Maria Irene de Oliveira Monteiro Jesus Rebelo

A lactoferrina como marcador da activação do neutrófilo na gravidez normal e na pré-eclâmptica

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
1995

Maria Irene de Oliveira Monteiro Jesus Rebelo

A lactoferrina como marcador da activação do neutrófilo na gravidez normal e na pré-eclâmptica

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
1995

Dissertação de doutoramento
apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

À memória de meu Pai

Aos meus filhos
Francisco Pedro e Ricardo Miguel

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Carvalho Guerra, orientador desta tese, o meu agradecimento pelos ensinamentos e amizade demonstrada durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luis Pereira Leite o meu especial agradecimento. A ele devo o entusiasmo pelo trabalho na área da Obstetrícia, a obtenção das amostras necessárias para este estudo e ainda a caracterização do estado clínico da população de grávidas estudadas, assim como o constante incentivo na procura de novos marcadores de interesse clínico.

Ao Professor Doutor Alexandre Quintanilha agradeço a sua constante disponibilidade e os seus ensinamentos sobre *stress* oxidativo que tão úteis foram durante todo este estudo.

Ao Professor Doutor Fernando Sena Esteves os meus agradecimentos por todos estes anos de compreensão, amizade e ajuda demonstrada.

A todos os meus colegas do Laboratório de Bioquímica, principalmente aos que de perto seguiram o meu trabalho, e de quem senti um precioso apoio.

Aos colaboradores do Laboratório de Bioquímica por todo o apoio dado durante a execução deste trabalho.

A todos os colaboradores do Laboratório de Análises Clínicas que de algum modo contribuiram para a realização deste trabalho.

À minha mãe por todo o incentivo que me tem dado durante todos estes anos e ainda por todo o apoio como avó, sem o qual eu não teria tido tanta disponibilidade para levar este trabalho a bom termo.

Por último, muito em especial, a meu marido, pelo amor, compreensão e carinho e por tudo o que me tem proporcionado.

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam das publicações/comunicações seguintes:

IM Rebelo, Guerra FC, Leite LP, Quintanilha A "Lactoferrin as a sensitive blood marker of neutrophil activation in normal pregnancies". European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology (aceite para publicação).

IM Rebelo, Guerra FC, Leite LP, Quintanilha A "Comparative study of lactoferrin and other blood markers of inflammatory stress between normal and preeclamptic pregnancies". European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology (enviado para publicação).

IM Rebelo, Guerra FC, Leite LP, Quintanilha A. "Blood Markers of Oxidative Stress in Normal and Preeclamptic Pregnancies"., painel apresentado no 9º Congresso Nacional de Bioquímica (Algarve, 5-8 Dezembro 1993)

IM Rebelo, Guerra FC, Leite LP, Quintanilha A. "Blood Markers of Oxidative Stress During Normal Pregnancies", painel apresentado no VIII Meeting of the European Association of Red Cell Research: Hotel dasTermas (Curia,12-15 Outubro 1994).

Resumo

O objectivo deste trabalho foi identificar marcadores de *stress* durante a gravidez e puerpério (de normais e de pré-eclâmpticas). Para isto, comparou-se uma população de 100 mulheres primigestas normais e de 30 puérperas cuja gravidez tinha decorrido sem patologia associada, com um grupo de 11 mulheres não-grávidas saudáveis. Para caracterizar o *stress* imposto pela gravidez pré-eclâmptica comparou-se uma população de 42 grávidas pré-eclâmpticas e de 22 puérperas com pré-eclampsia gravídica com a população de grávidas e puérperas normais.

Para o estudo de marcadores sanguíneos de *stress* seleccionámos em primeiro lugar determinações que confirmassem a resposta inflamatória materna à gravidez (CRP e γGT) e quantificassem o *stress* imposto pela gravidez (TBA e MDA-TBA), assim como a capacidade de defesa do organismo à peroxidação lipídica (vitamina E e vitamina C). Consideramos também determinações que quantificassem as alterações causadas em diferentes tecidos. Para o sangue, mediram-se o número, concentração de hemoglobina e índices de fragilidade dos eritrócitos; a fragilidade osmótica, hemoglobina no plasma e haptoglobina; mediu-se para os leucócitos o seu número, diferenciação e produtos de activação de neutrófilos (lactoferrina e elástase), e ainda o número de plaquetas. Para a função hepática, mediram-se as transamínases (ASAT e ALAT), bilirrubina total e LDH. Para a função renal medimos a creatinina, ureia e ácido úrico.

Verificámos, através do doseamento de uma proteína de fase aguda, a CRP, a existência de uma resposta inflamatória á gravidez por parte do organismo materno, acompanhada por um aumento de leucócitos, de neutrófilos e da lactoferrina (um dos seus produtos de activação). Como consequência foram identificadas alterações em diferentes sistemas maternos, nomeadamente: o estímulo da hemodinâmica renal e da hemólise e ainda o desequilíbrio do balanço normal entre os sistemas oxidantes/antioxidantes.

A activação de neutrófilos, através do comprometimento do mecanismo antioxidante de defesa, pode ser a causa principal de muitas das alterações encontradas. Na gravidez pré-eclâmptica, a resposta inflamatória é ainda mais evidente (maiores elevações na CRP e na γGT). O aumento da concentração plasmática de lactoferrina no grupo de grávidas com patologia associada poderia ser responsável pela alteração de alguns dos índices eritrocitários, reflectindo-se numa maior resistência eritrocitária associada a maior concentração de haptoglobina e a menor concentração de hemoglobina no plasma. A maior discrepância na razão oxidantes/antioxidantes levaria a uma maior activação de neutrófilos. Está descrita a relação entre os neutrófilos activados e a alteração da parede dos vasos, com libertação de elástase, lactoferrina e outras

protéiases capazes de mediar danos vasculares que podem provavelmente contribuir para as lesões observadas nos diferentes orgãos.

Em relação ao parto, a resposta do organismo materno faz-se sentir com maior intensidade na gravidez normal. O aumento do número de leucócitos e do número de neutrófilos é superior no grupo com patologia associada á gravidez; no entanto, a variação da concentração plasmática de lactoferina é inferior neste grupo. Poderemos concluir que enquanto numa gravidez normal.o parto faz estimular a resposta inflamatória do organismo materno, na gravidez pré-eclâmptica a resposta inflamatória não é tão acentuada, verificando-se uma redução da lactoferrina.

A activação dos neutrófilos compromete o mecanismo de defesa antioxidante durante a gravidez e puerpério, pelo que a quantificação da lactoferrina plasmática é um bom marcador não só da activação do neutrófilo, mas ainda uma medida indirecta do balanço oxidantes/antioxidantes responsável pela alterações verificadas em vários orgãos.

Résumé

Le but de ce travail était d'identifier les marqueurs du *stress* pendant la grossesse et pendant la période puerpérale chez les sujets normaux et pré-éclamptiques. Un groupe de 100 femmes lors de leur première grossesse et un groupe de 30 femmes après accouchement dont la grossesse était exempte de toute pathologie ont été comparés à un troisième groupe de 11 femmes en bonne santé et non enceintes. Pour identifier le stress causé par la grossesse pré-éclamptique, on a aussi étudié une population de 42 grossesses pré-éclamptiques, ainsi qu'une autre population de 22 femmes pré-éclamptiques après accouchement; ces deux populations ont été comparées à une population normale de femmes, lors de leur première grossesse et après accouchement.

Pour étudier le *stress*, marqueurs dans le sang, on a d'abord déterminé la concentration da la Protéine C Réactive (CRP) et de la γ Glutamil Transferase (γ GT) afin de confirmer la réponse inflammatoire à la grossesse; puis des produits de péroxidation des lipides pour confirmer le stress et finalement des valeurs des vitamines C et E pour vérifier la capacité de défense contre la péroxidation lipidique. D'autres déterminations biochimiques et hématologiques ont été réalisées pour quantifier les altérations des tissus. Les cellules du sang ont été comptées, les tests de fragilité osmotique réalisées,.et les concentrations d'hémoglobine et d'haptoglobine du plasma déterminées. On a mesuré les quantités de lactoferrine et d'élastase pour quantifier le degrès d'activation des neutrophyles. On a vérifié la fonction hépatique à partir de la détermination des transaminases (ASAT et ALAT), bilirrubine totale et LDH. Les dosages de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique ont été faits pour connaître l'état de la fonction rénale.

On a mis en évidence une réponse inflammatoire à la grossesse par la présence de la CRP, une protéine de la phase aigue, qu'accompagnait une augmentation des leucocytes, des neutrophyles et de la lactoferrine. Par conséquent on a identifié des altérations dans les différents systèmes maternels, notamment la stimulation de l'hémodynamique rénale et de l'hémolise mais aussi le déséquilibre entre les systèmes oxydants/antioxydants.

L'activation des neutrophyles, par la compromission du mécanisme antioxydant de défense est sans doute la cause principale des nombreuses altérations rencontrées. Pour les grossesses pré-eclamptiques, la réponse inflammatoire est encore plus évidente (augmentation supérieure de la CRP et de la γ GT). L'augmentation de la concentration plasmatique de la lactoferrine du groupe des femmes enceintes atteintes d'une pathologie peut être à l'origine de l'altération de certains indices éritrocitaires, cela se manifeste par une plus grande résistance éritrocitaire associée à une plus grande concentration d' haptoglobine et une plus faible concentration d'hémoglobine dans le plasma. Une plus

grande différence dans le rapport oxydant/antioxydant amènerait une plus grande activation des neutrophyles. La relation entre les neutrophyles activés et l'altération des parois des vaisseaux sanguins, avec la libération de l'élastase, de la lactoferrine et des autres protéases susceptibles d'intervenir dans les dommages vasculaires contribuent probablement aux lésions observées dans les différents organes.

Concernant l'accouchement la réponse de l'organisme maternel est plus nette pour une grossesse normale. L'augmentation du nombre des leucocytes et des neutrophyles est supérieure chez les femmes enceintes et atteintes d'une pathologie. Cependant, la variation de concentration plasmatique de la lactoferrine est inférieure dans ce groupe. Nous pourrions conclure que pour une grossesse normale l'accouchement stimule la réponse inflammatoire de l'organisme maternel, pour une grossesse pré-éclamptique la réponse inflammatoire n'est pas aussi accentuée, observant une réduction de lactoferrine.

L'activation des neutrophyles interfère dans le mécanisme de défense antioxydant lors de la grossesse et de la période puerpérale, c'est pour cela que la quantification de la lactoferrine plasmatique est un bon marqueur non seulement pour l'activation du neutrophyle mais encore est une mesure indirecte du rapport oxydant/antioxydant à l'origine des altérations vérifiées dans différents organes.

Summary

The aim of the present work was to identify *stress* markers during pregnancy and puerperium both in normal and pre-eclamptic subjects. A group of 100 women in their first pregnancy and a group of 30 women after delivery, the pregnancy of whom was devoid of any pathology, were compared with a group of 11 non-pregnant healthy women. To characterize the *stress* caused by preeclampsia a population of 42 pre-eclamptic women was studied, as well as another of 22 pre-eclamptic women after delivery, were compared with the normal population of women in their first pregnancy and after delivery.

To study blood markers for *stress*, determination of C-Reactive Protein (CRP) and γ-glutamyltranspeptidase (γGT) were first selected in order to confirm the maternal inflammatory response to pregnancy; products of lipid peroxidation were determined to verify *stress*, and the values of vitamins C and E were checked to measure the organism defense capacity against lipid peroxidation. Other biochemical and hematological measurements were also carried out in order to quantify alterations induced in several tissues. Blood cells were counted and osmotic fragility tests performed, as well as plasma hemoglobin and haptoglobin concentrations. Lactoferrin and elastase were measured to estimate neutrophil activation. The hepatic function was checked with the determination of transaminases (ASAT e ALAT), total bilirubin and lactic dehydrogenase. Creatinine, urea and uric acid were measured for the renal function.

Measuring CRP, an acute phase protein, the existence of inflammatory response to pregnancy was determined, followed by an increase in the count of white blood cells, including neutrophils and lactoferrin. Alterations were found in several maternal defense system, including renal hemodynamics stimulation, hemolysis, and the shift from normal ratio values of oxidants/antioxidants.

Neutrophil activation, jeopardizing the antioxidant defense mechanism, could be the main cause of many of the alterations found. In pre-eclamptic pregnancy, inflammatory response is more pronounced (higher increases in CRP and γGT). The increase of plasma lactoferrin concentration in pregnant women with associated pathology could be responsible for the alteration of some erythrocytes parameters, with an increase in the cells resistance, higher hemoglobin concentration and lower plasma hemoglobin. The higher shift in the ratio oxidants/antioxidants would cause an increase in neutrophil activation. The relationship between neutrophil activation and alteration of blood vessels walls has been described, with the release of elastase, lactoferrin and other proteases capable of mediating vascular damage which

may probably contribute to the lesions observed in diferent organs.

Maternal response to delivery is stronger in normal pregnancy. The increase in the number of total white blood cells and neutrophils is higher in the group with associated pathology. However, lactoferrin plasma concentration is lower is such case. It can be concluded that, while in the normal pregnancy delivery stimulates the inflammatory response, in pre-eclamptic pregnancy this response is less marked and a reduction of lactoferrin is actually observed.

Neutrophil activation compromises the antioxidant defense mechanism during pregnancy and in the period after delivery, so quantification of plasma lactoferrin is a good marker not only for neutrophil activation but also constitutes an indirect measure of the oxidants/antioxidants ratio, responsible for the alterations observed in several organs.

Abreviaturas

12-HPETE	superóxido-dismútase
ADP	adenosina-5'-difosfato
ALAT	transamínase da alanina
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ASAT	transamínase do aspartato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSP	bromossulftaleína
CID	coagulação intravascular disseminada
CRP	proteina C reactiva
EPH	edema, proteinúria, hipertensão
γGT	γ-glutamiltransférase
HELLP	H-hemolysis, EL-elevated liver enzymes, LP-low platelet count
LDH	desidrogénase láctica
LTB4	leucotrieno B4
LTs	leucotrienos
MDA-TBA	malonildialdeído-ácido tiobarbitúrico
PG	prostaglandina
PMNLs	leucócitos polimorfonucleares
PUFAs	ácidos gordos polinsaturados
SEM	erro padrão da média
SOD	superóxido-dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico

Índice

Introdução

Capítulo 1. *Stress* Oxidativo

1.1. Radicais livres 4
1.2. Patogénese dos radicais livres 5
1.3. Algumas propriedades dos radicais livres de oxigénio 6
1.4. Peroxidação 6
1.5. Mecanismo de peroxidação lipídica —radicais livres 7
1.6. Resposta celular aos radicais livres 8
1.7. Resposta tecidular ao excesso de peróxidos 8
1.8. Fontes de peroxidação dos ácidos gordos poli-insaturados 11
1.9. Radicais livres e peroxidação lipídica 12
1.10. *Stress* oxidativo e defesas antioxidantes 15
1.11. Métodos de determinação dos produtos da peroxidação lipídica 18

Capítulo 2. Aspectos Fisiopatológicos Particulares da Gravidez

2.1. Aparelho circulatório 20
2.2. Endotélio 32
2.3. Função renal 39
2.4. Função hepática 43
2.5. *Stress* oxidativo e gravidez 45

Capítulo 3. Material e Métodos

3.1. Casuística 55
3.2. Objectivos do trabalho experimental 56
3.3. Bioquímica e hematologia 57
3.4. Técnicas 57
3.5. Estudo estatístico 63

Capítulo 4. Resultados

4.1. O *stress* ao longo da gravidez 65
4.2. O *stress* do 3º trimestre nas pré-eclâmpticas e nas grávidas normais 73
4.3. O *stress* em puérperas (com gravidez normal e com pré-eclampsia gravídica) 82

4.4. O *stress* do pós-parto versus 3º trimestre (normais e pré-eclâmpticas) 90
4.5. O *stress* do pós-parto versus grupo de controlo (normais e pré-eclâmpticas)..... 99

Capítulo 5. Discussão

5.1. O *stress* da gravidez..... 109
5.2. O *stress* do 3º trimestre (pré-eclâmpticas e grávidas normais)..... 112
5.3. O *stress* do puerpério (normais e pré-eclâmpticas)..... 115
5.4. O *stress* do pós-parto versus grupo de controlo (normais e pré-eclâmpticas)..... 119

Capítulo 6. Conclusões

6.1. Gravidez normal..... 123
6.2. Pré-éclampsia..... 123
6.3. Puerpério..... 123
6.4. Conclusões finais..... 125

Anexo..... 127
Bibliografia..... 135

Introdução

O início da gravidez e o fenómeno da implantação do embrião envolvem interacções embriónico-maternas complexas, durante as quais o útero passa por uma série de alterações. Durante este processo, denominado por decidualização, verifica-se a diferenciação do endométrio associado com a invasão do trofoblasto e com a placentação hemocorial. Os orgãos reprodutores contêm uma grande quantidade de leucócitos e as situações de alteração da rede vascular, como é o caso da implantação, assemelham-se a processos inflamatórios.

Poderemos dizer que a implantação está associada a uma reacção inflamatória local de intensidade variável, seguida por várias reações sistémicas. A leucocitose e a neutrofilia do sangue e ainda a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado são as principais alterações associadas ao processo inflamatório. Os neutrófilos desempenham uma função muito importante nos mecanismos de defesa do organismo. As integrinas existentes à superfície da sua membrana determinam interações específicas, provocando lesões em diversos componentes celulares e tecidulares, por uma série de mecanismos (Harlan, 1985; Lewis e Graugher, 1986). Estes mecanismos incluem a libertação, no local da inflamação, de espécies de oxigénio reactivas, proteínases e metabolitos do ácido araquidónico. A activação dos

neutrófilos é acompanhada por um aumento rápido do consumo de oxigénio, conhecido por "burst" respiratório, caracterizado pela rápida utilização de oxigénio, produção de radicais superóxido e de peróxido de hidrogénio e num aumento da oxidação da glucose através do "shunt" da hexose-monofosfato. Tão importante como a libertação de radicais de oxigénio pelo neutrófilo activado é a libertação de lactoferrina, lisozima e de enzimas lisossómicas.

A lactoferrina, glicoproteína específica dos grânulos secundários dos neutrófilos, libertada numa forma isenta de ferro, tem sido utilizada como parâmetro clínico de investigação. De entre os efeitos da lactoferrina é de salientar o aumento de produção de radicais livres intracelulares, a promoção da aderência dos granulócitos às células endoteliais, o aumento da retenção dos granulócitos no local inflamatório, levando à libertação de enzimas proteolíticas, das quais a elástase é a mais importante. Quer a libertação da lactoferrina pelos neutrófilos quer a libertação de uma proteína de fase aguda pelo fígado, a proteina C-reactiva, são estimuladas pelas citoquinas TNF, IL-1 e IL-6, pelo que a quantificação daqueles dois parâmetros tem interesse no estudo de processos inflamatórios. Como já foi referido, da activação dos neutrófilos resulta também a libertação de radicais livres cuja presença está implicada numa série de alterações fisiológicas (Babior *et al.*, 1973). Mais importante que a quantificação dos peróxidos lipídicos plasmáticos é a determinação do balanço entre oxidantes e antioxidantes, nomeadamente a vitamina C e a vitamina E.

Se numa grávida normal todas estas alterações são bem toleradas pelo organismo materno, o mesmo não se verifica na pré-eclampsia. A gravidez pode induzir um estado hipertensivo numa mulher normotensa ou agravar um estado hipertensivo anterior á gravidez, sendo a hipertensão induzida pela gravidez com proteinúria (pré-eclampsia) uma das principais causas de morbilidade e mortalidade materna e perinatal (Sibai *et al.*, 1982). A doença hipertensiva induzida pela gravidez é um estado complexo e intrigante. A descoberta desta doença, descrita como eclampsia, tem sido atribuída aos antigos Egípcios, Indianos e Chineses. Uma das mais antigas fontes citadas é o papiro de Kahun (Petrie) que data de 2200 a.C. A primeira documentação de pré-eclampsia como doença data do tempo dos antigos Gregos antes de Hipócrates (Chesley, 1974). Mauriceau em 1694 recomendava o imediato terminar da gravidez assim que a pré-eclampsia fosse diagnosticada, referindo também que as primigestas apresentavam maior risco de desenvolver convulsões que as multíparas (Mauriceau citado por Haeger, 1993). A etiologia da pré-eclampsia tem-se mantido de difícil interpretação durante séculos. Têm-se proposto muitas hipóteses, desde acções muito simples até aos efeitos dos prostanóides.

A presente dissertação relaciona-se directamente com o tipo de alterações causadas pela oxidação a nível celular assim como às defesas antioxidantes verificadas durante a gravidez e, em particular, a gravidez pré-eclâmptica.

Alguns autores (Ishiara, 1978) responsabilizam o aumento dos lipoperóxidos pelos danos oxidativos verificados na célula durante a gravidez. Também na gravidez o oxigénio desempenha uma função reguladora em processos metabólicos; no entanto o aumento do seu consumo resulta na produção de espécies reactivas capazes de provocar danos celulares. Como as células têm mecanismos próprios para se defenderem contra os danos provocados pelo aumento do *stress* oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1986), considerámos de interesse o estudo do equilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes para investigarmos de que modo o desenvolvimento da hipertensão durante a gravidez compromete a capacidade de autoprotecção das células contra o *stress* oxidativo.

Durante a gravidez, por analogia com o exercício físico, sugerimos que a activação de neutrófilos seria uma das causas do aumento dos níveis de *stress*. Existem já provas *in vivo* de que os oxidantes dos neutrófilos activados podem lesar as células endoteliais vasculares (Harlan et al, 1981; Harlan, 1985), a membrana glomerular basal (Vissers et al., 1984) e o epitélio pulmonar (Suttorp e Simon, 1982). Outros componentes dos neutrófilos como as protéiases e as proteínas catiónicas podem ser importantes como mediadores da lesão celular. Assim, a elástase está implicada na patogénese do enfisema (Janoff, 1985), modula a função plaquetária (Brower et al., 1985) e interfere com factores de coagulação (Takai *et al.*, 1983); a lactoferrina está relacionada com o metabolismo do ferro, tem poder bacteriostático e é ainda importante na adesão dos granulócitos e na granulocitopoiese (Hansen *et al.*, 1975).

Sabendo que a gravidez e o parto induzem *stress* e que na pré-eclampsia este efeito está agravado, identificámos marcadores sanguíneos do *stress* imposto durante a gravidez normal e a pré-eclampsia. Numa primeira fase foram identificados vários parâmetros relacionados com a resposta de fase aguda ao processo inflamatório desenvolvido pela gravidez. Identificámos ainda parâmetros que funcionam como marcadores de sistemas oxidantes e antioxidantes, de activação neutrofílica, de hemólise eritrocitária e de alterações renais e hepáticas. Numa segunda fase foram identificadas diferenças nos valores obtidos entre grávidas normais e pré-eclâmpticas.

No sentido de melhor enquadrar a nossa investigação nos conhecimentos actuais nestas importantes áreas de estudo, faremos preceder com uma síntese bibliográfica sobre *stress* oxidativo e aspectos fisiopatológicos particulares da gravidez orientada tanto a apresentação da metodologia utilizada como a dos resultados obtidos e respectiva discussão.

Capítulo 1. *Stress* Oxidativo

A gravidez é um dos processos fisiológicos que sofre a influência do *stress* oxidativo. As mais importantes espécies de oxigénio reactivo implicadas no desenvolvimento do *stress* oxidativo são: o oxigénio singleto, o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo. Estas espécies de oxigénio reagem com muitos constituintes celulares provocando grandes danos oxidativos, pondo-se muitas vezes a hipótese de os danos teciduais serem a causa e não uma consequência do aumento das reacções de radicais livres ao *stress*.

1.1. Radicais livres

Radical livre é qualquer espécie molecular que contém um ou mais electrões desemparelhados (Halliwell e Gutteridge, 1987; Pryor, 1976), podendo aparecer carregados ou não, e possuindo uma reactividade variada. O radical livre pode ser de vários tipos:

intermediário produzido durante a desintoxicação xenobiótica, intermediário reactivo de oxigénio ou radical de oxigénio.

O ataque dos radicais livres não é específico e depende das biomacromoléculas que estão à sua volta, do local onde se forma, do tipo de radical e da presença de antioxidantes. A sua toxicidade deve-se não só à sua reactividade mas também à capacidade de gerar outras espécies reactivas. Podem participar em reacções de propagação em cadeia, atacar uma molécula e continuar com a sua actividade, bem como gerar mais radicais a partir de um radical inicial, propagando assim as reacções tóxicas.

1.2. Patogénese dos radicais livres

A produção de radicais activados pelos mecanismos descritos pode exceder a capacidade dos protectores locais e produzir lesão tecidual. Os radicais livres podem ser produzidos (Quintanilha, 1985):

—Enzimaticamente: em reacções redox da cadeia de transporte de electrões (mitocôndria, retículo endoplasmático e membranas nuclear e plasmática) e como intermediários durante a desintoxicação de drogas, na síntese de prostaglandinas e durante a activação de leucócitos e de plaquetas;

—Por causas ambientais como a luz ou radiação ionizante;

—Por um processo não enzimático através da autoxidação de muitas substâncias: ácidos gordos poli-insaturados, hemoglobina, mioglobina, catecolaminas e outros. A autoxidação pode ser estimulada por iões metálicos com capacidade redox (ferro e cobre), radiações ionizantes ou ultravioletas e por corantes fotoactivados ou pigmentos.

Os radicais livres são necessários para reacções biossintéticas (síntese das prostaglandinas, síntese do colesterol, etc.), têm também função protectora (leucócitos activados e macrófagos produzem peróxido de hidrogénio com poder bactericida).

Em situações fisiológicas normais as reacções de radicais livres são mantidas sob controlo através de processos químicos e físicos dos intermediários de radicais e dos seus *scavengers*. No entanto, quando se verifica alteração das propriedades das células ou uma redução dos *scavengers* naturais de radicais livres pode verificar-se um processo de peroxidação lipídica. Nestes casos, os radicais livres são nocivos porque participam em reacções de propagação com consequências bastante graves. Podem reagir com outras moléculas e gerar novas espécies reactivas.

A peroxidação lipídica e a produção excessiva de radicais livres podem interferir com a produção de ATP, danificar a membrana através de uma alteração nos lipídeos e inactivar enzimas por alteração nas proteínas. Tudo isto vai provocar modificações nas funções da membrana celular (permeabilidade, transporte e bioenergética).

1.3. Algumas propriedades dos radicais livres de oxigénio

A redução monovalente do oxigénio molecular leva à formação de radicais de aniões superóxido, que são muito activamente dismutados pela superóxido-dismútase (SOD) (McCord e Fridovich, 1969). O produto desta reacção é o peróxido de hidrogénio, que é menos prejudicial que os radicais superóxido. Contudo, ele é eliminado através de dois sistemas: as catálases, que são sensíveis a concentrações relativamente elevadas de peróxido de hidrogénio e a glutationa-peroxídase, que reage com baixas concentrações de peróxido de hidrogénio. No entanto, esta última requer um substrato (glutationa) que nem sempre está disponível nas células. Como consequência desta situação pode assumir-se que o peróxido de hidrogénio facilmente difusivel está sempre presente nos sistemas vivos e pode participar em várias reacções. Um dos efeitos da presença do peróxido de hidrogénio pode ser a peroxidação lipídica directa (Donato e Sohal, 1981); contudo, mais importante é a reacção do peróxido de hidrogénio com metais de transição como o Fe^{2+} (Fenton, 1894). Este tipo de reacção origina hidroxilos livres que são muito reactivos.

1.4. Peroxidação

Cada tecido e cada membrana celular tem uma composição distinta de fosfoglicerídeos e de outros lipídeos. Todas as membranas biológicas são constituídas por lipídeos que formam uma estrutura de dupla camada na qual a parte interior é hidrófoba e a parte exterior hidrófila. As bicamadas são estruturas extremamente estáveis ligadas por interacções não covalentes. Estas interacções lipídeo-lipídeo têm baixas energias de activação. Contudo, as bicamadas lipídicas têm mobilidade limitada, podendo participar na formação e na quebra de moléculas próximas sem desfazerem a bicamada. A bicamada é estável e fluida com interacções lipídicas muito complexas e dinâmicas. Sendo a maior parte dos radicais livres gerada por sistemas enzimáticos localizados em camadas lipídicas, os lipídeos são os primeiros a serem atacados, o que em conjunto com a sua capacidade de autoxidação os torna alvos muito

fáceis para o ataque pelos radicais livres. Como os lipídeos fazem parte da composição das membranas biológicas, o efeito do *stress* oxidativo resulta na degeneração da sua estrutura e na perda de actividade. Os lipídeos preferencialmente atacados são o colesterol e os fosfolipídeos contendo ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs) e esta degradação lipídica designa-se por peroxidação lipídica.

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas (Packer, 1980):
—Iniciação ou etapa oxidativa;
—Propagação em que se verifica estabilização do radical formado através da produção quer de um lipídeo tóxico quer de um novo radical que originará a propagação do processo;
—Finalização, em que as reacções de propagação continuam até que algum mecanismo vá competir e impedir essa propagação. Como exemplos desses mecanismos temos os mecanismos antioxidativos (reacção com um antioxidante), as reacções dos radicais com substratos ou a formação de ligações covalentes entre os radicais lipídicos.

Os radicais livres de oxigénio aparecem durante a vida aeróbica e apesar de as vias peroxidativas serem moduladas por um sistema protector, muitas vezes há lesões.

1.5. Mecanismo de peroxidação lipídica —radicais livres

Os PUFAs são normalmente metabolizados na membrana interna das mitocôndrias a acetil-CoA através da beta-oxidação. Este processo enzimático é essencial para a vida aeróbica. Outro processo anormal, não controlado, de reacção de radicais livres por quebra dos PUFAs, pode ocorrer nos aeróbios. Geralmente este processo degenerativo tem várias etapas (Pryor, 1978; Konze e Elstner, 1978; Cohen, 1979). O segmento —CH_2— dos PUFAs perde rapidamente um dos seus hidrogénios quando este segmento se localiza entre duas ligações duplas. O hidrogénio é perdido para o radical hidroxilo, que por sua vez deriva de um anião superóxido, formando-se um radical PUFA. Verifica-se um rearranjo de uma das ligações duplas e forma-se um dieno conjugado. O dieno conjugado tem entropia mais baixa que o percursor. O passo seguinte é a reacção do oxigénio com um electrão livre do dieno conjugado, formando-se um radical peróxido. Este radical peróxido retira um segundo electrão de outra molécula de PUFA, seguindo-se uma série de reacções deletérias. Esta cadeia de reacções só pode ser parada por um antioxidante.

1.6. Resposta celular aos radicais livres

Os radicais livres de oxigénio aparecem nos sistemas biológicos e estão implicados em numerosos fenómenos (envelhecimento celular, mutagénese, inflamação e outras patologias).

As consequências de um excesso de peróxidos variam consideravelmente de um tecido para outro, dependendo do conteúdo membranar em ácidos gordos poli-insaturados, dos sistemas protectores, da pressão parcial de oxigénio e do tipo de actividades enzimáticas que podem activar o oxigénio, a taxa de *turnover* celular e a natureza da matriz celular.

A sobreprodução intracelular de peróxidos ou de radicais livres activa quer a fosfolípase A_2 quer as lipooxigénases. Também pode resultar na morte celular com libertação de moléculas intracelulares, incluindo peróxidos orgânicos, no compartimento extracelular.

Com a excepção do sistema nervoso central, o *stress* oxidativo intracelular iniciará uma forte reacção inflamatória. Enquanto a reacção inflamatória é necessária para eliminar os restos celulares, o processo de reparação não pode ser prolongado sem consequências deletérias.

1.7. Resposta tecidual ao excesso de peróxidos

Plaquetas

As plaquetas são muito ricas em PUFAs (Mahadevappa e Holub, 1982), especialmente ácido araquidónico, o que sugere que a peroxidação lipídica pode interferir com o processo de agregação e de inflamação. De facto, a prostaciclina-sintétase, que está localizada no endotélio vascular, é muito facilmente inactivada por hidroperóxidos de ácidos gordos em concentrações em que a tromboxano-sintétase não é afectada (Ham *et al.*, 1979). Isto implica que a peroxidação lipídica não controlada está associada com hiperagregação plaquetária e oclusão dos microvasos. Através do seu efeito estimulatório nas lipoxigénases, os peróxidos aumentarão a produção ácido 12-hidroperóxi-eicosatetranóico (12-HPETE) nas plaquetas, o qual por seu lado estimula a produção de leucotrieno B4 (LTB_4) (Maclouf *et al.*, 1982) nos neutrófilos (um mediador pró-inflamatório extremamente importante).

A gravidez é um processo muitas vezes complicado pelo desenvolvimento de trombocitopenia, podendo ser o resultado de causas fisiológicas ou patológicas, como acontece na pré-eclampsia. Apesar de a patogénese da pré-eclampsia não estar ainda bem esclarecida, tem sido sugerido que a placentação está alterada, modificando as artérias uterinas espiraladas (DeWolf *et al*, 1975 e 1986; Pijnenborg *et al.*, 1991; Oosterhof *et al.*, 1994; Nardulli *et al.*, 1994) com uma aparente deficiência na remodelação desses vasos pelo trofoblasto (Brosens e Ranaer, 1972; DeWolf *et al.*, 1975 e 1986). A placentação deficiente provoca uma vasculatura utero-placentária incapaz de transportar quantidades adequadas de sangue materno para a placenta e para o feto, originando isquémia placentar (Redman *et al.*, 1976 e 1978). Em resposta, a placenta pode libertar quantidades menores de mediadores fisiológicos necessários para a manutenção do estado hemodinâmico gestacional normal ou, pelo contrário, libertar factores patológicos que podem contribuir para a manifestação clínica da pré-eclampsia (Romero e Duffy, 1980; Redman, 1984 e 1991). As pacientes com pré-eclampsia que desenvolvem trombocitopenia parecem manifestar estados de acelerada destruição plaquetária que excede a que normalmente se verifica na grávida normal (Giles e Inglis, 1981).

Neutrófilos

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) têm um baixo conteúdo em PUFAs e nestas células a libertação activa do superóxido nos fagossomas, no decurso do aumento respiratório, desempenha o papel principal (Gabit e Babior, 1979; Badwey e Karnovsky, 1980). Uma parte significativa deste superóxido está ligada ao meio extracelular.

O superóxido LTB_4 e alguns de ácidos gordos oxigenados, como o hidroperóxido do ácido linoleico, são quimiotácticos, e contudo a peroxidação lipídica não específica estimula o processo inflamatório induzindo também a desgranulação dos leucócitos polimorfonucleares, a activação dos neutrófilos e a libertação de lactoferrina para o plasma. Em mulheres com pré-eclampsia verifica-se activação dos neutrófilos (Haeger *et al.*, 1990 e 1992), pensando-se que esta activação é mediada pelo complemento. O sistema do complemento é muito potente e uma das principais vias efectoras do processo de inflamação (Goldstein *et al.*, 1973; Haeger, 1993).

Haeger (1993) especula que as lesões endoteliais e microvasculares verificadas nas pré-eclâmpticas, manifestações patológicas da pré-eclampsia, podem ser explicadas parcialmente pela activação do complemento, resultando em efeitos vasculares directos das anafilotoxinas, e em efeito do complexo do complemento C_{5a} e C_{5b-9} sobre os leucócitos, com a libertação de potentes mediadores inflamatórios.

Figado

Nas células hepáticas, a peroxidação lipídica é facilmente iniciada no retículo endoplasmático, especialmente em regiões onde o citocromo P_{450} está implicado (Fong *et al.*, 1973; O'Brien e Rahimtula, 1975). Neste tecido, a oxigenação das substâncias hidrófobas através da via do citocromo P_{450} dependente é a fonte principal do *stress* oxidativo e normalmente associada com peroxidação lipídica intensa.

Coração

Neste orgão, no qual a actividade da catálase é extremamente baixa (Doroshow *et al.*, 1980) e onde não há provas de que uma glutationa-peroxídase não dependente do selénio está activa, esta última enzima pode desempenhar um papel mais importante que em outros tecidos. Isto pode explicar porque a cardiomiopatia é a manifestação principal da deficiência de selénio no homem (Fleming *et al.*, 1990).

Pulmão

No pulmão, a pressão parcial de oxigénio é alta (Freeman e Tanswell, 1985) e o conteúdo dos PUFAs do endotélio pulmonar é baixa. Contudo, a presença de macrófagos alveolares contribui para a amplificação do *stress* oxidativo através da libertação extracelular de superóxido (Taylor *et al.*, 1983). É interessante notar que a activação do complemento resulta na sequestração de leucócitos na vasculatura pulmonar (McCall *et al.*, 1974; Craddok *et al.*, 1977). De facto, o peptídeo quimiotáctico do complemento C_{5a} parece ser o mais importante factor de iniciação na lesão pulmonar de superóxido gerado pelos neutrófilos (Till e Ward, 1985).

Eritrócitos

Nos eritrócitos, a alta concentração de oxigénio e de hemoproteína facilita consideravelmente a iniciação da peroxidação lipídica. A anemia hemolítica ou a hemólise eritrocitária induzida por drogas, que normalmente envolve peroxidação lipídica, está muitas vezes associada com deficiência nutricional ou genética numa das enzimas relacionadas com a glutationa (Chiu *et al.*, 1992).

A SOD-Cu-Zn, a glutationa-peroxídase-selénio, a glutationa-redútase e a meta-hemoglobina-redútase garantem uma grande protecção e além disso o *turnover* celular minimiza o importante dano cumulativo.

Cérebro

Em contraste com os eritrócitos, o *turnover* celular está virtualmente ausente nos neurónios do sistema nervoso central, apesar do elevado conteúdo em PUFAs , nomeadamente o ácido araquidónico e o ácido docosano-hexanóico (Sastry, 1985). Assim, a peroxidação pode desempenhar um papel central em alguns aspectos do envelhecimento dos neurónios. O tipo de lesão oxidativa observada no sistema nervoso central está muitas vezes localizada em certos tipos celulares, devido ao seu conteúdo em sistemas activadores e protectores. Os danos oxidativos do cérebro a seguir à isquémia cerebral estão também muito localizados (Yoshida *et al.*, 1980). É interessante notar que nesta ligação os neurónios catecolaminérgicos têm os mais elevados níveis de citocromo P_{450}, monoamino-oxídase e de selénio.

1.8. Fontes de peroxidação dos PUFAs

A maior fonte de peróxidos de PUFAs nos anaeróbios é endógena, pois são continuamente gerados em grandes concentrações pelas cadeias respiratórias da membrana mitocondrial interna. Isto acontece uma vez que a membrana interna tem a mais baixa concentração de lipídeos (20%) de toda a célula, pelo que se torna muito resistente à peroxidação e à destruição de radicais livres.

A função da cadeia respiratória da membrana mitocondrial interna é reduzir oxigénio a água através de uma sequência de transferências de 4 electrões e 4 protões por molécula de oxigénio. Este processo enzimático é catalisado por um sistema enzimático de citocromos com ferro. Estes núcleos de ferro e outros metais de transição (zinco, cobre e manganésio) são essenciais para que se verifique transferência de um electrão a uma velocidade de reacção suficiente para manter o metabolismo e a vida em todos os aeróbios. Os superóxidos são destruídos eficazmente na mitocôndria pela SOD, a qual existe em altas concentrações na matriz (Nohl e Hegner, 1978). A primeira linha de defesa efectiva contra o peróxido de hidrogénio é a catálase da matriz. Contudo, não é eficiente, especialmente quando a mitocôndria está sob *stress* de oxigénio. O *stress* de oxigénio pode ser induzido por oxigénio hiperbárico ou por exercício vigoroso.

Noutras reacções nas quais o peróxido de hidrogénio é catalisado por metais de transição há a formação do mais potente e destruidor radical livre, o radical hidroxilo.

1.9. Radicais livres e peroxidação lipídica

Os radicais livres e espécies excitadas desempenham um papel importante quer nas funções fisiológicas normais quer na patogénese de certas doenças. Por exemplo, a formação de espécies activadas por células inflamatórias é o principal mecanismo microbicida e pode também mediar componentes importantes da resposta inflamatória. Processos activados podem também ser importantes na toxicidade de muitas drogas, no envelhecimento e na carcinogénese.

O aumento da actividade dos radicais livres (*stress* oxidativo) é devido quer ao aumento da produção de radicais livres quer a uma deficiência dos sistemas protectores antioxidantes.

Os radicais livres de oxigénio aparecem durante a vida aeróbica e, quando se formam perto dos fosfolipídeos da membrana (ricos em ácidos gordos poli-insaturados) provocam o desencadear da peroxidação lipídica que leva a lesão, apesar da modulação das vias peroxidativas por um sistema protector.

A alteração induzida por radicais livres nos tecidos pode ser consequência dos seguintes factores:
—Activação das células inflamatórias como os monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (isto resulta num *burst* respiratório e numa libertação de radicais livres e de peróxidos, quer intra quer extracelulares);
—Aumento da produção intracelular de radicais livres e/ou de peróxidos que pode ser devido a hiperoxia, hipoxia, reperfusão pós-isquémica, intoxicação com xenobióticos pró-oxidantes, ou deficiência em alguns sistemas protectores;
—Exposição a radiações ionizantes que também resulta em produção aumentada de radicais livres e peróxidos intra e extracelulares.

Inflamação

A inflamação é uma resposta localizada e protectora que serve para destruir, diluir ou separar os agentes invasor e o injuriado. As doenças caracterizadas por inflamação são uma causa importante de morbilidade e mortalidade no homem. Normalmente a inflamação aparece como resposta de defesa à invasão do hospedeiro por material estranho. No caso particular da gravidez, o feto e a mãe são dois indivíduos geneticamente distintos, sendo o feto um enxerto de tecido estranho na sua mãe. No entanto, o transplante é tolerado e a reacção de

rejeição que normalmente se produz quando tecidos estranhos são implantados não se verifica (Berge *et al.*, 1988). A razão para que o enxerto fetal não seja rejeitado pode ser atribuída a não ser expressa pelo trofoblasto a histocompatibilidade de antigénios em áreas onde contacta com o tecido materno.

A inflamação é o processo pelo qual os leucócitos e as moléculas do soro são direccionadas para as áreas de lesão no corpo humano. As reacções inflamatórias muitas vezes acontecem a seguir a lesões físicas e independentemente do sistema imune. Há três componentes principais numa reacção inflamatória:
—Aumento do fluxo sanguíneo para a área afectada;
—Simultaneamente, aumento da permeabilidade capilar na vasculatura local;
—Aumento da migração de células dos vasos sanguíneos para a área afectada.
Os dois primeiros factores levam a um aumento da passagem de grandes moléculas do soro para fora dos vasos, formando um exsudado rico em proteínas que contém leucócitos chamados ao local inflamatório por estímulos quimiotáticos.

É quase certo que as citoquinas (Kupferminc *et al.*, 1994) desempenham um papel importante na pós-implantação gravídica, dado a sua presença na decídua, à presença de receptores no trofoblasto e aos efeitos *in vivo* das citoquinas nos sistemas CBA-DBA/2 (Clark, 1989). De modo semelhante, os produtos da reacção imunológica contra antigénios do concepto podem exercer efeito protector contra o aborto no rato.

A acumulação e subsequente activação dos leucócitos são fenómenos importantes na patogénese da inflamação. Muitas formas de inflamação são amplificadas e propagadas como resultado da renovação de componentes humorais e celulares do sistema imune. Ao mesmo tempo que se verifica a desgranulação dos neutrófilos também se dá um aumento acentuado do consumo de oxigénio e do metabolismo respiratório com aumento da actividade do *shunt* da hexose-monofosfato e da produção de peróxido de hidrogénio e de aniões superóxido. Os neutrófilos libertam ainda tromboxanos que são vasoconstritores e factores de agregação plaquetária, leucotrienos (LTs) que aumentam a permeabilidade vascular e atraem mais neutrófilos para o local onde vão exercer o seu efeito anti-inflamatório.

Os processos inflamatórios são processos muito complexos que envolvem um elevado número de mediadores, incluindo não só o superóxido e hidroperóxidos de ácidos gordos, mas também as prostaglandinas, leucotrienos, ácidos gordos livres, albumina polipeptídeos e aminas. A peroxidação lipídica está sem dúvida associada com a maior parte das situações inflamatórias porque o superóxido, peróxido de hidrogénio e outras espécies oxidantes como o hipoclorito são libertadas na mesma altura que os PUFAs livres.

Através de muitos dos seus produtos quimiotácticos, o superóxido tem um efeito amplificador no processo inflamatório, o aumento intravascular de superóxido resulta em aumento da permeabilidade vascular, adesão das PMNLs ao endotélio e estimulação da agregação plaquetária. Tais processos inflamatórios são ubíquos na patologia, não só durante a infecção mas também nas chamadas doenças autoimunes e em problemas de transplantes cardíacos e renais. A SOD-Cu/Zn e alguns *scavengers* de radicais livres inibem estas reacções inflamatórias adversas.

Hipoxia, isquémia e reperfusão pós-isquémica

A hipoxia está associada com pressões parciais de oxigénio anormalmente baixas, e a isquémia que resulta de uma interrupção do fluxo sanguíneo tem consequências semelhantes (Hearse *et al.*, 1973; McCord, 1985):

—Desacopolamento de fosforilação oxidativa mitocondrial e aumento na percentagem dos produtos da redução parcial do oxigénio;

—Dentro de dois minutos seguintes à interrupção do fornecimento de oxigénio dá-se a activação da xantina-desidrogénase em xantina-oxídase (esta pode ser consequência de uma activação de protéiases extremamente rápida, consecutiva a alterações de pH e/ou da concentração de cálcio);

—Degradação de ATP a ADP, AMP e eventualmente a hipoxantina. Este último produto acumula-se no tecido.

Do mesmo modo, as células hipóxicas são muito sensíveis a xenobióticos, e a reperfusão pós-isquémica aumentará um *burst* da actividade da xantina-oxídase, convertendo toda a hipoxantina acumulada em xantina e depois em ácido úrico com produção estequiométrica intracelular de superóxido. Isto provoca um *stress* oxidativo agudo que resulta em necrose tecidual extensa.

O conceito de lesão tecidual pós-isquémica ajuda no paradoxo do oxigénio (Hearse *et al.*, 1978), e é um dos responsáveis pelo desenvolvimento do infarte do miocárdio, podendo também afectar outros tecidos.

No sistema nervoso central a situação é ligeiramente diferente, pois apesar de as purinas se acumularem durante a isquémia, a xantina-desidrogénase/oxídase está praticamente ausente do cérebro isquémico. Pensa-se que a barreira sanguínea cerebral que possui actividade xantina-desidrogénase/oxidase possa ser o local de lesão cerebral pós-isquémica de oclusão/perfusão da artéria cerebral. A isquémia cerebral resulta na estimulação da actividade da fosfolípase A_2 e da lipoxigénase quer no cérebro quer na microvasculatura cerebral. Além

disso, estes últimos tem a capacidade de capturar activamente as purinas que se acumulam no cérebro isquémico (Betz, 1985).

A Na,K-ATPase dos microvasos cerebrais é especificamente activada por concentrações micromolares de 15-HPETE, o principal metabolito do ácido araquidónico por acção da lipoxigénase, mas é fortemente inibida por baixas concentrações de hidroperóxidos de ácidos gordos ou por radicais livres de oxigénio.

A necrose pós-isquémica dos tecidos periféricos é evitada experimentalmente pela inclusão no meio de reperfusão de SOD e de alopurinol, um inibidor da xantina-oxídase. As lesões pós-isquémicas estão significativamente diminuídas em animais com depleção artificial de neutrófilos polimorfonucleares. A extensão da necrose pós-isquémica miocardial pode ser significativamente atenuada por inibição da activação do complemento. Isto isto apoia a hipótese de que as lesões oxidativas pós-isquémicas são amplificadas por uma resposta inflamatória e que o sistema de activação do complemento desempenha um papel importante neste processo. A marginação dos leucócitos e a sua subsequente infiltração é uma resposta à oclusão dos grandes vasos (Lo e Betz, 1986).

Hiperoxia

São bastante conhecidos os efeitos tóxicos da hiperoxia, especialmente no pulmão. Além disso, na mitocôndria isolada a produção de peróxido de hidrogénio e de anião superóxido aumentam linearmente com a pressão parcial de oxigénio (Jones, 1985). Este processo está associado com a inflamação e o número de leucócitos polimorfonucleares aumenta sustancialmente no pulmão hiperóxico.

1.10. *Stress* oxidativo e defesas antioxidantes

Os sistemas biológicos protegem-se a eles próprios contra os efeitos das espécies activadas de muitas maneiras. Isto inclui *scavengers* de radicais livres e terminadores de reacções em cadeia, enzimas como a SOD, a catálase e o sistema de glutationa-peroxídase e as defesas de estado sólido como as melaninas.

Os antioxidantes químicos doam um electrão a um radical livre e convertem-no numa forma não radical. Estes compostos redutores podem terminar reacções em cadeia e reduzir hidroperóxidos e epóxidos a derivados menos reactivos. Quando um antioxidante neutraliza um radical livre, forma-se o seu próprio radical livre. Muitos antioxidantes podem actuar

como pró-oxidantes reduzindo formas de oxigénio não reactivos aos seus derivados radicais. As propriedades pró-antioxidantes de um composto redutor são complexas, implicando o pH, derivados de radicais relativamente radioactivos, etc. O ácido úrico (antioxidante nos primatas superiores) participa na reacção de Fenton com peróxido, uma propriedade que pode ser importante na etiologia da gota (doença inflamatória).

Os aeróbios tem um eficiente sistema de protecção contra os peróxidos de PUFAs e outros percursores activos de oxigénio. Este sistema defensivo é composto por um equilíbrio entre enzimas desintoxificantes celulares, antioxidantes celulares e antioxidantes exógenos.

No quadro evolutivo, os aeróbios superiores possuem mecanismos mais sofisticados e linhas de defesa mais compartimentadas (Packer *et al.*, 1979). As linhas de defesa funcionam num balanço homeostático umas com as outras. Este balanço é composto de muitos pares redox acopolados, cujos mecanismos e relações *in vivo* são ainda mal compreendidos. Uma hipótese de pares redox é baseada em experiências *in vivo* usando dois pares de antioxidantes comunicando com NADH/NAD+ e pares de radicais PUFA:
—Um radical PUFA fica com um hidrogénio da vitamina E;
—A vitamina E é reduzida pela vitamina C e forma-se um radical de vitamina C;
—O radical de vitamina C pode ser novamente reduzido a vitamina C através da interacção com o NADH ou talvez através de outros fortes antioxidantes do soro ou do fluido celular. Devemos ainda referir que a vitamina C em altas concentrações actua como um pró-oxidante, perturbando o delicado balanço homeostático nos aeróbios (Lippman, 1989). Certamente que outros antioxidantes actuarão como pró-oxidantes quando aparecem em altas concentrações. Apesar das defesas antioxidantes, as células envelhecidas acumulam lesões peroxidativas (Dillard *et al.*, 1978).

