

José Cícero Guilhen

Perfil da eletroforese das proteínas urinárias de gestantes hipertensas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Área de Concentração em Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. José Carlos Peraçoli

Botucatu-SP
2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Guilhen, José Cícero.

Perfil da eletroforese das proteínas urinárias de gestantes hipertensas / José Cícero Guilhen. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientador: José Carlos Peraçoli

Assunto CAPES: 40101150

1. Hipertensão na gravidez

CDD 618.3261

Palavras-chave: Gestação; Hipertensão arterial; Eletroforese urinária; Proteinúria

Dedico este trabalho...

**À minha mulher Rosana,
companheira e amiga de todos os dias,
pela
compreensão e incentivo em todos os
momentos.**

**Aos meus filhos José Cícero e José
Fernando
que muito me orgulham, e que
escolhendo a Medicina como profissão,
são os grandes estímulos para que eu
continue e a certeza da continuidade.**

**Ao meu avô (in memorian),
que muito me incentivou para que fosse
médico,
sempre amigo e conselheiro.**

**Aos meus pais José (in memorian) e
Deolinda
que não só me deram a vida como me
fizeram a pessoa que sou.**

Ao Prof. Dr. Adyr Soares Mulinari

**pelo respeito com os doentes e por ter
me iniciado na nefrologia.**

Agradecimentos

A realização deste trabalho somente foi possível devido a colaboração destas pessoas e serviços:

Enfermeira Kátia Pardo Rubira e funcionárias da enfermagem da Maternidade do Hospital Materno Infantil da FAMEMA, pela coleta dos exames laboratoriais.

Prof. Dr.^a Maria Terezinha Serrão Peraçoli, pelas sugestões e todo apoio do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP.

Bióloga Rosana Aparecida Rodrigues Martins pelo inestimável trabalho na realização das eletroforeses de proteínas.

Professores Drs. Joelcio Francisco Abbade e Sebastião Marcos Ribeiro de Carvalho pela análise estatística.

Biomédico Mário Aparecido de Lábio, pela importante colaboração na realização dos exames laboratoriais.

Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, pelas análises das eletroforeses de proteínas.

Docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Prof. Dr. Donaldo Cerci da Cunha e Docentes da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, por permitir a realização desta pesquisa.

Prof. Dr. Ivan de Mello Araújo e aos Drs. Maurício Braz Zanolli, Roberto Guzzardi, Vitor Luis Alasmar e Luis Carlos Pavanetti pela amizade e companheirismo que muito me ajudaram nesta caminhada.

Prof. Dr. José Carlos Peraçoli que durante todo o tempo foi um verdadeiro orientador por sua competência e amizade.

Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA.

Sumário

CAPÍTULO I

<i>Significado da proteinúria na gestação.....</i>	<i>1</i>
Referências Bibliográficas	14

CAPÍTULO II

<i>Perfil da Eletroforese das proteínas urinárias de gestantes hipertensas</i>	
Resumo	22
Abstract	25
Introdução.....	28
Objetivos	
Geral	33
Específicos	34
Sujeitos e Métodos	
1. Desenho do estudo	36
2. População estudada	36
3. Seleção dos sujeitos	37
3.1 Critérios de inclusão	37
3.2 Critérios de exclusão	37
4. Variáveis	
4.1 Variáveis de controle.....	38

4.2 Variáveis independentes.....	38
4.3 Variáveis dependentes.....	39
5. Conceitos	40
6. Técnicas Laboratoriais	
6.1 Proteinúria de 24 horas.....	41
6.2 Eletroforese de proteínas.....	41
6.3 Dosagem de ácido úrico	45
7. Análise dos dados	45
8. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	46
Resultados.....	48
Discussão	60
Conclusões.....	68
Referências Bibliográficas	71
Anexos	
1. Planilhas dos pesos moleculares das proteínas	80
2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - FMB.....	81
3. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - FAMEMA	82

Significado da proteinúria na gestação

O primeiro estudo de proteinúria em gestantes foi realizado na década de 30, quando Elden e Cooney⁽¹⁾, em 1935, determinaram a quantidade de proteína urinária de uma amostra matinal e encontraram valores entre 360mg e 720mg, variação que consideraram os limites de normalidade. Como a duração da colheita de urina foi de aproximadamente 12 horas, suas correspondências em 24 horas seriam respectivamente 720mg e 1.440mg. Em 1941 Dieckmann⁽²⁾ descreveu resultados similares.

