

ANELISE IMPELIZIERI NOGUEIRA

**PERFIL CIRCULANTE DOS
COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA EM GESTANTES
NORMAIS E PORTADORAS DE
DIABETES TIPO 1 E
DIABETES GESTACIONAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
Belo Horizonte-MG.
2005**

ANELISE IMPELIZIERI NOGUEIRA

**PERFIL CIRCULANTE DOS
COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA EM GESTANTES
NORMAIS E PORTADORAS DE
DIABETES TIPO 1 E
DIABETES GESTACIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Antônio Carlos Vieira Cabral

Co-orientador: Prof. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
Belo Horizonte-MG.
2005

RESUMO

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem demonstrado sua grande importância na fisiopatogenia das complicações do diabetes. Sabe-se que durante a gestação ele se encontra fisiologicamente ativado, porém pouco se conhece sobre ele durante a gestação de portadoras dos diabetes tipo 1 e gestacional. A gestação pode exacerbar as complicações crônicas relacionadas ao diabetes, além de tornar as diabéticas mais propensas ao desenvolvimento da pré-eclâmpsia, um distúrbio hipertensivo da gravidez, também vinculado a alterações do sistema renina-angiotensina. O diabetes gestacional é considerado um modelo de estudo para diabetes tipo 2, já que essas mulheres apresentam alto risco de desenvolvê-lo alguns anos após a gestação e, segundo alguns autores, já mostram disfunção endotelial após o parto mesmo com níveis glicêmicos dentro da normalidade. A proposta deste estudo foi conhecer o perfil circulante do sistema renina-angiotensina em grávidas, normotensas, portadoras de diabetes tipo 1, sem complicações crônicas, com bom controle glicêmico e diabetes gestacional comparando-as com mulheres não-grávidas e grávidas sem co-morbidades. As pacientes foram divididas em seis grupos: o primeiro de não-grávidas e não-diabéticas; o segundo de grávidas e não-diabéticas; o terceiro de não-grávidas e diabéticas tipo 1; o quarto de grávidas e diabéticas tipo 1; o quinto de portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta; e o sexto de portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina. Foram realizadas consultas freqüentes em ambulatórios de endocrinologia e obstetrícia e selecionadas as sem hipertensão ou complicações do diabetes para o estudo do sistema renina-angiotensina, que constou da dosagem das angiotensinas circulantes: ANG I, ANG II e ANG-(1-7) e da atividade da renina plasmática (ARP). Entre as não-grávidas, aquelas com diabetes tipo 1 apresentaram níveis elevados de ANG I e ARP ($p < 0,05$), quando comparadas às sem diabetes. Na gravidez, houve elevação das angiotensinas e ARP quando comparadas mulheres sem diabetes, não-grávidas e grávidas, indicando ativação fisiológica do sistema renina-angiotensina. Na gestação de diabéticas tipo 1, essa ativação foi ainda maior, no que se refere à ANG I e ANG-(1-7), sugerindo uma hiperativação destes componentes do sistema. Porém, em gestantes nesse grupo, houve ativação do sistema, como ocorreu nas gestantes normais, exceto pela falta de elevação dos níveis circulantes da ANG-(1-7) ($p < 0,05$). Esse dado foi confirmado pela relação ANG-(1-7) /ANG I, que também foi significativamente menor ($p < 0,05$). O sistema renina-angiotensina encontra-se fisiologicamente ativado durante a gestação, com equilíbrio entre as angiotensinas, porém, em diabéticas tipo 1 grávidas, a elevação mais acentuada da ANG-(1-7) pode estar associada à proteção endotelial vascular e/ou glomerular. Já as portadoras de diabetes gestacional apresentaram elevação significativa da ANG I, discreta elevação de ANG II e redução significativa de ANG-(1-7). Este último dado pode estar relacionado à persistência de disfunção endotelial observada nessas mulheres, inclusive após o parto, quando os níveis glicêmicos retornam ao normal. Este pode, inclusive, ser o elo de ligação entre diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e distúrbios cardiovasculares posteriores.

Palavras-chave: diabetes, gravidez, angiotensinas

SUMMARY

Renin Angiotensin System (RAS) has demonstrated its great importance in the pathogenesis of *diabetes mellitus* complications. During pregnancy RAS is physiologically activated but little is known about it in gestations associated with gestational diabetes or preexistent type I diabetes. Pregnancy can worsen the complications related to diabetes. Preeclampsia, an hypertensive disease of pregnancy also linked to RAS changes, is more frequent in diabetic patients. Gestational diabetes is considered a model for the study of type II diabetes since these women show high risk of becoming diabetic later in life and, as demonstrated by some authors, endothelial dysfunctions are present after labor even with normal glycemic levels. The objective of this study was to evaluate the circulating profile of RAS in non-hypertensive pregnancies in women with type I diabetes or gestational diabetes, with good glycemic control and absence of complications and compare them to non-pregnant and pregnant women with and without diabetes. The patients were distributed in six groups: 1) non-pregnant and non-diabetics; 2) pregnant and non-diabetics; 3) non-pregnant with type I diabetes; 4) pregnant with type I diabetes; 5) patients with gestational diabetes controlled with diet and 6) patients with gestational diabetes controlled with insulin. Frequent consultations were realized in endocrinological and obstetrical ambulatories where selection of patients was accomplished. The RAS evaluation was made by plasma measurement of ANG I, ANG II, ANG-(1-7) and Plasmatic Renin Activity (PRA). Among the non-pregnant women, the type I diabetic showed elevated ANG I and PRA levels when compared to the non-diabetic ($p < 0,05$). In pregnancy, there were higher levels of angiotensins and PRA when compared to non-diabetic women, non-pregnant and pregnant, suggesting physiological activation of RAS. In pregnancies of type I diabetics the activation of ANG I and ANG-(1-7) was even higher, showing hyperactivation of these RAS components. In this group, however, there was RAS activation, as occurred in normal pregnant, in exception of lack of elevation of ANG-(1-7) levels ($p < 0,05$). This observation was confirmed by the significantly lower ANG-(1-7) /ANG I relation ($p < 0,05$). RAS is physiologically activated during pregnancy, with equilibrium among the angiotensins but, in pregnant type I diabetics, the higher elevation of ANG-(1-7) can be linked to endothelial and/or glomerular protection. In pregnant with gestational diabetes, there was significant elevation of ANG I, discrete elevation of ANG II and significant reduction of ANG-(1-7). This last finding can be related to the persistence of endothelial dysfunction observed in these women, including after labor, when glycemic levels return to normal. This can even be the link between gestational diabetes, preeclampsia and later cardiovascular dysfunction.

Keywords: diabetes, pregnancy, angiotensins.

Ao meu marido, LUIZ OTÁVIO, pelo estímulo, apoio e compreensão e pela colaboração em todos os passos desta e de todas as jornadas.

Às minhas filhas queridas, MARINA e LUÍSA, por representarem o sentido maior de tudo e para que me perdoem pelos momentos de ausência resultantes dos esforços para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, WALMIR e WANDA: por tudo!!!!!!

Aos meus irmãos, pelo companheirismo e carinho que nos unem.

AGRADECIMENTOS

Ao professor ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL, pelo estímulo durante a realização do curso e na orientação deste trabalho.

Ao professor ANTÔNIO RIBEIRO DE OLIVEIRA JÚNIOR, pelo incentivo, orientação, paciência, carinho e ensinamentos.

Ao professor ROBSON AUGUSTO DOS SANTOS, por ter me acolhido, ensinado e orientado.

À professora ANA CRISTINA SIMÕES SILVA, pela disponibilidade e imprescindível colaboração na elaboração deste estudo.

À THAÍS, pelo estímulo, dedicação, carinho e pela colaboração diária que sempre me dispensou.

À amiga RENATA e BETH VELLOSO, pelo apoio e imprescindível colaboração.

Ao professor LEONARDO DINIZ, mestre e amigo, pela contribuição à minha formação endocrinológica e pela colaboração inestimável para a minha formação não só profissional como humana.

À professora REGINA AGUIAR, pela disponibilidade, apoio e carinho dispensados desde o início da realização de nosso trabalho.

À MAGDA, pelo imenso apoio, carinho e dedicação na correção desta tese.

À enfermeira IVONE e a toda a equipe do Serviço de Endocrinologia, pela dedicação incansável às pacientes e pela ajuda na condução dos atendimentos que possibilitaram este estudo.

Aos RESIDENTES DOS SERVIÇOS DE OBSTETRÍCIA E ENDOCRINOLOGIA, pelo interesse e pela colaboração no acompanhamento às pacientes.

À equipe de endocrinologia do HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG, pelo estímulo constante e pela torcida e apoio durante esta caminhada.

À CAMILA CARAM, responsável pela análise estatística. Obrigada pelos ensinamentos e paciência.

Ao Dr GUSTAVO CASTILHO, pela ajuda na seleção das pacientes.

À THALITA, pela ajuda na coleta das angiotensinas.

Ao SÉRGIO VELOSO, mais novo professor desta faculdade, obrigada pelo apoio.

Às muitas outras pessoas que, embora não mencionadas nominalmente, ajudaram de maneira fundamental a torná-lo possível.

*"Vivendo se aprende; mas, o que se aprende
mais é só a fazer outras maiores perguntas"*

JOÃO GUIMARÃES ROSA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 O sistema renina-angiotensina.....	21
2.1.1 Aspectos relevantes dos componentes do sistema renina-angiotensina.....	25
2.1.1.1 Angiotensinogênio.....	25
2.1.1.2 Renina.....	26
2.1.1.3 Enzimas conversoras da angiotensina.....	29
2.1.1.4 Angiotensina II.....	32
2.1.1.5 Angiotensina-(1-7).....	36
2.2 Interação sistema renina-angiotensina <i>versus</i> sistema caliceína-cinina	39
2.3 Interação entre endotélio–sistema renina-angiotensina sistema caliceína-cinina – insulina.....	40
2.4 Fisiologia da gravidez e sistema renina-angiotensina na gestação.....	51
2.4.1 Ajustes e interações do sistema renina-angiotensina durante a gravidez e sua ativação fisiológica.....	54
2.5 Diabetes.....	59
2.6 O sistema renina-angiotensina e o diabetes	62
2.7 O sistema renina-angiotensina e o diabetes e o endotélio.....	67
3 OBJETIVOS.....	71
3.1 Objetivo geral.....	72
3.2 Objetivos específicos.....	72
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	73
4.1 Pacientes.....	74
4.1.1 Faixa etária.....	74
4.1.2 Procedência das gestantes.....	74
4.1.3 Grupos observacionais (controle e estudo).....	74
4.1.4 Características dos grupos estudados.....	75
4.1.5 Critérios de inclusão.....	76
4.1.6 Critérios de exclusão.....	78
4.1.6.1. Exclusão de pacientes.....	79
4.1.7 Aspectos éticos.....	80
4.2 Métodos.....	80
4.2.1 Termo de consentimento.....	80
4.2.2 Exames.....	81
4.2.3. Protocolo de acompanhamento.....	81
4.2.3.1 Grupo 1: não-grávidas e não-diabéticas.....	81
4.2.3.2 Grupo 2: grávidas e não-diabéticas.....	82
4.2.3.3 Grupo 3: não-grávidas e diabéticas tipo 1.....	82
4.2.3.4 Grupo 4: grávidas e diabéticas tipo 1.....	83
4.2.3.5 Grupo 5: gestantes portadoras diabetes gestacional com dieta.....	83
4.2.3.6 Grupo 6: gestantes portadoras diabetes gestacional com insulina.....	84
4.2.4 Protocolo do estudo.....	85

4.2.5 Radioimunoensaio.....	86
4.3 Protocolo geral.....	88
4.4 Cálculo do tamanho da amostra.....	99
4.5 Desenho do estudo.....	100
4.6 Análise estatística.....	101
5 RESULTADOS.....	103
5.1 Características dos grupos de pacientes estudadas.....	104
5.1.1 Idade.....	104
5.1.2 Índice de massa corporal.....	104
5.1.3 Idade gestacional.....	104
5.1.4. Tempo de diabetes.....	105
5.1.5 Uso de insulina.....	105
5.1.6 Dados perinatais.....	106
5.2 Angiotensinas e atividade da renina plasmática.....	108
5.2.1 Análise individual dos resultados.....	108
5.2.1.1 Grupo 1 controle: mulheres não-grávidas e não-diabéticas.....	108
5.2.1.2 Grupo 2: gestantes não diabéticas.....	110
5.2.1.3 Grupo 3: mulheres diabéticas tipo 1 não-grávidas.....	115
5.2.1.4 Grupo 4: diabéticas tipo 1 grávidas.....	116
5.2.1.5 Gestantes portadoras de diabetes gestacional.....	119
5.2.1.5.1 Grupo 5: gestantes portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta.....	119
5.2.1.5.2 Grupo 6: gestantes portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina.....	120
5.2.2 Avaliação do SRA em gestantes com diabetes gestacional, comparadas com mulheres normais e não-grávidas.....	120
5.2.3 Comparação da interferência do diabetes gestacional no SRA circulante entre grávidas com e sem diabetes gestacional.....	124
5.3 Análise dos resultados comparando todos os grupos estudados.....	127
5.3.1 Avaliação comparativa da angiotensina I em todos os grupos.....	127
5.3.2 Avaliação comparativa da angiotensina II em todos os grupos.....	129
5.3.3 Avaliação comparativa da angiotensina-(1-7) em todos os grupos.....	129
5.3.4 Avaliação comparativa da atividade da renina plasmática em todos os grupos.....	131
5.3.5. A avaliação comparativa da angiotensina 1-7/Ang I em todos os grupos..	132
5.3.6 Avaliação comparativa da angiotensina II /Ang(1-7) em todos os grupos.	134
6 DISCUSSÃO.....	136
6.1 Grupo 1: não-grávidas e não-diabéticas.....	137
6.2 Grupo 2: grávidas e não-diabéticas.....	139
6.3 Grupo 3: não-grávidas diabéticas tipo 1.....	140
6.4 Grupo 4: grávidas portadoras de diabetes tipo 1.....	146
6.5 Grupo 5: grávidas portadoras de diabetes gestacional.....	152
7 CONCLUSÕES.....	161
REFERÊNCIAS.....	163

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figuras

FIGURA 1 - O sistema renina-angiotensina clássico.....	23
FIGURA 2 - Representação esquemática do sistema renina-angiotensina e seus novos componentes.....	25
FIGURA 3 - Cascata enzimática resumida do sistema calicreína-cinina (SCC)..	40
FIGURA 4 - Possíveis vias de atuação da angiotensina (1-7).....	44
FIGURA 5 - Via de sinalização da insulina que acarreta ativação da eNOS e aumento da produção de óxido nítrico no endotélio.....	46
FIGURA 6 - Estimulação da via MAP-k pela ANG II no endotélio e nas células musculares lisas vasculares.....	47
FIGURA 7 - Interação entre os sistema renina-angiotensina – sistema calicreína cinina – vias de sinalização da insulina.....	50
FIGURA 8 - Perfil circulante do sistema renina-angiotensina na gestação.....	57

Gráficos

GRÁFICO 1 - Distribuição das concentrações circulantes de angiotensinas em mulheres não-grávidas e não-diabéticas.....	110
GRÁFICO 2 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de Ang I entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.....	112
GRÁFICO 3 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de Ang II, entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.....	112
GRÁFICO 4 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de ANG-(1-7) entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.....	113
GRÁFICO 5 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de ARP entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.....	113
GRÁFICO 6 - Análise comparativa das medianas das razões de Ang-(1-7) /Ang I entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.....	114
GRÁFICO 7 - Análise comparativa das medianas das razões de Ang II /Ang - (1-7) entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.....	114
GRÁFICOS 8, 9, 10, 11 - Interferência do diabetes tipo 1 nas concentrações de angiotensinas circulantes e atividade da renina plasmática entre mulheres fora da gravidez, em mulheres com e sem diabetes tipo 1.....	116
GRÁFICO 12 - Análise da interferência da gravidez nas concentrações circulantes das angiotensinas I, II e (1-7) entre mulheres diabéticas tipo 1, não-grávidas e grávidas.....	118
GRÁFICO 13 - Análise comparativa da interferência do diabetes tipo 1 nas concentrações circulantes das angiotensinas I, II e (1-7) na gravidez.....	118
GRÁFICO 14 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG I (Angiotensina I) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).....	121
GRÁFICO 15 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de	

ANG I (Angiotensina I) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).....	121
GRÁFICO 16 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG-(1-7) [Angiotensina-(1-7)] quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).....	122
GRÁFICO 17 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis da ARP (atividade da renina plasmática) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).....	122
GRÁFICO 18 - Interferência do diabetes gestacional na relação de ANG-(1-7) /ANG I quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).....	123
GRÁFICO 19 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG II / ANG-(1-7) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).....	123
GRÁFICO 20 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG I entre grávidas com e sem diabetes gestacional.....	124
GRÁFICO 21 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG II entre grávidas com e sem diabetes gestacional.....	125
GRÁFICO 22 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG-(1-7) entre grávidas com e sem diabetes gestacional.....	125
GRÁFICO 23 - Interferência do diabetes gestacional na atividade da renina plasmática (ARP) entre grávidas com e sem diabetes gestacional.....	126
GRÁFICO 24 - Interferência do diabetes gestacional na relação ANG-(1-7) /ANG I quando comparadas mulheres grávidas com e sem diabetes gestacional.....	126
GRÁFICO 25 - Interferência do diabetes gestacional na relação ANG-(1-7) /ANG I quando comparadas mulheres grávidas com e sem diabetes gestacional.....	127
GRÁFICO 26 - Níveis circulantes de angiotensina I em não-grávidas não-diabéticas.....	128
GRÁFICO 27 - Níveis circulantes de angiotensina II em não-grávidas, não-diabéticas, grávidas não-diabéticas, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina.....	129
GRÁFICO 28 - Níveis circulantes de angiotensina-(1-7) em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) $n = 12$, grávidas não-diabéticas (GND) $n = 13$, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) $n = 12$, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) $n = 15$, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) $n = 15$ e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) $n = 9$	131
GRÁFICO 29 - Comparação da atividade da renina plasmática em não-	

grávidas, não-diabéticas (NGND) n =12, grávidas não-diabéticas (GND), não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) n =13, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) n =13, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) n =15 e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) n =8.....	132
GRÁFICO 30 - Relação entre as medianas da ANG-(1-7) /ANG I em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) n = 12, grávidas não-diabéticas (GND) n =13, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) n =12, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) n =15, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) n = 12 e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) n = 9.....	133
GRÁFICO 31 - Comparação da razão entre ANG II /ANG-(1-7) entre os grupos estudados.....	134
GRÁFICOS 32, 33, 34 e 35 - Distribuição dos grupos quanto a: 1- idade gestacional à época da coleta das angiotensinas e ARP; 2- índice de massa corporal; 3- idade; 4- tempo de diabetes.....	189
Tabelas	
TABELA 1 - Composição do coquetel de inibidores de angiotensinases.....	89
TABELA 2 - Tratamento da amostra para determinação da atividade da renina plasmática.....	92
TABELA 3 - Soluções e seus respectivos volumes utilizados para o radioimunoensaio e angiotensina I.....	94
TABELA 4 - Soluções e seus respectivos volumes utilizados para o radioimunoensaio de angiotensina II.....	96
TABELA 5 - Soluções e seus respectivos volumes utilizados para o radioimunoensaio de angiotensina-(1-7).....	98
TABELA 6 - Características dos grupos estudados.....	105
TABELA 7 - Dados perinatais nos grupos de gestantes, ou seja, grupos 2,4 e 5	107
TABELA 8 - Idade em todos os grupos estudados, expressa em anos.....	187
TABELA 9 - Índice de massa corporal em todos os grupos, expresso através da fórmula peso/(alt) ²	187
TABELA 10 - Idade gestacional. expressa em semanas de gestação.....	187
TABELA 11 - Tempo de diabetes nos grupos de pacientes diabéticas tipo 1.....	188
TABELA 12 - Angiotensinas I, II e -(1-7) e atividade da renina plasmática nos grupos estudados.....	188
TABELA 13 - Comparação das relações.....	190
TABELA 14 - Comparação entre diabéticas e não-diabéticas.....	190

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES
ANG	ANGIOTENSINA
ANP	PEPTÍDEO ATRIAL NATRIURÉTICO
ARP	ATIVIDADE DA RENINA PLASMÁTICA
AT	RECEPTOR DA DO TIPO ANGIOTENSINA
BK	BRADICININA
BNP	PEPTÍDEO CEREBRAL NATRIURÉTICO
BSA	ALBUMINA SOROBOVINA
CAGE	“CHYMOSTATIN-SENSITIVE ANGIOTENSIN II – GENERATING ENZYME”
COEP	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COX	CICLOXIGENASE
DCCT	“DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL”
DM	DIABETES <i>MELLITUS</i>
DMG	DIABETES <i>MELLITUS</i> GESTACIONAL
ECA	ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA
EDTA	ÁCIDO ETILEDODIAMINO TETRA ACÉTICO
eNOS	SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL
EPM	ERRO-PADRÃO DA MÉDIA
ET1	ENDOTELINA 1
GDMG	GRÁVIDA COM DIABETES GESTACIONAL
GDMG2	DIABETES GESTACIONAL CONTROLADO COM INSULINA
GDM1	GRÁVIDA E DIABÉTICA TIPO 1
GLUT	TRANSPORTADOR DE GLICOSE
GND	GRÁVIDA E NÃO-DIABÉTICA
Hb A1c	GLICOHEMOGLOBINA
HCG	HORMÔNIO LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO
HCL	ÁCIDO CLORÍDRICO
HDL	“HIGH DENSITY LIPOPROTEIN”
HPL	HORMÔNIO LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO
ICAM-1	MOLÉCULA DE ADESÃO INTRACELULAR-1
ICB	INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMC	ÍNDICE DE MASSA CORPORAL
IP3	INOSITOL TRIFOSFATO
IRS-1	SUBSTRATO-1 DO RECEPTOR DA INSULINA
LDL	LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE
LH	HORMÔNIO LUTEINIZANTE
MAP	PROTEÍNA ATIVADORA MITOGÊNICA
MAP-K	“MITOGEN ACTIVATED PROTEIN-KINASE”
MAS	RECEPTOR ESPECÍFICO DA ANGIOTENSINA
MCP-1	“MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1”
MEOH	METANOL
mRNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAGEIRO
NaCl	CLORETO DE SÓDIO
NGND	NÃO-GRÁVIDA E NÃO-DIABÉTICA
NEP	NEUTRAL ENDOPEPTIDASE

NGDM1	NÃO-GRÁVIDA E DIABÉTICA TIPO 1
NO	ÓXIDO NÍTRICO
PDK-1	SERINO QUINASE DEPENDENTE DA FOSFOSITIDO-QUINASE-1
P13K	FOSFOINOSITOL 3 QUINASE
PAI-1	“PLASMINOGEN ACTIVADOR INHIBITOR-1”
PEP	PROLIL ENDOPEPTIDASE
PGE	PROSTAGLANDINA
PI-3-QUINASE	FOSFADITILINOSITOL-3 QUINASE
PMSF	PARA-METILSULFONIL FLUORETO
pOHHgBz	PARA-HIDROXIMERCÚRIO-BENZOATO
RIE	RADIOIMUNOENSAIO
SCC	SISTEMA CALICREÍNA-CININA
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SRA	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA
TFA	ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO
TGF β	FATOR DE CRESCIMENTO β
TXA2	TROMBOXANO A2
UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
VCAM-1	“VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE 1”
VEGF	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR
VSMC	CRESCIMENTO DA MUSCULATURA LISA VASCULAR

1 INTRODUÇÃO

O meu interesse pelo tema diabetes e gravidez teve início há 15 anos, quando um ambulatório específico para atendimento às gestantes diabéticas foi criado em nossa Instituição, no Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas. Desde aquela época meu contato com a Obstetrícia foi intenso e constante, sobre a qual fui aprendendo cada vez mais a ponto de surgir o convite para o doutorado, advindo do meu orientador Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral, tendo como foco principal as gestantes diabéticas. Foi nesse contexto que surgiu a proposta de estudo do sistema renina-angiotensina em gestantes portadoras de diabetes, através das pesquisas e conhecimento dos professores Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior e Ana Cristina Simões e Silva, em parceria com o Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), onde fui tão bem recebida pelo prof. Robson Augusto dos Santos.

Em gestantes com diabetes, chama a atenção o grande número de complicações com as quais lidamos no dia-a-dia, especialmente as vinculadas ao sistema cardiovascular, como a hipertensão, que se exacerba durante a gestação, a pré-eclâmpsia, a piora dos distúrbios micro e macrovasculares preexistentes e, naquelas com diabetes gestacional, a obesidade, dislipidemia, o risco muito alto de pré-eclâmpsia e a persistência no pós-parto, em muitas dessas gestantes, de intolerância a carboidratos e da hipertensão, além, ainda, do desenvolvimento do diabetes tipo 2 no futuro. Desta forma, lidar com gestantes diabéticas passou a ser um grande desafio e um aprendizado contínuo.

Em nosso serviço, as pacientes já sabidamente diabéticas que desejam engravidar são atendidas antes da gestação, preparando-se no Ambulatório de Pré-concepção e, ao

engravidar, mantêm o acompanhamento no Ambulatório de Endocrinopatias da gestação, onde nosso contato é intenso e muito próximo.

Durante a gestação normal, a angiotensina II (ANG II) encontra-se aumentada. Como ela exerce ação vasopressora aumentando o tônus vascular, espera-se que haja elevação nos níveis pressóricos durante a gestação. Entretanto, esse efeito esperado não acontece. Os vasos, de alguma forma, tornam-se refratários à ação da ANG II, ou seja, é necessário um aumento muito significativo na ANG II (cerca de duas ou mais vezes que no estado não-gravídico) para alcançar-se o mesmo grau de resposta vascular. Algumas evidências indiretas apontam a angiotensina-(1-7) [ANG (1-7)], um peptídeo com capacidade vasodilatadora, como um possível regulador cardiovascular durante a gestação. Acredita-se, atualmente, que na pré-eclâmpsia há perda do equilíbrio entre essas angiotensinas, pois, com níveis baixos de ANG-(1-7), os efeitos vasoconstritores da ANG II preponderam sobre os efeitos vasodilatadores da ANG-(1-7).

Diante do exposto, e com respaldo na literatura, optamos por estudar o perfil do sistema renina-angiotensina em gestantes portadoras de diabetes tipo 1 e naquelas com diabetes gestacional, estas últimas consideradas hoje um modelo de estudo para diabetes tipo 2 por apresentarem precocemente alterações da síndrome de resistência insulínica. Estudos sobre o assunto vêm sendo realizados cada vez com mais frequência, pois cresce o interesse de se determinarem marcadores precoces e até mesmo de compreender melhor o diabetes tipo 2 e sua associação com aterogênese e doenças cardiovasculares. Além disto, esse grupo de gestantes encontra-se sob risco aumentado de desenvolver pré-eclâmpsia, entidade cuja patogenia encontra-se altamente vinculada a alterações no sistema renina-angiotensina.

Além disto, interações entre ANG-(1-7), cininas, ANG II e insulina têm surgido em inúmeros trabalhos da literatura, estimulando a avaliação dessas inter-relações em pacientes grávidas, especialmente gestantes com diabetes tipo 1, e aquelas com diabetes gestacional, por tratar-se de diabetes de etiopatogenias tão distintas.

Como pouco é conhecido a respeito do perfil e das relações dessas angiotensinas durante a gestação de mulheres com diabetes tipo 1 e diabetes gestacional, optamos por avaliar o sistema renina-angiotensina nessas gestantes.

2 LITERATURA

2. 1 O sistema renina-angiotensina

Corresponde a um complexo sistema hormonal e parácrino que desempenha importante papel na manutenção da homeostasia hidroeletrolítica do organismo e no controle da pressão arterial (BADER *et al.*, 1994; NIELSEN; SCHAUSER; POULSEN, 2000).

Apesar do sistema renina-angiotensina (SRA) ser conhecido há mais de três décadas, descobertas recentes em biologia celular e molecular, assim como fisiologia cardiovascular e renal, têm introduzido maior entendimento sobre ele em situações fisiológicas e em diversas doenças. O SRA tem sido associado à fisiopatologia de inúmeras doenças (GRIENDLING; MURPHY; ALEXANDER, 1993), como hipertensão e pré-eclâmpsia, cardiopatia hipertrófica e insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e várias doenças renais progressivas, especialmente a nefropatia diabética (JANDELEIT-DAHM e COOPER, 2002; CAREY e SIRAGY, 2003a). Por essa razão, nas últimas décadas, inúmeros estudos vêm sendo realizados no intuito de melhorar a compreensão dos mecanismos celulares, moleculares e circulantes dos componentes desse sistema.

A história da descoberta do SRA iniciou-se em 1898 com os estudos de Tigersted e Bergman (*apud* BASSO e TERRAGNO, 2001), que descreveram os efeitos da renina, uma substância capaz de elevar a pressão arterial quando injetada em animais. Somente em 1934, no entanto, com os estudos de Harry Goldblatt (BASSO e

TERRAGNO, 2001), foi-lhe atribuída uma participação em modelos experimentais de hipertensão renal (*apud* SKEGGS, 1993).

Braun-Menéndez e Irving Page, em 1940, demonstraram que o efeito pressor da renina era indireto e resultante de sua ação enzimática sobre proteínas plasmáticas. Essa substância pressora formada pela renina foi chamada angiotensina (*apud* BASSO e TERRAGNO, 2001).

Em 1954, Skeggs *et al.* identificaram duas formas de angiotensinas (ANG), a angiotensina I (ANG I) e a angiotensina II (ANG II). A clivagem dos dois aminoácidos da porção aminoterminal (His-Leu) do decapeptídeo ANG I pela ação de uma enzima conversora da angiotensina (ECA) gerava o octapeptídeo ANG II (*apud* SKEGGS, 1993). A partir dos estudos de Helmer, foi demonstrado que a ANG II era o agente pressor envolvido nos experimentos descritos anteriormente.

Desta forma, o SRA clássico (FIG. 1) é considerado sistema endócrino cuja substância ativa, a angiotensina II (ANG II), é produzida por clivagem seqüencial enzimática dupla a partir do substrato angiotensinogênio de origem hepática. Na circulação sangüínea, a renina, uma protease altamente específica, converte o angiotensinogênio circulante em octapeptídeo ANG I (PEACH, 1977). A conversão da ANG I em ANG II, assim como a inativação da bradicinina (BK), ocorre pela ação da ECA presente principalmente nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar (CAREY e SIRAGY, 2003b).

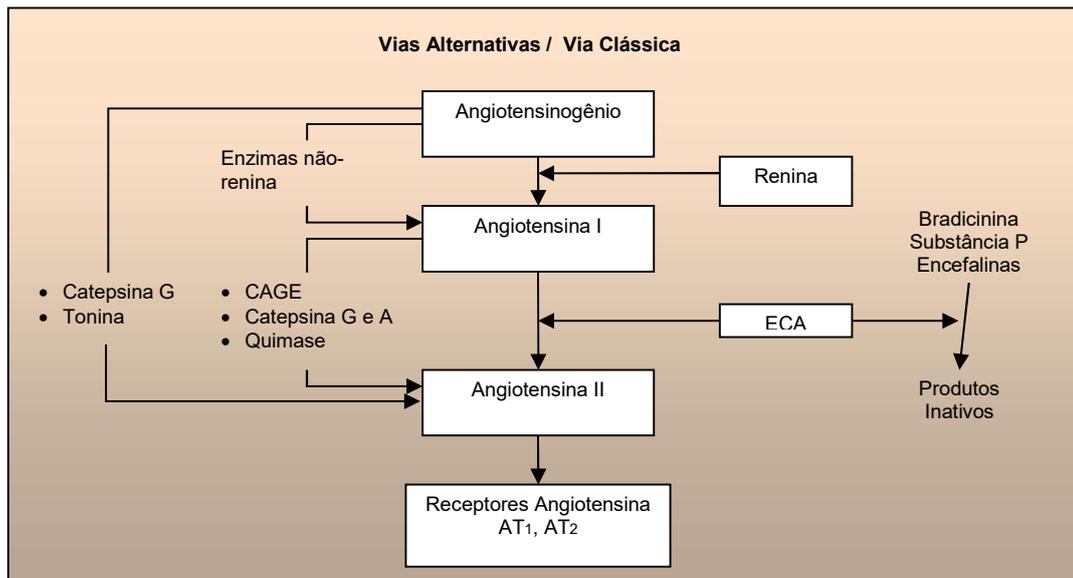


FIGURA 1 - O sistema renina-angiotensina clássico.

ECA= enzima conversora da angiotensina, AT1=receptores tipo 1 da angiotensina II, AT2=receptores tipo 2 da angiotensina II; CAGE="Chymostatin-sensitive Angiotensin II-generating enzyme".

Entre as décadas de 60 e 70, Ryan (1967) e Ganten *et al.* (1971) demonstraram a presença de renina em tecidos como adrenais e cérebro (*apud* GANTEN *et al.*, 1983), porém as primeiras observações do SRA intra-renal foram demonstradas mais tarde e apresentam grande importância na nefropatia diabética.

Boucher *et al.* (1974, *apud* CAREY e SIRAGY, 2003a) demonstraram pela primeira vez que todos os componentes do SRA podiam ser produzidos localmente em vários órgãos e tecidos. Assim, as ações locais do SRA poderiam ocorrer na célula que produz os peptídeos (funções intrácina e autócrina), sobre células vizinhas (função parácrina) ou em sítios distantes do local de produção (função endócrina) - (TAHMASEBI; PUDDEFOOT; INNANG, 1999).

Os vários sistemas renina-angiotensina distribuídos em diferentes locais como coração, vasos sanguíneos, medula adrenal, sistema nervoso, órgãos reprodutores, placenta, entre outros (CAREY e SIRAGY, 2003a) possuem ação complementar ao SRA clássico. Têm sua importância ligada ao fato de exercerem efeitos diretamente sobre os mecanismos regulatórios locais, que contribuem para um grande número de mecanismos homeostáticos teciduais de desenvolvimento mais lento, porém de caráter mais permanente, como o crescimento celular, formação da matriz dos tecidos, proliferação vascular, modulação da função do endotélio e controle do processo de apoptose, particularmente na fase de desenvolvimento embrionário (RE, 2004) - (FIG. 2).

Algumas das dificuldades de se estudar o SRA encontram-se exatamente nessa questão, pois, muitas vezes, torna-se confuso diferenciar entre um produto do SRA produzido localmente e aquele produzido sistemicamente (LAVOIE e SIGMUND, 2003; BREWSTER e PERAZELLA, 2004). Inúmeros estudos, no entanto, demonstraram a validade da dosagem das angiotensinas circulantes (HANSSENS *et al.*, 1991a e b; SANTOS *et al.*, 2001).

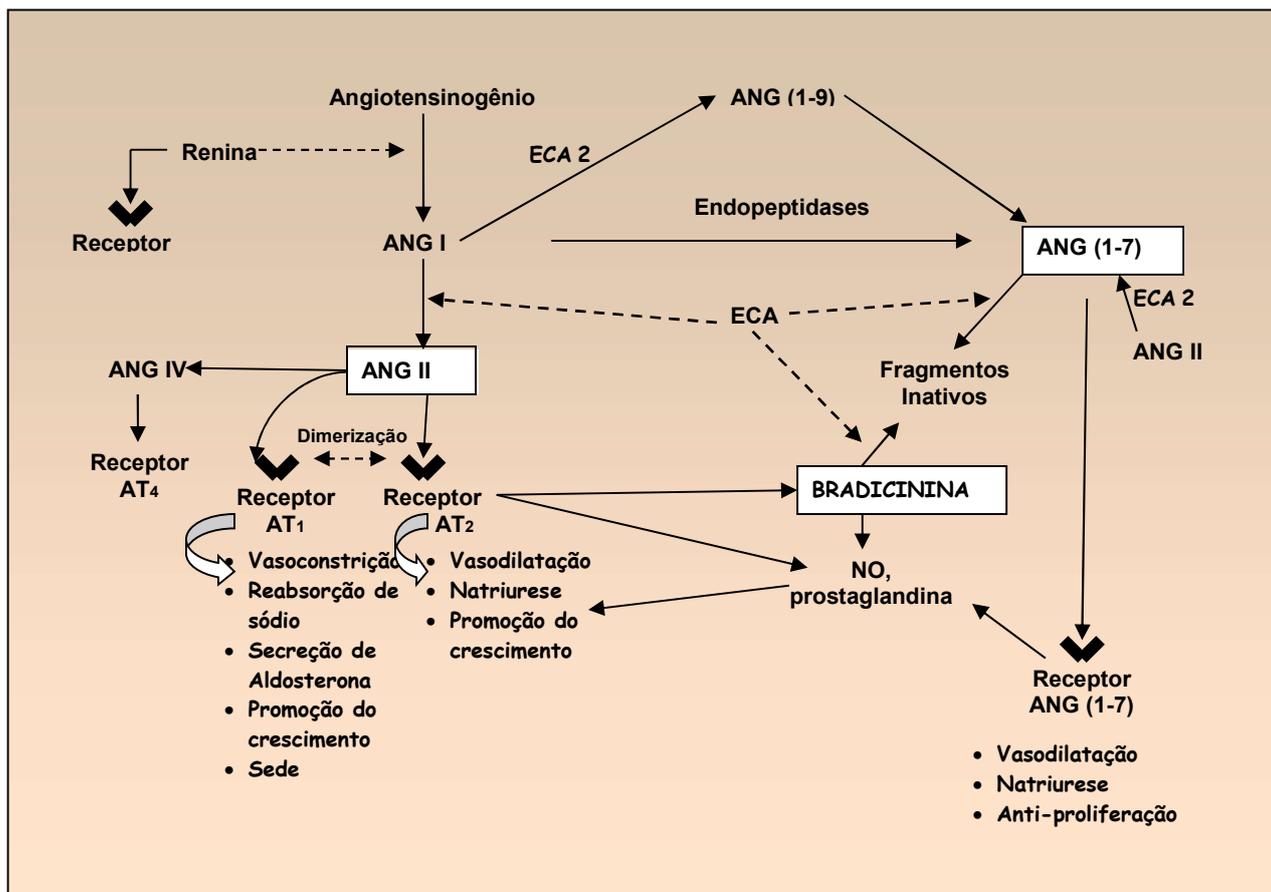


FIGURA 2 - Representação esquemática do sistema renina-angiotensina e seus novos componentes.