O balanço entre *stress* oxidativo e defesas antioxidantes tem uma natureza muito dinâmica. Como resultado de uma alteração, esse balanço pode ser desfeito. Os antioxidantes têm uma natureza bifásica que depende não só das suas concentrações mas também das concentrações de oxigénio, o que os transforma de pró-oxidantes em antioxidantes e vice-versa.

Quando as acções pró-oxidantes dos antioxidantes dependem da estimulação de um ou de ambos os ciclos redox, é mais vulgar o domínio dos efeitos pró-oxidantes com baixas concentrações de antioxidantes. A supressão dos danos oxidantes verifica-se quando as concentrações locais de antioxidantes se tornam suficientemente altas para a eliminação dos radicais exceder o ciclo redox, pois a aceleração do ciclo tende a saturar as concentrações dos catalisadores metálicos ou de antioxidantes (e ocasionalmente de oxigénio), tornando-se limitantes nos locais de reacção. Exemplos típicos disto são os efeitos pró-oxidantes do ascorbato em baixas concentrações, que se transforma no esperado comportamento

antioxidante a concentrações mais elevadas na oxidação lipídica de homogeneizados de cérebro e das membranas lipossómicas e celulares (Mak e Weglicki, 1985). A variabilidade biológica dos sistemas teste pode ser suficiente para que os efeitos de uma dada concentração de ascorbato se torne imprevisível, algumas vezes enaltecendo e outras vezes inibindo (Weitberg e Weitzman, 1985). Mesmo quando o ascorbato isolado é mais tóxico do que protector dos danos oxidativos, pode ainda assim inibir as acções pró-oxidantes de outras substâncias, tais como os efeitos maléficos de algumas hormonas catecolaminas e da 6-hidroxidopamina nas cínases da creatina ou do adenilato do cérebro do rato, efeitos também inibidos pela glutationa (Maker *et al.*, 1986).

Quando o comportamento bifásico anti/pró-oxidante é feito pela alteração na concentração de oxigénio, o máximo de pró-oxidação acontece com baixas pressões de oxigénio, com a toxicidade diminuindo à medida que a concentração de oxigénio aumenta. Isto pode acontecer com a redução de metais livres, que danificam biomoléculas críticas, principalmente através da transferência directa de electrões ou por reacções de adição molecular. Em tais situações, os auto-oxidantes desintoxificam através da remoção de intermediários perigosos antes de eles poderem inactivar importantes moléculas alvo e esta via de detoxificação competirá com mais sucesso com reacções danificadoras à medida que a pressão de oxigénio aumenta.

Os radicais ascorbilo também são capazes de inactivar algumas enzimas por reacções directas (Maker *et al.*, 1986). Contudo, são radicais fracamente oxidantes que não se autoxidam rapidamente (Bielski, 1975); não é de esperar a inibição de reacções directas de radicais ascorbilo através do aumento da pressão de oxigénio a não ser que haja consumo simultâneo do ascorbato até ao esgotamento pelos ciclos redox.

Ocorre redução similar dos danos pró-oxidantes com o aumento da pressão de oxigénio quando a citotoxicidade deriva principalmente dos ciclos redox e dos radicais livres de oxigénio, especialmente se os redutores levam à formação de radicais hidroxilo através da regeneração do catalisador metálico reduzido que se autoxida com relativa rapidez. Pode haver inibição pela SOD nessas circunstâncias. Autoxidações rápidas e altas pressões de oxigénio levam a inibições da SOD mesmo quando o superóxido não é um participante da cadeia de reacções de radicais livres que causam danos.

Surpreendentemente, mesmo na ausência de SOD as condições aeróbicas podem originar uma redução paradoxal dos danos antioxidantes. Isto é devido a que a autoxidação compete com o redox ciclico de metais e serve para desintoxificar através da sua inibição. Por outro lado, algum oxigénio é necessário para produzir peróxido de hidrogénio através da dismutação do superóxido ou através da redução bielectrónica por uma oxídase apropriada,

não se verificando então danos antioxidantes em anaerobiose restrita, a menos que se forneça peróxido de hidrogénio exógeno (Winterbourn *et al.*, 1985).

1.11. Métodos de determinação da peroxidação lipídica

Existem várias técnicas para a detecção *in vitro* da peroxidação lipídica (Lippman, 1989):
—Por cromatografia através da perda de ácidos gordos poli-insaturados;
—Formação de dienos conjugados;
—Detecção directa do consumo de oxigénio;
—Detecção indirecta da presença de derivados de PUFA tais como o malonildialdeído, o qual origina produtos corados por reacção com o ácido tiobarbitúrico;
—Detecção indirecta por cromatografia gasosa do etano e pentano de derivados da peroxidação dos PUFA;
—Detecção através do ácido parinárico (molécula com um espectro de fluorescência muito característico);
—Por HPLC dos peróxidos lipídicos formados;
—Por quimioluminiscência

O teste do ácido tiobarbitúrico é o método mais vulgarmente utilizado, apesar de apresentar muitas desvantagens como a falta de reprodutilidade quantitativa entre diferentes investigadores e o facto de os derivados do malonildialdeído não revelarem concentrações dos percursores de peróxidos nem reflectirem a viabilidade das linhas celulares de defesa. O método da microscopia revela o produto final de todos os peróxidos de PUFAs, nomeadamente a lipofucsina. A cromatografia gasosa do etano e do propano permite a medida *in vivo* desses dois gases de degradação dos PUFAs. A espectroscopia de infravermelho permite medidas *in vivo* directas e não invasivas no homem e ainda a monitorização de efeitos farmacocinéticos de vários antioxidantes que se sabe terem capacidade de reduzir os níveis de peróxidos de PUFAs no soro e tecidos. Esta degradação pode ser retardada por terapia antioxidante ou talvez por substituição dos PUFAs comuns por mais resistentes radicais livres de lipídeos.

Os aeróbios superiores tem linhas de defesa mais sofisticadas contra radicais livres e peróxidos. O aumento da longevidade no homem pode ser conseguida por mais protecção ou substituição dos PUFAs celulares humanos. A peroxidação dos PUFAs é promovida por consumo de oxigénio (especialmente sob hiperoxia), dietas ricas em PUFAs, aumento da temperatura corporal, aumento da taxa metabólica, certas drogas indutoras de radicais livres e

por uma série de doenças. A peroxidação dos PUFAs é parcialmente inibida por suplementos antioxidantes na dieta, dietas ricas em ácidos gordos saturados, restrição de dieta e, a mais importante, a aquisição genética das linhas de defesa de um aeróbio.

Yagi (1976) e Ledwozyw *et al.* (1986) indicavam que a peroxidação lipídica não controlada podia contribuir para certas doenças através da rotura dos lipídeos da membrana e de outros componentes celulares. O processo destructivo de peroxidação lipídica pode contribuir para o desenvolvimento de uma série de anomalias, nomeadamente a nível cardiovascular na pré-eclampsia, incluindo a disfunção das células endoteliais.

Capítulo 2. Aspectos fisiopatológicos particulares da gravidez

2.1. Aparelho Circulatório

As alterações circulatórias que acompanham a gravidez começam no primeiro trimestre. Por volta das 20-24 semanas de gestação, o rendimento cardíaco em repouso está próximo do máximo, 30-40% acima dos valores da não grávida, valor que se mantém até cerca de 8 semanas antes do parto (Ueland *et al.*, 1969). O aumento do fluxo sanguíneo derivado do aumento do rendimento cardíaco distribui-se pelos diferentes orgãos e tecidos. No primeiro trimestre, o maior aumento verifica-se nos rins e no útero, atingindo o fluxo sanguíneo uterino cerca de 500 ml/min no final da gravidez. Os fluxos sanguíneo cerebral e hepático não são influenciados pela gravidez (Gibbs, 1981).

2.1.1. Fluxo sanguíneo regional

O sistema cardiovascular durante a gravidez é caracterizado por uma síndroma hipercinética. O desenvolvimento fetal precisa de oxigénio e outros nutrientes em quantidade

progressivamente maior no fluxo sanguíneo uteroplacentário. Este fluxo é a maior via de abastecimento através da qual o oxigénio materno e nutrientes atingem a placenta e finalmente o sangue fetal. No entanto, quando calculados por unidade de peso do útero grávido, o fluxo sanguíneo e o consumo de oxigénio mantém-se constantes. Do mesmo modo, o fluxo sanguíneo umbilical e o consumo de oxigénio fetal aumentam progressivamente com a gravidez e com o aumento do peso fetal; quando calculados por unidade de peso fetal não se verifica nenhuma alteração. O fluxo sanguíneo uterino aumenta durante a gestação de cerca de 15-20 ml/min na não grávida para 500-600 ml/min próximo do final da gravidez (Metcalfe *et al.*, 1955; Assali *et al.*, 1960). É possível separar o fluxo sanguíneo uterino em dois componentes distintos (Gibbs, 1981): o que irriga a porção muscular do útero e o que irriga a placenta. A musculatura uterina recebe 20% do fluxo sanguíneo uterino, enquanto a área placentária recebe 80%.

As artérias e as veias da mulher grávida sofrem vasodilatação em consequência do estado hipermetabólico do sistema cardiovascular e das acções das hormonas esteróides (Gibbs, 1981). As alterações do sistema cardiovascular tornam-se importantes e perigosas em doentes com doença cardiovascular pré-gravídica, dado que há um aumento do limiar circulatório e ainda em mulheres aparentemente normais por estimulação da doença cardíaca orgânica.

As alterações funcionais do sistema circulatório que constituem um estado de adaptação à existência de duas vidas conjuntas podem ser assim resumidas (Sullivan e Ramanathan,1985):

Índices cardiovasculares	Alterações
Resistência periférica global	Reduzida
Volume sanguíneo	Aumentado
Débito cardíaco	Aumentado
Volume/minuto	Aumentado
Frequência cardíaca	Aumentada
Pressão arterial	Reduzida
Resistência vascular pulmonar	Reduzida

Algumas destas alterações estão aparentemente relacionadas com a necessidade de expandir o fluxo sanguíneo uterino, mas as implicações das outras alterações são menos claras.

Do ponto de vista funcional, o aumento do limiar circulatório é bem tolerado por mulheres com um coração normal e também pela grande maioria de mulheres com doença cardíaca orgânica. Contudo, numa pequena proporção de mulheres com doença orgânica, a alteração da hemodinâmica característica da gravidez é responsável pelo aparecimento de complicações

que possivelmente não ocorreriam se a paciente não estivesse grávida. Na mesma altura podem desenvolver-se complicações cardíacas que não estão directamente relacionadas com o aumento do limiar circulatório.

A hemodinâmica e as alterações metabólicas são mais extensas que o necessário para cobrir as necessidades fetais (Kerr, 1968; Metcalfe e Ueland, 1974). Ueland *et al.* em 1969 e posteriormente Artal *et al.* em 1981 referem que o estado gravídico modifica a resposta hemodinâmica ao exercício, pois o débito cardíaco e a taxa cardíaca apresentam uma maior subida após o exercício leve durante a gravidez. Também o exercício moderado induz um maior aumento no consumo de oxigénio na gravidez (Hytten e Leitch, 1971).

Tentou-se ainda quantificar alterações do fluxo sanguíneo da pele e outras regiões (Ginsburg e Duncan, 1967; Tindall e Beazley, 1965; Tindall, 1975). Para a pele foi considerado um aumento de fluxo de cerca de 500 ml/min, na glândula mamária o fluxo não foi quantificado em humanos mas foi considerado significativo julgando pelas alterações no tamanho das glândulas e das veias dilatadas na superfície do peito. Às alterações hemodinâmicas da gravidez sobrepõem-se ainda as do parto, e vão desaparecendo lentamente no puerpério. Foi verificado que o maior aumento no rendimento cardíaco materno dura menos de uma hora a seguir ao parto (Ueland e Metcalfe, 1975).

2.1.2. Volume sanguíneo

O volume sanguíneo total aumenta cerca de 40% durante a gravidez, havendo uma variação individual considerável (Walters *et al.*, 1966; Hytten e Leitch, 1971; Walters e Lim, 1975 Metcalfe *et al.*, 1981;). A expansão do volume sanguíneo envolve um aumento no volume plasmático menos acentuado que no volume globular, de modo a reflectir-se no hematócrito e na taxa de hemoglobina, diminuindo as suas concentrações, dando origem à denominada "anemia fisiológica". O hematócrito cai em concordância com a hemoglobina, alcançando um valor mínimo normal de 31% (valor não-gravídico 40-42%) com melhoria no termo. Em mulheres normais, a concentração mínima de hemoglobina é de 11-12 g/dl. A queda aparente nos primeiros três meses atinge os níveis mais baixos cerca das 34 semanas, quando o valor normal reduzido chega a 11 g/dl, com ligeira diferença nas últimas semanas. As modificações eventuais do hematócrito e da hemoglobina no final devem-se ao aumento do volume globular, progressivo até ao termo, ao contrário do volume plasmático que se estabiliza por volta das 34 semanas. Estas alterações retornam aos valores pré-gravídicos 6-8 semanas pós-parto. Esta situação pode ser corrigida com ferro e ácido fólico, se não mesmo evitada, de modo a assegurar uma adequada capacidade de transporte de oxigénio ao sangue materno.

Volume plasmático

O volume plasmático sobe, em média 50%, no decurso da gravidez. O acréscimo tem início às 6 semanas, alcançando o máximo por volta das 32-34 semanas (Martin, 1980). Pensava-se que esta hipervolemia era constante até ao termo. Depois verificou-se um aumento do débito cardíaco nas últimas semanas, o que originava um declínio de volume (Hytten e Thomson, 1968) ou um planalto nas últimas 8 semanas (Pirani *et al.*, 1973). Chesley em 1972 justificou esta diminuição no volume plasmático como originada por um derivado causado pela compressão da veia cava pelo útero, continuando o volume plasmático a aumentar até ao final da gravidez.

Imediatamente a seguir ao parto, o volume de plasma pode mostrar uma diminuição dependendo da quantidade da perda sanguínea (cerca de 600 ml nos casos de parto normal e de 1000 ml nas cesarianas), pensando-se que a hipervolemia da gravidez actua como reserva (Pritchard *et al.*, 1960; Ueland e Metcalfe, 1975). Então, aumenta novamente à medida que o sangue é enviado do útero para a circulação geral. Uma quantidade variável de fluido retido nos tecidos durante a gravidez é também reabsorvido após o parto. O valor pré-gravídico de volume plasmático é atingido em regra algumas semanas após o parto.

A expansão de volume plasmático foi medida por vários autores usando a técnica da diluição com azul de Evans (T-1824)ou com albumina radioactiva (Chesley, 1972). Dadas as consideráveis diferenças individuais no volume plasmático, poucos autores valorizam esta determinação (Thomson *et al.*, 1938; Roscoe e Donaldson, 1946; McLenan e Thouin, 1948; Paintin, 1962; Hytten e Paintin, 1963; Brody e Spetz, 1967). Como valores de não grávidas foram referidos de 2265 a 2908 ml com uma média de 2564 ml. Os valores nas grávidas variam entre 3309 ml e 4245 ml com uma média de 3662 ml. Estas diferenças nas médias entre não grávidas e grávidas indicam um aumento nestas de 43%. A expansão de volume plasmático requer retenção de fluido e expansão do *pool* de proteína circulante, principalmente albumina. Esta concentração de proteínas plasmáticas deve ser mantida para regular a pressão oncótica dentro de valores normais. O aumento das proteínas circulantes é de cerca de 20% em relação às não grávidas e proporcionalmente menor que a retenção de fluido e electrólitos. Como resultado, a pressão oncótica coloidal baixa (Robertson, 1969). Não se conhece a razão para a aparente falta de resposta do fígado à baixa pressão osmótica da gravidez. Mais, noutras situações o fígado responde com um aumento da produção da albumina (Peters, 1975). No entanto, durante a gravidez o *turnover* da albumina mantém-se inalterado (Honger, 1968). O pequeno aumento no *pool* circulante será conseguido por uma saída de albumina intersticial para o sistema intravascular (Honger, 1968).

Os mecanismos responsáveis pela retenção adicional de fluido durante a gravidez são só parcialmente compreendidos (Nolten e Erlich, 1980). A retenção de fluido requer um balanço positivo de sódio, normalmente conseguido por um aumento da reabsorção de sódio nos túbulos renais. O aumento da absorção de água e sódio durante a gravidez foi descrito, e seria fundamental para as alterações renais (Parry *et al.*, 1970).

Alguns autores referem uma queda terminal de volume plasmático, atribuída à posição da grávida quando se efectua a determinação do volume. Na posição supina, o útero volumoso obstrui o retorno venoso dos membros inferiores resultando numa incompleta homogeneização do corante (Chesley e Duffus, 1971). Alguns autores (Hytten e Leitch, 1971; Pirani *et al.*, 1973) descrevem uma relação entre volume plasmático por um lado e peso do recém-nascido ou sucesso clínico por outro. Na gravidez múltipla a mulher tem um volume maior (cerca de 1940 ml superior ao grupo de controlo) (Rovinsky e Jaffin, 1965; Fullerton *et al.*, 1965; Gibson, 1973).

Em conclusão, mulheres saudáveis e grávidas do primeiro filho têm o seu volume plasmático aumentado para cerca de 2600 ml, enquanto nas não grávidas esse volume corresponde a 1250 ml. A maior parte desta variação verifica-se entre as 32 e as 34 semanas, seguida de uma estabilização do volume. Em gravidezes seguintes esse aumento é maior, estando relacionado com o tamanho do feto e com a paridade (Hytten e Leitch, 1971; Pirani *et al.*, 1973). É necessário lembrar que a elevação de volume plasmático atribuída a alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona acompanha os níveis sanguíneos aumentados de progesterona e estrógenios durante a gravidez normal, o mesmo não se verificando nos casos de pré-eclampsia (Fagundes *et al.*, 1992).

Volume globular

Não se conhece muito bem qual a percentagem do aumento da massa de eritrócitos durante a gravidez. O aumento é influenciado pela medicação com ferro. Se considerarmos que o volume dos eritrócitos é de 1400 ml antes da gravidez, a média de aumento durante a gravidez é de cerca de 18% (240 ml) em mulheres que não tomam suplemento de ferro e de cerca de 30% (400 ml) quando durante a gravidez se faz medicação com ferro. O aumento é maior nos 2º e 3º trimestres. Como o aumento de volume depende do tamanho do feto, verificam-se aumentos particularmente grandes em gravidezes múltiplas. A massa de eritrócitos diminui rapidamente após o parto como resultado da perda sanguínea (Leeuw *et al.*, 1966). Os valores das não grávidas só se atingem cerca de 3 semanas após o parto (Chesley, 1972).

Hemoglobina total, hematócrito e número de eritrócitos

A concentração de hemoglobina, o hematócrito e o número de eritrócitos diminuem durante a gravidez devido a ser maior a expansão do volume plasmático que o da massa de eritrócitos. Paradoxalmente verifica-se um aumento na hemoglobina circulante total directamente relacionado com o aumento da massa de eritrócitos.

O quantidade mínima de hemoglobina na mulher não grávida é de cerca de 12.0 g/dl (Leeuw *et al.*, 1966). O mínimo aceite pela O.M.S. é de 11.0 g/dl.

Anemia

Algumas grávidas com pré-eclampsia grave tem uma anemia hemolítica microangiopática (Pritchard *et al.*, 1954; Pritchard e Adams, 1960), mas não se sabe se o aumento do *turnover* dos eritrócitos ocorre nas formas mais suaves deste síndroma. A sobrevivência dos eritrócitos nas grávidas é dificil de estudar. Apesar de dados de *turnover* de isótopos serem efectuados no terceiro trimestre da gravidez normal (Pritchard *et al.*, 1954), restrições éticas proibem o uso de marcadores radioactivos ou a infusão de células alogénicas com marcadores imunológicos nas grávidas. Mesmo os métodos que utilizam isótopos estáveis, como o ^{50}Cr, com activação de neutrões, são limitados pela natureza aguda e dinâmica da sindroma, com o parto e a sua perda sanguínea e a resolução da sindroma que ocorre num curto espaço de tempo. Inicialmente, Entman *et al.* (1987) postularam que elevações agudas da concentração de ferro no soro intra-parto (70 a 600%) reflectem aumento do metabolismo do heme, secundário ao aumento do *turnover* dos eritrócitos na maioria (83%) das pacientes com pré-eclampsia (Entman *et al.*, 1982a e b; Entman e Richardson, 1983).

Dado que o heme origina partes equimoleculares de bilirrubina, ferro, e monóxido de carbono, um concomitante aumento na concentração sanguínea destes parâmetros ajudaria a confirmar o aumento do catabolismo do heme (Sjostrand, 1949; Engel, 1971). As implicações desta descoberta são importantes porque um aumento acentuado na produção endógena de monóxido de carbono pode alterar a oxigenação materna ou fetal e compromete a saúde fetal nesta síndroma. Se na grávida normal uma anemia fisiológica é normal devido à hemodiluição, na grávida hipertensa com proteinúria pode aparecer anemia hemolítica microangiopática (Pritchard *et al.*, 1954), com aumento da destruição dos eritrócitos maternos (Entman *et al.*, 1987).

2.1.3. Rendimento cardíaco

Sobe cerca de 30% a 40% (de 4,5-5 para 6,5-7 l/min, em média). A elevação ocorre até por volta das 10-12 semanas, mantendo-se aumentado o rendimento cardíaco durante o 2º trimestre e no ínicio do 3º trimestre. Quando a grávida se coloca em decúbito dorsal, o útero comprime a veia cava inferior, interferindo com o retorno venoso do coração e em consequência reduz-se o rendimento cardíaco (Kerr, 1965). Então torna-se importante a postura da paciente. Pyorala (1966) e Lees *et al.* (1967) demonstraram que o rendimento cardíaco elevado se mantém até ao final da gravidez se a grávida se mantém em decúbito lateral. O aumento no rendimento cardíaco é o resultado do aumento da frequência cardíaca e do volume sistólico. Enquanto no início da gravidez predomina o volume sistólico, no final predomina a frequência cardíaca.

2.1.4. Pressão sanguínea arterial

Mantendo-se a grávida em posição supina, a pressão sistólica sofre uma descida muito ligeira (3-5 mm Hg) e a pressão diastólica uma descida muito significativa (5-15 mm Hg). Os valores mais baixos são obtidos no 2º trimestre, com aumento em direcção aos valores pré-gravídicos nos últimos meses. A pressão arterial na posição supina é menor do que em decúbito lateral, especialmente no final da gravidez.

Num grande número de grávidas normais verifica-se uma ligeira descida nas pressões diastólicas e sistólicas, a qual é mais acentuada no meio da gravidez. A pressão sistólica aumenta durante o parto em cada contracção uterina, o que em conjunto com o aumento do volume tende a aumentar o trabalho do ventrículo esquerdo. A pressão sanguínea pode variar na grávida com a postura, podendo ser influenciada pela terapia (agentes hipotensivos, anestesia epidural). Hovinga *et al.* (1978) estudaram a pressão sanguínea intra-arterial em mulheres com toxemia grave e verificaram que os efeitos da postura não eram constantes, verificando-se as maiores flutuações quando havia alterações ambientais. Deve medir-se a pressão arterial seriadamente, numa postura constante, pois pequenas flutuações na mulher grávida podem ser enganadoras.

A hipertensão induzida pela gravidez com proteinúria é a principal causa de morbilidade e mortalidade pré-natal e materna (Sibai *et al.*, 1982; Rubin *et al.*, 1969; HMSO: Report on Confidential Enquiries, 1973-1975), atingindo cerca de 5 a 10 % da população grávida. Esta alteração tem uma etiogenia ainda desconhecida, o que dificulta o trabalho dos clínicos no que respeita ao diagnóstico, prevenção e terapêutica. Vários são os factores que influenciam a terapêutica sendo o modo de medição da pressão arterial um dos pontos mais importantes. Vamos então referir os critérios clínicos da classificação da hipertensão durante a gravidez.

2.1.5 Diagnóstico da hipertensão induzida pela gravidez

O diagnóstico da pré-eclampsia e a gravidade da doença são geralmente baseadas na medição da pressão sanguínea materna efectuada por pessoal clínico especializado, devendo os critérios de medição da pressão sanguínea ser perfeitamente definidos, sendo influenciada pelos seguintes parâmetros: equipamento utilizado, valor do *cut off*, duração do período de descanso anterior ao registo, postura da paciente, posição do braço, e fase do Korotkoff utilizada (IV ou V) para a medição da pressão sanguínea diastólica (Wichman *et al.*, 1984; Aberg 1992). Ambas as pressões sistólica e diastólica são influenciadas pela postura materna e pela posição do braço durante a medição da pressão (Gallery *et al.*, 1977; Redman *et al.*, 1977; Wichman *et al.*, 1984; Webster *et al.*, 1984).

O aumento anormal da pressão sanguínea (sem proteinúria) é o critério usado para o diagnóstico da hipertensão induzida pela gravidez. O diagnóstico é problemático em grávidas cuja história clínica anterior à gravidez não é conhecida ou em mulheres que recorrem ao obstetra numa fase tardia da gravidez. A variação da pressão sanguínea no início do segundo trimestre não é idêntica em todas as mulheres, pelo que o desconhecimento da história clínica pode levar a diagnósticos errados por parte do obstetra (Chesley e Annito, 1968).

Diagnostica-se pré-eclampsia severa quando uma ou mais das seguintes situações se verifica:
—Pressão sanguínea de pelo menos 160 mm Hg sistólicos ou 110 mmHg diastólicos em duas medições separadas de 6 horas;
—Proteínúria superior a 5 g por 24 horas;
—Oligúria inferior a 400 ml por 24 horas;
—Distúrbios cerebrais ou visuais;
—Edema pulmonar;
—Síndroma de HELLP

Hovinga *et al.* analisaram em 1978 a pressão sanguínea intra-arterial em mulheres com toxemia grave e descobriram que os efeitos das alterações da postura não eram constantes e que as maiores flutuações podiam ocorrer mudando o ambiente. Deve-se, no entanto, medir a pressão sanguínea seriadamente numa postura constante, pois pequenas flutuações numa grávida podem ser enganadoras. Hipertensão grave e pré-eclampsia são complicações comuns da gravidez e são causas comuns de mortalidade perinatal e materna. A mortalidade perinatal resulta de morte intra-uterina, atraso de crescimento intra-uterino, placenta abruptio e prematuridade causada por intervenção obstétrica. A mortalidade materna resulta de deficiência cardíaca, hepática ou renal, acidente cerebrovascular ou eclampsia.

Os objectivos do tratamento são:

—Proteger a mãe dos efeitos da pressão sanguínea elevada (especialmente hemorragia cerebral) e evitar a ocorrência de espasmos eclâmpticos e outras complicações;

—Aumentar o fluxo sanguíneo uteroplacentar para minimizar os riscos de placenta abruptio, atraso de crescimento intra-uterino e morte intra-uterina, para controlar a pressão sanguínea e manter o fluxo sanguíneo uteroplacentar até o feto estar maduro e ser seguramente removido;

—Retirar o feto do modo mais seguro e expedito ou, se o feto estiver imaturo, decidir se os riscos de prematuridade e parto são compensados pelos riscos para o feto e para a mãe no caso de prolongamento de gravidez.

2.1.6. Classificação das doenças hipertensivas da gravidez, definição de hipertensão grave, pré-eclampsia e eclampsia

As doenças hipertensivas da gravidez são um grupo limitado de condições que são caracterizadas por hipertensão mas que têm diferentes etiologias e patologias (Quadros I e II). A classificação mais seguida é a de Chesley e Sloam (1964). Deve notar-se o seguinte:

—A hipertensão desenvolvida durante a gravidez, com proteinúria (hipertensão gestacional), é muitas vezes uma manifestação de hipertensão essencial latente que é temporariamente desmascarada pela gravidez;

—O desenvolvimento de proteinúria numa grávida hipertensa é provavelmente devido a uma verdadeira pré-eclampsia e está associado a um aumento de 3-4 vezes da mortalidade perinatal;

—O tratamento da hipertensão na gravidez é geralmente determinado pela condição clínica da paciente sem atender à causa responsável.

QUADRO I. Classificação clínica de doenças hipertensivas e proteinúricas da gravidez

Hipertensão induzida pela gravidez (ou proteinúria): Hipertensão e/ou proteinúria desenvolvida durante a gravidez numa mulher normotensa e não proteinúrica:

- Hipertensão gestacional (hipertensão sem proteinúria)
- Proteinúria gestacional (proteinúria sem hipertensão)
- Pré-eclampsia (hipertensão com proteinúria)

Hipertensão crónica ou doença renal crónica. Hipertensão e/ou proteinúria em mulheres com hipertensão crónica ou doença renal crónica prévia que se prolonga durante a gravidez.

- Hipertensão essencial (normalmente sem proteinúria)
- Doença renal crónica (normalmente com proteinúria e com ou sem hipertensão)
- Outras doenças hipertensivas conhecidas (coartação da aorta, feocromocitoma, lupus eritmatoso sistémico, etc.)

Hipertensão transitória periparto (ou proteinúria).

- Hipertensão e proteinúria ocorrendo isoladamente pela primeira vez durante o parto ou no início do puerpério, desaparecendo no período de 48 horas pós-parto. A hipertensão e proteinúria ocorrendo em conjunto no parto ou puerpério no período de 48 horas após o parto deve ser classificada como pré-eclampsia.

Pré-eclampsia sobreposta

- Proteinúria aparecendo numa mulher com com hipertensão essencial, gestacional ou tardia na gravidez.

Eclampsia sobreposta

- Um espasmo eclâmptico ocorrendo numa mulher com qualquer forma de hipertensão e /ou proteinúria na gravidez.

Eclampsia não classificada (ou proteinúria)

- Hipertensão e/ou proteinúria descoberta numa mulher com informação insuficiente para permitir classificação
- Hipertensão tardia —hipertensão (sem proteinúria) observada na primeira consulta realizada a partir das 20 semanas de gestação
- Proteinúria tardia —proteinúria (sem hipertensão) observada na primeira consulta realizada a partir das 20 semanas de gestação
- Pré-eclampsia tardia —hipertensão e proteinúria observada na primeira consulta realizada a partir das 20 semanas de gestação
- Outras doenças hipertensivas ou proteinúricas.

Quadro II. Definição de hipertensão grave, pré-eclampsia e eclampsia

Pressão diastólica (DBP) igual ou superior a 120 mmHg ou

DBP igual ou superior a 110 mm Hg em duas medições consecutivas com um intervalo mínimo de 6 horas ou

DBP igual ou superior a 90 mm Hg associada a uma ou mais das seguintes alterações:

- Proteinúria de 3 g ou mais por 24 horas (3+ ou 4+ no teste semiquantitativo)
- Oligúria inferior a 500 ml/24 horas (ou 20 ml/hora)
- Eclampsia iminente, dor de cabeça forte, sintomas visuais, dor epigástrica
- Espasmo eclâmptico
- Desenvolvimento rápido de edema generalizado

Os termos hipertensão induzida pela gravidez ou pré-eclampsia são usados para descrever uma condição peculiar à gravidez cuja manifestação pode ser sómente uma elevação mínima da pressão sanguínea. A hipertensão é o ponto principal para o diagnóstico da pré-eclampsia, sendo diagnosticada em mulheres grávidas com idade gestacional igual ou superior a 20 semanas, com pressão arterial superior a 140/90 mm Hg e proteinúria igual ou superior a 1+(300 mg/24 horas).

Os termos hipertensão induzida pela gravidez ou pré-eclampsia são usados para descrever uma condição peculiar à gravidez cuja manifestação pode ser somente uma elevação mínima da pressão sanguínea. A hipertensão é o ponto principal para o diagnóstico da pré-eclampsia, sendo diagnosticada em mulheres grávidas com idade gestacional igual ou superior a 20 semanas, com pressão arterial superior a 140/90 mm Hg e proteinúria igual ou superior a 1+(300 mg/24 horas).

2.1.7. Volume sanguíneo e pré-eclampsia

Grávidas com pré-eclampsia têm pequenos volumes plasmáticos (Chesley, 1972). Esta observação foi inicialmente feita com base na determinação do hematócrito e posteriormente confirmada pela medição do volume de distribuição do corante azul de Evans (Hytten e Paintin, 1963; Chesley e Duffus, 1971; Hays *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1989). Sabe-se ainda que esta redução está relacionada com a severidade da hipertensão (Assali e Vaughn, 1977). A vasoconstrição provoca um aumento da libertação de plasma do espaço intravascular para o espaço extravascular. Nos casos de pré-eclampsia grave, o volume sanguíneo está 30 a 40% abaixo dos valores normais.

De qualquer modo está demonstrado que um baixo volume plasmático está associado com bébés pequenos para a idade gestacional em mulheres com pré-eclampsia (Soffronoff *et al.*, 1977). Wallenburg *et al.* (1986) demonstram que a redução de volume leva a uma menor perfusão da placenta e rins. A hipovolemia associada à pré-eclampsia pode ser a causa da diminuição da perfusão aos orgãos e tecidos, provocando uma situação materna idêntica ao choque circulatório (Cloeren *et al.*, 1973). Esta redução de volume cria nas pré-eclâmpticas

um aumento da viscosidade média do sangue, um aumento do hematócrito, um aumento do fibrinogénio do plasma e uma menor deformabilidade do glóbulo rubro (Buchan, 1982). Todos estes factores contribuem para um aumento da resistência periférica, aumento da pressão sanguínea e redução do fluxo sanguíneo à mãe e ao feto.

O volume plasmático é inferior na gravidez afectada por pré-eclampsia do que na gravidez normal (Fievet *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1992). Este volume plasmático reduzido já se verifica no 2º trimestre e precede o aumento da pressão sanguínea (Fadnes e Oian, 1989; Huisman e Aarnoudse, 1986). A causa principal é a perda de fluido plasmático para o fluido extracelular (Brown *et al.*, 1992). Contudo, o volume de fluido extracelular total é normal durante a pré-eclampsia, havendo uma redistribuição do fluido devido ao aumento da permeabilidade capilar e/ou à reduzida pressão osmótica coloidal (Fadnes e Oian, 1989; Zinaman *et al.*, 1985).

2.1.8. Hemostase

A hemostase depende da vasculatura normal, das plaquetas, dos factores de coagulação e da fibrinólise. Todos estes factores actuam em conjunto para transportar o sangue circulante ao leito vascular e para parar a hemorragia após um trauma. As alterações no sistema de coagulação na gravidez normal são consistentes com um processo continuado de actividade coagulante. A gravidez normal é acompanhada por grandes alterações nos sistemas de coagulação e fibrinolíticos. Há um aumento em alguns factores de coagulação e a fibrinólise está reduzida. A maior parte dos factores de coagulação (fibrinogénio, factor VII, VIII, IX e X) estão aumentados, provocando um aumento dos complexos soluveis de fibrina. Estas alterações associadas com o aumento de volume sanguíneo, ajudam a combater as hemorragias durante a separação placentária e na contracção do miométrio que reduz o fluxo sanguíneo ao local placentário. A contracção do miométrio desempenha um papel vital na homeostase reduzindo o afluxo de sangue ao local placentário. O fecho rápido da parte terminal da artéria espiralada será facilitada pelas alterações estruturais nas suas paredes. O local placentário é rapidamente coberto por um penso de fibrina a seguir ao parto. O aumento dos níveis de fibrinogénio e de outros factores de coagulação será vantajoso na súbita necessidade de factores hemostáticos durante a separação placentária.

A deposição de fibrina pode ser demonstrada nos espaços intervilosos da placenta e nas paredes das artérias espiraladas que abastecem a placenta (Sheppard e Bonnard, 1976, 1981). À medida que a gravidez evolui, a lâmina elástica e o músculo liso destas artérias espiraladas são substituídas por uma matriz contendo fibrina. Isto permite a expansão do lúmen para acomodar um aumento de fluxo sanguíneo e reduzir a pressão no sangue arterial que atinge a placenta. Na separação placentária nos casos de parto normal, tem de ser atingido em poucos segundos um fluxo sanguíneo de 500 a 800 ml por minuto ou aparecerá

uma hemorragia grave. A separação placentária também produz um estado vulnerável de coagulação intravascular e muitas outras variações, incluindo coagulação em outras complicações da gravidez: tromboembolismo e sangramento devido à coagulação intravascular disseminada.

2.1.9. Coagulação e pré-eclampsia

A coagulação intravascular disseminada (CID) é caracterizada por vários graus de trombocitopenia, prolongamento do tempo de trombina, níveis elevados dos produtos da degradação da fibrina no soro, monómero da fibrina no plasma e hipofibrinogenemia. Por vezes, a CID é acompanhada de hemólise microangiopática com deformações nos eritrócitos circulantes e evidências de hemólise aguda incluindo reticulocitose, bilirrubina indirecta aumentada, eritrócitos nucleados no sangue periférico e em alguns casos hemoglobinémia e hemoglobinúria acentuada. O trauma para os eritrócitos que leva à sua deformação e destruição tem sido atribuído aos cordões de fibrina que se formam intravascularmente (Pritchard *et al.*, 1976). Um espectro similar de anomalias hematológicas foi observado em alguns casos de pré-eclampsia e mais comumente na eclampsia (Pritchard *et al.*, 1954). Além disso, a fibrina depositada intravascularmente foi descrita em casos fatais (McKay *et al.*, 1953). Não é surpreendente que a CID esteja para alguns autores implicada na patogénese da pré-eclampsia (Henderson *et al.*, 1970; Bonnar *et al.*, 1971; Page, 1972). Uma teoria mais recente, verifica que a tromboplastina de origem placentária invade a circulação materna a várias velocidades para produzir quer CID lenta quer CID rápida e alterações patofisiológicas da pré-eclampsia (Page, 1972).

2.2. O endotélio

2.2.1. Células endoteliais

Yanagisawa *et al.* (1988) tentaram avaliar os efeitos vasoconstrictores do plasma através da determinação da endotelina, sendo posteriormente confirmado que a concentração deste vasoconstritor está elevada nos casos de pré-eclampsia (Florijin *et al.*,1991; Gao, 1993; Hu, 1993; MacMahon *et al.*, 1993; Barden *et al.*, 1994; Metz *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). No entanto, Benigni *et al.* (1992) referem a acção da endotelina como a de unicamente limitar os efeitos negativos de outros factores vasoactivos na circulação renal. Outros autores (Kilby *et al.*, 1992) referem o papel do cálcio como responsável por tal fenómeno e ainda a sua função de mediador da acção da angiotensina II, sendo Olofsson *et al.* (1992) tentados a utilizar o magnésio como antagonista das acções do cálcio.

A mais óbvia função do endotélio é a separação mecânica dos produtos do sangue do colagéneo e músculo liso da parede vascular (Jaffe *et al.*, 1973). Esta interface entre compartimentos intra e extravasculares deve simultaneamente permitir o transporte de nutrientes, produtos gastos, moléculas reguladoras e células fagocíticas através das membranas celulares basais. Para facilitar todas estas funções de maneira regulada requerem-se funções metabólicas e secretórias sofisticadas (Jaffe et *al.*, 1973). Muitas destas actividades são especialmente relevantes para a fisiopatologia da pré-eclampsia. Normalmente, a superfície vascular endotelial resiste à agregação plaquetária e coagulação. Um processo pelo qual isto é conseguido é pela via da activação celular endotelial dependente da proteína C, um anticoagulante circulante muito potente. A proteína C é um regulador da coagulação dependente da vitamina K, sendo a sua actividade no plasma regulada em parte por dois inibidores: o inibidor da proteína C e a antitripsina α_1 (Connell e Connell, 1971). A importância desta actividade é indicada pela frequente ocorrência de tromboembolismo em pessoas geneticamente deficientes neste factor. Além disso, a aderência plaquetária à superfície celular endotelial é contrariada por outros produtos celulares endoteliais, incluindo a prostaciclina.

As células endoteliais normais modificam as respostas contrácteis do músculo liso vascular subjacente. Vanhoutte *et al.* (1986) foram os primeiros a demonstrar que a remoção do endotélio vascular inverte a resposta das faixas aórticas à acetilcolina do relaxamento à contracção. Modificações semelhantes das respostas vasculares foram referidas para numerosos agonistas em diferentes vasos. A rotura do endotélio vascular elimina a fonte do potente vasodilatador prostaciclina e de outros agentes menos caracterizados. Isto inclui agentes que levam ao relaxamento da musculatura vascular lisa, factor endotelial de relaxamento, e outros que aumentam o vasoespasmo, o factor endotelial de vasospasmo. Outro potente constritor da musculatura vascular lisa, a endotelina, foi identificada em culturas de endotélio vascular. Actualmente ainda não é conhecido se a produção é efectuada *in vivo* por endotélios normais ou danificados (Yanagisawa *et al.*, 1988).

2.2.2. Função Normal

Integridade Vascular

Embora não se saiba como se mantém a integridade vascular, conhece-se no entanto o papel das plaquetas neste fenómeno. Quando o número de plaquetas está reduzido ou a função plaquetária está alterada, aumentam as hemorragias capilares espontâneas. As plaquetas em indivíduos saudáveis estão constantemente a reparar defeitos da vasculatura, a formar coágulos de fibrina e, através da fibrinólise, a eliminar a fibrina não necessária. O contacto das plaquetas com o endotélio vascular saudável não é um estímulo para a formação de trombos dada a formação de prostaciclina (PGI_2) da parede dos vasos. O PGI_2 é um potente

vasodilatador e potente inibidor da agregação plaquetária. Moncada e Vane (1979) propuseram a existência de um equilíbrio entre a produção de PGI_2 pela parede dos vasos e a produção de um vasoconstrictor e poderoso agente agregante pelas plaquetas, o tromboxano (Goeschen *et al.*, 1993). Este aumento de libertação de tromboxano provocaria agregação plaquetária, activação e desgranulação (Maki *et al.*, 1988 e 1993; Di Renzo *et al.*, 1993).

A produção de prostaciclina está reduzida nos tecidos fetal e placentário das pré-eclâmpticas. A função da prostaciclina na patogénese da doença continua em estudo (Lewis *et al.*, 1980). Há muitos estudos publicados acerca do número de plaquetas ao longo da gravidez. O problema maior está na distinção entre gravidez normal e pré-eclampsia. Não há diferença significativa na gravidez normal sem complicações (Fenton *et al.*, 1977; Rodrigues e Smith, 1994), mas na gravidez com atraso de crescimento intrauterino foi verificada uma diminuição no número de plaquetas (Redman *et al.*, 1978). Não há provas de alteração da função plaquetária (Shapes *et al.*, 1968) nem diferenças no tempo de semivida plaquetária (Rakoczi *et al.*, 1979) entre não grávidas e grávidas, estando o tempo de semivida diminuído nas grávidas com pré-eclampsia (Giles e Inglis, 1981; Leduc *et al.*, 1992).

O resultado final da coagulação do sangue é a formação de um coágulo insolúvel de fibrina do percursor solúvel de fibrinogénio do plasma. Isto envolve uma complexa interacção dos factores de coagulação e a activação sequencial de uma série de proenzimas denominada por cascata de coagulação. A actividade fibrinolítica é uma parte essencial do mecanismo hemostático de interacção dinâmica e está dependente do activador de plasminogénio no sangue. A fibrina e o fibrinogénio são digeridos pela plasmina, pró-enzima derivada do percursor plasmático inactivo —plasminogénio. Após o exercício físico, *stress* emocional, operações cirúrgicas e outros traumas, aparecem no plasma quantidades elevadas de activador.

Podem ser extraídos activadores de tecidos de muitos orgãos com excepção da placenta. Tecidos particularmentre ricos em activadores incluem o útero, ovários, coração, pulmões, tiróide, glândulas suprarrenais e nódulos linfáticos. A sua actividade nos tecidos está localizada principalmente próximo dos vasos sanguíneos, mostrando as veias maior actividade que as artérias. A oclusão venosa dos membros estimulará a actividade fibrinolítica. As plaquetas, o plasma e o soro exercem uma forte acção inibitória na plasmina. Normalmente os níveis anti-plasmina plasmáticos excedem os níveis de plasminogénio.

2.2.3. Actividade das células endoteliais danificadas

O reconhecimento do tecido endotelial danificado em doenças como aterosclerose, trombocitopenia, púrpura trombótica e síndroma urémica hemolítica levaram a estudos

intensivos da função celular endotelial após lesões. Com as lesões, a produção de substâncias vasodepressoras e anticoagulantes está reduzida. Verificam-se também alterações nos complexos juncionais tensos endoteliais e concomitante perda de fluido regulador e proteínas do espaço intravascular. Juntamente com a perda de funções protectoras, as células endoteliais danificadas também apresentam novas funções (Rodgers, 1988; Rodgers *et al.*, 1988). A síntese pró-coagulante e a activação da cascata de coagulação ocorre em locais da rotura endotelial e promove a agregação plaquetária e a formação de coágulos. O endotélio danificado produz mitogénios, pelo menos um dos quais, o factor de crescimento plaquetário, é também um potente vasoconstritor (Taylor *et al.*, 1990 e 1991). O aumento da permeabilidade da membrana, a formação de coágulos, vasoespasmo, e a remodelação dos vasos sanguíneos, enquanto respostas vitais à rotura da integridade dos vasos, podem causar distúrbios fisiológicos graves tais como os que estão implicados na patogénese da aterosclerose quando não activados apropriadamente.

2.2.4. Lesão da célula endotelial na pré-eclampsia

Há bastantes provas de que a lesão da célula endotelial aparece em mulheres com pré-eclampsia. A anomalia morfológica mais consistente nas mulheres pré-eclâmpticas é a lesão renal denominada por endoteliose na qual as células endoteliais dos capilares glomerulares estão congestionadas com inclusões intracelulares (Roberts *et al.*, 1989). Isto acontece em mais de 70% de mulheres primíparas com pré-eclampsia e há regresso completo à normalidade após o parto. Demonstrou-se rotura das células endoteliais nas artérias do cordão umbilical em mulheres pré-eclâmpticas, o que não se verifica em vasos similares com mulheres normais (Roberts *et al.*, 1989). Deve ainda ser referido que anomalias funcionais das células endoteliais podem acontecer em vasos com morfologia aparentemente normal. Os dados clínicos proeminentes na pré-eclampsia, edema, e perda de proteínas pelos capilares glomerulares são consistentes com a perda de funções de transporte do endotélio normal. O aumento da taxa de desaparecimento do corante azul de Evans do espaço intravascular das mulheres pré-eclâmpticas justifica que haja perda da integridade das células do endotélio nestas mulheres.

As provas bioquímicas da lesão das células endoteliais nas mulheres pré-eclâmpticas são ainda mais comprovadoras. A fibronectina e o antigénio do factor VIII, dois factores conhecidos como sendo libertados das células endoteliais danificadas, têm a concentração aumentada no sangue das pré-eclâmpticas (Roberts *et al.*, 1989; Halligan *et al.*, 1994; Sen *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1995). Além disso, verificou-se que o sangue das pré-eclâmpticas tem actividade mitogénica que excede a das grávidas normais (Musci, *et al.* 1988). Não foi no entanto possível determinar se isto é o resultado da libertação de mitogénios directamente das células danificadas ou se é o resultado da activação das plaquetas. Resultados

semelhantes foram verificados na síndroma urémica hemolítica, na qual a lesão das células endoteliais foi fortemente implicada como factor patofisiológico.

Outras alterações patofisiológicas da mulher pré-eclâmptica podem explicar-se por lesão da célula endotelial. Apesar de a coagulação intravascular disseminada (CID) estar demonstrada por testes laboratoriais convencionais em cerca de 20% das mulheres com pré-eclampsia grave (Roberts *et al.*, 1989), indicadores mais sensíveis demonstram que ocorrem anomalias da coagulação em muito maior percentagem em mulheres com esta afecção. As razões antigénio do factor VIII/actividade por um lado e contagens seriadas de plaquetas/nível de tromboglobulina ß por outro lado, são anormais numa grande parte das mulheres com pré-eclampsia (Roberts *et al.*, 1989). Níveis reduzidos de antitrombina III, outro indicador de activação da coagulação, parece ser um dos mais importantes meios usados para diferenciar pré-eclampsia de hipertensão preexistente (Roberts *et al.*, 1989). Os complexos trombina-antitrombina III são um indicador promissor para detectar gravidezes complicadas por hipertensão (Cadroy *et al.*, 1993).

Uma das anomalias patofisiológicas mais importantes da pré-eclampsia é o aumento da sensibilidade destas mulheres a agentes pressores (Chesley *et al.*, 1968; Roberts *et al.*, 1989). Vasos removidos de mulheres pré-eclâmpticas produzem menos prostaciclina que vasos similares de mulheres normais, o que é compatível com a disfunção das células endoteliais e redução dos efeitos vasodilatadores do endotélio normal. Além disso, trabalhos recentes indicam a presença de factores que alteram a resposta vascular no sangue de mulheres pré-eclâmpticas. Tulenko *et al.* (1987) demonstraram que a perfusão de artérias de coelho com o soro de mulheres pré-eclâmpticas, mas não de mulheres normais, aumentava a sensibilidade desses vasos à angiotensina II e à noradrenalina. Foi também referido que o soro de mulheres pré-eclâmpticas leva a maior lesão do endotélio celular que o soro das mesmas mulheres colhido 48 horas após o parto ou do que o soro de mulheres normais antes ou após o parto (Rodgers *et al.*, 1988). Em contraste, o soro pré-parto de mulheres normais parece ter um efeito citoprotector, comparando com as amostras pós-parto.

Apesar de alterações consistentes com danos das células endoteliais na mulher pré-eclâmptica, não há provas de que estas alterações são a causa e não o resultado de outras alterações fisiológicas. Se a lesão da célula endotelial fosse a causa de hipertensão e proteinúria, era de encontrar provas de que tal lesão anteciparia as restantes alterações: o aumento da razão do antigénio do factor VIII/ actividade, redução da contagem plaquetária e aumento dos níveis da tromboglobulina ß e fibronectina anteciparam a alteração clínica em dias ou semanas. A descoberta clássica de Gant *et al.* (1973) indica que o aumento da sensibilidade pressora à angiotensina II pode ser demonstrada às 18-20 semanas. A perda de efeitos citoprotectores do endotélio normal leva ao aumento do vasospasmo e à coagulação

intravascular, que reduzirá a perfusão distal do local da lesão. Este fenómeno levará ao aumento da extensão da lesão da célula endotelial, criando um ciclo vicioso. Este modelo é compatível com o decurso da escalada clínica da pré-eclampsia, que desaparece completamente após a saída da placenta.