Em 1948, Addis⁽³⁾ considerou patológica a excreção urinária maior que 60mg em 24 horas. Entretanto, Dieckmann⁽⁴⁾ e Nettles & Flenigan⁽⁵⁾, consideram que, na gestação, o valor de proteinúria até 300mg em urina de 24 horas é normal. Para Kuo et al.⁽⁶⁾ a proteinúria de 24 horas de gestantes normais não difere da encontrada na população normal não gestante, apesar das significativas mudanças hemodinâmicas que ocorrem na gestação. Para esses autores, entre 17 e 20 semanas de gestação o valor da proteinúria foi de 195mg em 24 horas e, entre 33 e 36 semanas foi menor que 150mg em 24 horas. Higby et al.⁽⁷⁾ demonstraram que, em grávidas normais a excreção de proteínas não deve ultrapassar 260mg em 24 horas.

Comparando a proteinúria de mulheres não-grávidas com grávidas normais, Hemmingsen e Skaarup⁽⁸⁾ mostraram que, nestas últimas, a excreção é significativamente maior e, este aumento é decorrente das frações pós-albumina e transferrina. Misiani et al.⁽⁹⁾ observaram que durante a gravidez normal a excreção de proteínas é progressiva, com permiseletividade

glomerular normal, levando a crer que esse aumento tem a ver com a passagem de proteínas de baixo peso molecular, por exceder a capacidade de reabsorção tubular ou por existir aumento de secreção tubular.

Quanto à excreção de albumina, Lopez-Espinoza et al.⁽¹⁰⁾ encontraram valores acima de 36mg em urina de 24 horas, nos vários períodos da gestação normal, enquanto Higby et al.⁽⁷⁾ afirmam que essa excreção não deve ultrapassar de 29mg em 24 horas. Douma et al.⁽¹¹⁾ verificaram que a excreção de albumina, no terceiro trimestre da gestação, é maior que nas mulheres não grávidas e no período noturno. Para Bar et al.⁽¹²⁾ a excreção de albumina em gestantes normais é maior no terceiro que no primeiro e segundo trimestres, e maior que nas mulheres não grávidas.

No estudo de Misiani et al.⁽⁹⁾, em gestantes com pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional, houve aumento da proteinúria a partir da 28ª semana de gestação, às custas de aumento de albumina, precedendo em nove semanas o aparecimento da hipertensão arterial.

Segundo Erman et al.⁽¹³⁾, o aparecimento de albumina urinária acima dos valores normais poderia ser conseqüente ao aumento da pressão intraglomerular, como resultado da maior resposta vasoativa a angiotensina II no terceiro trimestre da gestação ou ao aumento da pressão na veia renal, secundária à compressão da veia cava pelo útero.

Wright et al.⁽¹⁴⁾ verificaram que a razão albumina/creatinina urinária era maior, em todas as fases da gestação, que em controles não grávidas, sendo mais acentuada na 36ª. que na 14ª. semana de gestação. Rodriguez e Lieberman⁽¹⁵⁾ detectaram que a razão proteína/creatinina urinária é

um bom preditor de proteinúria significativa (≥ 300 mg/24hs), estando relacionada com a proteinúria de 24 horas. A razão proteína/creatinina urinária abaixo de 0,14 exclui e maior ou igual a 0,19 indica proteinúria significativa. Neithardt et al.⁽¹⁶⁾, analisando amostra isolada de urina de gestantes hospitalizadas encontraram relação significativa entre proteinúria de 24 horas e a razão proteína/creatinina. Concluíram que, a relação proteína/creatinina, de amostra isolada de urina, prediz a proteinúria de 24 horas.

Para Ramos et al.⁽¹⁷⁾, em gestantes hipertensas, a razão proteína/creatinina urinária pode fornecer resultado mais seguro que a proteinúria de 24 horas, porque possibilita menor chance de erro de colheita. Esses autores também demonstraram que razão proteína/creatinina menor que 0,3 corresponde a proteinúria menor que 300 mg/24 horas, quando essa razão é maior que 0,5 corresponde a proteinúria maior que 300 mg/24 horas e, quando a razão varia entre 0,3 e 0,5 pode representar tanto um resultado falso negativo como um falso positivo.