ANG I e ANG II= Angiotensinas I e II, AT1 e AT2= Receptores tipo 1 e tipo 2 das Angiotensinas I e II, NO= Óxido Nítrico, ECA= Enzima conversora da angiotensina, Linhas sólidas indicam vias bioquímicas ou interações com receptor; linhas pontilhadas indicam atividade enzimática ou heterodimerização. Adaptado de CAREY E SIRAGY (2003a).

2.1.1 Aspectos relevantes dos componentes do sistema renina-angiotensina

2.1.1.1 Angiotensinogênio

O angiotensinogênio é uma glicoproteína formada por 452 aminoácidos, precursor dos peptídeos angiotensinérgicos, produzido no fígado e em vários outros tecidos (incluindo o coração, vasos, rins e tecido adiposo) e circula no plasma como um

peptídeo biologicamente inativo. Pela ação da renina, ele é convertido em angiotensina I, dando início à cascata do SRA (JARAMILLO *et al.*, 1987). Tem concentração plasmática variada e sua síntese pode ser aumentada por diversos estímulos, como glicocorticóides, hormônios tireoidianos, estrógenos, hiperglicemia, hiperinsulinemia (MILLER *et al.*, 1996) e pela ANG II. Altos níveis plasmáticos de angiotensinogênio foram medidos em pacientes geneticamente predispostos à hipertensão arterial (WARD *et al.*, 1993). Estudos recentes sugeriram que polimorfismos no gen do angiotensinogênio podem exercer importante papel causal no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais, especialmente a pré-eclâmpsia (GRIENDLING; MURPHY; ALEXANDER, 1993).

2.1.1.2. Renina

A renina é uma enzima que ocorre no sangue na forma ativa e inativa ou pró-renina (SEALEY *et al.*, 1991). A pró-renina, o precursor da renina, apresenta uma fraca atividade e é responsável pela maior parte da renina circulante (HSUEH *et al.*, 1978). A renina é sintetizada, armazenada e secretada pelas células juxtaglomerulares do córtex renal e por vários outros tecidos, porém a maior parte da renina circulante parece ser de origem renal (SEALEY *et al.*, 1977). Enzimas ativadoras da pró-renina estão presentes nos neutrófilos, células endoteliais e rins (LINDPAINNER e GANTEN, 1991). A renina ativa é liberada das células juxtaglomerulares por um processo de exocitose, porém, a pró-renina também é liberada e convertida em renina ativa por uma enzima ativadora semelhante à tripsina (PEACH, 1977).

A renina cliva seu substrato, o angiotensinogênio, para produzir um decapeptídeo, ANG I, que é rapidamente convertida em ANG II pela ECA nos pulmões, endotélio vascular e outros tecidos para formar o octapeptídeo ativo (BADER *et al.*, 1994).

A secreção de renina pelas células juxtaglomerulares é controlada por três mecanismos básicos (PRATT *et al.*, 1987; HACKENTHAL *et al.*, 1990), dois que agem predominantemente nos rins e o terceiro que age através do sistema nervoso central (SNC) e é mediado pela liberação de noradrenalina pelos nervos noradrenérgicos renais. O primeiro mecanismo é controlado pela mácula densa, ou seja, o aumento de fluxo de cloreto de sódio (NaCl) através da mácula densa inibe a liberação de renina e reduções do fluxo de NaCl estimulam sua liberação. O segundo mecanismo é regulado pelos barorreceptores intra-renais, pois aumentos e reduções da pressão sanguínea nesses vasos inibem e estimulam, respectivamente, a liberação de renina. Acredita-se que o estímulo imediato para a secreção seja uma redução na tensão da parede da arteríola aferente, o que talvez controle, em parte, o mecanismo baroreceptor intra-renal. O terceiro mecanismo, regulado pelos receptores β adrenérgicos, é mediado pela liberação de noradrenalina das terminações dos nervos simpáticos pós-ganglionares. A ativação desses receptores nas células juxtaglomerulares aumenta a secreção de renina (KEETON e CAMPBELL, 1981).

Os três mecanismos que regulam a secreção de renina estão interligados, constituindo uma rede fisiológica (DAVIS e FREEMAN, 1976). Elevações da secreção de renina aumentam a formação de ANG II que, interagindo com seus receptores renais, inibe

a secreção de renina. Esse sistema é denominado mecanismo de “feedback” negativo de alça curta (HACKENTHAL *et al.*, 1990).

Além disto, aumento na pressão sanguínea inibe a liberação de renina por vários mecanismos: ativação dos barorreceptores carotídeos e aórticos, que reduzem o tônus simpático renal; aumento da pressão nos vasos pré-glomerulares; e redução na reabsorção de sódio no túbulo proximal (natriurese pressórica), aumentando a liberação tubular de sódio para a mácula densa (SEALEY *et al.*, 1976). Esses mecanismos são chamados “feedback” negativo de alça longa.

Fatores que reduzem o aporte sanguíneo renal, como hemorragia e desidratação, aumentam os níveis de renina. Em contraste, fatores que fazem a pressão sanguínea subir (como mais consumo de sal e vasoconstrição periférica) diminuem os níveis de renina circulante (RIBEIRO *et al.*, 1985).

Recentemente, NGUYEN *et al.* (2002) descreveram a existência de um receptor funcional para a renina, localizado no mesângio glomerular. Esse receptor realiza uma ligação entre sinalizadores intracelulares por ativar a via proteína ativadora mitogênica (MAP) quinase, facilitando a geração e ação de ANG II na superfície celular. Esses achados enfatizam o papel do endotélio celular na gênese da ANG II (SIGMON; CARRETERO; BEIERWALTES, 1992).

Uma vez que a produção e secreção da renina são fortemente influenciadas pela ingestão alimentar de sódio e pela postura e atividade física, as determinações de

renina plasmática devem ser interpretadas com cautela e levar em consideração todos esses parâmetros. Além disto, a dosagem pode ser influenciada por inúmeros outros fatores como, técnica de coleta, forma de estocagem das amostras (pode ocorrer crioativação da renina a partir da pró-renina com conseqüente superestimação dos níveis de renina) e pela presença ou ausência de inúmeros inibidores durante a realização do ensaio (SEALEY *et al.*, 1991).

2.1.1.3 Enzimas conversoras da angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (ECA), ou cininase II, é inespecífica, cliva unidades de dipeptídeo de substratos com diferentes seqüências de aminoácidos e catalisa a remoção do dipeptídeo His-Leu da ANG I, dando origem à ANG II (FERRARIO, 2003). A ECA existe em duas formas: solúvel e ligada à membrana (ERDOS, 1975). É encontrada nas membranas plasmáticas de vários tipos de células, incluindo as endoteliais vasculares, tubulares renais e neuroepiteliais (PEACH, 1977; NATESH *et al.*, 2003).

Pode ser encontrada no plasma e também em diversos tecidos, como o endotélio vascular, cérebro, placenta, intestino, testículos (BADER *et al.*, 1994), túbulos renais e em altas concentrações nos vasos sanguíneos pulmonares. Por ser constituinte da membrana plasmática de células endoteliais, epiteliais, neuroepiteliais e neuronais, a ECA participa do metabolismo de peptídeos biologicamente ativos em tecidos, com importantes repercussões funcionais (FERRARIO, 2003). A conversão da ANG I em

ANG II é feita tanto pela ECA situada no endotélio vascular, como também pela enzima solúvel no plasma, que se desprende da membrana das células endoteliais (EHLERS e RIORDAN, 1990). Além disso, CHAPPELL *et al.* (1998a) demonstraram que a ECA purificada de membrana de pulmão de cães hidrolisa a ANG-(1-7), sugerindo uma dupla função para ela no processamento de peptídeos de angiotensina. Assim, ela estaria envolvida não somente na formação de ANG II, mas possivelmente no metabolismo da ANG-(1-7), conforme será descrito adiante. A posição chave dessa enzima no controle neuro-humoral da pressão arterial está fortemente documentada pela eficácia de seus inibidores no tratamento de diferentes formas de hipertensão, na insuficiência cardíaca e na nefropatia diabética (LEWIS *et al.*, 1993).

A ECA também atua metabolizando a BK, uma substância diurética e vasodilatadora, em BK (1-7), um metabólito inativo. Portanto, inibe a ação vasodilatadora da BK (PEACH, 1977). Desta forma, o uso clínico de inibidores da ECA, como captopril, enalapril e lisinopril, não apenas bloqueia os efeitos vasoconstritores (e hipervolêmicos) produzidos pela ANG II, mas também potencializa a vasodilatação induzida pela BK (HOOPER, 1991).

A clonagem de genes humanos codificadores para a ECA, angiotensinogênio e o receptor AT1 da angiotensina levaram à descoberta de vários polimorfismos que podem estar implicados na patogênese de várias doenças cardiovasculares (WARD, 1993).

A descoberta de uma nova enzima, a conversora da angiotensina 2 (ECA2), adicionou nova dimensão à complexidade do SRA (BROSNIHAN *et al.*, 2003). Essa enzima mostra uma homologia de aproximadamente 42% com ECA, mas com atividades bioquímicas diferentes é altamente específica para a clivagem de angiotensinas, sendo encontrada principalmente no coração, rins e testículos. A ECA2 é uma carboxipeptidase que exibe uma eficiência catalítica elevada para gerar ANG-(1-7), ao mesmo tempo em que inativa o receptor AT1 da ANG II. A ECA 2 quebra também um aminoácido da ANG I para gerar ANG-(1-9), que pode ser processada para ANG-(1-7) pela neprilisina e pela ECA. A eficiência catalítica da ECA 2 em gerar ANG-(1-7) a partir da ANG II é quase 500 vezes maior do que aquela para a conversão de ANG I em ANG-(1-9) - (CAREY e SIRAGY, 2003a). A ECA 2 é insensível aos inibidores da ECA, o que sugere que ela pode agir como contra-regulador da atividade dos componentes vasoconstritores do SRA (CRACKOWER *et al.*, 2002; FERRARIO, 2003).

Recentemente foi demonstrado que a expressão da ECA 2 está reduzida nos rins de pacientes diabéticos, o que pode ser prevenido pelo uso dos inibidores da ECA (TIKELLIS *et al.*, 2003).

2.1.1.4 Angiotensina II

A angiotensina II (ANG II) é um octapeptídeo ativo derivado da clivagem proteolítica da angiotensina I pela ECA presente em células endoteliais, principalmente no leito vascular pulmonar, através da clivagem de dois aminoácidos da porção aminoterminal (histidina-leucina) - (URATA; NISHIMURA; GANTEN, 1995). Pode também ser formada diretamente do angiotensinogênio pela ação da tonina e da catepsina G (URATA *et al.*, 1996).

É um potente vasoconstritor que atua através de receptores específicos presentes na superfície celular (ALLEN; ZHUO; MENDELSON, 1999). Dois subtipos de receptores foram descritos: AT1 e AT2, apesar da identificação recente de dois outros tipos de receptores: AT3 e AT4, porém com funções ainda pouco conhecidas (WRIGHT e HARDING, 1997).

A ANG II exerce suas funções localmente em tecidos onde é produzida (rins, vasos, coração, etc.) e sistemicamente mantendo a homeostase cardiovascular, atuando sobre os receptores específicos (FISHER *et al.*, 1998; HOLLENBERG *et al.*, 2003). Até o momento, os efeitos farmacológicos principais da ANG II são atribuídos à sua interação com o receptor AT1. Seus efeitos na regulação cardiovascular são múltiplos e de grande importância (CAREY e SIRAGY, 2003a):

- ação vasoconstritora direta (ALLEN; ZHUO; MENDELSON, 1999);
- potencialização dos efeitos da noradrenalina liberada pelas terminações nervosas (BOOZ e BAKER, 1996);

- aumento da síntese e liberação de aldosterona pelo córtex adrenal, resultando em aumento da reabsorção de sódio pelos túbulos renais (BLANTZ; KONNEN, TUCKER, 1976);
- estímulo a diversas regiões do SNC, provocando aumento do tônus simpático no coração, vasos e na medula adrenal, aumentando a liberação de catecolaminas (BOOZ e BAKER, 1996);
- ativação de células imunes induzindo quimiotaxia, proliferação, diferenciação e fagocitose, além de participação em respostas inflamatórias, incluindo produção de radicais superóxido, ativação de proteínas-quinase e fatores como NF-kB (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2003);
- estímulo à secreção de vasopressina, contribuindo para o aumento da volemia (KENNEFICK e ANDERSON, 1997);
- indução à hipertrofia e crescimento da musculatura lisa vascular (VSMC) - (DZAU, 1994; BOOZ e BAKER, 1996);
- efeitos pró-oxidativos na vasculatura ao diminuir a biodisponibilidade do óxido nítrico, por aumentar a conversão do mesmo para radicais superóxido, contribuindo, assim, para a disfunção endotelial. (HUANG; RICHARDS; SUMNERS, 1996);
- contribuição na aterogênese ao aumentar a expressão de substâncias vasculares inflamatórias como a “vascular cell adhesion molecule-1” (VCAM-1) - (HUCKLE e EARP, 1994; TUMMALA *et al.*, 1999);
- aumento da adesão de monócitos que circulam na superfície endotelial por estímulo à “monocyte chemoattractant protein-1” (MCP-1) e molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) - (HSUEH e QUIÑONES, 2003);

- estímulo à agregação plaquetária, assim como trombose, por ativação do “plasminogen activator inhibitor-1” (PAI-1) - (VAUGHAN; LAZOS; TONG, 1995);
- no coração, a ANG II induz à hipertrofia e crescimento da musculatura lisa vascular (VSMC) inibindo os efeitos metabólicos, mas não os proliferativos, da insulina, além de estimular a “mitogen activated protein-kinase” (MAP-K) - (SAAD; VELLOSO; CARVALHO, 1995; HORIUCHI *et al.*, 1997; FISCHER *et al.*, 1998; VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005).

No coração a ANG II aumenta a força de contração do miocárdio e nos rins ativa diretamente a bomba de prótons que troca Na⁺ tubular por H⁺ da célula e indiretamente (via aldosterona) a bomba Na⁺/K⁺ no túbulo distal. A vasoconstrição induzida pela ANG II sobre a arteríola aferente, neste caso, poderia tornar-se exagerada prejudicando a nutrição dos túbulos renais, porém, para evitar a necrose tubular aguda, os rins passam a produzir vasodilatadores locais, prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) que determinam insensibilidade parcial aos vasoconstritores sistêmicos, de modo a adequar a perfusão renal à sobrevivência tubular (BREWSTER e PERAZELLA, 2004).

Já o receptor AT₂ está amplamente distribuído nos tecidos fetais e em adultos sua distribuição é restrita (WOLF e ZIYADEH, 1997). Esse receptor parece mediar fenômenos antiproliferativos (TSUTSUMI *et al.*, 1998), apoptose e discreta vasodilatação fisiológica posterior à vasoconstrição em alguns leitos vasculares, além de estímulo pró-inflamatório, estimulante de crescimento e pró-trombóticos

(TIMMERMANS *et al.*, 1992, 1993; HORIUCHI, 1996; CSIKOS; CHUNG; UNGER, 1998).

Recentes estudos têm demonstrado que os receptores AT2 estão envolvidos na produção de GMP cíclico (SIRAGY e CAREY, 1996), óxido nítrico (SIRAGY e CAREY, 1997) e prostaglandina F2 (SIRAGY e CAREY, 1997), inibição do crescimento e diferenciação celular (VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005).

A ANG II, entretanto, pode também ser gerada a partir de ANG I por uma série de outras peptidases capazes de clivar a ligação Phe 8 His 9 do decapeptídeo. A formação de ANG II através de outras peptidases que não a ECA tem sido referida na literatura como vias alternativas de geração de ANG II (CAREY e SIRAGY, 2003a).

Até recentemente, o octapeptídeo ANG II era considerado o único produto biologicamente ativo do SRA. No entanto, inúmeros estudos mostraram que importantes ações periféricas e centrais do SRA podem ser mediadas por seqüências menores de peptídeos angiotensinérgicos, incluindo a angiotensina III [ANG III ou ANG-(2-8)], angiotensina IV [ANG IV ou ANG-(3-8)] e a angiotensina-(1-7) [ANG-(1-7)]. Esses estudos têm ampliado o conceito do SRA, podendo-se então considerar que tanto a ANG I [ANG-(1-10)] como a ANG II [ANG-(1-8)] podem sofrer um processo de biotransformação, gerando uma "família" de peptídeos angiotensina biologicamente ativos (CAREY e SIRAGY, 2003a), conforme a FIG. 2.

2.1.1.5 Angiotensina-(1-7)

A ANG-(1-7), um heptapeptídeo aminoterminal, (SCHIAVONE *et al.*, 1988), é formado a partir da ANG I por ação de endopeptidases neutras, ou seja, formada por via independente da ECA (SANTOS e BARACHO, 1992).

Pode ser formada diretamente da ANG I pela ação de endopeptidases responsáveis em cada tecido, tais como a metaloendopeptidase 24.15, encontrada no músculo liso vascular; neutral-endopeptidase (NEP), presente na circulação periférica; e prolil-endopeptidase (PEP), encontrada no cérebro e endotélio vascular (BROSNIHAN, 1998). A diversidade de vias enzimáticas pelas quais a ANG I é clivada à ANG-(1-7) sugere que a produção desse heptapeptídeo seja regulada nos tecidos, uma interpretação que favorece a idéia de que a ANG-(1-7) funciona como um hormônio parácrino (FERRARIO *et al.*, 1997). Além disto, pode ser formada a partir da ANG II através da PEP, significando, talvez, uma via alternativa de degradação da ANG II. Ela também pode ser formada a partir da ANG II por ação da ECA2, o que se acredita ser sua principal via de formação (CAREY e SIRAGY, 2003a).

A ANG-(1-7) é degradada pela ECA em peptídeos biologicamente inativos. Essa particularidade pode explicar o aumento de 25 a 50 vezes observado na concentração plasmática de ANG-(1-7) em pacientes hipertensos tratados cronicamente com inibidores da ECA (CAMPBELL; KLADIS; DUNCAN, 1994). Esses achados associados à demonstração de que essa angiotensina apresenta importantes efeitos vasculares e renais sugerem sua participação no mecanismo de ação dos inibidores da

ECA (MERRILL *et al.*, 2002; FERRARIO, 2003; BROSNIHAN *et al.*, 2004). Além disto, um aumento nos níveis de ANG-(1-7) por bloqueio de receptores AT1 pode ser devido à formação de ANG (1-7) a partir da ANG II, através da PEP (IVER; FERRARIO; CHAPPELL, 1998b).

A ANG-(1-7) possui fraca atividade vasodilatadora e potente atividade potenciadora de BK. Essa provável interação da ANG-(1-7) com a BK pode ser encarada como um ponto de cruzamento entre o SRA e o sistema caliceína-cinina (SCC) - (CHAPPELL; ALFRED; FERRARIO, 2001; BICKET, 2002).

A ANG-(1-7) produz respostas opostas àquelas obtidas com a ANG II (CAREY e SIRAGY, 2003a). Foi demonstrado, por exemplo, que ela inibe o crescimento das VSMC (FREEMAN *et al.*, 1996) e estimula a biosíntese de prostaglandinas do endotélio vascular e células lisas musculares. Ela não promove nem facilita a liberação de aldosterona, porém, libera vasopressina como a ANG II (RESENDE e MILL, 2002).

Segundo relato de BROSNIHAN (1998); HOLGER *et al.* (2001); UEDA *et al.* (2001), entre outros, esse peptídeo libera óxido nítrico, prostaciclina e vários outros vasodilatadores diretos, além de potencializar a ação da BK através de seu receptor B2. Em modelos animais, seus efeitos são ligados à diminuição dos níveis pressóricos e aumento da excreção de sódio (FERRARIO *et al.*, 1997), mecanismos que favorecem os efeitos contra-regulatórios exercidos pela ANG II.

As seguintes ações da ANG-(1-7) já foram identificadas periféricamente:

- atividade antidiurética (SANTOS e BARACHO, 1992; SANTOS *et al.*, 1996; SIMÕES E SILVA *et al.*, 1997; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000);
- atividade natriurética (CHAPPELL *et al.*, 1998a,b);
- atividade vasodilatadora (FERRARIO *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1997; REN; GARVIN; CARRETERO, 2002);
- potente atividade potencializadora da BK (LIMA *et al.*, 1997; SANTOS; FAGUNDES-MOURA; SIMÕES E SILVA, 2000) e conseqüente estímulo à liberação de NO e de prostaglandinas vasodilatadoras (CALKA e BLOCK, 1993; SANTOS e CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000);
- ação antiproliferativa (TALLANT, 1999).

Existem evidências de que as ações dessa angiotensina sejam mediadas por receptores específicos, sendo recentemente descrito o receptor específico da angiotensina (MAS) - (SANTOS *et al.*, 2003b). Esse receptor acoplado à proteína G é um protooncogene, não bloqueado pelos bloqueadores do receptor AT1 (como, por exemplo, o losartan). Porém, parece que a mesma interage também com esse receptor, pois algumas de suas ações podem ser bloqueadas pelo losartan. Algumas ações também podem ser inibidas com o uso de antagonistas específicos do receptor AT2. Essas observações sugerem a possibilidade de interação entre os receptores de ANG II e ANG-(1-7) (SANTOS; FAGUNDES-MOURA; SIMÕES E SILVA, 2000).

2.2 Interação sistema renina-angiotensina *versus* sistema caliceína-cinina (SCC)

Conforme já discutido, ocorre, assim, um papel dual exercido através dos principais peptídeos biologicamente ativos do SRA: ANG II e ANG (1-7). Enquanto a ANG II tem um papel vasoconstritor, pró-mitogênico, pró-fibrótico, pró-trombótico, pró-oxidante, aumenta a resistência periférica total, o débito cardíaco e, conseqüentemente, a pressão arterial (LAVOIE e SIGMUND, 2003); a ANG (1-7) tem papel vasodilatador, antiproliferativo, antitrombótico, antioxidante, diminuindo a pressão arterial, aumentando o débito cardíaco e potencializando as ações da BK (FERRARIO *et al.*, 1997; TALLANT, 1999; SANTOS *et al.*, 2001). Ao potencializarem-se as ações da BK, ocorre vasodilatação por atuação através da ativação dos receptores vasculares endoteliais B₁ ou B₂ (DUKA *et al.*, 2001) - (FIG. 3). A BK atua promovendo a formação de prostaglandinas vasodilatadoras através da ação da fosfolipase-A₂ e cicloxigenase (COX) - (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A BK exerce também papel importante no metabolismo da glicose por aumentar sua captação e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade à insulina. Sugere-se que esse efeito no metabolismo ocorra por ação direta da BK, via receptor B₂ (DUKA *et al.*, 2001).

Os inibidores da ECA estão associados à melhora na sensibilidade insulínica (BICKET, 2002), que parece dever-se, em parte, ao aumento de concentração da BK, pois o mesmo efeito não é observado quando se utiliza um antagonista direto dos receptores da ANG II (CARVALHO *et al.*, 1997).

Desta forma, alterações no equilíbrio do SRA interferem diretamente no equilíbrio do SCC, uma vez que, especialmente na vasculatura, esses sistemas exercem funções

opostas.

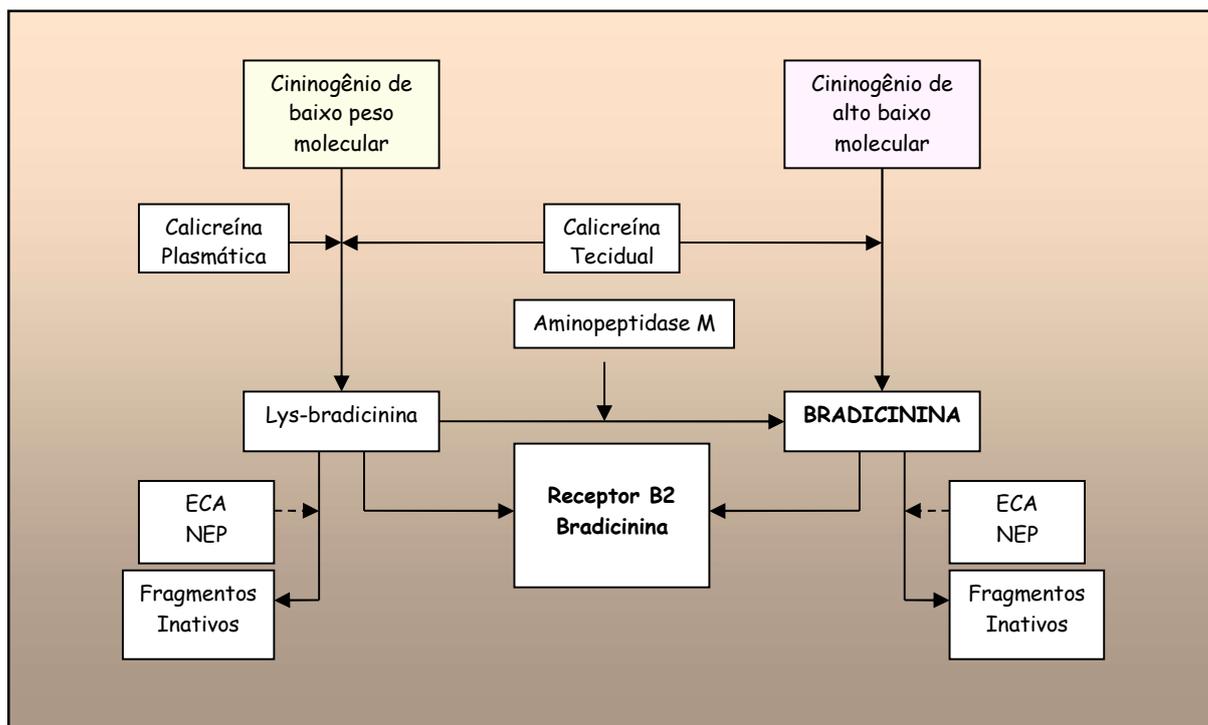


FIGURA 3 - Cascata enzimática resumida do sistema caliceína-cinina (SCC).

ECA: enzima conversora da angiotensina; NEP, endopeptidase neutra.

2.3 Interação entre endotélio – sistema renina-angiotensina – sistema caliceína-cinina - insulina

O SRA pode influenciar a função vascular de várias maneiras, uma vez que as células endoteliais possuem sabidamente receptores AT1 e AT2, além de evidências da existência de receptores específicos para ANG-(1-7) nesses sítios (TALLANT *et al.*, 1997). A ANG II tem geralmente um efeito vasoconstritor enquanto a ANG-(1-7) é preferencialmente vasodilatadora (ARDAILLOU, 1999). Desta forma, o equilíbrio

entre a ação dessas angiotensinas é importante na manutenção da integridade das funções endoteliais.

O endotélio é um órgão dinâmico, autócrino e parácrino que regula o tônus vascular e a interação da parede vascular com substâncias circulantes e as células sanguíneas. Ele produz substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras que, sob condições normais, estão em equilíbrio. A saúde da rede vascular depende do funcionamento normal do endotélio. A disfunção endotelial é definida como um desequilíbrio vascular, onde os efeitos vasoconstritores se sobrepõem aos vasodilatadores. Esse desequilíbrio geralmente resulta em diminuição da atividade do NO, que implica a perda da proteção vascular (HSUEH e QUIÑONES, 2003).

Esse órgão, o endotélio, atua como uma barreira prevenindo exocitose de macrófagos e de colesterol lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para o subendotélio, barrando o processo de aterosclerose (PRASAD e QUYYUMI, 2004). É também importante na manutenção do tônus vascular por liberar ANG II e endotelina, potentes vasoconstritores, em equilíbrio com a liberação de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador que também atua na inibição do crescimento das VSMC e da agregação plaquetária e trombose, da adesão de monócitos, inflamação e oxidação (BENTER; DIZ; FERRARIO, 1993). Exerce também importante papel na hemostasia, mediando a coagulação por inibi-la e liberar o fator de von Willebrand's, o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) e o SRA (VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005).

O SRA desempenha também grande influência sobre o crescimento e proliferação celular endotelial. Tanto a estimulação de receptores endoteliais AT₁ como AT₂ e AT₁₋₇ podem antagonizar as ações tróficas exercidas pelos receptores AT₁ na musculatura lisa. Uma ação antiproliferativa direta da ANG-(1-7) em células musculares lisas foi descrita por FREEMAN *et al.* (1996). A ação antiproliferativa mediada por receptores AT₁ também envolve a liberação de NO e PGI₂, enquanto a mediada por receptores AT₂ parece envolver a ativação de fosfotirosinas fosfatases com conseqüente inibição da via das MAP-K (VELLOSO, 1996, ARDAILLOU, 1999).

A ANG II, em situações de excesso não fisiológico, contribui para a disfunção endotelial por aumentar o estresse oxidativo, exercer atividade proliferativa e protrombótica, produzindo radicais superóxidos, estimulação da produção de TGF- β , endotelina e PAI-1, que interferem na ação do óxido nítrico. Desta forma, há evidências de que seu acúmulo prejudica as funções endoteliais e contribui para o processo de aterosclerose (VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005).

Já a BK apresenta efeitos benéficos sobre o endotélio, especialmente por sua poderosa atividade vasodilatadora e liberação de NO (BROSNIHAN, 1998; PAULA *et al.*, 1999).

Alterações na síntese e degradação de fatores endoteliais podem contribuir para o início ou manutenção de uma série de complicações como mudanças na reatividade

vascular, no fluxo sanguíneo e na perfusão tecidual comumente vistas no diabetes, doenças renais, insuficiência cardíaca, hipertensão, etc.

Segundo SANTOS *et al.* (2001), a ANG-(1-7) pode atuar em vários níveis, regulando os efeitos vasculares, e talvez cardíacos e renais, conseqüentes da formação da ANG I. Além disto, pode antagonizar os efeitos vasoconstritores da ANG II, por atuar como um antagonista competitivo dos receptores AT1, e potencializar a atividade vasodilatadora da BK, provavelmente contribuindo para a melhora do equilíbrio endotelial (UEDA *et al.*, 2001) - (FIG. 4). A ANG-(1-7), como dito anteriormente, atua potencializando as ações da BK (FERRARIO, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003), além de comportar-se como vasodilatador direto em experimentos animais (PAULA *et al.*, 1999; BROSNIHAN *et al.*, 2004).

Vários estudos têm vinculado a presença de níveis reduzidos de ANG-(1-7) às gestações onde ocorre pré-eclâmpsia, uma situação de sabida disfunção endotelial (MERRIL, 2002; SHAH, 2005).

Os inibidores da ECA sabidamente melhoram a disfunção endotelial (TADDEI *et al.*, 2002). Um dos recursos propostos é o aumento nos níveis de BK observado. A inibição do SRA também tem sido associada à redução de incidência de casos novos de diabetes (YUSUF *et al.*, 2001). Os mecanismos responsáveis por essa redução na incidência do diabetes são pouco compreendidos, entretanto, acredita-se que um deles seja o vínculo com os níveis elevados de BK induzidos por essas drogas (DUKA *et al.*, 2001; HSUEH e QUIÑONES, 2003).

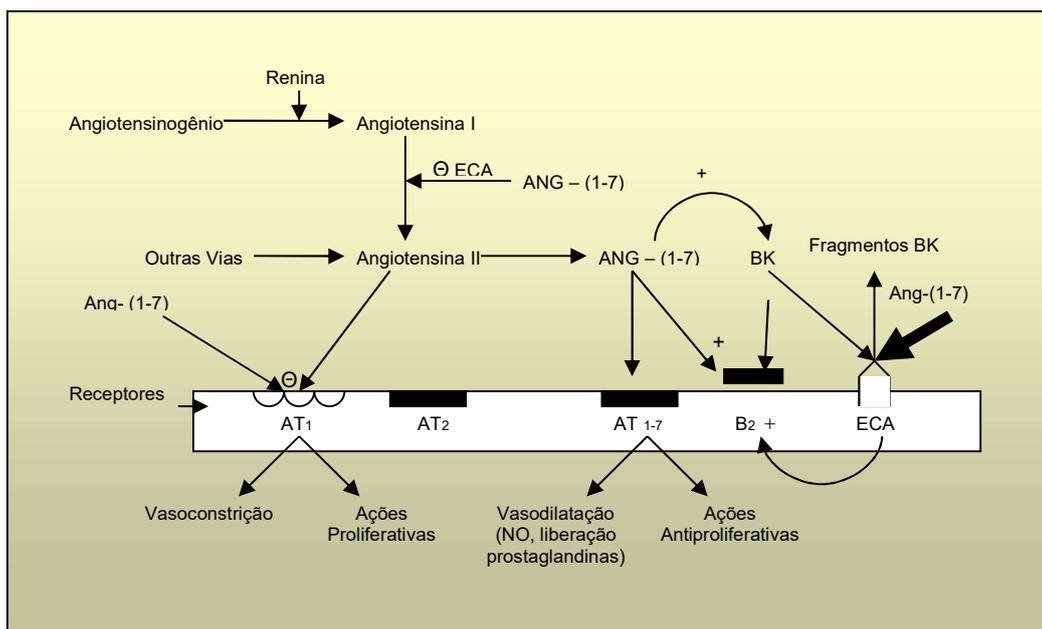


FIGURA 4 - Possíveis vias de atuação da angiotensina (1-7).

ECA=Enzima conversora da angiotensina, ANG-(1-7)= Angiotensina-(1-7); AT1=Receptor tipo 1 da angiotensina II; AT2=Receptor tipo 2 da angiotensina II; AT1-7=Receptor da Angiotensina-(1-7); B2= Receptor tipo 2 da Bradicina; BK=Bradicinina; +=estímulo; -= inibição.
Adaptado de SANTOS *et al.* (2001).

Assim como a ANG II influi na disfunção endotelial e progride paralelamente às complicações do diabetes, especialmente se há insulino-resistência (HSUEH e QUIÑONES, 2003), vários estudos têm determinado uma inter-relação entre o SRA e as vias de sinalização da insulina (SAAD; VELLOSO; CARVALHO, 1995, MARRERO *et al.*, 2004) através dos receptores AT1.

Várias pesquisas verificaram que a infusão de ANG II induz à insulino-resistência (OGIHARA, 2002) e que os inibidores da ECA melhoram a sensibilidade à insulina,

como já visto. Algumas sugeriram que a ativação dos receptores AT1 pela ANG II pode ativar a MAP-K (PRASAD e QUYYUMI, 2004).

Além da regulação da distribuição da insulina para tecidos-alvo, o endotélio responde também diretamente à insulina através da produção aumentada de NO (YKI-JÄRVINEN, 2003). Estudos em células endoteliais primárias elucidaram uma via sinalizadora bioquímica completa a partir do receptor de insulina para a ativação da sintetase da NO endotelial (eNOS). Essa via, chamada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), necessita de ativação do receptor tirosino-quinase da insulina, a fosforilação subsequente do substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1), a ligação e ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3), a ativação da serino-quinase dependente da fosfoinositido-quinase-1 (PDK-1) - (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002), as quais, por outro lado, efetuam a fosforilação e ativação da eNOS, acarretando a produção aumentada de NO em questão de minutos (VINCENT; MONTAGNANI; QUON, 2003) - (FIG. 5).

Estudos em humanos e em animais demonstraram objetivamente que a produção de NO estimulada pela insulina a partir do endotélio vascular representa um papel fisiológico importante no aumento do recrutamento capilar e do fluxo sanguíneo total para os membros no músculo esquelético (VELLOSO, 1996). Os vasos sanguíneos periféricos são mais sensíveis e respondem mais rapidamente aos efeitos vasodilatadores da insulina dependentes do NO. Os grandes paralelos entre as vias de sinalização da insulina nos alvos metabólicos e as vias de sinalização no endotélio vascular que regulam a produção de NO sugerem um mecanismo que vincula a

resistência à insulina com disfunção endotelial e também às alterações no equilíbrio do SRA (MARRERO *et al.*, 2004). O bloqueio da produção de NO no endotélio pode acarretar redução do recrutamento capilar e diminuição do fluxo sanguíneo total aos membros, o que contribui para o comprometimento da disponibilidade de glicose que caracteriza os estados de insulino-resistência (VINCENT; MONTAGNANI; QUON, 2003; HSUEH; LYON; QUIÑONES, 2004).