2.2.5. Factores que originam a lesão celular endotelial

De momento, a identidade dos factores que causam danos nas células endoteliais na pré-eclampsia é especulativo. Os dados sugerem a presença de anticorpos das células endoteliais celulares nas mulheres pré-eclâmpticas (Rappaport *et al.*, 1990). Contudo, a melhoria da pré-eclampsia e o rápido desaparecimento dos efeitos citotóxicos do soro após o parto (Tsukimori *et al.*, 1994), indicam que este factor tem um tempo de semi-vida relativamente pequeno e é pouco provável que seja uma imunoglobulina (Rodgers *et al.*, 1988). Factores peptídicos tais como factor de crescimento plaquetário foram propostos como potenciais candidatos (Musci *et al.*, 1988). Hubel *et al.* (1989) sugeriram que os peróxidos lipídicos, que estão aumentados nas mulheres pré-eclâmpticas e que se sabe que danificam as membranas celulares, podem desempenhar um papel importante neste mecanismo. São então apresentadas as seguintes hipóteses:

—Na pré-eclâmptica, a perfusão trofoblástica está reduzida, o que resulta na produção de um ou mais agentes que são libertados na circulação sistémica e induz danos celulares endoteliais subletais;

—As células endoteliais danificadas activam a cascata de coagulação e perdem a sua integridade como barreira à extravasão de fluido extravascular e como tampões no efeito vasoconstrictor de pressores que circulam normalmente;

—A coagulação intravascular resultante, a perda de fluido do espaço intravascular, e o aumento da sensibilidade a pressores resultam na síndroma da pré-eclampsia. O processo inicia-se pouco depois da invasão trofoblástica das paredes das artérias placentárias, e manifesta-se clinicamente na gravidez tardia à medida que se autoaceleram os danos das células endoteliais. Uma vez iniciada a alteração, esta continua até que os danos endoteliais terminem com o parto (Roberts *et al.*, 1989).

2.2.6. O trofoblasto como fonte de factores que causam lesão

No início da gravidez o útero é invadido pelo blastocisto, o que dá origem a uma reacção inflamatória local. O processo inflamatório é normalmente uma resposta localizada, defensiva e protectora, que no caso da gravidez se manifesta através de uma adaptação do tecido uterino à presença de um tecido estranho nele implantado —o tecido trofoblástico. Provas histopatológicas, epidemiológicas e experimentais indicam a redução da perfusão trofoblástica como a primeira e mais consistente alteração na pré-eclampsia (Roberts *et al.*,

1989). A ocorrência da pré-eclampsia em gravidezes quer abdominais quer molares indicam que não são necessários factores uterinos e fetais, respectivamente. As artérias espiraladas que irrigam os espaços intervilosos de placentas pré-eclâmpticas não sofrem as alterações morfológicas que acontecem na gravidez normal (Opsjon *et al.*, 1995). Normalmente, as artérias espiraladas do local de implantação aumentam pelo menos 4 vezes em diâmetro e perdem os seus componentes musculares e elásticos (Robertson *et al.*, 1986). Estas alterações estendem-se através da decídua até à porção do miométrio do vaso e parecem estar amplamente estabelecidas das 18 às 20 semanas de gestação. Em vasos de mulheres pré-eclâmpticas, estas alterações fisiológicas normais não se verificam na porção decidualEste fenómeno, bastante semelhante ao apresentado no aloenxerto de rejeição, é denominado de aterose. A aterose pode ser demonstrada em cerca de 10% dos locais de implantação nos finais do 1º trimestre em mulheres nulíparas e em menor proporção em outros grupos de mulheres, o que sugere que isto pode ser uma manifestação inicial das alterações que levam à pré-eclampsia (Roberts *et al.*, 1989). Estas alterações reduzem a perfusão trofoblástica.

Condições obstétricas que aumentam o risco da pré-eclampsia incluem mola hidatiforme, gestações múltiplas e hidropsia imune e não imune. Todas estas condições estão associadas a aumento da massa trofoblástica e redução relativa da perfusão placentária. Semelhantemente, condições clínicas associadas com um aumento da incidência da pré-eclampsia, como os diabetes, hipertensão e doenças do colagéneo vascular, incluem um componente de doença microvascular na sua fisiopatologia que pode reduzir a perfusão placentária. Em mulheres grávidas com hipertensão crónica há uma hipertrofia do músculo liso das artérias espiraladas que abastecem o espaço interviloso. Alem disso, mulheres diabéticas mesmo sem pré-eclampsia, demonstram aterose nas artérias espiraladas (Robertson *et al.*, 1986). Esta última observação é de especial interesse pela indicação de que o aumento da glicosilação das proteínas das membranas das células endoteliais por hiperglicemia pode levar à lesão das células endoteliais (Brownlee *et al.*, 1988).

Estes dados apoiam a teoria de que a perfusão placentária é uma demonstração predominante na patogénese da pré-eclampsia. Na verdade, tentou-se induzir pré-eclampsia em animais de experiência sem sucesso; em alguns casos só foi conseguida a redução experimental da perfusão uterina . A perfusão leva à libertação de factores circulantes danificadores para o endotélio vascular. Como consequência, ocorre uma cascata de lesões celulares endoteliais e a perfusão de muitos orgãos diminui. O acelerar do progresso da pré-eclampsia é um processo cíclico que leva à maior redução da perfusão placentar.

2.3. Função renal

2.3.1. Alterações anatómicas

Cerca de 80% das mulheres grávidas têm dilatação significativa de ambos os ureteres e pelves renais, com início pelas 10 semanas. Mais tarde, opera o factor mecânico, pois a dilatação é principalmente observada no lado direito acima do estreito superior, o que acontece devido à dextro-rotação normal do útero gravídico. As veias ovarianas participam da obstrução mecânica dos ureteres (Bellina *et al.*, 1970), pelo que em 1978 Marchant considera estes dois factores, hormonal e mecânico, como responsáveis pelas alterações. O fluxo de urina fica assim retardado, o que torna as grávidas mais sujeitas às infecções urinárias.

A frequência e a intensidade das contracções uretrais não se alteram, o que contradiz ser a hipotonia da musculatura lisa regional induzida pela progesterona a responsável pela sua dilatação (Martin, 1980). A bexiga é progressivamente elevada pelo útero aumentado nos dois últimos trimestres de gravidez. A área do trígono pode ser estirada a ponto de determinar incompetência das válvulas ureterovesicais com consequente refluxo ureterovesical, outro factor predisponente de infecção urinária ascendente. A parede da bexiga e sua mucosa ficam hiperemiadas, processo generalizado em toda a pelve, durante a gravidez.

2.3.2. Alterações funcionais

As anomalias da função renal reflectem alterações fisiológicas no sistema cardiovascular que influenciam o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular; verifica-se também uma perda glomerular de proteínas ou sódio e retenção com edema.

2.3.3. Hemodinâmica renal

É sabido que há certas adaptações na gravidez que afectam a interpretação dos testes da função renal. Os primeiros estudos de hemodinâmica renal durante a gravidez foram efectuados em 1939 por Chesley e Chesley. O fluxo renal plasmático aumenta substancialmente em relação aos valores da mulher não grávida em cerca de 50 a 85% (o maior incremento verifica-se no primeiro trimestre da gravidez). Alguns autores referem um ligeiro declínio durante a segunda metade da gravidez (Sims e Krantz, 1958, Alvarez e Seattle, 1958; Dunlop e Davison, 1977); outros referem um aumento progressivo (Assali *et*

al., 1960). Em 1958, Sims e Krantz notaram que o refluxo plasmático renal era cerca de 45% superior aos valores pré-gravídicos, atingindo em média 725 ml/min no início do segundo trimestre, baixando até cerca de 15% no final da gravidez. A taxa de filtração glomerular foi determinada através da clearance da inulina, verificando-se que aumenta cedo na gravidez atingindo valores superiores em 50% aos da não grávida (Sims e Krantz, 1958, Alvarez e Seattle, 1958; Assali *et al.*, 1960; Dunlop e Davison, 1977). O estudo de Davison *et al.* (1980) descreve valores substancialmente mais altos e esta discrepância foi posteriormente atribuída, pelo mesmo autor (1991), a diferenças no processo de infusão.

Pensava-se que e redução se devia a condições posturais, pois Chesley e Sloam (1964) observaram diferenças de 20% nos valores do fluxo plasmático renal quando as medições foram feitas em posição supina e decúbito lateral. Se essa quantidade fosse adicionada aos valores finais de Sims e Krantz (1958), a queda observada no fluxo plasmático renal podia ser anulada, o que não se verifica.

2.3.4. Taxa de filtração glomerular

A taxa de filtração glomerular aumenta cedo na gravidez, atingindo esse aumento cerca de 60% no final do primeiro trimestre. Para alguns autores (Sims e Krantz, 1958) não há diminuição da taxa de filtração glomerular no final da gravidez, enquanto para Davison *et al.* (1980) essa variação seria responsável pela redução da clearance da creatinina endógena de 155 para 135 ml/min. No entanto, essa variação não foi confirmada pela depuração da inulina nem da creatinina com a paciente sentada. A fracção filtrada aparentemente diminui no início e retorna aos valores pré-gravídicos durante as últimas 10 semanas de gestação (Davison *et al.*, 1980). Concomitantemente verificou-se um aumento do rendimento cardíaco até ao final. O fluxo renal apresenta somente uma variação de cerca de 10% em relação ao normal por volta do oitavo mês, normalizando-se ao fim de 5 semanas pós-parto.

Outro factor importante na mulher grávida é a ocorrência de proteinúria ortostática (benigna, postural) que pode ocorrer em 20% das grávidas devido a um exagero dos mecanismos que originam a proteinúria ortostática chamada de lordose (com rotação e deslocamento do fígado para a frente com compressão da veia cava inferior causando um aumento na pressão renal venosa). Esta situação pode complicar-se pelo aumento de volume uterino que comprime a veia renal esquerda. É então necessário saber distinguir entre proteinúria ortostática de doença primária do parênquima renal e proteinúria associada à pré-eclampsia, que por definição aparece após as 24 semanas.

2.3.5. Função tubular

A grávida tem um aumento da excreção urinária de glucose (devido a uma baixa do limiar renal), aminoácidos e outros nutrientes. O aumento da excreção de glucose acontece 4 semanas após a concepção e aumenta progressivamente até ao final (Renschler *et al.*, 1967, Lind e Hytten, 1972). A concentração de glucose na urina não está aparentemente relacionada com os níveis de glucose sanguíneos, cujo valor pode ser cerca de 10 vezes superior aos níveis da não grávida.

Lind e Hytten (1972) registaram valores de glucose na urina da ordem dos 20 g por 24 horas. Esta glicosúria gravídica reflecte taxa de filtração glomerular aumentada e aumento da capacidade tubular, mais do que uma redução real na capacidade de reabsorção tubular (Davison *et al.*, 1980). Certos casos de glicosúria podem reflectir uma capacidade de reabsorção diminuída já presente antes da gravidez (Hytten e Thomson, 1968; Davison *et al.*, 1980). Pode concluir-se que a glicosúria da gravidez pode estar aumentada devido a um incremento na taxa de filtração glomerular e a sua magnitude depende da capacidade tubular de reabsorver glucose. O aumento da taxa de filtração glomerular determina que maior quantidade de substância se apresente aos tubulos renais (depuração renal aumentada). Assim:

—As concentrações de ureia e creatinina estão diminuídas no sangue para 2/3;

—A quantidade de glucose filtrada sobe 50% e a capacidade máxima do rim em absorvê-la permanece igual, o que torna normal a presença dessa substância na urina (glicosúria fisiológica ou renal), com níveis normais no sangue. Coslovsky e Rezende (1965) verificaram que em 88% das gestantes com glicosúria se verificava tolerância glucídica diminuída e uma certa relação com estado pré-diabético;

—É ainda frequente a excreção de aminoácidos na urina (aumento de 200 a 700% em relação aos valores pré-gravídicos). A média da perda diária seria aproximadamente 2g/24horas (Hytten e Cheyne, 1972). O padrão de excreção de aminoácidos não parece relacionar-se com factores como concentração de aminoácidos plasmáticos ou estrutura química de aminoácidos individuais. Os mecanismos responsáveis pelo aumento da excreção de aminoácidos são desconhecidos, apesar de estarem implicados factores como aumento da taxa de filtração glomerular e aumento do cortisol (Zinneman *et al.*, 1963);

—Entram em jogo os mecanismos compensatórios (sistema renina-angiotensina-aldosterona) responsáveis pela retenção sódica (Pipkin, 1988; Fagundes *et al.*, 1992). O limiar renal de sódio durante a gravidez e a capacidade da grávida para manter a homeostase do sódio recebeu atenção considerável como resultado de uma controvérsia sobre o uso de diuréticos em grávidas normotensas (Gray, 1968). Devido ao aumento da taxa de filtração glomerular, o sódio levado ao tubulo renal é maior durante a gravidez (Sims e Krantz, 1958). Contudo, o rim da grávida é capaz de reabsorver sódio em quantidade suficiente para manter a

osmolalidade dentro de valores normais. A mulher grávida retém aproximadamente 7,2 litros de água corporal, dos quais cerca de 5 litros correspondem ao fluido extracelular (Pipe *et al.*, 1979). Dado que no final da gravidez a concentração plasmática de sódio é de 139,5 mEq/l (Neuman, 1957), o sódio total a mais retido no espaço extracelular será de 697 mEq. A concentração de sódio no espaço intracelular é de aproximadamente 37 mEq/l. Então, o sódio retido no espaço intracelular será de 81 mEq/l, e a combinação de retenção de sódio nos dois espaços será de 778 mEq. Este cálculo teórico está de acordo com os 756 mEq medidos na grávida (MacGillivray e Buchanan, 1958; MacGillivray *et al.*, 1969). Outros investigadores também referem retenção significativa de sódio durante a gravidez (Gray *et al.*, 1964). Apesar do balanço positivo do sódio, a excreção da grávida é tão eficiente como a da não grávida (Chesley *et al.*, 1958, Katz e Lindheimer, 1973).

2.3.6. Função renal e pré-eclampsia

Seitchic (1956) e Seitchic *et al.* (1958) verificaram que o *pool* de ácido úrico era mais elevado no 3º trimestre de gravidez do que na não grávida. Estas diferenças podem ser atribuídas às alterações da composição do corpo humano durante a gravidez, assim como à contribuição fetal para o *pool* do ácido úrico ou às alterações hormonais (Nicholls *et al.*, 1973). Boyle *et al.* (1966) e Dunlop e Davison (1977) verificaram uma redução dos níveis de ácido úrico nas primeiras semanas de gravidez (até à 20ª). Pritchard e Stone (1967) referem que apesar de a hiperuricemia ser característica da pré-eclampsia, o seu índice não serve para avaliar a gravidade da situação. No entanto, outros autores (Pollak e Neettles, 1960) demonstram existir correlação entre níveis de ácido úrico e gravidade da situação. Redman *et al.* (1976) encontram relação entre os níveis de ácido úrico e prognóstico fetal, Posteriormente, Redman *et al.* (1978) verificam que o ideal seria conhecer-se o valor do ácido úrico antes de engravidar e verificar se o aumento devido à gravidez era ou não superior a 30%.

A taxa de filtração glomerular e o fluxo renal plasmático diminuem na pré-eclampsia. Contudo, devido ao aumento da hemodinâmica renal na gravidez normal, os seus valores serão idênticos ou superiores aos valores descritos para a não grávida. Deste modo, a creatinina do soro pode ter um valor elevado na pré-eclampsia, e enquanto os valores poderiam ser considerados normais numa mulher não grávida, numa pré-eclâmptica são indicativos de disfunção renal. A diminuição da hemodinâmica renal tem provavelmente muitas origens: a redução do volume intravascular, a vasoconstrição renal e o aumento de volume das células intracapilares glomerulares (endoteliose glomerular), lesões características de pré-eclampsia.

2.4. Função hepática

O fígado tem trabalho aumentado na gestação, embora a maioria dos testes de função hepática esteja dentro dos limites de normalidade (Martin, 1980). A alteração dos parâmetros representativos da função hepática pode reflectir uma variedade de alterações em outros orgãos ou sistemas. É o caso da elevação da actividade da fosfátase alcalina no soro. O aumento é devido a uma enzima de origem placentária. O mesmo se verifica em relação à concentração de proteínas plasmáticas, cuja diminuição se atribui à hemodiluição. A única situação que se pode referir como anormal é a hipercolesterolemia (Riely, 1994).

2.4.1. Alterações anatómicas

Do ponto de vista anatómico verifica-se um ligeiro aumento de volume hepático e um deslocamento para a direita e para cima no final da gravidez. Como este orgão participa em grande parte dos processos metabólicos, há reorganização da bioquímica hepática para manter as transformações energéticas (Scholtes, 1979), libertar metabolitos intermediários e regular as hormonas circulantes, embora resultando em testes de função hepática dentro dos limites da normalidade. Em situações gravídicas mais complicadas, as anomalias na função hepática reflectem alterações noutros orgãos ou sistemas. O rendimento cardíaco aumenta 40 a 50%, mas o volume que por minuto atravessa o fígado durante a gravidez mantém-se em cerca de 1,5 litros, o que leva a concluir que a percentagem do rendimento cardíaco que atravessa o fígado durante a gravidez diminui de 35% para 20-25% (Hoffman, 1976). Pérez *et al.* (1971) verificaram que o *stress* funcional imposto ao fígado durante a gravidez é tolerado sem quaisquer problemas, sendo apenas de assinalar um aumento no conteúdo de glicogénio e alguma deposição de gordura nas células hepáticas. A glicogenólise hepática está de acordo com as necessidades energéticas acrescidas.

2.4.2. Alterações funcionais

Para estudar diferenças na função hepática entre grávidas e não grávidas, Wheeler *et al.* (1969) usaram o teste da bromossulftaleina (BSP), substância rapidamente removida do sangue pelo fígado e excretada pela bile após conjugação com a glutationa e que tem a vantagem de não atravessar a placenta. Combes *et al.* (1963) e Tindall e Beazley (1965) verificaram que na segunda metade da gravidez a taxa de secreção hepática de BSP para a bile diminui 27%, enquanto a taxa de armazenamento aumenta 122%. Em 1969, Clinch e Tindall atribuem estas variações aos níveis aumentados de estrogénios, cujo efeito vasodilatador também se verifica a nível cutâneo (Scholtes, 1979). Posteriormente, Tindall (1975) verificou que o fluxo sanguíneo hepático aumentava na mulher grávida (1,398 ml/min

contra 801 ml/min na não grávida). Helmer e Judson (1967) demonstraram que os estrogénios promovem, a nível hepatocitário, um aumento da produção do substrato da renina (angiotensinogénio) e, quanto à libertação de renina renal, atribui-se papel relevante à prostaciclina (Miyamori *et al.* 1979).

Adlercreutz *et al.* (1967a e b) verificaram que as caracteristicas histológicas do fígado eram semelhantes entre grávidas e não grávidas. Em 1971, Perez *et al.* observaram proliferação do retículo sarcoplasmático liso com dilatação das vesiculas; o retículo rugoso estava bem desenvolvido, havendo um aumento do número de polissomas e de ribossomas livres. Na maioria das amostras, as mitocôndrias eram normais atribuindo-se o aumento verificado em alguns casos a inclusões cristalinas. Os capilares biliares eram normais sugerindo um aumento da síntese de proteínas apesar de não se saber quais as implicações do aumento das mitocôndrias. A concentração plasmática de proteínas é menor na mulher grávida, não sendo esta diminuição atribuída à hemodiluição. A razão albumina/globulina diminui de 1,32 (antes da gravidez) para 0,7 no ponto mais baixo, atingindo os valores normais 4 a 6 semanas depois do parto (devido a uma diminuição da albumina e a um aumento nas globulinas α e β). Como resultado das alterações na composição de proteínas plasmáticas há um aumento da velocidade de sedimentação a partir do 2º mês de gravidez.

2.4.3. Parâmetros hepáticos

Devido ao aumento do *turnover* da hemoglobina, a bilirrubina do plasma pode estar ligeiramente aumentada atingindo o seu valor máximo durante o parto (McNair e Jaynes, 1960). Em qualquer das situações a concentração de bilirrubina está dentro dos valores normais descritos (Iber, 1965). A fosfátase alcalina aumenta acentuadamente durante o 3º trimestre, devido à produção simultânea dessa enzima pela placenta. As transamínases, indicadores mais específicos da destruição hepatocelular, mantém-se dentro dos valores normais, pois a integridade das células hepáticas não é alterada. A composição da bile também não varia (Large *et al.*, 1960). A vesícula biliar está aumentada e esvazia lenta e não completamente após as refeições (Braverman *et al.*, 1980), o que explicam por uma combinação do tonus muscular das paredes da vesícula biliar e por uma diminuição da reabsorção de água.

Em relação à composição lipídica em mulheres grávidas normais, Laatikainem *et al.* (1978) verificaram um aumento na percentagem de ácido cólico. As alterações no metabolismo lipídico tem como objectivo a constituição de reservas utilizáveis como veículo de vitaminas lipossolúveis e percursores das principais hormonas esteróides. A única anomalia que pode estar relacionada com alteração na função hepática é o colesterol do soro. Os testes de função hepática são difíceis de avaliar, pois o figado contribui para imensas vias metabólicas.

2.4.4. Função hepática e pré-eclampsia

O envolvimento do fígado na pré-eclampsia manifesta-se por uma dor no quadrante epigástrico superior direito e por níveis elevados de transaminases (Sibai, 1982 e 1993). A pré-eclampsia é a principal causa de testes hepáticos alterados durante a gravidez. As principais lesões a nível hepático são a hemorragia periportal e a deposição de fibrina e de fibrinogénio (Rolfes e Ishak, 1989).

2.5. *Stress* oxidativo e gravidez

A nível celular verificam-se alterações da estrutura e da função enzimática, do metabolismo bioquímico, nomeadamente através de um maior consumo de oxigénio, do aumento dos radicais de oxigénio e do metabolismo oxidativo. Este conjunto de fenómenos conhecidos por *stress* oxidativo foram avaliados pela determinação dos níveis plasmáticos dos peróxidos lipídicos. Ishiara (1978) refere um aumento acentuado do nível de peróxidos lipídicos na mulher grávida quando comparada com a não grávida, verificando que esses níveis são ainda maiores nas mulheres com hipertensão induzida pela gravidez. O significado e importância da possível relação entre a evolução da gravidez e as características do processo inflamatório dela decorrente pode ser estabelecido sabendo-se que a activação do sistema do complemento é uma das principais vias efectoras do processo de inflamação e que o crescimento, diferenciação e função celulares são influenciadas pelas citoquinas. Deste modo é conhecido o papel fundamental das citoquinas no processo da nidificação e desenvolvimento embrionário, assim como cada vez é maior o número de trabalhos que comprovam a relação entre a activação do complemento e manifestação de lesão endotelial e microvascular na doença hipertensiva induzida pela gravidez.

Pode dizer-se então que os sistemas fisiológicos respondem a estímulos apropriados (*stress*), cuja continuidade origina adaptações da capacidade funcional. Esta resposta dá-se à custa do aumento de consumo da energia conseguida através da via de fosforilação oxidativa sob a forma de ATP, verificando-se relação directa entre o aumento de consumo de ATP e o de oxigénio. Entre as consequências do aumento da taxa respiratória são referidas alterações mitocondriais, inactivação de algumas enzimas do retículo sarcoplasmático e endoplasmático e de algumas enzimas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica é um processo controlado que ocorre normalmente em todas as células e tecidos em baixos níveis. Envolve a conversão oxidativa de ácidos gordos insaturados a hidroperóxidos lipídicos e a uma variedade de metabolitos secundários. Um mecanismo

importante para a peroxidação lipídica detectado em todas as células é normalmente designado por processo de peroxidação lipídica acompanhada da formação de radicais livres. Danos provocados por radicais livres estão implicados em muitas alterações, sendo de referir que o aumento da actividade de radicais livres (*stress* oxidativo) é devido quer a um aumento de produção de radicais livres ou a uma deficiência nos sistemas protectores.

As alterações que durante a gravidez ocorrem no organismo materno assumem significado clínico não só em grávidas com antecedentes de doença mas também em mulheres aparentemente normais, através de modificações hemodinâmicas e do volume sanguíneo e rendimento cardíaco que, em conjunto, constituem um estado de adaptação à coexistência da vida materna e fetal (Kerr, 1968).

Em indivíduos normais, a elevação crónica da pressão arterial pode ter graves consequências, nomeadamente insuficiência cardíaca, enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e/ou insuficiência renal. Esta situação é ainda mais complicada quando se desenvolve em grávidas, condição designada por pré-eclampsia, EPH-gestose ou toxemia gravídica.

Wickens *et al.* (1981) verificaram existir relação entre hipertensão arterial e concentração plasmática elevada de peróxidos lipídicos. Os peróxidos lipídicos podem aumentar a resistência periférica e a pressão sanguínea com alteração de orgãos e tecidos (Yagi, 1976). Na gravidez normal tem-se associado o aumento da concentração de peróxidos lipídicos com o de lipídeos totais do soro, indicando que a razão dos peróxidos lipídicos/lipídeos totais não se altera (Maseki *et al.*, 1981). Dados mais recentes sugerem que o tecido placentar pode ser a maior fonte de produtos da peroxidação lipídica na gravidez. Em face de uma concentração fixa de catalisadores da peroxidação, a peroxidação lipídica mediada por radicais livres nos microssomas do tecido placentário humano aumenta em função da idade gestacional. Isto permite admitir que a acumulação de peróxidos lipídicos *in vivo* acompanha o evoluir da gestação, atingindo um máximo nas placentas de termo, conforme foi verificado por Parmley *et al.* em 1981 através da determinação da lipofucsina.

O estudo da adaptação metabólica constitui o ponto de partida para a compreensão dos fenómenos fisiopatológicos relacionados com a patologia materna e/ou fetal. A adaptação metabólica materna reflecte-se por variação significativa de vários parâmetros bioquímicos determináveis no sangue periférico. Deste modo estudámos parâmetros bioquímicos seleccionados com base na sua importância fisiológica e na falta de informação acerca das respectivas variações normais. Como patologia gravídica para o desenvolvimento do nosso estudo comparativo escolhemos a pré-eclampsia.

A escolha da pré-eclampsia deve-se ao facto de ser a causa mais comum de complicações clínicas durante a gravidez com uma incidência de 5 a 10% (Roberts *et al.*, 1989). Esta situação acontece com mais frequência nas primíparas, mas também pode surgir em gravidezes seguintes. A pré-eclampsia é uma alteração multissistema característica da gravidez humana e uma das principais causas de morbilidade e mortalidade materna e perinatal. Quando a situação evolui para o denominado por Weinstein (1982) por síndroma de HELLP (H-hemolysis, EL-elevated liver enzymes, LP-low platelet count) o risco é ainda maior. A pré-eclampsia é normalmente diagnosticada na segunda metade da gravidez, altura em que se regista um aumento da pressão sanguínea acompanhado de edema e proteinúria, cuja resolução é completa após o terminar da gravidez. Apesar da enigmática etiologia da pré-eclampsia, o tecido trofoblástico é necessário para estimular a sua fisiopatologia. Uma vez o vasoespasmo desenvolvido, a pré-eclampsia persiste até as vilosidades coriónicas serem expelidas ou evacuadas (Hernandez e Cunningham, 1990).

A pré-eclampsia está associada à disfunção da célula endotelial (Roberts *et al.*, 1989). Esta disfunção pode ser provocada por *stress* oxidativo: os lipídeos insaturados e as proteínas contendo grupos tiol das membranas celulares são susceptíveis ao ataque por radicais livres (Freeman e Tanswell, 1985). O efeito do *stress* oxidativo sobre alguns orgãos e tecidos merece ser considerado de forma particular neste trabalho e será considerado nos capítulos seguintes. Descobertas anteriores consistentes com a doença referem aumento da sensibilidade vascular aos pressores (Graeff *et al.*, 1984), activação da cascata de coagulação (Chesley *et al.*, 1968), activação plaquetária, aumento da razão antigénio/actividade do factor VIII (Redman, *et al.* 1977) e níveis reduzidos de antitrombina III (Weiner *et al.*, 1985).

Foram também referidas, em algumas pacientes pré-eclâmpticas e mais vulgarmente nas eclâmpticas, alterações hematológicas (McCay *et al.*, 1972), além de nos casos fatais se verificarem ainda depósitos intravasculares de fibrina, talvez devido à invasão da circulação materna por tromboplastina de origem placentária (Page, 1972). De entre as alterações hematológicas não podemos deixar de referir a trombocitopenia (Pritchard *et al.*, 1976) que ocorre em cerca de 20% das pacientes pré-eclâmpticas (Burrows *et al.*, 1987), sendo a sua frequência e intensidade variável com a intensidade da alteração e com o espaço de tempo entre o início da pré-eclampsia e o parto. Maki *et al.* (1993) tentaram justificar a diminuição no número de plaquetas através da redução da actividade do factor activador da acetil-hidrólase plaquetária.

É ainda referido o aumento de lipídeos do plasma durante a gravidez, cerca de 25% na concentração de colesterol (Oliver e Boyd, 1955), enquanto os triglicerídeos aumentam cerca de 2 a 3 vezes (Aurell e Cramer, 1966). Este aumento é ainda maior nas grávidas com

toxemia (Nelson, *et al.* 1966). Também a composição das lipoproteínas está alterada quer na parte lipídica quer na parte proteica (Hill *et al.*, 1975).

Deixámos para último a formação dos radicais livres de oxigénio e a formação de peróxidos lipídicos como resultado do *stress* imposto pela gravidez (Ishiara, 1978). O aumento de tromboxano pode estar associado a um aumento de peróxidos lipídicos através da enzima ciclooxigénase que gera não só tromboxano mas também radicais de oxigénio que formam peróxidos lipídicos com os ácidos gordos poli-insaturados. A baixas concentrações, os radicais de oxigénio podem estimular a enzima ciclooxigénase (enzima essencial para a produção de prostaciclina), mas a níveis mais elevados podem inibir quer esta enzima quer a síntase da prostaciclina (Warso e Lands, 1983). Os danos causados por radicais livres estão implicados em muitas situações patológicas, resultando quer do aumento da produção de radicais quer da deficiência de sistemas de protecção. Para controlar a peroxidação lipídica há um sistema defensivo que consiste em moléculas *scavenging* antioxidantes como a vitamina E, transformando-se em quinona ou em produtos de maior peso molecular. No entanto, as concentrações destes produtos são bastante baixas. Nos mamíferos há regeneração da vitamina E por outros nutrientes antioxidantes como a vitamina C (Doba *et al.*, 1985). Durante a gravidez verifica-se um aumento da vitamina E, cujo valor no 3º trimestre é cerca de 25% superior ao valor da não grávida (Ferguson *et al.*, 1955). Os peróxidos lipídicos são componentes tóxicos que podem danificar enzimas, proteínas, e membranas celulares, estando relacionados com a síntese de prostaglandinas. Em baixas concentrações, os peróxidos lipídicos estimulam a ciclooxigénase, mas quando as suas concentrações ultrapassam os valores normais, inibem não só a ciclooxigénase mas também a síntase da prostaciclina, diminuindo a respectiva síntese. A síntase do tromboxano não é afectada por peróxidos lipídicos (Warso e Lands, 1983; Wang *et al.*, 1991a, 1991b e 1992; Walsh e Wang, 1993).

Na pré-eclampsia estão também implicados os neutrófilos, que quando activados atacam a parede dos vasos e libertam uma variedade de substâncias capazes de mediar danos vasculares. Estas substâncias incluem o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos (elástase e outras protéiases) que podem destruir a integridade das células endoteliais, a membrana vascular basal e a matriz subendotelial. Além destes também se libertam radicais de oxigénio e leucotrienos que também provocam danos vasculares com aumento da sua reactividade e amplificam a resposta dos neutrófilos. Nestes locais as protéiases e os radicais livres gerados são inacessíveis aos inibidores das protéiases e *scavengers* circulantes, o que facilita as lesões vasculares (Janoff, 1985). Ainda nestes pacientes se verifica uma deposição de gordura nas paredes das artérias espiraladas uterinas (Simpson *et al.*, 1983). Este fenómeno, denominado de aterose aguda, é característico da pré-eclampsia (Brosens e Ranaer, 1972).

A elástase dos neutrófilos é o mediador principal dos danos vasculares e pode contribuir para as lesões vasculares observadas na pré-eclampsia. A sua concentração no plasma é normalmente muito baixa e independente do número de neutrófilos, pelo que um aumento da sua concentração plasmática reflecte activação dos neutrófilos e desgranulação. Um marcador ainda mais específico da activação dos neutrófilos é a lactoferrina, proteína exclusiva dos grânulos secundários dos neutrófilos, sendo de evidenciar a sua função de promover a aderência dos granulócitos às células, o que faz com que se liberte mais elástase no local inflamatório. Para confirmar o processo inflamatório, associa-se normalmente a esta determinação a quantificação de uma proteína de fase aguda, a proteína C reactiva (Tyler e Roes, 1957; Watts *et al.*, 1991).

Em face da presença no soro de substâncias imunorreactivas tipo digoxina em situações associadas com expansão de volume, incluindo a gravidez e no líquido amniótico e soro fetal e neonatal, alguns autores (Gusdon *et al.*, 1984; Phelps *et al.*, 1988; Poston *et al.*, 1989) determinaram o potencial uso dessa substância endógena na predicção da pré-eclampsia, estudando a correlação entre os seus níveis séricos e a idade gestacional, avaliando ainda a correlação entre esta substância e os valores da pressão sanguínea em grávidas pré-eclâmpticas. No entanto, Kerkez *et al.* (1990) e Logoglu *et al.* (1993) confirmam a presença dessa substância no soro das grávidas do 3º trimestre, afirmando ainda que a substância endógena tipo digoxina não contribui para a patogénese ou predição da pré-eclampsia.

Apesar desta divergência de resultados, alguns investigadores (Goodlin, 1988) propuseram uma terapia com anticorpos antidigoxina nos casos de hipertensão induzida pela gravidez.

O desequilíbrio imunológico entre os tecidos materno e fetal tem sido sugerido como causa da pré-eclampsia. Rote (1989) refere a participação dos sistemas imunes maternos e fetais na fisiopatologia da hipertensão induzida pela gravidez. Os anticorpos antifosfolipídeos, identificados no plasma (Sletnes *et al.*, 1992; Birdsall *et al.*, 1992; Munday e Jones, 1993; Pattison *et al.*, 1993), actuariam no eixo da prostaciclina-tromboxano. Este aumento poderia ser confirmado pelo excesso de tromboxano e pela hipercoagulabilidade referida na pré-eclampsia (Bussolino *et al.*, 1980; Remuzzi *et al.*, 1980; Bodzenta *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1993).

De referir ainda o papel crucial desempenhado pelas prostaglandinas durante o processo de reprodução humana (Ylikorkala e Viinika, 1980; Ylikorkala e Makela, 1985). A acção de dois prostanóides: o tromboxano A_2 (Hamberg *et al.*, 1975) e da prostaciclina ou prostaglandina I_2 (Moncada e Vane, 1979; Moncada *et al.*, 1976) tem sido objecto de um estudo mais aprofundado. De salientar a diferente origem destes dois compostos: enquanto a prostaciclina, vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária, é essencialmente

produzida na parede dos vasos, sendo sintetizada quer pelas células endoteliais (Moncada e Vane, 1979) quer nas células do músculo liso (Weksler *et al.*, 1978); a síntese do tromboxano A2 faz-se predominantemente nas plaquetas a partir dos endoperóxidos via sintétase do tromboxano (Hamberg *et al.*, 1975), sendo a vasoconstrição e a agregação plaquetária as suas principais funções.

É importante referir os efeitos opostos desempenhados por estes dois prostanóides; o balanço entre a prostaciclina e o tromboxano A_2 é um factor de regulação da função vascular-plaquetária (Moncada e Vane, 1979). Zuspan (1979) e Lindheimer e Katz (1981) verificaram a baixa resistência vascular e a vasodilatação nas circulações materna e fetal. Posteriormente, Fitzgerald *et al.* (1987 e 1990; Walsh, 1985) confirmam que a pré-eclampsia está associada com uma diminuição da produção de prostaciclina, o que iria provocar um desequilíbrio na razão tromboxano/prostaciclina. Se se associarem níveis normais ou ligeiramente aumentados de tromboxano à deficiência de prostaciclina, então o desequilíbrio seria ainda maior. Garzetti *et al.* demonstram em 1993 existir alteração na fluidez da membrana plaquetária, provocando por seu turno a alteração da razão tromboxano/prostaciclina. Tudo isto pode afectar o fluxo sanguíneo uteroplacentário (Norris *et al.* 1992), o crescimento fetal e levar a alterações vasculares maternas (Ylikorkala e Viinika, 1980). A razão deste desequilíbrio não é conhecida, verificando-se a existência no sangue da pré-eclâmptica de factores citotóxicos para as células humanas endoteliais (Hubel *et al.*, 1989; Rodgers *et al.*, 1988), os quais podem ser responsáveis pela diminuição da produção de prostaciclina. Após o parto, a actividade citotóxica diminui para níveis normais, o que aponta a placenta como fonte possível desses factores.

A pré-eclampsia impõe riscos para a mãe e para o feto, riscos esses que estão relacionados com os valores da pressão sanguínea. A pré-eclampsia é classicamente descrita como um estado hiperadrenérgico com resposta aumentada aos agentes pressores noradrenalina (Zuspan, 1979) e angiotensina II (Gant *et al.*, 1973). Como estes factores levam a um aumento da resistência vascular periférica, o tratamento é muitas vezes feito com bloqueadores beta dos receptores adrenérgicos (Mahmoud *et al.*, 1993).

Tentou-se corrigir o desequilíbrio da razão tromboxano/prostaciclina através de vários esquemas de tratamento, muitos dos quais se provou serem mais prejudiciais que a própria doença. É então necessário um melhor conhecimento da patogenia da alteração, embora neste momento esteja em franca divulgação a ministração de pequenas doses de aspirina a título mais profilático do que terapêutico (Benigni *et al.*, 1989).

Desde a utilização da nitroglicerina para tratamento de doenças cardíacas e coronárias que tem sido estudada a síntese de óxidos de azoto pelos seres humanos (Mitchell, 1916 citado por

Schmidt e Walter, 1994). Estas informações foram recentemente confirmadas pela demonstração de que o óxido nítrico endógeno regula os vasos sanguíneos dos mamíferos (Moncada e Higgs, 1991), de tal modo que todas as células dos mamíferos estão sob a sua influência. As funções mediadas pelo óxido nítrico são: o relaxamento do músculo liso vascular (Furchgott e Zawadzki, 1980; Marletta *et al.*, 1988; McCarthy *et al.*, 1994), a neurotransmissão (Garthwaite *et al.*, 1988; Gillespie *et al.*, 1989) e a resposta imune (Nathan, 1992).

Em relação à área imunológica, Schmidt e Walter (1994) verificaram que o óxido nítrico tanto pode funcionar como modulador ou mensageiro na auto-defesa imunológica como exercer efeitos tóxicos. Em diferentes situações em que apareçam factores como *stress* oxidativo, radicais reactivos de oxigénio ou deficientes defesas antioxidantes, o óxido nítrico pode, através de uma reacção com o superóxido, formar compostos (Beckman *et al.*, 1990) com funções sinalizadoras do óxido nítrico (Gaston *et al.*, 1994; Moro *et al.*, 1994) e citotóxicos (Beckman, 1991). Segundo Beckman *et al.* (1994), um dos efeitos seria a nitração excessiva da tirosina das proteínas.

Wright *et al.* (1989) referem a síntese do óxido nítrico por neutrófilos humanos, pelo que estas células possuem um mecanismo gerador de radicais livres que pode contribuir para a regulação do tónus vascular. Rao *et al.* (1992), ao estudarem os neutrófilos humanos, verificaram que a oxidação da diclorofluoresceína, além de servir como medida do peróxido de hidrogénio, também é útil na medição do óxido nítrico. A inibição da indução enzimática da síntase do óxido nítrico nos PMNLs pode levar a uma redução da sua actividade anti-inflamatória (McCall *et al.*, 1991).

Yallampalli e Garfield (1993) confirmam os resultados anteriormente obtidos por Nathan (1992) e Moncada e Higgs (1991) acerca dos efeitos da infusão de um inibidor da síntese do óxido nítrico. O óxido nítrico sintetizado a partir da L-arginina actua através da estimulação da cíclase do adenilato solúvel, de modo a aumentar os níveis do seu 3',5'-monofosfato no músculo vascular liso, provocando relaxamento. A ministração de inibidores do óxido nítrico provocam um aumento da pressão sanguínea (Moncada e Higgs, 1991), sendo também sugerido que a redução da síntese do óxido nítrico pode contribuir para a patogénese da hipertensão (Rees *et al.*, 1990). Além deste efeito também potencializa as respostas pressoras à angiotensina AII, vasopressina e noradrenalina (Molnar e Hertelendy, 1992). Em pacientes com hipertensão induzida pela gravidez, a libertação de óxido nítrico pelos vasos umbilicais está reduzida (Pinto *et al.*, 1991; Seligman *et al.*, 1994) e a diminuição fisiológica da pressão sanguínea em ratos hipertensos depende da libertação de óxido nítrico (Ahocas *et al.*, 1991).

Visser *et al.* (1994), utilizando monitorização invasiva hemodinâmica associada ou não com expansão de volume plasmático, reduziriam a mortalidade e morbilidade neonatais, apresentando os recém-nascidos diferenças de peso. Ben-Ami *et al.* (1994) utilizaram para tratamento bloqueadores dos canais de cálcio para inibir o influxo de cálcio extracelular através da membrana da célula. Estes autores fazem ainda referência aos efeitos do magnésio, não só através do bloqueio dos canais de cálcio, mas ainda através do seu efeito como activador da adenilcíclase e no aumento do AMPc que reduz o cálcio intracelular.

Os peróxidos lipídicos são componentes tóxicos que danificam e inibem a síntase da prostaciclina, podendo considerar-se como prováveis factores citotóxicos. Na pré-eclampsia, os peróxidos lipídicos estão anormalmente elevados no plasma materno (Ishiara, 1978; Wickens *et al.*, 1991; Maseki *et al.*, 1981), e há também um aumento da razão sistemas oxidantes/vitamina E no plasma materno que se associa com o desequilíbrio do balanço da relação tromboxano/prostaciclina (Wang *et al.*, 1991a e b).

Pré-eclampsia

Na gravidez normal, a implantação do embrião é seguida pela migração das células trofoblásticas nas paredes das artérias espiraladas uterinas. Estes vasos perdem a sua musculatura média e servem de condutores passivos ao acomodarem um fluxo sanguíneo uterino 10 vezes superior. Alguns autores pensam que este processo que normalmente ocorre entre as 10 e as 20 semanas de gestação não se verifica na pré-eclampsia e que é um dos primeiros sinais patofisiológicos do desenvolvimento da doença (Barron, 1992).

Se durante a gravidez normal o processo inflamatório é controlado pelo organismo materno, o mesmo não se verifica em gravidezes complicadas por hipertensão arterial com proteinúria (toxémia gravídica ou pré-eclampsia). Sendo os lipídeos as principais fontes de peróxidos lipídicos, faremos primeiro uma breve análise à composição lipídica do organismo materno durante a gravidez.

Lipídeos e gravidez

A gravidez provoca um aumento nos lipídeos plasmáticos, nomeadamente no colesterol que aumenta cerca de 25% (Alvarez e Bratvold, 1961; Potter e Nestel, 1979), enquanto os triglicerídeos aumentam cerca de 2 ou de 3 vezes (Kontinen *et al*, 1964). São ainda detectáveis alterações na composição lipídica e proteica das lipoproteínas (Hill *et al.*, 1975). Nelson *et al.* (1966) referem alterações adicionais em complicações da gravidez, tais como a toxemia em que foi verificado agravamento da hiperlipidemia. Garzetti *et al.* (1993) verificaram aumento de colesterol nas membranas das plaquetas; no entanto, também

verificaram existir discrepância entre o aumento de colesterol e o aumento da fluidez da membrana, a qual só poderia ser justificada através do aumento de ácidos gordos poli-insaturados. Com este aumento, o principal substrato para a peroxidação seriam os ácidos gordos poli-insaturados. O aumento de triglicerídeos no sangue materno é uma das alterações mais importantes durante o terceiro trimestre da gravidez (Herrera *et al.*, 1988). A passagem destes lipídeos através da placenta não foi detectada (Thomas *et al.*, 1983), pelo que o feto não beneficia directamente desta condição materna. Na placenta, o ácido araquidónico é libertado dos fosfolipídeos, convertido em ácidos gordos não esterificados e triglicerídeos, o que a torna mais sujeita ao processo da peroxidação (Ogburn *et al.*, 1988). Deste modo, Walsh (1985) atribui ao metabolismo lipídico (especialmente ao metabolismo do ácido araquidónico) uma função importante na patogénese da pré-eclampsia.

Lipídeos e pré-eclampsia

Para alguns autores (Brosens e Renaer, 1972; Dixon *et al.*, 1963; Robertson *et al.*, 1992; Olofsson *et al.*, 1993), a hipertensão induzida pela gravidez está associada com placentação anormal e constrição vascular das artérias do leito placentário. Em grávidas com pré-eclampsia verifica-se deposição de lipídeos nas paredes das artérias espiraladas uterinas (Sexton *et al.*, 1950; Kokia *et al.*, 1990; Branch *et al.*, 1994), o que vulgarmente se designa por aterose aguda. Esta situação parece estar associada à alteração das fracções lipídicas sanguíneas (Arbogast *et al.*, 1994). Na grávida normal e na pré-eclâmptica, os níveis de peróxidos lipídicos são elevados, sendo ainda de referir que nas pré-eclâmpticas a fracção das lipoproteínas de alta densidade (HDL) se encontra elevada.

Peroxidação lipídica e sistema cardiovascular

Para Hubel *et al.* (1989), as alterações patofisiológicas da pré-eclampsia no endotélio vascular estão explicadas em termos da disfunção endotelial vascular. Como as células endoteliais arteriais contactam com o sangue arterial, estão expostas a maiores pressões parciais de oxigénio que os outros tecidos. As células neste ambiente são particularmente vulneráveis à peroxidação lipídica iniciada por radicais livres de oxigénio. O aumento de peróxidos lipídicos circulantes pode significar disfunção da célula endotelial. Nas pré-eclâmpticas verificou-se uma vasoconstrição arteriolar e um redução de volume plasmático. Foi ainda verificada um aumento da resistência vascular sistémica (Assali *et al.*, 1960) paralelamente a uma redução do volume sanguíneo circulante (Chesley, 1972). O índice cardíaco nas pré-eclâmpticas era inferior às normais, o que se pode relacionar com a hipovolémia verificada na pré-eclampsia. É ainda de referir uma baixa produção de urina (Groenendijk *et al.*, 1984). Durante o parto, verifica-se um aumento no índice cardíaco

acompanhado por um aumento de volume sanguíneo circulante (Rafferty e Berkowitz, 1980; Phelan e Yurth, 1982).

Objectivos específicos do presente trabalho

O objectivo deste nosso estudo foi o de identificar marcadores sanguíneos do processo inflamatório desencadeado no organismo materno pela gravidez. Tentámos deste modo determinar o efeito do *stress* provocado pela gravidez nos vários orgãos do corpo humano, comparando os valores obtidos com os de uma população não grávida saudável. Em seguida escolhemos uma patologia gravídica, a pré-eclampsia, e comparámos os dois grupos de grávidas. Em ambos os grupos efectuámos as determinações pós-parto para conseguirmos ter uma ideia do *stress* da gravidez normal, da gravidez pré-eclâmptica e do significado do parto nestes dois grupos.

Capítulo 3. Material e Métodos

3.1. Casuística

3.1.1 Grávidas e puérperas

O protocolo deste trabalho foi aprovado pelo Conselho de Ética do Hospital de S. João do Porto. As pacientes que participaram neste estudo foram voluntárias escolhidas entre as mulheres que recorrem ao apoio do Serviço de Obstetrícia do Hospital de S. João. Foram estudado os seguintes quatro grupos de mulheres com idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos:

—Primigrávidas e normotensas durante toda a gestação;

—Primigrávidas com hipertensão induzida pela gravidez, normotensas antes das 20 semanas de amenorreia e obedecendo à definição de pré-eclampsia do Comité de Terminologia do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas. Nenhuma das mulheres hipertensas estudadas apresentava sinais de hemorragia ou de sofrimento fetal na altura da admissão.

Foram ainda excluídas pacientes com outras complicações obstétricas ou médicas como hipertensão essencial, doença renal crónica, alterações de crescimento, doença autoimune, diabetes mellitus ou qualquer outra doença a nível cerebral ou vascular. Este grupo de mulheres além da medicação com ferro fazia medicação anti-hipertensiva com ácido acetilsalicílico, prazosina com hidralazina ou com nifedipina.

—Puérperas internadas no Hospital de S. João sem história de hipertensão, não apresentando qualquer outro tipo de complicação obstétrica ou médica;

—Puérperas internadas no Hospital de S.João, cuja história clínica de pré-eclampsia estava perfeitamente definida.

3.1.2. Mulheres não grávidas (grupo de controlo)

Mulheres não grávidas normotensas e sem qualquer outra patologia, com idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos, não fazendo qualquer tipo de contracepção oral.

3.2. Objectivos do Trabalho Experimental

Os objectivos do trabalho experimental a seguir descrito foram os seguintes:

—Fazer o estudo longitudinal do *stress* induzido ao longo de uma gravidez normal;

—Estudar a variação do *stress* induzida pelo parto;

—Comparar os níveis de *stress* no 3º trimestre de gestação entre um grupo de grávidas normal e um grupo de grávidas pré-eclâmpticas;

—Comparar o nível de *stress* num grupo de puérperas normais e um grupo de puérperas pré-eclâmpticas;

—Identificar marcadores sanguíneos de *stress*.

Para este efeito foi colhido sangue a 11 mulheres não grávidas e a 194 grávidas e puérperas. Do grupo de grávidas e puérperas normais colheu-se sangue a 29 grávidas do 1º trimestre de gestação, a 31 grávidas do 2º trimestre, a 40 grávidas do 3º trimestre e a 30 puérperas.

Não foi possível efectuar no grupo de grávidas pré-eclâmpticas o mesmo tipo de estudo longitudinal. Usámos então a avaliação previamente efectuada no grupo sem patologia gravídica para posteriormente fazermos o estudo comparativo entre valores obtidos, para a mesma idade gestacional, entre as grávidas normais e as pré-eclâmpticas. Assim, no grupo de pré-eclâmpticas estudámos 42 casos no 3º trimestre e 22 casos pós-parto.

3.3. Bioquímica e Hematologia

O sangue foi colhido para tubos estéreis sem anticoagulante ou contendo o anticoagulante apropriado (heparina ou EDTA) para as diferentes determinações. As amostras foram conservadas a 4°C até serem convenientemente tratadas e analisadas num período máximo de 2 horas após a colheita. Para algumas determinações o plasma ou soro foi conservado a -20°C até serem efectuadas as análises. Para o estudo de marcadores sanguíneos de *stress* seleccionámos determinações que nos indicassem as alterações causadas em diferentes tecidos: sangue, fígado e rim.

Como marcadores de hemólise eritrocitária utilizámos a determinação da fragilidade osmótica, da haptoglobina e da hemoglobina no plasma. Determinámos ainda para os eritrócitos o seu número, o hematócrito e a hemoglobinémia. Como marcadores leucocitários escolhemos a determinação de produtos libertados durante a sua activação, como a elástase e a lactoferrina e ainda a determinação do seu número e a fórmula leucocitária. Quantificámos as plaquetas pela sua importância na hemostase. Para a caracterização da função hepática determinámos a γ-glutamiltranspeptídase, a transamínase do aspartato, a transamínase da alanina, a desidrogénase do ácido láctico e a bilirrubina total. Por último, como marcadores da função renal doseámos o ácido úrico, a ureia e a creatinina.