Avaliando a manifestação de microalbuminúria, Das et al.⁽¹⁸⁾ encontraram incidência de 17% na segunda metade de gestações normais, ocorrência não verificada em mulheres normais não grávidas. Das grávidas com microalbuminúria, 60% desenvolveram pré-eclâmpsia, enquanto nas gestantes sem microalbuminúria a incidência de pré-eclâmpsia foi de apenas 5,8%.

Beaufils⁽¹⁹⁾ observou a ocorrência de hipertensão em 10% de uma população de gestantes e destas, entre 10% e 20% desenvolveram

proteinúria. No estudo de Zhang et al.⁽²⁰⁾ 11% das gestantes hipertensas tinham proteinúria, mas somente 2% antes da 23ª semana de gestação.

A proteinúria associada à hipertensão arterial, presente a partir da 20ª semana de gestação, define a pré-eclâmpsia. O valor de 300mg em urina de 24 horas é considerado ponto de corte entre proteinúria negativa e positiva e, a presença de pelo menos 2.000mg é um dos marcadores de gravidade da doença (NHBPE, 2000).

O significado da presença de proteinúria e de sua concentração sobre a morbidade e mortalidade materna e perinatal tem sido motivo de estudos. Lin et al.⁽²¹⁾ verificaram que, hipertensão arterial e proteinúria nefrótica, estão associadas com aumento da mortalidade perinatal. Schiff et al.⁽²²⁾ constataram, em gestantes com pré-eclâmpsia grave, que a taxa de proteinúria e o aumento da mesma durante conduta conservadora no controle da doença, não foram preditores importantes do resultado materno e perinatal. Ferrazzani et al.⁽²³⁾ relataram que, a prevalência de feto com restrição de crescimento intra-uterino nos casos de hipertensão arterial crônica é semelhante a da população geral (12%), porém, quando aparece proteinúria o risco aumenta em mais de quatro vezes (52%). Nos resultados desses autores a presença de proteinúria quadruplicou a taxa de mortalidade perinatal e apresentou relação linear negativa entre nível de proteinúria, semana do parto e peso ao nascer.

Chua e Redman⁽²⁴⁾ associaram valor de proteinúria maior que 5g em 24 horas com insuficiência renal (31%), hipertensão arterial grave (71%) e recém-nascido pequeno para a idade gestacional (52%). Para Bar et al.⁽²⁵⁾,

a taxa de excreção de albumina no 3º trimestre foi nove vezes maior em gestações complicadas por restrição de crescimento intra-uterino, quando comparadas com crescimento intra-uterino normal. Seshadri e Venkataraman(26), comparando gestantes hipertensas, sem e com proteinúria, demonstraram que no primeiro grupo a incidência de restrição de crescimento intra-uterino foi 16%, parto pré-termo 3,3% e mortalidade neonatal 1,5%, enquanto no grupo com proteinúria a incidência de restrição de crescimento intra-uterino foi 51%, parto pré-termo 28% e morte neonatal 17%.

Knuist et al.(27), em estudo tipo cohort com 2.413 gestantes, observaram que o risco de complicações fetais e maternas em mulheres com pressão arterial diastólica de pelo menos 90 mmHg foi significativamente maior nas portadoras de proteinúria.

PAD	Proteinúria	Evolução Obstétrica Adversa		Risco Relativo IC 95%	
		Fetal	Materna	Fetal	Materno
90	Ausente	1,7%	0,4%	1,31	2,05
≥ 95	Ausente	2,0%	2,5%	1,48	11,59
≥ 90	Presente	11,8%	8,8%	8,86	41,51

As complicações obstétricas fetais, identificadas por recém-nascido pequeno para a idade gestacional (PIG) e morte perinatal (MP), também apresentaram riscos relativos significativamente aumentados.