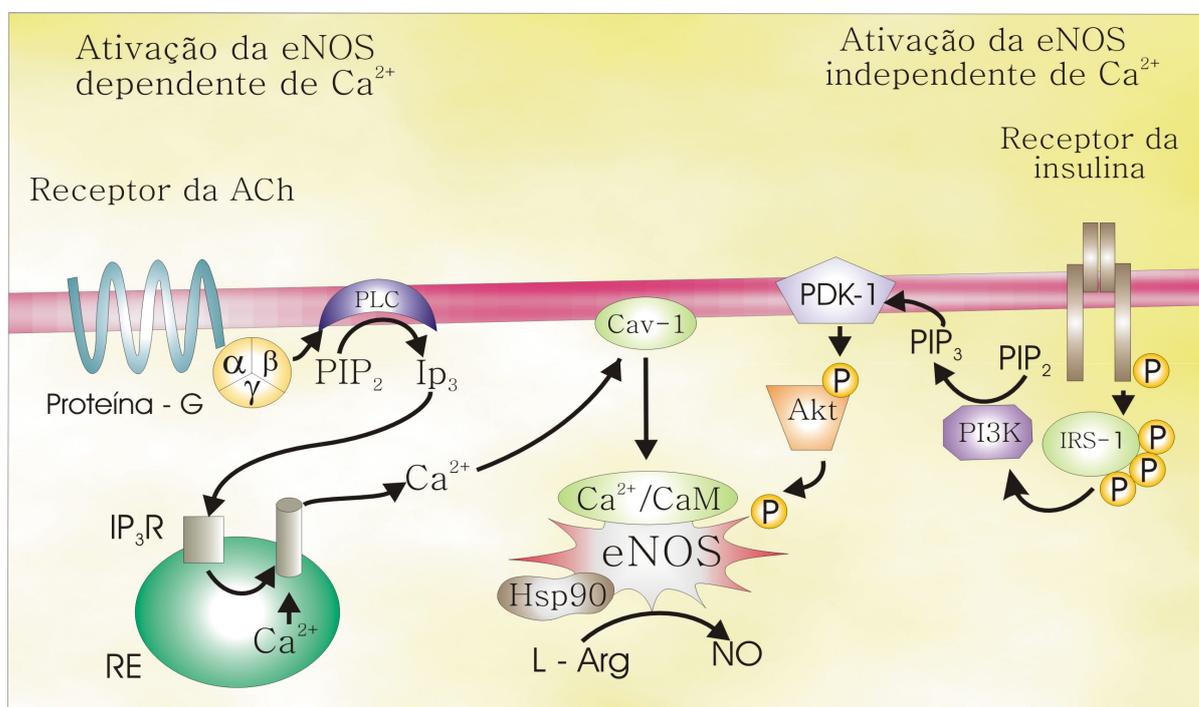


FIGURA 5 - Via de sinalização da insulina que acarreta ativação da eNOS e aumento da produção de óxido nítrico no endotélio.

Ca²⁺=cálcio iônico; eNOS= sintetase do óxido nítrico endotelial; Ach= acetilcolina; IRS- 1= substrato 1 do receptor de insulina; Akt=serino/treonino quinase; PDK-1=serino-fosfoinositidoquinase; PI3K=fosfatidilinositol 3-quinase; Cav-1= caveolina; RE=retículo endoplasmático; P= local da fosforilação; PIP= fofdato de fosfatidilinositol; PLC=fosfolipase C.

(Adaptado de VINCENT; MONTAGNANI; QUON, 2003).

Além das ações vasodilatadoras da insulina, dependentes do NO no endotélio vascular, a insulina também possui diversas outras ações biológicas que causam impacto sobre a homeostase hemodinâmica (YKI-JÄRVINEN, 2003). Um desvio entre as ações vasodilatadoras e vasoconstritoras da insulina pode ser um fator importante na fisiopatologia vascular da resistência à insulina (HSUEH e QUIÑONES, 2003; PRASAD e QUYYUMI, 2004).

A insulina também age através da via MAP-K mediando não apenas o crescimento celular, mas também a habilidade de migração das células endoteliais, VSMC e monócitos (VELLOSO, 1996). Desta forma, pratica ações pró-inflamatórias e pró-trombóticas. Em indivíduos obesos, diabéticos ou não, há tendência à interrupção na via PI3-K e uma ativação da via MAP-K. Assim, na presença de insulino-resistência, a hiperinsulinemia pode exercer papel pró-aterogênico (HSUEH; LYON; QUIÑONES, 2004) - (FIG. 6). BEDECS *et al.* (1997); BOTTARI *et al.* (1992) demonstraram também que os receptores AT2 da ANG II inibem a via MAP-K e ativam a via PI3-K.

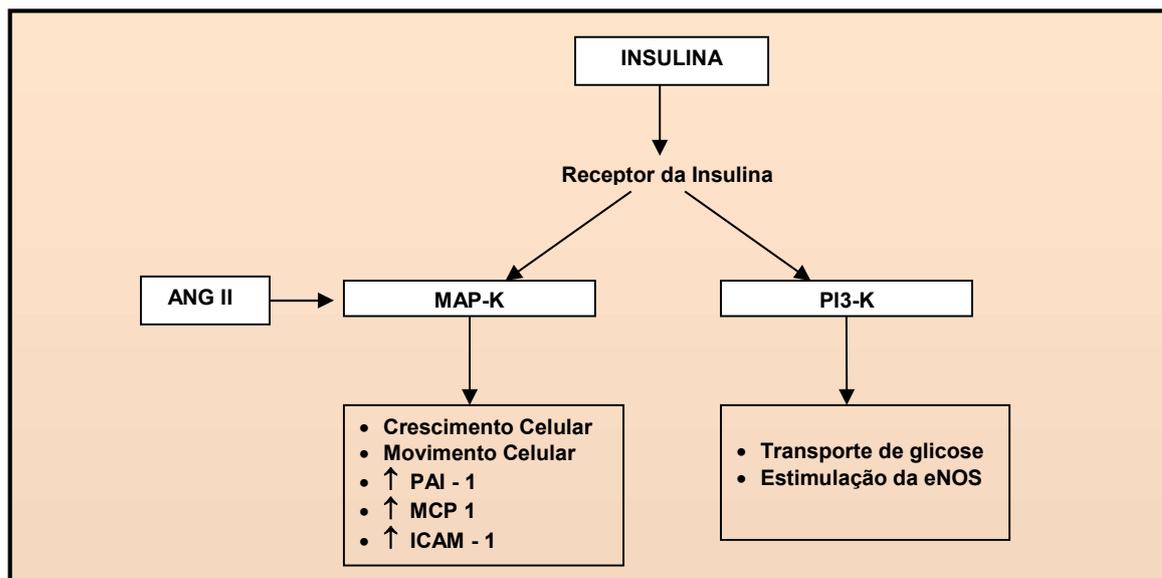


FIGURA 6 - Estimulação da via MAP-k pela ANG II no endotélio e nas células musculares lisas vasculares.

MAP-K= mitogen-activated protein-kinase PI3-K = fosfaditil inositol 3 quinase; PAI-1= inibidor do ativador de plasminogênio; eNOS= sintetase do óxido nítrico endotelial; ICAM-1= molécula de adesão intracelular-1; MCP1=monocyte chemoattractant protein-1.

Como dito, os inibidores da ECA aumentam a sensibilidade à insulina em modelos de insulino-resistência tanto de animais quanto de humanos (JAUCH *et al.*, 1987; HERINGS *et al.*, 1991). Vários mecanismos são implicados nesse achado, porém não são totalmente compreendidos. Novamente o papel da BK foi observado por CARVALHO *et al.* (1997), que descreveram, após administração aguda de captopril em ratos, um aumento nos receptores insulínicos induzidos pela insulina e aumento na fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor da insulina), no fígado e nos músculos. Esses procedimentos foram acompanhados pelo aumento na IRS-1/PI3-quinase em ambos os tecidos. A PI3quinase é necessária para a translocação de GLUT 1 e para a estimulação de GLUT 4, além do metabolismo do glicogênio

(CZECH e CORVERA, 1999). Acredita-se que a IRS 1/PI 3-quinase esteja ligada ao transporte de glicose muscular, assim como à síntese de glicogênio no fígado e músculos e que o aumento dessa associação, em animais tratados agudamente com captopril, possa melhorar a sensibilidade insulínica. Além disto, esse medicamento inibe a cininase II (uma enzima semelhante à ECA, que atua degradando a BK), gerando, conseqüentemente, aumento nas suas concentrações. A literatura tem apontado que a administração de BK melhora a ação da insulina e reduz os níveis plasmáticos de glicose (UEHARA *et al.*, 1994). Novamente, o estudo de CARVALHO *et al.* (1997) demonstrou que a BK aumenta o número de receptores induzidos pela insulina e a fosforilação do IRS-1, assim como a associação IRS-1/PI 3 quinase no fígado e nos músculos, melhorando a sensibilidade insulínica.

Na FIG. 7 fica evidente a interação entre os sistemas SRA, SCC e insulina, com foco especial nas ANG II e (1-7).

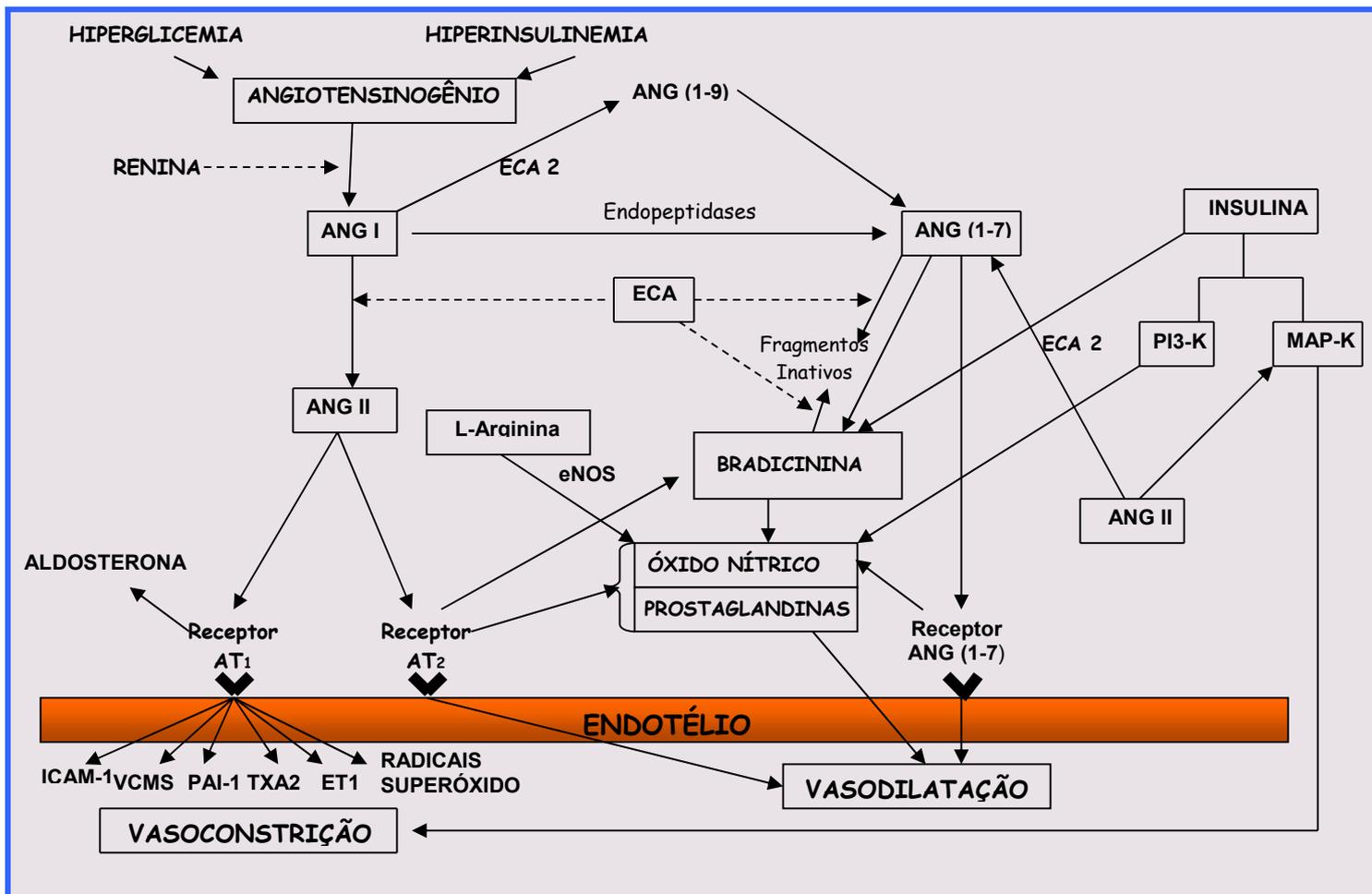


FIGURA 7 - Interação entre os SRA – SCC – vias de sinalização da insulina.

MAP-K= “mitogen-activated protein-kinase” PI3-K = fosfatidil inositol 3 quinase; eNOS= sintetase do óxido nítrico endotelial; ECA=enzima conversora da angiotensina, ANG-(1-7)= angiotensina-(1-7); AT1=receptor tipo 1 da angiotensina II; AT2=receptor tipo 2 da angiotensina II; AT1-7=receptor da angiotensina-(1-7); ANG I= angiotensina I, ANG II= angiotensina II, AT1= receptor tipo 1 da angiotensina II, AT2= Receptor tipo 2 da angiotensina II, NO= Óxido Nítrico, ANG-(1-7)= angiotensina-(1-7), ECA 2 = enzima 2 conversora da angiotensina. ET1=endotelina 1; TXA2= tromboxano A2; PAI-1= inibidor do ativador de plasminogênio; VCMS= “vascular smooth muscle cell”; ICAM-1= molécula de adesão intracelular-1. Linhas pontilhadas significam degradação e linhas sólidas, estimulação.

2.4 Fisiologia da gravidez e sistema renina-angiotensina na gestação

Durante a evolução da gravidez, surgem numerosas e intensas modificações no organismo materno. Ocorre um estado contínuo de adaptação, proporcionando um ambiente estável para o feto e atendendo às suas necessidades de crescimento. A gestante está sujeita a uma série de alterações bioquímicas, funcionais e anatômicas, com readaptações que envolvem todo o seu organismo (BROWN; ZAMMIT; MITAR, 1992).

As alterações fisiológicas nesse período incluem aumento da resistência insulínica, dislipidemia e hiperestímulo da cascata inflamatória, representando um “teste de estresse” ao metabolismo e função vascular materna (SEELY, 1999; ANG *et al.*, 2002; XIANG *et al.*, 2004; DABELEA *et al.*, 2005; SHAH, 2005).

O fluxo útero placentário é essencial para o crescimento, metabolismo do feto e da placenta e para a remoção de escórias metabólicas. Existem poucas evidências experimentais acerca da mecânica do fluxo sanguíneo no útero humano durante a gravidez. A perfusão placentária depende, por sua vez, desse fluxo, que chega a atingir 450 a 650 ml/min no final da gestação. Isto se deve, em parte, ao aumento do tamanho placentário e proliferação de vasos sanguíneos. Esse aumento do fluxo materno-placentário deve-se principalmente à vasodilatação induzida pelo estrógeno e progesterona, ao passo que o fluxo sanguíneo feto-placentário ocorre por elevação contínua da formação dos vasos placentários (BROWN; ZAMMIT; MITAR, 1992). Provavelmente, essa vasodilatação ocorre devido ao “shunt” artério-venoso na

circulação materna imposta pela placenta e também ao aumento na produção de prostaglandinas vasodilatadoras e óxido nítrico pelas células endoteliais (JAUNIAX *et al.*, 1999). A elevação inicial do fluxo sanguíneo placentário talvez seja uma conseqüência da diminuição da resposta dos vasos uterinos a agentes pressores como ANG II e endotelina. A perfusão útero-placentária diminui à medida que a resistência vascular uterina aumenta, em comparação com a resistência vascular sistêmica. Parece haver redução na quantidade de NO derivado do endotélio e também na sensibilidade do músculo liso ao mesmo (MAGNESS *et al.*, 1996).

A gravidez é acompanhada normalmente por um ganho global de sódio de 500 a 900mmol, que são distribuídos entre o lado materno e a unidade feto-placentária. Em conseqüência dessa retenção salina, um aumento regular e progressivo do volume do plasma ocorre com o transcorrer da gestação, alcançando o máximo no terceiro trimestre (BROWN; ZAMMIT; MITAR, 1992). Há, então, um acréscimo importante na taxa de filtração glomerular, que pode ser tanto quanto 50%, trazendo a carga total do sódio filtrado a 30.000mmol por 24 horas (um incremento de 5000 a 10.000mmol). Isto representa uma quantidade enorme de sódio filtrado quando comparado à excreção de sódio de 100 a 200mmol. Há retenção hídrica significativa, que é medida pela diminuição da osmolalidade plasmática (aproximadamente 10mOsm/Kg) induzida pelo reajuste dos limiares osmóticos para a sede e secreção de vasopressina (LINDHEIMER e DAVIDSON, 1995).

Paralelamente, e apesar da retenção salina, os níveis pressóricos tendem a ser 20% mais baixos durante o primeiro trimestre da gestação. Para se adaptar a essas

mudanças, ocorre uma redução na resistência vascular periférica e conseqüente aumento na frequência cardíaca (BROWN *et al.*, 1992).

Há aumento de renina e elevação ainda mais acentuada da aldosterona, principalmente no final da gestação (BADER *et al.*, 1994). Essa observação sugere que outros fatores possam participar de forma importante na secreção de aldosterona no final da gestação. Apesar disso, a excreção de sódio e potássio em urina de 24 horas permanece dentro da normalidade (DUNLOP, 1979).

Desta forma, para satisfazer as necessidades feto-placentárias, há profundas modificações nos sistemas renal e vascular durante a gestação. Conseqüentemente, ocorrem ajustes importantes nos níveis plasmáticos dos hormônios envolvidos na homeostase da água e dos eletrólitos. Algumas dessas mudanças podem ser causa ou conseqüência do novo ambiente hormonal e circulatório que se estabelece durante a gestação, onde o papel desempenhado pela placenta é fundamental (DUNLOP, 1979).

Durante esse período, ocorre um aumento progressivo na liberação dos peptídeos natriurético cerebral (BNP) e atrial (ANP) (WILSON *et al.*, 1980). O BNP é produzido pelas células amnióticas e pela placenta e parece exercer potente efeito vasodilatador na rede vascular placentária (POULSEN; OLOFSSON; STJERNQUIST, 1995). O ANP induz aumento no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular, diminui a secreção de renina, reduz a liberação basal de aldosterona nas células da granulosa e também aquela estimulada pela cortosina e

pela ANG II (POULSEN; OLOFSSON; STJERNQUIST, 1995). Além disso, possui ação vasodilatadora, agindo diretamente sobre o músculo liso vascular, estimulado pela ANG I e pela noradrenalina (LOWE; MACDONALD; BROWN, 1992).

As mudanças observadas nos níveis plasmáticos ou na atividade de vários componentes do SRA são bastante complexas, pois envolvem alterações no substrato da renina, modificações regulatórias da síntese de renina e pró-renina, secreções de inúmeros produtos pelos rins da mãe e do feto e pela placenta e, finalmente, mudanças nos efeitos da ANG II nas células-alvo (BROSNIHAN *et al.*, 2004).

Enquanto a hiperfiltração é uma característica da gravidez normal, o mesmo não pode se dizer do aumento da pressão intraglomerular, que é comum em pacientes que desenvolvem doenças na gestação, especialmente a pré-eclâmpsia (SHAH, 2005).

2.4.1 Ajustes e interações do sistema renina-angiotensina durante a gravidez e sua ativação fisiológica

A gravidez é uma condição fisiológica caracterizada pelo aumento progressivo dos diferentes componentes do SRA (BROSNIHAN *et al.*, 2004). As conseqüências fisiológicas da ativação do SRA na gravidez normal são incompletamente compreendidas (AUGUST *et al.*, 1995) e menos ainda quando existe alguma desordem metabólica na gravidez, como é o caso dos distúrbios hipertensivos, do diabetes tipo 1 e do diabetes gestacional.

Vários estudos têm auxiliado na compreensão da ativação fisiológica e dos desequilíbrios do SRA na gravidez, na gênese/manutenção de inúmeras desordens nesse período (SEALEY *et al.*, 1991; AUGUST *et al.*, 1995; MERRIL *et al.*, 2002). Na gravidez normal, o estrógeno e/ou progesterona causam a superexpressão do SRA, aumentando os níveis do angiotensinogênio e da renina teciduais e circulantes (OELKERS, 1996). Em associação com o aumento de estrógeno circulante, a pró-renina e a renina materna são também aumentadas. A pró-renina atinge um pico cerca de 20 dias após a concepção e permanece elevada até o parto, sendo produzida inicialmente pelos ovários e, a seguir, pela placenta. Ainda é desconhecido o significado desse aumento exagerado da pró-renina no início da gestação (SEALEY *et al.*, 1990). A atividade da renina plasmática (ARP) aumenta durante as primeiras semanas da gravidez (LANGER *et al.*, 1998) e a ANG II plasmática eleva em associação com a ascensão da atividade da renina e do angiotensinogênio plasmático. Apesar das ações da ANG II não serem totalmente conhecidas na gestação, sua concentração é cerca de três a quatro vezes maior durante uma gestação normal (PIPKIN, 1997).

A aldosterona, tanto urinária quanto plasmática, também está aumentada. Tanto em gestações humanas quanto em animais há resistência aos efeitos pressores da ANG II e manutenção de normotensão, apesar de um aumento de duas vezes na ANG II, um evento que tem sido associado a um fenômeno de “down-regulation” dos receptores AT1 (SHAH, 2005). Em animais prenhes, a administração de inibidores da ECA

resulta em diminuição na pressão arterial, demonstrando o papel tônico de ANG II na manutenção da pressão durante a gravidez (AUGUST *et al.*, 1995).

Em gestantes normais pode ocorrer aumento de duas a seis vezes na concentração da renina plasmática, ANG II e aldosterona. Há também aumento na ARP conseqüente à elevação do substrato da renina, não se podendo eliminar a possibilidade de contribuição placentária (AUGUST *et al.*, 1995). Parece haver também redução na resposta pressora à ANG II infundida (ITO *et al.* 1998) - (FIG. 8).

O estrógeno desloca os caminhos da formação dos peptídeos do SRA de uma maneira tecido-específica (OELKERS, 1996), reduzindo a formação de ANG II e aumentando a produção de ANG-(1-7), que age como o contra-regulador das ações cardiovasculares da ANG II, modulando o tônus vascular (BROSNIHAN *et al.*, 2004). As ações vasodilatadoras de ANG-(1-7) foram relatadas em vários sítios vasculares e envolvem a liberação de BK e de prostaglandinas (SANTOS *et al.*, 2001) e tanto direta quanto indiretamente a liberação de NO (BROSNIHAN, 1998).

Distúrbios na formação da ANG (1-7) estão relacionados à fisiopatologia da pré-eclâmpsia (MERRIL *et al.*, 2002) que, por sua vez, associa-se à disfunção endotelial por alteração no equilíbrio vascular por redução na formação de NO (SHAH, 2005).

A descoberta da ECA 2, que se encontra muito elevada durante a gestação normal (BROSNIHAN *et al.*, 2003), trouxe novos conhecimentos à dinâmica do SRA na gestação. Essa enzima converte a ANG I em ANG (1-9) que processa a ANG-(1-7).

A ECA 2 parece contribuir para a produção local e aumento importante da ANG-(1-7) nos rins durante a gestação (BROSNIHAN *et al.*, 2003), trazendo melhor compreensão da ativação fisiológica do SRA na gestação. Acredita-se que reduções na ECA 2 e ANG-(1-7) são importantes na gênese da pré-eclâmpsia e danos endoteliais comumente observados nesse distúrbio (MERRIL *et al.*, 2002; BROSNIHAN *et al.*, 2004).

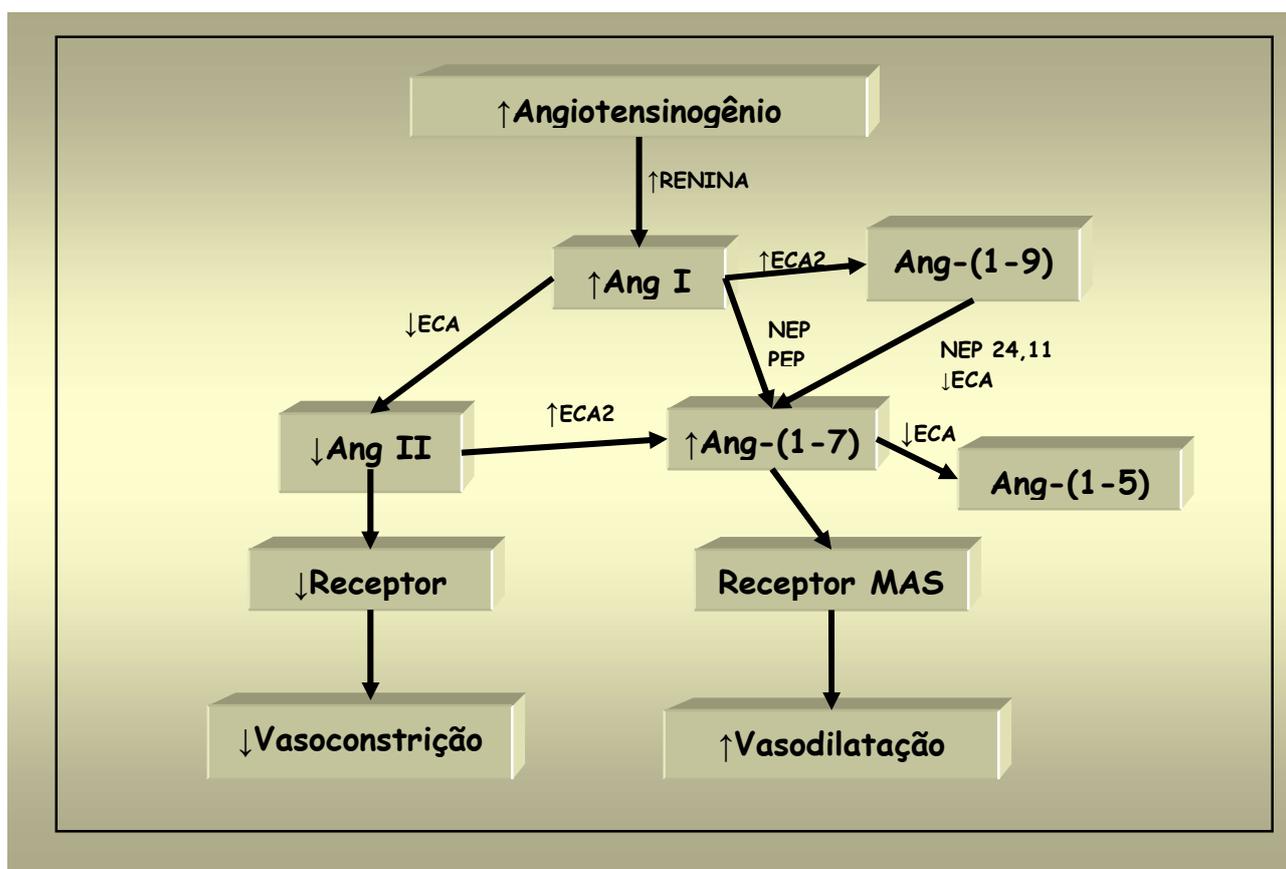


FIGURA 8 - Perfil circulante do sistema renina-angiotensina na gestação.

ECA= enzima conversora da angiotensina, ECA2= enzima conversora da angiotensina II, NEP= neutral peptidases, PEP= proil endopeptidase.

Adaptado de BROSNIHAN *et al.*, 2004.

A ANG II é também um fator de angiogênese, induzindo a formação de novos vasos em estudos experimentais (BREWSTER e PERAZELLA, 2004). A pró-renina uterina também pode estar envolvida nessa neovascularização. O uso de inibidores de prostaglandinas e da ANG II reduziu o fluxo sanguíneo placentário em animais. Desta forma, não apenas as prostaglandinas e, conseqüentemente, a ciclooxigenase são importantes durante a gestação, mas também a integridade do SRA (NIELSEN; SCHAUSER; POULSEN, 2000).

Na gravidez também há elevação significativa na síntese de óxido nítrico (WILLIAMS *et al.*, 1997), prostaciclina, em especial da PGI₂, um vasodilatador resultante do ácido aracônico e tromboxano (NEVES *et al.*, 2003). A placenta é capaz de gerar prostaglandinas e a artéria umbilical tem capacidade 10 a 100 vezes maior que outras artérias em fazê-lo (CHRISTENSEN *et al.*, 1989). Durante a pré-eclâmpsia, tem sido relatada uma redução nos níveis de PGI₂ e ANG-(1-7). O estímulo para esse aumento é desconhecido, mas especula-se que possa ter relação com a ativação do SRA e SCC (FITZGERALD *et al.*, 1987). Talvez esta seja uma ligação importante entre pré-eclâmpsia e os danos endoteliais observados nessas gestantes.

A gravidez pode influenciar negativamente o curso das doenças renais. Algumas mulheres com doença renal intrínseca sofrem de deterioração mais rápida na função renal após a gestação, especialmente se há hipertensão (AUGUST *et al.*, 1995) ou diabetes (ROSSING *et al.*, 2002), pois ambos podem acelerar a deterioração renal. Entretanto, mesmo quando não existem co-morbidades, é importante salientar que há

elevação dos componentes do SRA e que pouco se conhece sobre suas interações com doenças que possam ser deflagradas pela gravidez, como é o caso do diabetes gestacional e da pré-eclâmpsia.

2.5 Diabetes

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica e evolutiva, caracterizada por alterações no metabolismo dos carboidratos, lípidos e proteínas, identificada pela presença de hiperglicemia, seja no estado de jejum, pós-alimentar ou seguindo-se a testes orais padronizados de sobrecarga de glicose. Hiperglicemia e outras alterações bioquímicas ocorrem devido à secreção e/ou atividade insulínica reduzida. O grau de privação insulínica determina a gravidade dos sintomas da doença, os quais variam desde a ausência de sintomas até graus extremos de gravidade, onde coma e morte estão incluídos (ADA, 2005).

No estado diabético crônico, há alterações características e progressivas na retina, rins, nervos periféricos e tecido conjuntivo. Há também doença aterosclerótica acelerada dos vasos coronários, cerebrais e periféricos. Micro e macroangiopatias são as principais causas de morbi-mortalidade em pacientes diabéticos (ADA, 2005).

O diabetes pode ser classificado em tipo 1, tipo 2, gestacional e outros, conforme ADA (2005). O tipo 1 é imunomediado, com destruição das células β e corresponde a 5 a 10% dos casos de diagnosticados. Já no tipo 2, que corresponde a quase 90% da

população diabética, a etiologia exata é desconhecida. A fisiopatologia básica no tipo 2 é a resistência insulínica ou a depleção de receptores responsivos à ação da insulina, além de mecanismos pós-receptores com deficiência de ação da insulina. Porém, com a evolução da doença e em alguns casos específicos, pode haver uma deficiência quase absoluta de insulina. Esse tipo de diabetes pode permanecer sem diagnóstico durante anos, pois os pacientes são geralmente oligo ou assintomáticos. Complicações em longo prazo invariavelmente ocorrem em alguma extensão em ambos os grupos (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 1997). O tipo 2 acomete com frequência elevada as mulheres que apresentaram diabetes gestacional (BEN-HAROUSH e YOGEU, 2004).

Baseado nos resultados do “Diabetes Control and Complication Trial” (DCCT), a hiperglicemia é um fator importante que contribui para o desenvolvimento das complicações microvasculares como a nefropatia, retinopatia e neuropatia em pacientes com diabetes tipo 1; e a manutenção da euglicemia e dos níveis pressóricos pode prevenir ou retardar a progressão da microangiopatia diabética (DCCT, 1993).

No diabetes tipo 1, a proteinúria se associa à hipertensão arterial e ao risco elevado de nefropatia avançada e a inibição do SRA é determinante no prognóstico da complicação renal (COOPER, 1998). No tipo 2, tanto o significado clínico como o papel da inibição desse sistema no prognóstico da nefropatia diabética são mais imprecisos, havendo controvérsias quanto aos benefícios específicos dessa terapia (RITZ e STEFANKI, 1996).

Já o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é definido como intolerância aos carboidratos de gravidade variável, de início ou primeiro reconhecimento na gestação, segundo os critérios ADA (2005), com prevalência que varia de 1 a 14%, dependendo da população e dos critérios diagnósticos adotados (DABELEA *et al.*, 2005).

O diabetes gestacional ocorre habitualmente na segunda metade da gestação e relaciona-se principalmente à insulino-resistência comum nesse período, daí sua ligação aumentada com o diabetes tipo 2 (BEN-HAROUSH e YOGU, 2004).

Nesse período, a resistência à insulina é caracterizada pelo crescimento acelerado do feto e pela elevação crescente de vários hormônios, entre eles o lactogênico placentário (HPL), prolactina, glucagon e cortisol. O resultante da produção aumentada desses hormônios contra-insulínicos é um estado de insulino-resistência, com aumento da produção hepática de glicose e diminuição dos estoques de glicogênio hepático e acréscimo evidente nos valores da insulina materna em jejum, que objetiva manter os níveis de glicose dentro da normalidade, sob equilíbrio (NOGUEIRA, 2001).

Se a compensação adequada não é atingida, com predomínio da resistência insulínica/síntese-ação insulínica, defeitos subclínicos na homeostasia dos carboidratos podem ser desmascarados, resultando no DMG. Desta forma, vários casos de DMG revelam uma paciente com diabetes tipo 2 em estado pré-clínico (DABELEA *et al.*, 2005). Para tratá-lo, recomenda-se dieta equilibrada e, caso não

haja controle dos níveis glicêmicos, a introdução de insulina é recomendada, mais para prevenir complicações fetais e perinatais do que para proteção materna (NOGUEIRA, 2001).

A maioria das gestantes com diagnóstico de DMG retorna à tolerância normal aos carboidratos no puerpério, porém apresenta risco aumentado de desenvolver doenças metabólicas e vasculares no decorrer da vida, como o diabetes tipo 2, dislipidemia e doença coronariana (XIANG *et al.*, 2004).

2.6 O sistema renina-angiotensina e o diabetes

Há controvérsias sobre o perfil circulante do SRA em pacientes diabéticos. (BJÖRCK, 1990). Mecanismos hemodinâmicos e metabólicos participam da patogênese da nefropatia diabética (COOPER, 1998). Nos indivíduos diabéticos tipo 1 portadores de nefropatia, o SRA encontra-se inapropriadamente ativado, enquanto naqueles sem complicações parece estar intacto (BJÖRCK, 1990).

A hiperglicemia, a resistência à insulina e os ácidos graxos livres elevados ativam a geração de ANG II nos rins (BREWSTER e PERAZELLA, 2004). A ANG II atua aumentando a pressão capilar glomerular, o que favorece a hiperfiltração e a proteinúria (ANDERSON; JUNG; INGELFINGER, 1993; SINGH *et al.*, 1999). Os efeitos deletérios da ANG II têm sido demonstrados em estudos experimentais nos

quais as infusões resultaram em aumento da pressão intraglomerular e da excreção de proteínas (DORIA *et al.*, 1997).

O estresse mecânico lesa a superfície endotelial levando à expansão mesangial, ao aumento na produção de matriz extracelular e espessamento da membrana basal glomerular, determinando deposição de colágeno nesse sítio, que pode ser mediada por aumento na expressão de fatores de crescimento, tais como o fator de transformação e crescimento tipo beta (TGF- β), responsáveis pela instalação da nefropatia diabética (BJÖRCK, 1990).

Como no diabetes há algum grau de expansão de volume extracelular e/ou aumento na troca de sódio (FELDT-RASMUSSEN *et al.*, 1987; ANDERSON; JUNG; INGELFINGER, 1993), há, conseqüentemente, elevação na pressão hidráulica transcápicular, crescendo, desta forma, o tônus na arteríola glomerular eferente (LEWIS *et al.*, 1993). Associado a isto, muitos autores demonstraram redução no padrão da ARP. Essas observações levaram a supor que o SRA estaria suprimido e inativo no diabetes (ANDERSON; JUNG; INGELFINGER, 1993). Entretanto, essas suposições não foram comprovadas, pois apenas o fato de se observar ARP reduzida não significa que todo o sistema também esteja. Em alguns estudos em ratos diabéticos, os níveis de ANG II tendem a seguir as mesmas tendências da ARP, porém eles foram realizados em ratos anestesiados, o que pode alterar o SRA (KENNEFICK, 1997). Vários mecanismos podem ser utilizados para explicar esse fato, pois, apesar de a renina ser limitante da taxa de formação da ANG II, cresce a lista de vias alternativas que processam angiotensinogênio a ANG I e ANG I a ANG

II, sugerindo a possibilidade de vias alternativas de formação (ANDERSON; JUNG; INGELFINGER, 1993; KENNEFICK e ANDERSON, 1997). MAHMOOD *et al.* (2002) demonstraram em ratos o aumento significativo da ANG I na circulação coronariana, com formação local de ANG II, ANG-(1-7) e ANG-(1-9), com níveis semelhantes em ratos diabéticos e não-diabéticos. Porém, quando o fluxo coronariano era reduzido, a ANG II era cerca de quatro vezes mais alta em ratos diabéticos que não-diabéticos. De acordo com estudos de CAMPBELL; KLADIS; DUNCAN (1994), as concentrações locais desses peptídeos foram similares às plasmáticas.

Finalmente, considerando-se a relação entre a expansão do volume plasmático e o aumento da troca de sódio em pacientes diabéticos (ELL *et al.*, 1989) e o SRA, os níveis de renina e ANG II normais ou apenas discretamente reduzidos podem ser inapropriados (ANDERSON; JUNG; INGELFINGER, 1993). Desta forma, níveis normais de ANG II podem de fato ser considerados inapropriadamente normais para o volume plasmático aumentado, sendo, então, discutível se realmente o SRA está suprimido em diabéticos (KENNEFICK e ANDERSON, 1997; BOJESTIG *et al.*, 2000). ÜSTÜNDAG; CAY; NAZIROGLU (1999) demonstraram que a ARP está normal nos diabéticos sem complicações vasculares, mas pode estar reduzida ou até mesmo aumentada naqueles com nefropatia ou hipertensão (BJÖRCK, 1990).