Como indicadores gerais do processo de *stress* e sistemas de protecção quantificámos a proteína C reactiva, a peroxidação lipídica através de determinações com o ácido tiobarbitúrico, verificando ainda a existência de sistemas adequados de protecção pelas determinações das vitaminas C e E plasmáticas.

3.4. Técnicas

Fragilidade osmótica do sangue heparinizado (Parpart *et al.*, 1947)

O sangue heparinizado é posto em contacto (na proporção de 1 para 100) com uma solução tampão salina (pH 7,4). A concentração da solução tampão varia entre 9,0 g/l e 1,0 g/l de NaCl. À medida que a concentração salina diminui, os eritrócitos incham e depois rebentam. Após 30 minutos da adição do sangue aos tubos com diferentes concentrações de NaCl, as soluções são centrifugadas e as concentrações de hemoglobina libertada são lidas nos sobrenadantes a 540 nm. Deste modo, a resistência dos eritrócitos é determinada através do

registo do início da hemólise (resistência mínima) e do registo da hemólise completa (resistência máxima).

É então possível obter uma "curva de fragilidade" construída com a percentagem de lise em função da correspondente concentração salina. A partir deste gráfico é calculada a concentração de NaCl (g/l) para que se verifique 50% de hemólise.

Haptoglobina do soro (Mancini *et al.*, 1965)

Volumes iguais de amostra e de soro de referência são adicionados aos poços de uma placa de agarose contendo um anti-soro monoespecífico. A amostra difunde-se radialmente através de gel e a substância a ser quantificada (antigénio) forma um anel de precipitina com o anti-soro monoespecífico. Os diâmetros dos aneis são medidos quando o complexo antigénio-anticorpo atinge um equilíbrio (método de ponto final). É construida uma curva de referência dos quadrados dos diâmetros dos aneis de precipitina em função das suas concentrações. As concentrações das amostras são obtidas por interpolação gráfica do valor ao quadrado dos diâmetros dos aneis obtidos para cada amostra.

Hemoglobina no plasma-heparinizado (Blakney e Dinwoodie,1975)

A fracção de absorção de uma porção da banda da oxi-hemoglobina a 578 nm, em conjunto com o coeficiente da absorção da oxi-hemoglobina, é usada para relacionar a absorção com concentração de hemoglobina. A fracção da absorvência da oxi-hemoglobina a 578 nm é proporcional à concentração de hemoglobina.

A fracção de absorção da oxihemoglobina a 578 nm é calculada a partir da absorção total a 578 nm, por subtracção da tangente à linha de base de absorção, cuja determinação é efectuada assumindo como base uma recta tangente à linha de base da absorção.

$$A_{562}-A_{598}=X$$

$$A_{562}-X=Y$$

$$(A_{578}-Y)\times 155=\text{Hemoglobina no plasma (mg/dl)}$$

$$2{,}25\times Y=\text{linha de base tangencial, calculada a 578 nm}$$

$$(A_{578}-Y)=\text{Absorvência fraccionada da oxi-hemoglobina.}$$

Hematócrito, eritrócitos, hemoglobina e leucócitos

Estas determinações foram feitas com um contador de células electrónico (Coulter, Roche Cobas Minos STX). O número de neutrófilos foi determinado no esfregaço do sangue periférico.

Plaquetas por um método visual

(Brecher e Cronkite, 1950)

A contagem das plaquetas é efectuada numa câmara de Neubauer a partir do sangue colhido em EDTA e tratado com oxalato de amónio a 1% para que as células sejam lisadas.

PMNL-Elástase

(12589 PMNL-elástase da Merck)(Plow, 1982)

A determinação da PMNL-elástase foi efectuada em EDTA-plasma. O plasma já separado é centrifugado nas 2 horas seguintes à colheita e em seguida rejeitada a camada de leucócitos eventualmente presentes. Uma alíquota de plasma é usado para a quantificação da elástase.

A quantificação da elástase é feita por um imunoensaio enzimático heterogéneo específico para a determinação da PMNL-elástase proveniente dos leucócitos polimorfonucleares que complexa com o inibidor da α_1-proteínase da PMNL-elástase (PI) do plasma. Durante a primeira incubação, o complexo PMNL-elástase-α_1PI da amostra liga-se aos anticorpos que revestem a parede do tubo pelo lado da PMNL-elástase. No segundo passo da incubação são adicionados anticorpos marcados com fosfátase alcalina que se ligam à parte da α_1-PI do complexo. Após ser retirado o excesso de anticorpos marcados com a fosfátase alcalina, a actividade enzimática da fosfátase alcalina imunocomplexada (com o para-nitro-fenil-fosfato em pH 9,8) é medida a 405 nm. A quantidade de corante formado é directamente proporcional à concentração de PMNL-elástase-α_1-PI. É construída uma curva de calibração dos valores das absorvências dos padrões em função das suas concentrações. As concentrações das amostras são obtidas por interpolação gráfica dos valores das absorvências lidos.

Lactoferrina do soro usando uma técnica competitiva de Elisa

(Douglas e Craig, 1989)

As placas de Elisa são revestidas por lactoferrina em tampão carbonato. Os padrões e as amostras são diluídas em soro anti-lactoferrina de coelho e imediatamente adicionadas aos poços. A lactoferrina imobilizada compete com a lactoferrina livre que está em solução para a imunoglobulina anti-lactoferrina. Os anticorpos ligados à fase imobilizada são detectados

com peroxídase conjugada com IgG anti-coelho e revelada com 1,2-fenilenodiamina. A reacção é parada com ácido sulfúrico e a absorvência do produto final é lida a 492 nm. É construida uma curva de calibração dos valores das absorvências dos padrões em função das suas concentrações. As concentrações das amostras são obtidas por interpolação gráfica.

Transamínases
(IFCC)

—Determinação da actividade catalítica aminotransférase do aspartato (ASAT, AST, GOT, EC 2.6.1.1), bem como da aminotransférase da alanina (ALAT, ALT, GPT, EC 2.6.1.2), do soro, por um testes cinéticos em 340 nm.

$$\text{L-Aspartato} + \text{2-Oxoglutarato} \rightarrow \text{L-glutamato} + \text{oxaloacetato}$$
$$\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + H^+ \rightarrow \text{L-malato} + NAD^+$$

A velocidade de oxidação do NADH, catalisada pela desidrogénase do malato (ou pela do lactato), é proporcional à actividade catalítica da transamínase, e determina-se pela diminuição da absorvência.

$$\text{L-Alanina} + \text{2-oxoglutarato} \rightarrow \text{L-glutamato} + \text{piruvato}$$
$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightarrow \text{L-lactato} + NAD^+$$

Desidrogénase do ácido láctico
(Wroblewski e La Due, 1956)

Determinação da desidrogénase do ácido láctico (LDH EC 1.1.1.27) do soro, por um método cinético.

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightarrow \text{L-lactato} + NAD^+$$

A velocidade de oxidação do NADH é proporcional à actividade catalítica do LDH. A determinação é efectuada através da redução da absorvência a 340 nm.

Bilirrubina do soro
(Jendrassik e Grof, 1938)

A bilirrubina forma com o cloreto de 4-sulfobenzenodiazónio um azocomposto de cor vermelha, a azobilirrubina. A intensidade da coloração (medida a 578 nm) é directamente proporcional à concentração de bilirrubina.

Ureia do soro

(Tiffany *et al.*, 1972)

$$\text{Ureia} + 2H_2O \rightarrow 2NH^{4+} + HCO_3^-$$

$$NH^{4+} + \text{2-oxoglutarato} + NADH \rightarrow \text{L-glutamato} + NAD^+ + H_2O$$

A velocidade de oxidação do NADH, catalisada pela desidrogénase do glutamato, é proporcional à actividade catalítica da uréiase, e determina-se pela diminuição da absorvência a 340 nm.

Ácido úrico do soro

(Barham e Trinder, 1972)

Determinação enzimático-colorimétrica com urícase e 4-aminofenazona (PAP).

$$\text{Ácido úrico} + O_2 + 2H_2O \rightarrow \text{alantoína} + CO_2 + H_2O_2$$

O peróxido de hidrogénio conjuga-se com o ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfónico (DHBS) e com a 4-aminofenazona, na presença de peroxídase, dando origem a um derivado de quinoneimina de cor vermelha. A concentração da quinoneimina formada é determinada espectrofotometricamente entre 480 e 550 nm.

Creatinina do soro

(Jaffé, modificado por Bartels e Bohmer, 1971)

Em solução alcalina, o picrato reage com a creatinina formando 2,4,6-trinitrociclohexadienato de cor alaranjada. A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração de creatinina e é determinada espectrofotometricamente entre 490 e 510 nm.

Proteína C reactiva do soro

(Pepys, 1981)

Esta determinação é efectuada por uma reacção imunológica entre a proteína C reactiva (CRP) humana com os correspondentes anticorpos anti-CRP humanos ligados a particulas de látex. A CRP humana forma com o anti-soro específico um precipitado que é medido turbidimetricamente a 340 nm por um método de ponto final.

γ-Glutamiltransférase do soro

(Persijn *et al.*, 1971)

Determinação cinética da actividade da γ-glutamil-transférase (γGT) segundo a reacção

L-γ-glutamil-p-nitroanilina + glicilglicina → L-γ-glutamilglicilglicina + p-nitroanilina

A velocidade de síntese da p.nitroanilina é proporcional à actividade catalítica da γ-GT. A determinação é efectuada através da variação da absorvência a 405 nm.

Peróxidos lipídicos do soro

O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) é o mais vulgarmente utilizado para quantificação da peroxidação lipídica. O material lipídico é aquecido com TBA a um baixo pH, formando-se um cromogénio cuja leitura espectrofotométrica é feita a 532 nm (Niehaus e Samuelson, 1968) ou fluorimétrica a 553 nm após extracção com 1-butanol (Yagi, 1976). Este cromogénio é formado por reacção de uma molécula de malonildialdeído com duas moléculas de TBA.

Vitamina C do plasma heparinizado

(Tarada, descrito por Carr *et al.*, 1983)

O ácido ascórbico é oxidado pelo 2,6-diclorofenol-indofenol a ácido desidroascórbico, o qual reage com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina formando um derivado de hidrazona que é medido espectrofotometricamente a 524 nm.

Vitamina E do soro

(Abe e Katsui , 1975)

A determinação da Vitamina E (tocoferol) é feita por uma técnica fluorimétrica. Após a adição de etanol ao soro, o tocoferol é extraído com n-hexano. A determinação da concentração do tocoferol no n-hexano é efectuada num espectrofluorímetro com excitação a 295 nm e emissão a 320 nm.

3.5. Estudo Estatístico

Todas as determinações foram efectuadas em duplicado. Os resultados estão expressos como médias ± SEM. A significância estatística das diferenças entre médias foi determinada usando o teste t de Student.

Capítulo 4. Resultados

Os resultados estão divididos em cinco secções, as quais consideram o *stress* nas seguintes situações:

—Ao longo da gravidez;

—No 3º trimestre nas pré-eclâmpticas e nas grávidas normais;

—Em puérperas (com gravidez normal e com pré-eclampsia gravídica);

—No pós-parto, comparativamente ao 3º trimestre (normais e pré-eclâmpticas);

—No pós-parto, comparativamente ao grupo de controlo (normais e pré-eclâmpticas).

Os valores encontrados para as determinações efectuadas no sangue estão divididos em cinco tabelas, as quais se apresentam em anexo no fim deste trabalho. A partir dos valores nelas expostos prepararam-se igualmente os gráficos das figuras.

Tabela 1: Concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante a gravidez normal e o puerpério.

Tabela 2: Tabela corrigida para os aumentos de volume descritos durante a gravidez normal.

Tabela 3: Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante o 3º trimestre de gravidez normal e o 3º trimestre de gravidez pré-eclâmptica.

Tabela 4: Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante o pós-parto de uma gravidez normal e o pós-parto de uma gravidez pré-eclâmptica.
Tabela 5: Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos antes e após o partto num grupo de mulheres com gravidez normal.
Tabela 6: Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos antes e após o parto num grupo de mulheres com pré-eclampsia gravídica.
Tabela 7: Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos no pós-parto de grávidas de grávidas normais e pré-eclâmpticas e o grupo de não grávidas (controlo).

4.1. O *stress* ao longo da gravidez

As figuras representam a evolução dos parâmetros no grupo de mulheres não grávidas saudáveis e no grupo de grávidas sem patologia nos três trimestres de gestação. As alterações significativas dos resultados durante os diferentes trimestres da gravidez são sempre dados em relação aos valores encontrados no sangue do grupo de mulheres não grávidas.

4.1.1. O *stress* e o rim

(Fig. 1)

Ureia —A concentração diminui de 31,4±1,5 mg/dl no grupo de controlo para 19,1±1,3 mg/dl no 1º trimestre de gravidez, aumenta ligeiramente no 2º trimestre (21,5±1,0 mg/dl) mantendo-se esta concentração no 3º trimestre (21,3±0,9 mg/dl).

Ácido úrico —Os valores diminuem no início da gravidez de 3,0±0,2 mg/dl no grupo de controlo para 2,7±0,1 mg/dl no 1º trimestre de gravidez. As concentrações plasmáticas mantêm-se baixas no 2º trimestre (3,1±0,1 mg/dl), aumentando no 3º trimestre para 4,1±0,2 mg/dl.

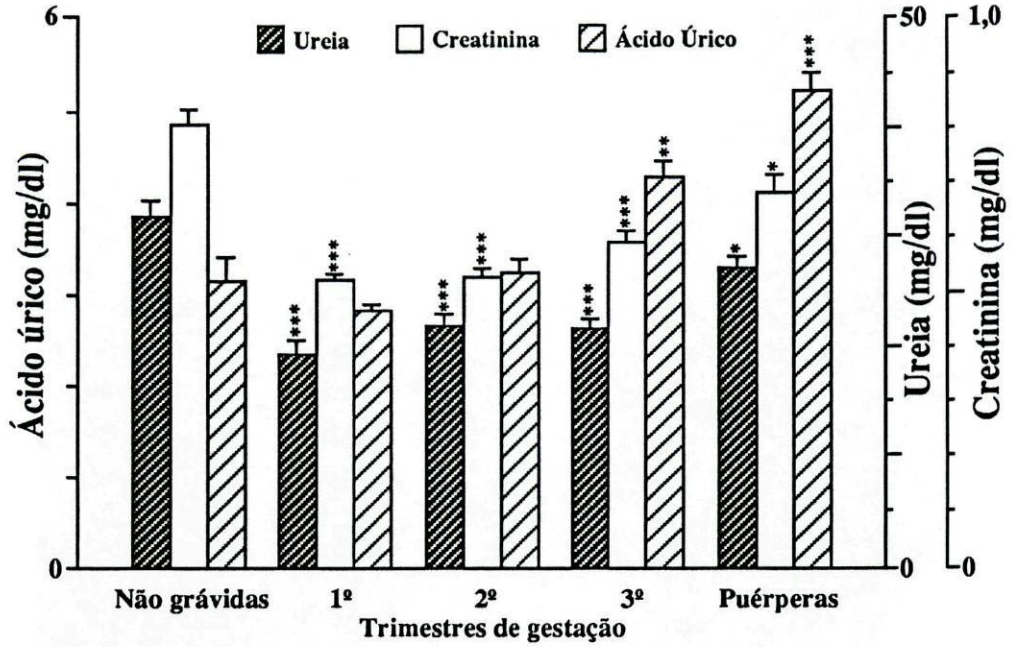


Figura 1. Testes da função renal. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: * p <0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

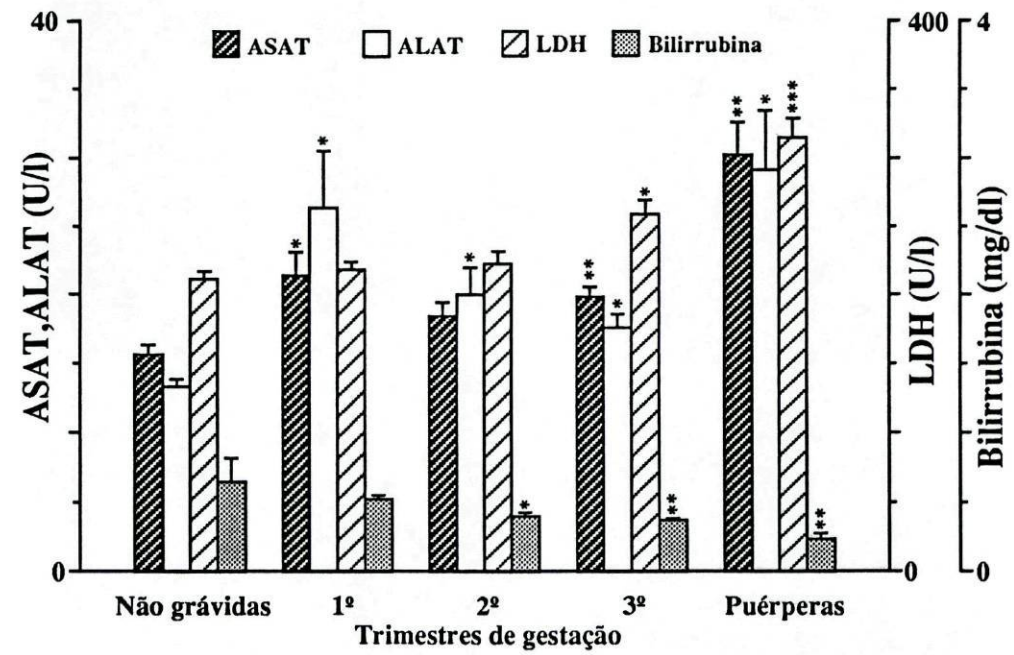


Figura 2. Testes de função hepática. Actividades de transamínase da alanina (ALAT), transamínase do aspartato (ASAT), desidrogénase láctica (LDH) e bilirrubina total. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: * p <0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Creatinina —A concentração diminui no início da gravidez de 0,79±0,02 mg/dl para o grupo de controlo para 0,51±0,01 mg/dl no 1º trimestre de gravidez; mantém-se a sua concentração no 2º trimestre (0,52± 0,02 mg/dl), aumentando no 3º trimestre para 0,58±0,02 mg/dl.

4.1.2. O *stress* e o fígado

(Fig. 2)

ASAT —A aminotransférase do aspartato (ASAT) aumenta significativamente do grupo de controlo (15,7±0,7 U/l) para o 1º trimestre de gravidez (21,4±1,7 U/l), mas diminui no 2º trimestre de gravidez (18,5±0,9 U/l); aumenta significativamente no 3º trimestre (19,9±0,7 U/l).

ALAT —A variação da aminotransférase da alanina (ALAT) é idêntica à da ASAT até ao 2º trimestre; aumenta significativamente no 1º trimestre (de 13,4±0,5 U/l para 26,4±4.0 U/l), diminui no 2º trimestre (20,1±1,9 U/l) e diminui significativamente no 3º trimestre (17,7±0,9 U/l).

LDH —A desidrogénase do ácido láctico (LDH) aumenta ligeiramente de 206±6 U/l no grupo de controlo para 213±5 U/l no 1º trimestre de gravidez, continua a aumentar no 2º trimestre (218±7 U/l) e no 3º trimestre (252±9 U/l).

Bilirrubina total —A concentração de bilirrubina total só diminui significativamente após o 2º trimestre. No grupo de controlo a concentração encontrada foi de 0,66±0,16 mg/dl, no 1º trimestre de gestação 0,53±0,02 mg/dl, no 2º trimestre 0,40±0,03 mg/dl e no 3º trimestre 0,37±0,02 mg/dl.

4.1.3. Peroxidação lipídica e defesas antioxidantes

Peróxidos lipídicos (Fig. 3)

Os níveis de foram determinados por duas técnicas, TBA (método colorimétrico) e MDA-TBA (método fluorimétrico); em ambas as técnicas verificou-se aumento significativo dos níveis de peróxidos durante os três trimestres de gravidez quando comparados com os valores obtidos para o grupo de controlo.

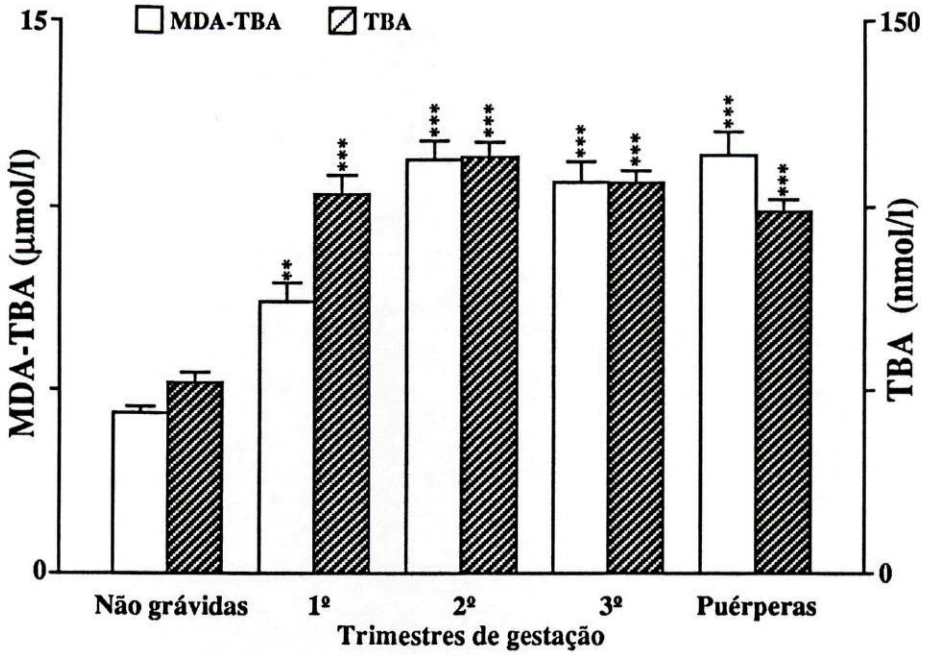


Figura 3. Testes de determinação dos peróxidos lipídicos. Concentração dos produtos da reacção com o ácido tiobarbitúrico pelo método colorimétrico (TBA) e pelo método fluorimétrico (MDA-TBA). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

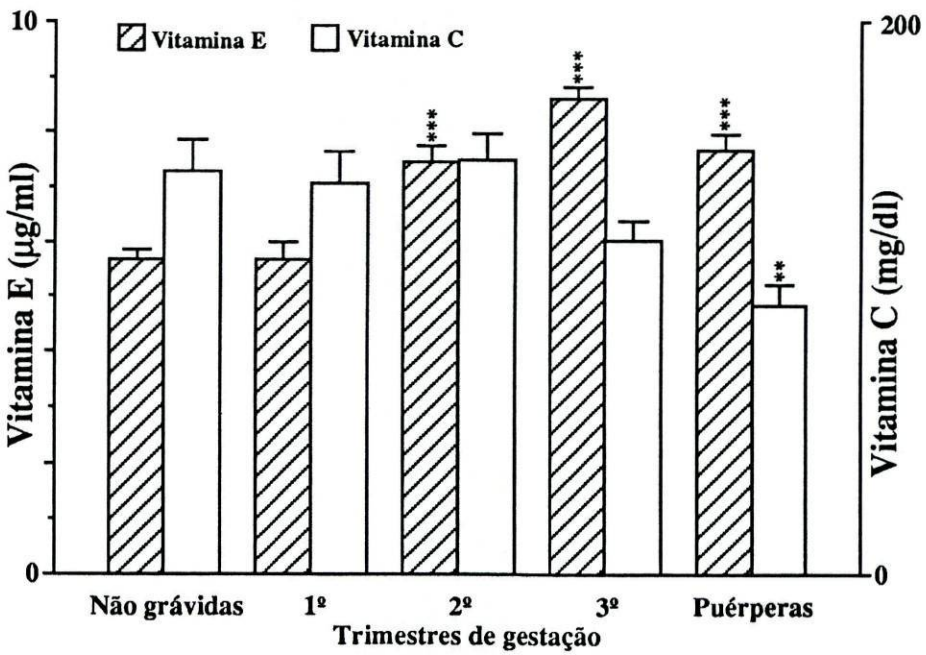


Figura 4. Defesas antioxidantes. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Defesas antioxidantes (Fig. 4)

Vitamina C —A concentração plasmática de ácido ascórbico diminui de cerca de 140 mg/dl no grupo de controlo (1º e 2º trimestres de gravidez) para 120 mg/dl no 3º trimestre.

Vitamina E —A concentração plasmática de α-tocoferol não aumenta no 1º trimestre de gravidez (5,6±0,3 μg/ml), sendo igual ao grupo de controlo (5,6±0,1 μg/ml), e aumentando progressiva e significativamente durante o resto da gestação até atingir 8,5±0,2 μg/ml no 3º trimestre.

Razão defesas peróxidos lipídicos/defesas antioxidantes (Fig. 5)

A razão dos peróxidos lipídicos/sistemas de defesa antioxidantes aumenta durante a gravidez, sendo o aumento significativo em duas das quatro razões determinadas.

4.1.4. Inflamação e leucócitos

Foram determinados os leucócitos e seus produtos de desgranulação (Fig. 6).

Leucócitos —O seu número aumenta significativamente no 1º trimestre de gravidez ($10,2\pm0,2 \times 10^9$/l) quando comparado com o valor obtido para o grupo de controlo ($5,6\pm0,2) \times 10^9$/l. Este valor mantém-se mais ou menos constante até ao final da gravidez ($9,8\pm0,3 \times 10^9$/l).

Elástase —A elástase do plasma não parece alterar-se significativamente durante a gravidez, apresentando um valor médio de 52±8 μg/l, o que difere dos resultados do outro produto de desgranulação leucocitária —a lactoferrina.

Lactoferrina —A concentração de lactoferrina plasmática aumenta significativamente no início da gravidez (de 0,70±0,14 μg/ml no grupo de controlo para 2,56±0,33 μg/ml no 1º trimestre da gravidez), continuando a verificar-se aumento significativo no 2º trimestre (3,89±0,65 μg/ml), seguido por um ligeiro decréscimo no 3º trimestre (3,02±0,40 μg/ml).

4.1.5. Perfil hematológico

Estão representados na figura 7 três índices hematimétricos.

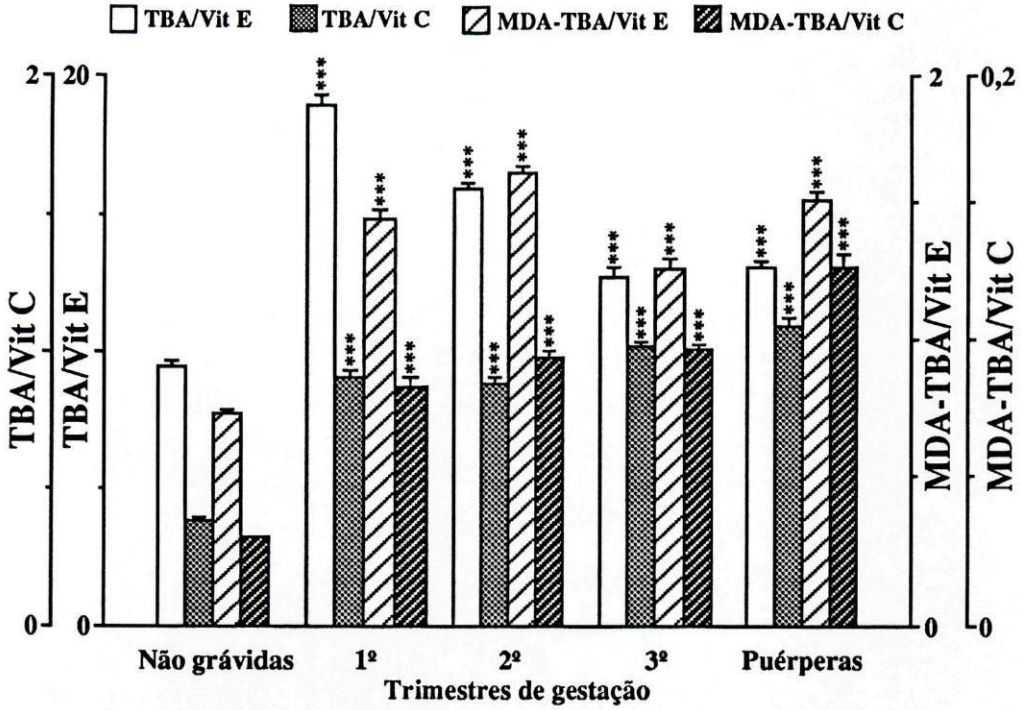


Figura 5. Razões peroxidação lipidica/defesas antioxidantes: produtos da peroxidação lipídica com vitamina E e vitamina C. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: * p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

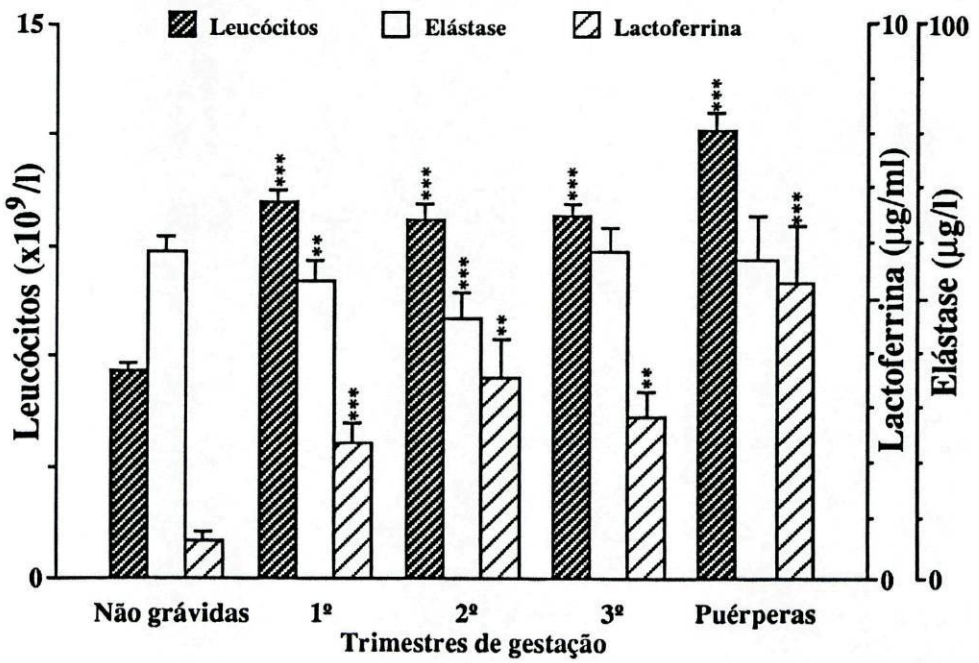


Figura 6. Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos (lactoferrina e elástase). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

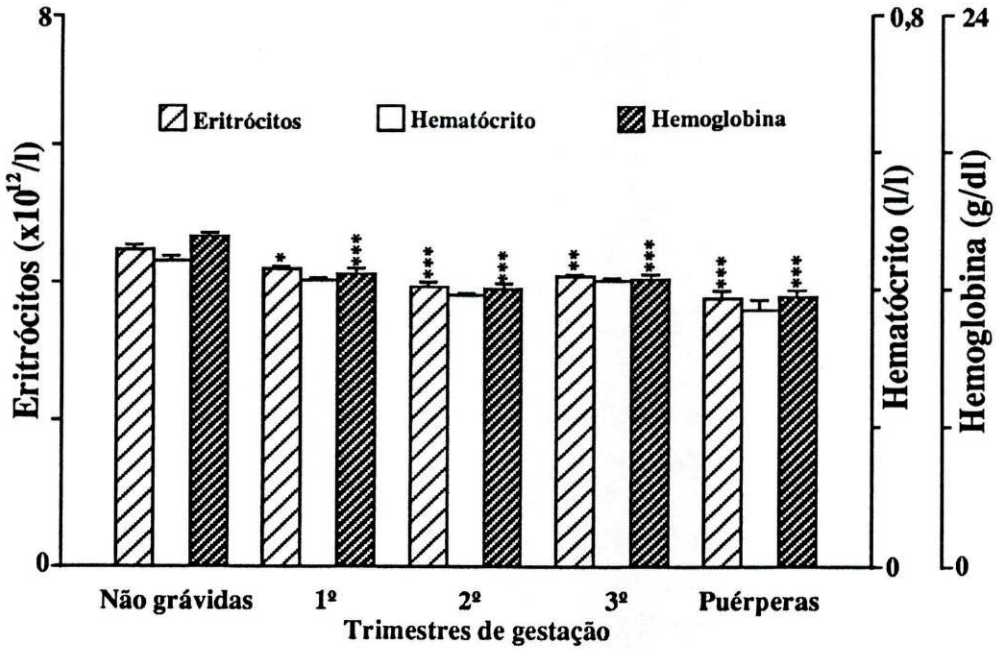


Figura 7. Perfil hematológico. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

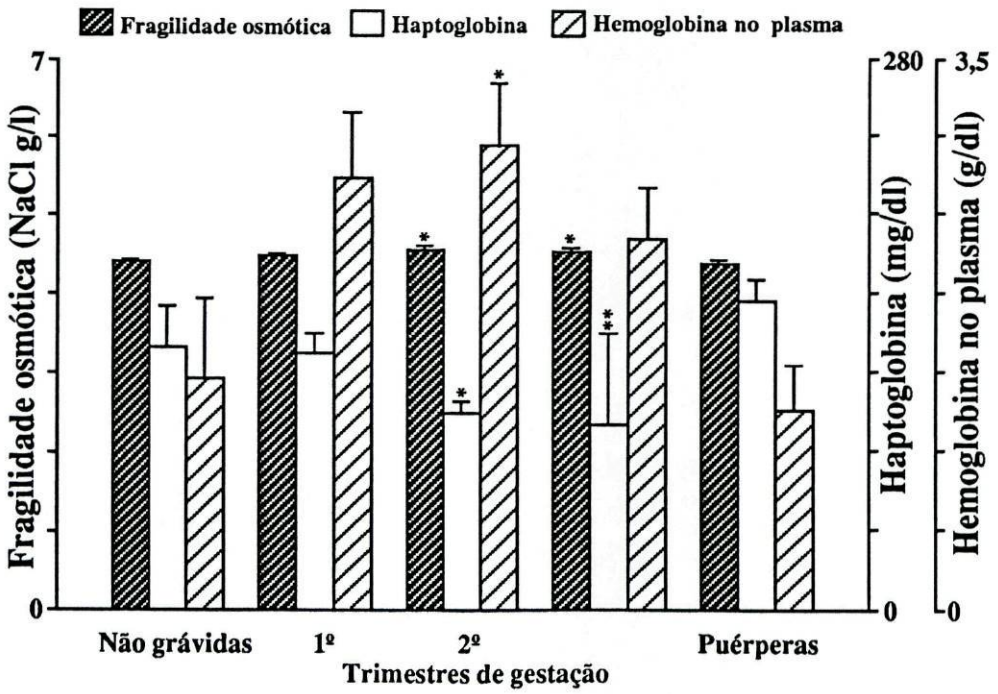


Figura 8. Índices eritrocitários. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

Hematócrito —As variações não são significativas. O valor do hematócrito diminui de 0,43±0,01 l/l no grupo de controlo para 0,40±0,004 l/l no 1º trimestre e para 0,38±0,005 l/l no 2º trimestre, seguido por um ligeiro aumento no 3º trimestre (0,40±0,005 l/l).

Hemoglobina —A concentração de hemoglobina diminui significativamente durante a gravidez: de 14,0±0,2 g/dl no grupo de controlo para 12,4±0,2 g/dl no 1º trimestre, mantendo-se baixa no 2º trimestre (11,8±0,1 g/dl), seguindo-se um aumento no 3º trimestre (12,3±0,1 g/dl).

Eritrócitos —O seu número também diminui significativamente. O valor no grupo de controlo é de $4,50\pm0,06\times10^{12}$/l e no 1º trimestre de $4,20\pm0,06\times10^{12}$/l. Este valor diminui no 2º trimestre ($3,99\pm0,06\times10^{12}$/l), aumentando no 3º trimestre para $4,11\pm0,05\times10^{12}$/l.

Índices de hemólise eritrocitária (Fig. 8)

Hemoglobina no plasma —A concentração no plasma aumenta no 1º trimestre de gravidez (2,68±0,42 mg/dl) quando comparada com os valores do grupo de controlo (1,44±0,49 mg/dl), aumentando significativamente no 2º trimestre (2,89±0,39 mg/dl), seguido por um ligeiro decréscimo no 3º trimestre (2,31±0,31 mg/dl).

Haptoglobina —A sua concentração diminui de 132±19 mg/dl no grupo de controlo para 128±10 mg/dl no 1º trimestre de gravidez. No entanto, somente as variações no 2º e no 3º trimestres (99 mg/dl e 93 mg/dl, respectivamente) se apresentam significativas.

Fragilidade osmótica —Os valores obtidos para o teste da fragilidade osmótica aumentam no 1º trimestre de gravidez (4,44±0,03 g/l NaCl) comparativamente ao grupo de controlo (4,36±0,03 g/l NaCl). Os valores encontrados para o 2º e 3º trimestres (4,52±0,03 e 4.50±0,03 g/l NaCl, respectivamente) apresentam diferenças significativas em relação ao grupo de controlo.

4.1.6. Marcadores de inflamação

(Fig. 9)

Proteína C reactiva —Verificou-se um aumento significativo na sua concentração durante a gravidez (0,61±0,040 mg/dl) em relação ao valor encontrado para o grupo de controlo (0,25±0,01 mg/dl).

γ-Glutamiltranspeptídase —A concentração plasmática deste marcador hepático de inflamação diminui significativamente entre o grupo de controlo e o grupo de grávidas.

4.1.7. Marcador de *stress*

(Fig. 10)

A concentração plasmática de lactoferrina é representada em função do número de neutrófilos. A sua concentração plasmática aumenta significativamente desde o início da gravidez, só apresentando uma ligeira redução no 3º trimestre, o mesmo se verificando quando a sua concentração é representada em função do número de neutrófilos.

4.2. O *stress* do 3º trimestre nas pré-eclâmpticas e nas grávidas normais

As figuras representam os valores encontrados para os diferentes parâmetros determinados durante o 3º trimestre no grupo de mulheres grávidas sem patologia e no grupo de grávidas pré-eclâmpticas. As alterações significativas dos resultados são sempre dadas em relação aos valores encontrados para o grupo de mulheres grávidas sem patologia.

4.2.1. O *stress* e o rim

(Fig.11)

Ureia —Verificámos uma diferença significativa na concentração de ureia entre o grupo de grávidas com patologia e o grupo de grávidas sem patologia. O soro das grávidas pré-eclâmpticas apresenta uma concentração de ureia mais elevada (29,1±2,0 mg/dl) que o soro das grávidas normais (21,3±0,9 mg/dl).

Ácido úrico —A taxa de ácido úrico do apresenta também uma diferença significativa entre os dois grupos. Enquanto nas grávidas sem patologia o valor médio é 4,1±0,2 mg/dl, no grupo de pré-eclâmpticas a concentração de ácido úrico é de cerca de 5,9±0,2 mg/dl.

Creatinina —A concentração de creatinina também difere significativamente entre os dois grupos. A concentração de creatinina para o grupo de normais é de 0,58±0,02 mg/dl e no grupo com patologia é de 0,68±0,02 mg/dl.

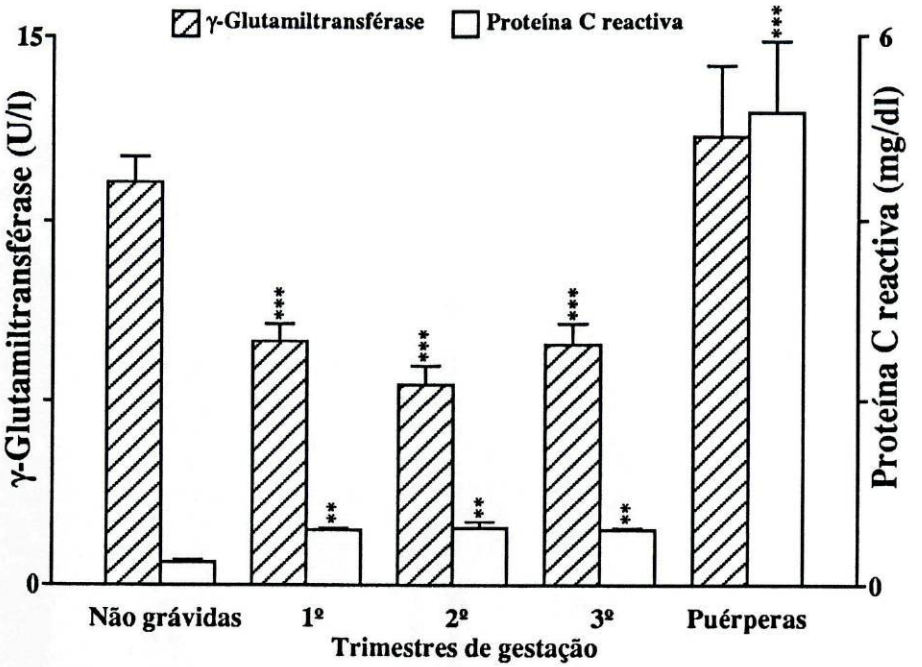


Figura 9. Marcadores inflamatórios. Dados representados como média± SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não grávida: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

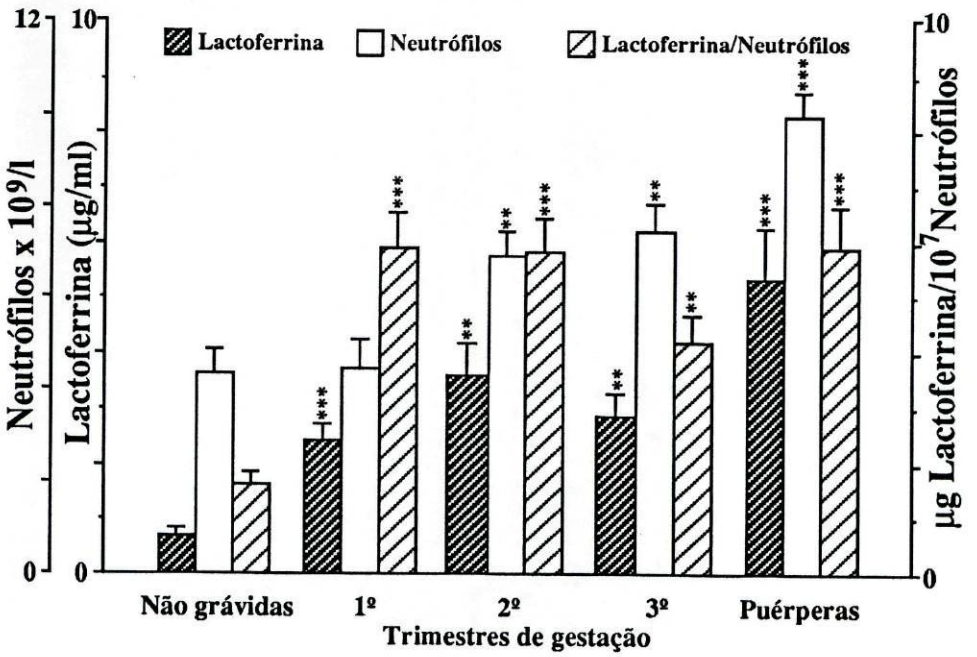


Figura 10. Teste de activação dos neutrófilos. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores obtidos na não-grávida: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.2.2. O *stress* e o fígado

(Fig. 12)

ASAT —A aminotransférase do aspartato aumenta significativamente do grupo de normais (19,9±0,7 U/l) para o grupo com patologia (26,6±1,9 U/l).

ALAT —Também a aminotransférase da alanina é superior no grupo com patologia (26,4±3,4 U/l) em relação ao grupo sem patologia (17,7±0,9 U/l).

LDH —Apesar de o valor para a desidrogénase do ácido láctico ser superior no soro das grávidas pré-eclâmpticas (288±15 U/l), a diferença não é significativa em relação ao grupo de grávidas sem patologia (252±9 U/l).

Bilirrubina total —Para este parâmetro, as diferenças encontradas entre os dois grupos não são significativas (0,37±0,02 mg/dl para as normais e 0,39±0,04 mg/dl para as pré-eclâmpticas).

4.2.3. Peroxidação lipídica e defesas antioxidantes

Peróxidos lipídicos (Fig. 13) —Os níveis de peróxidos lipídicos determinados por duas técnicas não apresentam diferenças significativas entre os dois grupos.

Defesas antioxidantes (Fig. 14)

Vitamina C —A concentração plasmática de ácido ascórbico é ligeiramente menor no grupo de grávidas normais (118,1±6,4 mg/dl) do que no grupo de pré-eclâmpticas (119,5±6,1 mg/dl).

Vitamina E —A concentração plasmática de α-tocoferol é muito semelhante nos dois grupos: no grupo com patologia é de 8,7±0,3 μg/ml e no grupo sem patologia de 8,5±0,2 μg/ml.

Razão peróxidos lipídicos/defesas antioxidantes (Fig. 15)

A razão dos peróxidos lipídicos/antioxidantes é muito semelhante entre os dois grupos.

4.2.4. Inflamação e leucócitos

(Fig. 16)

Leucócitos —O seu número não difere significativamente entre os dois grupos.

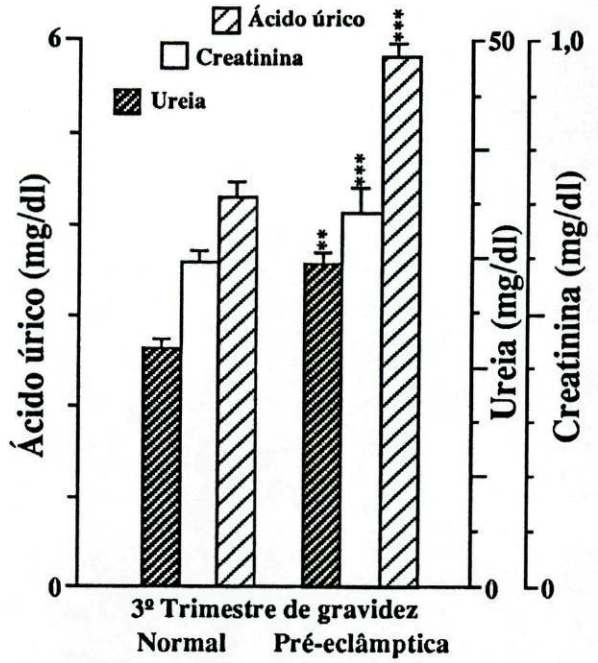


Figura 11. Testes da função renal. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

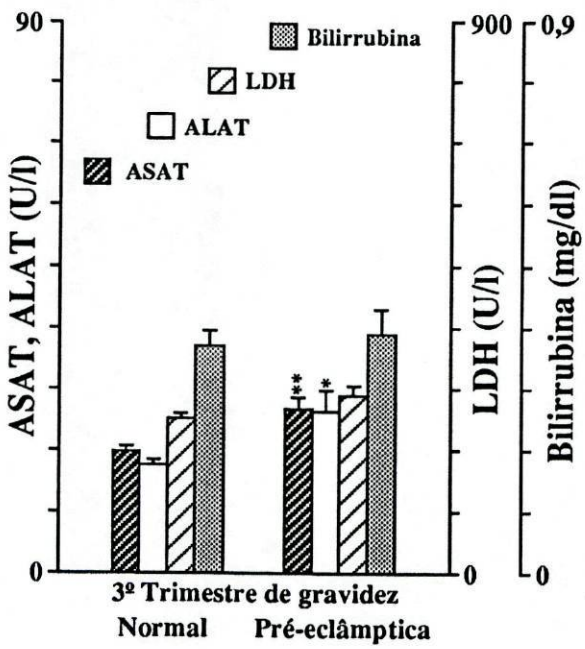


Figura 12. Testes da função hepática. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

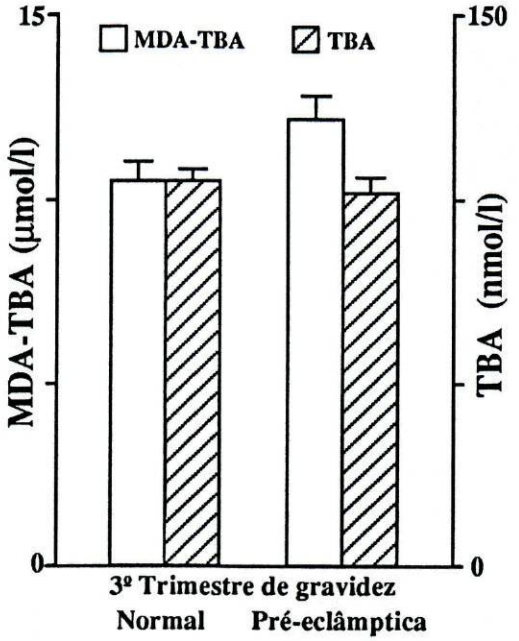


Figura 13. Testes de determinação dos peróxidos lipídicos. Concentração dos produtos da reacção com o ácido tiobarbitúrico pelo método colorimétrico (TBA) e pelo método fluorimétrico (MDA-TBA). Dados representados como média±SEM. Altera- ções significativas em relação aos valores da gravidez normal:
*** $p<0,05$; ** $p<0,01$; ***$p<0,001$.**

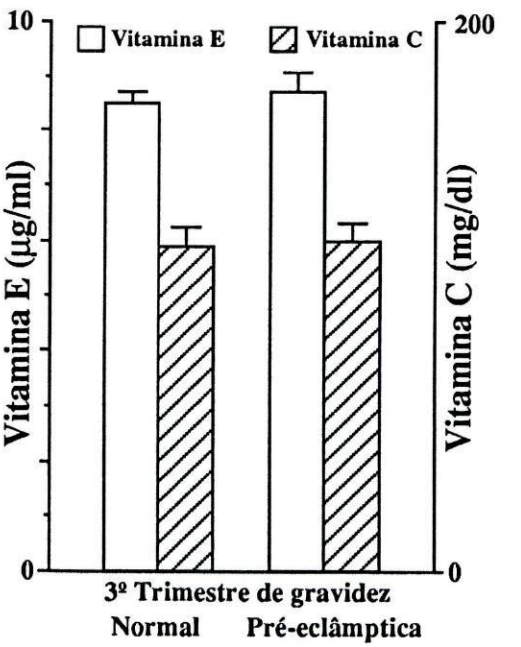


Figura 14. Defesas antioxidantes. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
*** $p<0,05$; ** $p<0,01$; ***$p<0,001$.**

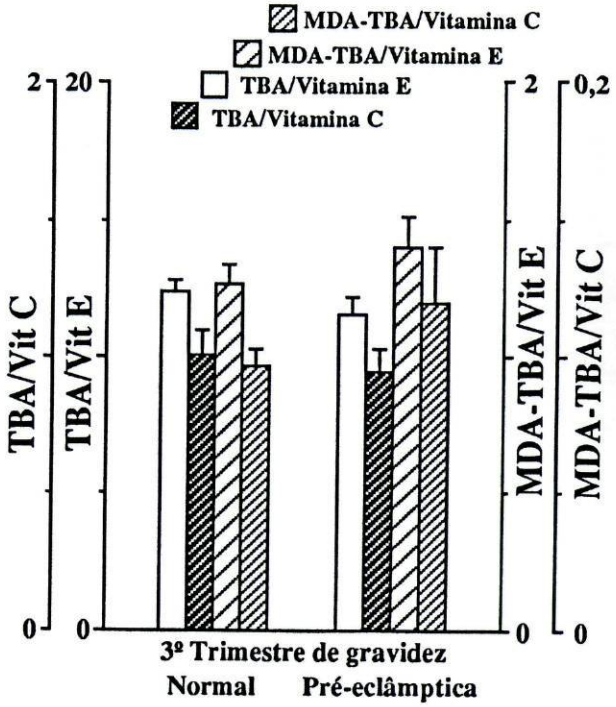


Figura 15. Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes: produtos da peroxidação lipidica com vitamina E e vitamina C. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

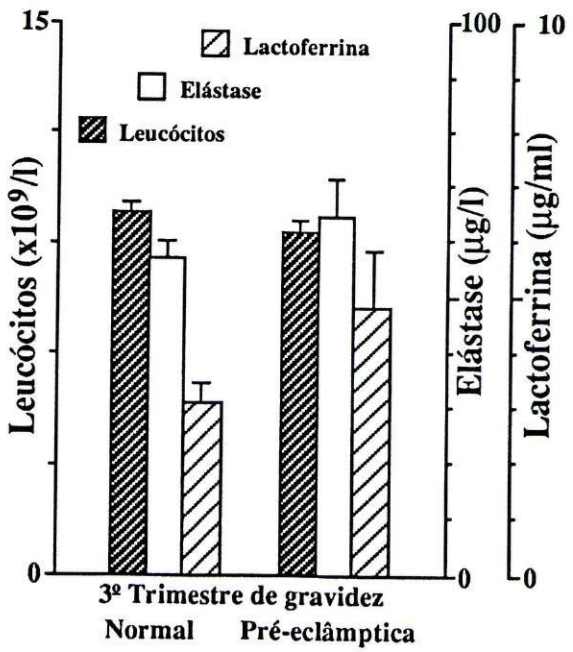


Figura 16. Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos (lactoferrina e elástase). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
*** $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.**

Elástase —Apesar de a concentração de elástase ser superior no plasma das pré-eclâmpticas (63,3±6,0 µg/l), este valor não difere significativamente do encontrado para o grupo sem patologia (58,4±4,2 µg/l).