PAD	Proteinúria	Evolução Obstétrica Fetal		Risco Relativo IC 95%	
		PIG	MP	PIG	MP
90	ausente	1,3%	0,4%	1,4	1,4
≥ 95	ausente	1,5%	1,0%	1,5	3,1
≥ 90	presente	8,8%	5,9%	9,2	18,4

Os resultados de Moodley et al.⁽²⁸⁾ mostraram que a incidência de cesariana foi maior nas pacientes com hipertensão e proteinúria (41,3%) que nas gestantes hipertensas sem proteinúria (17%). O peso do feto foi menor nas gestantes hipertensas com proteinúria (2.400g) que nas gestantes hipertensas sem proteinúria (3.020g) e todas as mortes perinatais ocorreram nas gestantes com proteinúria.

Hall et al.⁽²⁹⁾, avaliando a importância da proteinúria no controle expectante de pré-eclâmpsia grave, de início precoce, verificaram que em 75% das pacientes houve aumento dos níveis de proteinúria. Entretanto, quando comparadas pacientes com proteinúria grave e moderada os resultados materno e perinatal foram semelhantes.

Na gestante hipertensa, além da avaliação da presença ou não de proteinúria e do seu valor, a literatura tem estudado a origem de proteína excretada.

Em 1951, Parviainen et al.⁽³⁰⁾, realizando eletroforese urinária em gestantes com pré-eclâmpsia, verificaram que nos casos leves os níveis de

albumina eram menores (entre 25,3% e 38,8%) que os de gama globulina (entre 32,5% e 55,5%), nos casos em que ocorreu piora da pré-eclâmpsia houve aumento significativo do nível de albuminúria (entre 55,4% e 61,9%).

McEwan⁽³¹⁾, analisando urina de gestantes com proteinúria de diferentes causas, identificou em mulheres com infecção do trato urinário e sem pré-eclâmpsia três frações de proteínas, nas com pré-eclâmpsia leve seis frações e nas com pré-eclâmpsia graves nove frações. Nas gestantes com pré-eclâmpsia grave, além das nove frações de proteínas foram identificadas a imunoglobulina A e a macroglobulina, o que foi considerado sinal de pior prognóstico. Esse autor demonstrou ainda que não existe relação entre a pressão arterial (sistólica ou diastólica) e a quantidade de proteína excretada na urina e que na pré-eclâmpsia a presença de β_2 microglobulina na urina parece ser de mau prognóstico para o feto.

A literatura tem relatado que a proteinúria da pré-eclâmpsia é de seletividade intermediária, uma vez que sua origem é glomerular e de caráter uniforme^(31,32). Kaltenbach⁽³³⁾ constatou que a taxa de proteinúria glomerular aumenta com a pressão arterial média e sua seletividade correlaciona-se com a perda diária de proteína e a gravidade da doença. Quaas et al.⁽³⁴⁾ verificaram que a proteinúria glomerular está associada com altas taxas de pré-eclâmpsia, cuja incidência aumenta com a seletividade e a intensidade da proteinúria. Quaas et al.⁽³⁵⁾ verificaram ainda que as gestantes com proteinúria glomerular ou mista tinham grande risco (80% e 75% respectivamente) de desenvolver pré-eclâmpsia grave. Nessas gestantes ocorreu alta taxa de prematuridade, restrição do crescimento fetal e

mortalidade perinatal. Ficou demonstrado também que a proteinúria mista é o achado clássico da toxemia gravídica e sua incidência está relacionada com a gravidade da hipertensão.

Hemmingsen e Skaarup⁽⁸⁾ mostraram que a excreção urinária de proteína na gravidez normal era significativamente maior que nas mulheres não grávidas, aumento este conseqüente as frações pós-albumina e transferrina. As pacientes com pré-eclâmpsia tinham aumento de todas as frações, exceto a pré-albumina, que não sofreu modificação.

Moodley et al.⁽³⁶⁾, comparando os resultados da eletroforese urinária de gestantes com pré-eclâmpsia, demonstraram que as pressões sistólica e diastólica eram significativamente maiores nas gestantes com proteinúria mista que nas gestantes com proteinúria glomerular.

Raidt et al.⁽³⁷⁾, estudando gestantes com pré-eclâmpsia encontraram 5% com proteinúria normal, 69% com proteinúria glomerular, 10% com proteinúria tubular e 18% com proteinúria mista.