Existem evidências de que o SRA intra-renal possa estar ativado nos diabéticos com nefropatia, regulado independentemente dos níveis plasmáticos e pode ser modulado pelo tônus vascular local (DANSER *et al.*, 1989). A infusão de ANG I diretamente

na artéria renal elevou significativamente os níveis de ANG II, porém o mesmo não ocorreu em não-diabéticos (BJÖRCK, 1990). Níveis elevados de ANG II podem resultar do aumento da ARP extra-renal (da rede vascular, das adrenais), mais que da renina plasmática (KENNEFICK, 1997), ou de uma sensibilidade aumentada à ANG II intrarenal (BJÖRCK, 1990).

Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia crônica influencia a progressão da doença renal são pouco compreendidos (VALABHJY J, 2003). Há demonstrações de que tanto o bloqueio do SRA quanto a manutenção da euglicemia levam ao mesmo resultado, ou seja, uma diminuição na atividade do SRA (MILLER, 1999). A hiperglicemia moderada, sem glicosúria, pode exercer efeitos hemodinâmicos e humorais (HOLLENBERG *et al.*, 2003), como o aumento do angiotensinogênio, da ARP, nos níveis pressóricos e na resistência vascular renal (MILLER *et al.*, 1996). WOODS; HALL; MIZELLE (1987), usando um modelo animal, demonstraram que a infusão de glicose nas artérias renais resultou em aumento na renina plasmática. O'HARE *et al.* (1982) verificaram em pacientes diabéticos que o período de pior controle glicêmico associou-se à elevação ainda maior nos níveis de renina plasmática. Níveis séricos de pró-renina, precursor da renina, estão marcadamente aumentados em pacientes diabéticos com microangiopatia (MILLER; THAI; SCHOLEY, 1999), podendo ser considerados marcadores de evolução de complicações crônicas em pacientes com DM1 (DANSER *et al.*, 1989; SEALEY *et al.*, 1991).

O SRA está intimamente envolvido na fisiopatologia da nefropatia diabética (BURNS, 2000) e a sua inibição é capaz de alterar consideravelmente o prognóstico da complicação renal, particularmente no tipo 1. Os inibidores da ECA parecem exercer efeitos benéficos na prevenção das complicações micro e macrovasculares do diabetes (THE HEART OUTCOMES PREVENTION STUDY, 2000). Esses efeitos benéficos parecem ser independentes dos efeitos anti-hipertensivos dessas drogas (DZAU *et al.*, 2001).

Já o papel da ANG-(1-7) é pouco estudado no diabetes. Segundo estudos de OLIVEIRA *et al.* (2003) em ratos diabéticos, níveis elevados de glicose bloqueiam a interação ANG-(1-7)/BK, porém há restauração dessa relação com a administração crônica, mas não aguda, de insulina. Esse efeito provocado pela insulina envolveu hiperpolarização da membrana, mas não a liberação de NO (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Poucos estudos avaliaram o SRA na gestação diabética e apenas o fizeram em relação ao diabetes tipo 1 (VAN DIJK *et al.*, 2001). Eles foram realizados em ratas prenhes diabéticas e avaliaram a ECA, ARP e ANG II em três grupos de ratas não-diabéticas, diabéticas sem uso de insulina e o último grupo em controle com insulina. Demonstrou-se que no grupo de ratas diabéticas sem uso de insulina os níveis de ANG II e ECA estavam elevados, enquanto a ARP era normal ou diminuída. Esse grupo apresentou proteinúria intensa durante a gestação e após o parto

Concluindo, em portadores de diabetes tipo 1, períodos de descontrole glicêmico podem associar-se a alterações nos níveis de renina e da ARP, assim como elevação

da ANG II, que se correlacionam com o aumento nos níveis pressóricos e resistência vascular renal. Pacientes diabéticos bem controlados do ponto de vista glicêmico tendem a apresentar o SRA inalterado em relação a indivíduos não-diabéticos.

2.7 O sistema renina-angiotensina e o diabetes e o endotélio

Há uma grande heterogeneidade de disfunções vasculares observadas em diferentes estágios do diabetes, refletindo mecanismos bastante variados e complexos (PRASAD e QUYYUMI, 2004). A microangiopatia diabética tem sido atribuída a alterações dos fatores endoteliais vasoativos (COOPER, 1998). Numerosos fatores têm sido implicados na gênese dessa disfunção endotelial, como, por exemplo, a idade de início do diabetes, a duração da doença, o nível do controle metabólico, a coexistência de anormalidades lipídicas e alterações no SRA. Entretanto, parece que o que determina a disfunção endotelial é a combinação desses diferentes processos, mais do que um único fator isolado (HSUEH e QUIÑONES, 2003).

A própria hiperinsulinemia pode contribuir para a disfunção endotelial por induzir a um acúmulo de ácidos graxos livres, adiponectinas pró-inflamatórias e TNF- α e também para a formação das “low density lipoprotein” (LDL) oxidadas, redução das “high density lipoprotein” (HDL) além de desenvolvimento de hipertensão e hiperuricemia (VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005).

Recentemente, vários estudos demonstraram disfunção endotelial em pacientes

euglicêmicas com história de diabetes gestacional (XIANG *et al.*, 2004) e também em parentes de primeiro grau de portadores de diabetes tipo 2 associado à insulino-resistência (BALLETSCHOFER, 2003), além da redução na incidência de casos novos de diabetes tipo 2 em pacientes em uso prolongado de inibidores da ECA (VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005). Esses dados apóiam a hipótese de inter-relação entre alterações no metabolismo de carboidratos, alterações no SRA e a disfunção endotelial (KNOCK *et al.*, 1997; PARADISI *et al.*, 2002).

Nos pacientes com diabetes tipo 2, onde predomina a insulino-resistência, há significativo aumento do risco de doenças cardiovasculares (PRASAD e QUYYUMI, 2004). Há forte evidência de que a insulino-resistência e a disfunção endotelial progridam paralelamente (HSUEH, 2003). A disfunção endotelial resulta em inflamação, que aumenta o estresse oxidativo e culmina na doença aterosclerótica. Por sua vez, níveis elevados de ANG II reforçam a disfunção endotelial por mecanismos variados, como o estímulo à proliferação celular e ao desequilíbrio nas vias de sinalização da insulina através da MAP-K (SAAD; VELLOSO; CARVALHO, 1995), aumento na geração do TGF- β 1, do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), dos fatores pró-trombóticos, entre outros (BEDECS *et al.*, 1997; VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005).

WOLF e ZIYADEH (1997) demonstraram que hiperglicemia e ANG II (em níveis fisiológicos ou elevados) podem exercer ações co-estimulatórias sobre vários mediadores inflamatórios e co-inibir aqueles que suprimem a formação da matriz extracelular. A hiperglicemia aumenta a produção de ANG II pelas células

mesangiais, o que resulta em estímulo à secreção de TGF- β 1, diminuição da degradação e aumento de acúmulo da matriz mesangial (SINGH *et al.*, 1999).

A ativação patológica do SRA pode inibir as ações metabólicas da insulina e promover seus efeitos proliferativos. Adicionalmente, tanto hiperglicemia quanto hiperinsulinemia podem ativar o SRA por aumentar a expressão de angiotensinogênio, ANG II e receptores AT1 (PRASAD e QUYYUMI, 2004). É interessante ressaltar que insulinoaterapia em pacientes com diabetes tipo 2 melhorou a sensibilidade insulínica, o perfil lipídico e a função endotelial (VEHKAVAARA *et al.*, 2000; RASK-MADSEN *et al.*, 2001).

O aumento da incidência de complicações onde a lesão endotelial é o fator chave, como, por exemplo, a pré-eclâmpsia, a insuficiência placentária e a piora das complicações microangiopáticas, é descrito em portadoras de diabetes tipo 1 e tipo 2 que engravidam (ANG e LUMSDEN, 2001) e até mesmo naquelas que desenvolvem a doença durante a gestação (XIANG *et al.*, 2004). Ressalta-se um estudo que avaliou função endotelial em gestantes portadoras de diabetes tipo 1, onde o controle metabólico adequado foi possivelmente o responsável pela preservação da função endotelial (ANG *et al.*, 2002).

Concluindo, o SRA exerce múltiplos papéis na regulação da pressão arterial, na função renal e no desenvolvimento da nefropatia diabética. Além disto, a disfunção endotelial provavelmente se associa às complicações crônicas do diabetes e está intimamente relacionada ao equilíbrio do SRA e do SCC e à

hiperglicemia/hiperinsulinemia. O equilíbrio e a interação das ações do SRA são de vital importância na manutenção da função renal e endotelial e da pressão intraglomerular na paciente diabética, especialmente durante a gestação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil circulante do sistema renina-angiotensina nas gestantes portadoras de diabetes tipo 1 e de diabetes gestacional, comparando-as com mulheres não-grávidas e grávidas sem co-morbidades.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar o perfil circulante do SRA entre as mulheres normais: do grupo 1 (sem co-morbidades e fora da gestação) e do grupo 2 (grávidas e sem co-morbidades).
- Comparar o perfil circulante do SRA entre mulheres grávidas: normais (grupo 2) e diabéticas, ou seja, do grupo 2 (grávidas sem co-morbidades), com aquelas dos grupos 4 (grávidas e diabéticas tipo 1) e 5 (grávidas com diabetes gestacional).
- Comparar o perfil circulante do SRA entre mulheres não-grávidas: normais (grupo 1) e diabéticas tipo 1 (grupo 3).
- Comparar o perfil circulante do SRA entre mulheres diabéticas tipo 1 grávidas (grupo 4) e não-grávidas (grupo 3)

4 PACIENTES E

MÉTODOS

4.1 Pacientes

4.1.1 Faixa etária

Variou de 18 a 44 anos.

4.1.2 Procedência das gestantes

As pacientes foram encaminhadas dos ambulatórios gerais e de especialidades que prestam atendimento de pré-natal no município de Belo Horizonte.

4.1.3 Grupos observacionais (controle e estudo)

Foram avaliadas 95 pacientes, porém apenas 77 foram selecionadas para a análise final, respeitando-se os critérios de exclusão.

Elas foram divididas em cinco grupos, sendo três controles e três de estudo. Um grupo de estudo foi subdividido em dois subgrupos.

- Grupos-controle
- ✓ Grupo 1 NGND - Não-grávidas e não-diabéticas n= 12
- ✓ Grupo 2 GND - Grávidas e não-diabéticas n= 13

- ✓ Grupo 3 NGDM1 - Não-grávidas e diabéticas tipo 1 n= 12
- Grupos de estudo
- ✓ Grupo 4 GDM1 - Grávidas e diabéticas tipo 1 n= 16
- ✓ Grupo 5 GDMG - Grávidas com diabetes gestacional, controladas com dieta.
n=14
- ✓ Grupo 6 GDMG2 - Grávidas com diabetes gestacional, controladas com insulina.
n= 10

4.1.4 Características dos grupos estudados

Grupo 1- NGND: grupo-controle constituído por mulheres saudáveis, não-grávidas, em idade reprodutiva, com glicemia e pressão arterial dentro dos limites da normalidade, nas quais foram excluídas nefropatias, diabetes, hipertensão, colagenoses e uso de contraceptivo oral.

Grupo 2- GND: grupo-controle constituído por gestantes saudáveis, no terceiro trimestre da gestação, com glicemia e pressão arterial dentro dos limites da normalidade, nas quais foram excluídas nefropatias, diabetes, colagenoses. Essas pacientes freqüentaram os ambulatórios de Obstetrícia do Hospital das Clínicas (UFMG), do Hospital Odilon Behrens e da Maternidade Odete Valadares, para consulta de pré-natal de rotina. A idade gestacional foi confirmada pela avaliação de ultra-som obstétrico realizado precocemente até a 12^a semana de gestação.

Grupo 3- NGDM1: grupo-controle constituído por pacientes portadoras de diabetes tipo 1, não-grávidas, diagnosticadas conforme os critérios da “American Diabetes Association” (ADA, 2003), com glicohemoglobina de $7,5\% \pm 0,3$ e frutamina entre 2,2 e 2,8 à época da coleta de sangue.

Grupo 4- GDM1: grupo de estudo constituído por pacientes portadoras de diabetes tipo 1, grávidas, no terceiro trimestre da gestação confirmada por ultra-som precoce, com glicohemoglobina de $7,5\% \pm 0,3$ e frutamina entre 2,2 e 2,8 à época da coleta de sangue.

Grupo 5- GDMG: grupo de estudo constituído por pacientes portadoras de diabetes gestacional, no terceiro trimestre de gestação, diagnosticadas conforme os critérios da ADA (2003), em controle apenas com dieta.

Grupo 6- GDMG2: grupo de estudo constituído por pacientes portadoras de diabetes gestacional, no terceiro trimestre de gestação, diagnosticadas conforme os critérios da ADA (2003), em controle com insulina.

4.1.5 Critérios de inclusão

Grupo 1: grupo-controle formado por mulheres em idade reprodutiva, sem doenças detectáveis ao exame clínico, não hipertensas, sem nefropatias, diabetes ou hipertensão arterial confirmado a partir de exames clínico-laboratoriais.

Grupo 2: grupo-controle formado por gestantes no terceiro trimestre de gestação, sem doenças detectáveis ao exame clínico, não hipertensas, sem nefropatia, diabetes ou hipertensão arterial confirmado a partir de anamnese e exame físico minuciosos, além de exames laboratoriais de rastreamento.

Grupo 3: portadoras de diabetes tipo 1, sem complicações micro ou macrovasculares detectáveis por fundo-de-olho ou proteinúria em urina de 24 horas e com glicohemoglobina de $7,5\% \pm 0,3$ e frutossamina entre 2,2 e 2,8 à época da coleta de sangue, além de glicemia < 100 mg% medida em sangue capilar no momento da coleta do sangue.

Grupo 4: gestantes portadoras de diabetes tipo 1, sem complicações micro ou macrovasculares, com glicemia, glicohemoglobina de $7,5\% \pm 0,3$ e frutossamina entre 2,2 e 2,8 à época da coleta de sangue no terceiro trimestre da gestação.

Grupo 5: gestantes no terceiro trimestre da gestação, portadoras de diabetes gestacional, em controle com dieta, comprovado pelos critérios da ADA, sem hipertensão prévia ou pré-eclâmpsia, collagenoses ou outras doenças associadas, com glicemia < 100 mg% no momento da coleta do sangue.

Grupo 6: mesmos critérios do grupo 5, porém gestantes com diabetes gestacional em controle com insulina.

4.1.6 Critérios de exclusão

- Gestantes portadoras de diabetes tipo 2, segundo critérios da ADA (2003).
- Hipertensas crônicas ou pré-eclâmpsia atual ou passada segundo critérios de BROWN *et al.* (2000).
- Níveis de glicohemoglobina (Hb A1c) acima de 7,5% e/ou proteína glicada (frutosamina) acima de 2,8%.
- Em relação a todos os grupos, foram excluídas as gestantes que apresentaram, na ocasião da coleta de exames, alguma descompensação orgânica e/ ou metabólica mais grave.
- Em relação a todos os grupos, foram excluídas as gestantes portadoras de hipertensão arterial (critérios do “The seventh report of the Joint National Committee”, 2003) ou complicações micro ou macrovasculares do diabetes, como a nefropatia diabética e/ou retinopatia, em qualquer estágio de evolução (critérios da ADA, 2003).
- Em relação a todos os grupos, foram excluídas as gestantes que apresentaram hipertensão arterial durante o acompanhamento da gravidez.
- Em relação a todos os grupos, foram excluídas as gestantes que apresentaram, na ocasião da coleta de exames, alguma doença de caráter agudo ou intercorrência médica capaz de interferir em sua homeostase, como, por exemplo, infecções, diarreia aguda, hiperglicemia (glicemia em jejum > 100 mg%) e outras.
- Em relação a todos os grupos, foram excluídas as gestantes internadas na ocasião da coleta de exames, devido ao estresse adicional gerado pela própria internação

e pela possibilidade de apresentarem alguma descompensação de caráter transitório.

- Em relação aos grupos 1 e 3, foram excluídas as mulheres em uso de contraceptivo oral.

4.1.6.1. Exclusão de pacientes

Foram selecionadas inicialmente 95 pacientes para participação neste estudo, entretanto, apenas 77 foram utilizadas para a conclusão final do trabalho.

Os motivos da exclusão das pacientes **após** coleta do material foram variados:

1. As duas excluídas do grupo-controle 2, ou seja, grávidas e não-diabéticas, e as três do grupo 4 (grávidas portadoras de DM1) apresentaram elevação dos níveis pressóricos e proteinúria no final da gestação.
2. As cinco diabéticas tipo 1 (duas grávidas e três não-grávidas) manifestaram descontrole glicêmico no momento da coleta, ou seja, apesar de terem apresentado glicemia normal no momento da coleta do sangue para a determinação das angiotensinas, a glicohemoglobina e/ou frutossamina encontravam-se fora dos valores considerados para este estudo.
3. As oito (três do grupo 1, duas do grupo 3 e três do grupo 5) tinham problemas relacionados à coleta do material, como, por exemplo, coagulação do sangue ou excesso de fibrina, o que inviabilizava a extração em coluna das angiotensinas.

4.1.7 Aspectos éticos

As pacientes que participaram desta pesquisa foram devidamente esclarecidas sobre a natureza do estudo, tendo resguardado seu direito de, em caso de recusa, deixar de participar do mesmo. O consentimento para a participação no estudo foi obtido por escrito pela voluntária após os esclarecimentos necessários (APÊNDICE A).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e pela Câmara Departamental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da UFMG –parecer ETIC 061/03 (APÊNDICE F).

4.2 Métodos

4.2.1 Termo de consentimento

Após consentimento por escrito, as pacientes submeteram-se a coleta de exames conforme protocolo do Serviço de Endocrinologia e pré-natal de Alto risco do Hospital das Clínicas da UFMG (APÊNDICES B, C e D).

Em relação às pacientes dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 as coletas foram realizadas simultaneamente a outros exames de sangue que fazem parte da propedêutica e/ou do seguimento desses pacientes e também mediante consentimento.

4.2.2 Exames

- exames clínico-laboratoriais, segundo critérios da ADA (2003) e do “The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure” (2003), conforme descrito nos APÊNDICES B, C e D;
- exames laboratoriais de rastreamento que consistiram de dosagens séricas de glicemia de jejum e uma hora após 50g de dextrosol, uréia e creatinina, exame de urina rotina e ultra-som obstétrico realizado na primeira metade da gestação para confirmação da idade gestacional.;

4.2.3 Protocolo de acompanhamento (APÊNDICES B, C, D)

4.2.3.1 Grupo 1: não-grávidas e não-diabéticas (NGND)

As pacientes do grupo 1 foram selecionadas a partir de contato pessoal, entrevistadas e examinadas com o intuito de excluirmos aquelas que não se adequassem aos critérios de inclusão e, a seguir, submetidas à coleta de sangue, conforme descrito nos protocolos dos APÊNDICES. Não mais retornaram ao acompanhamento.

4.2.3.2 Grupo 2: grávidas e não-diabéticas (GND)

Essas gestantes foram selecionadas a partir de ambulatórios de pré-natal, especialmente provenientes do pré-natal do Hospital das Clínicas, não apresentavam co-morbidades e foram acompanhadas a cada três semanas e no pós-parto imediato, sendo excluídas aquelas que apresentaram elevação nos níveis pressóricos ou proteinúria. A coleta de sangue foi realizada apenas à época do primeiro contato.

4.2.3.3 Grupo 3: não-grávidas e diabéticas tipo 1 (NGDM1)

Essas mulheres foram selecionadas a partir do Ambulatório Borges da Costa: Pré-concepção. Foram acompanhadas mensalmente pela equipe de endocrinologia e enfermagem. Quando eram examinadas, recebiam orientação nutricional (também com acompanhamento pela equipe de nutrição), realizavam glicemias e mensalmente frutossamina e glicohemoglobina, sendo liberadas para engravidar com glicohemoglobina < 7,0%. Foram acompanhadas conforme protocolo no APÊNDICE B.

Em relação ao tratamento do diabetes, todas as pacientes foram controladas com dieta com ingesta calórica variando de 30 a 40 calorias/Kg de peso ideal pré-concepcional e atividade física. As doses de insulina humana foram reajustadas pelo menos mensalmente e sempre que necessário. Todas as mulheres estavam em uso de insulina humana NPH, divididas em duas doses (de manhã e à noite) e de insulina humana regular administrada antes das principais refeições (desjejum, almoço e jantar), se necessário.

4.2.3.4 Grupo 4: grávidas e diabéticas tipo 1 (GDM1)

As pacientes desse grupo foram selecionadas a partir do Ambulatório de pré-concepção quando já grávidas e a partir de procura direta ao serviço, provenientes do pré-natal de Alto Risco do Hospital das Clínicas, Odilon Behrens e Odete Valadares.

Elas foram acompanhadas semanalmente por endocrinologistas, obstetras e enfermeiras e, quando detectado descontrole metabólico, as doses de insulina foram reajustadas. Todas as gestantes estavam em uso de insulina humana NPH, divididas em duas doses (de manhã e à noite) e de insulina humana regular administrada antes das principais refeições (desjejum, almoço e jantar), se necessário. Foram acompanhadas conforme protocolos no APÊNDICE. D.

4.2.3.5 Grupo 5: gestantes portadoras diabetes gestacional com dieta (GDMG)

As participantes desse grupo foram selecionadas a partir dos ambulatórios de pré-natal de Alto Risco do Hospital das Clínicas, Odilon Behrens e Odete Valadares, todas classificadas conforme os critérios de Sullivan (ADA, 2003).

Em relação ao tratamento do diabetes, elas foram orientadas a controlar com medidas não farmacológicas que incluíam dieta (com ingesta calórica variando de 30 a 40

calorias/Kg de peso ideal pré-concepcional) com restrição de carboidratos (especialmente carboidratos simples) e com atividade física aeróbica, porém, quando essas medidas eram insuficientes para o bom controle, adicionou-se insulina ao tratamento. Como no grupo 4, essas pacientes também foram acompanhadas semanalmente com as mesmas providências.

O sangue foi colhido sem que fosse realizada qualquer mudança no tratamento do diabetes. As amostras sempre foram coletadas no período da manhã após jejum de aproximadamente oito horas e com o paciente em decúbito dorsal durante a retirada de sangue. Nesse momento era realizada glicemia capilar, que deveria encontrar-se entre 70 e 100 mg% para o prosseguimento da coleta.

4.2.3.5 Grupo 6: gestantes portadoras diabetes gestacional com insulina

Nesse grupo, as pacientes foram selecionadas conforme descrito para o grupo 5 e receberam insulina para controle glicêmico quando medidas dietéticas eram insuficientes para o bom controle.

A introdução de insulina foi realizada sempre que já havia hiperglicemia em jejum e/ou quando as glicemias pós-prandiais excediam o valor preconizado, em duas vezes consecutivas, conforme protocolo no APÊNDICE C. Todas as gestantes estavam em uso de insulina humana NPH, divididas em duas doses (de manhã e à noite) e de insulina humana regular administrada antes das principais refeições (desjejum,

almoço e jantar), se necessário. Como nos grupos 4 e 5, essas também foram acompanhadas semanalmente com as mesmas providências.

O sangue foi colhido sem que fosse realizada qualquer mudança no tratamento do diabetes. As amostras sempre foram coletadas no período da manhã após jejum de aproximadamente oito horas e com o paciente em decúbito dorsal durante a retirada de sangue. Nesse momento era realizada glicemia capilar, que deveria encontrar-se entre 70 e 100 mg% para o prosseguimento da coleta.

4.2.4 Protocolo do estudo

Nas gestantes dos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foi coletado sangue para determinação de ARP e dos níveis séricos de ANG I, ANG II e ANG-(1-7) por radioimunoensaio. E para os grupos de 3 a 6, dosagens séricas de glicemia, glicohemoglobina, frutossamina, sódio, uréia e creatinina. O restante dos exames foi realizado conforme os protocolos de propedêutica e acompanhamento clínico-laboratorial do Ambulatório de Endocrinologia/Pré-Natal de Alto-Risco da Faculdade de Medicina – UFMG (APÊNDICES B, C, e D).

O sangue foi colhido sem que fosse realizada qualquer mudança nos hábitos de vida desses pacientes. As amostras sempre foram coletadas no período da manhã, após jejum de aproximadamente oito horas e com o paciente em decúbito dorsal durante a retirada de sangue.

Em relação às mulheres do grupo 1 e 2, as coletas de sangue foram realizadas uma única vez. Nos demais grupos, foram realizadas conforme protocolo do pré-natal de alto-risco ou sempre que houve dúvidas nos resultados ou, ainda, devido a alguma mudança em relação ao quadro clínico inicial.

As dosagens de uréia, creatinina, glicemia, glicohemoglobina, frutossamina, sódio, bem como o restante dos exames complementares que se fizerem necessários foram obtidos utilizando-se técnicas laboratoriais convencionais que são adotadas pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas – UFMG.

- Foram determinados em cada grupo os seguintes parâmetros:
 - ✓ Atividade da renina plasmática (ARP)
 - ✓ Angiotensina I (ANG I)
 - ✓ Angiotensina II (ANG II)
 - ✓ Angiotensina 1-7 (ANG 1-7)

4.2.5 Radioimunoensaio

As amostras de sangue foram coletadas para realização de radioimunoensaio (RIE) para determinar a atividade da renina plasmática (ARP, RIE para angiotensina I) e para dosagem das angiotensinas [ANG I, ANG II e ANG-(1-7)]. Os RIE foram realizados conforme os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da

UFMG. As variabilidades intra e inter ensaio foram as seguintes para angiotensinas e ARP:

ANG II: variabilidade inter-ensaio: 5% e intra-ensaio: 9%

ANG I: variabilidade inter-ensaio: 6,6% e intra-ensaio: 9,6%

ARP: variabilidade inter-ensaio: 6,6% e intra-ensaio: 9,6%

Quanto à coleta de sangue, é importante ressaltar que o perfil cromatográfico de peptídeos de angiotensina pode sofrer alterações importantes decorrentes de metabolismo *ex-vivo* de seus precursores (BOTELHO, 1994). Assim, é essencial usar uma mistura de inibidores de protease para a coleta de sangue a fim de minimizar-se o metabolismo dos peptídeos *in vitro*. Além da coleta de sangue, as técnicas de extração dos peptídeos das amostras e os radioimunoensaios foram também previamente padronizados no Laboratório de Hipertensão do ICB – UFMG.

Existem inúmeros ensaios para a dosagem da renina no plasma. Optou-se, neste estudo, pela determinação da atividade da renina plasmática e não da sua dosagem. A taxa de formação da ANG I a partir do angiotensinogênio endógeno é definida como ARP. A quantidade de ANG I produzida em um determinado período de tempo é medida por radioimunoensaio e a ARP é expressa em nanogramas (ng) por mililitro por minuto. A ARP é então fortemente influenciada pelos níveis de angiotensinogênio e de renina plasmática. Já a quantificação da concentração da renina plasmática não sofre variações dos níveis de angiotensinogênio (HABER *et al.*, 1969).

4.3 Protocolo geral

a) Coleta de sangue

As amostras de sangue para dosagem da ARP e para a determinação das ANG foram obtidas através de coleta em veia periférica, todas realizadas pela manhã, com jejum prévio de pelo menos oito horas. Antes da coleta, as pacientes permaneceram em repouso por pelo menos 15 minutos e a retirada do sangue foi realizada com a paciente deitada. O seguinte protocolo foi seguido:

- Foram coletados 2ml de sangue de cada gestante para determinação da ARP, em seringas lavadas com ácido etiledodiamino tetra acético (EDTA) a 7,5% e imediatamente transferidos para tubos de polietileno mantidos em gelo, contendo 200 μ l de EDTA a 7,5%, ou seja, 100 μ l para cada 1ml de sangue.
- Foram coletados 10ml de sangue de cada gestante para determinação das ANG em seringas lavadas com um coquetel de inibidores (TAB. 1) de angiotensinases e imediatamente colocados no gelo. As amostras foram colhidas em tubos de polietileno contendo 700 μ l do coquetel de inibidores de angiotensinases (140 μ l para cada 1ml de sangue) e mantidas no gelo.

TABELA 1

Composição do coquetel de inibidores de angiotensinas

Inibidores enzimáticos utilizados	Concentração	Quantidade/1ml de sangue coletado
Para-hidroximercurio-benzoato (pOHHgBz)	1 mM	10 µl
O-fenantrolina	9,1 mM	50 µl
Para-metilsulfonil fluoreto (PMSF)	1 mM	10 µl
Pepstatin A	0,5 mM	20 µl
Ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA)	75 g/ l	50 µl

As soluções de pOHHgBz e o PMSF foram preparados imediatamente antes das coletas da seguinte forma:

- pesava-se 1mg de pOHHgBz em balança analítica, diluindo-se, a seguir, em 2.5ml de NaCl 0,9%;
- pesava-se 1,74mg de PMSF em balança analítica, diluindo-se, a seguir, em 10ml de metanol (MeOH) a 50%.

Depois disso, preparava-se o coquetel de inibidores de angiotensinas logo antes do momento da coleta de sangue, utilizando-se essas soluções juntamente com pepstatin A 0,5mM e o-fenantrolina 9,1mM, que eram conservados em “freezer” e EDTA a 7,5%, mantido em geladeira.

b) Obtenção das amostras de soro

Após a coleta das amostras de sangue, os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada e centrifugados a 2000rpm durante 20 minutos a uma temperatura de

-4°C. O soro obtido foi mantido em tubos dentro de um “freezer” a aproximadamente -20°C para extração imediata das angiotensinas ou nas próximas 48 horas e processamento dos RIE em três a sete 7 dias, no máximo.

c) Extração das amostras

A extração de angiotensinas do plasma foi realizada em colunas “bond elut”. As soluções e amostras de plasma foram passadas pela coluna através da adaptação de uma seringa que permitia aplicar pressão positiva à coluna. Antes disso, as amostras foram re-centrifugadas a -4°C sob 2.000rpm e durante 20 minutos. O processo de extração obedeceu:

- a coluna foi pré-ativada através de lavagem com 20ml de metanol 99,9% (MeOH 99,9%) / ácido trifluoroacético 0,1% ácido trifluoroacético - TFA 0,1% e 20ml de uma solução aquosa de TFA 0,1%;
- a seguir, a coluna foi lavada seqüencialmente com 10ml de TFA 0,1%, 3ml de TFA 0,1% / albumina sorobovina (BSA) 0,1%, 10ml de MeOH 10% / TFA 0,1% e, por último, 3ml de TFA 0,1%;
- nesse momento, aplicava-se a amostra, anotando-se o volume de plasma colocado na coluna;
- após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada duas vezes com 10ml TFA 0,1%;
- a seguir, com 10ml de MeOH a 20% / TFA 0,1%;

- os peptídios retidos na coluna eram eluídos com 3ml de MeOH 99,9% / TFA 0,1% e armazenados a -20°C em tubo de cristal previamente lavado com BSA 0,1%.

Os peptídeos, em solução alcoólica, foram concentrados até resíduo através da evaporação do componente alcoólico em centrífuga evaporadora durante oito a 12 horas e estocados em “freezer” a -20° C até o processamento das amostras pelo RIE.

d) Determinação da atividade de renina plasmática (ARP)

Para determinação da ARP (TAB. 2), o plasma (0,2ml) foi incubado em banho-maria a 37°C durante duas horas, juntamente com 0,2ml de tampão I da ANG I (pH 6,8), 0,02ml de 8-OH-quinoleína 48mM e 0,01ml de PMSF 161mM. Uma alíquota similar era mantida a 4°C em banho de gelo. Ao final do tempo de incubação, 0,1ml de cada amostra do plasma incubado era adicionado ao RIE para ANG I descrito. A ARP foi determinada através de RIE para ANG I. A determinação foi feita pela quantidade de ANG I formada no período de incubação (duas horas) a 37° C, sendo expressa em ng ANG I/ml de plasma/h. A ARP foi calculada subtraindo-se a concentração de ANG I na amostra incubada a 37° C daquela mantida em banho de gelo.

TABELA 2

Tratamento da amostra para determinação da atividade da renina plasmática

	37° (µl)	Gelo(µl)
Plasma	100	100
Tampão ANG I	200	200
8 OH quinoleína	20	20
PMSF 16,1mM	10	10

Cálculo para obtenção da ARP: $[(pg\ 37^\circ) - (pg\ gelo)] \times 33/2000 = x\ ng\ ang\ I/ml/h$

e) Determinação por radioimunoensaio para angiotensina I

O material já ressuspendido anteriormente foi retirado do “freezer” a -20°C e colocado para descongelar em gelo (TAB. 3). Cada ensaio foi realizado em duplicata e seguiu o seguinte protocolo:

- Preparo do tampão I: tris acetato 0,2M pH 7,4: 12,1g de tris foram dissolvidos em aproximadamente 450ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com ácido acético e o volume completado para 500ml com H₂O deionizada.
- Preparo do tampão II: tampão tris acetato 0,2M pH 6,8 com BSA 0,05%. Preparado no momento de uso pela adição de 0,5mg de BSA por ml de tampão tris acetato 0,2 M em pH de 7,4.
- Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1% / ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR): 4,5g de NaCl 0.9% e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500ml de solução de ácido acético 0,03%.
- O anticorpo policlonal empregado foi produzido no Laboratório de Hipertensão do ICB/UFMG (Ac de coelho Larry Reforço 1). Com alíquotas

de 20 microlitros (alíquota mãe) foi utilizada a diluição de 1:20.000 (cada alíquota de 20 μ l de alíquota mãe foi adicionada a 1980 μ l de tampão de ANG I, gerando alíquotas de 100 μ l para serem usadas no ensaio).

- Cada alíquota de 100 μ l Ac recebeu 900 μ l de tampão de ANG I (observação: No RIE foram usados 50 μ l dessa diluição para cada tubo).
- 125 IANG I: 125 IANG I marcada e purificada foi diluída com tampão II para uma concentração de 6000cpm por 0,1ml.
- As concentrações de padrão utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25pg/ 0,1ml, preparadas a partir de uma solução do estoque de 1mg/ml diluída no tampão I.
- A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 62,5mg de dextran e 625mg de carvão ativado, dissolvidos em 100ml de tampão I. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por uma hora antes do uso.

TABELA 3

Soluções e seus respectivos volumes utilizados para o radioimunoensaio e
angiotensina I

Soluções (µl)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão II	—	100	100	—	—
Tampão I	1500	400	300	300	300
BSA 5%	100	100	—	100	100
Amostra	—	—	100	—	100
Padrões (200-6,25pg)	—	—	—	—	—
¹²⁵ IANG I (6000cpm)	100	100	100	100	100
Anticorpo (1:20.000)	—	—	100	100	100
Volume final	1700	700	700	700	700

- B = fração de peptídeo marcado ligado.
- Po = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado.
- Br = branco.

Os tubos eram agitados em vortex e incubados a 4°C durante 18 a 22 horas.

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran, eles foram imediatamente agitados em vortex e centrifugados a 4°C em 2500rpm e por 20 minutos, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ . As concentrações de ANG I foram fornecidas pela programação do contador de radioatividade a partir de curva-padrão construída. Essa concentração foi, então, corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

f) Determinação por radioimunoensaio para angiotensina II

O material foi submetido inicialmente à secagem na evaporadora e ressuspendido em tampão de ANG II, conforme descrito na TAB. 4. Vale salientar que todos os testes foram feitos em duplicata. O anticorpo empregado foi produzido no Laboratório de Hipertensão do ICB/UFMG.

- Tampão I: tampão tris-ácido clorídrico (HCl) 0,1M, EDTA 15mM, lisozima 0,1% pH 7,4: 6,0g de tris juntamente com 2,79g de EDTA e 0,5g de lisozima foram dissolvidos em, aproximadamente, 450ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3N e o volume completado para 500ml com H₂O deionizada.
- Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1% / ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR): 4,5g de NaCl 0,9% e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500ml de solução de ácido acético 0,03%.
- Tampão II: tampão tris-HCl 0,1M pH 7,4 6,0g de tris foram dissolvidos em, aproximadamente, 450ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3N e o volume completado para 500ml com H₂O deionizada.
- Anticorpo policlonal (título 1:160.000): preparado a partir de uma solução do estoque no título de 1:2500, pela dissolução em tampão I.
- ¹²⁵IANG II: ¹²⁵IANG II marcada e purificada foi diluída com tampão I para uma concentração de 6000cpm por 0,1ml.
- As concentrações da curva-padrão utilizadas foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5pg/ 0,2ml, preparadas a partir de uma solução do estoque de 2mg/ ml.

- A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 25mg de dextran e 250mg de carvão ativado dissolvido em 100ml de tampão II. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por uma hora antes do uso.

TABELA 4

Soluções e seus respectivos volumes utilizados para o
radioimunoensaio de angiotensina II

Soluções (µl)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão I ANG II	1100	100	_____	_____	_____
Tampão II ANG II	200	200	200	_____	_____
Padrões (80-2,5pg)	_____	_____	_____	200	_____
Amostra	_____	_____	_____	_____	200
¹²⁵ IANG II (6000cpm)	100	100	100	100	100
Anticorpo (1:160.000)	_____	_____	100	100	100
Volume Final	1400	400	400	400	400

- B = fração de peptídeo marcado ligado.
- Po = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado.
- Br = branco.

Os tubos eram agitados em vortex e incubados a 4° C durante 18 a 22 horas.