Lactoferrina —A concentração de lactoferrina plasmática é superior no grupo com patologia (4,63±1,08 µg/ml), sem contudo se verificar significado estatístico quando comparámos esse valor com o grupo sem patologia (3,02±0,40 µg/ml).

4.2.5 Perfil hematológico

(Fig. 17)

Estão representados na figura três índices hematimétricos:

Hematócrito —Para o grupo de grávidas normais o valor do hematócrito é de cerca de 0,40±0,005 l/l, enquanto nas pré-eclâmpticas o valor médio é de 0,39±0,007 l/l.

Hemoglobina —A concentração de hemoglobina é semelhante nas duas populações estudadas.

Eritrócitos —O seu número não difere entre os dois grupos.

Índices de hemólise eritrocitária (Fig. 18)

Hemoglobina no plasma —A concentração de hemoglobina no plasma é significativamente diferente entre os dois grupos: 2.31±0,31 mg/dl para o grupo de grávidas normais e 1,52±0,25 mg/dl para o grupo com pré-eclampsia.

Haptoglobina —A concentração da haptoglobina não apresenta diferença significativa entre os dois grupos: 93±5 mg/dl para o grupo sem patologia e 109±6 mg/dl para as pré-eclâmpticas.

Fragilidade osmótica —Encontrámos diferenças significativas entre os dois grupos quando determinámos o valor médio para a fragilidade osmótica: 4.50±0,03 g/l NaCl para as normais e 4.32±0,04 g/l NaCl para as pré-eclâmpticas.

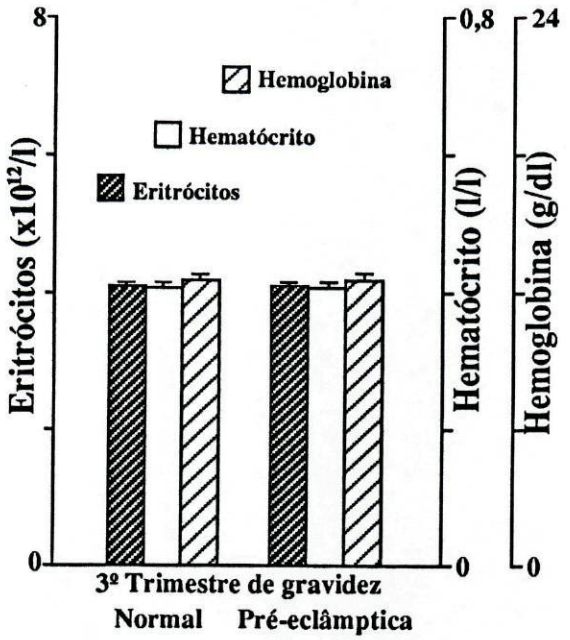


Figura 17. Perfil hematológico. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

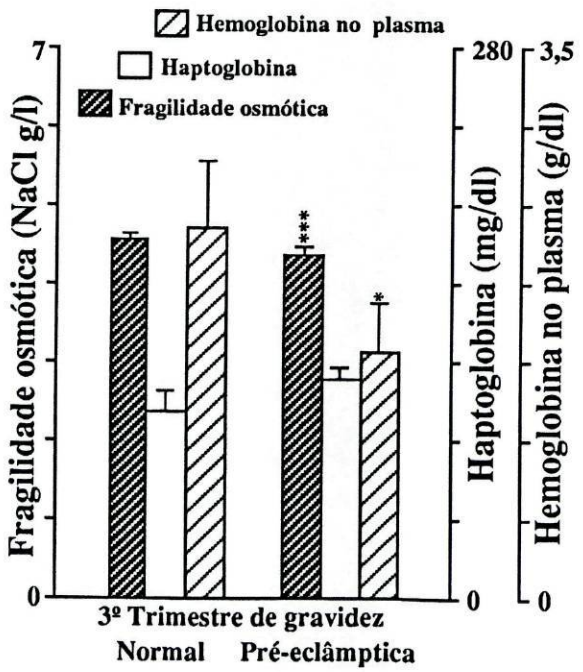


Figura 18. Índices eritrocitários. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

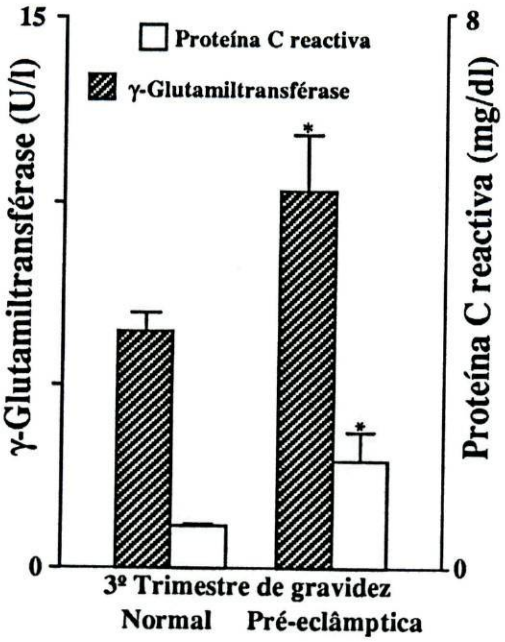


Figura 19. Marcadores inflamatórios. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
***p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001.**

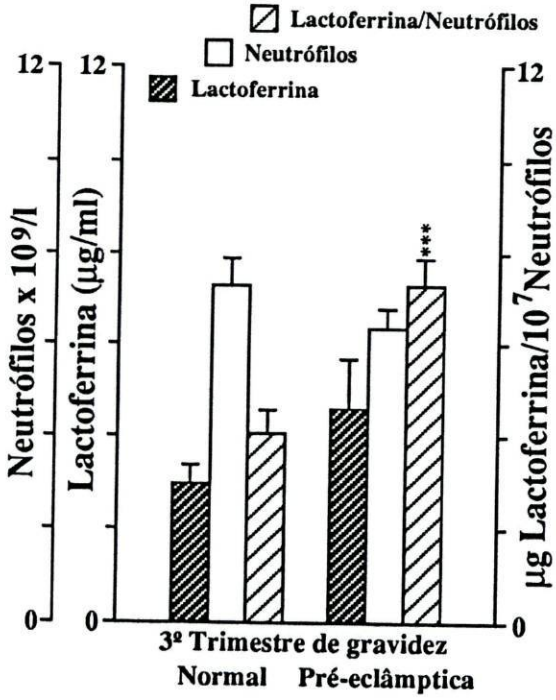


Figura 20. Teste de activação dos neutrófilos. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
***p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.**

4.2.6. Marcadores de inflamação

(Fig. 19)

Proteína C reactiva —A concentração plasmática no grupo com pre-eclampsia é significativamente maior (1,56±0,41 mg/dl) no grupo de pré-eclâmpticas do que no grupo sem patologia (0,60±0,03 mg/dl).

γ-Glutamiltranspeptídase —A concentração plasmática deste marcador hepático de inflamação difere significativamente entre os dois grupos: 6,5±0,5 U/l nas normais e 10,3±1,5 U/l para as pré-eclâmpticas.

4.2.7. Marcador de *stress*

(Fig. 20)

A concentração plasmática de lactoferrina não é significativamente diferente entre os dois grupos, o mesmo se verificando em relação ao número de neutrófilos. Quando o resultado da concentração plasmática de lactoferrina é dado em função do número de neutrófilos, verificámos que o valor é significativamente maior no grupo com pré-eclampsia.

4.3. O *stress* em puérperas (com gravidez normal e com pré-eclampsia gravídica)

Para estudarmos o *stress* induzido pelo parto, efectuámos as determinações no sangue de puérperas de dois grupos: um grupo de mulheres cuja gravidez tinha decorrido sem qualquer patologia associada e um grupo de mulheres com diagnóstico de pré-eclampsia gravídica.

As figuras representam os valores encontrados para os diferentes parâmetros determinados durante o puerpério no grupo de mulheres com gravidez normal e no grupo de mulheres com gravidez pré-eclâmptica. As alterações significativas dos resultados são sempre dadas em relação aos valores encontrados para o grupo de puérperas cuja gravidez tinha decorrido sem nenhuma patologia associada.

4.3.1. O *stress* e o rim

(Fig. 21)

Ureia —A concentração de ureia no soro era idêntica nos dois grupos, cerca de 26,5 mg/dl.

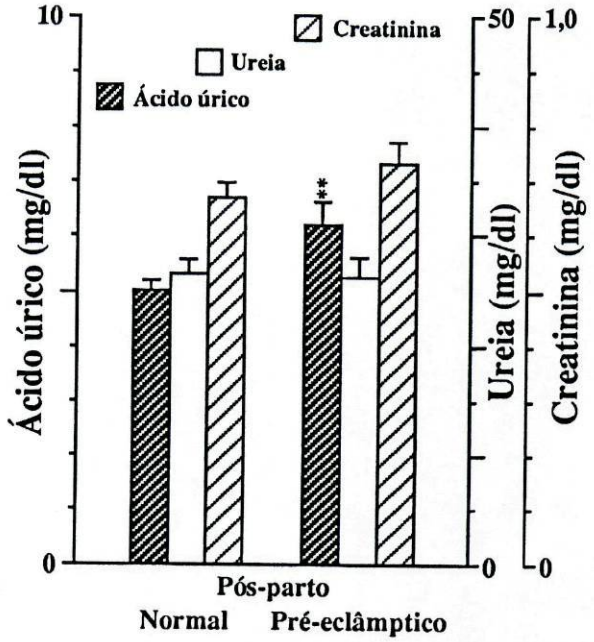


Figura 21. Testes da função renal. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

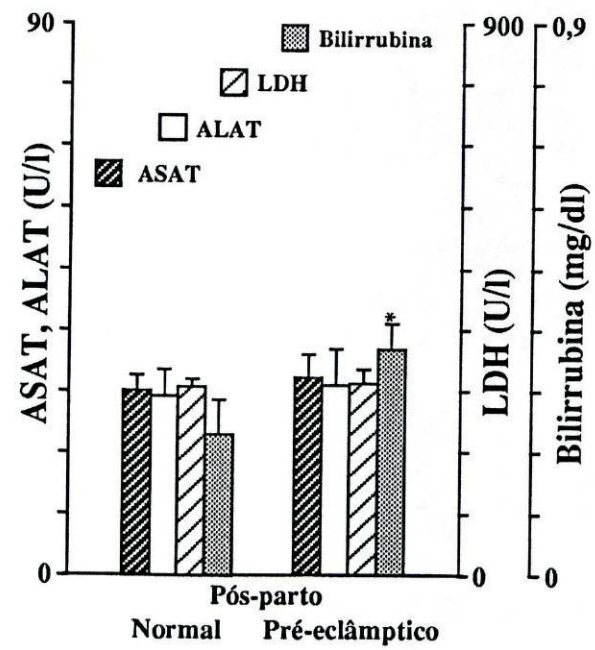


Figura 22. Testes da função hepática. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Ácido úrico —A taxa de ácido úrico apresenta diferença significativa entre os dois grupos. Enquanto nas puérperas normais a concentração de ácido úrico era de cerca de 5,0±0,2 mg/dl, nas puérperas com pré-eclampsia gravídica a concentração de ácido úrico era mais elevada, cerca de 6,2±0,3 mg/dl.

Creatinina —A concentração de creatinina era idêntica nos dois grupos (cerca de 0,70 mg/dl).

4.3.2. O *stress* e o fígado

(Fig. 22)

ASAT, ALAT e LDH —Não apresentavam diferenças significativas entre os dois grupos.

Bilirrubina total —Para este parâmetro as diferenças estavam muito próximo de serem significativas: 0,23±0,05 mg/dl nas normais e 0,37±0,04 mg/dl nas puérperas com pré-eclampsia gravídica.

4.3.3. Peroxidação lipídica e defesas antioxidantes

Peróxidos lipídicos —Os níveis de peróxidos lipídicos determinados por duas técnicas não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos; no entanto, o valor encontrado para o grupo com pré-eclampsia gravídica é ligeiramente superior (Fig. 23).

Defesas antioxidantes (Fig. 24)

Vitamina C —A concentração plasmática de ácido ascórbico é ligeiramente menor no grupo de puérperas com pré-eclampsia (75,6±8,2 mg/dl) do que no grupo de puérperas com gravidez normal (95,7±7,8 mg/dl).

Vitamina E —A concentração plasmática de α-tocoferol é muito semelhante nos dois grupos.

Razão peróxidos lipídicos/antioxidantes —É superior para ambos os sistemas antioxidantes no grupo com pré-eclampsia gravídica (Fig. 25).

4.3.4. Inflamação e leucócitos

(Fig. 26)

Leucócitos —O seu número é idêntico nos dois grupos.

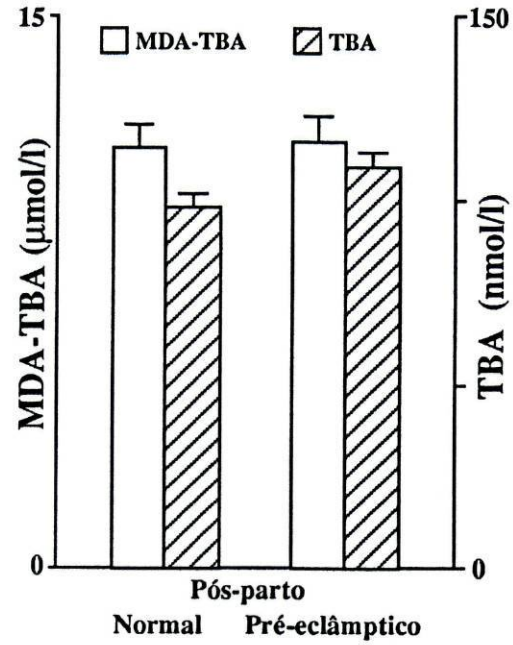


Figura 23. Testes de determinação dos peróxidos lipídicos. Concentração dos produtos da reacção com o ácido tiobarbitúrico pelo método colorimétrico (TBA) e pelo método fluorimétrico (MDA-TBA). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
***p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

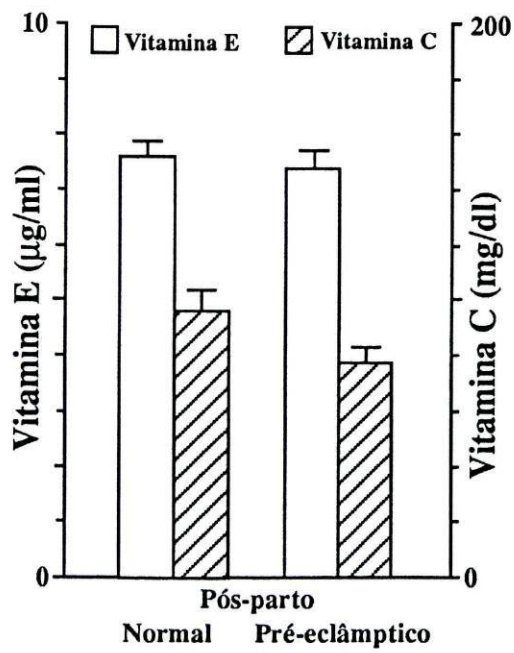


Figura 24. Defesas antioxidantes. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
*** p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

Elástase —Apesar de a concentração de elástase ser superior no plasma das puérperas com pré-eclampsia gravídica (72,6±7,9 µg/l), este valor não difere significativamente do encontrado para as puérperas cuja gravidez tinha decorrido normalmente (57,5±7,1 µg/l).

Lactoferrina —A concentração de lactoferrina plasmática é superior no grupo de puérperas com gravidez normal (5,72±0,99 µg/ml), sem contudo se verificar significado estatístico quando comparámos esse valor com o grupo de puérperas com pré-eclampsia gravídica (3,44±0,32 µg/ml).

4.3.5. Perfil hematológico

Hematócrito, hemoglobina e eritrócitos —Os valores encontrados para estes parâmetros são idênticos nos dois grupos (Fig. 27).

Índices de hemólise eritrocitária (Fig. 28)

Hemoglobina no plasma —A concentração de hemoglobina no plasma é idêntica nos dois grupos.

Haptoglobina —A concentração da haptoglobina apresenta diferença significativa entre os dois grupos: 155±10 mg/dl para o grupo de puérperas sem patologia anterior ao parto e 200±15 mg/dl para o grupo com pré-eclampsia gravídica.

Fragilidade osmótica —O valor encontrado para este parâmetro era igual para os dois grupos (4,35 g/l NaCl).

4.3.6. Marcadores de inflamação

(Fig. 29)

Proteína-C reactiva —Apesar de as concentrações encontradas serem diferentes, não apresentam variação significativa: 7,36±1,00 mg/dl para a concentração plasmática no grupo de puérperas com pré-eclampsia gravídica e 5,17±0,75 mg/dl no grupo de puérperas com gravidez normal.

γ-Glutamiltranspeptídase —A concentração plasmática deste marcador hepático de inflamação é ligeiramente superior no grupo de puérperas com gravidez normal (12,1±1,9 U/l) em relação ao grupo de puérperas com pré-eclampsia gravídica (10,4±1,8 U/l).

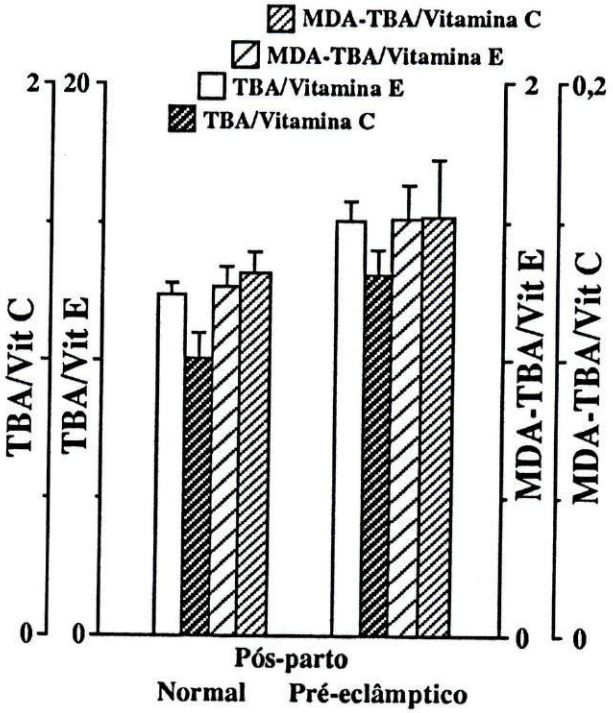


Figura 25. Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes: produtos da peroxidação lipidica com vitamina E e vitamina C. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

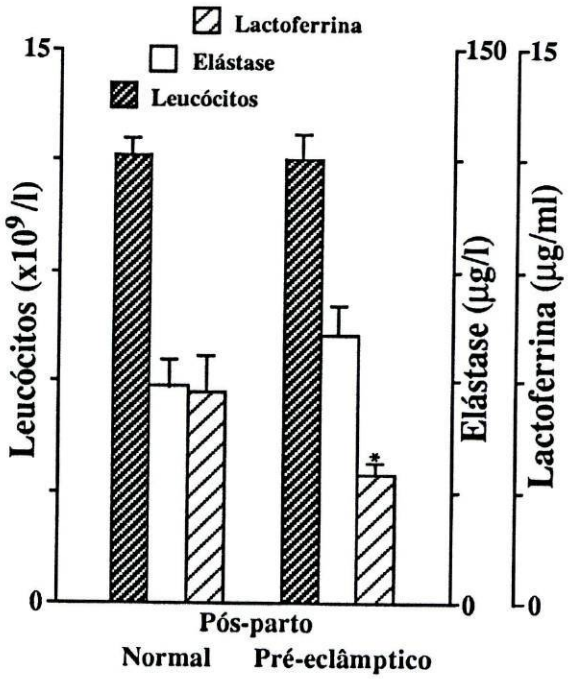


Figura 26. Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos (lactoferrina e elástase). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
*** $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.**

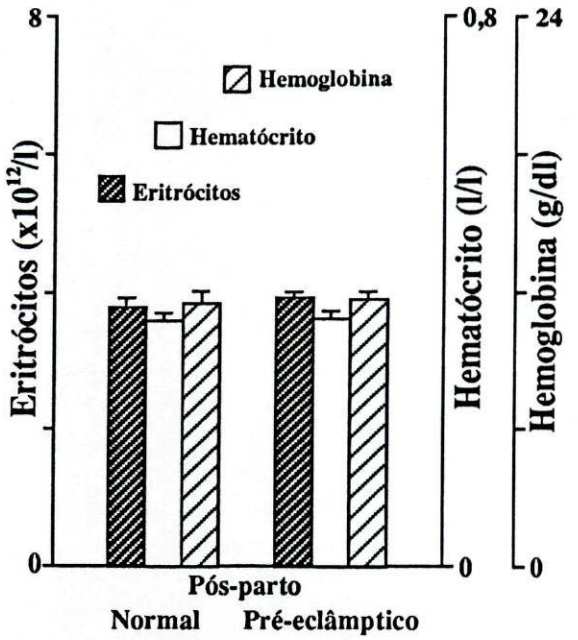


Figura 27. Perfil hematológico. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$.

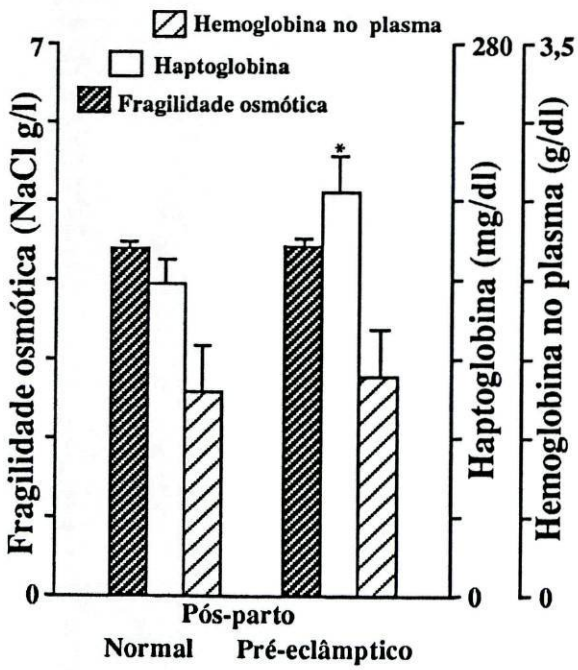


Figura 28. Índices eritrocitários. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal: *$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$.

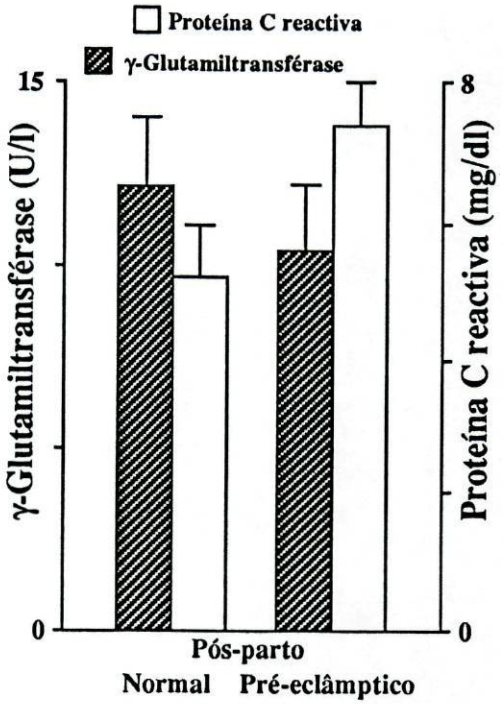


Figura 29. Marcadores inflamatórios. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
***p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001.**

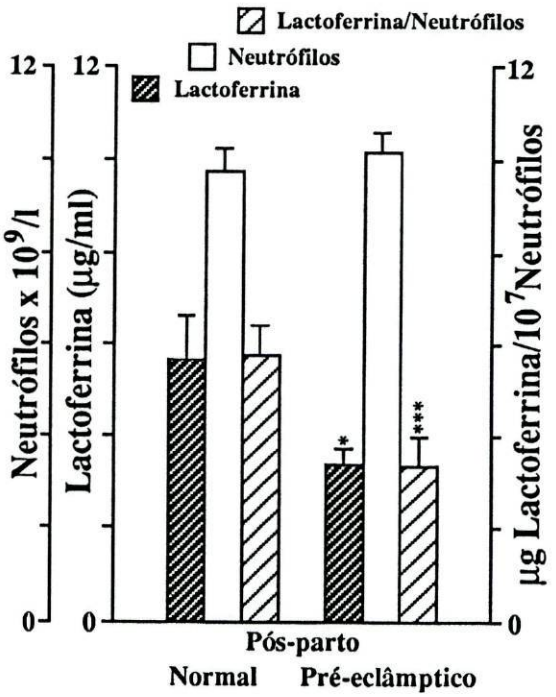


Figura 30. Teste de activação dos neutrófilos. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas em relação aos valores da gravidez normal:
*** p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.**

4.3.7. Marcador de *stress*

(Fig. 30)

A significância da lactoferrina entre os dois grupos de puérperas é maior quando o resultado é dado em função do número de neutrófilos.

4.4. O *stress* do pós-parto versus 3º trimestre (normais e pré-eclâmpticas)

Para estudarmos o *stress* induzido pelo parto efectuámos as determinações no sangue de puérperas de dois grupos: um grupo de mulheres cuja gravidez tinha decorrido sem qualquer patologia associada e um grupo de mulheres com diagnóstico de pré-eclampsia gravídica.
As figuras representam os valores encontrados para as diferenças do pós-parto e do 3º trimestre entre os diferentes parâmetros determinados.

4.4.1. O *stress* e o rim

(Fig. 31)

Ureia —Enquanto a diferença dos valores no grupo de normais era de 5.4 mg/dl, no grupo de pré-eclâmpticas a diferença era de -2.8 mg/dl. Apesar de as alterações não se darem no mesmo sentido as diferenças eram significativas em ambos os casos.

Ácido úrico —A diferença nas concentrações de ácido úrico só são significativas no grupo de grávidas normais (0,9 mg/dl), apresentando variações mais pequenas no grupo com pré-eclampsia (0,3 mg/dl).

Creatinina —A variação das concentrações de creatinina era significativa em ambos os grupos (0,09 mg/dl nas normais e 0,05 mg/dl nas pré-eclâmpticas).

4.4.2. O *stress* e o fígado

(Fig. 32)

ASAT —Enquanto a diferença nas normais é de 10,3 U/l, nas pré-eclâmpticas é de 6,7 U/l. Em ambos os grupos as diferenças são significativas.

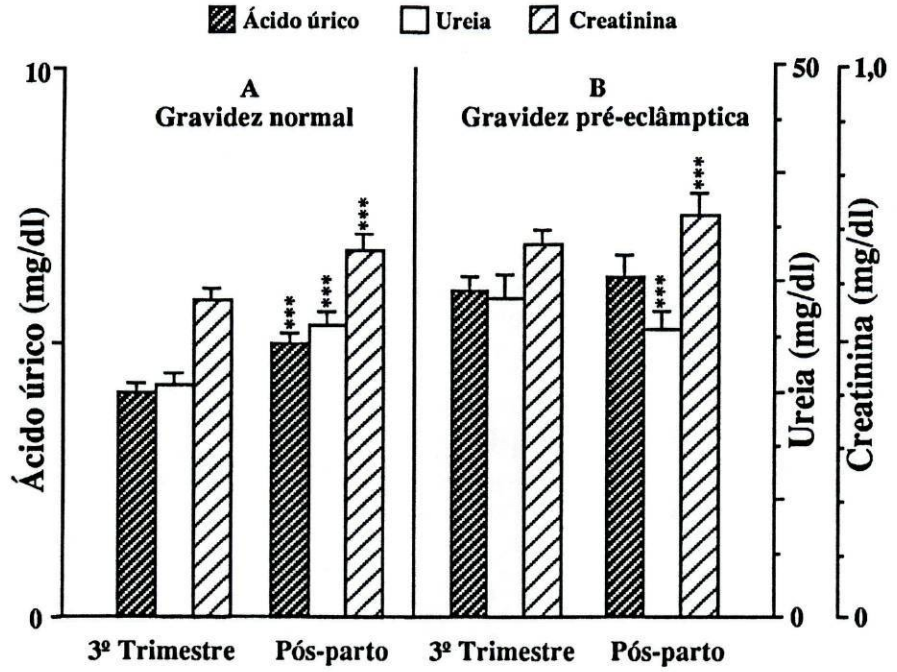


Figura 31. Provas da função renal na gravidez normal e na pré-eclâmptica. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de uma gravidez normal: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

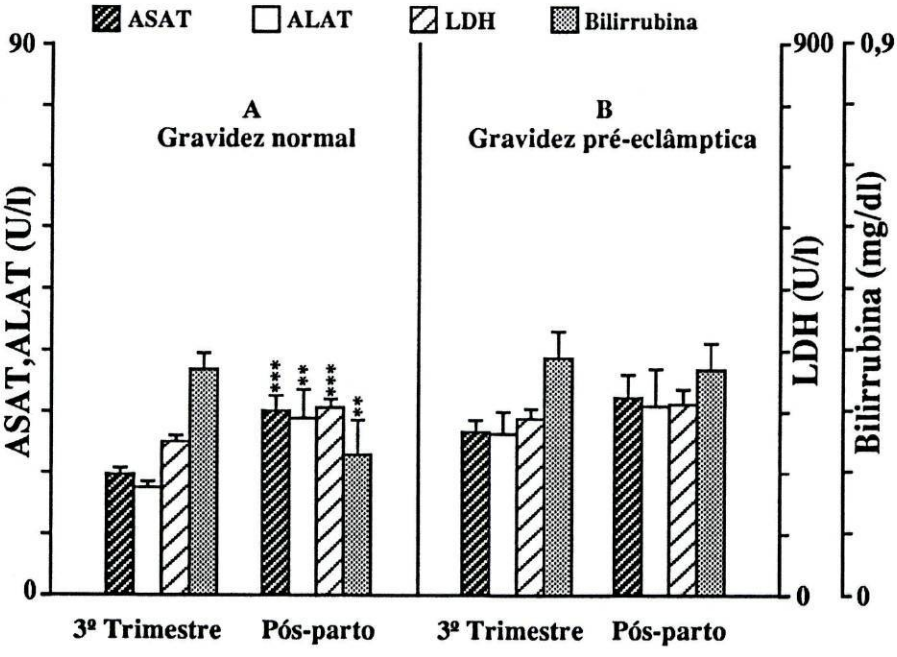


Figura 32. Provas da função hepática na gravidez normal e na pré-eclâmptica. Actividades de ALAT (transamínase da alanina), ASAT (transamínase do arpartato), LDH (desidrogénase láctica) e concentração da bilirrubina total. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de uma gravidez pré-eclâmptica:
*** $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.**

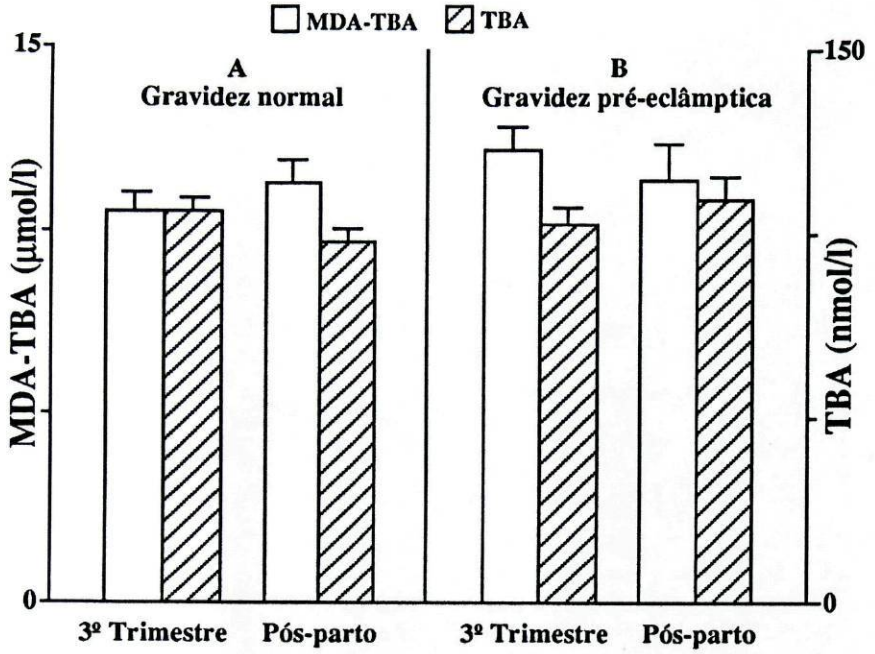


Figura 33. Testes de determinação dos peróxidos lipídicos. Concentração dos produtos da reacção com o ácido tiobarbitúrico pelo método colorimétrico (TBA) e pelo método fluorimétrico (MDA-TBA). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de uma gravidez normal: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

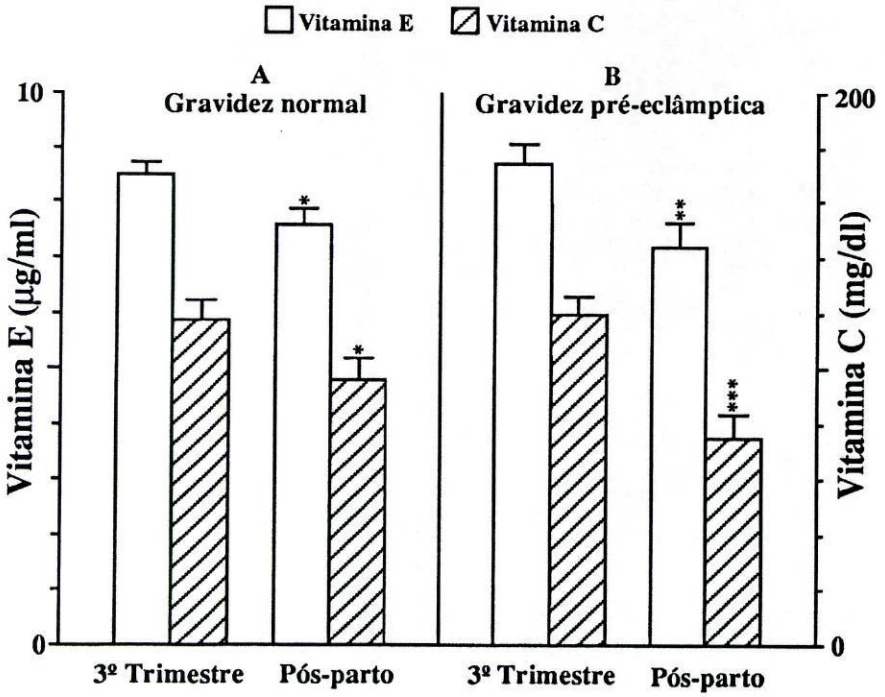


Figura 34. Defesas antioxidantes. Concentrações de vitamina E e de vitamina C. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de gravidez: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

ALAT —Também para este parâmetro as diferenças são significativas entre os ambos os grupos: 11,4 U/l para as normais e 8,7 U/l para as pré-eclâmpticas.

LDH —Nas pré-eclâmpticas, apesar de a diferença ser grande (36,4 U/l), não é significativa. No grupo de grávidas normais a diferença (55,6 U/l) já tem significado estatístico.

Bilirrubina total —Também neste parâmetro a diferença só tinha significado estatístico no grupo de grávidas normais (-0.14 mg/dl).

4.4.3. Peroxidação lipídica e defesas antioxidantes

Peróxidos lipídicos (Fig. 33)

Enquanto no grupo sem patologia o valor do teste do TBA diminui depois do parto (de 105,1±3,2 para 96,4±3,2 nmol/l), os níveis de peróxidos lipídicos no grupo com patologia gravídica aumenta de 101,9±3,9 para 108,2±5,9 nmol/l. A medição dos peróxidos lipídicos pela técnica do MDA-TBA dá-nos resultados ligeiramente diferentes, pois que no grupo de normais se verificou um aumento de 0,7 mmol/l, no grupo com pré-eclampsia gravídica verificou-se um redução de 0,6 mmol/l.

Defesas antioxidantes (Fig. 34)

Vitamina C —A redução da concentração plasmática de ácido ascórbico é significativa nos dois grupos estudados. No grupo sem patologia associada, a redução é de 22,4 mg/dl; no outro grupo a redução é de 43,9 mg/dl.

Vitamina E —Também a redução nos níveis plasmáticos de vitamina E é maior no grupo com patologia (1,5 µg/ml) do que no grupo de normais (0,9 µg/ml). Em ambos os casos a diferença tem significado estatístico.

Razões peróxidos lipídicos/defesas antioxidantes (Fig. 35)

A diferenças das razões dos peróxidos lipídicos/antioxidantes é superior nas pré-eclâmpticas quando a comparação se faz através dos resultados obtidos pelo teste do TBA. Com os resultados obtidos através do teste do MDA-TBA, para a vitamina E a razão para as pré-eclâmpticas é ligeiramente superior à das normais, para a vitamina C a diferença é bastante inferior.

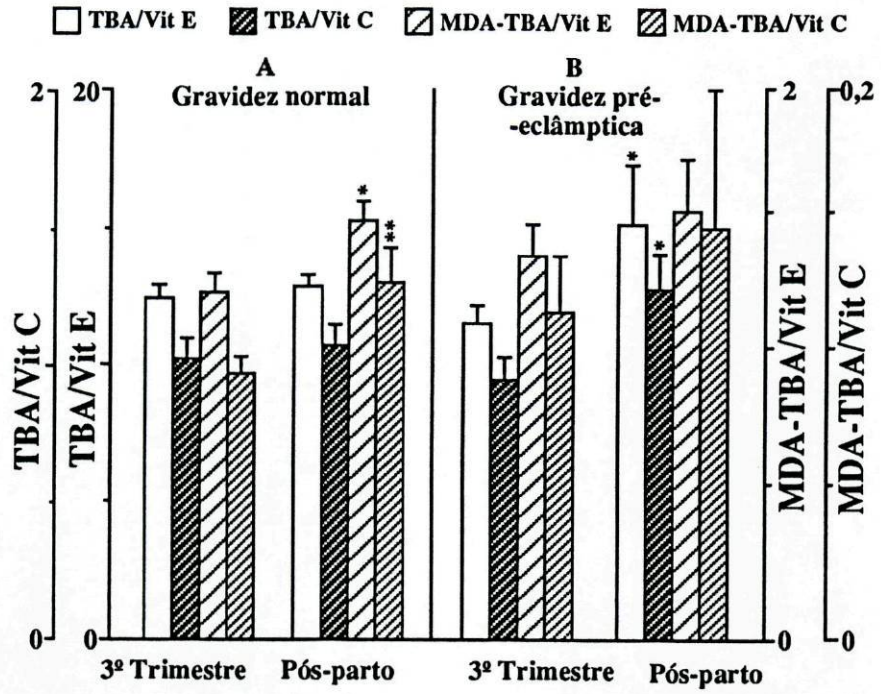


Figura 35. Razões peroxidação lipidica/defesas antioxidantes: produtos da peroxidação lipidica com vitamina E e vitamina C. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de gravidez:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

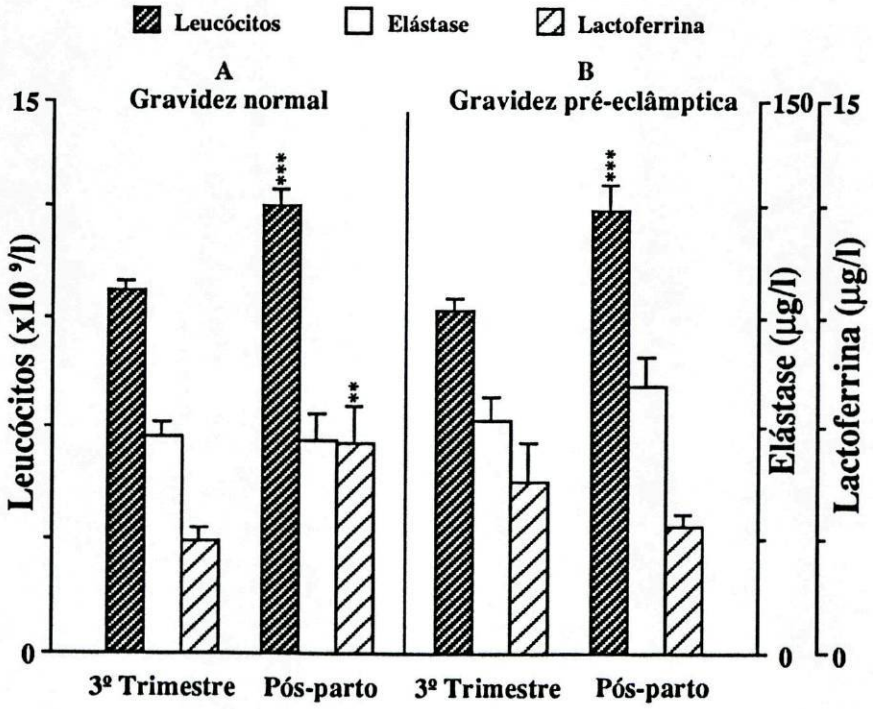


Figura 36. Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos (lactoferrina e elástase).Dados representados como média± SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de gravidez: * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

4.4.4. Inflamação e leucócitos

(Fig. 36)

Leucócitos —O aumento é significativo em ambos os grupos. Em termos numéricos os leucócitos aumentam $2,3x10^9/l$ no grupo de grávidas normais e $2,7x10^9/l$ no grupo com patologia gravídica.

Elástase —Enquanto no grupo de normais a sua concentração diminui 0,9 µg/l, no outro grupo a elástase plasmática aumenta cerca de 8,3 µg/l.

Lactoferrina —A concentração de lactoferrina plasmática aumenta significativamente com o parto no grupo de normais (2,7 µg/ml), enquanto no outro grupo se verifica uma redução de 0,81 µg/ml.

4.4.5. Perfil hematológico

(Fig. 37)

Hematócrito —Em ambos os grupos o seu valor diminui cerca de 0,04 l/l (resultado significativo).

Hemoglobina —A concentração de hemoglobina também diminui, só tendo significado esta redução no grupo de mulheres sem patologia durante a gravidez (0,8 g/dl).
Eritrócitos —O número de eritrócitos diminui significativamente no grupo normal ($0,35x10^{12}/l$), enquanto a redução de $0,19x10^{12}/l$ no grupo com pré-eclampsia gravídica não é significativa.

Índices de hemólise eritrocitária (Fig. 38)

Hemoglobina no plasma —A concentração de hemoglobina no plasma diminui em ambos os grupos só tendo significado estatístico a redução no grupo com gravidez normal (1,06 g/dl).

Haptoglobina —A variação da haptoglobina plasmática é significativa nos dois grupos estudados. O seu valor aumenta 62,7 mg/dl no grupo normal e 91,8 mg/dl no grupo com pré-eclampsia gravídica.

Fragilidade osmótica —O valor encontrado para este parâmetro no grupo das grávidas sem patologia diminui significativamente (0,15 g/l NaCl); o grupo com pré-eclampsia gravídica apresentava um ligeiro aumento nesse parâmetro (0,03 g/l NaCl).

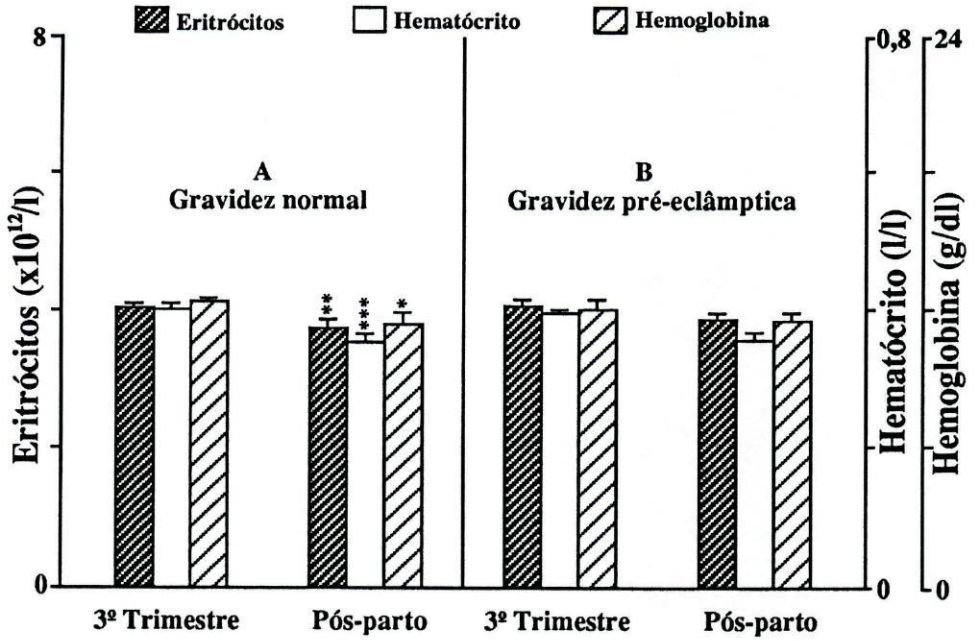


Figura 37. Perfil hematológico. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de uma gravidez normal: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

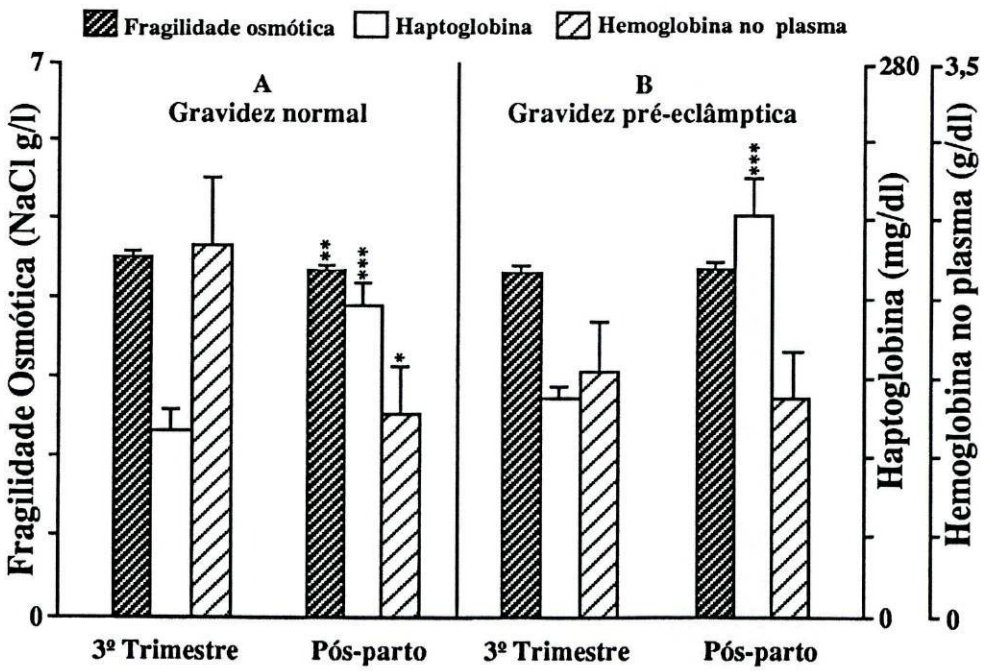


Figura 38. Índices eritrocitários. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de uma gravidez normal: * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

4.4.6. Marcadores de inflamação

(Fig. 39)

Proteína C reactiva —As diferenças são significativas nos dois grupos: o grupo das normais apresenta um aumento de 4,6 mg/dl e o grupo das pré-eclâmpticas 5,8 mg/dl.

γ-Glutamiltranspeptídase —Enquanto nas pré-eclâmpticas a concentração plasmática deste marcador hepático de inflamação não se altera, no grupo de normais ele sofre um aumento significativo (5,6 U/l).

4.4.7. Marcador de *stress*

(Fig. 40)

No grupo de mulheres cuja gravidez decorreu sem patologia, a concentração plasmática da lactoferrina/neutrófilos aumenta com o parto, enquanto no grupo com patologia gravídica este valor se torna menor após o parto. No número de neutrófilos verifica-se um aumento para os dois grupos estudados.