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran, eles foram imediatamente agitados em vortex e centrifugados a 4°C, em 2500rpm e por 20 minutos, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada

em detector de radiação γ . As concentrações de ANG II foram fornecidas pela programação do próprio contador de radioatividade a partir de curva-padrão construída. Essa concentração foi, então, corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

g) Determinação da angiotensina-(1-7) por RIE

O material já ressuspenso foi retirado do “freezer” a -20° C e colocado para descongelar em gelo. O anticorpo empregado foi produzido no Laboratório de Hipertensão do ICB/UFMG e foi utilizado na diluição de 1:20.000 em tampão tris-HCl TAB. 5). Cada ensaio foi realizado em duplicata e seguiu o seguinte protocolo:

- Tampão I: tampão tris-HCl 50mM, BSA 0,1%, NaCl 50mM, azida sódica 0,02% pH 7,5 3,0g de tris juntamente com 0,5g de BSA, 1,46g de NaCl e 0,1g de azida sódica foram dissolvidos em aproximadamente 450ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,5 com HCl 3N e o volume completado para 500ml com H₂O deionizada.
- Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1% / ácido acético 0,03%: 4,5g de NaCl e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500ml de solução de ácido acético 0,03%.
- Anticorpo policlonal (título 1: 20.000): preparado a partir de uma solução do estoque no título de 1:500, pela dissolução em tampão I.
- ¹²⁵IANG-(1-7): ¹²⁵IANG-(1-7) marcada e purificada foi diluída com tampão I para uma concentração de 6000cpm por 0,1ml.

- As concentrações de padrão utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25pg/ 0,1ml, preparadas a partir de uma solução do estoque de 2 mg/ml diluído na SR.
- A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 62,5mg de dextran e 625mg de carvão ativado dissolvidos em 100ml de tampão I. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por uma hora antes do uso.

TABELA 5

Soluções e seus respectivos volumes utilizados para o radioimunoensaio de angiotensina-(1-7)

Soluções (µl)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão II de Ang II	_____	100	100	_____	_____
Tampão I	1300	200	100	100	100
Amostra	_____	_____	_____	_____	100
Padrões (200-6,25 pg)	_____	_____	_____	100	_____
¹²⁵ Iang-(1-7)(6000cpm)	100	100	100	100	100
Anticorpo (1:20.000)	_____	_____	100	100	100
Volume Final	1400	400	400	400	400

- B = fração de peptídeo marcado ligado.
- Po = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado.
- Br = branco.

Os tubos foram agitados em vortex e incubados a 4°C, durante 18 a 22 horas.

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran, eles foram imediatamente agitados em vortex e centrifugados a 4°C em 2500rpm e por 20 minutos, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ .

As concentrações de ANG (1-7) foram obtidas pela programação do contador de radioatividade a partir de curva-padrão construída. Essa concentração foi corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

4.4 Cálculo do tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra, foi realizado experimento-piloto com aproximadamente 10 pacientes nos grupos observacionais. Esse procedimento foi adotado porque não foi possível uma estimativa satisfatória do tamanho amostral, a princípio, por não se ter idéia da variabilidade dos radioimunoensaios em gestantes diabéticas. Segundo LEMESHOW *et al.* (1990), é aceitável que os cálculos que estimam o tamanho da amostra possam ser feitos após experimentos-piloto iniciais e adotando-se os seguintes parâmetros:

- Erro α de 0.05 (5%);
- Erro β de 0.20 (20%), com poder estatístico de 80%.

Do ponto de vista estatístico, LEMESHOW; STANLEY; HOSMER (1990) consideram uma estratégia adequada a utilização de dados obtidos em experimentos-piloto iniciais para o cálculo do tamanho de amostra. Sendo assim, no presente estudo, a partir de cálculos utilizando-se o “software” EPI-INFO versão 6.0, verificou-se que um total de 10 pacientes em cada grupo já seria suficiente para detectar diferenças entre ARP e angiotensinas circulantes, com poder estatístico de 80% e erro α de 0,05.

4.5 Desenho do estudo

O estudo é prospectivo, observacional.

Primeira fase

As pacientes foram atendidas e selecionadas a partir dos Ambulatórios de Endocrinologia e do pré-natal normal e de alto risco do HC-UFMG e divididas nos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Foram orientadas sobre o trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A). Submeteram-se a consultas e exames do protocolo de acompanhamento de gestantes diabéticas desses serviços, exceto as do grupo 1, que fizeram apenas os descritos previamente. Entre a 24^a e a 35^a semanas de gestação, foram realizados: dosagens de ARP, níveis de angiotensinas [ANG I, ANG II e ANG-(1-7)], depuração de creatinina e a excreção de proteína, além de glicemia, glicohemoglobina, frutossamina, íons.

Segunda fase

As pacientes foram acompanhadas durante a gestação e todos os dados foram dispostos em um protocolo de acompanhamento (APÊNDICES B, C, D).

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada da seguinte forma:

- a) Análise descritiva e caracterização dos dados brutos. Os dados foram avaliados isoladamente e submetidos à análise, sendo excluídos valores considerados “outliers”, após padronização, ou seja, superiores a 2 DP ou inferiores a -2DP.
- b) Análise descritiva e caracterização dos dados limpos, já excluídos os “outliners”.
- c) Análise das variáveis estudadas para escolha do método estatístico a ser aplicado, através da distribuição de normalidade das variáveis. Aplicado o teste de normalidade Anderson-Darling e elaboradas as seguintes hipóteses: H_0 - os dados têm distribuição normal e H_a - os dados não têm distribuição normal. Nível de significância 5%.
- d) Foi realizada comparação de dados entre os grupos controle (NGND, GND, NGDM1 e os grupos de estudo GDM1, GDMG e GDMG2).
- e) Muitas variáveis não apresentavam distribuição normal, portanto, o teste utilizado para comparação dos grupos foi o “Kruskal Wallis Test” e o “Mann Whitney Test” com nível de significância de 5%. Quando necessário, foi

aplicado o teste de “Dunn” (H_0 : os grupos são iguais; H_1 : os grupos não são iguais).

- f) Os resultados foram apresentados como mediana e foram considerados estatisticamente diferentes para valores de $p < 0,05$.
- g) As comparações foram feitas com o “software Graph Pad Prism”, versão 3,0 e SPSS versão 11. Para o teste de “Dunn”, foi utilizado o programa “Graph pad”, versão 3.06.

5 RESULTADOS

Os seis grupos de estudo foram avaliados separadamente e em conjunto. As TAB. 8 a 14 estão no APÊNDICE E.

5.1 Características dos grupos de pacientes estudadas

Os dados completos encontram-se na TAB. 6.

5.1.1 Idade

A idade média em todo o grupo foi de 30 ± 6 anos, o que não diferiu entre os grupos, conforme demonstrado na TAB. 8.

5.1.2 Índice de massa corporal

O índice de massa corporal (IMC) teve distribuição normal, com média de 26 ± 4 para todos os grupos, não diferindo entre eles (TAB. 9).

5.1.3 Idade gestacional

A idade gestacional média, para todos os grupos, foi de 31 ± 4 semanas (TAB 10).

5.1.4. Tempo de diabetes

O tempo médio de diagnóstico do diabetes tipo 1 foi de 6 ± 2 anos para os dois grupos de pacientes portadoras de diabetes tipo 1 (TAB. 11).

TABELA 6

Características dos grupos estudados

Todos os grupos	n	Média	Desvio- Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
IDADE (anos)	77	30	6	19	30	45
IDADE GESTACIONAL						
(semanas)	53	31	4	20	31	36
TEMPO DE DIABETES (anos)	28	6	2	2	6	11
IMC (kg/m ²)	77	26	4	16	27	36

5.1.5 Uso de insulina

- a) Grupos 1 e 2: mulheres sem diabetes que, desta forma, não utilizaram insulina.
- b) Grupos 3 e 4: a dose média de insulina NPH para o grupo 3 (diabéticas não-grávidas) foi de 30 ± 4 unidades ao dia, além de insulina humana regular com dose média de 8 ± 4 unidades ao dia.

No grupo 4, composto por gestantes portadoras de diabetes tipo 1, a dose média de insulina NPH à época da coleta das angiotensinas foi de 40 ± 6 unidades ao dia, além de insulina humana regular, com dose média de 10 ± 4 unidades ao dia.

- c) Grupo 5: composto por 14 gestantes portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta.
- d) Grupo 6: 10 gestantes portadoras de diabetes gestacional. Foram utilizadas insulinas de ação intermediária (NPH) e de ação rápida (regular), com dose média para a NPH de 30 ± 8 unidades ao dia e para a regular de 12 ± 4 unidades ao dia.

5.1.6 Dados perinatais (TAB. 7)

a) Grupo 2: grávidas e não-diabéticas:

- Parto vaginal em nove de 12 gestantes (78%) sem complicações materno-fetais
- Em média: $38 \pm 1,5$ semanas
- Peso médio dos recém-nascidos: $3,2 \pm 0,6$ Kg

b) Grupo 4: grávidas e portadoras de diabetes tipo 1

Parto vaginal em cinco de 12 gestantes (42%), sendo que duas apresentaram infecção urinária após o parto cesárea. Quanto aos recém nascidos, três necessitaram de fototerapia devido à icterícia, dois apresentaram taquipnéia transitória e outros três

hipoglicemia assintomática, corrigida com oferta alimentar, sem maiores repercussões.

- O parto ocorreu, em média, com $37 \pm 1,5$ semanas.
- O peso médio dos recém-nascidos foi de $3,0 \pm 0,6$ Kg.

c) Grupo 5 e 6: grávidas e portadoras de diabetes gestacional

- Parto vaginal em 14 de 24 gestantes (58%) e de 10 de 14 gestantes que controlaram apenas com dieta e em quatro de 10 que controlaram também com insulina. Houve relato de um caso de taquipnéia transitória do recém-nascido e dois de hipoglicemia assintomática e rapidamente corrigida em dois recém-nascidos de mães que se encontravam em uso de insulina.
- O parto ocorreu, em média, com 38 ± 2 semanas.
- O peso médio dos recém-nascidos foi de $3,3 \pm 0,6$ Kg.

TABELA 7

Dados perinatais nos grupos de gestantes, ou seja, grupos 2, 4 e 5

	Grávida Não-diabética	Grávida diabética tipo 1	Diabetes gestacional
Tipo de parto: vaginal	78%	42%	58%
Época do parto (semanas)	$38 \pm 1,5$	$37 \pm 1,5$	38 ± 2
Peso ao nascimento (Kg)	$3,2 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,6$

5.2 Angiotensinas e atividade da renina plasmática

Os valores individuais e comparativos das angiotensinas estão apresentados nas TAB. 13, 14 e 15. Os dados que se seguem dizem respeito inicialmente aos valores individuais em cada grupo e, a seguir, os valores comparando os grupos entre si.

5.2.1 Análise individual dos resultados

Os resultados de todo o grupo encontram-se compilados na TAB. 13. As descrições individuais dos grupos serão realizadas utilizando-se média \pm erro-padrão da média (EPM) para as variáveis ANG I, ANG II, ANG-(1-7) e ARP. As análises comparativas e os gráficos estão apresentados em medianas. Para as razões entre as angiotensinas foi utilizada a mediana da razão.

5.2.1.1 Grupo 1 controle: mulheres não-grávidas e não-diabéticas (NGND)

O grupo I, controle, foi constituído por 12 mulheres em idade reprodutiva, não-grávidas. Para se estudar o SRA em condições fisiológicas, foram determinados a ARP e os níveis basais de angiotensinas [ANG I, ANG II e ANG-(1-7)]. A ARP apresentou média de $4,41 \pm 1,27$ ng ANG I/ ml/h e mediana de 2,10ng ANG I/ml/h. Em relação à determinação da ANG I, a média foi de $13,99 \pm 4,04$ pg/ml e a mediana de 11,56pg/ml. A ANG II apresentou média de $50,39 \pm 14,55$ pg/ml e mediana de

25,70pg/ml. No que se refere à ANG-(1-7), a média foi de $17,80 \pm 5,14$ pg/ml e a mediana de 17,40pg/ml. (GRÁF. 1).

Outra forma de se avaliar o SRA é através do cálculo da razão entre os níveis de ANG II /ANG I e os níveis de ANG-(1-7) /ANG I. Esse cálculo é feito dividindo-se os valores obtidos para as angiotensinas II e (1-7) pelos níveis de ANG I. Essas relações indicam, de forma indireta, a conversão de ANG I tanto em ANG II quanto em ANG-(1-7). No grupo-controle, as medianas das razões entre ANG II /ANG I e entre ANG-(1-7) /ANG I foram, respectivamente, $2,62 \pm 6,17$ e $1,26 \pm 1,57$. Além desses cálculos, também a razão entre ANG II/ANG-(1-7) é interessante de se analisar, pois possibilita mais noção de qual angiotensina está preponderando, uma vez que apresenta, na maioria das vezes, efeitos antagônicos, como por exemplo, vasoconstrição/vasodilatação. A mediana da razão ANG II /ANG (1-7) resultou $2,07 \pm 1,54$. Esses valores indicam um discreto predomínio de formação de ANG II em relação à ANG-(1-7), porém sem significância estatística.

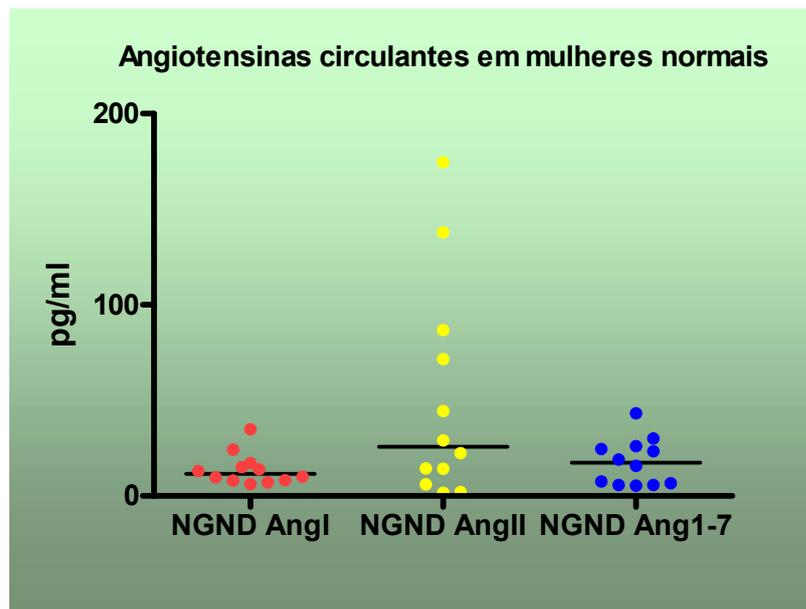


GRÁFICO 1 - Distribuição das concentrações circulantes de angiotensinas em mulheres não-grávidas e não-diabéticas (NGND).

ANG I=Angiotensina I, ANG II=Angiotensina II, ANG-(1-7) =ANG -(1-7). $n=12$

5.2.1.2 Grupo 2: gestantes não-diabéticas

O grupo 2 foi constituído por 12 gestantes saudáveis, sem diabetes ou hipertensão. Para estudar-se o SRA durante a gestação normal, foram determinadas a ARP e os níveis basais de angiotensinas [ANG I, ANG II e ANG-(1-7)]. As médias \pm EPM foram: ARP: $12,52 \pm 3,42$ ng ANG I/ml/h; ANG I: $35,29 \pm 9,79$ pg/ml; ANG II: $88,51 \pm 24,55$ pg/ml e ANG-(1-7): $44,86 \pm 12,44$ pg/ml. O valor da mediana foi de 10,69ng ANG I/ml/h para ARP; 19,54pg/ml para a ANG I; 58,80pg/ml para a ANG II e 44,90pg/ml para a ANG -(1-7).

As relações entre os níveis de ANG II /ANG I e ANG-(1-7) /ANGI também foram calculadas para o grupo 2, sendo as medianas das razões, respectivamente, de 4,46 e 2,85. Ainda no que diz respeito a essas pacientes, a razão ANG II /ANG (1-7) apresentou mediana de 1,83. Observou-se, à semelhança do grupo-controle, o predomínio da formação de ANG II em relação à ANG-(1-7).

- Comparação entre grupo 1 e grupo 2 (não-grávidas e não-diabéticas e grávidas não-diabéticas)

Quando comparados os grupos 1 e 2, ou seja, mulheres sem co-morbidades, o grupo 1 composto por não-gestantes e o grupo 2 por gestantes não-diabéticas no terceiro trimestre de gestação, observou-se elevação significativa nos níveis de ANG I, ANG-(1-7) e ARP, com valores de $p < 0,05$ (respectivamente: 0,03; 0,02 e 0,01), porém ANG II foi semelhante nos dois grupos, com valor de $p = 0,18$, assim como a relação entre ANG II /ANG-(1-7), que apresentou valor de $p = 0,97$, e a relação ANG-(1-7) / ANG I, com valor de $p = 0,51$.

Desta forma, ficou evidente a ativação do SRA durante a gestação de mulheres sem co-morbidades, dado muito semelhante ao encontrado na literatura, porém a ANG II não se elevou significativamente na gestação.

Os GRÁF. 2 a 7 mostram as relações entre as ANG e ARP entre mulheres normais, grávidas e não-grávidas.

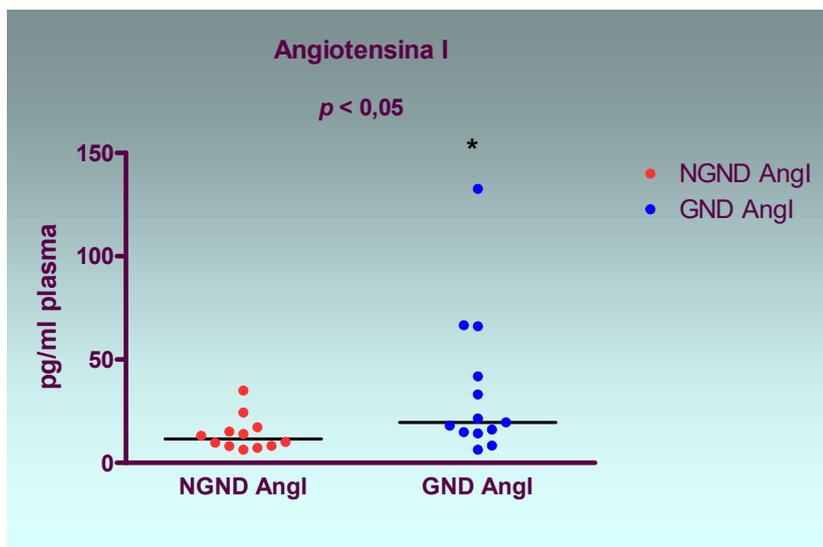


GRÁFICO 2 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de Ang I entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.

Angiotensina I (Ang I).

NGND (não-grávida e não-diabética) $n = 12$ e GND (grávida e não-diabética) $n = 13$. * $p < 0,05$

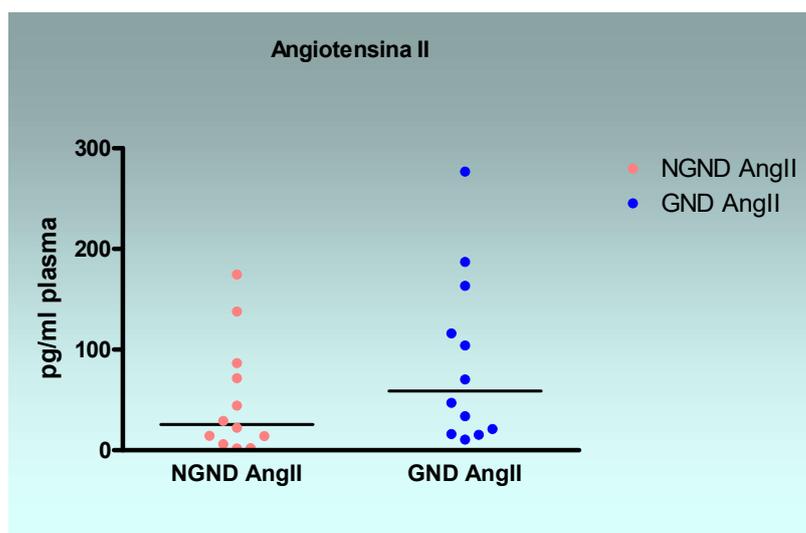


GRÁFICO 3 – Interferência da gravidez nos níveis circulantes de Ang II, entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.

NGND (não-grávidas e não-diabéticas) $n = 12$ e GND (grávidas e não-diabéticas) $n = 13$. $p > 0,05$.

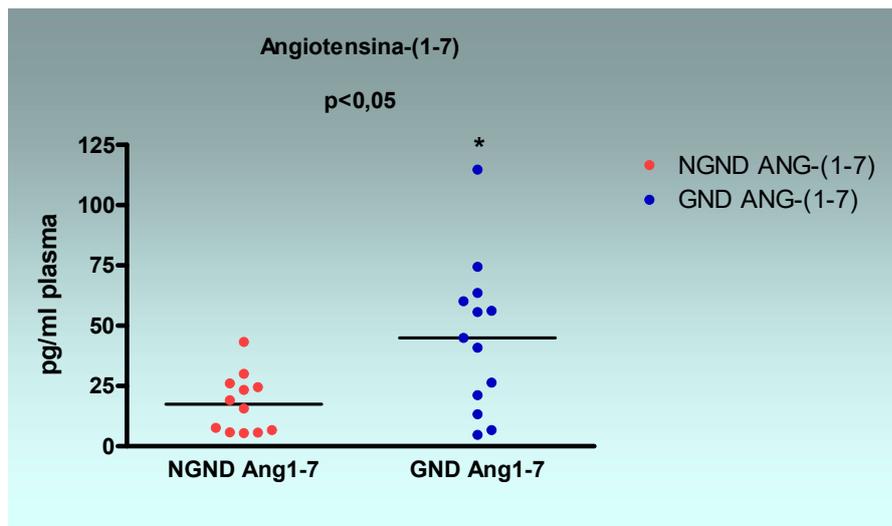


GRÁFICO 4 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de ANG-(1-7) entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.

Angiotensina-(1-7) [ANG-(1-7)]. NGND $n = 12$ e GND $n = 13$. * $p < 0,05$

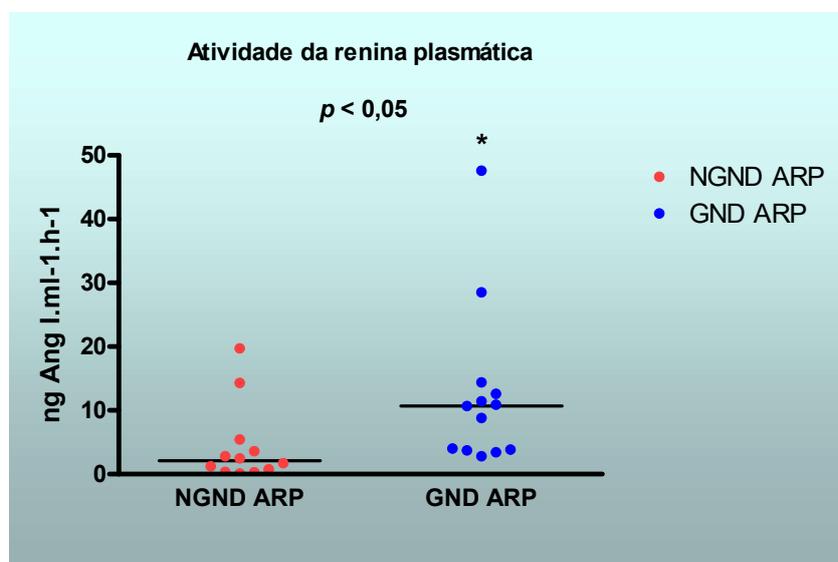


GRÁFICO 5 - Interferência da gravidez nos níveis circulantes de ARP entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.

ARP (Atividade da Renina Plasmática), NGND $n = 12$ e GND $n = 13$. * $p < 0,05$

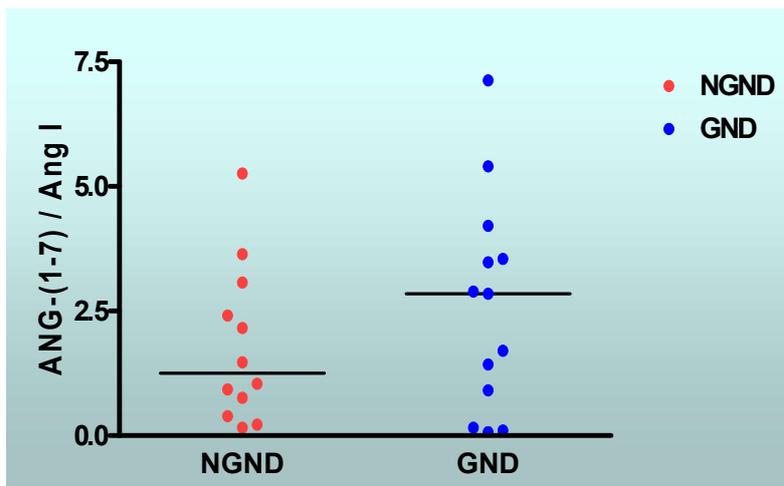


GRÁFICO 6 - Análise comparativa das medianas das razões de Ang-(1-7) /Ang I entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.

ANG(1-7)[ANG-(1-7)] e ANG I=angiotensina I. NGND n= 12 e GND n = 13. $p>0,05$

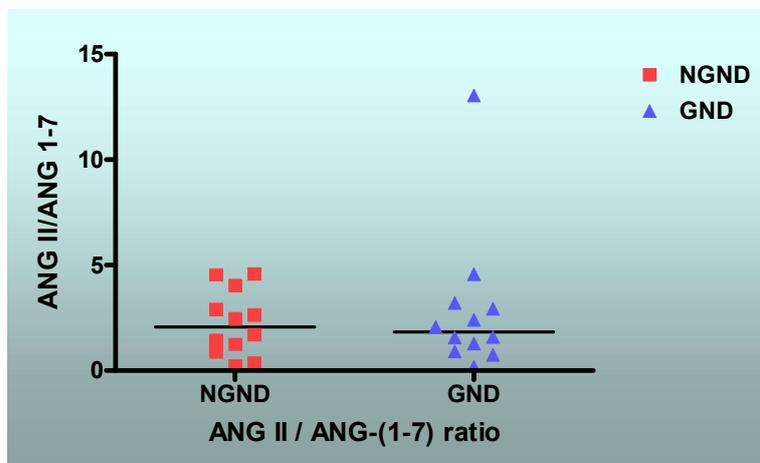


GRÁFICO 7 - Análise comparativa das medianas das razões de Ang II /Ang -(1-7) entre os grupos controle de mulheres sem diabetes: não-grávidas x grávidas.

ANG(1-7)[ANG-(1-7)] e ANG I=angiotensina I. NGND n= 12 e GND n = 13. $p>0,05$

Angiotensina-(1-7)[ANG-(1-7)] e ANG I=angiotensina I. NGND $n= 12$ e GND $n=13$. $p=0,97$.

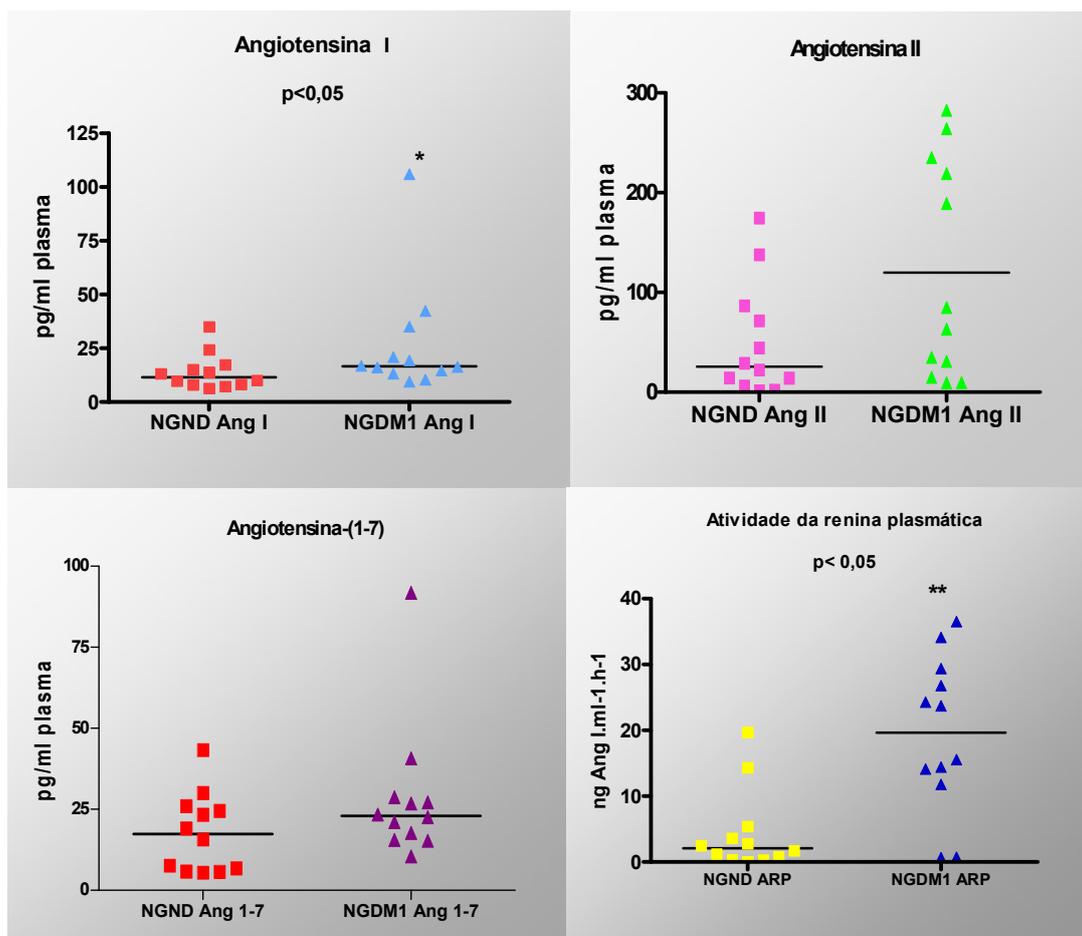
5.2.1.3 Grupo 3: mulheres diabéticas tipo 1 não-grávidas

O grupo 3 foi constituído por 12 portadoras de diabetes tipo 1.

Para estudar-se o SRA em mulheres portadoras de diabetes tipo 1, não-grávidas, foram determinados a ARP e os níveis basais de angiotensinas [ANG I, ANG II e ANG-(1-7)]. As médias \pm EPM foram: ARP: $19,64 \pm 5,58$ ng ANG I/ml/h; ANG I: $26,70 \pm 7,71$ pg/ml; ANG II: $119,79 \pm 34,58$ pg/ml e ANG-(1-7): $28,42 \pm 8,20$ pg/ml. As medianas foram: ARP: 19,64ng ANG I/ml/h; ANG I: 16,59pg/ml; ANG II: 73,91 e ANG-(1-7): 22,94pg/ml.

Quando comparado o grupo de mulheres não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 com aquelas não-grávidas e não-diabéticas, observou-se elevação significativa nos níveis circulantes de ARP e ANG I ($p < 0,05$), porém elevações não significativas de ANG II e ANG-(1-7) - (GRÁF. 8 a 11).

Além disso, as medianas das razões de ANG-(1-7) / ANG I, ANG II/ANG I e ANGII/ANG-(1-7) para o grupo de mulheres diabéticas tipo 1, não-grávidas, foram, respectivamente, 1,34; 3,11 e 1,93. Quando comparadas essas razões com aquelas encontradas entre as mulheres do grupo-controle I, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.



GRÁFICOS 8, 9, 10, 11 - Interferência do diabetes tipo 1 nas concentrações de angiotensinas circulantes e atividade da renina plasmática entre mulheres fora da gravidez, em mulheres com e sem diabetes tipo 1 (da esquerda para a direita).

* e ** $p < 0,05$, com elevação significativa de ARP e ANG I no grupo de mulheres portadoras de diabetes tipo 1, não-grávidas (NGDMI).

5.2.1.4 Grupo 4: diabéticas tipo 1 grávidas

O grupo 4 foi constituído por 14 gestantes no terceiro trimestre de gestação, portadoras de diabetes tipo 1.

Para estudar-se o SRA nas gestantes diabéticas tipo 1, foram determinados: a ARP e os níveis basais de angiotensinas [ANG I, ANG II e ANG-(1-7)]. A ARP apresentou média de $12,12 \pm 3,36$ ng ANG I/ml/h. Em relação à determinação da ANG I, a média foi de $61,60 \pm 15,90$ pg/ml. Para a ANG II, a média foi de $87,90 \pm 22,71$ pg/ml. No que se refere à ANG-(1-7), a média foi de $47,55 \pm 12,30$ pg/ml. As medianas para essas variáveis foram as seguintes: ARP: 4,44ng ANG I/ml/h; ANG I: 54,80pg/ml; ANG II: 93,30pg/ml e ANG-(1-7): 44,31pg/ml.

Também foram calculadas as relações entre os níveis de ANG II e ANG I e de ANG-(1-7) e ANG I. As medianas obtidas para as relações ANG II/ANG I e ANG-(1-7) / ANG I foram, respectivamente, de 1,44 e 1,02, sem significância estatística.

Quando comparadas as diabéticas tipo 1 grávidas e não-grávidas, observou-se elevação significativa ($p < 0,05$) nas angiotensinas ANG I e ANG-(1-7), porém sem diferença no que diz respeito à ANG II e ARP (GRÁF. 12).

Quando a comparação do SRA circulante foi feita entre grávidas normais e diabéticas tipo 1, manteve-se nível elevado da ANG I ($p < 0,05$) em gestantes com diabetes tipo 1, demonstrando que essa angiotensina realmente encontra-se mais elevada no grupo de mulheres portadoras de diabetes tipo 1 (GRÁF. 13).

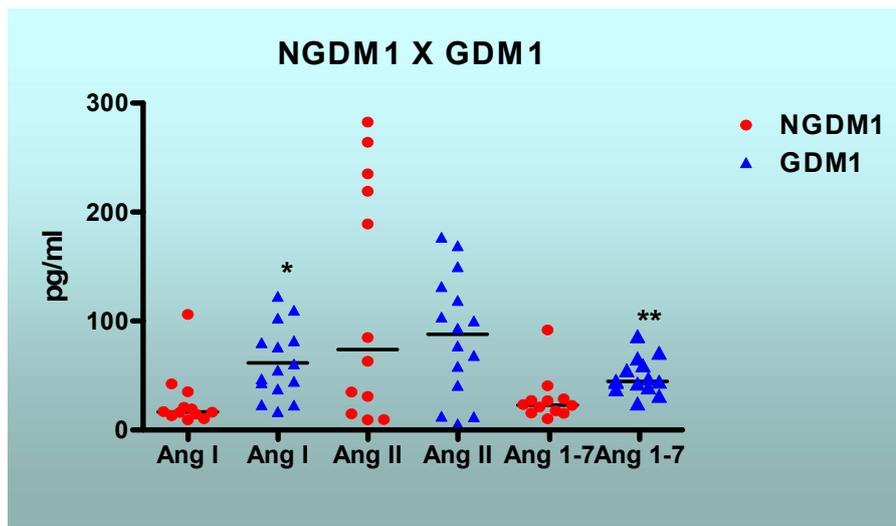


GRÁFICO 12 – Análise da interferência da gravidez nas concentrações circulantes das angiotensinas I, II e (1-7) entre mulheres diabéticas tipo 1, não grávidas e grávidas.

* $p < 0,05$ representa elevação significativa nos níveis circulantes de Ang I (Angiotensina I) durante a gestação de mulheres diabéticas tipo 1 (GDM1).

** $P < 0,05$ representa elevação significativa nos níveis circulantes de Ang-(1-7) (Angiotensina-(1-7)) durante a gestação de mulheres diabéticas tipo 1.

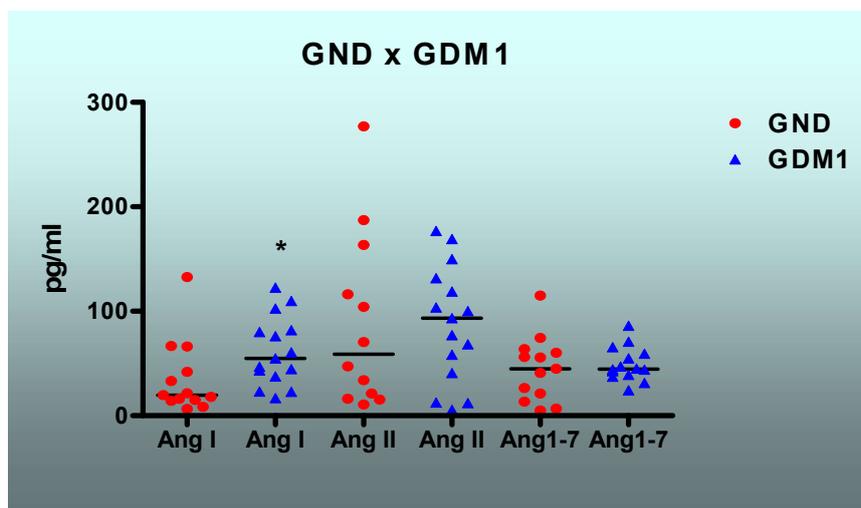


GRÁFICO 13 - Análise comparativa da interferência do diabetes tipo 1 nas concentrações circulantes das angiotensinas I, II e (1-7) na gravidez.