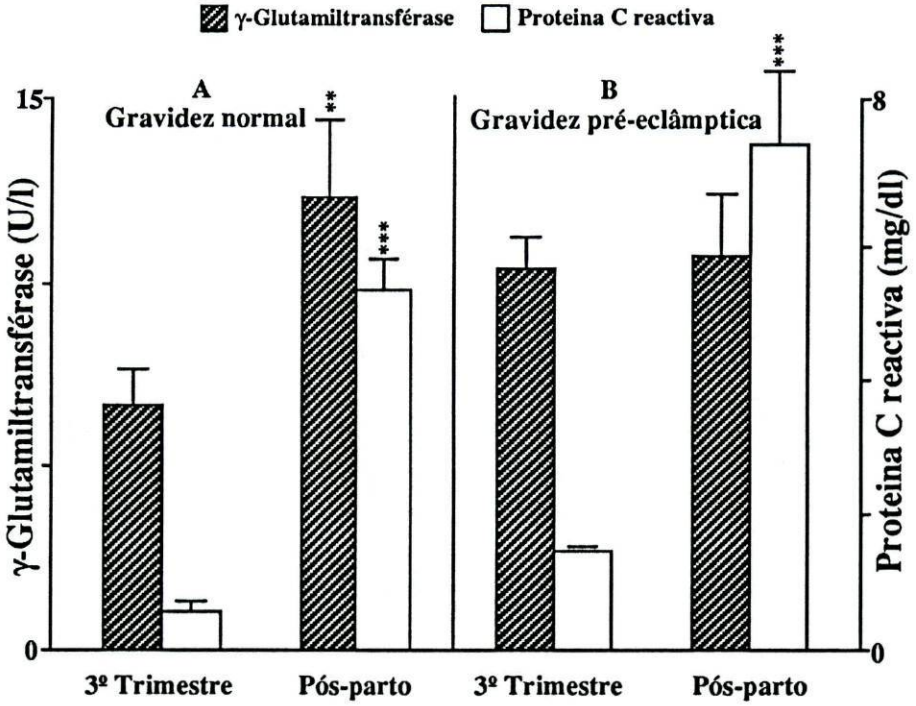


Figura 39. Marcadores inflamatórios. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de uma gravidez normal:
*** *p* <0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001.**

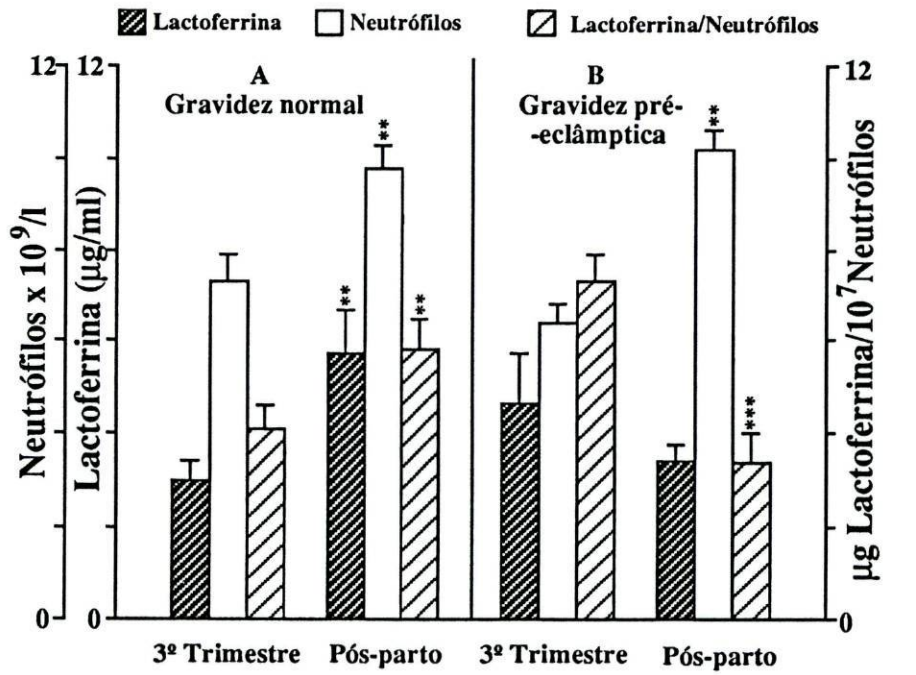


Figura 40. Teste de activação dos neutrófilos. Dados representados como média± SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no 3º trimestre de gravidez:
*** *p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001.**

4.5. O *stress* do pós-parto versus grupo de controlo (normais e pré-eclâmpticas)

4.5.1. O *stress* e o rim

(Fig. 41)

Os parâmetros renais determinados no sangue de puérperas dos dois grupos estudados apresentam diferenças significativas em relação ao grupo de controlo.

Ureia —A concentração da ureia de 26,5 mg/dl é idêntica em ambos os grupos; é um valor significativamente inferior ao do grupo de controlo (31,4 mg/dl).

Ácido úrico —Em relação à concentração de ácido úrico, as concentrações dos dois grupos, apesar de não serem semelhantes entre si (5,0 mg/dl para as puérperas normais e 6,2 mg/dl para as puérperas com pré-eclampsia gravídica), diferem significativamente do valor encontrado para as não grávidas (3,0 mg/dl).

Creatinina —A concentração de creatinina no pós-parto apresenta valores também diferentes (0,67 e 0,73 mg/dl) do grupo de não grávidas (0,79 mg/dl).

4.5.2. O *stress* e o fígado

(Fig. 42)

Também a função hepática não recuperou os seus valores normais durante o período estudado.

ASAT —A aminotransférase do aspartato apresenta valores médios de 31,3 U/l comparados com actividades de 15,7 U/l do grupo de controlo (diferença significativa).

ALAT —A variação da aminotransférase da alanina é idêntica à da ASAT, atingem no pós-parto actividades médias de 30,2 U/l, enquanto no grupo de controlo a actividade é de 13,4 U/l.

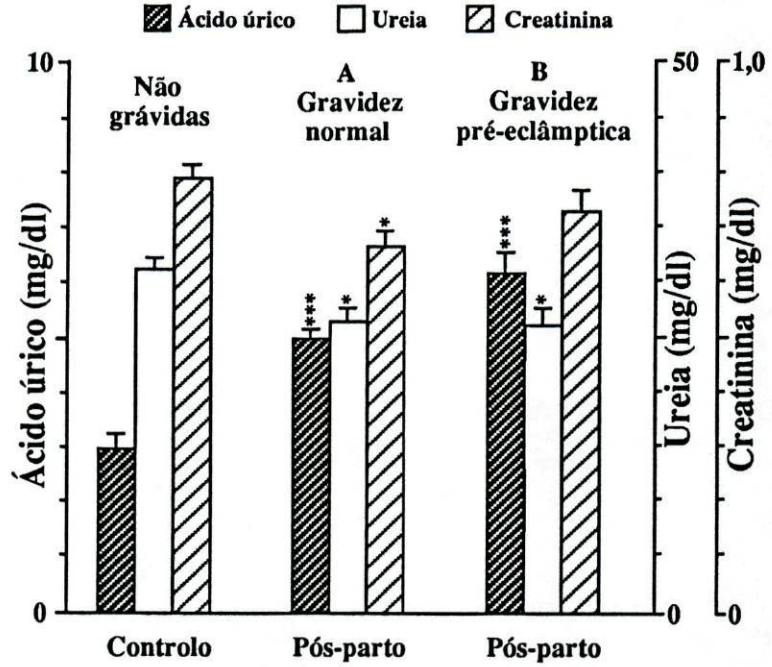


Figura 41. Provas da função renal em não grávidas (controlo), na gravidez normal e na pré-eclâmptica. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

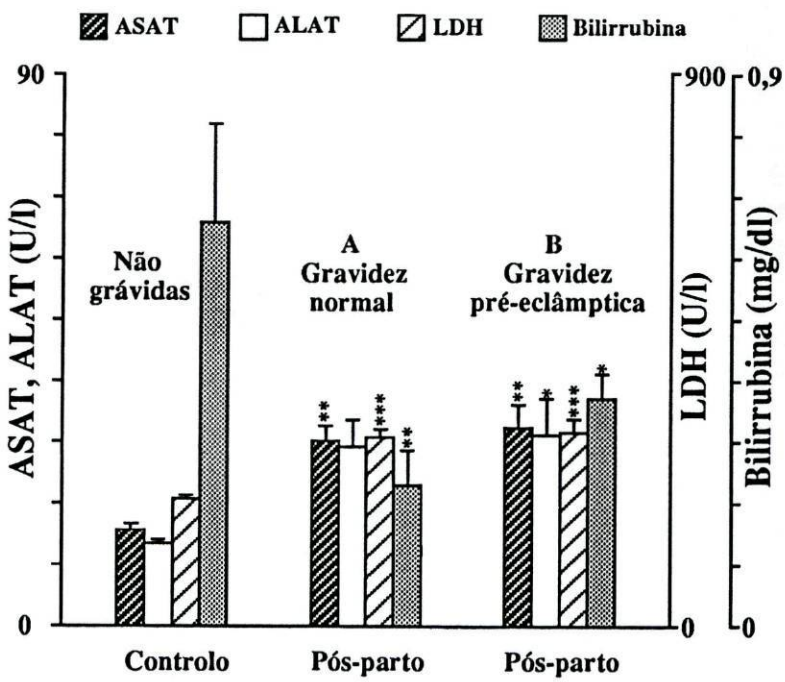


Figura 42. Provas da função hepática em não grávidas (controlo), na gravidez normal e na pré-eclâmptica. Actividades de ALAT (transamínase da alanina), ASAT (transamínase do arpartato), LDH (desidrogénase láctica) e concentração da bilirrubina total. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

LDH —A desidrogénase do ácido láctico (LDH) está significativamente aumentada no pós-parto (314 U/l), quando a comparação é efectuada com o grupo de controlo (206 U/l).

Bilirrubina total —A concentração de bilirrubina total apresenta valores significativamente inferiores no pós-parto (0,23 mg/dl no grupo de puérperas com gravidez normal e 0,37 mg/dl no grupo de puérperas com patologia gravídica), comparativamente ao grupo de controlo (0,66 mg/dl).

4.5.3. Peroxidação lipídica e defesas antioxidantes

Verificou-se que o nível de peróxidos está ainda elevado no pós-parto, assim como um dos antioxidantes estudados (α-tocoferol). O ácido ascórbico, outro antioxidante estudado, apresenta uma redução em relação ao grupo de controlo.

Peróxidos lipídicos (Fig. 43)

Os níveis de peróxidos lipídicos pela técnica do TBA estão significativamente aumentados no pós-parto: 96,4 nmol/l nas normais e 108,2 nmol/l nas puérperas com patologia gravídica, comparativamente ao grupo de controlo (51,7 nmol/l). Pelo método do MDA-TBA, o aumento é ainda mais acentuado: 11,2 mmol/l para as puérperas com gravidez normal e 11,6 mmol/l para as puérperas com pré-eclampsia gravídica, enquanto no grupo de controlo a concentração era de 4,3 mmol/l.

Defesas antioxidantes (Fig. 44)

Vitamina C —A variação da concentração plasmática de ácido ascórbico não acompanha a variação dos níveis de peróxidos lipídicos, pois o valor é significativamente menor (95,7 mg/dl nas puérperas normais e 75,6 mg/dl nas puérperas com patologia gravídica) que no grupo de controlo (139,7 mg/dl).

Vitamina E —A concentração plasmática de α-tocoferol varia significativamente na mesmo sentido que os peróxidos lipídicos, apresentando valores de cerca de 7,4 μg/ml nas puérperas e de 5,6 μg/ml no grupo de controlo.

Razão peróxidos lipídicos/defesas antioxidantes (Fig. 45)

As razões peróxidos lipídicos/antioxidantes estão significativamente aumentadas no puerpério.

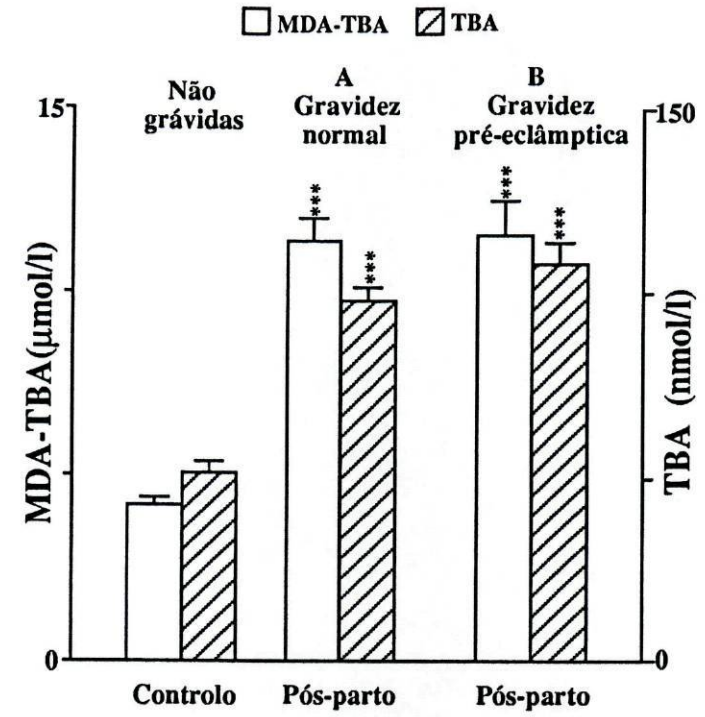


Figura 43. Testes de determinação dos peróxidos lipídicos. Concentração dos produtos da reacção com o ácido tiobarbitúrico pelo método colorimétrico (TBA) e pelo método fluorimétrico (MDA-TBA). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

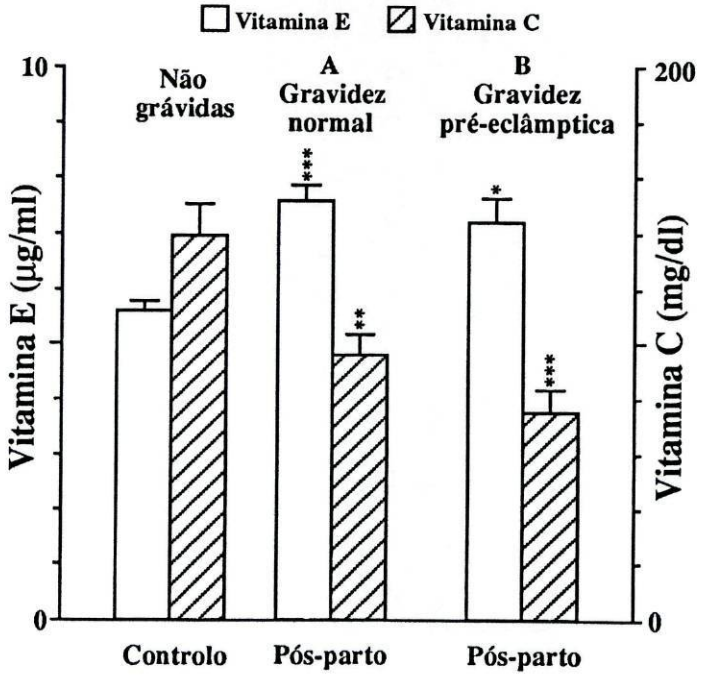


Figura 44. Defesas antioxidantes Concentrações de vitamina E (µg/ml) e vitamina C (mg/dl). Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

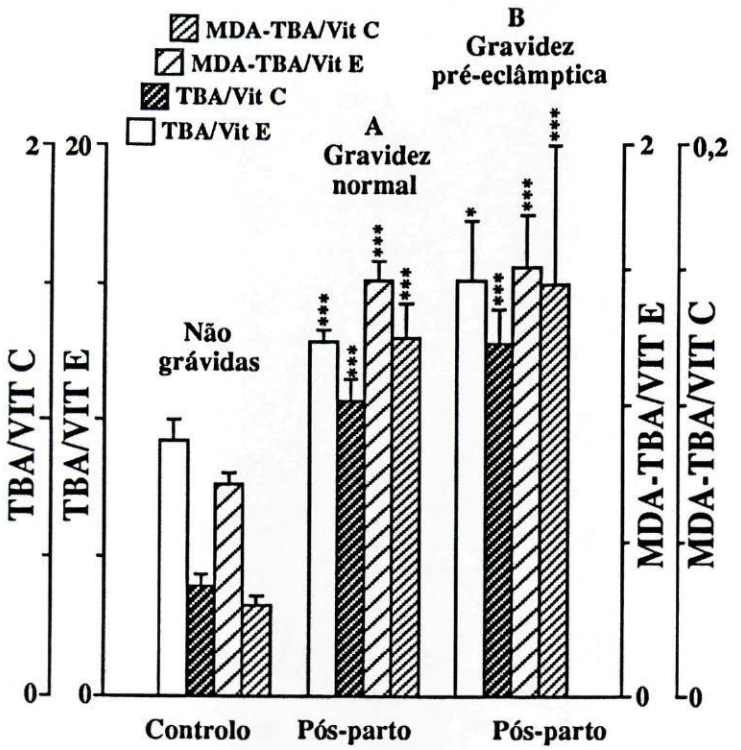


Figura 45. Razões peroxidação lipidica/defesas antioxidantes: produtos da peroxidação lipídica com vitamina E e vitamina C. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

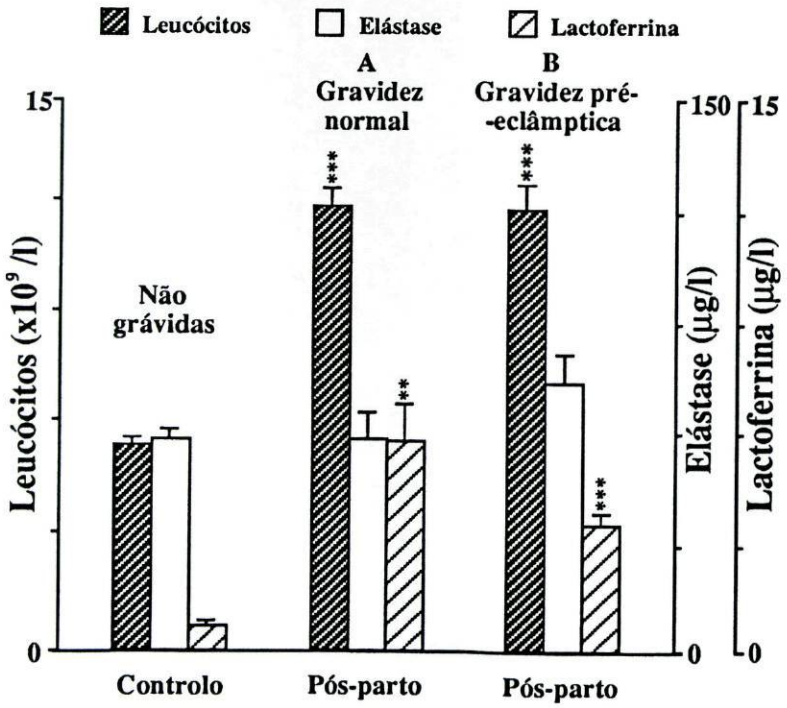


Figura 46. Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos (lactoferrina e elástase). Dados representados como média± SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

4.5.4. Inflamação e leucócitos

(Fig. 46)

Leucócitos —O seu número aumenta significativamente nos dois grupos de puérperas para um valor médio de $12,0x10^9/l$, enquanto no grupo de controlo o valor encontrado é de cerca de $5,6x10^9/l$.

Elástase —Só foi encontrada diferença na concentração de elástase no plasma das puérperas pré-eclâmpticas (72,6 µg/l), pois no grupo de controlo e no grupo de puérperas com gravidez normal a concentração média era de 57,5 µg/l.

Lactoferrina —A concentração de lactoferrina plasmática aumenta significativamente no pós-parto para 5,72 mg/ml nas normais e 3,44 µg/ml nas puérperas ex-pré-eclâmpticas, enquanto o seu valor no grupo de controlo era de 0,70 µg/ml.

4.5.5. Perfil hematológico

(Fig. 47)

O número de eritrócitos, o hematócrito e a hemoglobinemia estão significativamente diminuídas no puerpério.

Hematócrito —Enquanto o valor do hematócrito no grupo de controlo é de 0,43 l/l, nas puérperas esse valor é de 0,36 l/l.

Eritrócitos —O número nas puérperas normais é de $3,76x10^{12}/l$, nas puérperas com pré-eclampsia gravídica é de $3,92x10^{12}/l$, valores inferiores aos do grupo de controlo ($4,50x10^{12}/l$).

Hemoglobina —A hemoglobinemia no pós-parto é em média 11,6 g/dl, valor significativamente diferente do encontrado para o grupo de controlo (14,0 g/dl).

Índices de hemólise eritrocitária

(Fig. 48)

Hemoglobina no plasma —O valor da concentração de hemoglobina no plasma é menor no puerpério do que no grupo de controlo, não sendo as diferenças significativas para qualquer dos grupos.

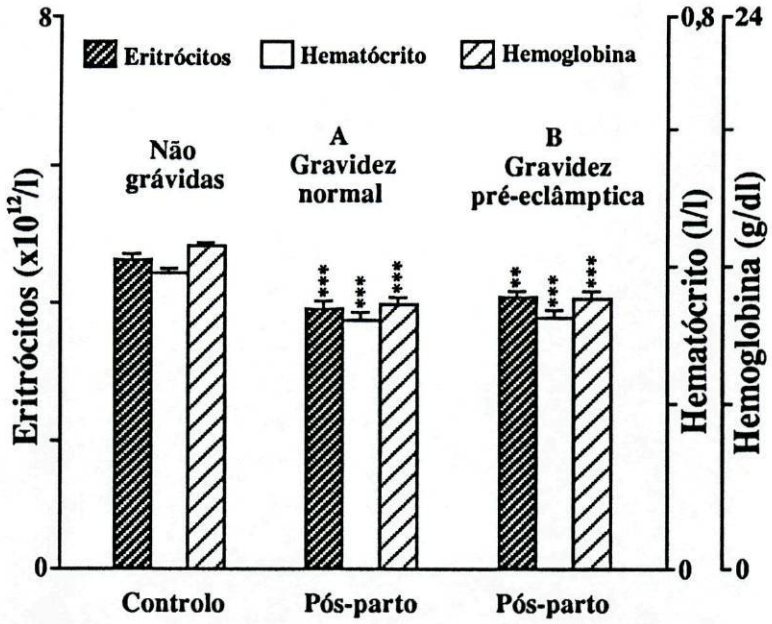


Figura 47. Perfil hematológico. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

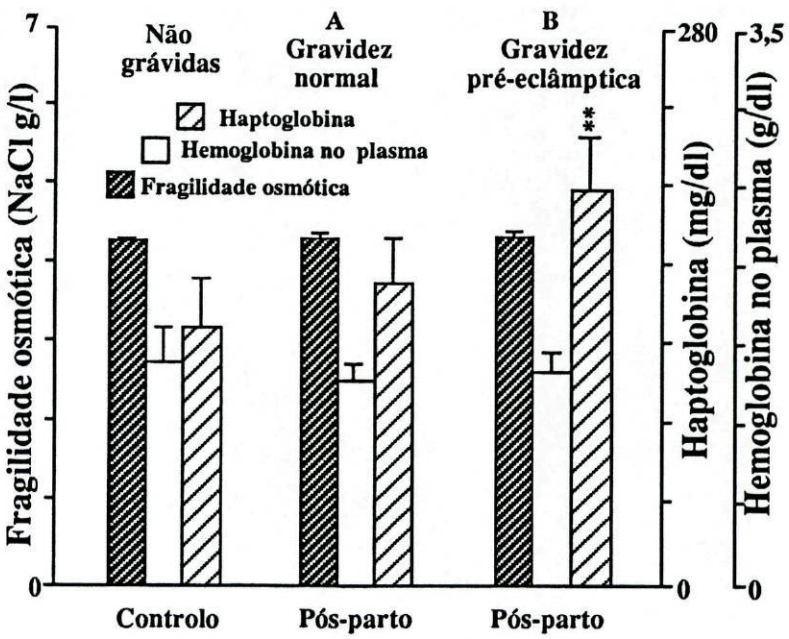


Figura 48. Índices eritrocitários. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica: * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

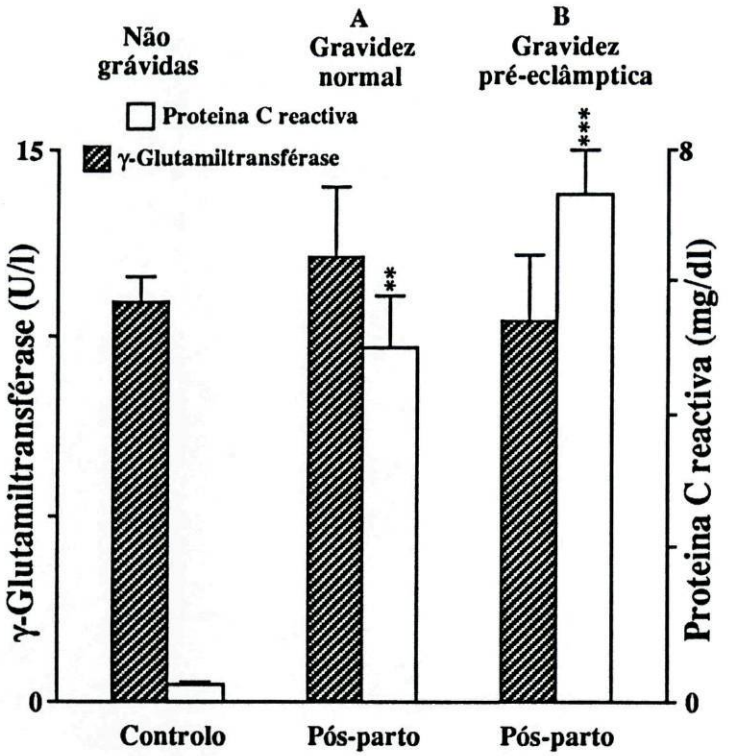


Figura 49. Marcadores inflamatórios. Dados representados como média±SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica:
*** p <0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

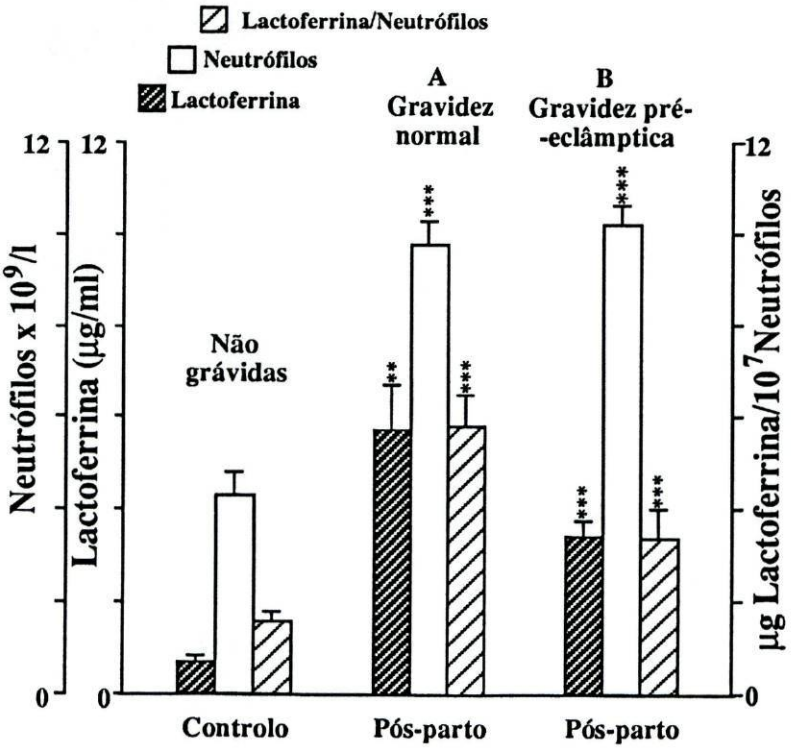


Figura 50. Teste de activação dos neutrófilos. Dados representados como média± SEM. Alterações significativas do pós-parto em relação aos valores obtidos no controlo, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmptica:
*** p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.**

Haptoglobina —A concentração da haptoglobina aumenta de 132 mg/dl no grupo de controlo para 155 mg/dl nas puérperas normais e para 200 mg/dl nas puérperas com pré-eclampsia gravídica (única diferença significativa para este parâmetro).

Fragilidade osmótica —Os valores obtidos para o teste da fragilidade osmótica são iguais em todos os grupos (4,35 g/l NaCl).

4.5.6. Marcadores de inflamação

(Fig. 49)

Proteína C reactiva —Verificou-se um aumento significativo no sangue das puérperas (5,17 mg/dl nas puérperas normais e 7,36 mg/dl com pré-eclampsia gravídica) em relação ao valor encontrado para o grupo de controlo (0,25 mg/dl).

γ-Glutamiltranspeptídase —A concentração plasmática deste marcador hepático de inflamação é idêntica no grupo de controlo e nas puérperas com pré-eclampsia gravídica (10,9 e 10,4 U/l, respectivamente), apresentando um valor ligeiramente superior no grupo cuja gravidez tinha decorrido normalmente (12,1 U/l).

4.5.7. Marcadores de *stress*

(Fig. 50)

A concentração plasmática de lactoferrina, o número de neutrófilos e a concentração de lactoferrina em relação ao número de neutrófilos são significativamente mais elevadas nas puérperas de ambos os grupos.

Capítulo 5. Discussão

O grupo de estudo foi seleccionado de modo a representar uma população de mulheres saudáveis (grávidas e não grávidas) e uma população com hipertensão induzida pela gravidez. As voluntárias com parto pré-termo ou com outro tipo de patologia foram excluidas. O grupo de mulheres grávidas além da medicação com ferro (também feita nas grávidas normais) fazia medicação anti-hipertensiva com ácido acetilsalicílico, prazosina com hidralazina ou com nifedipina. Nesta discussão não nos podemos esquecer de que determinámos concentrações de marcadores sanguíneos num volume de sangue que não é idêntico ao volume da mulher não grávida, pois que durante a gravidez normal está descrita uma expansão significativa do volume plasmático que pode atingir os 50% (Chesley, 1972). O aumento de volume começa a notar-se no 1º trimestre de gestação, aumenta gradualmente e atinge o seu máximo por volta da 30ª semana de gravidez (Walters e Lim, 1975). Na hipertensão induzida pela gravidez dá-se uma redução que pode atingir até 40% do volume plasmático (Ramanhatan *et al.*, 1991; Ramanhatan, 1992). Apesar de neste estudo só serem comparados valores de concentração e não valores totais, serão também representados em tabelas (em anexo) os valores com as correcções feitas como se fosse previamente efectuada a determinação do volume total (azul de Evans) para que se possa ver a grandeza da variação de concentrações totais entre grávidas normais e não grávidas.

5.1. O stress da gravidez

Os metabolitos de oxigénio reactivos gerados durante o metabolismo normal podem entrar em reacções que quando não controladas podem provocar danos peroxidativos nas membranas e em outros componentes celulares, interferindo com funções metabólicas importantes. Normalmente o organismo está protegido por sistemas antioxidantes que trabalham em conjunto. Efectuámos o estudo da peroxidação lipídica durante a gravidez normal e utilizando duas técnicas diferentes confirmámos a observação de que a concentração de peróxidos lipídicos está elevada no sangue da mulher grávida sendo no nosso estudo o aumento já visível a partir do 1º trimestre da gravidez.

Como mecanismos antioxidantes efectuámos o estudo da vitamina E e da vitamina C. A vitamina E é considerada a primeira linha de defesa contra a peroxidação dos ácidos gordos poli-insaturados contidos nos fosfolipidos da membrana. Os fosfolipidos da mitocôndria, retículo endoplasmático e membranas plasmáticas possuem afinidade para o tocoferol daí a sua localização nas membranas. Os tocoferóis actuam como antioxidantes, quebrando as reacções em cadeia dos radicais livres, através da transferência de um hidrogénio fenólico para um radical livre de um ácido gordo peroxidado. O radical assim formado pode reagir com a vitamina C para regenerar tocoferol. A redução dos níveis plasmáticos de vitamina C entre o 2º e o 3º trimestres está de acordo com os estudos de Guo (1993) e de Mikhail *et al.*(1994). Apesar dos aumentos observados dos níveis de vitamina E durante a gravidez, as razões oxidantes/vitamina E são maiores durante a gravidez do que na não grávida. Conforme se pode ver na figura 5, as razões dos peróxidos lipídicos/vitamina C ou vitamina E são maiores durante a gravidez, aumentando ainda mais nos casos oxidantes/vitamina C. A susceptibilidade das células ao *stress* oxidativo é função do balanço total, entre o grau de *stress* oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante. As razões elevadas peróxidos lipídicos/antioxidantes indicam que o balanço normal nos sistemas oxidante/antioxidante pode estar desemparelhado. As razões para o aumento da vitamina E durante a gravidez não são bem conhecidas. Os níveis podem aparecer aumentados como resposta fisiológica à gravidez. Algumas razões para o aumento da concentração plasmática de vitamina E:

—os níveis de vitamina E aumentam como uma resposta fisiológica à gravidez (Ferguson *et al.*, 1955);

—a vasodilatação pode resultar num aumento da absorção da vitamina E através do intestino;

—o aumento da vitamina E deve-se a um aumento dos lipidos do plasma. A vitamina E tem o mesmo sistema de transporte no sangue (lipoproteínas) que o colesterol e os triglicerídeos, cujos níveis estão também aumentados durante a gravidez (Jagadeesan e Prema, 1980).

O aumento dos leucócitos que se verifica durante a gravidez é fisiológico; no entanto, a razão desse aumento é obscura (Berge *et al.*, 1988; Beilin *et al.*, 1993). É ainda de referir o

aumento dos neutrófilos activados avaliado através do determinação de superóxido, de lactoferrina e de elástase. No nosso estudo, a activação dos neutrófilos é confirmada por um aumento significativo nos níveis plasmáticos de lactoferrina; surpreendentemente não foram encontradas alterações idênticas nos níveis de elástase. A concentração da hemoglobina, o hematócrito e o número de eritrócitos diminui durante a gravidez, pois a expansão do volume plasmático parece ser superior ao da *red cell mass* (Leeuw *et al.*, 1966). No entanto, Koller *et al.*(1979 e 1980) referem a relação entre concentração de hemoglobina e ingestão de ferro, pela grávida. Para estudar os níveis de *stress* nos eritrócitos determinámos a sua fragilidade osmótica e os níveis plasmáticos de hemoglobina, como medida da hemólise *in vivo*. Os eritrócitos da grávida são osmoticamente mais frágeis que os da mulher não grávida. Na presença de hemólise intravascular, mais hemoglobina livre é libertada para a circulação dando origem à formação de complexos hemoglobina-haptoglobina. Estamos em presença de uma proteína de fase aguda, a haptoglobina, cujo aumento no plasma está associado a processos inflamatórios. A haptoglobina liga-se à hemoglobina extracorpuscular, evita a sua perda pelo rim e pela urina e preserva o ferro para reutilização. Os níveis mais elevados de hemoglobina no plasma e os níveis mais baixos de haptoglobina encontrados durante a gravidez (Wilke *et al.*, 1992) confirmam a hipótese de aumento de hemólise dos eritrócitos (Entman *et al.*, 1987). Acreditamos que todos estes factores contribuam para a denominada anemia fisiológica da gravidez.

Por outro lado, dado que encontrámos uma redução nos níveis de bilirrubina, não é possível concluir através destes dados que haja um aumento do *turnover* dos eritrócitos. Contudo, é possível que seja a diluição do soro a causa principal dos baixos níveis de bilirrubina conforme descrito por Samuels *et al.* (1987).

O efeito da gravidez sobre a função renal é determinado pelas concentrações plasmáticas de ureia, creatinina e ácido úrico. A função renal sofre uma série de alterações durante a gravidez normal, alterações essas que parecem estar relacionadas com a retenção de água e de sódio (Alvarez e Seattle, 1958). A hemodinâmica renal está elevada durante a gravidez, e os valores são diferentes dos da não grávida. O fluxo plasmático renal durante a gravidez aumenta de 20% a 40%; a taxa de filtração glomerular aumenta cerca de 30 a 60% e há um aumento acentuado na clearance do ácido úrico (Gallery *et al.*, 1979). Boyle *et al.* (1966), num estudo ao longo da gravidez, verificaram que o nível do ácido úrico diminui nas primeiras semanas de gravidez, aumentando durante o terceiro trimestre. Isto está de acordo com os nossos resultados.

As concentrações de creatinina e de ureia no soro diminuem, provavelmente como consequência do aumento da filtração glomerular e da expansão do volume plasmático (Sims e Krantz, 1958). Uma menor taxa de catabolismo proteico pode explicar a reduzida

concentração de creatinina (Marchant ,1978). A redução da clearance da creatinina endógena nas últimas semanas de gravidez contribui para o aumento dos níveis de creatinina do soro, conforme verificado por Davison *et al.* (1980).

O *stress* funcional imposto pelo trabalho extra da gravidez sobre o fígado é normalmente bem tolerado, conforme demonstrado pelos testes de função hepática (Scholtes, 1979). No nosso estudo, as transamínases —indicadores mais específicos de lesão das células hepáticas mantém-se nos seus valores normais estando os seus valores médios aumentados, facto consistente com os resultados de Sibai *et al.* (1982). Também confirmámos o aumento da actividade da LDH do soro; Shukla *et al.* (1978) associaram este aumento a uma contribuição extra de outros tecidos além do fígado, pois a fracção hepática (LDH_5) não apresentava aumento de actividade. O aumento da actividade da LDH seria para Samuels *et al.* (1987) indicativo de hemólise, o que está também de acordo com os nossos resultados.

Todos os parâmetros determinados estão consistentes com o facto de a gravidez ser um processo inflamatório. Para análises de rotina, a quantificação de uma proteína de fase aguda, a proteína C reactiva (CRP) que aumenta rapidamente em resposta à inflamação tecidual (Connell e Connell, 1971; Kaapa e Koistinem, 1993), e o marcador hepático γGT (Scholtes, 1979) são os parâmetros de inflamação normalmente medidos. Os níveis elevados de CRP durante a gravidez dão provas de estarmos perante um processo inflamatório (Watts *et al.*, 1991). A diminuição inicial da γGT e a baixa actividade desta enzima durante a maior parte da gravidez podem ser totalmente explicadas por um aumento do volume plasmático. Neste estudo foram confirmados os resultados de España *et al.* (1991) e de Romem e Artal (1985) em relação ao aumento da CRP ao longo da gravidez, de um modo progressivo e significatico. Romem e Artal (1985) atribuem o aumento da CRP a duas causas possíveis: a sua produção ser estimulada pelo envelhecimento da placenta ou ao aumento do nível de estrogénios e de agentes progestacionais. Para outros autores, os níveis elevados de CRP na grávida normal podem ser explicados quer por um aumento da produção de proteínas pelo fígado induzido por resposta inflamatória quer por uma resposta imunológica à presença do feto (Watts *et al.*,1991). Qualquer que seja a causa desse aumento, a CRP vai estimular a via do complemento, como regulador na coagulação no processo dependente da vitamina K (España *et al.*, 1991; Faught *et al.*, 1995).

Como há algumas patologias associadas com variações na contagem plaquetária, também determinámos o seu número ao longo da gravidez e não encontrámos diferenças significativas. Estes dados estão de acordo com os resultados de Cadroy *et al.* (1993).
Resumindo, durante a gravidez há alterações profundas no metabolismo dos fosfolipidos dos neutrófilos (Beilin *et al.*, 1993), concomitantemente há um aumento da actividade fagocítica dos PMNLs representados pela libertação de radicais livres de oxigénio (Berge *et al.*, 1988).

Estes radicais livres de oxigénio são os responsáveis pelo *stress* oxidativo induzido pela gravidez (Uotila *et al.*, 1993; Cester *et al.*, 1994).

5.2. O stress do 3º trimestre (pré-eclâmpticas e grávidas normais)

Com base no mesmo raciocínio, efectuámos o estudo em grávidas pré-eclâmpticas no 3º trimestre de gravidez. Quantificámos o efeito do *stress* provocado pela hipertensão induzida pela gravidez e comparámos com os resultados obtidos na grávida normal e com a mesma idade gestacional.

De entre as voluntárias com pré-eclampsia seleccionámos apenas primigravidas. As pacientes pré-eclâmpticas obedeciam a dois critérios do Comité de Terminologia do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas: pressão sanguínea sistólica superior ou igual a 140 mm Hg e pressão sanguínea diastólica igual ou superior a 90 mm Hg. As pré-eclâmpticas não tinham história de hipertensão antes de engravidarem, apresentavam proteinúria e uma concentração plasmática de ácido úrico superior a 5.5 mg/dl (Chesley, 1958). Temos ainda de salientar que as pacientes com pré-eclampsia não apresentam o aumento de volume verificado nas grávidas normais (Pritchard *et al.*, 1960; Groenendijk *et al.*, 1984; Hays *et al.*, 1985). Parece então que a pré-eclampsia está associada com uma circulação hiperdinâmica caracterizada por um aumento da taxa cardíaca, da resistência vascular periférica, da pressão arterial, apesar da redução do volume plasmático (Mabie *et al.*, 1990). Na pré-eclampsia há um aumento da viscosidade média do sangue, um aumento do hematócrito, um aumento do fibrinogénio do plasma, um aumento da viscosidade do plasma, acompanhado por uma menor deformabilidade dos eritrócitos (Buchan, 1982). Sabe-se ainda que os casos de maior viscosidade plasmática se associam a patologia a nível da placenta que, por sua vez cria um ciclo vicioso provocando uma maior hemoconcentração (Sagen *et al.*, 1982).

O desequilíbrio entre a peroxidação lipídica e a actividade antioxidante verificado na gravidez normal é ainda maior na pré-eclampsia (Ishiara, 1978). Através das determinações dos peróxidos lipídicos por duas técnicas distintas, o método colorimétrico e o método fluorimétrico, verificámos que:

—Os resultados obtidos com o método colorimétrico eram idênticos para os dois grupos de grávidas;

—Com o método fuorimétrico havia um aumento de 16% dos peróxidos lipídicos nas grávidas pré-eclâmpticas comparativamente às grávidas normais;

O aumento (54%) da actividade antioxidante determinado pela concentração da vitamina E durante a gestação é o resultado da resposta do organismo ao *stress* oxidativo. Os níveis maternos de vitamina E e de peróxidos lipídicos estão ambos aumentados na gravidez, resultados consistentes com os de outros autores (Ishiara, 1978; Jagadeesan e Prema, 1980). Quer a peroxidação lipídica quer os sistemas antioxidantes são superiores durante a gravidez. O aumento progressivo na concentração de vitamina E durante a gravidez sugere a existência de um aumento gradual da actividade antioxidante sobre a peroxidação com o avançar da gestação. Também o aumento de peróxidos lipídicos pode estar relacionado com o aumento dos lipidos do soro, pois eles autooxidam-se para formar peróxidos lipídicos, então a razão peróxidos lipídicos/lipidos totais não se altera (Maseki *et al.*, 1981). Na pré-eclampsia há um reverso nessas razões, favorecendo as acções tóxicas dos peróxidos lipídicos (Wang *et al.*, 1991). Não há diferenças nas concentrações de vitamina E entre as normais e as pré-eclâmpticas o que está de acordo com os resultados de outros autores (Ferguson *et al.*, 1955).

A concentração de ácido úrico é considerada um marcador importante para grávidas com pré-eclampsia, não tendo no entanto de grande significado como predictivo da doença (Selmons e Bogert, 1971). No nosso estudo, o valor médio para uma população saudável era entre 3,0 e 4,1 mg/dl para o grupo de grávidas normais no 3º trimestre da gravidez; para o grupo com patologia associada a concentração média encontrada era de 5,9 mg/dl; todos estes resultados estão de acordo com os estudos de Fischer *et al.* (1981), nos quais se demonstra que a clearance do ácido úrico diminui na pré-eclampsia, pelo que a hiperuricemia é considerada uma grande ajuda no diagnóstico. As mesmas diferenças significativas são também verificadas com as concentrações de ureia e de creatinina do soro que apresentam um aumento no grupo patológico. Podemos então dizer que o fluxo plasmático renal está diminuído na pré-eclampsia, pelo que os níveis considerados normais em mulheres não grávidas são nestas situações indicativos de disfunção severa em qualquer mulher grávida.

O envolvimento hepático na pré-eclampsia indica doença materna grave com risco de eclampsia ou de rotura hepática (Sibai, 1988). Manifesta-se por dor epigástrica no quadrante superior direito ou por níveis elevados de transamínases, que só se verificam num pequeno número de grávidas com pré-eclampsia. No nosso estudo, verificámos um aumento de 34 % na ASAT e de 49% na ALAT que mostra alguma tendência para disfunção hepática.

O número de neutrófilos está aumentado em mulheres com pré-eclampsia grave, o que é também confirmado pela libertação de mais mediadores inflamatórios através das determinações da PMNL-elástase (8,4%) e de lactoferrina (53,3%). A elástase dos neutrófilos é para muitos investigadores a responsável pelos danos vasculares da pré-eclampsia (Greer *et al.*, 1989, 1991a e b).

Mulheres com pré-eclampsia grave podem desenvolver uma grande variedade de aberrações hematológicas (Pritchard *et al.*, 1960 e 1976). A trombocitopenia está muitas vezes associada à pré-eclampsia, com uma ocorrência entre 11-29% e com uma incidência de 35% nas pacientes hipertensas com proteinúria (Burrows *et al.*, 1987). No nosso estudo não conseguimos confirmar estes resultados, pois o número de plaquetas era idêntico nos dois grupos (Sibai *et al.*,1982; Cadroy *et al.*, 1993).

Confirmámos ainda um aumento da resposta inflamatória nas pré-eclâmpticas através dos valores mais elevados de CRP (160%) neste grupo (España *et al.*, 1991). No grupo patológico o estado inflamatório é mais evidente, a CRP, a γGT e a haptoglobina estão mais elevadas.

Os índices eritrocitários (número, concentração de hemoglobina e hematócrito) são idênticos, mas a resistência do glóbulo rubro difere entre os dois grupos estudados. Há provas de maior resistência do glóbulo rubro no grupo com patologia (teste da fragilidade osmótica), o que também se confirma pela determinação da hemoglobina no plasma (menor concentração no grupo das pré-eclâmpticas).

Podemos resumir o que se passa no grupo com pré-eclampsia do seguinte modo:
—A peroxidação lipídica é maior, o que provoca um aumento das defesas antioxidantes (vitamina C e vitamina E);
—O número de leucócitos é idêntico; o número de neutrófilos é inferior nas pré-eclâmpticas; no entanto a concentração plasmática dos produtos resultantes da activação dos neutrófilos está elevada (elástase, lactoferrina) dando origem a uma maior quantidade de lactoferrina por número de neutrófilos;
—O aumento do processo inflamatório também pode ser confirmado através da elevação dos níveis de γGT e CRP plasmáticas;
—O número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o volume globular mantém-se constantes;
—Aumenta a resistência dos eritrócitos, diminui a concentração da hemoglobina do plasma, o que se reflecte num aumento da haptoglobina (outra proteína de fase aguda). A concentração de bilirrubina total mantém-se inalterada;
—Em relação aos parâmetros de função hepática (ASAT, ALAT e LDH), as actividades são superiores no grupo com pré-eclampsia.

Se durante a gravidez normal há alterações profundas no metabolismo dos fosfolípidos dos neutrófilos (Beilin *et al.*, 1993), concomitantemente com o aumento da actividade fagocítica dos PMNLs representados pela libertação de radicais livres de oxigénio, durante a pré-

eclampsia verifica-se que há uma maior produção de PMNLs, pelo que a actividade fagocítica seria ainda maior (mecanismo de defesa quando o equilíbrio mãe-filho está alterado) (Berge *et al.*, 1988). Por outro lado há um aumento da activação do complemento através da CRP, o que também irá influenciar os neutrófilos a libertar mediadores inflamatórios (Haeger *et al.*, 1992).

5.3. O stress do puerpério (normais e pré-eclâmpticas)

Na altura do parto o organismo materno desencadeia uma série de acções que tem por fim expulsar o ovo. Este acto fisiológico provoca modificações cardiovasculares, modificações respiratórias e alterações hormonais (os níveis de ocitocina sobem no início do parto). As respostas hemodinâmicas ao parto desaparecem no período pós-parto.

O periodo pós-parto, em que se verificam novas adaptações no organismo materno e em que a mulher retorna à fisiologia normal, denomina-se puerpério. Temos como objectivo deste nosso estudo a comparação dos níveis de *stress* induzido pelo parto normal em grávidas normais e em grávidas pré-eclâmpticas através da quantificação da variação dos parâmetros já referidos em amostras de sangue obtidas 24-48 horas após o parto e em amostras obtidas durante o 3º trimestre de gestação.

Já em 1694 Mauriceau *et al.* (citado por Haeger, 1993) referiam que a remoção do feto do útero é a melhor terapia para a pré-eclampsia. Mesmo nos casos em que a doente já esteja a ser tratada com agentes anti-hipertensivos, a única cura para a hipertensão seria a saída do feto e da placenta; apesar de imediatamente a seguir ao parto se verificar um aumento da pressão sanguínea devido ao aumento da resistência periférica provocada pelo encerramento da circulação uteroplacentária e à autotransfusão do sangue normalmente acumulado no útero (Kerr, 1968), os valores da pressão sanguínea voltam rapidamente ao seu valor normal. O parto seria o único modo de reduzir a actividade mitogénica (Musci *et al.*, 1988) ou a actividade citotóxica (Rodgers *et al.*, 1988) existente no plasma das pré-eclâmpticas. Através das determinações efectuadas nos dois grupos de puérperas pudemos concluir que com a remoção do feto e da placenta as duas populações se tornam idênticas; quando efectuámos o estudo comparativo entre os dois grupos de puérperas (com gravidez normal e com hipertensão induzida pela gravidez) somente encontrámos diferenças significativas na haptoglobina e na concentração plasmática de ácido úrico, o que confirma os resultados de Hankins *et al.* (1984), os quais referem que as alterações hemodinâmicas características da pré-eclampsia persistem apenas durante 12 horas após o parto. Todos estes factos levam a concluir que a pré-eclampsia é uma doença completamente reversível e sem sequelas.

Também a actividade fibrinolítica deixa de estar inibida nas situações de pré-eclampsia (Bonnar *et al.*, 1971), pelo que se verifica um aumento nos produtos resultantes da degradação da fibrina (Henderson *et al.*, 1970).

Os indicadores de processo inflamatório sofrem alteração com o parto. O aumento das proteínas de fase aguda verifica-se como resultado do aumento das prostaglandinas que ocorre durante o parto (Romem e Artal, 1985). O parto após uma gravidez normal provoca um aumento de 7 vezes na concentração de CRP, enquanto após uma gravidez pré-eclâmptica o valor do aumento é de apenas de 4 vezes. O aumento da CRP após o parto é devido a lesão tecidual ou ao aumento da síntese de prostaglandinas que estimulam a síntese de proteínas de fase aguda (Romem e Artal, 1985; Tyler e Roess, 1957; Makkonen *et al.*, 1993). No entanto, para Tyler e Roess (1957) e para Connell e Connell (1971), não existem diferenças na concentrações de CRP entre os dois grupos de puérperas, atribuindo esse facto a que esta proteína só é produzida pelo fígado e na nossa patologia de estudo a função hepática não apresenta grandes variações pós-parto. Em relação à γGT, o seu valor é pequeno durante a gravidez e aumenta com o parto após uma gravidez normal (86%), o que se pensa ser devido ao aumento de volume plasmático verificado na gravidez normal. No grupo com pré-eclampsia a actividade da γGT não se altera (Pritchard e Stone, 1967). Com o parto também se verificam aumento (26%) do número de leucócitos para valores idênticos nos dois grupos. Em relação aos produtos da sua activação verificámos que na grávida normal o parto induz um aumento da libertação da lactoferrina (89%), na grávida pré-eclâmptica a concentração plasmática de lactoferrina diminui cerca de 26%. Em relação á elástase plasmática, na grávida normal esse parâmetro sofre apenas uma alteração muito ligeira com o parto, na pré-eclampsia há um aumento que se pensa estar associado á falta de inibidores específicos para esta substância. Para a grávida pré-eclâmptica tudo indica que o parto funciona como "melhorador" do processo inflamatório, pois verifica-se uma redução na lactoferrina.