* $p < 0,05$ para ANG I entre GND (grávidas não-diabéticas) e GDM1 (grávidas diabéticas tipo 1)

5.2.1.5 Gestantes portadoras de diabetes gestacional

Os grupos 5 e 6 foram constituídos por 24 gestantes portadoras de diabetes gestacional determinado segundo critérios da ADA. O grupo 5 possuía 14 gestantes em controle apenas com dieta (58%) e o grupo 6 era composto por 10 gestantes (42%) em controle com insulina humana NPH e regular. A idade média foi de 32 ± 6 anos, o IMC médio de 28 ± 4 e o tempo médio de gestação de 33 ± 2 semanas, entre os dois grupos. O grupo 5, que controlou apenas com dieta, teve média de idade de 32 anos, enquanto no grupo 6, controlado com insulina, a média foi de 27 anos. Já a média do IMC na data da coleta foi, respectivamente, de 29 para o grupo 5 e 28 para o grupo 6 e as semanas de gestação foram 33 e 32, respectivamente.

5.2.1.5.1 Grupo 5: gestantes portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta

A ARP apresentou média de $12,63 \pm 3,52$ ng/ANG I/ml/h. Em relação à determinação das médias das angiotensinas, para a ANG I $68,39 \pm 18,28$ pg/ml; para a ANG II $81,54 \pm 21,79$ pg/ml e para a ANG-(1-7) de $24,30 \pm 6,27$ pg/ml. As medianas foram: para ARP de 4,02 ng/ANG I/ml/h; para a ANG I de 56,42 pg/ml; para a ANG II de 29,62 pg/ml; e para a ANG-(1-7) de 12,86 pg/ml.

As relações entre os níveis de ANG II / ANG I, entre ANG-(1-7) / ANG I e ANG II / ANG (1-7) também foram calculadas, sendo as medianas das razões: ANG II / ANG I = 0,67; ANG-(1-7) / ANG I = 0,27 e ANG II / ANG (1-7) = 2,61.

5.2.1.5.2 Grupo 6: gestantes portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina.

A ARP apresentou média de $18,62 \pm 6,51$ ng/ANG I/ml/h. Em relação à determinação das médias das angiotensinas, para a ANG I $63,31 \pm 21,10$ pg/ml; para a ANG II $94,50 \pm 31,50$ pg/ml e para a ANG-(1-7) de $22,57 \pm 7,52$ pg/ml. As medianas foram: para a ARP de $12,97$ ng/ANG I/ml/h; para a ANG I de $50,93$ pg/ml; para a ANG II de $111,78$ pg/ml e para a ANG-(1-7) de $16,85$ pg/ml.

As relações entre os níveis de ANG II / ANG I, entre ANG-(1-7) / ANG I e ANG II / ANG (1-7) também foram calculadas para o grupo 6, sendo as medianas das razões: ANG II / ANG I = 2,19; ANG-(1-7) / ANG I = 0,39 e ANG II / ANG (1-7)=3,43.

5.2.2 Avaliação do SRA em gestantes com diabetes gestacional, comparadas com mulheres normais e não-grávidas

Os grupos 5 e 6, compostos por grávidas com diabetes gestacional, apresentaram elevação significativa nos níveis de ANG I quando comparadas às mulheres não-grávidas ($p < 0,05$), porém o mesmo não ocorreu em relação à ANG II e ARP. Já a ANG-(1-7) e a relação ANG-(1-7/ANGI) revelou-se estatisticamente significativa devido à redução nessa razão em mulheres com diabetes gestacional.

Os GRÁF. 14 a 19 dizem respeito à comparação entre o grupo-controle de mulheres normais e gestantes portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) e em controle com insulina (GDMG2).

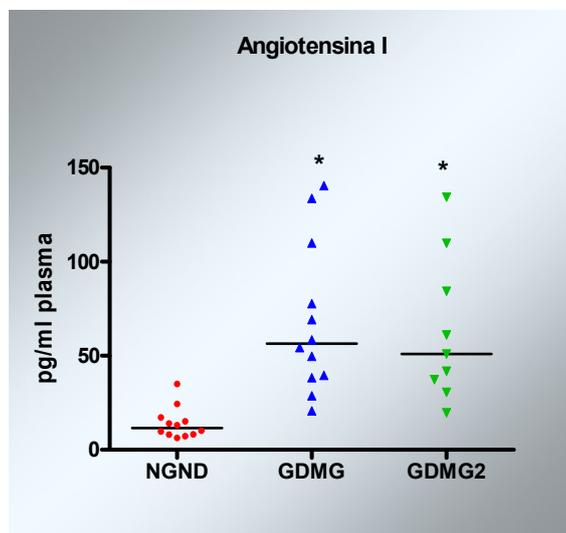


GRÁFICO 14 – Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG I (Angiotensina I) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).

NGND $n=12$; GDMG $n=12$ e GDMG2 $n=9$. * e ** $p<0,05$.

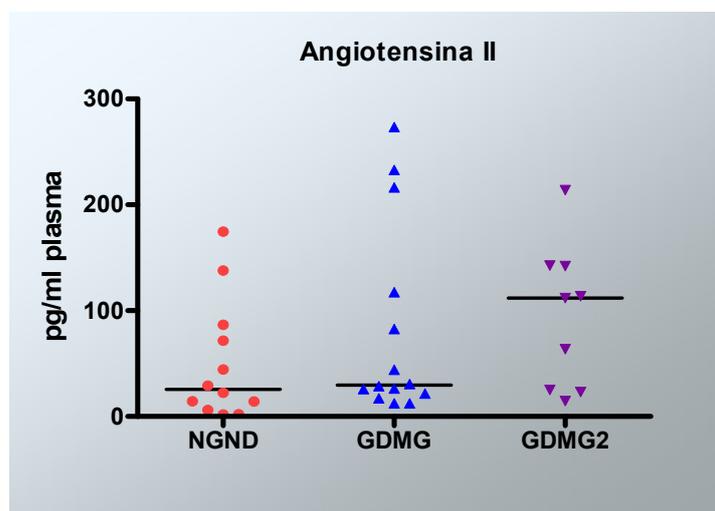


GRÁFICO 15 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG I (Angiotensina I) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).

NGND $n=12$; GDMG $n=14$ e GDMG2 $n=9$.

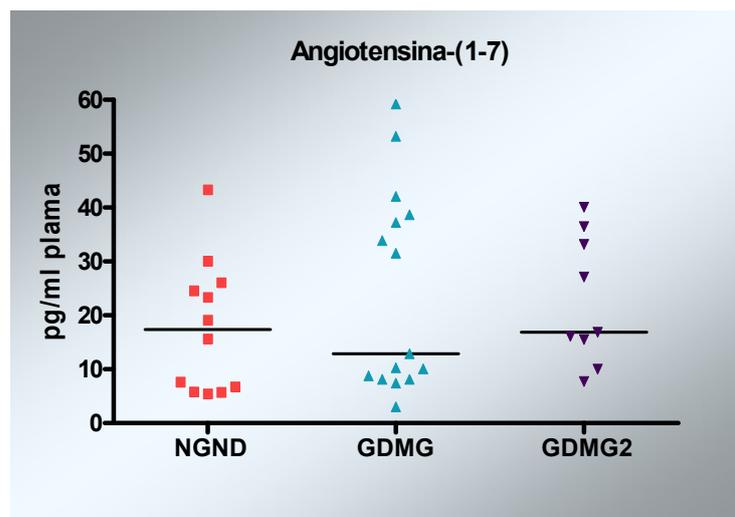


GRÁFICO 16 – Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG-(1-7) [Angiotensina-(1-7)] quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).

NGND $n= 12$; GDMG $n=15$ e GDMG2 $n=9$.

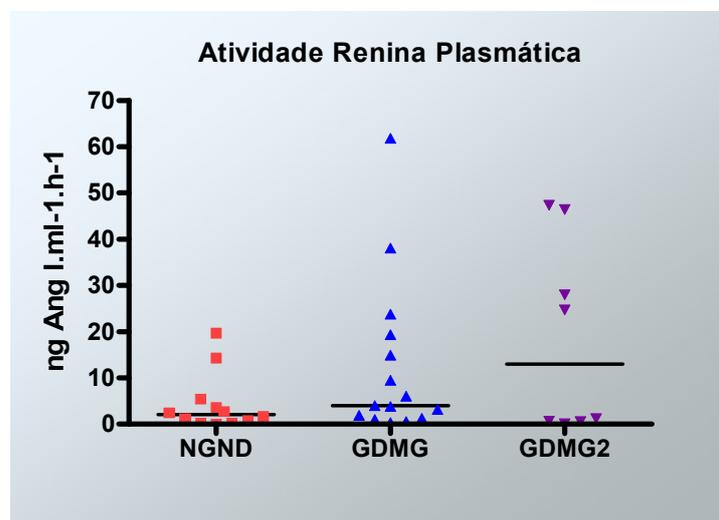


GRÁFICO 17 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis da ARP (atividade da renina plasmática) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).

NGND $n= 12$; GDMG $n=15$ e GDMG2 $n=9$.

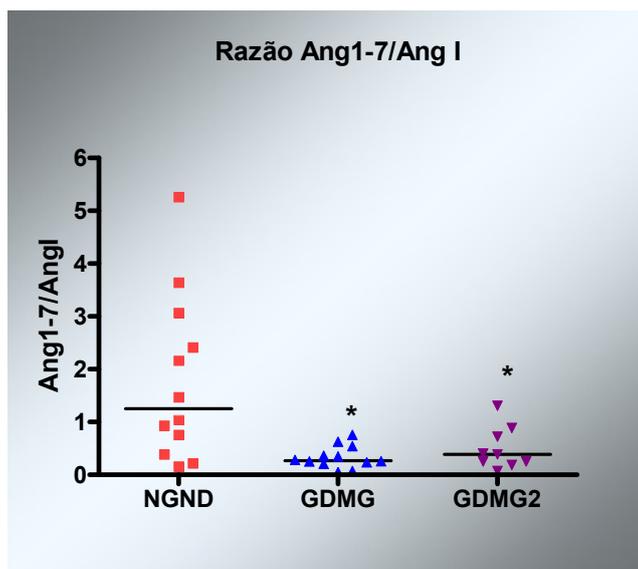


GRÁFICO 18 - Interferência do diabetes gestacional na relação de ANG-(1-7) /ANG I quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).

* $p < 0,05$. NGND $n = 12$; GDMG $n = 12$ e GDMG2 $n = 9$.

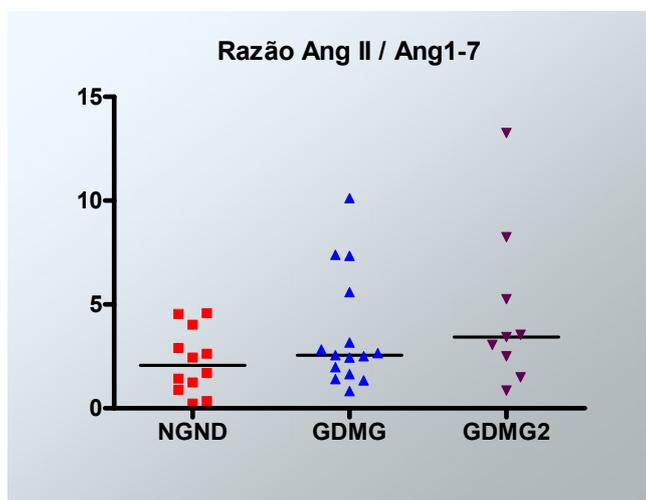


GRÁFICO 19 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG II / ANG-(1-7) quando comparadas mulheres normais fora da gravidez (NGND) e aquelas portadoras de diabetes gestacional (GDMG e GDMG2).

NGND $n = 12$; GDMG $n = 12$ e GDMG2 $n = 9$.

5.2.3 Comparação da interferência do diabetes gestacional no SRA circulante entre grávidas com e sem diabetes gestacional

Comparando grávidas no terceiro trimestre de gestação, não-diabéticas (GND) com as grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) e aquelas em controle com insulina, ou seja, avaliando a gestação sem diabetes e com diabetes gestacional, encontraram-se os seguintes resultados: ANG I com níveis significativamente mais elevados nas gestantes com diabetes gestacional (GDMG e GDMG2); níveis de ANG-(1-7) significativamente reduzidos no grupo de gestantes com diabetes gestacional (GDMG E GDMG2), quando comparadas às gestantes sem diabetes ($p < 0,05$). Porém, ANG II e ARP não apresentaram diferenças significativas entre esses grupos (GRÁF. 20 a 25).

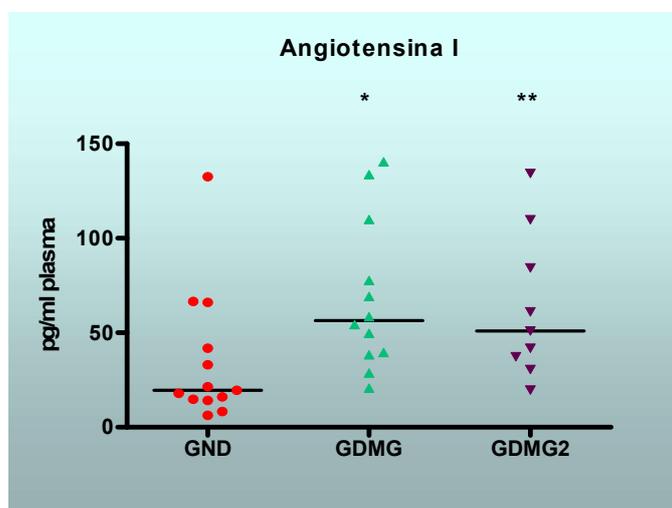


GRÁFICO 20 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG I entre grávidas com e sem diabetes gestacional.

GND= grávidas não-diabéticas; GDMG= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta; GDMG2= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina .

* e ** $p < 0,05$. NGND $n = 12$; GDMG $n = 12$ e GDMG2 $n = 9$.

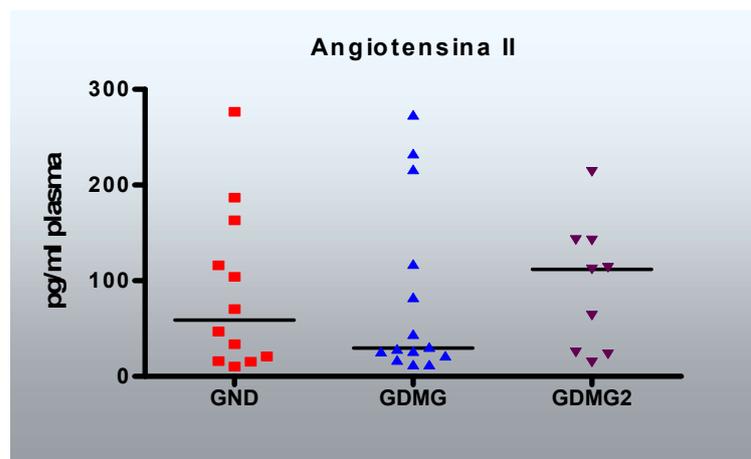


GRÁFICO 21 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG II entre grávidas com e sem diabetes gestacional.

GND= grávidas não-diabéticas; GDMG= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta; GDMG2= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina

NGND $n= 12$; GDMG $n=14$ e GDMG2 $n=9$.

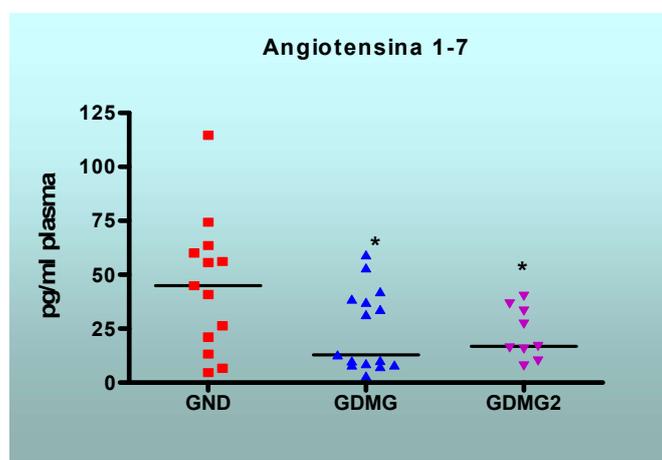


GRÁFICO 22 - Interferência do diabetes gestacional nos níveis circulantes de ANG-(1-7) entre grávidas com e sem diabetes gestacional.

GND= grávidas não-diabéticas; GDMG= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta; GDMG2= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina

* e ** $p<0,05$. NGND $n= 12$; GDMG $n=15$ e GDMG2 $n=9$.

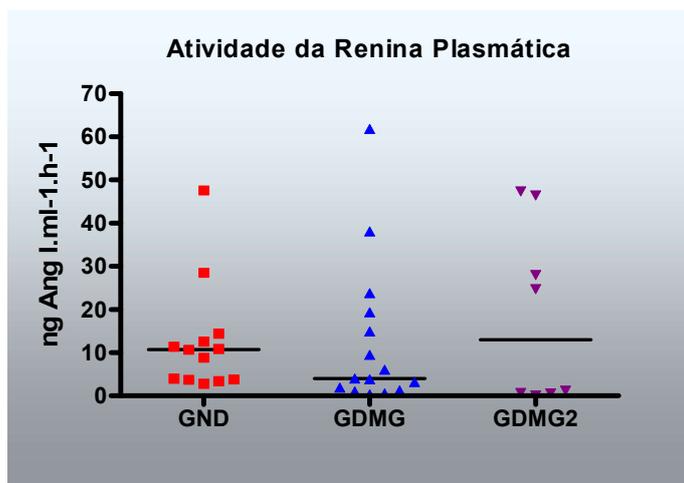


GRÁFICO 23 – Interferência do diabetes gestacional na atividade da renina plasmática (ARP) entre grávidas com e sem diabetes gestacional.

GND= grávidas não-diabéticas; GDMG= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta; GDMG2= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina.

NGND $n= 12$; GDMG $n=15$ e GDMG2 $n=9$.

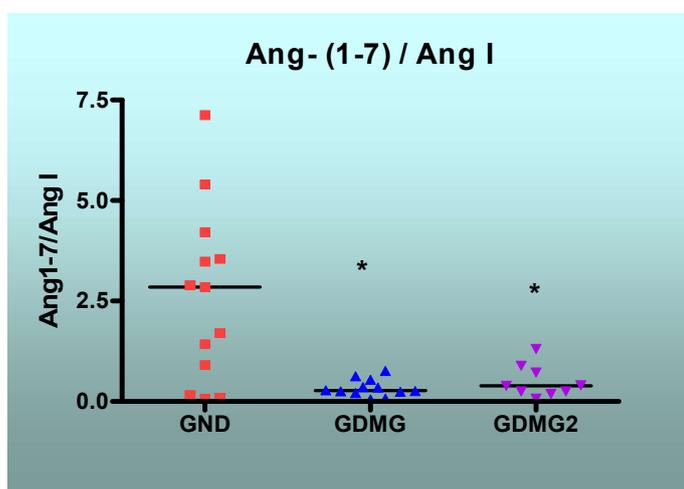


GRÁFICO 24 – Interferência do diabetes gestacional na relação ANG-(1-7) /ANG I quando comparadas mulheres grávidas com e sem diabetes gestacional. $p<0,05$

GND= grávidas não-diabéticas; GDMG= grávidas com diabetes gestacional em controle com dieta;

GDMG2= grávidas com diabetes gestacional em controle com insulina. NGND $n= 12$; GDMG $n=12$ e

GDMG2 $n=9$.

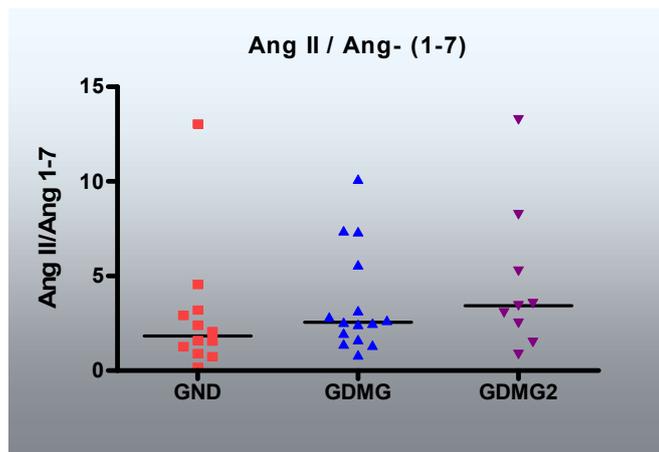


GRÁFICO 25 - Interferência do diabetes gestacional na relação ANG-(1-7) /ANG I quando comparadas mulheres grávidas com e sem diabetes gestacional. $p < 0,05$

GND= grávidas não-diabéticas; GDMG= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta; GDMG2= grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina.

NGND $n= 12$; GDMG $n=12$ e GDMG2 $n=9$.

5.3 Análise dos resultados comparando todos os grupos estudados

5.3.1 Avaliação comparativa da angiotensina I em todos os grupos

A ANG I apresentou-se em níveis mais baixos nas mulheres não-grávidas ($p < 0,05$) tanto não-diabéticas quanto diabéticas tipo 1, sendo, porém, significativamente mais alta ($p < 0,05$) nas não-grávidas diabéticas que naquelas sem diabetes, indicando que mulheres com diabetes tipo 1 têm ANG I mais elevada. Na gestação, houve nítido aumento nos níveis da ANG I, conforme esperado, indicando ativação fisiológica dessa angiotensina. Cabe salientar que nas gestantes portadoras de diabetes (tanto do tipo 1, quanto gestacional), esses níveis foram significativamente superiores aos das

não-grávidas e também maiores que os de gestantes não-diabéticas ($p < 0,05$). O valor de p foi inferior a 0,05 quando comparadas não-grávidas com grávidas diabéticas (GRÁF. 26).

Concluindo, mulheres grávidas com ou sem diabetes apresentaram elevação significativa nos níveis de ANG I em relação às não-grávidas. Entre os dois grupos de não-grávidas, as portadoras de diabetes tipo 1 apresentaram níveis circulantes de ANG I significativamente mais altos que as não-diabéticas.

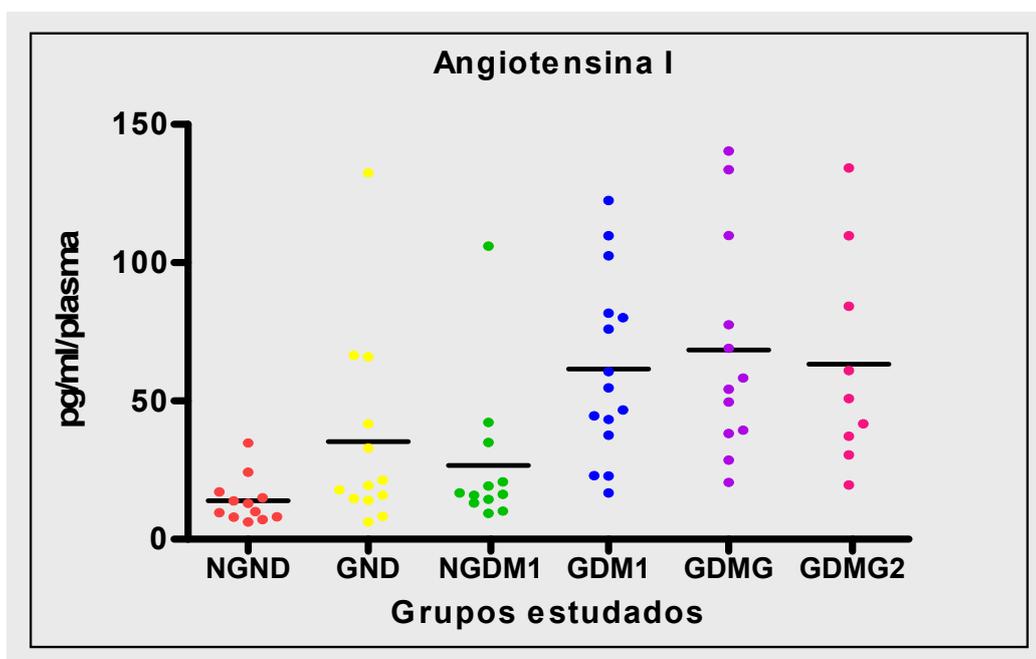


GRÁFICO 26 - Níveis circulantes de angiotensina I em não-grávidas não-diabéticas (NGND)

$n = 12$, grávidas não-diabéticas (GND) $n = 13$, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1), grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) $n = 12$, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) $n = 12$ e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) $n = 9$.

$P < 0,05$: NGND x NGDM1; NGND x GND; GND x GDM1; NGND x GDMG e NGND x GDMG2.

5.3.2 Avaliação comparativa da angiotensina II em todos os grupos

Em nenhum grupo houve significância estatística em relação à ANG II (GRÁF. 27).

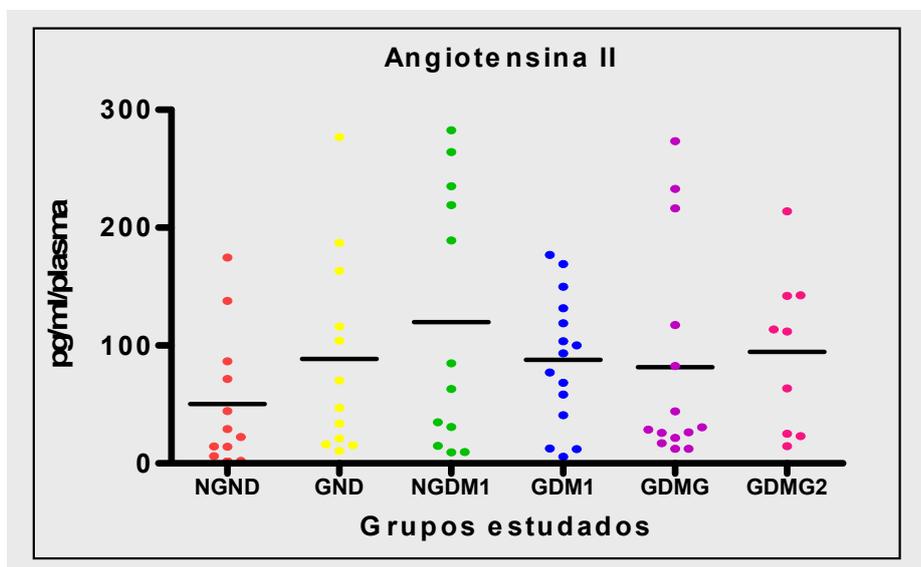


GRÁFICO 27 - Níveis circulantes de angiotensina II em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) $n = 12$, grávidas não-diabéticas (GND) $n = 12$, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) $n = 12$, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) $n = 15$, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) $n = 14$ e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) $n = 9$.

Houve significância estatística em relação ao grupo de mulheres NGND e NGDM1, com $p < 0,05$.

5.3.3 Avaliação comparativa da angiotensina-(1-7) em todos os grupos

Os valores individuais da ANG-(1-7) estão apresentados no GRÁF. 28, que mostra as comparações das médias de todos os grupos. Os níveis de ANG-(1-7) elevaram-se significativamente quando comparadas NGND com GND ($p < 0,05$) e NGND com GDM1, com p inferior a 0,05. Também foi significativa a elevação de ANG-(1-7) nas GDM1 comparadas às diabéticas não-grávidas.

É importante salientar que os níveis de ANG-(1-7) apresentaram-se significativamente mais baixos ao compararem-se os grupos de gestantes que apresentaram diabetes gestacional com os grupos de mulheres grávidas, diabéticas tipo 1 ou grávidas não-diabéticas ($p < 0,05$).

Houve elevação significativa ($p < 0,05$) de ANG-(1-7) em mulheres grávidas com e sem diabetes tipo 1, comparadas às mulheres não-grávidas com e sem diabetes tipo 1, demonstrando, nesses grupos, que o fato de estar grávida elevou a ANG-(1-7).

Houve, porém, redução significativa ($p < 0,05$) de ANG-(1-7) em grávidas portadoras de diabetes gestacional, quando comparadas às gestantes dos outros grupos. Os níveis de ANG-(1-7) nessas gestantes comportaram-se como se elas não estivessem grávidas.

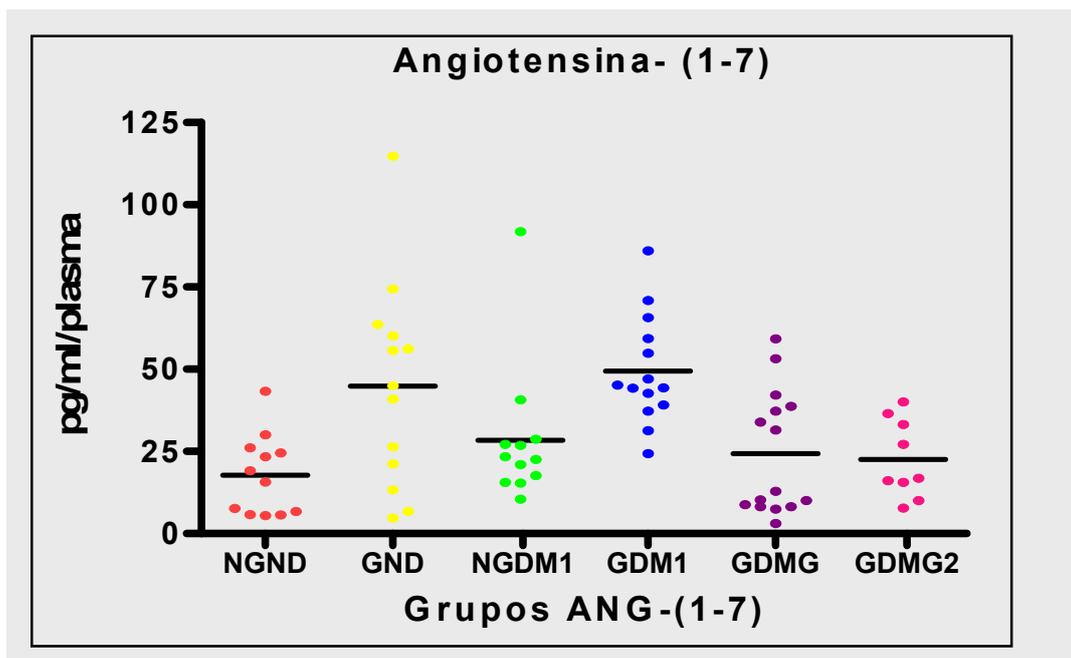


GRÁFICO 28 - Níveis circulantes de angiotensina-(1-7) em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) $n = 12$, grávidas não-diabéticas (GND) $n = 13$, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) $n = 12$, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) $n = 15$, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) $n = 15$ e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) $n = 9$.

$P < 0,05$ quando comparados os grupos NGND x GND, NGND x GDM1 e GDM1 x GDMG

5.3.4 Avaliação comparativa da atividade renina plasmática em todos os grupos

Os valores individuais da ARP estão apresentados no GRÁF. 29, com as comparações das médias de todos os grupos. Houve elevação da ARP nas mulheres sem diabetes que engravidaram, sugerindo ativação da ARP ($p < 0,05$). Os níveis de ARP também elevaram significativamente quando comparadas não-grávidas e não-diabéticas com diabéticas tipo 1 não-grávidas, em que o valor de p foi inferior a 0,05.

Os níveis de ARP apresentaram-se ainda mais elevados ao comparar-se o grupo de não-gestantes e não-diabéticas com o de diabéticas tipo 1 não-grávidas.

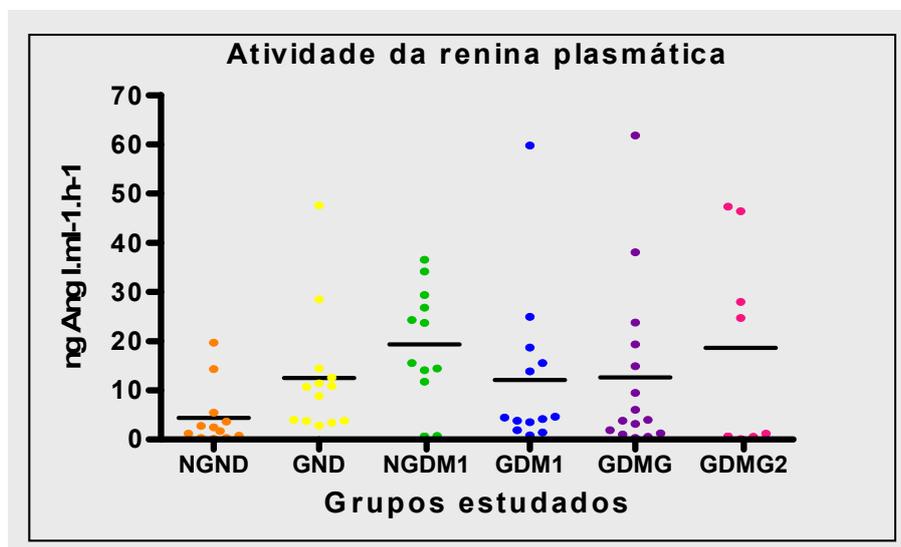


GRÁFICO 29 - Comparação da atividade da renina plasmática em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) $n = 12$, grávidas não-diabéticas (GND), não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) $n = 13$, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) $n = 13$, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) $n = 15$ e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) $n = 8$.

$P < 0,05$ entre os grupos NGND e NGDM1, e NGND x GDM1.

5.3.5. A avaliação comparativa da angiotensina 1-7/ANG I em todos os grupos

Apenas a relação ANG-(1-7) /ANG I apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O GRÁF. 30 compara gestantes não-diabéticas e gestantes portadoras de diabetes gestacional, pois há uma queda significativa nessa relação. Quando o grupo de gestantes portadoras de diabetes gestacional foi

subdividido em dois (dieta *versus* insulina para o tratamento), a significância estatística permaneceu apenas no grupo que se controlou apenas com dieta. Ou seja, nesse subgrupo, a relação ANG-(1-7) /ANG I é ainda mais baixa - houve menor formação da ANG-(1-7) proveniente da ANG I.

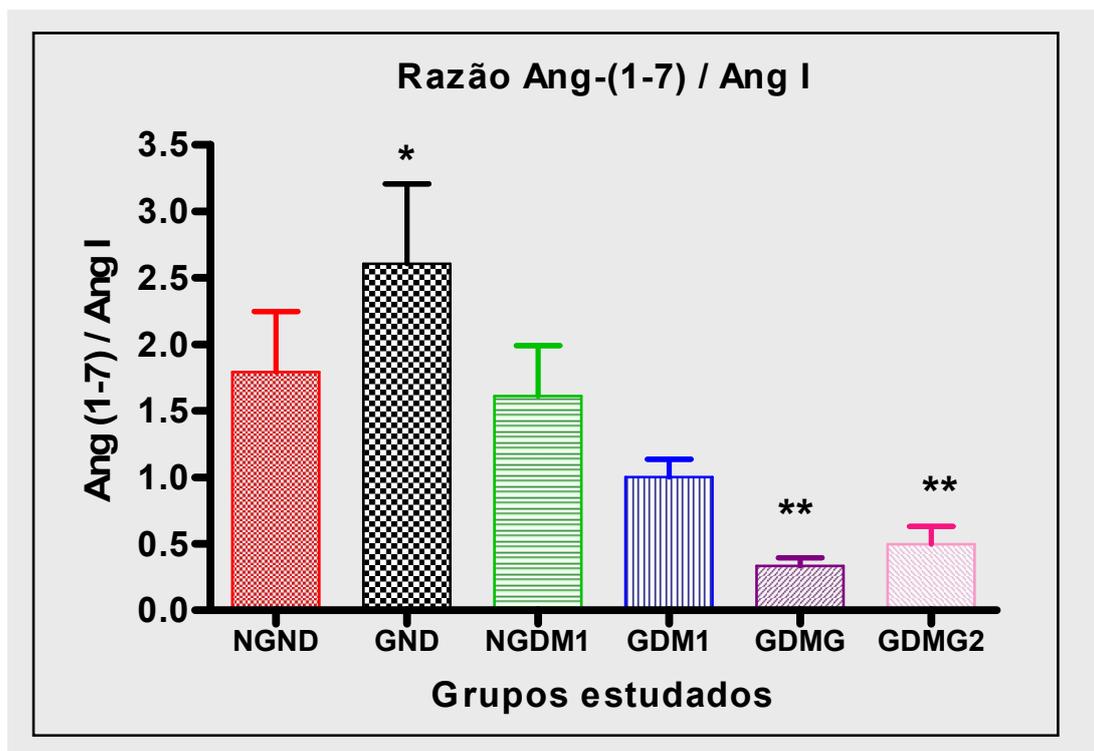


GRÁFICO 30 - Relação entre as medianas da ANG-(1-7) /ANG I em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) n = 12, grávidas não-diabéticas (GND) n =13, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) n =12, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) n =15, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) n = 12 e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) n = 9.

* e ** $p < 0,05$ quando comparados os grupos NGND, GND, NGDM1 com GDMG e DMG2.

5.3.6 Avaliação comparativa da angiotensina II /ANG(1-7) em todos os grupos

Não houve diferença na relação ANG II/ANG (1-7), porém observou-se nitidamente uma tendência ao aumento na relação gestantes portadoras de diabetes tipo 1 não-grávidas e de diabetes gestacional $p=0,21$. (GRÁF. 31).