Durante a gravidez há uma série de alterações hemodinâmicas que desaparecem rapidamente no início do puerpério. Ueland e Metcalf (1975) referem que o incremento de 20% a 60% no rendimento cardíaco materno verificado durante o parto dura menos de uma hora. Após o parto há um rápido equilíbrio do volume intravascular através de uma redução do volume sanguíneo (Ueland, citado por Ueland *et al.*, 1969). Esta variação não provoca efeitos secundários pois o organismo materno durante a gravidez apresentava uma hipervolemia que funciona como reserva.

Também o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular das puérperas estão reduzidos em relação à gravidez (Sims e Krantz, 1958). Enquanto a taxa de filtração glomerular só atinge os valores normais 6 semanas após o parto, o fluxo plasmático demora

apenas 3 dias a restabelecer-se (Alvarez e Seattle, 1958). Deste modo se justifica o aumento (20%) nas concentrações plasmáticas dos parâmetros seleccionados como marcadores renais de *stress* (ureia, creatinina e ácido úrico) no grupo cuja gravidez decorreu sem normalmente; no entanto no grupo de grávidas com pré-eclampsia a concentração plasmática de ureia diminui (10%) com o parto, enquanto as concentrações de creatinina e de ácido úrico sofrem apenas um ligeiro aumento. De qualquer modo a única diferença significativa entre os dois grupos durante o puerpério diz respeito à concentração plasmática de ácido úrico. O nível elevado de ácido úrico presente no plasma deve-se a que o aumento da clearance renal verificada no final da gravidez não é suficiente para tirar da mãe o excesso de ácido úrico produzido pelo feto (Boyle *et al.*, 1966).

Em relação à função hepática no puerpério não encontrámos diferenças entre as duas populações, há uma tendência nítida de equilíbrio para os valores encontrados entre os dois grupos (á custa de um menor aumento no grupo com patologia gravídica) no que se refere às actividades enzimáticas (ASAT, ALAT, LDH). O parto induz um aumento nas transamínases nos dois grupos estudados sendo de salientar que a percentagem desse aumento é cerca de duas vezes superior no grupo normal. O único parâmetro que apresenta valores ligeiramente diferentes é a bilirrubina total. Para ambas as populações o parto induz aumento da actividade enzimática das enzimas estudadas, enquanto a bilirrubina total mostra tendência para uma redução (38% no grupo sem patologia e 5% no grupo com patologia associada á gravidez). Para Combes *et al.* (1963), a função hepática retoma os valores normais imediatamente após o parto.

Durante o parto verifica-se um aumento quer no volume plasmático quer no volume globular (com valores superiores aos encontrados na não grávida), seguidos por uma maior redução no pós-parto (Tatum, citado por Pritchard e Adams, 1960) conforme pode ser observado através dos resultados obtidos, encontrámos reduções no volume globular da ordem dos 10%. Nos nossos resultados verificámos que após o parto os eritrócitos recuperam a sua fragilidade normal: um aumento de resistência nos eritrócitos das puérperas com gravidez normal e uma redução no outro grupo em que a resistência era maior durante a gravidez. Este segundo grupo apresentava um aumento da bilirrubina no soro. O parto faz com que os parâmetros hematimétricos (RBC, hemoglobina e volume globular) se igualem nos dois grupos. Tudo leva a fazer crer que no pós-parto das normais haja uma redução da hemólise pois encontrámos valores mais baixos para a hemoglobina no plasma. Este resultado torna-se ainda mais consistente se lhe associarmos o teor da haptoglobina que apresenta uma elevação no puerpério.

Também a nível lipídico foram referidas algumas alterações: os triglicerídeos diminuem (Darmady e Postle, 1982), os lipidos totais diminuem (Pipe *et al.*, 1979), o mesmo se verificando no colesterol e nas lipoproteínas (Potter e Nestel, 1979).

Verifica-se que a peroxidação lipídica não apresenta diferenças no pós-parto das duas populações estudadas (Davidge *et al.*, 1992 e 1994); no entanto, no puerpério das grávidas pré-eclâmpticas a concentração dos peróxidos lipídicos é superior, acompanhado por um aumento de consumo das defesas antioxidantes. A redução da vitamina C está de acordo com os resultados de Moore *et al.* (1979), em que referem uma redução desta vitamina nos leucócitos 24 horas após o parto.

Podemos resumir as consequências do parto do seguinte modo:
—A variação nos níveis de peroxidação lipídica é diferente entre os dois grupos; no entanto há uma maior redução nos sistemas antioxidantes no grupo com patologia associada à gravidez;
—O número de leucócitos aumenta; a concentração plasmática de lactoferrina aumenta nas normais, reduzindo-se no outro grupo; no entanto, a concentração de lactoferrina por número de neutrófilos aumenta após o parto na grávida normal (41%) e diminui com o parto na grávida pré-eclâmptica (53%). Em relação à elástase a sua concentração no grupo de controlo mantém-se constante, enquanto no outro grupo se verifica um aumento da concentração plasmática de elástase;
—O aumento do processo inflamatório também pode ser verificado através do aumento da CRP plasmática; no entanto a concentração de γGT nas puérperas com patologia associada à gravidez não varia;
—O número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o volume globular diminuem, atingindo valores idênticos nos dois grupos estudados;
—A resistência dos eritrócitos iguala-se nos dois grupos, á custa de um aumento da resistência no grupo de grávidas normal e de uma redução no grupo de grávidas com pré-eclamspsia; diminui a concentração da hemoglobina no plasma (46% no grupo normal e 11% no grupo com patologia), o se reflecte num aumento da haptoglobina. A concentração de bilirrubina total diminui;
—Em relação aos parâmetros de função hepática (ASAT, ALAT e LDH), as actividades são superiores no pós-parto.

Resumindo, um dia após um parto normal as alterações do organismo materno são idênticas para os dois grupos estudados. Confirmámos a existência de um maior incremento nas razões oxidantes/antioxidantes na grávida com pré-eclampsia à custa de um maior consumo de defesas antioxidantes. O processo inflamatório torna-se mais evidente após o parto no

grupo com gravidez normal, enquanto para as pré-eclâmpticas a resposta inflamatória não é tão drástica.

Na nossa patologia de estudo verificámos que apesar da eficácia da terapia dada às pré-eclâmpticas durante o 3º trimestre de gestação, somente o parto iria provocar alívio dos efeitos do *stress* provocados por esta patologia, nomeadamente a nível da activação de neutrófilos que apresenta um decréscimo significativo após o parto para o grupo de pré-eclâmpticas.

5.4. O stress do pós-parto versus grupo de controlo (normais e pré-eclâmpticas)

As determinações efectuadas no puerpério tinham como objectivo a quantificação dos níveis de *stress* oxidativo determinado 24 a 48 horas após o parto. Comparando estes valores com os obtidos para o grupo de mulheres não grávidas verificámos que durante esse período as funções maternas não estão completamente recuperadas. É natural que com a saída do feto do útero haja redução do consumo de oxigénio e do fluxo sanguíneo uterino (Assali *et al.*, 1960) e normalização da anormal extracção de oxigénio dos tecidos verificada durante a pré-eclampsia (Belfort *et al.*, 1993). Sabe-se ainda que até 48 horas após o parto se verifica uma redução do rendimento cardíaco, uma normalização da pressão arterial média e um aumento da resistência vascular sistémica (Hawkins *et al.*, 1993).

A função renal está ainda sob a influência das alterações iniciadas como consequência da gravidez. O fluxo plasmático renal renal volta ao normal no 3º dia pós-parto (Alvarez e Seattle, 1958). O aumento da clearance renal não é ainda suficiente para tirar da mãe o excesso de ácido úrico produzido pelo feto (Boyle *et al.*, 1966), o que justifica o nível ainda elevado de ácido úrico que encontrámos nas determinações efectuadas neste período.

Os níveis de peróxidos lipídicos apresentam um valor elevado em relação ao grupo de controlo; as defesas antioxidantes apresentam também diferenças significativas. Em relação ao grupo de controlo, a vitamina E apresenta valores mais elevados enquanto a vitamina C apresenta valores mais baixos. No entanto, as razões entre os peróxidos lipídicos e as defesas antioxidantes são significativamente mais elevadas.

Verificámos ainda que a concentração da CRP está elevada durante o puerpério devido à lesão tecidual provocada pelo parto ou ao aumento da síntese de prostaglandinas que estimulam a síntese de proteínas de fase aguda (Romem e Artal, 1985; Tyler e Roess, 1957). Neste período, o número de leucócitos não está ainda nos valores normais, que só se verificam uma semana pós-parto (Beilin *et al*, 1993), verificando-se também um aumento do

número de neutrófilos e de um dos seus produtos de activação, a lactoferrina. A razão lactoferrina/número de neutrófilos é significativamente superior no puerpério comparativamente ao grupo controlo.

Também confirmámos o aumento do número de plaquetas pós-parto (Katz *et al.*, 1990; KitzMiller *et al.*, 1974). Em relação aos eritrócitos, verificámos uma tendência para retomarem as características do grupo de controlo, pois a fragilidade osmótica já atingiu o seu valor normal. Há uma redução da *red cell mass* no parto, que está de acordo com os resultados de Leeuw *et al.* (1966), e o hematócrito aumenta no 3º dia pós-parto apenas normalizando no 4º/5º dia (Martin *et al.*, 1991 e 1993). A vitamina C dos leucócitos diminui significativamente no 1º dia pós-parto, o que está de acordo com as determinações efectuadas por Moore *et al.* (1979); Chalopin *et al.* (1966) atribuiram esta redução aos efeitos do *stress* oxidativo.

Resumindo:
—Estamos em presença de elevados níveis de *stress* oxidativo acompanhado por aumentos de tocoferol e redução de ascorbato;
—O número de neutrófilos está mais elevado após uma gravidez normal; um dos seus produtos de activação, a lactoferrina, está elevada nos dois grupos de puérperas, enquanto a concentração de elástase se mantém constante após uma gravidez normal e apresenta valores mais elevados após uma pré-eclampsia;
—A função renal está alterada: as concentrações plasmáticas de ureia e de creatinina estão reduzidas e a ácido úrico aumentada;
—Aumentam as actividades das enzimas hepáticas e há redução da bilirrubina;
—O número de eritrócitos, o seu volume globular e a concentração de hemoglobina também se encontram reduzidos;
—A fragilidade osmótica dos eritrócitos já voltou ao seu valor normal, acompanhada por uma redução da hemoglobina no plasma e por um aumento na haptoglobina;
—O número de plaquetas está aumentado;
—O número de brancos está elevado, assim como os seus produtos de activação;
—Em relação ao processo inflamatório, a γGT é ligeiramente superior e a CRP está aumentada.

Estas alterações são ainda resultado do aumento da peroxidação lipídica e/ou da redução dos sistemas antioxidantes. Deste modo podemos dizer que as alterações metabólicas verificadas durante a gravidez e parto ainda não estão completamente recuperadas 24 horas após a saída do feto do útero. No entanto, poderemos afirmar que a remoção do feto do útero é a melhor maneira de se restabelecer o equilíbrio nos sistemas maternos que muitas vezes se encontra alterado por uma série de patologias, nomeadamente na hipertensão induzida pela gravidez.

Capítulo 6. Conclusões

A razão lactoferrina plasmática/número total de neutrófilos demonstra claramente que durante a gravidez e após o parto se verifica activação de neutrófilos. Especulámos que esta activação seja uma das causas das alterações provocadas nos diferentes orgãos ou sistemas.

O número de leucócitos aumenta desde o início da gravidez até ao puerpério. No nosso estudo, a activação de neutrófilos é confirmada por um aumento muito significativo, e maior que o proporcional, dos níveis plasmáticos de lactoferrina. Enquanto o número de neutrófilos aumenta do grupo de controlo até ao 3º trimestre de gravidez (cerca de 1,7 vezes), o nível de lactoferrina no plasma aumenta cerca de 4,3 vezes. Após o parto, o aumento da concentração de lactoferrina é ainda maior que o aumento no número de neutrófilos; a razão lactoferrina por número de neutrófilos varia de 1,6 $\mu g/10^7$neutrófilos no grupo de controlo para 4,1 $\mu g/10^7$neutrófilos no 3º trimestre da gravidez e para 5,8 $\mu g/10^7$neutrófilos no puerpério. Não verificámos existir correspondência com as alterações dos níveis plasmáticos de elástase e atribuimos esta diferença ao facto de a lactoferrina e a elastase serem originárias de subpopulações de grânulos que estão sob diferente controlo secretório.

Confirmámos, usando duas técnicas diferentes, a observação de que os níveis dos peróxidos lipídicos aumenta na mulher grávida, mas no nosso estudo este aumento é já visível no 1º trimestre da gravidez. Confirmámos a redução dos níveis plasmáticos de vitamina C durante os 2º e 3º trimestre de gravidez. Em relação ao puerpério relacionámos a redução da concentração plasmática de vitamina C com a redução já descrita para o leucócito. Apesar do aumento verificado nos níveis de vitamina E durante a gravidez as razões oxidantes/vitamina E são maiores durante a gravidez e o período pós-parto comparativamente á não grávida. A razão entre a peroxidação lipídica e as vitaminas C e E são maiores durante a gravidez. A susceptibilidade das células ao *stress* oxidativo é função do balanço global entre o grau de *stress* oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante. O aumento das razões dos peróxidos lipídicos e a actividade antioxidante indicam que o balanço normal nos sistemas oxidante-antioxidante pode estar desemparelhado.

Os oxidantes libertados durante a activação dos neutrófilos podem desempenhar um papel significativo na lesão ao eritrócito. Verificámos uma redução na concentração de hemoglobina, no hematócrito e no número de eritrócitos provavelmente originada por uma maior expansão de volume comparativamente ao aumento do volume globular. Estudámos os danos produzidos nos eritrócitos pelos neutrófilos activados e verificámos que as células são osmoticamente mais frágeis que na população não grávida, o que origina níveis mais elevados de hemoglobina no plasma e níveis mais baixos de haptoglobina. Pensámos que estes factores possam contribuir para a anemia fisiológica que acompanha a gravidez.

Todos os parâmetros determinados são consistentes com uma resposta inflamatória á gravidez. A resposta inflamatória foi confirmada pela determinação de uma proteina de fase aguda, a proteina C-reactiva (CRP) e por um marcador hepático, a γ-glutamiltránsferase (γGT). Os níveis elevados de CRP durante a gestação e particularmente no puerpério dão provas de uma resposta inflamatória. A redução inicial na γGT seguida por um aumento durante o puerpério confirma que a inflamação provavelmente só se verifica após o parto e que os níveis mais baixos encontrados durante a gravidez podem ser explicados por aumento do volume plasmático.

Como a elástase modula a função plaquetária, efectuámos ainda a contagem das plaquetas e não encontrámos diferenças significativas durante a gravidez.

Após termos chegado a estas conclusões, fizemos o mesmo estudo num grupo de pré-eclâmpticas. Nesta situação só analisámos amostras de grávidas obtidas durante o 3º trimestre de gravidez, pelo que vamos agora focar o que se passa, durante esse período, quer numa situação normal de gravidez quer na patologia por nós eleita.

6.1. Gravidez normal

No grupo do 3º trimestre de gravidez normal, quando comparado com o grupo de não grávidas registámos uma maior activação do neutrófilos confirmada por um aumento da razão lactoferrina/neutrófilos, cujas consequências poderemos esquematizar:

—redução das concentrações plasmáticas de ureia e de creatinina e aumento da concentração de ácido úrico;

—aumento da actividade plasmática das transaminases (ALAT e ASAT) e da LDH, redução da concentração plasmática de bilirrubina total;

—aumento dos produtos plasmáticos da peroxidação lipídica e da concentração plasmática de vitamina E; aumento das razões entre os sistemas oxidantes/antioxidantes ;

—aumento do número de leucócitos, do número de neutrófilos, aumento da concentração plasmática de lactoferrina

—redução do número de eritrócitos, do hematócrito e da concentração de hemoglobina;

—diminuição da resistência eritrocitária e da concentração de haptoglobina no plasma.

—redução da actividade da γGT e aumento da concentração da CRP plasmáticas.

6.2. Pré-eclampsia

No grupo de pré-eclâmpticas, quando comparado com o grupo de gravidez normal registámos:

—aumento da concentração plasmática de ureia, creatinina e ácido úrico;

—aumento da actividade plasmática das transaminases (ASAT e ALAT);

—aumento da resistência eritrócitária;

—diminuição da concentração de hemoglobina no plasma;

—aumento da actividade da γGT e aumento da concentração plasmática de CRP;

—aumento da concentração plasmática de lactoferrina por número de neutrófilos

De seguida analisámos o efeito do parto nos dois grupos estudados, pelo que efectuamos a avaliação dos mesmos parâmetros durante o puerpério.

6.3. Puerpério

Nas primeiras 24 a 48 horas do puerpério após parto eutócico, verificamos em relação aos valores do 3º trimestre:

6.3.1. No grupo de gravidez normal

No grupo de puérperas, quando comparado com o grupo de grávidas do 3º trimestre de gravidez normal registámos:

—aumento das concentrações plasmáticas de ureia, de creatinina e de ácido úrico;

—aumento das actividades plasmáticas das transaminases (ASAT e ALAT), aumento da concentração plasmática da LDH e redução da concentração plasmática da bilirrubina total;

—redução das concentrações plasmáticas de vitamina C e de vitamina E;

—aumento do número de leucócitos e de neutrófilos; aumento da concentração plasmática de lactoferrina e da razão lactoferrina/neutrófilos;

—diminuição do número de eritrócitos, do hematócrito e de concentração de hemoglobina;

—aumento da resistência dos eritrócitos, redução da concentração de hemoglobina no plasma e aumento da concentração plasmática de haptoglobina;

—aumento da actividade da γGT e da concentração da CRP plasmáticas

6.3.2. No grupo das pré-eclâmpticas

No grupo de puérperas, quando comparado com o grupo de grávidas pré-eclâmpticas, registámos:

—redução da concentração plasmática de ureia e aumento da concentração plasmática de creatinina;

—redução das concentrações plasmáticas de vitamina C e de vitamina E;

—aumento do número de leucócitos, do número de neutrófilos e redução da razão lactoferrina/neutrófilos ;

—aumento da concentração plasmática de haptoglobina;

—aumento da concentração plasmática da CRP

6.3.3. Comparação entre os dois grupos de puérperas (das grávidas pré-eclâmpticas e das grávidas normais);

Variações não significativas:

—concentração plasmática de ureia e de creatinina;

—actividade plasmática das transaminases (ASAT e ALAT) e da LDH ;

—concentrações plasmáticas dos produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes (vitaminas C e E);

—número de leucócitos, de neutrófilos e concentração de elastase plasmática;

—número de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina;

—número de plaquetas;

—fragilidade osmótica, concentração de hemoglobina no plasma;

—actividade da γGT e da concentração da CRP plasmáticas

Variações siginificativas no grupo das pré-eclâmpticas:

—redução na concentração plasmática da lactoferrina e da razão lactoferrina/neutrófilos

—aumento da concentração plasmática de ácido úrico, bilirrubina total e haptoglobina.

6.4. Conclusões finais

6.4.1. Na gravidez normal

Neste estudo verificámos que na gravidez humana normal se desenvolve um processo inflamatório. Identificámos um novo marcador de *stress* que é um conhecido produto da activação do neutrófilo - a lactoferrina. Este marcador quando calculado em relação ao número total de neutrófilos elimina a variável volume. Medimos outros parâmetros sanguíneos que servem para quantificar o stress imposto em alguns orgãos; estes incluem hemólise dos eritrócitos, danos hepáticos e renais, peroxidação lipídica e algumas defesas antioxidantes. Os nossos resultados confirmam que a gravidez e o parto impõem sobre o eritrócito níveis variáveis e mensuráveis de *stress*. Concluimos que a activação do neutrófilo pode ser a causa principal de muitos dos resultados aqui referidos e que a variabilidade dos resultados descritos na literatura podem ser atribuidos à já descrita variação das defesas antioxidantes das grávidas ou puérperas e à adaptação destas defesas durante a gravidez.

6.4.2. Na pré-eclampsia

A resposta inflamatória à gravidez é ainda maior neste grupo (de grávidas tratadas). Verificámos também que a activação do neutrófilo é superior, havendo uma diferença estatisticamente significativa da razão lactoferrina/neutrófilo entre a gravidez normal e a pré-eclampsia. Os resultados obtidos para os parâmetros de função renal, de função hepática e resistência eritrocitária eram significativamente diferentes do grupo normal. Especulámos que estas diferenças seriam consequência da activação do neutrófilo.

6.4.3. Puerpério

Para a gravidez normal o parto parece agravar o estado inflamatório, o contrário acontece no grupo de grávidas com pré-eclampsia. Neste grupo, o processo inflamatório parece ser mais grave antes do que após o parto. O parto tem pois repercussões diferentes nos dois grupos estudados.

Na gravidez normal o parto induz um aumento da activação dos neutrófilos, revelado por um aumento da concentração plasmática de lactoferrina. Este processo leva a alterações noutros sistemas —nomeadamente no hepático e no renal— e a um aumento da resistência dos eritrócitos. Na pré-eclampsia verifica-se uma redução da activação dos neutrófilos associada a um menor número de parâmetros com diferenças significativas entre o antes e o pós parto. No puerpério notámos já certa semelhança entre os valores obtidos para os dois grupos.

A razão lactoferrina/neutrófilo pode ser um marcador importante para avaliar as consequências do desenvolvimento da pré-eclampsia, assim como a sua determinação pode ser valiosa na clínica da pré-eclampsia.

Anexo

Tabela 1. Concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante a gravidez normal e o puerpério.

	Não Grávidas	Grávidas 1ºtrimestre	Grávidas 2ºtrimestre	Grávidas 3ºtrimestre	Puérperas (24-48 h)
Testes de função renal					
Ureia (mg/dl)	31,4±1,5	19,1±1,3	21,5±1,0	21,3±0,9	26,7±1,1
Creatinina (mg/dl)	0,79±0,02	0,51±0,01	0,52±0,02	0,58±0,02	0,67±0,03
Ácido úrico (mg/dl)	3,0±0,2	2,7±0,1	3,1±0,1	4,1±0,2	5,0±0,2
Testes de função hepática					
ASAT (U/l)	15,7±0,7	21,4±1,7	18,5±0,9	19,9±0,7	30,2±2,4
ALAT (U/l)	13,4±0,5	26,4±4,0	20,1±1,9	17,7±0,9	29,1±4,3
LDH (U/l)	206±6	213±5	218±7	252±9	307±13
Bilirrubina (mg/dl)	0,66±0,16	0,53±0,02	0,40±0,03	0,37±0,02	0,23±0,05
Testes de determinação dos produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes					
TBA (nmol/l)	51,7±2,8	102,2±5,1	111,4±3,9	105,1±3,2	96,4±3,2
MDA-TBA (µmol/l	4,3±0,1	7,3±0,5	11,1±0,4	10,5±0,5	11,2±0,6
Vitamina C (mg/dl)	139,7±10,9	136,3±10,9	143,8±9,0	118,1±6,4	95,7±7,8
Vitamina E (µg/ml)	5,6±0,1	5,6±0,3	7,4±0,2	8,5±0,2	7,6±0,2
Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes					
TBA/Vitamina C	0,40±0,04	0,90±0,08	0,89±0,06	1,01±0,09	1,07±0,08
TBA/Vitamina E	9,3±0,7	18,9±1,4	15,8±0,9	12,4±0,4	12,9±0,4
MDA-TBA/Vit C	0,033±0,003	0,085±0,022	0,095±0,008	0,097±0,006	0,13±0,013
MDA-TBA/Vit E	0,77±0,04	1,45±0,21	1,62±0,10	1,27±0,07	1,51±0,07
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos					
Leucócitos ($x10^9$/l)	5,6±0,2	10,2±0,2	9,7±0,4	9,8±0,3	12,1±0,5
Elástase (µg/l)	57,6±2,7	53,4±3,2	46,3±4,5	58,4±4,2	57,5±7,1
Lactoferrina (µg/ml)	0,70±0,14	2,56±0,33	3,89±0,65	3,02±0,40	5,72±0,99
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas					
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	4,50±0,06	4,20±0,06	3,99±0,06	4,11±0,05	3,76±0,11
Hematócrito (l/l)	0,43±0,006	0,40±0,004	0,38±0,005	0,40±0,005	0,36±0,02
Hemoglobina (g/dl)	14,0±0,2	12,4±0,2	11,8±0,1	12,3±0,1	11,5±0,3
Frag Osm (NaCl g/l)	4,36±0,03	4,44±0,03	4,52±0,03	4,50±0,03	4,35±0,03
Hb no plasma (mg/dl)	1,44±0,49	2,68±0,42	2,89±0,39	2,31±0,31	1,25±0,28
Haptoglobina (mg/dl)	132±19	128±10	99±6	93±5	155±10
Plaquetas ($x10^9$/l)	195±12	257±10	213±11	200±9	225±10
Marcadores inflamatórios					
γGT (U/l)	10,9±0,7	6,6±0,4	5,4±0,5	6,5±0,5	12,1±1,9
CRP (mg/dl)	0,25±0,01	0,60±0,03	0,63±0,05	0,60±0,03	5,17±0,75
Testes de activação de neutrófilos					
Lactoferrina (µg/ml)	0,70±0,14	2,56±0,33	3,89±0,65	3,02±0,40	5,72±0,99
Neutrófilos ($x10^9$/l)	4,3±0,5	4,4±0,6	6,8±0,5	7,3±0,6	9,8±0,5
µg lactoferrina/10^7 N	1,6±0,4	5,8±1,0	5,7±1,1	4,1±0,8	5,8±1,2

Tabela 2. Concentrações corrigidas para os aumentos de volume descritos durante a gravidez: 10% no 1º trimestre, 35% no 2º trimestre e 50% no 3º trimestre.

	Não Grávidas	Grávidas 1ºtrimestre	Grávidas 2ºtrimestre	Grávidas 3ºtrimestre	Puérperas (24-48 h)
Testes de função renal					
Ureia (mg/dl)	31,4	21,0	29,0	32,0	26,7
Creatinina (mg/dl)	0,79	0,56	0,70	0,87	0,67
Ácido úrico (mg/dl)	3,0	3,0	4,2	6,2	5,0
Testes de função hepática					
ASAT (U/l)	15,7	23,5	25,0	29,9	30,2
ALAT (U/l)	13,4	29,0	27,1	26,6	29,1
LDH (U/l)	206	234	294	378	307
Bilirrubina (mg/dl)	0,66	0,58	0,54	0,56	0,23
Produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes					
TBA (nmol/l)	51,7	112,4	150,4	157,7	96,4
MDA-TBA (µmol/l)	4,3	8,0	15,0	15,8	11,2
Vitamina C (mg/dl)	139,7	149,9	194,1	177,2	95,7
Vitamina E (µg/ml)	5,6	6,2	10,0	12,8	7,6
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos					
Leucócitos ($x10^9$/l)	5,6	11,2	13,1	14,7	12,1
Elástase (µg/l)	57,6	58,7	62,5	87,6	57,5
Lactoferrina (µg/ml)	0,70	2,82	5,25	4,53	5,72
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas					
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	4,50	4,62	5,39	6,17	3,76
Hematócrito (l/l)	0,43	0,44	0,51	0,60	0,36
Hemoglobina (g/dl)	14,0	13,6	15,9	18,5	11,5
Hb no plasma (mg/dl)	1,44	2,95	3,90	3,47	1,25
Haptoglobina (mg/dl)	132	141	134	140	156
Plaquetas ($x10^9$/l)	195	283	288	300	225
Marcadores inflamatórios					
γGT (U/l)	10,9	7,3	7,3	9,8	12,1
CRP (mg/dl)	0,25	0,66	0,85	0,90	5,17
Testes de activação de neutrófilos					
Lactoferrina (µg/ml)	0,70	2,82	5,25	4,53	5,72
Neutrófilos ($x10^9$/l)	4,3	4,8	9,2	11,0	9,8
µg Lactoferrina/10^7 N	1,6	5,8	5,7	4,1	5,8

Tabela 3. Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante o 3º trimestre de gravidez normal e o 3º trimestre de gravidez pré-eclâmptica.

	3º Trimestre Gravidez Normal	3º Trimestre Gravidez Pré-eclâmptica	*p*
Testes de função renal			
Ureia (mg/dl)	21,3±0,9	29,1±2,0	<0,01
Creatinina (mg/dl)	0,58±0,02	0,68±0,02	<0,001
Ácido úrico (mg/dl)	4,1±0,2	5,9±0,2	<0,001
Testes de função hepática			
ASAT (U/l)	19,9±0,7	26,6±1,9	<0,01
ALAT (U/l)	17,7±0,9	26,4±3,4	<0,05
LDH (U/l)	252±9	288±15	s/s
Bilirrubina (mg/dl)	0,37±0,02	0,39±0,04	s/s
Produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes			
TBA (nmol/l)	105,1±3,2	101,9±3,9	s/s
MDA-TBA (µmol/l)	10,5±0,5	12,2±0,6	s/s
Vitamina C (mg/dl)	118,1±6,4	119,5±6,1	s/s
Vitamina E (µg/ml)	8,5±0,2	8,7±0,3	s/s
Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes			
TBA/Vit C	1,01±0,09	0,95±0,08	s/s
TBA/Vit E	12,4±0,4	11,6±0,6	s/s
MDA-TBA/Vit C	0,097±0,006	0,12±0,02	s/s
MDA-TBA/Vit E	1,27±0,07	1,40±0,11	s/s
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos			
Leucócitos ($x10^9$/l)	9,8±0,3	9,3±0,3	s/s
Elástase (µg/l)	58,4±4,2	63,3±6,0	s/s
Lactoferrina (µg/ml)	3,02±0,40	4,63±1,08	s/s
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas			
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	4,11±0,05	4,11±0,08	s/s
Hematócrito (l/l)	0,40±0,005	0,40±0,007	s/s
Hemoglobina (g/dl)	12,3±0,1	12,2±0,2	s/s
Frag Osm (NaCl g/l)	4,50±0,03	4,32±0,04	<0,001
Hb no plasma (mg/dl)	2,31±0,31	1,52±0,25	<0,05
Haptoglobina (mg/dl)	93±5	109±6	s/s
Plaquetas ($x10^9$/l)	200±9	204±7	s/s
Marcadores inflamatórios			
γGT (U/l)	6,5±0,5	10,3±1,5	<0,05
CRP (mg/dl)	0,60±0,03	1,56±0,41	<0,05
Testes de activação de neutrófilos			
Lactoferrina (µg/ml)	3,02±0,40	4,63±1,08	s/s
Neutrófilos ($x10^9$/l)	7,3±0,6	6,4±0,4	s/s
µg Lactoferrina/10^7 N	4,1±0,8	7,3±1,9	<0,001

Tabela 4. Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante o pós-parto de uma gravidez normal e de uma gravidez pré-eclâmptica

	Puérperas Gravidez Normal	Puérperas Gravidez Pré-eclâmptica	*p*
Testes de função renal			
Ureia (mg/dl)	26,7±1,1	26,3±1,6	s/s
Creatinina (mg/dl)	0,67±0,03	0,73±0,04	s/s
Ácido úrico (mg/dl)	5,0±0,2	6,2±0,3	<0,01
Testes de função hepática			
ASAT (U/l)	30,2±2,4	32,4±3,7	s/s
ALAT (U/l)	29,1±4,3	31,2±5,8	s/s
LDH (U/l)	307±13	314±19	s/s
Bilirrubina (mg/dl)	0,23±0,05	0,37±0,04	<0,05
Produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes			
TBA (nmol/l)	96,4±3,2	108,2±5,9	s/s
MDA-TBA (µmol/l)	11,2±0,6	11,6±0,9	s/s
Vitamina C (mg/dl)	95,7±7,8	75,6±8,2	s/s
Vitamina E (µg/ml)	7,6±0,2	7,2±0,4	s/s
Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes			
TBA/Vitamina C	1,07±0,08	1,28±0,13	s/s
TBA/Vitamina E	12,9±0,4	15,1±2,2	s/s
MDA-TBA/Vit C	0,13±0,01	0,15±0,07	s/s
MDA-TBA/Vit E	1,51±0,07	1,56±0,19	s/s
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos			
Leucócitos ($x10^9$/l)	12,1±0,5	12,0±0,7	s/s
Elástase (µg/l)	57,5±7,1	72,6±7,9	s/s
Lactoferrina (µg/ml)	5,72±0,99	3,44±0,32	<0,05
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas			
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	3,76±0,11	3,92±0,09	s/s
Hematócrito (l/l)	0,36±0,01	0,36±0,01	s/s
Hemoglobina (g/dl)	11,5±0,3	11,7±0,3	s/s
Frag Osm (NaCl g/l)	4,35±0,03	4,35±0,05	s/s
Hb no plasma (mg/dl)	1,25±0,28	1,35±0,47	s/s
Haptoglobina (mg/dl)	155±10	200±15	<0,01
Plaquetas ($x10^9$/l)	225±10	221±9	s/s
Marcadores inflamatórios			
γ GT (U/l)	12,1±1,9	10,4±1,8	s/s
CRP (mg/dl)	5,17±0,75	7,36±1,00	s/s
Testes de activação de neutrófilos			
Lactoferrina (µg/ml)	5,72±0,99	3,44±0,42	<0,05
Neutrófilos ($x10^9$/l)	9,8±0,5	10,2±0,4	s/s
µg Lactoferrina/10^7 N	5,8±1,2	3,4±0,9	<0,001

Tabela 5. Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos antes e após o parto num grupo de mulheres com gravidez normal.

	3º Trimestre Gravidez Normal	Puérperas Gravidez Normal	*p*
Testes de função renal			
Ureia (mg/dl)	21,3±0,9	26,7±1,1	<0,001
Creatinina (mg/dl)	0,58±0,02	0,67±0,03	<0,001
Ácido úrico (mg/dl)	4,1±0,2	5,0±0,2	<0,001
Testes de função hepática			
ASAT (U/l)	19,9±0,7	30,2±2,4	<0,001
ALAT (U/l)	17,7±0,9	29,1±4,3	<0,01
LDH (U/l)	252±9	307±13	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,37±0,02	0,23±0,05	<0,01
Produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes			
TBA (nmol/l)	105,1±3,2	96,4±3,2	s/s
MDA-TBA (µmol/l)	10,5±0,5	11,2±0,6	s/s
Vitamina C (mg/dl)	118,1±6,4	95,7±7,8	<0,05
Vitamina E (µg/ml)	8,5±0,2	7,6±0,2	<0,05
Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes			
TBA/Vitamina C	1,01±0,09	1,07±0,08	s/s
TBA/Vitamina E	12,4±0,4	12,9±0,4	s/s
MDA-TBA/Vit C	0,097±0,006	0,13±0,013	<0,01
MDA-TBA/Vit E	1,27±0,07	1,51±0,07	<0,05
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos			
Leucócitos ($x10^9$/l)	9,8±0,3	12,1±0,5	<0,001
Elástase (µg/l)	58,4±4,2	57,5±7,1	s/s
Lactoferrina (µg/ml)	3,02±0,40	5,72±0,99	<0,01
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas			
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	4,11±0,05	3,76±0,11	<0,01
Hematócrito (l/l)	0,40+0,005	0,36±0,012	<0,001
Hemoglobina (g/dl)	12,3±0,1	11,5±0,3	<0,05
Frag Osm (NaCl g/l)	4,50±0,03	4,35±0,03	<0,01
Hb no plasma (mg/dl)	2,31±0,31	1,25±0,28	<0,05
Haptoglobina (mg/dl)	93±5	155±10	<0,001
Plaquetas ($x10^9$/l)	200±9	225±10	s/s
Marcadores inflamatórios			
γGT (U/l)	6,5±0,5	12,1±1,9	<0,01
CRP (mg/dl)	0,60±0,03	5,17±0,75	<0,001
Testes de activação de neutrófilos			
Lactoferrina (µg/ml)	3,02±0,40	5,72±0,99	<0,01
Neutrófilos ($x10^9$/l)	7,3±0,6	9,8±0,5	<0,01
µg Lactoferrina/10^7 N	4,1±0,8	5,8±1,2	<0,01

Tabela 6. Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos antes e após o parto num grupo de mulheres com pré-eclampsia gravídica.

	3º Trimestre Gravidez Pré-eclâmptica	Puérperas Gravidez Pré-eclâmptica	*p*
Testes de função renal			
Ureia (mg/dl)	29,1±2,0	26,3±1,6	<0,001
Creatinina (mg/dl)	0,68±0,02	0,73±0,04	<0,001
Ácido úrico (mg/dl)	5,9±0,2	6,2±0,3	s/s
Testes de função hepática			
ASAT (U/l)	26,6±1,9	32,4±3,7	s/s
ALAT (U/l)	26,4±3,4	31,2±5,8	s/s
LDH (U/l)	288±15	314±19	s/s
Bilirrubina (mg/dl)	0,39±0,04	0,37±0,04	s/s
Produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes			
TBA (nmol/l)	101,9±3,9	108,2±5,9	s/s
MDA-TBA (µmol/l)	12,2±0,6	11,6±0,9	s/s
Vitamina C (mg/dl)	119,5±6,1	75,6±8,2	<0,001
Vitamina E (µg/ml)	8,7±0,3	7,2±0,4	<0,01
Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes			
TBA/Vitamina C	0,95±0,08	1,28±0,13	<0,05
TBA/Vitamina E	11,6±0,6	15,1±2,2	<0,05
MDA-TBA/Vit C	0,12±0,02	0,15±0,07	s/s
MDA-TBA/Vit E	1,40±0,11	1,56±0,19	s/s
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos			
Leucócitos ($x10^9$/l)	9,3±0,3	12,0±0,7	<0,001
Elástase (µg/l)	63,3±6,0	72,6±7,9	s/s
Lactoferrina (µg/ml)	4,63±1,08	3,44±0,42	s/s
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas			
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	4,11±0,08	3,92±0,09	s/s
Hematócrito (l/l)	0,40±0,007	0,36±0,01	s/s
Hemoglobina (g/dl)	12,2±0,2	11,7±0,3	s/s
Frag Osm (NaCl g/l)	4,32±0,04	4,35±0,05	s/s
Hb no plasma (mg/dl)	1,52±0,25	1,35±0,47	s/s
Haptoglobina (mg/dl)	109±6	200±15	<0,001
Plaquetas ($x10^9$/l)	204±7	221±9	s/s
Marcadores inflamatórios			
γGT (U/l)	10,3±1,5	10,4±1,8	s/s
CRP (mg/dl)	1,56±0,41	7,36±1,00	<0,001
Testes de activação de neutrófilos			
Lactoferrina (µg/ml)	4,63±1,08	3,44±0,42	s/s
Neutrófilos ($x10^9$/l)	6,4±0,4	10,2±0,4	<0,01
µg Lactoferrina/10^7 N	7,3±1,9	3,4±0,9	<0,001

Tabela 7. Comparação entre as concentrações de parâmetros bioquímicos e hematológicos no pós-parto de grávidas normais e pré-eclâmpticas e o grupo de não grávidas (controlo).

	Controlo Não Grávidas	Puérperas Gravidez Normal	*p*	Puérperas Gravidez Pré-eclâmptica	*p*
Testes de função renal					
Ureia (mg/dl)	31,4±1,5	26,7±1,1	<0,05	26,3±1,6	<0,05
Creatinina (mg/dl)	0,79±0,02	0,67±0,03	<0,05	0,73±0,04	s/s
Ácido úrico (mg/dl)	3,0±0,2	5,0±0,2	<0,001	6,2±0,3	<0,001
Testes de função hepática					
ASAT (U/l)	15,7±0,7	30,2±2,4	<0,01	32,4±3,7	<0,01
ALAT (U/l)	13,4±0,5	29,1±4,3	s/s	31,2±5,8	<0,05
LDH (U/l)	206±6	307±13	<0,001	314±19	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,66±0,16	0,23±0,05	<0,01	0,37±0,04	<0,05
Testes de determinação dos produtos de peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes					
TBA (nmol/l)	51,7±2,8	96,4±3,2	<0,001	108,2±5,9	<0,001
MDA-TBA (µmol/l)	4,3±0,1	11,2±0,6	<0,001	11,6±0,9	<0,001
Vitamina C (mg/dl)	139,7±10,9	95,7±7,8	<0,01	75,6±8,2	<0,001
Vitamina E (µg/ml)	5,6±0,1	7,6±0,2	<0,001	7,2±0,4	<0,05
Razões peroxidação lipídica/defesas antioxidantes					
TBA/Vitamina C	0,40±0,04	1,07±0,08	<0,001	1,28±0,13	<0,001
TBA/Vitamina E	9,3±0,7	12,9±0,4	<0,001	15,1±2,2	<0,05
MDA-TBA/Vit C	0,030±0,003	0,13±0,013	<0,001	0,15±0,07	<0,001
MDA-TBA/Vit E	0,77±0,04	1,51±0,07	<0,001	1,56±0,19	<0,001
Leucócitos e produtos de activação de neutrófilos					
Leucócitos ($x10^9$/l)	5,6±0,2	12,1±0,5	<0,001	12,0±0,7	<0,001
Elástase (µg/l)	57,6±2,7	57,5±7,1	s/s	72,6±7,9	s/s
Lactoferrina (µg/ml)	0,70±0,14	5,72±0,99	<0,01	3,44±0,32	<0,001
Perfil hematológico, índices eritrocitários e plaquetas					
Eritrócitos ($x10^{12}$/l)	4,50±0,06	3,76±0,11	<0,001	3,92±0,09	<0,01
Hematócrito (l/l)	0,43±0,006	0,36±0,012	<0,001	0,36±0,011	<0,001
Hemoglobina (g/dl)	14,0±0,2	11,5±0,3	<0,001	11,7±0,3	<0,001
Frag Osm(NaCl g/l)	4,36±0,03	4,35±0,03	s/s	4,35±0,05	s/s
Hb no plasma (mg/dl)	1,44±0,49	1,25±0,28	s/s	1,35±0,47	s/s
Haptoglobina(mg/dl)	132±19	155±10	s/s	200±15	<0,01
Plaquetas ($x10^9$/l)	195±12	225±10	s/s	221±9	s/s
Marcadores inflamatórios					
γGT (U/l)	10,9±0,7	12,1±1,9	s/s	10,4±1,8	s/s
CRP (mg/dl)	0,25±0,01	5,17±0,75	<0,001	7,36±1,00	<0,001
Testes de activação de neutrófilos					
Lactoferrina (µg/ml)	0,70±0,14	5,72±0,99	<0,01	3,44±0,32	<0,001
Neutrófilos ($x10^9$/l)	4,3±0,5	9,8±0,5	<0,001	10,2±0,4	<0,001
µg Lactoferrina/10^7 N	1,6±0,4	5,8±1,2	<0,001	3,4±0,9	<0,001

Bibliografia

Abe K, Katsui G (1975). Fluorometric determination of tocopherol in serum. J Jap Soc Food Nut 28:227-280.

Abe S (1991). An overview of pregnancy in women with underlying renal disease. Am J Kidney Dis 17:112-115.

Aberg A (1992). Diagnostic methods for pregnancy hypertension. Int J Techn Assess in Health Care 8:72-74.

Adlercreutz H, Svanborg A, Anberg A (1967a). Recurrent jaundice in pregnancy. I. A clinical and ultrastructural study. Am J Med 42:335-40.

Adlercreutz H, Svanborg A, Anberg A (1967b). Recurrent jaundice in pregnancy. II. A study of the estrogens and their conjugation in late pregnancy. Am J Med 42:341-47.

Ahocas RA, Mercer BM, Sibai BM (1991). Enhanced endothelium-derived relaxing factor activity in pregnant spontaneously hypertensive rats. Am J Obstet Gynecol 164:242-45.

Alvarez RR, Bratvold GE (1961). Serum lipids in pre-eclampsia. Am J Obstet Gynecol 81:1140-48.

Alvarez RR, Seattle W (1958). Renal glomerulotubular mechanisms during normal pregnancy. I. Glomerular filtration rate, renal plasma flow, and creatinine clearance. Am J Obstet Gynecol 75:931-44.

Arbogast BW, Leeper SC, Merick RD *et al.* (1994). Which plasma factors bring about disturbance of endothelial function in pre-eclampsia? Lancet 343:340-41.

Artal R, Platt LD, Sperling M *et al.* (1981). Exercise in pregnancy I. Maternal cardiovascular and metabolic responses in normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol 140:123-27.

Assali NS, Rauramo L, Peltonen T (1960). Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism. Am J Obstet Gynecol 79:86-98.

Assali NS, Vaughn DL (1977). Blood volume in pre-eclampsia: fantasy and reality. Am J Obstet Gynecol 129:355-59.

Aurell M, Cramer K (1966). Serum lipids lipoproteins in human pregnancy. Clin Chim Acta 13:278-84.

Babior B, Kipnes RS, Curnutte JT (1973). The production of leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin Invest 52:741-43.

Badwey JA, Karnovsky ML (1980). Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. Annu Rev Biochem 49:695-00.

Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, *et al.* (1994). Plasma and urinary endothelin 1, prostacyclin metabolites and platelet consumption in pre-eclampsia and essential hypertensive pregnancy. Blood Press 1994:38-46.

Barham D, Trinder P (1972). An improved reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. Analyst 97:142-45.

Barr SM, Lees KR, Butters L *et al.* (1989). Platelet intracellular free calcium concentration in normotensive and hypertensive pregnancies in the human. Clin Sci 76:67-71.

Barr SM, Lees KR, McBrian DD *et al.* (1988). Exercise and platelet intracellular free calcium concentration. Clin Sci 75:221-24.

Barron WM (1992). The syndrome of preeclampsia. Gastroenterol Clin North America 21:851-72.

Bartels H, Bohmer M (1971). Eine mikromethod zur kreatininbestimmung. Clin Chim Acta 32:81-85.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J *et al.* (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 87:1620-24.

Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG *et al.* (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. Biol Chem 375:81-88.

Beckman, JS (1991). The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. J Dev Physiol 15:53-59.

Beilin LJ, Croft KD, Michael CA *et al.* (1993). Neutrophil platelet-activating factor in normal and hypertensive pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. Clin Sci 85:63-70.

Belfort MA, Anthony J, Saade GR *et al.* (1993). The oxygen consumption/oxygen delivery curve in severe preeclampsia: Evidence for a fixed oxygen extraction state. Am J Obstet Gynecol 169:1448-55.

Bellina JH, Dougherty CM, Mickal A (1970). Pyeloureteral dilatation and pregnancy. Am J Obstet Gynecol 108:356-63.

Ben-Ami M, Giladi Y, Shalev E (1994). The combination of magnesium sulphate and nifedipine: a cause of neuromuscular blockade. Br J Obstet Gynaecol 101:262-63.

Benedetti TJ, Quilligan EJ (1980). Cerebral edema in severe pregnancy-induced hypertension. Am J Obstet Gynecol 137:860-63.

Benigni A, Gregorini G, Frusca T *et al.* (1989). Effect of low-dose aspirin on fetal and maternal generation of thromboxane by platelets in women at risk for pregnancy-induced hypertension. N Engl J Med 321:357-362.

Benigni A, Orisio S, Gaspari F *et al.* (1992). Evidence against a pathogenetic role for endothelin in pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 99:798-02.

Berge LN, Ostensen M, Revhaug A (1988). Phagocytic cell activity in pre-eclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 67:499-504.

Betz AL (1985). Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. J Neurochem 44, 574-77.

Bielski BHJ (1975). Some properties of the ascorbate free radical. Ann N Y Acad Sci 258:231-35.

Birdsall M, Pattison N, Chamley L (1992). Antiphospholipid antibodies in pregnancy. Aust NZJ Obstet Gynaecol 32:328-30.

Blakney GB, Dinwoodie AJ (1975). Clin Biochem 8:96-98.

Bodzenta A, Thomson JM, Poller L (1980). Prostacyclin activity in amniotic fluid in preeclampsia. Lancet 2:650.

Bonnar J, McNicol GP, Douglas AS (1971). Coagulation and fibrinolytic systems in pre-eclampsia and eclampsia. Br Med J 2:12-16.

Boyle JA, Campbell S, Duncan AM *et al.* (1966). Serum uric acid levels in normal pregnancy with observations on the renal excretion of urate in pregnancy. J Clin Pathol 19:501-03.

Branch DW, Mitchell MD, Miller E *et al.* (1994). Pre-eclampsia and serum antibodies to oxidised low-density lipoproteins. Lancet 343:645-46.

Braverman DZ, Johnson ML, Kern F (1980). Effects of pregnancy and contraceptive steroids on gallbladder function. N Engl J Med 362-64.

Brecher, G., Cronkite, EP (1950). Morphology and enumeration of human blood platelets. J of Appl Physiology 3:365-67.

Brody S, Spetz S (1967). Plasma, extracellular, and interstitial fluid volumes in pregnancy complicated by toxaemia. Acta Obstet Gynecol Scand 46:138-50.

Brosens I, Ranaer M (1972). On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia. Obstet Gynecol 78:194-99.

Brosens I, Renaer M (1972). On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia. J Obstet Gynecol Br Cwlth 79:794-99.

Brosens I, Robertson WB, Dixon HG (1972). The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia. Obstet Gynecol Annu 1:177-80.

Brower MS, Levin RI, Garry K (1985). Human neutrophil elastase modulates platelet function by limited proteolysis of membrane glycoproteins. J Clin Invest 75:657-61.

Brown MA, Zammit VC, Lowe SA (1989). Capillary permeability and extracellular fluid volumes in pregnancy-induced hypertension. Clin Sci 77:599-04.

Brown MA, Zammit VC, Mitar DM (1992). Extracellular fluid volumes in pregnancy-induced hypertension. J Hypertension 10:61-68.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988). Advanced glycosilation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 318:1315-19.

Buchan PC (1982). Preeclampsia - A hyperviscosity syndrome. Am J Obstet Gynecol 142:111-12.

Burrows RF, Hunter DJS, Andrew M *et al.* (1987). A prospective study investigating the mechanism of thrombocytopenia in preeclampsia. Obstet Gynecol 70:334-38.

Bussolino E, Benedetto C, Massobrio M *et al.* (1980). Maternal vascular prostacyclin activity in preeclampsia. Lancet 88:1101.

Cadroy Y, Granjean H, Pichon J *et al.* (1993). Evaluation of six markers of haemostatic system in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension or pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 100:416-20.