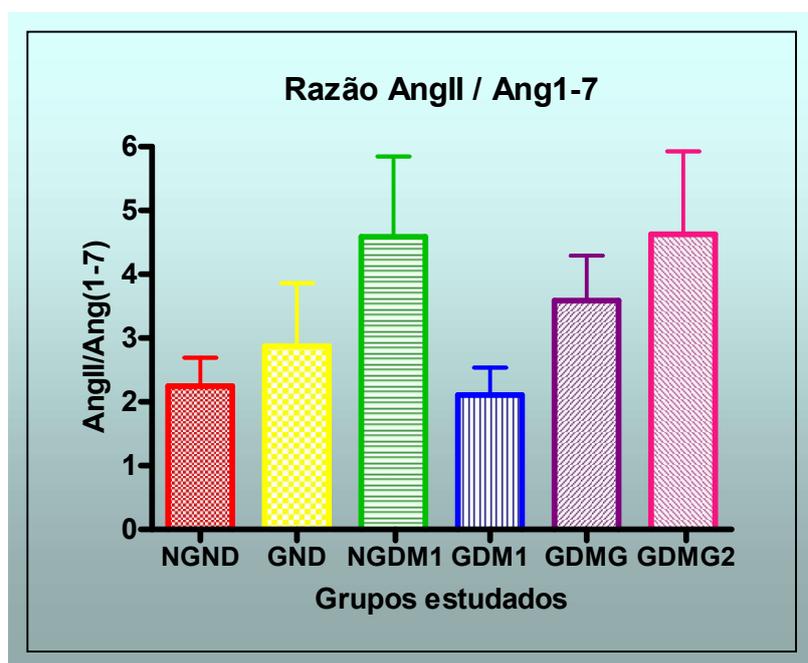


GRÁFICO 31 - Relação entre as medianas da ANG II /ANG-(1-7) em não-grávidas, não-diabéticas (NGND) $n = 12$, grávidas não-diabéticas (GND) $n = 13$, não-grávidas portadoras de diabetes tipo 1 (NGDM1) $n = 12$, grávidas e portadoras de diabetes tipo 1 (GDM1) $n = 15$, grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com dieta (GDMG) $n = 12$ e grávidas portadoras de diabetes gestacional em controle com insulina (GDMG2) $n = 9$.

Em síntese, os principais resultados obtidos neste estudo foram:

- a) A ativação do SRA na gravidez através da detecção, em nível periférico, de um aumento dos componentes do SRA; isto pode ser demonstrado comparando-se as

variáveis estudadas entre não-grávidas e não-diabéticas com grávidas e não-diabéticas. Houve elevação nos níveis da ANG II, porém sem significância estatística.

- b) A ANG I mostrou-se significativamente mais elevada na gravidez tanto de diabéticas quanto de não-diabéticas, assim como foi elevada em diabéticas tipo 1 não-grávidas, comparada com o grupo-controle de mulheres sem co-morbidades.
- c) A ANG-(1-7) elevou-se na gestação normal e de diabéticas tipo 1, porém o mesmo não ocorreu nas gestantes portadoras de diabetes gestacional.
- d) A razão ANG-(1-7) / ANG I mostrou-se significativamente mais baixa nas grávidas com diabetes gestacional quando comparadas com grávidas sem diabetes ou com diabetes tipo 1.
- e) Mesmo quando o grupo de gestantes com diabetes gestacional foi subdividido em dois, ou seja, grávidas com diabetes gestacional que controlaram apenas com dieta e que controlaram com insulina, foi significativa a redução na razão de ANG 1-7 / ANG I.
- f) Houve aumento significativo nos níveis de ARP em diabéticas tipo 1 não-grávidas.

6 DISCUSSÃO

No que se refere às determinações de ARP e níveis circulantes de angiotensinas, é importante salientar que os dados disponíveis em relação à gestação de mulheres diabéticas são bastante escassos. A maior parte das publicações diz respeito às determinações da ARP em animais prenhes diabéticos. Além disso, existem poucos estudos sobre o SRA em grávidas diabéticas (LOUKOVAARA *et al.* 2005), especialmente em portadoras de diabetes gestacional, e não há publicação que mostre os níveis circulantes de angiotensinas como ANG-(1-7) tanto em grávidas com diabetes tipo 1 ou gestacional. Desta forma, o cálculo amostral foi realizado através de experimento-piloto.

A seguir será realizada a discussão individualizada de cada grupo estudado e suas relações.

6.1 Grupo 1: não-grávidas e não-diabéticas

Houve uma grande preocupação em selecionar uma amostra representativa de gestantes normais e não-gestantes, nas quais pudessem ser determinados tanto a ARP quanto os níveis de angiotensinas circulantes e, a partir daí, possibilitar-se a comparação desses parâmetros com situações clínicas associadas a condições patológicas como o diabetes gestacional e tipo 1.

Vários pesquisadores têm procurado caracterizar melhor a importância fisiológica e o metabolismo das angiotensinas tanto em nível sistêmico quanto em diferentes tecidos

(SANTOS e CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994; FERRARIO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000). Existem inúmeras evidências de que outras angiotensinas, além da ANG II, exerçam diferentes ações sistêmicas e teciduais, variando conforme a espécie e a situação fisiopatológica estudada (SANTOS e CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994; FERRARIO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000).

Esse grupo-controle consistiu de não grávidas e não-diabéticas sem quaisquer sinais e/ou sintomas de enfermidades, normotensas, sem uso de anticoncepcionais orais, com função renal preservada e sem passado mórbido digno de nota. Dessa forma, esse grupo mostrou a expressão periférica fisiológica dos componentes do SRA em mulheres saudáveis, possibilitando a determinação de valores médios de ARP e angiotensinas para comparação com situações associadas, como a gravidez, o diabetes tipo 1 e o diabetes gestacional. Essas mulheres não foram avaliadas quanto à época do ciclo menstrual em que se encontravam, pois vários estudos demonstraram não haver diferença significativa entre os níveis de angiotensinas entre homens e mulheres e apenas discretas diferenças em relação à fase do ciclo menstrual (VALABHJI *et al.*, 2001).

Em síntese, no grupo-controle foram detectados níveis plasmáticos de ARP e angiotensinas que devem refletir razoavelmente o estado do SRA em condições fisiológicas, permitindo, assim, comparações com situações patológicas.

6.2 Grupo 2: grávidas e não-diabéticas

O segundo grupo originou-se do pré-natal normal do Ambulatório do Hospital das Clínicas e as gestantes foram selecionadas quanto à ausência de hipertensão e diabetes, sem intercorrências durante a gestação. Neste sentido, esse grupo também serviu para controle, revelando a ativação natural do sistema renina-angiotensina durante a gestação.

O presente estudo mostrou claramente a ativação fisiológica do SRA circulante durante a gravidez, quando dois grupos de mulheres normais, não grávidas e grávidas foram comparados. Observou-se elevação significativa ($>$ duas vezes) quando comparadas ANG I, ANG-(1-7) e ARP com não-gestantes. Somente ANG II não apresentou significância estatística, todavia, estava duas vezes mais elevada que em não-gestantes, conforme já demonstrado em vários outros estudos (SEALEY *et al.*, 1991; AUGUST *et al.*, 1995; MERRIL *et al.*, 2002).

É interessante observar essa ativação fisiológica do SRA que, conforme discutido anteriormente, necessita apresentar um equilíbrio ativo entre todos os componentes, no intuito de manterem-se os níveis pressóricos adequados durante toda a gestação. Essa ativação é considerada paradoxal, pois essas gestantes não apresentam hipertensão, apesar da ativação do sistema. Sabe-se que alterações nesse equilíbrio são responsáveis por distúrbios significativos durante a gestação, especialmente a pré-eclâmpsia, onde muitos autores comprovaram, nessas gestantes, a redução dos níveis circulantes da ANG-(1-7) - (MERRIL *et al.*, 2002).

Os níveis de ANG II não apresentaram significância estatística entre os dois grupos estudados ($p=0,17$), porém demonstraram tendência à elevação. É possível que este fato se deva ao tamanho da amostra, no entanto, é importante salientar que a ativação do SRA na gestação foi vastamente referenciada em vários estudos (conforme descrito anteriormente) e esse não era o foco principal desta tese.

6.3 Grupo 3: não-grávidas diabéticas tipo 1

Já o terceiro grupo de pacientes foi composto por mulheres não-grávidas, portadoras de diabetes tipo 1, em idade reprodutiva, com ciclos menstruais normais, em controle em nosso Ambulatório para atingir controle metabólico ideal (glicohemoglobina < 7%) para engravidar. Nenhuma dessas mulheres era portadora de micro ou macroangiopatias detectáveis pelo exame clínico, fundoscopia ou depuração de creatinina e proteinúria em urina de 24 horas e nenhuma encontrava-se em uso de contraceptivos orais.

Através de dosagem das angiotensinas circulantes e da ARP, neste estudo percebeu-se elevação significativa da ANG I e da ARP nesse grupo de pacientes, mas não da ANG II e da ANG-(1-7) em relação às mulheres normais do grupo I.

Essas pacientes possuíam controle metabólico satisfatório, atestado pelos níveis de glicohemoglobina $7,5 \pm 0,3\%$ e glicemia realizada no momento da coleta $\leq 100\text{mg}\%$ em sangue capilar, uma vez que esses parâmetros podem sabidamente alterar de

forma significativa o SRA, tanto tecidual quanto periférico. Desta forma, como não havia hiperglicemia no momento da coleta das angiotensinas, como explicar níveis tão altos de ARP? Em estudo de BJÖRCK (1990) sobre hiperglicemia e um estado de hiperfiltração em pacientes diabéticos, descreveu-se que ocorre não aumento no ritmo de filtração glomerular durante a hiperglicemia, mas uma redução no fluxo sanguíneo renal com manutenção do ritmo de filtração glomerular. Isto poderia ser explicado pela duração do estímulo e justificaria o aumento na secreção de renina observada 12 horas após um pico hiperglicêmico. Como nessas mulheres não se dispõe de glicemias realizadas durante a madrugada, ou seja, cerca de 12 horas antes da coleta das angiotensinas e ARP, não é possível saber se houve, nesse período, algum pico hiperglicêmico responsável pela elevação tardia da ARP.

Baseado em estudos do DCCT (1993), sabe-se que a hiperglicemia é um importante fator implicado no desenvolvimento da nefropatia diabética em pacientes com diabetes tipo 1 e que a manutenção da euglicemia pode prevenir ou retardar a progressão da doença renal. Ativação do SRA e subsequente geração de ANG II também exercem papel importante na progressão da nefropatia diabética (LEWIS *et al.*, 1993). Em estudos de MILLER (1999), demonstrou-se que hiperglicemia moderada sem glicosúria pode exercer efeitos hemodinâmicos e humorais como aumento na ARP, nos níveis pressóricos e na resistência vascular renal. Também O'HARE *et al.* (1982) sugeriram essa relação entre hiperglicemia e ativação do SRA.

Em estudo com diabéticos normotensos, avaliaram-se a ARP e os níveis de pressão arterial antes e após a indução de hiperglicemia (WOODS; HALL; MIZELLE,

1987). Houve inicialmente elevação nos dois parâmetros e a seguir redução com a restauração dos níveis glicêmicos. Desta forma, episódios pontuais de hiperglicemia podem ser responsáveis por profundas e fugazes alterações no SRA, sem implicar elevação significativa na glicohemoglobina (DERR *et al*, 2003).

Há, atualmente, inúmeras evidências de que a ativação do sistema tanto em nível periférico quanto tecidual realmente contribua para as complicações renais hemodinâmicas e celulares do diabetes (DANSER *et al.*, 1989; COOPER, 1998; BREWSTER e PERAZELLA, 2004). Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina parecem influenciar a prevenção das complicações micro e macrovasculares do diabetes, que sugerem ser independentes dos seus efeitos anti-hipertensivos (DZAU *et al.*, 2000). Investigações sobre o SRA em pacientes diabéticos podem gerar esclarecimentos quanto aos mecanismos envolvidos nas complicações micro e macrovasculares e aos efeitos benéficos dos inibidores da ECA (VALABHJY J, 2003).

Entretanto, o estado do SRA no diabetes é controverso, com diferentes grupos descrevendo ativação, inativação ou um sistema inalterado (BJÖRCK, 1990; MILLER *et al.*, 1996; ÜSTÜNDA; CAY; NAZIROGLU, 1999). As inconsistências nesses estudos provavelmente advêm das diferenças na população estudada, no volume extracelular e nos níveis de glicemia. O'HARE *et al.* (1982); ÜSTÜNDA; CAY; NAZIROGLU (1999) estudaram pacientes diabéticos normotensos antes e após um intervalo de melhora no controle glicêmico e descreveram um declínio significativo na pressão arterial em paralelo com os níveis glicêmicos. Ainda nesses

trabalhos, os níveis de ANG II estiveram marcadamente elevados durante o período de pior controle glicêmico, mas normalizaram após o controle agudo da glicemia. Em um estudo de MILLER *et al.* (1996) em indivíduos normais, elevações agudas na insulina e glicose após sobrecarga de glicose foram acompanhadas por redução nos níveis de cortisol e aldosterona e elevações na ARP. Em algumas situações, é possível deduzir que a elevação resulte de diurese osmótica por redução do volume extracelular, com ativação da ARP. Entretanto, o estudo de PRICE *et al.* (1999), não detectou depleção de volume durante o período de hiperglicemia e elevação da ARP, tornando essa hipótese menos provável. No estudo em questão as pacientes não apresentavam hiperglicemia no momento da coleta e a média glicêmica era adequada, assim como não apresentavam glicosúria no momento da coleta.

Segundo LUIK *et al.* (2003), há aumento da atividade do SRA em pacientes diabéticos, porém, de sistemas teciduais, onde a ARP encontra-se muito ativada. No entanto, é a ANG II elevada que parece mediar a geração de matriz mesangial que, por sua vez, estimula a atividade do TGF- β 1, levando a um aumento da síntese e diminuição na degradação das proteínas mesangiais e resultando em expansão da matriz, responsável pela gênese da nefropatia diabética (MATSUSAKA; HYMES; ICHIKAWA, 1996; SINGH *et al.*, 1999; BURNS, 2000).

Em estudo animal, ANDERSON; JUNG; INGELFINGER (1993) apresentaram inúmeras participações do SRA, tanto tecidual quanto periférico, na gênese das complicações diabéticas. A ARP tecidual mostrou-se elevada (2,3 vezes) em ratos diabéticos mantidos hiperglicêmicos no momento da coleta, porém houve apenas

discreto ou nenhum aumento na ARP plasmática. Esse estudo apontou também uma significativa redução na ECA plasmática.

Classicamente, é sabido que mesmo a hiperglicemia moderada induz a uma ingestão aumentada de sódio, assim como a uma expansão do volume plasmático. Nesse caso, era de se esperar uma supressão nos níveis de renina plasmática, do angiotensinogênio e dos níveis de mRNA da renina teciduais. Entretanto, anormalidades nesse eixo sódio-volemia-renina foram descritas em inúmeros estudos, indicando uma desregulação desse eixo em pacientes diabéticos. O bloqueio da ANG II, tanto direto com o uso de bloqueadores AT1 quanto indireto com o uso de inibidores da ECA, melhora as respostas adaptativas renais em pacientes diabéticos, apesar de inúmeros trabalhos não demonstrarem melhora da hiperfiltração glomerular com essas drogas (MILLER *et al.*, 2003).

Outra possibilidade para o aumento significativo da ARP circulante e, conseqüentemente, da ANG I, porém sem elevação da ANG II e/ou ANG-(1-7), seria a metabolização da ANG I em outras angiotensinas, como, por exemplo, a angiotensina 1-9, como ocorreu no estudo de MAHMOOD *et al.* (2002) em ratos diabéticos ou de angiotensina 1-4 (RE, 2004).

Segundo estudos de NISHIYAMA (2002), o fluido intersticial renal normal apresenta concentração 1000 vezes maior de ANG II quando comparada com os níveis circulantes da mesma. Desta forma, é importante salientar que a avaliação do SRA circulante pode representar apenas a ponta do “iceberg”, ou seja, não se sabe

com certeza o que ocorre em nível tissular, como se encontram a ECA ou outras enzimas como as quimases, endopeptidases, prolil-endopeptidases ou até mesmo as angiotensinas (RESENDE e MILL, 2002).

Além disso, inúmeras outras variáveis de confundimento podem explicar esse nível tão alto da ARP no grupo de pacientes do presente estudo. Diferenças na ingestão de sódio e proteína, assim como o desconhecimento dos níveis de microalbuminúria no grupo avaliado. Além disto, apenas a glicemia no momento da consulta era conhecida, mas não aquela de 12 ou mais horas antes da coleta. Deve-se considerar, também, erro na coleta ou realização da ARP nesse grupo, uma vez que sabidamente a dosagem da ARP apresenta grande variabilidade inter e intra-ensaio, sendo necessárias mais investigações para maior esclarecimento.

Existem, ainda, diversas possibilidades de erro e/ou variabilidade excessiva em relação às determinações da ARP não apenas em diabéticos. SEALEY e LARAGH (1976) já haviam relatado a existência de imensa variabilidade nos valores obtidos para ARP ao compararem vários “kits” utilizados no RIE para determinação da taxa de produção de ANG I, ou seja, da ARP. Esses autores verificaram que essa grande variabilidade entre os procedimentos analíticos pode ser atribuída principalmente a diferenças em sua habilidade para detectar valores baixos de ARP.

6. 4 Grupo 4: grávidas portadoras de diabetes tipo 1

O quarto grupo estudado foi composto por gestantes diabéticas tipo 1 (GDM1), todas apresentando controle glicêmico considerado adequado através de parâmetros como glicohemoglobina, frutossamina e média de glicemias capilares. Além disto, não apresentavam proteinúria ou alterações na depuração de creatinina e o resultado do exame de fundo de olho era normal. A avaliação fetal através de ultra-som obstétrico mostrava-se dentro de parâmetros considerados adequados, sem macrosomia, polidrâmnio ou malformações congênitas. O doppler de artérias uterinas encontrava-se dentro da normalidade, sem presença de incisura. Foram excluídas as gestantes que evoluíram com elevação dos níveis pressóricos ou proteinúria. O resultado da gravidez mostrou-se favorável, ou seja, todos os recém-nascidos encontravam-se até o percentil 90 de peso/idade gestacional, nenhum necessitou de tratamento especializado e todos receberam alta nas primeiras 72 horas após o parto, sugerindo controle materno adequado.

Como descrito anteriormente, sabe-se que a nefropatia diabética é a causa mais comum de insuficiência renal terminal em países desenvolvidos e que a gravidez em pacientes com níveis elevados de creatinina e proteinúria acompanha-se de maior risco de deterioração da função renal, de complicações obstétricas e de malformações fetais (PRUDY *et al.*, 1996). Assim, muitos serviços que lidam com essas pacientes recomendam cuidados e até mesmo contra-indicam a gravidez para as portadoras de nefropatia avançada, baseado em que se acredita que o curso da gravidez pode acelerar a progressão da nefropatia para estágios terminais (REECE;

LEGUIZAMON; HOMKO, 1998). Isto se deve ao fato da gravidez associar-se normalmente ao aumento na taxa de filtração glomerular, que também é situação observada na nefropatia diabética, supondo-se, então, o agravamento da lesão renal em mulheres diabéticas que já manifestam essa complicação. As que têm taxas normais de excreção de proteínas no início da gestação apresentarão mínima alteração no primeiro e segundo trimestres da gestação. Entretanto, no terceiro trimestre é comum o surgimento ou o aumento das taxas de excreção de proteínas urinárias, que tendem a retornar ao normal cerca de seis semanas após o parto (McCANCE *et al.*, 1989).

Como mencionado anteriormente, existem poucos estudos que definem precisamente os níveis circulantes de angiotensinas em gestantes com diabetes tipo 1. Sendo assim, fica claro que dados a respeito dos níveis de angiotensinas em humanos são bastante restritos, principalmente de ANG-(1-7). Dessa forma, as determinações de ANG I, ANG II e ANG-(1-7) foram realizadas em todas as gestantes diabéticas estudadas, padronizando-se ao máximo as condições da coleta de sangue e os procedimentos experimentais durante os radioimunoensaios.

Neste estudo, foram acompanhadas 13 gestantes diabéticas tipo 1 bem controladas e avaliadas as ANG I, ANG II e ANG-(1-7), assim como a ARP, no terceiro trimestre da gestação. Observou-se ativação do SRA quando comparado esse grupo com o de mulheres não-grávidas e diabéticas nos parâmetros ANG I e ANG-(1-7), porém não na ANG II e ARP. Mesmo ao compararem-se as grávidas diabéticas com as não-

diabéticas, esses parâmetros foram mantidos. Novamente percebe-se elevação significativa da ANG I no grupo de mulheres diabéticas

Conforme descrito, houve elevação significativa tanto da ANG I quanto da ANG-(1-7) em grávidas com diabetes tipo 1. Na literatura, são encontrados poucos trabalhos que avaliaram o SRA na gestação de diabéticas, talvez pela dificuldade de se analisá-lo no diabetes e, ainda mais, na gestação de diabéticas. Em ratas prenhes diabéticas com e sem controle glicêmico adequado, VANDJCK *et al.* (2001) observaram redução da proteinúria nas primeiras, assim como redução da ANG II e da ECA. Ao contrário, aquelas com controle glicêmico inadequado exibiram proteinúria intensa e níveis elevados de ANG II até após o parto. Também ANG *et al.* (2002) afirmaram que gestantes diabéticas tipo 1 com bom controle durante a gestação não apresentaram disfunção endotelial, situação que também pode estar vinculada ao SRA, conforme discutido no capítulo 2. Estudo de LOUKOVAARA *et al.* (2005) encontrou redução da ARP em gestantes diabéticas quando comparadas com gestantes não diabéticas, sem alterações nos níveis de ANG II entre os dois grupos.

Nenhum estudo anterior havia avaliado ANG-(1-7) em gestantes com diabetes tipo 1 com controle glicêmico adequado.

Nesse contexto, o estudo da ANG-(1-7) vem adquirindo importância crescente tendo-se em vista a seletividade e diversidade de seus efeitos em relação à ANG II. Alguns autores têm denominado essa angiotensina de peptídeo contra-regulador, baseando-se em efeitos vasculares, cardíacos e renais que se mostraram antagônicos aos da ANG

II (CHAPPEL *et al.*, 1998; FERRARIO *et al.*, 1998). Adicionalmente, o metabolismo desse heptapeptídeo difere daquele da ANG II pelo fato de a ANG-(1-7) poder ser formada diretamente a partir da ANG I e ser metabolizada em ANG-(1-5) por ação da ECA (FERRARIO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000).

É importante salientar que, como a ANG-(1-7) pode ser formada diretamente a partir da ANG I, talvez esta possa ser a explicação para a elevação de ambas neste estudo. Ou seja, nessas pacientes, os níveis elevados de ANG I podem estar gerando mais ANG-(1-7), o que é consistente com os achados nesse grupo de pacientes com bom controle glicêmico, sem elevação dos níveis pressóricos e que, muito provavelmente, se comportaram como aquelas estudadas por ANG *et al.*, 2002 (com bom controle glicêmico durante a gestação e, conseqüentemente, função endotelial preservada). Aí se encontra uma possível ligação entre ANG-(1-7) e função endotelial, pois o aumento dessa angiotensina eleva os níveis de BK que, por sua vez, aumenta a disponibilidade de NO para o endotélio com preservação deste (PAULA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Assim, a elevação significativa dos níveis de ANG-(1-7) foi o dado mais intrigante obtido nesse grupo de pacientes. Além disso, esse aumento foi seletivo para essa angiotensina, uma vez que os níveis de ANG II não diferiram significativamente do grupo-controle. O significado preciso desse achado permanece obscuro. Pode-se postular que a ANG-(1-7) esteja envolvida na fisiopatologia do diabetes e da gravidez, atuando como um peptídeo contra-regulador, com ações anti-hipertensivas

e protetoras do endotélio não só renal como sistêmico, além de possíveis ações protetoras para o feto.

Há uma inquestionável relação entre ANG-(1-7) e BK, demonstrada em estudos de FERRARIO *et al.* (1998); OLIVEIRA *et al.* (2003) e outros. Entretanto, em situações em que há ativação fisiológica ou patológica dos sistemas em questão, como é o caso da gravidez, da pré-eclâmpsia, do diabetes com e sem complicações, do diabetes gestacional, como essas interações se mantêm? Quais as conseqüências a médio/longo prazo dessas modificações? Alguns estudos já abordaram essas interações nessas situações descritas, como os de OLIVEIRA *et al.* (2002 e 2003), onde BK e ANG-(1-7) foram avaliadas em ratos diabéticos e demonstrou-se que a hiperglicemia bloqueia essa interação. Porém, estudos em humanos ainda são deficitários, necessitando de maiores investigações.

Observou-se que a ANG-(1-7) atua endogenamente como um hormônio antidiurético em ratos normotensos, promovendo a retenção de água e a redução do ritmo de filtração glomerular (SANTOS *et al.*, 1996; SIMÕES e SILVA *et al.*, 1997; BARACHO *et al.*, 1998). Esses achados sugerem que a ANG-(1-7) desempenha um papel endógeno no controle do equilíbrio hidroeletrólítico na gestação.

É importante ressaltar, ainda, que muitos dos efeitos sistêmicos e/ou locais das angiotensinas podem resultar de interações do SRA com vários outros mediadores locais e/ou circulantes que atuam ora modulando, ora inibindo e ora potencializando seus efeitos. É sabido que a ANG-(1-7) também estimula a síntese e a liberação de

prostaglandinas vasodilatadoras e óxido nítrico, bem como potencializa as ações biológicas da BK (LIMA *et al.*, 1997; FERRARIO *et al.*, 1998; PAULA *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2000). Tomados em conjunto, esses efeitos atuam como um contra-regulador das ações da ANG II, promovendo redução dos níveis pressóricos. Dessa forma, o aumento dos níveis de ANG-(1-7) detectado no presente estudo poderia ser justificado como um mecanismo de compensação às alterações hemodinâmicas induzidas pela gravidez.

O SRA pode estimular o crescimento vascular através de efeitos proliferativos da ANG II ou inibir a partir de ações diretas e indiretas da ANG-(1-7) sobre o endotélio vascular (SANTOS *et al.*, 2000). Além disso, a ANG-(1-7) possui um efeito antiangiogênico em camundongos, diferindo significativamente das ações estimulatórias da ANG II nesse mesmo modelo experimental (MACHADO *et al.*, 1999). Pode-se, então, dizer que a ANG-(1-7) seria capaz de retardar a glomerulosclerose produzida em parte pelos efeitos proliferativos da ANG II (HAMAR *et al.*, 1999).

Porém, em estudo recente em nossa Instituição, níveis extremamente elevados de ANG-(1-7) circulante foram demonstrados em crianças e adolescentes portadores de insuficiência renal crônica em estágio terminal (SIMÕES e SILVA *et al.*, 2001). Ainda que não se saiba qual o significado desse aumento, a ANG-(1-7) foi considerada, neste estudo, como um marcador de lesão renal progressiva nesses pacientes pediátricos portadores de diferentes nefropatias devido, talvez, à disfunção nos receptores desse heptapeptídeo em nível renal e/ou vascular ou, ainda, a

alterações na formação e/ou degradação do mesmo. Essa correlação pode ser a mesma em relação às gestantes com diabetes tipo 1 durante a gestação? Estariam os receptores para ANG-(1-7) reduzidos ou modificados nessa condição? Ou haveria alguma alteração na formação/degradação dessa angiotensina na gestação dessas mulheres? Talvez, em pacientes com função renal preservada, o significado da ANG-(1-7) seja de proteção, mas essa hipótese é apenas especulativa.

Dessa forma, pode-se postular que esse aumento da ANG-(1-7) circulante em gestantes diabéticas tipo 1 contribua de alguma forma para a compensação às alterações hemodinâmicas induzidas pela gravidez e talvez para proteção glomerular e fetal, embora o oposto deva ser analisado, ou seja, seria esse um marcador de lesão renal?

6.5 Grávidas portadoras de diabetes gestacional Grupos 5 e 6

Nesse grupo foram avaliadas 24 gestantes portadoras de diabetes gestacional, subdivididas em dois, dependendo do uso ou não de insulina. Foram excluídas as gestantes com diabetes gestacional que apresentaram algum transtorno hipertensivo antes ou durante a gestação, no intuito de avaliar o sistema renina-angiotensina sem a interferência que os níveis pressóricos ou o uso de drogas possam refletir.

As gestantes portadoras de diabetes gestacional selecionadas para este estudo realizaram o teste de sobrecarga de glicose conforme os critérios da ADA e foram

retestadas em nosso laboratório, preenchendo os critérios de dois valores alterados na curva. Todas foram acompanhadas por equipe multidisciplinar que constava de médicos endocrinologistas e obstetras, além de equipe de enfermagem e nutricionista. As glicemias capilares foram realizadas pelo menos duas vezes por semana, sempre em jejum e duas horas após as refeições; e testes de proteína e hemoglobina glicada foram realizados mensalmente. Proteinúria foi realizada trimestralmente e todas foram acompanhadas durante e após o parto. Todas apresentavam controle metabólico adequado, atestado pelas médias glicêmicas, proteína glicada e glicohemoglobina dentro dos parâmetros da normalidade, além de resultados fetais e perinatais compatíveis com bom controle glicêmico materno, pois não houve macrossomia, polidramnia ou complicações perinatais.

Para a classificação adequada dessas gestantes, é importante que todas sejam reavaliadas após o parto quanto à persistência ou não do diabetes, porém, até o momento da apresentação deste estudo, nem todas foram ainda reclassificadas. Essa avaliação é realizada rotineiramente em nosso Serviço através da dosagem de glicemia em jejum e duas horas após sobrecarga de 75g de dextrosol, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde, a partir de oito semanas após o parto. Das 24 pacientes, 15 já foram avaliadas no pós-parto. Nesse grupo houve persistência do diabetes em 20% (todas elas utilizaram insulina para controle durante a gestação) e 26,7% de intolerância a carboidratos (sendo três que fizeram controle com dieta e uma com insulina). É importante salientar que, apesar de orientadas a retornar no pós-parto para a realização do teste de sobrecarga, muitas não retornaram às consultas.

O diabetes gestacional é um tipo que ocorre durante a gestação e, na grande maioria das vezes, há retorno dos níveis glicêmicos ao normal após o parto. Sabe-se hoje que mulheres com essa história gestacional adversa apresentam níveis elevados de lípidos em jejum e da pressão arterial quando comparadas com as que não apresentaram esse quadro durante a gestação (XIANG *et al.*, 2004). Essas encontram-se sob maior risco de desenvolver diabetes tipo 2 no futuro, o que ocorre em cerca de 60% delas (BENHAROUSH e YOGEV, 2004), além de doença cardiovascular. Essas observações podem apresentar mecanismos comuns com a síndrome metabólica e resposta inflamatória alterada. SATTAR e GREER (2002) vincularam essas complicações comuns da gravidez ao risco aumentado de doenças metabólicas e vasculares no decorrer da vida. Eles focaram especificamente o diabetes gestacional e os transtornos hipertensivos durante a gestação. Sabe-se que as alterações fisiológicas da gestação incluem um aumento da resistência à insulina, elevação dos lípidos plasmáticos e uma regulação para cima da cascata inflamatória (NOGUEIRA, 2001). Esses autores levantaram a hipótese de que a gravidez representa um “teste de estresse” do metabolismo e da função vascular maternos. Eles atribuíram essas complicações da gravidez ao risco aumentado de transtornos vasculares e metabólicos no decorrer da vida e levantaram a hipótese de que elas e a doença coronária compartilham diversos fatores etiológicos comuns, incluindo obesidade, dislipidemia e hiperinsulinemia (SINGH *et al.*, 1999; SATTAR e GREER, 2002).

Inúmeras evidências no presente estudo apontam para uma alteração no perfil circulante dos componentes do SRA em pacientes portadoras de diabetes gestacional, revelando um aumento na produção de ANG I e redução na formação da ANG-(1-7),

além de alteração significativa na relação ANG-(1-7)/ANG I, o que significa que a ANG I elevada não gerou especificamente ANG-(1-7). Essa redução da ANG-(1-7), apesar de não relacionada à hipertensão (pois nesse grupo foram excluídas as hipertensas), pode ser o elo entre o diabetes gestacional e a presença precoce de disfunção endotelial em mulheres que manifestaram diabetes gestacional, situação esta já demonstrada em estudos de KNOCK *et al.*, (1997); PARADISI *et al.* (2002). Talvez uma explicação possível seja a redução de óxido nítrico e prostaglandinas especialmente de PGI₂ (FERNANDES *et al.*, 2005), que apresentam forte correlação com bradicinina e ANG-(1-7). Esse mesmo mecanismo pode explicar as alterações encontradas em gestantes com pré-eclâmpsia devida aos níveis reduzidos da ANG-(1-7) - (MERRIL, 2002), conforme discutido anteriormente. Interessante é correlacionar diabetes gestacional e pré-eclâmpsia (SUHONEN, 1993), que parecem compartilhar alterações comuns no SRA. Seria esta a correlação entre as duas entidades?

São inúmeros os estudos que associam o diabetes gestacional à hipertensão. LEIONONEN *et al.* (2004) relataram incidência de pré-eclâmpsia em 43% das mulheres com diabetes gestacional. Nelas, o perfil glicêmico foi semelhante, exceto pelos níveis elevados de glicemia em jejum no grupo das hipertensas, revelando maior resistência insulínica e hiperatividade simpática.

É conhecido que no terceiro trimestre da gravidez são característicos insulino-resistência e estado de hiperinsulinemia. Por ser esse o momento de maior incidência de hipertensão na gravidez, essa relação pode estar vinculada à etiopatogenia da pré-

eclâmpsia. Vários fatores associam pré-eclâmpsia à insulino-resistência: deficiência de óxido nítrico, deficiência de cálcio, alteração na liberação de prostaglandinas e desordens no sistema renina-angiotensina. Através de técnicas de “clamp” insulínico, tem sido demonstrada insulino-resistência persistente no pós-parto de mulheres que apresentaram pré-eclâmpsia mesmo sem terem apresentado diabetes gestacional (SEELY, 1999).

Várias pesquisas associaram o diabetes à disfunção endotelial. Neste sentido, é interessante ressaltar os estudos de KNOCK *et al.* (1997) e PARADISI *et al.* (2002), que demonstraram a presença de disfunção endotelial em mulheres portadoras de diabetes gestacional. Ambos associaram-na a distúrbios hipertensivos tanto durante quanto após a gestação, além disto, pode também ser interpretada como marcador precoce de doença macrovascular. ANASTASIOU *et al.* (1998) verificaram que mulheres euglicêmicas após o parto, porém com história de diabetes gestacional, apresentavam disfunção endotelial, o que talvez seja a ligação entre o diabetes gestacional e as anormalidades vasculares relacionadas ao diabetes tipo 2, mesmo antes do desenvolvimento de hiperglicemia.

CATALANO *et al.* (1993) referenciaram que mulheres com diabetes gestacional apresentavam redução importante na sensibilidade à insulina. E STEINBERG *et al.* (1996) associaram insulino-resistência à disfunção endotelial. Talvez a insulino-resistência seja também uma ligação entre o diabetes gestacional e a disfunção endotelial. BALLETSCHOFER *et al.* (2003) detectaram disfunção endotelial em

parentes de primeiro grau de portadores de diabetes tipo 2 que já apresentavam fatores de risco dessa doença.

Além disto, sabe-se que a disfunção endotelial ocorre precocemente na insulino-resistência, antes mesmo de alteração nos níveis glicêmicos (VIJAYARAGHAVAN e DEEDWANIA, 2005) e já pode ser observada em mulheres euglicêmicas que apresentaram diabetes gestacional (KNOCK *et al.*, 1997). Em estudo recente demonstrou-se alta prevalência de síndrome metabólica em mulheres que apresentaram diabetes gestacional (FOREST, 2005).

No presente estudo, níveis baixos de ANG-(1-7) foram detectados. Como não se dispõe de estudos prévios sobre essa angiotensina em gestantes portadoras de diabetes gestacional, pode-se apenas supor que essa “não ativação” desse peptídeo na gestação pode realmente estar vinculado à presença de disfunção endotelial e talvez possa ser utilizado como um marcador desta situação em gestantes com diabetes gestacional.

Classicamente, pacientes portadoras de diabetes gestacional são tratadas com dieta isoladamente e, caso não haja bom controle glicêmico, especialmente devido a riscos fetais e perinatais, a insulina é introduzida para melhor controle metabólico (NOGUEIRA, 2001).

Neste estudo, as gestantes portadoras de diabetes gestacional que utilizaram insulina para o controle glicêmico apresentaram menor redução na relação ANG-(1-7) /ANG

I, talvez pelo uso da insulina exógena que sabidamente melhora a sensibilidade insulínica, aumentando a disponibilidade de óxido nítrico e contribuindo para a vasodilatação (YKI-JÄRVINEN, 2003). Porém, como explicar a melhora nos níveis de ANG-(1-7) em gestantes que utilizaram insulina exógena? Há alguma ligação entre insulina exógena e ANG-(1-7)? A insulina, melhorando o equilíbrio endotelial, poderia alterar o equilíbrio do SRA, desviando a formação da ANG I para a ANG-(1-7) ao invés da ANG II?

A partir do conceito de que a vasodilação causada pela BK é reduzida em diabéticos e que a ANG-(1-7) potencializa os efeitos vasodilatadores da BK, OLIVEIRA e FORTES *et al.* (2002) estudaram a resistência mesentérica em ratos diabéticos e demonstraram que a ANG-(1-7) promove efeito vasodilatador, mas, ao contrário do observado em ratos não-diabéticos, não potencializa a vasodilatação induzida pela BK. Essa não-potencialização pode ser restaurada pelo tratamento crônico com insulina e parece envolver hiperpolarização de membrana sem liberação de óxido nítrico. Também a administração aguda de insulina restaura a resposta vasodilatadora à BK em vênulas mesentéricas de ratos diabéticos, conforme descrito pelos mesmos autores. Assim, apesar de permanecer sem resposta a relação desse peptídeo com insulina, postula-se que haja alguma ligação entre eles, que talvez possa interferir positivamente no equilíbrio endotelial.

Espera-se que esse achado venha a contribuir para a melhor compreensão dos casos de disfunção endotelial nesse grupo de pacientes. Como proposta para estudos futuros, fica a possibilidade de avaliação do comportamento da ANG-(1-7) em

mulheres com diabetes gestacional que retornaram à normoglicemia no pós-parto, relacionando os níveis baixos de ANG-(1-7) com disfunção endotelial persistente e complicações macrovasculares descritas previamente.