Carr RS, Bally MB, Thomas P *et al.* (1983). Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. Anal Chem 55: 1229-1232.

Cester N, Staffolani R, Rabini RA *et al.* (1994). Pregnancy induced hypertension: a role for peroxidation in microvillus plasma membranes. Moll Cell Biochem 131:151-55.

Chalopin H, Moutin M, Ratsimanga AR (1966). Ascorbic acid. World Review of Nutrition and Dietetics 6:165-75.

Chesley LC (1972). Plasma and red cell volumes during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 112:440-50.

Chesley LC, Annitto JE, Cosgrove RA (1968). The familial factor in toxemia of pregnancy. Obstet Gynecol 32:303-07.

Chesley LC, Chesley ER (1939). The diodrast clearance and renal blood flow in normal pregnant and non-pregnant women. Am J Physiol 127:731-37.

Chesley LC, Duffus GM (1971). Posture and apparent plasma volume in late pregnancy. J Obstet Gynecol Br Cwlth 78:406-12.

Chesley LC, Sloan DM (1964). The effect of posture on renal function in late pregnancy. Am J Obstet Gynecol 89:754-56.

Chesley LC, Valenti C, Rein H (1958). Excretion of sodium loads by nonpregnant and pregnant normal, hypertensive and preeclamptic women. Metabolism 2:575-88.

Chiu D, Lubin B, Sohet SB (1992). Peroxidative reactions in red cell biology. In: Free Radicals in Biology, vol. 5, Pryor W.A. Ed Academic Press, New York, 115-35.

Churchill D, Kilby MD, Bignell A *et al.* (1994). Gamma-glutamyl transferase activity in gestational hypertension. Br J Obstet Gynaecol 101:251-53.

Clark DA (1989). Cytoquines and pregnancy. Curr Opin Immunol 1:1148-52.

Claster S, Quintanilha A (1989). Neutrophil-induced erythrocyte injury. In: CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine 1:231-235.

Clinch J, Tindall VR (1969). Effect of oestrogens and progestogens on liver function in the puerperium. Br Med J 1:602-05.

Cloeren SE, Lippert TH, Hinselman M (1973). Hypovolemia in toxemia of pregnancy. Plasma expander therapy with surveillance of central nervous pressure. Arch Gynecol Obstet 215:123-32.

Cohen G (1979). Lipid peroxidation. Detection in vivo and in vitro through the formation of saturated hydrogen gases. In: Oxygen free Radicals and Tissue Damage CIBA Foundation Symposium vol 65, Elsevier, Amsterdam, 177-82.

Combes B, Shibata H, Adams R *et al.* (1963). Alterations in sulfobromophthalein sodium-removal mechanisms from blood during normal pregnancy. J Clin Invest 42:1431-42.

Connell EB, Connell JT (1971). C-reactive protein in pregnancy and contraception. Am J Obstet Gynecol 110:633-39.

Coslovsky e Rezende (1965). In: Obstetrícia. Repercussões da gravidez sobre o organismo, Ed. Guanabara, 5ª Ed., 108-127.

Craddok PR, Fehr H, Brigham R *et al.* (1977). Complement and leukocyte mediated pulmonary disfunction in hemodyalisis. N Engl J Med 269:769-73.

Darmady J, Postle AD (1982). Lipid metabolism in pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 89:211-15.

Davidge ST, Hubel CA, Brayden RD *et al.* (1992). Sera antioxidant activity in uncomplicated and preeclamptic pregnancies. Obstet Gynecol 79:897-01.

Davidge ST, Hubel CA, McLaughlin MK (1994). Lipid peroxidation increases arterial cyclooxygenase activity during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 170:215-22.

Davison JM (1991). Dialysis, transplantation, and pregnancy. Am J Kidney Dis 17:127-32.

Davison JM, Dunlop W, Ezimokhai M (1980). 24-hour creatinine clearance during the third trimester of normal pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 87:106-09.

De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1975). The ultraestructure of acute atherosis in hypertensive pregnancy. Am J Obstet Gynecol 123:164-74.

De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. Br J Obstet Gynaecol 93:1049-59.

Di Renzo GC, Coata G, De Franceschi S *et al.* (1993). Platelet thromboxane A_2 receptor number and function in normal and hypertensive patients. Am J Reprod Immunol 30:160-66.

Dillard CJ, Litov RE, Tapper AL (1978). Effects of dietary vitamin E, selenium and polyunsaturated fats in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentane production. Lipids 13:396-00.

Dixon HG, Browne JCM, Davey DA (1963). Choridecidual and myometrial blood-flow. Lancet 369-73.

Doba T, Burton GW, Ingold KU (1985). Antioxidant and co-oxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation.of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. Biochim Biophys Acta 835:298-03.

Donato H, Sohal RS (1981). Relationship of lipofucsin accumulation to aging. In: CRC Handbook of Biochemistry in Aging, Florim JR, Adelman RC and Roth GS, ed, CRC Press, Boca Raton, FLA pp 221-31.

Doroshow Jh, Locker GY and Myers CE (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. J Clin Invest 65:128-32.

Douglas CWI, Craig GT (1989). Quantitation of lactoferrin in odontogenic cyst fluids. J Clin Pathol 42: 180-183.

Dunlop W, Davison JM (1977). The effect of normal pregnancy upon the renal handling of uric acid. Br J Obstet Gynaecol 84:13-21.

Engel RR, Roodkey FL, Krill CE (1971). Carboxyhemoglobin levels as an index of hemolysis. Pediatrics 47:723-30.

Entman SS, Kambam JR, Bradley CA *et al.* (1987). Increased levels of carboxyhemoglobin and serum iron as an indicator of increased red cell turnover in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 156:1169-73.

Entman SS, Moore RM, Richardson LD *et al.* (1982a). Elevated serum iron in toxemia of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 143:398-04.

Entman SS, Richardson LD (1983). Clinical applications of the altered iron kinetics of toxemia of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 146:568-74.

Entman SS, Richardson LD, Killam AP (1982b). Elevated serum ferritin in the altered ferrokinetics of toxemia of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 144:418-22.

España F, Gilabert J, Aznar J *et al.* (1991). Complexes of activated protein C with α_1-antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 164:1310-16.

Fadnes HO, Oian P (1989). Transcapillary fluid balance and plasma volume regulation: A review. Obstet Gynecol Surv 44:769-73.

Fagundes V, Lamas CC, Francischetti EA (1992). Renin-angiotensin-aldosterone systems in normal and hypertensive pregnancy. Hypertension 19:74-78.

Faught W, Garner P, Jones G *et al.* (1995). Changes in protein C and protein S levels in normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol 172:147-50.

Fenton HJH (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J Chem Soc 65: 899-04.

Fenton V, Cavill I, Fisher J (1977). Iron stores in pregnancy. Br J Haematol 37:145-49.

Ferguson ME, Bridgforth E, Quaife ML *et al.* (1955). The Vanderbilt Cooperative study of maternal and infant nutrition. J Nutr 55:305-21.

Fievet P, Fournier A, De Bold A *et al.* (1988). Atrial natriuretic factor in pregnancy-induced hypertension and preeclampsia:increased plasma concentrations possibly explaining these hypovolemic states and paradoxical hyporeninism. Am J Hypertens 1:16-21.

Fievet P, Pleskov L, Desailly I *et al.* (1985). Plasma renin activity, blood uric acid and plasma volume in pregnancy-induced hypertension. Nephron 40:429-32.

Fisher KA, Luger A, Spargo BH *et al.* (1981). Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. Medicine 60:167-76.

Fitzgerald DJ, Entman SS, Mulloy K *et al.* (1987). Decreased prostacyclin biosynthesis preceding the clinical manifestations of pregnancy-induced hypertension. Circulation 75:956-63.

Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R *et al.* (1990). Thromboxane A_2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. Lancet 335;751-54.

Fleming CR, Lie JT, McCall JT *et al.* (1990). Selenium deficiency and fatal cardiomiopathy in a patient on home parenteral nutrition. Gastroenterology 83:689-92.

Florijn KW, Derkx FHM, Visser W *et al.* (1991). Elevated plasma levels of endothelin in pre-eclampsia. J Hypertension 9:S166-67.

Fong KL, McCay B, Poyer JL (1973). Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. J Biol Chem 248:7792-95.

Freeman BA, Tanswell AK (1985). Biochemical and cellular aspects of pulmonar oxygen toxicity. Adv Free Radical Biol Med 1:133-36.

Fridovich I (1976) Oxygen radicals, hydrogen peroxyde, and oxygen toxicity. In: Free Radicals in Biology, vol 1, Pryor W.A., ed Academic Press, New York, 239-59.

Friedman SA, Schiff E, Emeiss JJ *et al.* (1995). Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 172:202-03.

Fullerton WT, Hytten FE, Klopper AE *et al.* (1965). A case of quadruplet pregnancy. J Obstet Gynecol Br Cwlth 72:791-96.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acethylcholine. Nature 299:373.

Gabit TG, Babior BM (1979). The O_2^- forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. J Biol Chem 245:9070-74.

Gallery EDM, Brown MA (1987). Control of sodium excretion in human pregnancy. Am J Kidney Dis 9:290-95.

Gallery EDM, Gyory AZ, Lissner D *et al.* (1979). Urinary concentration, white blood cell excretion, acid excretion, and acid-base status in normal pregnancy: Alterations in pregnancy-associated hypertension. Am J Obstet Gynecol 135:27-36.

Gallery EDM, Hunyor SN, Ross M *et al.* (1977). Predicting the development of pregnancy-associated hypertension. The place of standardized blood-pressure measurement. Lancet 1:1273-75.

Gant NF, Daley GL, Chand S *et al.* (1973). A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. J Clin Invest 52:2682-89.

Gao SS (1993). Changes of plasma endothelin and atrial natriuretic peptide in pregnancy induced hypertension. Chung Hua Fu Ghan Ko Tsa Chih 28:660-61.

Garthwaite J, Charles SJ, Chess-Williams (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intracellular messenger in the brain. Nature 336:385-88.

Garzetti GG, Tranquilli AL, Cugini AM *et al.* (1993). Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia. Obstet Gynecol 81:337-40.

Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J *et al.* (1994). The biology of nitrogen oxides in the airways. Am J Resp Crit Care Med 149:538-51.

Gibbs C.(1981). Maternal physiology. Clin Obstet Gynecol 24:525-43.

Gibson HM (1973). Plasma volume and glomerular filtration rate in pregnancy and their relation to differences in fetal growth. J Obstet Gynecol Br Cwlth 80:1067-74.

Giles C, Inglis TCM.(1981). Thrombocytopenia and macrothrombocytosis in gestational hypertension. Br J Obstet Gynaecol 88:1115-19.

Gillespie JS, Liu X, MartinW (1989). The effects of L-arginine and NG-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygens to NANC nerve stimulation. Br J Pharmacol 98:1080-82.

Ginsburg J, Duncan SLB (1967). Peripheral blood flow in normal pregnancy. Cardiovasc Res 1:132-37.

Glazer AN (1990). Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. Methods in Enzymology 186:161-168.

Goeschen K, Henkel E, Behrens O (1993). Plasma prostacyclin and thromboxane concentrations in 160 normotensive, hypotensive, and preeclamptic patients during pregnancy, delivery, and the post partum period. J Perinat Med 21:481-89.

Goldstein IM, Brai M, Osler AG, Weissmann G (1973). Lysosomal enzyme release from human leukocytes: Mediation by the alternative pathway of complement activation. J Immunol 111:33-37.

Goodlin RC (1988). Antidigoxin antibodies in eclampsia. N Engl J Med 318:518-19.

Graeff H, von Hugo R, Shrock R (1984). Recent aspects of hemostasis, hematology and hemorheology in preeclampsia-eclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 17:91-102.

Gray MJ (1968). Use and abuse of thiazides in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 11:568-78.

Gray MJ, Munro AB, Sims EAH *et al.* (1964). Regulation of sodium and the total body water metabolism in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 89:760-65.

Greer IA, Dawes J, Johnston TA *et al.* (1991a). Neutrophil activation is confined to the maternal circulation in pregnancy-induced hypertension. Obstet Gynecol 78:28-32.

Greer IA, Haddad NG, Dawes J *et al.* (1989). Increased neutrophil activation in diabetic pregnancy and in nonpregnant diabetic women. Obstet Gynecol 74:878-81.

Greer IA, Leask R, Hodson BA *et al.* (1991b). Endothelin, elastase, and endothelial dysfunction in pre-eclampsia. Lancet 337:558.

Groenendijk R, Trimbos JBMJ, Wallenburg HCS (1984). Hemodynamic measurements in preeclampsia: Preliminary observations. Am J Obstet Gynecol 150:232-36.

Guo XR (1993). Condition of the serum antioxidation in normal pregnant women. Chung Hua Fu Ghan Ko Tsa Chih 28:527-29.

Gusdon JP, Buckalew VM, Hennesy JF (1984). A digoxin-like immunoreactive substance in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 150:83-85.

Haeger M (1993). The role of complement in pregnancy-induced hypertensive disease. Int J Obstet Gynecol 43:113-27.

Haeger M, Unander M, Bengtsson (1990). Enhanced anaphylatoxin and terminal C_{5b}-9 complement complex formation in patients with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 76:698-02.

Haeger M, Unander M, Norder-Hansson B *et al.* (1992). Complement, neutrophil, and macrophage activation in women with severe preeclampsia and the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 79:19-26.

Halligan A, Bonnar J, Sheppard B *et al.* (1994). Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 101:488-92.

Halliwell B and Gutteridge JMC (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys 246:501-05.

Halliwell B and Gutteridge JMC (1987). In: Free Radicals in Biology and Medicine New York: Oxford University Press.

Ham EA, Egan RW, Sodermen DD *et al.* (1979). Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase. J Biol Chem 254:2191-95.

Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci USA 72:2994-98.

Hankins GDV, Wendel GD, Cunningham FG *et al.* (1984). Longitudinal evaluation of hemodynamic changes in eclampsia. Am J Obstet Gynecol 150:506-12.

Hansen NE, Malmquist J, Thorell J (1975). Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by immunoassay: relations to neutrophil kinetics. Acta Med Scand 198:437-43.

Hansen NE, Malmquist J, Thorell J (1975). Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay. Relation to neutrophil kinetics. Acta Med Scand 198:437-43.

Harlan JM (1985). Leukocyte endothelial interactions. Blood 65:513-17.

Harlan JM, Kellen PD, Harker LA *et al.* (1981). Neutrophil mediated endothelial injury in vitro, mechanism of cell detachment. J Clin Invest 68:1394-96.

Hawkins T, Jones MP, Gallery EDM (1993). Secretion of prostanoides by platelets and monocytes in normal and preeclamptic pregnancies. Am J Obstet Gynecol 168:661-67.

Hays PM, Cruikshank DP, Dunn LJ (1985). Plasma volume determination in normal and preeclamptic pregnancies. Am J Obstet Gynecol 151:958-66.

Hearse D, Humphrey SM, Chain EB (1973). Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. J Mol Cell Cardiol 5:395-03.

Hearse DJ, Humphrey SM, Bullok GR (1978). The oxygen paradox and the calcium paradox. Two facets of the same problem? J Mol Cell Cardiol 10:641-44.

Helmer OM, Judson WE (1967). Influence of high renin substrate levels on renin-angiotensin system in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 99:9-17.

Henderson AH, Pugsley DJ, Thomas DP (1970). Fibrin degradation products in pre-eclamptic toxaemia and eclampsia. Br Med J 3:545-47.

Hernandez C, Cunningham FG (1990). ECLAMPSIA. Clin Obstet Gynecol 33:460-66.

Herrera E, Lasunción MA, Gomez-Coronado D *et al.* (1988). Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 158:1575-83.

Hill L, Schonfeld G, Miller JP *et al.* (1975). Apolipoproteins in human pregnancy. Metabolism 24:943-47.

Hill LH (1978). Metabolism of uric acid in normal and toxemic pregnancy. Mayo Clin Proc 53:743-51.

Honger PW (1968). Albumin metabolism in normal pregnancy. Scand J Clin Lab Invest 21:3-9.

Hovinga G, Aarnoudse JG, Huisjes HJ (1978). The effect of supine and lateral positions on intra-arterial pressure in hypertensive pregnancies. Am J Obstet Gynecol 131:233-38.

Hu YF (1993). Radioimmunoassay of plasma endothelin in maternal and fetal umbilical cord vein in pregnancy induced hypertension. Chung Hua Fu Ghan Ko Tsa Chih 28:322-23.

Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN *et al.* (1989). Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 161:1025-34.

Huisman A, Aarnoudse JG (1986). Increased 2nd trimester hemoglobin concentration in pregnancies later complicated by hypertension and growth retardation. Acta Obstet Gynecol Scand 65:605-08.

Hytten FE, Cheyne GA (1972). The aminoaciduria of pregnancy. J Obstet Gynecol Br Cwlth 79:424-32.

Hytten FE, Leitch I (1971). In: The Physiology of Human Pregnancy, 2nd edition, Blackwell, Oxford.

Hytten FE, Paintin DB (1963). Increase in plasma volume during normal pregnancy. J Obstet Gynec Br Emp 70:402-07.

Hytten FE, Thomson AM (1968). Water and electrolytes in pregnancy. Br Med Bull 24:15-18.

Iber FL (1965). Jaundice in pregnancy - a review. Am J Obstet Gynecol 91:721-30.

Ishiara M (1978). Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and of patients with toxemia of pregnancy. Clin Chim Acta 84:1-9.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG *et al.* (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J Clin Invest 52:2745-47.

Jagadeesan V, Prema K (1980). Plasma tocopherol and lipid levels in pregnancy and oral contraceptive users. Br J Obstet Gynaecol 87:903-07.

Janoff A (1985). Elastase and emphysema. Current assessment of the protease antiprotease hypothesis. Am Rev Resp Dis 132:417-23.

Jendrassik L, Grof P (1938). Biochem J 297:81-89.

Jones DP (1985). The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models in oxidative stress, Sies, H.ed., Academic Press, New York, pp 151-59.

Kaapa P, Koistinem E (1993). Maternal and neonatal C-reactive protein after interventions during delivery. Acta Obstet Gynecol Scand 72:543-46.

Katz AI, Lindheimer MD (1973). Renal handling of acute sodium loads in pregnancy. Am J Physiol 225:696-99.

Katz VL, Thorp JM, Rozas L *et al.* (1990). The natural history of thrombocytopenia associated with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 163:1142-43.

Kerkez SA, Poston L, Wolfe CD *et al.* (1990). A longitudinal study of maternal digoxin-like immunoreactive substances in normotensive pregnancy and pregnancy-induced hipertension. Am J Obstet Gynecol 162:783-87.

Kerr MG (1965). The mechanical effects of the gravid uterus in late pregnancy. J Obstet Gynecol Br Cwlth 72:513-29.

Kerr MG (1968). Cardiovascular dynamics in pregnancy and labour. Br Med Bull 24:19-24.

Kilby MD, Pipkin FB, Symonds EM (1992). Calcium and platelets in normotensive and hypertensive human pregnancy. J Hypertension 10:997-03.

KitzMiller Jl, Lang JE, Captain USN *et al.* (1974). Hematologic assays in pre-eclampsia. Am J Obstet Gynecol 118:362-67.

Kokia E, Barkai G, Reichman B *et al.* (1990). Maternal serum lipid profile in pregnancies complicated by hypertensive disorders. J Perinat Med 18:473-78.

Koller O, Sagen N, Ulstein M *et al.* (1979). Fetal growth retardation associated with inadequate haemodilution in otherwise uncomplicated pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 58:9-13.

Koller O, Sandvei R, Sagen N (1980). High hemoglobin levels during pregnancy and fetal risk. Int J Gynecol Obstet 18:53-56.

Kontinen A, Pyorala T, Carpen E (1964). Serum lipid pattern in normal eclampsia and preeclampsia. Br J Obstet Gynaecol 71:453-57.

Konze JR, Elnstner EF (1978). Ethane and ethylene formation by mitochondria as an indication of aerobic lipid degradation in response to the wounding of plant tissue. Biochim Biophys Acta 538; 215-20.

Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR *et al.* (1994). Tumor necrosis factor-α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 170:1752-59.

Laatikainen T, Lehtonen P, Hesso A (1978). Biliary bile acids in uncomplicated pregnancy and in cholestasis of pregnancy. Clin Chim Acta 85:145-50.

Large AM, Johnston CG, Katsuki T *et al.* (1960). Gallstones and pregnancy: The composition of gallbladder bile in the pregnant woman at term. Am J Med Sci 91/713-98/720.

Leduc L, Wheeler JM, Kirshon B *et al.* (1992). Coagulation profile in severe preeclampsia. Obstet Gynecol 79:14-8.

Ledwozyw A, Michalak J, Stepien A *et al.* (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during normal atherosclerosis. Clin Chim Acta 155:275-78.

Lees MM, Scott DB, Kerr MG *et al.* (1967). The circulatory effects of recumbent postural change in late pregnancy. Clin Sci 32:453-65.

Leeuw NKM, Lowenstein L, Tucker EC *et al.* (1966). Correlation of red cell loss at delivery with changes in red cell mass. Am J Obstet Gynecol 100:1092-01.

Lewis PJ, Boylan P, Friedman LA *et al.* (1980). Prostacyclin in pregnancy. Br Med J 1581-82.

Lewis RE, Graugher HJ (1986). Neutrophil-dependent mediation of microvascular permeability. Fed Proc 45:109.

Lind T, Hytten FE (1972). The excretion of glucose during normal pregnancy. J Obstet Gynecol Br Cwlth 79:961-65.

Lindheimer MD, Katz AI (1981). Hypertension in pregnancy. N Engl J Med 313:675-80.

Lippman RD (1989). Free radical-induced lipoperoxidation and aging. In: CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol I, pp 191-94.

Lo WB, Betz AL (1986). Oxygen-free radical reduction of brain capillary rubidium uptake. J Neurochem 46, 394-98.

Logoglu G, Erdogan S, Ozgunen FT *et al.* (1993). Endogenous digoxin-immunoreactive substance in normal and preeclamptic pregnancies. Int J Gynecol Obstet 43:137-43.

Mabie WC, Ahocas RA, Sibai BM (1990). Maternal and uteroplacental hemodynamic effects of chronic captopril in the hipertensive, term-pregnant rat. Am J Obstet Gynecol 163:1861-67.

MacGillivray I, Buchanan TJ (1958). Total exchangeable sodium and potassium in non-pregnant women and in normal and pre-eclamptic pregnancy. Lancet 1:1090-93.

MacGillivray I, Rose GA, Rowe B (1969). Blood pressure survey in pregnancy. Clin Sci 37:395-07.

Maclouf J, Fruteau De Laclos B *et al.* (1982). Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet derived 12-hydroxyperoxyeicosatetranoic acid. Proc Natl Acad Sci USA 79:6042-45.

MacMahon LP, Redman CW, Firth JD (1993). Expression of the three endothelium genes and plasma levels of endothelin in pre-eclamptic and normal gestations. Clin Sci 85:417-24.

Mahadevappa VP, Holub BJ (1982). The molecular species composition of individual diacyl phospholipids in human platelets. Biochim Biophys Acta 713:73-80.

Mahmoud TZK, Bjornsson S, Calder AA (1993). Labetalol in pregnancy induced hypertension: the effects on fetoplacental circulation and fetal outcome. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol 50:109-13.

Mak IT, Weglicki WB (1985). Characterization of iron-mediated peroxidative injury in isolated hepatic lisosomes. J Clin Invest 75:58-61.

Maker HS, Weiss C, Brannan TS (1986). Amine-mediated toxicity. The effects of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxydopamine, 6-hydroxydopamine, ascorbate, glutathione and peroxide on the in vitro activities of creatine and adenylate kinases in the brain of the rat. Neuropharmacology 25:25-30.

Maki N, Hoffman DR, Johnston JM (1988). Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in maternal, fetal, and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. Proc Natl Acad Sci USA 85:728-32.

Maki N, Magness RR, Miyuaura S *et al.* (1993). Platelet-activating factor-acetylhydrolase activity in normotensive and hypertensive pregnancies. Am J Obstet Gynecol 168:50-54.

Makkonen M, Suonio S, Saarikoski S (1993). Puerperal CRP-levels after manual removal of the placenta. Ann Chir Gynaecol 82:250-53.

Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2:235-54.

Marchant DJ (1978). Alterations in anatomy and function of the urinary tract during pregnancy. Clin Obstet Gynecol 21:855-61.

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R *et al.* (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry 27:8706-11.

Martin C (1980). Physiologic changes during pregnancy: The mother. In: Quilligan EJ and Kretchmer N (eds) Fetal and Maternal Medicine New York, Wiley.

Martin JN, Blake PG, Perry KG *et al.* (1991). The natural history of HELLP syndrome: Patterns of disease progression and regression. Am J Obstet Gynecol 164:1500-13.

Martin JN, Perry KG, Miles JF *et al.* (1993). The interrelationship of eclampsia, HELLP syndrome, and prematurity: cofactors for significant maternal and perinatal risk. Br J Obstet Gynaecol 100:1095-100.

Maseki M, Nishigaki I, Hagihara M, *et al.* (1981). Lipid peroxide levels and lipid content of serum lipoprotein fractions of pregnant subjects with or without preeclampsia. Clin Chim Acta 115:155-61.

Mason M, Rivers JM (1970). Plasma ascorbic acid levels in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 109:960-61.

McCall CE, de Chatelet LR, Brown D *et al.* (1974). New biological activity following intravascular activation of the complement cascade. Nature 249:841-43.

McCall TB, Feelisch M, Palmer RMJ, Moncada S (1991). Br J Pharmacol 102:234-37.

McCall TB, Palmer MRJ, Moncada S (1991). Introduction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. Clin Immunol 21:2523-27.

McCarthy A, Taylor P, Graves J *et al.* (1994). Endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 171:1309-15.

McCay PB, Pfeifer PM and Stipe WH (1972). Vitamin E protection of membrane lipids during electron transport functions. Ann N Y Acad Sci 203:62-65.

McCord JM (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 312:159-63.

McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244:50-53.

McKay DG, Merrill SJ, Weiner AE *et al.* (1953). The pathologic anatomy of eclampsia, bilateral renal cortical necrosis, pituitary necrosis, and other acute fatal complications of pregnancy, and its possible relationship to the generalized Shwartzman phenomenon. Am J Obstet Gynecol 66:507-39.

McLennan CE, Thouin LG (1948). Blood volume in pregnancy. A critical review and preliminary report with a new technique. Am J Obstet Gynecol 55:189-200.

McNair RD, Jaynes RV (1960). Alterations in liver function during normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol 80:500-05.

Metcalfe J, McAnulty JH, Ueland K (1981). Cardiovascular physiology. Clin Obstet Gynecol 24:693-10.

Metcalfe J, Romney SL, Ramsey LH *et al.* (1955). Estimation of uterine blood flow in normal human pregnancy at term. J Clin Invest 34:1632-38.

Metcalfe J, Ueland K (1974). Maternal cardiovascular adjustements to pregnancy. Progr Cardiovasc Dis 16:363-74.

Metz J, Cincotta R, Francis M *et al.* (1994). Screening for consumptive coagulopathy in preeclampsia. Int J Gynaecol Obstet 46:3-9.

Mikhail MS, Anyaegbunam A, Garfinkel D *et al.* (1994). Preeclampia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, α-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 171:150-57.

Miyamori I, Fitzgerald GA, Brown M *et al.* (1979). Prostacyclin stimulates the renin-angiotensin-aldosterone system in man. J Clin Endocrinol 49:943-47.

Molnar M, Hertelendy F (1992). Nw-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. Am J Obstet Gynecol 166:1560-67.

Moncada MD, Vane JR (1979). Arachidonic acid metabolates and interactions between platelets and blood vessel walls. New Engl J Med 300:1142-47.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S *et al.* (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 263:663-65.

Moncada S, Higgs EA (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest 21:361-74.

Moore MR, Rohatgi S, Low RAL (1979). Prenatal and postnatal maternal leucocyte ascorbic acid concentrations. Br J Obstet Gynaecol 86:293-98.

Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA *et al.* (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. Proc Natl Acad Sci USA 91:6702-06.

Munday DN, Jones WR (1993). Pregnancy complicated by the antiphospholipid syndrome. Aust NZ Obstet Gynaecol 33:255-58.

Musci TJ, Roberts JM, Rodgers GM *et al.* (1988). Mitogenic activity is increased in the sera of preeclamptic women before delivery. Am J Obstet Gynecol 159:1446-51.

Nardulli G, Proverbio F, Limongi FG *et al.* (1994). Preeclampsia and calcium adenosine triphosphatase activity of red blood cell ghosts. Am J Obstet Gynecol 171:1361-65.

Nathan C (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6:3051-64.

Nelson GH, Zuspan FP, Mulligan LT (1966). Defects of lipid metabolism in toxemia of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 94:310-15.

Neuman RL (1957). Serum electrolytes in pregnancy, parturition and puerperium. Obstet Gynecol 10:51-55.

Nicholls A, Snaith ML, Scott JT (1973). Effect of oestrogen therapy on plasma and urinary levels of uric acid. Br Med J 1:449-51.

Niehaus WG, Samuelsson B (1968). Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. Eur J Biochem 6:126-30.

Nohl H, Hegner D (1978). Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat-heart mitochondria. FEBS Lett 89:126-28.

Nolten WE, Ehrlich EN (1980). Sodium and mineralocorticoids in normal pregnancy. Kidney Int 18:162-72.

Norris LA, Sheppard BL, Bonnar J (1992). Increased whole blood platelet aggregation in normal pregnancy can be prevented in vitro by aspirin and dazmegrel. Br J Obstet Gynaecol 99:253-57.

O'Brien PJ, Rahimtula (1975). Involvement of cytochrome P450 in the intracellular formation of lipid peroxides. J Agric Food Chem 23:154-57.

Ogburn PL, Rejeshwari M, Turner SI *et al.* (1988). Lipid and glucose metabolism in human placental culture. Am J Obstet Gynecol 159:629-35.

Oliver MF, Boyd GS (1955). Plasma lipids and lipoprotein patterns during pregnancy and puerperium. Clin Sci 14:15-25.

Olofsson P, Forsberg B, Marsal K *et al.* (1992). Short-term effect of magnesium sulfate infusion on renal function in preeclamptic women. J Perinat Med 20:361-64.

Olofsson P, Laurini RN, Marsal K (1993). A high uterine artery pulsatility index reflects a defective development of placental bed spiral arteries in pregnancies complicated by hypertension and fetal growth retardation. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol 49:161-68.

Oosterhof H, Voorhoeve PG, Aarnoudse JG (1994). Enhancement of hepatic artery resistance to blood flow in preeclampsia in presence or absence of HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets). Am J Obstet Gynecol 171:526-30.

Opsjon SL, Austgulen R, Waage A (1995). Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor at delivery in preeclamptic disorders. Acta Obstet Gynecol Scand 74:19-26.

Packer JE, Slater TF, Willson RL (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. Nature 278:737-40.

Packer L (1980). Physiology 153 (Course on Aging), Dept of Physiology-Anatomy, University of California at Berkeley.

Page EW (1972). On the pathogenesis of pre-eclampsia and eclampsia. J Obstet Gynecol Br Cwlth 79:883-94.

Paintin DB (1962). The size of total red cell volume in pregnancy. J Obstet Gynaecol Br Cwlth 69:719-23.

Parmley TH, Gupta PK, Walker MA (1981). "Aging" pigments in term human placenta. Am J Obstet Gynecol 139:760-66.

Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER *et al.* (1947). The osmotic resistance (fragility) of human red cells. J Clin Invest 26:636-39.

Parry E, Shields R, Turnbull AC (1970). The effect of pregnancy on the colonic absorption of sodium, potassium and water. J Obstet Gynaecol Br Cwlth 77:616-19.

Pattison NS, Chamley LW, McKay EJ *et al.* (1993). Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations. Br J Obstet Gynaecol 100:909-13.

Pepys MB (1981). C-Reactive Protein fifty years on. Lancet 653-57.

Perez V, Gorodisch S, Casavilla F *et al.* (1971). Ultraestructure of human liver at the end of normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol 110:428-31.

Perry IJ, Stewart BA (1990). Recording diastolic blood pressure in pregnancy. Br Med J 301:1198-00.

Persijn JP, Van Der Slik, Zwart WA (1971). Colorimetric assay for γ-glutamyl transpeptidase. Clin Chim Acta 35:239-40.

Peters T, Jr (1975). Serum albumin. In: The plasma proteins, 2nd ed, Putnam FW (ed) Academic Press, New York.

Phelan JF, Yurth DA (1982). Severe preeclampsia. I. Peripartum hemodynamic observations. Am J Obstet Gynecol 144:17-22.

Phelps SJ, Cochran EB, Gonzalez-Ruiz A *et al.* (1988). The influence of gestational age and preeclampsia on the presence and magnitude of serum endogenous digoxin-like immunoreactive substances. Am J Obstet Gynecol 158:34-39.

Pijnenborg R *et al.* (1980). Trophoblastic invasion of human decidua from 8-18 weeks of pregnancy. Placenta 1:3-19.

Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA *et al.* (1991). Placental bed spiral arteries in the hypertensive disease of pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 98:648-55.

Pinto A, Sorrentino R, Sorrentino P *et al.* (1991). Endothelial-derived relaxing factor released by endothelial cells of human umbilical vessels and its impairment in pregnancy-induced hypertension. Am J Obstet Gynecol 164:507-13.

Pipe NGJ, Smith T, Halliday D *et al.* (1979). Changes in fat, fat-free mass and body water in normal human pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 86:929-40.

Pipkin FB (1988). The renin-angiotensin system in normal and hypertensive pregnancies. In: Rubin PC (ed). Handbook of Hypertension, vol 10: Hypertension in Pregnancy. Elsevier Science Publishing CO, Inc, Amsterdam, 118-141.

Pirani BBK, Campbell DM, MacGillivray I (1973). Plasma volume in normal first pregnancy. J Obstet Gynecol Br Cwlth 80:884-87.

Plow EF (1982). Leukocyte elastase release during blood coagulation. J Clin Invest 69:564-72.

Pollak VE, Neettles JB (1969). The kidney in toxemia of pregnancy: A clinical and pathologic study based on renal biopsies. Medicine 39:469-26.

Poston L, Morris JF, Wolfe CD *et al.* (1989). Serum digoxin-like substances in pregnancy-induced hypertension. Clin Sci 77:189-94.

Poston L, Wilkinson S, Sewell RB *et al.* (1982). Sodium transport during the natriuresis of volume expansion: a study using peripheral blood leucocytes. Clin Sci 63:243-49.

Potkul RK, Moawad AH, Ponto KL (1985). The association of subclinical infection with preterm labor: The role of C-reactive protein. Am J Obstet Gynecol 153:642-45.

Potter JM, Nestel PJ (1979). The hyperlipidemia of pregnancy in normal and complicated pregnancies. Am J Obstet Gynecol 133:165-70.

Pritchard JA, Adams RH (1960). Erythrocyte production and destruction during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 79:750-57.

Pritchard JA, Cunningham FG, Mason RA (1976). Coagulation changes in eclampsia. Am J Obstet Gynecol 124:855-64.

Pritchard JA, Stone SR (1967). Clinical and laboratory observations on eclampsia. Am J Obstet Gynecol 99:754-65.

Pritchard JA, Weisman R, Ratnoff OD *et al.* (1954). Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematologic abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. N Engl J Med 250:89.

Pritchard JA, Wiggins KM, Dickey JC (1960). Blood volume changes in pregnancy and puerperium. Am J Obstet Gynecol 80:956-64.

Pryor WA (1976). The role of free radicals reactions in biological systems. In: Free Radicals in Biology, ed. WA. Pryor vol 1, pp 1-49 New York: Academic Press.

Pryor WA (1978). Formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. Photochem Photobiol 28:787-90.

Pyorala T (1966). Cardiovascular response to the upright position during pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 45:5-10.

Quintanilha AT (1985). Physiology 212 (Course on Free Radicals and Oxygen Toxicity in Biology). Dept of Physiology-Anatomy, University of California at Berkeley.

Rackozi I, Tallian F, Bagdany S, Gati I (1979). Platelet life-span in normal pregnancy and pre-eclampsia as determined by a non-radioisotope technique. Thromb Res 15:553-556.

Rafferty TD, Berkowitz RL (1980). Hemodynamics in patients with severe toxemia during labor and delivery. Am J Obstet Gynecol 138:263-270.

Ramanathan J (1992). Pathophysiology and anesthetic implications in preeclampsia. Clin Obstet Gynecol 35:414-25.

Ramanathan J, Coleman P, Sibai B (1991). Anesthetic modification of hemodynamic and neuroendocrine stress responses to cesarean delivery in women with severe preeclampsia. Anesth Analg 73:772-79.

Rao KWM, Padmanadhan J, Kilby DL *et al.* (1992). Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluoroscein diacetate in the presence of calmodulin inhibitor. J Leuk Biol 51:496-00.

Rappapport VJ, Hirata G, Kim Yap H *et al.* (1990). Anti-vascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 162:138-42.

Redman CWG (1984). Maternal plasma volume and disorders of pregnancy. Br Med J 288:955-56.

Redman CWG (1991). Controlled trials of antihypertensive drugs in pregnancy. Am J Kidney Dis 17:149-53.

Redman CWG, Beilin LJ *et al.* (1976). Plasma-urate measurements in predicting fetal death in hypertensive pregnancy. Lancet 1370-73.

Redman CWG, Beilin LJ, Denson KWE *et al.* (1977). Factor-VIII consumption in pre-eclampsia. Thromb Res 10:275-80.

Redman CWG, Bonnar J, Beilin L (1978). Early platelet consumption in pre-eclampsia. Br Med J 467-69.

Rees DD, Cellek S, Palmer RMJ *et al.* (1990). Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. Biochem Biophys Res Commun 173:541-47.

Reiss RE, Tizzano TP, O'Slaughness RW (1987). The blood pressure course in primiparous pregnancy. A prospective study of 383 women. J Reprod Med 32:523-26

Remuzzi G, Marchesi D, Zoja C *et al.* (1980). Reduced umbilical and placental vascular prostacyclin in severe pre-eclampsia. Prostaglandins. 20:105-10.

Renschler ME, Bach HG, Bayer H (1967). The urinary excretion of glucose in normal pregnancy. Ger Med Monthly 12:24-26.

Riely CA (1994). Hepatic disease in pregnancy. Am J Med 96:18s-22s.

Roberts JM, Taylor JM, Taylor RN *et al.* (1989). Preeclampsia: An endotelial cell disorder. Am J Obstet Gynecol 161:1200-04.

Robertson EG (1969). Oedema in normal pregnancy. J Reprod Fert 9:27-36.

Robertson SA, Brannstrom M, Seamark RF (1992). Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction. Curr Opin Immunol 4:585-90.

Robertson WB, Path FRC, Khong TY *et al.* (1986). The placental bed biopsy: Review from three European centers. Am J Obstet Gynecol 155:401-12.

Rodgers GM (1988). Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. FASEB J 2:116-23.

Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM (1988). Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. Am J Obstet Gynecol 159:908-14.

Rodrigues PA, Smith BR (1994). Noninvasive measurement of platelet kinetics in normal and hypertensive pregnancies. Am J Obstet Gynecol 170:117-22.

Rolfes DB, Ishak KG (1989). Liver disease in toxemia of pregnancy. Am J Gastroenterol 81:1138-44.

Romem Y, Artal R (1985). C-reactive protein in pregnancy and in the postpartum period. Am J Obstet Gynecol 151:380-83.

Romero R, Duffy TP (1980). Platelet disorders in pregnancy. Clin Perinatol 3:327-30.

Roscoe MH, Donaldson GMM (1946). The blood in pregnancy.II. The blood volume, cell volume and haemoglobin mass. J Obstet Gynecol Br Emp 53:527-32.

Rote NS (1989). Pregnancy-associated immunological disorders. Curr Opin Immunol 1:1165-72.

Rovinsky JJ, Jaffin H (1965). Cardiovascular hemodynamics in pregnancy.I. Blood and plasma volumes in multiple pregnancy. Am J Obstet Gynecol 93:1-13.

Rubin RT, Plag JA, Arthur RJ *et al.* (1969). Serum uric acid levels. JAMA 208:1184-86.

Sagen N, Koller O, Haram K (1982). Haemoconcentration in severe pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 89:802-05.

Samuels P, Main EK, Mennuti MT *et al.* (1987). The origin of increased serum iron in pregnancy-induced hypertension. Am J Obstet Gynecol 157:721-25.

Sastry PS (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. Prog Lip Res 24:69-75.

Schmidt HHH, Walter U (1994). NO at work. Cell 78:919-25.

Scholtes G (1979). Liver function and liver diseases during pregnancy. J Perinat Med 7:55-68.

Seitchik J (1956). The metabolism of urate in pre-eclampsia. Am J Obstet Gynecol 72:40-47.

Seitchik J, Szutka A, Alper C (1958). Further studies on the metabolism of N^{15}-labeled uric acid in normal and toxemic pregnant women. Am J Obstet Gynecol 76:1151-55.

Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM *et al.* (1994). The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 171:944-48.

Selmons JM, Bogert LJ (1971). The uric acid concentration of maternal and fetal blood. J Biol Chem 23:63-67.

Sen C, Madazh R, Ravuzlu C *et al.* (1994). The value of antithrombin-III and fibronectin in hypertensive disorders of pregnancy. J Perinat Med 22:29-38.

Sexton LI, Hertig AT, Reid DE *et al.* (1950). Premature separation of the normally implanted placenta. Am J Obstet Gynecol 59:13-24.

Shapes AG, Kear J, MacIntosh DM *et al.* (1968). The platelet count, platelet adhesivenesss and aggregation and the mechanism of fibrinolytic inhibition in pregnancy and the puerperium. J Obstet Gynecol Br Cwlth 75:433-41.

Sheppard BL, Bonnar J (1976). The ultrastructure of the arterial supply of the human placenta in pregnancy complicated by fetal growth retardation. Br J Obstet Gynecol 83:948-59.

Sheppard BL, Bonnar J (1981). An ultrastructural study of utero-placental spiral arteries in hypertensive and normotensive pregnancy and fetal growth retardation. Br J Obstet Gynaecol 88:695-05.

Shukla PK, Sharma D, Mandal RK (1978). Serum lactate dehydrogenase in detecting liver damage associated with pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 85:40-42.

Sibai BM (1988). Pitfalls in diagnosis and management of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 159:1-5.

Sibai BM, Anderson GD, McCubbin JH (1982). Eclampsia II. Clinical significance of laboratory findings. Obstet Gynecol 59:153-57.

Sibai BM, Ramadan MK, Usta I *et al.* (1993). Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzimes, and low platelets (HELLP syndrome). Am J Obstet Gynecol 169:1000-06.

Simpson HCR, Mann JI, Meade TW *et al.* (1983). Hypertriglyceridemia and hypercoagulability. Lancet 786-90.

Sims EAH, Krantz KE (1958). Serial studies of renal function during pregnancy and the puerperium in normal women. J Clin Invest 37:1764-74.

Sjostrand T (1949). Endogenous formation of carbon monoxide in man and abnormal and pathological conditions. Sand J Clin Lab Invest 1: 201-214.

Sletnes KE, Wisloff F, Dale PO (1992). Antiphospholipid antibodies in pre-eclamptic women: relation to growth retardation and neonatal outcome. Acta Obstet Gynecol Scand 71:112-17.

Soffronoff EC, Kaufmann BM, Connaughton JF (1977). Intravascular volume determinations and fetal outcome in hypertensives diseases of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 127:4-9.

Sullivan JM, Ramanathan KB (1985). Management of medical problems in pregnancy. Severe cardiac disease. N Engl J Med 313:5-10.

Suttorp N, Simon LM (1982). Lung cell oxidant injury. J Clin Invest 70:342-44.

Takai A, Enfield D, Thompson AR (1983). Cleavage and inactivation of factor IX by granulocyte elastase. J Clin Invest 72:1706-10.

Taylor AE, Martin D, Parker JC (1983). The effects of oxygen radicals on pulmonary edema formation. Surgery 94:433-36.

Taylor DJ, Lind T (1976). Haematological changes during the normal pregnancy. Iron induced macrocytosis. Br J Obstet Gynaecol 83:760-67.

Taylor RN, Casal DC, Jones LA *et al.* (1991). Selective effects of preeclamptic sera on human endothelial cell procoagulant protein expression. Am J Obstet Gynecol 165:1705-10.

Taylor RN, Heilbron DC, Roberts JM (1990). Growth factor activity in the blood of women in whom preeclampsia develops is elevated from early pregnancy. Am J Obstet Gynecol 163:1839-44.

Thomas RM, Canning CE, Cotes PM *et al.* (1983). Erytropoietin and cord blood hemoglobin in the regulation of human fetal erytropoiesis. Br J Obstet Gynaecol 90:795-00.

Thomson KJ, Hersheimer A, Gibson JG *et al.* (1938). Blood volume changes in normal pregnant women. Am J Obstet Gynecol 36:48-59.

Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA *et al.* (1972). Clin Chem 18:829.

Till GO, Ward PE (1985). Oxygen radicals in complement and neutrophil-mediated acute lung injury. J Free Radical Biol Med 1:163-66.

Tindall VR (1975). The liver in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 2:441-62.

Tindall VR, Beazley JM (1965). An assessment of changes in liver function during normal pregnancy using a modified bromosulphtalein test. J Obstet Gynecol Br Cwlth 72:717-37.

Tsukimori K, Maeda H, Shingu M *et al.* (1994). Possible mechanism of vascular damage in pre-eclampsia. J Hum Hypertens 8:177-80.

Tulenko T, Schneider J, Floro C *et al.* (1987). The in vitro effect on arterial wall function of serum from patients with pregnancy-induced hipertension. Am J Obstet Gynecol 156:817-23.

Tyler CW, Roess TJ (1957). C-Reactive Protein in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 73:837-42.

Ueland K, Metcalfe J (1975). Circulatory changes in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 18:41-50.

Ueland K, Novy MJ, Peterson EN *et al.* (1969). Maternal cardiovascular dynamics. IV. The influence of gestational age on the maternal cardiovascular response to posture and exercise. Am J Obstet Gynecol 104:856-63.

Uotila J, Tuimala R, Pyyko K *et al.* (1993). Pregnancy-induced hypertension is associated with changes in maternal and umbilical blood antioxidants. Gynecol Obstet Invest 36:153-57.

Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM *et al.* (1986). Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. Ann Rev Physiol 48:307-20.

Visser W, Pampus MG, Treffers PE *et al.* (1994). Perinatal results of hemodynamic and conservative temporizing treatment in severe-preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 53:175-81.

Vissers MG, Winterbourne CC, Hunt JS (1984). Degradation of glomerular basement membrane by human neutrophils in vitro. Biochim Biophys Acta 804:159-63.

Wallenburg HCS, Dekker GA, Makovitz JW *et al.* (1986). Low-dose aspirin prevents pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin-sensitive primigravidae. Lancet 1-3.

Walsh SW (1985). Preeclampsia: An imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. Am J Obstet Gynecol 152:335-40.

Walsh SW, Wang I (1993). Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. Am J Obstet Gynecol 169:1456-61.

Walters WAW, Lim YL (1975). Blood volume and hemodynamics in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 2:301-20.

Walters WAW, MacGregor WG, Hills M (1966). Cardiac output at rest during pregnancy and puerperium. Clin Sci 30:1-11.

Wang Y, Walsh SW, Guo J *et al.* (1991a). Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, vitamin E, and lipid peroxides throughout normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol 165:1690-94.

Wang Y, Walsh SW, Guo J *et al.* (1991b). The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. Am J Obstet Gynecol 165:1695-00.

Wang Y, Walsh SW, Kay HH (1992). Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 167:946-49.

Warso MA, Lands WEM (1983). Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. Br Med Bull 39:277-80.

Watts DH, Krohn MA, Wener MH *et al.* (1991). C-Reactive Protein in Normal Pregnancy. Obstet and Gynecol 77:176-80.

Webster J, Newnham D, Petrie JC *et al.* (1984). Influence of arm position on measurement of blood pressure. Br Med J 288:1574-75.

Weiner CP, Kwaan HC, Xu C *et al.* (1985). Antithrombin III activity in women with hypertension during pregnancy. Obstet Gynecol 65:301-06.

Weinstein L (1982). Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: A severe consequence of hypertension in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 142:159-67.

Weitberg AB, Weitzman SA (1985). The effect of vitamin C on oxygen-radical induced sister chromatid exchanges. Mut Res 144:23-27.

Weksler BB, Ley CW, Jaffe EA (1978). Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A23187. J Clin Invest 62:923-30.

Wheeler HO, Meltzer JI, Bradley SE (1969). Biliary transport and hepatic storage of sulfobromophtalein sodium in the unanesthetized dog, in normal man, and in patients with hepatic disease. J Clin Invest 1131-44.

Wichman K, Ryden G, Wichman M (1984). The influence of different positions and Korotkoff sounds on the blood pressure measurements in pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 118:25-28.

Wickens D, Wilkins MH, Lunec J *et al.* (1981). Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. Ann Clin Biochem 18:158-60.

Wilke G, Rath W, Shutz E *et al.* (1992). Haptoglobin as a sensitive marker of hemolysis in HELLP-syndrome. Int J Obstet Gynecol 39:29-34.

Winterbourn CC, Gutterridge JMC, Halliwell B (1985). Dexorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O_2. J Free Rad Biol Med 1:43-47.

Wright CD, Mulsch A, Busse R *et al.* (1989). Generation of nitric oxide by human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 160:813-19.

Wroblewski F, La Due JS (1956). Proc Soc Exper Biol Med 91: 626.

Yagi K (1976). A simple fluorometric assay of lipoperoxide in blood plasma. Biochem Med. 15: 212-216.

Yallampalli C, Garfield RE (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 169:1316-20.

Yamamoto T, Yoshimura S, Geshi Y *et al.* (1993). Measurement of antiphospholipid antibody by ELISA using purified β_2-glycoprotein I in preeclampsia. Clin Exp Immunol 94:196-00.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S *et al.* (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 332:411-15.

Ylikorkala O, Makila UM (1985). Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics. Am J Obstet Gynecol 152:318-29.

Ylikorkala O, Viinika L (1980). Thromboxane A_2 in pregnancy and puerperium. Br Med J 281:1601-09.

Yoshida S, Inoh S, Asano T *et al.* (1980). Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain: lipid peroxidation as a possible cause of post ischemic injury. J Neurosurg 53:323-27.

Zhang AC, Li YR, Wang HJ (1994). Changes in plasma endothelin level in pregnancy-induced hypertension with relation to its severity. Chung Hua Fu Ghan Ko Tsa Chih 29:2-4.

Zinaman M, Rubin J, Lindheimer MD (1985). Serial plasma oncotic pressure levels and echoencephalography during and after delivery in severe pre-eclampsia. Lancet 1245-47.

Zinneman HH, Johnson JJ, Seal US (1963). Effect of short-term therapy with cortisol on the urinary excretion of free amino acids. J Clin Endocrinol 23:996-00.

Zuspan FP (1979). Catecholamines. Their role in pregnancy and the development of the pregnancy induced hypertension. J Reprod Med 234:145-50.