Concluindo, nesse grupo de gestantes portadoras de diabetes gestacional, níveis baixos de ANG-(1-7) podem estar associados à disfunção endotelial, tanto durante quanto após a gestação. Ao utilizar-se insulina para manter o controle glicêmico adequado, observou-se discreta elevação nos níveis dessa angiotensina, podendo isso significar que o uso da insulina pode estar associado também a mudanças no perfil circulante das angiotensinas, especialmente a ANG-(1-7), e até mesmo à melhora da função endotelial, justificando, talvez, sua utilização também para a proteção do endotélio materno. Na realidade, todas essas hipóteses são apenas especulativas, pois esse dado é inédito, já que o presente estudo é o primeiro a mostrar redução significativa da ANG-(1-7) circulante nos pacientes com diabetes gestacional. Fica evidente, então, que ainda não se compreende claramente qual o preciso significado fisiopatológico dos dados obtidos nesse grupo de pacientes.

Outra hipótese é a de que a ANG-(1-7) possa atuar através de efeitos diretos variáveis conforme sua concentração plasmática e tecidual bem como seu sítio de ação, mas também por ações indiretas decorrentes de sua interação com outros moduladores da função renal, tais como bradicinina, prostaglandinas, óxido nítrico e peptídeos atriais natriuréticos (SANTOS *et al.*, 2000). De qualquer forma, apesar de uma explicação mais definitiva ainda estar por vir, fica evidente que esse

heptapeptídeo desempenha papel chave na regulação da função renal, tanto em condições fisiológicas quanto em situações patológicas.

Adicionalmente, se se separarem as pacientes quanto à doença de base, ou seja, portadoras de diabetes gestacional e tipo 1, observa-se redução da ANG-(1-7) nas primeiras, enquanto no segundo grupo há aumento. Essa elevação acentuada da ANG-(1-7) nas diabéticas tipo 1 pode estar associada à melhora da função endotelial, com possível predomínio de substâncias vasodilatadoras sobre vasoconstritoras no leito vascular. Tomados em conjunto, esses dados reforçam ainda mais a possibilidade de que a determinação dos níveis circulantes de ANG-(1-7) possa ser usada como um marcador de disfunção endotelial, a despeito do tratamento utilizado e do tipo de diabetes.

É necessário que haja mais compreensão das mudanças e interações do SRA durante a gestação da diabética para melhor orientação pré-concepcional e concepcional, no intuito de preservar a função renal e endotelial e tentar compreender o papel da gestação no desenvolvimento/progressão das complicações diabéticas, além do desenvolvimento posterior do diabetes tipo 2 nas mulheres que apresentaram diabetes gestacional.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo foram observadas as seguintes alterações nos componentes circulantes do sistema renina-angiotensina em mulheres portadoras de diabetes tipo 1 (grávidas e não-grávidas) e diabetes gestacional:

- Houve ativação do SRA na gravidez através da detecção de aumento de ANG I, ANG-(1-7), ANG II e ARP, quando comparadas mulheres normais não-grávidas e grávidas, no terceiro trimestre de gestação. Apesar de elevada, a ANG II não apresentou significância estatística.
- Em mulheres diabéticas tipo 1 não-grávidas, houve aumento significativo da ARP e ANG I quando comparadas com mulheres normais.
- A gravidez de mulheres diabéticas tipo 1 acompanhou-se de elevação significativa e acentuada nos níveis de ANG I e ANG-(1-7).
- Em gestantes portadoras de diabetes gestacional e de diabetes tipo 1, houve ativação do sistema como nas gestantes normais, porém não houve elevação dos níveis circulantes da ANG-(1-7) nas portadoras de diabetes gestacional..
- A razão ANG-(1-7) / ANG I mostrou-se significativamente mais baixa nas grávidas com diabetes gestacional quando comparadas com grávidas sem diabetes ou com diabetes tipo 1. Essa razão apresentou discreta melhora nas portadoras de diabetes gestacional controladas com insulina.

REFERÊNCIAS

ADA. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical Practice Recommendations. New York: **Diabetes Care**, suppl 1 2003, 2004 e 2005.

ALLEN, A.M.; ZHUO, J.; MENDELSON, F.A. Localization of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors. *Cakut*: **J Am Soc Nephrol** 10(suppl 11):S23–S29, 1999.

ANASTASIOU, E. *et al.* Impaired endothelium-dependent vasodilation in women with previous gestational diabetes. New York: **Diabetes Care** 21:211-2115, 1998.

ANDERSON, S.; JUNG, F.F.; INGELFINGER, J.R. Renal renin – angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical and molecular biological correlations. Bethesda: **The American Physiological Society**.477, 1993.

ANG, C.; LUMSDEN, M.A. Diabetes and the maternal resistance vasculature. Oxford: **Clinical Science** 101, 719-729, 2001.

ANG, C. *et al.* Endothelial function is preserved in pregnant women with well – controlled type 1 diabetes. *Commonw*: **BJOG**. 109:699-707, 2002.

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *Cakut*: **J Am Soc Nephrol**. 10:S30-S39, 1999.

AUGUST, P. *et al.* Role of renin – angiotensin system in blood pressure regulation in pregnancy. London: **Lancet**. 345, 896-897, 1995.

BADER, M. *et al.* A molecular biology and biochemistry of renin-angiotensin system. *In*: **Textbook of hypertension**. Swales JD, ed Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994.

BALLETSCHOFER, B.M. *et al.* Insulin resistant young subjects at risk of accelerated atherosclerosis exhibit a marked reduction in peripheral endothelial function early in life but not differences in intima-media thickness. Amsterdam. **Atherosclerosis**. 171(2): 303-92; 2003.

BASSO, N.; TERRAGNO, N.A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. Dallas: **Hypertension**. 38, 1246-1249, 2001.

BEDECS, K. *et al.* Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. London: **Biochem J** 325 (pt 2):449–454, 1997.

BEN-HAROUSH, A.; YOGEV, Y. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with type 2 diabetes. New York: **Diabet Med**. 21(2), 103-113, 2004.

BENTER, I.F.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). Chicago: **Peptides** 14: 679-684, 1993.

BICKET, D. Using ACE inhibitors appropriately. Kansas City, **Am Fam Phys.** 66 (3), 2002.

BJÖRCK, S. The renin angiotensin system in diabetes mellitus: a physiological and therapeutic study. Stockolm: **Scan J Urol Nephrol Suppl.** 126: 1-51, 1990.

BLANTZ, R.C.; KONNEN, K.S.; TUCKER, B.J. Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. Thorofare: **J Clin Invest** 57:419–434, 1976.

BOJESTIG, M. *et al.* The renin – angiotensin – aldosterone system is suppressed in adults with type 1 diabetes. Birmingham, **J Renin–Angiotensin – aldosterone system.**1 (4):353-356, 2000.

BOOZ, G.W.; BAKER, K.M. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. Dallas: **Hypertension**, 28: 635-640, 1996.

BOTELHO, LM. *et al.* Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. Chicago. **Peptides**, 15(4):723-9, 1994.

BOTTARI, S.P. *et al.* The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. London: **Biochem Biophys Res Commun** 183:206–212, 1992.

BREWSTER, U.C.; PERAZELLA, M.A. The renin - angiotensin - aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. Newton: **Am J Med.** 116: 263-272, 2004.

BROSNIHAN, K.B. Effect of the angiotensin-(1-7) peptide on nitric oxide release. Bethesda: **Am J Cardiol.** 19, 82(10A):17S-19S, 1998.

BROSNIHAN, K.B. *et al.* Enhanced renal immunocytochemical expression of Ang (1-7) and ACE2 during pregnancy. Dallas: **Hypertension.** 42 (4), part 2, 749-753, 2003.

BROSNIHAN, K.B. *et al.* Enhanced expression of Ang (1-7) during pregnancy. São Paulo: **Br J Med Biol Res.** 37 (8): 1255-1262, 2004.

BROWN, M.A.; ZAMMIT, V.C.; MITAR, D.M. Extra cellular fluid volumes in pregnancy–induced hypertension London: **J Hypertension.** 10: 61-68, 1992.

BROWN, M.A. *et al.* Renin-Aldosterone relationships in pregnancy – induced hypertension New York: **Am J Hypertension.** 5: 366-371, 1992.

BROWN, M.A. *et al.* The detection, investigation, and management of hypertension in pregnancy. Full consensus statement of recommendations from the Council of the

Australian Society for the Study of Hypertension in pregnancy. New Zeland: **Aust N Z J Obstet Gynaecol** 40:139, 2000.

BURNS, K.D. Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney. **Am J kid Dis.** 36: (3) 2000.

CABRAL, A.C.V. **Manual para elaboração e apresentação de dissertações e teses no Curso de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia.** Mestrado e Doutorado. Belo Horizonte: Escola de Medicina da UFMG. 2001, 27p.

CALKA, J.; BLOCK, C.H. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophysial system. Phoenix: **Brain Res Bull.**, 30:677-685, 1993.

CAMPBELL, D.J.; KLADIS, A.; DUNCAN, A.M. Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradikinin peptides. Dallas: **Hypertension**; 23(4): 439-449, 1994.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. Newly recognized components of the renin – angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Japan: **Endocrine Reviews.** 24 (3), 261-271, 2003a.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. The intrarenal renin – angiotensin system and diabetic nephropathy. Charlottesville: **Trends in Endocrinology and Metabolism.** 14 (6), 274-281, 2003b.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. São Paulo: **Arq Bras End Metab.** 46 (4):419-425, 2002.

CARVALHO, C.R.O. *et al.* Effect of captopril, losartan and bradykinin on early steps of insulin action. New York: **Diabetes.** 46: 1950-1957, 1997.

CATALANO, P.M. *et al.* Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. Bethesda: **Am J Physiol.** 264: 60-67, 1993.

CHAPPELL, M.C. *et al.* Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. Massachussets:**Kidney Int.** 54 (Suppl. 68): S3-S6, 1998a.

CHAPPELL, M.C. *et al.* Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. Dallas: **Hypertension.** 31: 362-367; 1998b.

CHAPPELL, M.C.; ALFRED, A.J.; FERRARIO, C.M. Pathways of angiotensin (1-7) metabolism in the kidney Berlin/New York: **Nephrol Dial Transplant.** 16: 22-26, 2001.

CHRISTENSEN, T. *et al.* Changes in renal volume during normal pregnancy. Copenhagen: **Acta Obstet Gynecol Scand** 68:541, 1989.

COOPER, M. Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy London: **Lancet**. 352:18, 213-219, 1998.

CRACKOWER, M.A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. London: **Nature** 417:822–828, 2002.

CSIKOS, T.; CHUNG, O.; UNGER T. Receptors and their classification: Focus on angiotensin II and the AT₂ receptor. London: **J Hum Hypertens** 12:311–318, 1998.

CZECH, M.P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. Baltimore: **J Biol Chem**. 274: 1865-1888, 1999.

DABELEA, D. *et al.* Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM) over time and by birth cohort. New York: **Diabetes Care**. 28:579-584, 2005.

DANSER, A.H. *et al.* Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. Bethesda: **J Clin Endocrinol Metab** 68:160–167, 1989.

DAVIS, J.O.; FREEMAN, R.H. Mechanisms regulating renin release. Washington **Physiol Rev** 56:1–27, 1976.

DCCT NATHAN, D.M. Long-Term Complications of Diabetes Mellitus. Seattle: **N Eng J Med** 328:1676-1685, 1993.

DERR R, *et al.* Is HbA(1c) affected by glycemic instability? New York: **Diabetes Care**. 26(10):2728-33, 2003.

DORIA, A. *et al.* Synergistic effect of angiotensin II type 1 receptor genotype and poor glycaemic control on risk of nephropathy in IDDM. Berlin: **Diabetologia** 40:1293–1299, 1997.

DUKA, I. *et al.* Role of the B2 receptor of bradykinin in insulin sensitivity. Dallas: **Hypertension**. (38), 1355-1360, 2001.

DUNLOP W: Renal physiology in pregnancy. Minneapolis: **Postgrad Med J** 55:329, 1979.

DZAU, V.J. Cell biology and genetics of angiotensin in cardiovascular disease.London: **J Hypertens Suppl** 12:S3–10, 1994.

DZAU, V.J. *et al.* The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. New York: **Am J Cardiol**. 88 (suppl): 1L-20L, 2001.

EHLERS, M.R.W.; RIORDAN, J.F. Angiotensin-converting enzyme. Basel: **Biochem Mol Biol** 76:1217–1230, 1990.

- ELL, G.M. *et al.* Increased plasma atrial natriuretic factor and reduced plasma renin in patients with poorly controlled diabetes mellitus Oxford: **Clinical Science** 77, 177-182, 1989.
- ERDOS, E.G. Angiotensin I converting enzyme. Baltimore: **Circ Res** 36:247–255, 1975
- FELDT-RASMUSSEN, B.*et al.* Central role for sodium in the pathogenesis of blood pressure changes independent of angiotensin, aldosterone and catecholamines in Type 1 (insulin – independent) diabetes mellitus. Berlin: **Diabetologia** (30), 610-617, 1987.
- FERNANDES, L. *et al.* Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. Amsterdam: **Regul pept** 127, 183-189, 2005.
- FERRARIO, C.M. *et al.* Counterregulatory actions of angiotensin-(1–7).Dallas: **Hypertension** 30:535–541, 1997.
- FERRARIO, C.M. *et al.* Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. Cakut: **J Am Soc Nephrol.** 9: 1716-1722, 1998.
- FERRARIO, C.M. Commentary on Tikellis et al: There is more to discover about angiotensin-converting enzyme. Dallas: **Hypertension** 41:390–391, 2003.
- FISCHER, T.A. *et al.* Role of AT₁ and AT₂ receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. Bethesda: **Am J Physiol** 275:H906–H916, 1998.
- FITZGERALD, D.J. *et al.* Decreased prostacyclin biosynthesis preceding the clinical manifestations of pregnancy induced hypertension. Dallas: **Circulation** 75:956, 1987.
- FOREST, J.C. *et al.* Early occurrence of metabolic syndrome after hypertension in pregnancy. New York. **Obstet Gynecol.** Jun;105(6):1373-80, 2005.
- FREEMAN, E.J. *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. Dallas: **Hypertension** 28: 104-108, 1996.
- GANTEN, D. *et al.* Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. Washington: **Science**, 221: 869, 1983.
- GRIENDLING, K.K.; MURPHY, T.J.; ALEXANDER, RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. Dallas: **Circulation** 87:1816–1828, 1993.
- HABER, E. *et al.* Application of a radio-immunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. Bethesda: **J Clin Endocrinol Metab** 29:1349–1355, 1969.

HACKENTHAL, E. *et al.* Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. Washington: **Physiol Rev** 70:1067–1116, 1990.

HAMAR P *et al.* Coinhibition of immune and renin-angiotensin systems reduces pace of glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. **J Am Soc Nephrol**, 10: S234-S238, 1999.

HANSSENS, M. *et al.* Angiotensin II levels in hypertensive and normotensive pregnancies. London: **Br J Obstet Gynecol** – fev, 98, 155-161, 1991a.

HANSSENS, M. *et al.* Measurement of individual plasma angiotensins in normal pregnancy and pregnancy- induced hypertension. Bethesda: **J Clin Endocrinol Metab**. v:73, 489-494, 1991b.

HERINGS, R.M.C. *et al.* Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin-converting enzyme. London: **Lancet**. 345: 1195-1198, 1991.

HOLLENBERG, N.K. *et al.* Glomerular hemodynamics and the Renin – Angiotensin system in patients with type 1 diabetes mellitus. Massachusetts: **Kidney International**, v:63, 172-178, 2003.

HOOPER, N.M. Angiotensin converting enzyme: Implications from molecular biology for its physiological functions. Oxford: **Int J Biochem** 23:641–647, 1991.

HORIUCHI, M. Functional aspects of angiotensin type 2 receptor. New York: **Adv Exp Med Biol** 396:217–224, 1996.

HORIUCHI, M. *et al.* Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. Baltimore: **J Biol Chem** 272:19022–19026, 1997.

HOLGER H. *et al.* Angiotensin-(1-7)–Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. Dallas: **Hypertension**. 37:72, 2001.

HSUEH, W.A. *et al.* A comparison of cold and acid activation of Big renin and of inactive renin in normal plasma. Bethesda: **J Clin Endocrinol Metab** – v:47, 792-799, 1978.

HSUEH, W.A.; QUIÑONES, M.J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. Durham: **Am J Card** 92 (suppl): 10J-17J, 2003.

HSUEH, W.A.; LYON, C.J.; QUIÑONES, M.J. Insulin resistance and endothelium. Newton: **Am J Med**. 117: 109-117, 2004.

HUANG, X.C.; RICHARDS, E.M.; SUMNERS, C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors

and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. Baltimore: **J Biol Chem** 271:15635–15641, 1996.

HUCKLE, W.R.; EARP, H.S. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. Oxford: **Prog Growth Factor Res** 5:177–194, 1994.

IVER, S.N.; FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C. Angiotensin (1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. Dallas: **Hypertension**. 31: 356-361, 1998.

ITO, S. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor/ nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole. Thorofare: **J Clin Invest**. 91: 2012-2019, 1998.

JANDELEIT-DAHM, K.; COOPER, M.E. Hypertension and Diabetes. Philadelphia: **Current Opinion in nephrology and hypertension**. 11, 221-228, 2002.

JARAMILLO, H.N. *et al.* Liver angiotensinogen synthesis and release during captopril treatment in sodium-depleted rats. Baltimore: **Endocrinology** 120:1384–1390, 1987.

JAUCH, K.H. *et al.* Captopril enhances insulin responsiveness of forearm muscle tissue in non-dependent diabetes-mellitus. Oxford: **Eur J Clin Invest**. 17: 448-454, 1987.

JAUNIAX, E. *et al.* The role of relaxin in the development of uteroplacental circulation in early pregnancy. New York: **Obstet Gynecol**. 84: 338, 1999.

KEETON, P.K.; CAMPBELL, W.B. The pharmacologic alteration of renin release. Marseille: **Pharmacol Rev**. 32: 81-95, 1981.

KENNEFICK, T.M.; ANDERSON, S. Role of ang II in diabetic nephropathy. London: **Seminars in Nephrology**. 17: 5, 441-447, 1997.

KNOCK, G.A. *et al.* Association of gestational diabetes with abnormal maternal vascular endothelial function. Commonw: **BJOG**. 104, 229-234, 1997.

KONSTAM, M.A. *et al.* Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dilatation in patients with asymptomatic systolic dysfunction. SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction) Investigators. Dallas: **Circulation**. 88(5): 2277-83, 1993.

LANGER, B. *et al.* Plasma active renin, angiotensin I, and angiotensin II during pregnancy and in pré-eclâmpsia. New York: **Obst Gynecol**. 196, 196-202, 1998 .

LAVOIE, J.L.; SIGMUND, C.D. Minireview: overview of the Renin-Angiotensin System – An endocrine and Paracrine system. Baltimore: **Endocrinology**. 144 (6), 2179-218, 2003.

LEIONONEN, A. *et al.* Diurnal blood glucose profiles in women with gestational diabetes with or without hypertension. New York: **Diab Med.** 21(11) 1181, 2004.

LEMESHOW; STANLEY; HOSMER; DAVID. **Adequacy of sample size in health studies.** Chichester, John Wiley, 1990.

LEWIS, E.J. *et al.* The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. Seattle: **N Eng J Med**, 329 (20), 1456-1462, 1993.

LI, P. *et al.* Angiotensin-(1-7) augments bradikinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. Dallas: **Hypertension** 1997; 29 [part 2]: 394-400.

LIMA, C.V. *et al.* Potentiation of the hypotensive effect of bradikinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. Dallas: **Hypertension.** 30: 542-548, 1997.

LINDHEIMER, M.D.; DAVIDSON, J.M. Osmoregulation, the secretion of arginine vasopressin and its metabolism during pregnancy. Bristol: **Eur J Endocrinol.** 132:133-138, 1995.

LINDPAINTENER, K.; GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin systems and their modulation: The heart as a paradigm for new aspects of converting enzyme inhibition. Basel: **Cardiology** 79(suppl) 1:32-44, 1991.

LOUKOVAARA, S. *et al* Vasoactive mediators and retinopathy during type 1 diabetic pregnancy. Stockholm: **Acta Ophth Scand**, Feb; 83 (1): 57-62, 2005.

LOWE, S.A.; MACDONALD, G.J.; BROWN, M.A. Acute and chronic regulation of atrial natriuretic peptide in human pregnancy: a longitudinal study. London: **J Hypertens.** 10: 201-207, 1992.

LUIK, P.T. *et al.* Low plasma aldosterone despite normal plasma renin activity in uncomplicated type 1 diabetes mellitus: effects of RAAS stimulation. Oxford: **Eur J Clin Invest** . 33, 787-793, 2003.

MACHADO RDP *et al* Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. Oxford **Life Sci.**, 66(1): 67-76, 1999.

MAGNESS, R.R. *et al.* Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. Effects of Ang II on PG2 and NO in pregnancy. Bethesda: **Am J Physiol.** 270: H914-923, 1996.

MAHAMOOD, A. *et al.* Metabolism of angiotensin I in the coronary circulation of normal and diabetic rats. Chicago: **Peptides.** 23, 1171-1175, 2002.

MARRERO, M.B. *et al.* Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. Augusta: **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24:2009-2013, 2004.

MATSUSAK, A.T.; HYMES, J.; ICHIKAWA, I. Angiotensin in Progressive renal disease: theory and practice. Cakut: **J Am Soc Nephrol** . 7 (10), 1996.

MCCANCE, D.R. *et al.* Urinary albumin excretion in diabetic pregnancy. Berlin: **Diabetologia**, 32:236-239, 1989.

MERRIL, D.C. *et al.* Angiotensin – (1-7) in normal and pre-eclamptic pregnancy. Japan: **Endocrine**, v:18, n: 3, 2002.

MILLER, J.A. *et al.* Effect of hyperglycaemia on arterial pressure, plasma renin activity and renal function in early diabetes Oxford: **Clinical Science**, (90)189-195, 1996.

MILLER, J.A.; THAI, K.; SCHOLEY, J.W. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. Massachusetts: **Kidney Int** 56:2173–2180, 1999.

MILLER, J.A. Impact of hyperglycemia on the renin angiotensin system in early human type 1 diabetes mellitus. Cakut: **J Am Soc Nephrol** 10: 1778-1785, 1999.

MILLER, J.A. *et al.* Effect of hyperglycaemia on arterial pressure, plasma renin activity and renal function in early diabetes. London: **Clin Science**, 90: 189-195, 2003.

NATESH, R. *et al.* Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. London: **Nature** 421:551–554, 2003.

NEVES, L.A.A. *et al.* Pregnancy enhances the angiotensin (Ang) – (1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of ang (1-7). Baltimore: **Endocrinology**. 144 (8), 3338-3343, 2003.

NGUYEN, G. *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. Throfare: **J Clin Invest** 109:1417–1427, 2002.

NIELSEN, E.H.; SCHAUSER, K.H.; POULSEN, K. The uteroplacental renin-angiotensin system. London: **Placenta**, 21, 468-477, 2000.

NISHIYAMA, A. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. Dallas: **Hypertension**. 39: 129-134, 2002.

NOGUEIRA, A.I. Diabetes mellitus e gravidez. *In*: **Clínica Médica**, Walter dos Reis Caixeta Braga, Belo Horizonte: Editora Medsi, 463-479, 2001.

- OELKERS, W.K.H. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. Stoneham: **Steroids**. 61:166-171, 1996.
- OGIHARA, T. *et al.* Angiotensin II induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. Dallas: **Hypertension**. 40: 872-879, 2002.
- O'HARE, J.A. *et al.* Changes in blood pressure, body fluids, circulation angiotensin II and aldosterone with diabetes control. London: **Clin Scien**. 63: 414-418, 1982.
- OLIVEIRA, M.A.; FORTES, Z.B. *et al.* Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation *in vivo*. Chicago: **Peptides**, 20; 1195-1201, 1999.
- OLIVEIRA, M.A. *et al.* Angiotensin-(1-7) and bradykinin interaction in diabetes mellitus: *in vivo* study. Chicago: **Peptides**, 23; 1449-1455, 2002.
- OLIVEIRA, M.A. *et al.* Elevated glucose blocks angiotensin-(1-7) and bradykinin interaction: the role of cyclooxygenase products. Chicago: **Peptides**. 24, 449-454, 2003.
- PARADISI, G. *et al.* Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy. Association with endothelial dysfunction. New York: **Diabetes Care**. 25:560-564, 2002.
- PAULA, R.D. *et al.* Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by angiotensin-(1-7) related peptides. Chicago: **Peptides** 20: 493-500, 1999.
- PEACH, M.J. Physiological Reviews Renin – Angiotensin System. London: **Biochem Mechan Ac**. 57 (2), 313-319, 1977
- PIPKIN, F.B.; BAKERP, N. Angiotensin II has depressor effects in pregnant and nonpregnant women. Dallas: **Hypertension**. 30: 1247-1252,1997.
- POULSEN, H.; OLOFSSON, P.; STJERNQUIST, M. Effects of head-tilt on atrial natriuretic peptide and renin system in pregnancy. Dallas: **Hypertension**. 25; 1161-1166, 1995.
- PRASAD, A; QUYYUMI, A.A. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. Dallas: **Circulation**, 110, 1507-1512, 2004.
- PRATT, R.E. *et al.* Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. Washington: **Proc Natl Acad Sci U S A** 84:7837–7840, 1987.
- PRICE, D. *et al.* The state and responsiveness of renin – angiotensin – aldosterone system in patients with type 2 diabetes mellitus. New York: **Am J Hypertension** v: 12, n:3, 348-355, 1999.

PRUDY, L. *et al.* Effect of pregnancy on renal function in patients with moderate-to-severe diabetic renal insufficiency. New York: **Diabetes care**. 19: 1067-1068, 1996.

RASK-MADSEN, C. *et al.* Insulin therapy improves insulin-stimulated endothelial function in patients with type 2 diabetes and ischemic heart disease. New York: **Diabetes**. 50: 2611-2618, 2001.

RE, R.N. Tissue renin angiotensin systems. EUA: **Medi Clin North Am**. 88 (1), 2004.

REECE, E.; LEGUIZAMON, G.; HOMKO, C. Pregnancy performance and outcomes associated with diabetic nephropathy. Taipei: **Am J Perinatol** 15: 413-421, 1998.

REN, Y.; GARVIN, J.L.; CARRETERO, O.A. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. Dallas: **Hypertension** 39:799-802, 2002.

RESENDE, M.M.; MILL, J.G. Vias alternativas de produção de angio II e sua importância em condições fisiológicas e fisiopatológicas. São Paulo: **Arq Bras Cardiol**, 78: 4, 425-431, 2002.

RIBEIRO, A.B. *et al.* The renin-angiotensin system in the control of systemic arterial pressure. New York: **Drugs** 30(suppl 1):6-12, 1985.

RITZ, E.; STEFANSKI, A. Diabetic nephropathy in type II diabetes. Chicago: **Am J Kidney Dis**. 27: 167-194, 1996.

ROSSING, K. *et al.* Pregnancy and progression of diabetic nephropathy. Berlin: **Diabetologia**. 45, 36-41, 2002.

RUIZ-ORTEGA, M. *et al.* Modulation of angiotensin II effects, a potential novel approach to inflammatory and immune diseases. Philadelphia: **Cur Med Chem Anti-inflam**. 2: 379-394, 2003.

SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A.; CARVALHO, C.R. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. London: **Biochem J**. 15;310 (Pt 3):741-744, 1995.

SANTOS, R.A.S.; BARACHO, N.C.V. Angiotensin-(1-7) is a potent anti diuretic peptide in rats. São Paulo: **Br J Med Biol Res** 25:651-654, 1992.

SANTOS RAS and CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). São Paulo: **Br J Med Biol Res.**, 27:1033-1047, 1994.

SANTOS, R.A.S. SIMÕES E SILVA A.C. *et al.* Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. Dallas: **Hypertension**. 27:875-884,1996.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; ANDRADE, S.P. Angiotensin-(1-7): an update. Amsterdam: **Regul Pept**. 91: 45-6, 2000.

SANTOS, R.A.S.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; SIMÕES E SILVA, A.C. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev Br Hipertens.**, 3: 227-236, 2000.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in Kidney and blood vessels. Dallas: **Hypertension**. 38[part 2]: 660-664, 2001.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Characterization of a new selective antagonist for angiotensin (1-7), Pro - Angiotensin (1-7). Dallas: **Hypertension**, v: 41, n:3, 737, 2003a.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Washington: **Proc Natl Acad Sci USA** – 100: 14, 8258-8263, 2003b.

SATTAR, N.; GREER, I.A. Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening? London: **BMJ**, 325: 157-160, 2002.

SCHIAVONE, M.T. *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system by angiotensin (1-7) heptapeptide. Washington: **Proc Natl Acad Sci USA**. 85: 4095-4098, 1988.

SEALEY, J.E. *et al.* Plasma prorenin: Cryoactivation and relationship to renin substrate in normal subjects. Newton: **Am J Med** 61:731–738, 1976.

SEALEY, J.E. *et al.* Plasma prorenin in normal, hypertensive, and anephric subjects and its effect on renin measurements. Baltimore: **Circ Res** 40:141–45, 1977.

SEALEY, J.E. *et al.* The ovarian renin-angiotensin system. Basel: **Front neuroendocrinol**. 11 (3), 213-237, 1990.

SEALEY, J.E. *et al.* The Greater renin system. Its prorenin – directed vasodilator limb. Relevance to diabetes mellitus, pregnancy and hypertension. New York: **Am J Hypertension** – v: 4, 972-977 , 1991.

SEELY, E.W. Hypertension in pregnancy: a potential window into long-term cardiovascular risk in women. Springfield: **JCEM**. 84 (6), 1858-1861, 1999.

SHAH, D.M. Role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. Bethesda: **AJP-renal**. 288: 614-625, 2005.

SIGMON, D.H.; CARRETERO, O.A.; BEIERWALTES, W.H. Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo. Bethesda: **Am J Physiol** 263:F256–F261, 1992.

SIMÕES E SILVA, A.C. *et al.* Renal actions of angiotensin-(1-7). São Paulo: **Br J Med Biol Res**. 30: 503-513, 1997.

SIMÕES e SILVA, A.C. *et al.* The renin angiotensin system in childhood hypertension: Selective increase of Angiotensin-(1-7) in essential hypertension. **Pediatric Nephrology**, Estados Unidos, v. 16, n. 8, p. C96-C96, 2001.

SINGH, R. *et al.* Role of angiotensin II in glucose – induced inhibition of mesangial matrix degradation New York: **Diabetes** 48, oct, 2066-2073, 1999.

SIRAGY, H.M.; CAREY, R.M. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3',5',-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. Thorofare: **J Clin Invest** 97:1978–1982, 1996.

SIRAGY, H.M.; CAREY, R.M. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. Thorofare: **J Clin Invest** 100:264–269, 1997.

SKEGGS JR., L.T. Discovery of the two angiotensin peptides and the angiotensin converting enzyme. Dallas: **Hypertension**.;21(2):259-60, 1993.

STEINBERG, H.O. *et al.* Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction: implications for the syndrome of insulin resistance. Thorofare: **J Clin Invest** 97: 2601-2610, 1996.

SUHONEN, L, TERAMO, K. Hypertension and pre-eclampsia in women with gestational glucose intolerance. Copenhagen: **Acta Obstet Gynecol Scand** 72: 269-272, 1993.

TADDEI, S. *et al.* Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. New York: **Drugs**. 62, 265-284, 2002.

TAHMASEBI, M.; PUDDEFOOT, J.R.; INNANG, E.R. The tissue renin – angiotensin system in the human pancreas. Baltimore: **J Endocrinology** – v: 161, 317-322, 1999.

TALLANT, E.A. *et al.* Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor. Dallas: **Hypertension**. 29:388-393, 1997.

TALLANT, E.A. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. Dallas: **Hypertension**, 34: 950-957, 1999.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. New York: **Diabetes Care** 20:1183-1197, 1997.

THE HEART OUTCOMES PREVENTION EVALUATION STUDY. Seattle: **N Engl J Med**;342:145-153, 2000.

THE SEVENTH REPORT OF THE JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE. Chicago: **JAMA**. 289:2560-2571, 2003.

TIKELLIS, C, *et al.* Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. Dallas: **Hypertension** 41:392-397, 2003.

TIMMERMANS, P.B. *et al.* Angiotensin II receptors and functional correlates. New York: **Am J Hypertens** 5:221S-235S, 1992.

TIMMERMANS, P.B. *et al.* Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. Marseille: **Pharmacol Rev** 45:205-251, 1993.

TSUTSUMI, Y. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. Baltimore: **Circ Res** 83:1035-1046, 1998.

TUMMALA, P.E. *et al.* Angiotensin II Induces Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression In Rat Vasculature : A Potential Link Between the Renin-Angiotensin System and Atherosclerosis. Dallas: **Circulation**. 14; 100(11): 1223-9. 1999

UEDA, S. *et al.* Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. London: **J Hypertens**. 19(11):2001-9, 2001.

UEHARA, M. *et al.* Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulphhydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. Berlin: **Diabetologia**. 37:300-307, 1994.

URATA, H.; NISHIMURA, H.; GANTEN, D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. London: **Eur Heart J** 16(suppl N):79-85, 1995.

URATA, H. *et al.* Angiotensin-converting enzyme-independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. Oslo: **Blood Press Suppl** 2:22-28, 1996.

ÜSTÜNDAG, G.B.; CAY, M.; NAZIROGLU, M. The Study of Renin – Angiotensin – Aldosterone in Experimental Diabetes Mellitus. Guildford: **Cell Biochemistry and function** 17, 193-198, 1999.

- VALABHJI, J. *et al.* The relationship between active renin concentration and plasma renin activity in type 1 diabetes. New York: **Diabetic Medicine** v:18, 451-8, 2001.
- VALABHJI J, DONOVAN J, KYPA A, *et al.* Relationship between diurnal blood pressure, renal hemodynamic functions and the renin – angiotensin system in Type 1 Diabetes **Diabetes UK**. New York: **Diabetic Medicine**, v:52,18, 451-458, 2003
- VANDJK, D.J. *et al.* Increased serum angiotensin – converting enzyme activity and plasma angiotensin II levels during pregnancy and partum in the diabetic rat. Birmingham: **J Renin–Ang – Ald System** – v: 2, n: 3, sep, 193-198, 2001.
- VAUGHAN, D.E.; LAZOS, S.A.; TONG, K. Ang II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells: a potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. Thorofare: **J Clin Invest** 95: 995-1001, 1995.
- VEHKAVAARA, S. *et al.* Insulin therapy improves endothelial function in type 2 diabetes. Augusta: **Arterioscler Tromb Vasc Biol**. 20: 545-550, 2000.
- VELLOSO, L.A. Cross-talk between insulin and angiotensin signaling systems. Washington: **Proc Natl Acad Sci. USA**. 93:12490-12495, 1996.
- VIJAYARAGHAVAN, K.; DEEDWANIA, P.C. The renin angiotensin system as a therapeutic target to prevent diabetes and its complications. Philadelphia: **Cardiol Clin**. 23, 165-183, 2005.
- VINCENT, M.A.; MONTAGNANI, M.; QUON, M.J. Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. Bethesda: **Am J Physiol**, 285: E123-E130, 2003.
- WANG D.H. Distinct mechanisms of modulation of angiotensin II type I receptor gene expression in heart and aorta. Dallas: **Hypertension**. 29:1104-1108, 1997
- WARD, K. *et al.* A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. New York: **Nat Genet** 4:59–61, 1993.
- WILLIAMS, D.J. *et al.* Nitric oxid-mediated vasodilatation in human pregnancy. Bethesda: **Am J Physiol**. 272: H748-752, 1997.
- WILSON, M. *et al.* Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. Newton: **The Am J Med** – v: 68, 97-104, 1980.
- WOLF, G.; ZIYADEH, F.N. The role of angiotensina II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. Chicago: **Am Kidney Dis**. 29: 153-163, 1997.

WOODS, L.H.L.; HALL, L.; MIZELLE, J.L. Control of renal hemodynamics in hyperglycaemia: possible role of tubuloglomerular feedback. Bethesda: **Am J Physiol**. 252: F65-73, 1987.

WRIGHT, J.W.; HARDING, J.W. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. Phoenix: **Brain Res Brain Res Rev** 25:96-124, 1997.

XIANG, A.H. *et al.* Pharmacological treatment of insulin resistance at two different stages in the evolution of type 2 diabetes: impact on glucose tolerance and β -cell function. Bethesda: **J Clin Endocrinol Metab**. 89 (6) 2846-2851, 2004.

YKI-JÄRVINEN, H. Non-glycemic effects of insulin. Philadelphia: **Clin Cornerstone**. Suppl 4, 2003.

YUSUF, S. *et al.* Ramipril and the development of diabetes. Chicago: **JAMA**. 286: 1882-1885, 2001.

Nogueira, Anelise Impelizzieri
N778p Perfil circulante dos componentes do sistema renina-angiotensina em gestantes normais e portadoras de diabetes tipo 1 e diabetes gestacional/Anelise Impelizzieri Nogueira. Belo Horizonte, 2005.
192 f. il.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia
Orientador: Antônio Carlos Vieira Cabral
Co-orientador: Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior
1.Gravidez em diabéticas/complicações 2.Diabetes gestacional/complicações 3.Diabetes mellitus tipo I/complicações 4.Pré-eclâmpsia/complicações 5.Pré-eclâmpsia/fisiopatologia 6.Sistema renina-angiotensina 7.Endotélio vascular/fisiopatologia I.Título

NLM: WQ 248

CDU: 618.2 : 616.379-008.64