Winkler et al.⁽³⁸⁾ observaram que pacientes que desenvolveram pré-eclâmpsia tardia tinham achados de proteinúria patológica antes do início dos sintomas. Em 90% dos casos a proteinúria era glomerular e em 10% mista, sugerindo que essas alterações podem ser consideradas como um teste de alta sensibilidade para detecção precoce de pré-eclâmpsia.

Krieger et al.⁽³⁹⁾ demonstraram que os níveis séricos de β_2 microglobulina são semelhantes entre gestantes normotensas e hipertensas, indicando que a filtração glomerular é normal em ambas situações. Também demonstraram aumento acima de quatro vezes na excreção urinária da β_2

microglobulina nas gestantes hipertensas. Concluíram que, uma vez que a β_2 microglobulina é um indicador sensível de disfunção tubular, a sua dosagem poderia prever o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, servindo como marcador pré-clínico da doença. Entretanto, Lopez-Espinoza et al.⁽¹⁰⁾ não conseguiram evidências de que a proteinúria grave de gestantes com pré-eclâmpsia seja precedida por aumento gradual de microalbuminúria.

Marshall et al.⁽⁴⁰⁾, avaliando proteinúria de gestantes com pré-eclâmpsia observaram que a proteinúria era de origem glomerular.

Em 1989, Nesselhut et al.⁽⁴¹⁾ detectaram na urina de gestantes uma banda protéica de 105.000 daltons, independente de variação diária e da idade gestacional. Fato interessante foi a constatação que as gestantes hipertensas tinham significativa redução na intensidade ou completo desaparecimento dessa banda. A ocorrência desse fenômeno foi de 83% nas pacientes hipertensas e essa banda reapareceu entre dois e 14 dias após o parto, existindo relação direta entre o desaparecimento da banda e a gravidade da doença. Esses autores conseguiram provar que essa banda correspondia a proteinúria de Tamm-Horsfall (pTH) e concluíram que, ainda que o papel da proteinúria de Tamm-Horsfall seja desconhecido na patogênese da pré-eclâmpsia, o significado de redução ou desaparecimento dessa proteína na pré-eclâmpsia deva refletir uma disfunção tubular transitória.

Em trabalho posterior, Nesselhut et al.⁽⁴²⁾ verificaram que, a excreção de proteínas de Tamm-Horsfall em mulheres não grávidas era em média de 20mg/g creatinina. Em gestantes, a excreção aumentava no 2º trimestre para 43mg/g creatinina e no 3º trimestre diminuía para 32mg/g

creatinina. Na pré-eclâmpsia ocorria redução significativa, de acordo com a gravidade da mesma, chegando a negativar nos casos mais graves. Essas alterações podem ser explicadas pela precipitação tubular como cilindros da pTH, causada provavelmente pela mudança de afinidade das cadeias de oligosacarídeos da pTH para a lecitina que reveste as células tubulares. A atividade urinária das glicosidases lisossômicas (β manosidase, α fucosidase, α manosidase e β galactosidase) aumentava da mulher normal para a gestante e, aumentava ainda mais na gestante hipertensa. O aumento da atividade das glicosidases foi seguido por aumento na excreção de pTH, interpretando-se este fato como um mecanismo fisiológico para prevenir a obstrução dos túbulos pela pTH.

Yamamoto et al.⁽⁴³⁾ observaram em mulheres com pré-eclâmpsia quatro tipos de proteinúria, de acordo com o valor do peso molecular: baixo (lesão tubular), alto (lesão glomerular), médio e misto, com incidência respectivamente de 11,8%, 14,7%, 47,1% e 26,5%. Foi encontrada alta incidência de padrão glomerular e misto nas pacientes com hipertensão arterial e alta incidência de padrão misto nas com proteinúria grave.

Alvarez⁽⁴⁴⁾ comparou a proteinúria de gestantes hipertensas com gestantes normais e verificou que as primeiras apresentavam proteinúria de origem mista, aumento da quantidade total de proteínas e da quantidade de globulinas.

Li et al.⁽⁴⁵⁾ relataram que a excreção urinária de IgA, IgG e albumina estava aumentada nas mulheres com pré-eclâmpsia, o mesmo não

acontecendo com a IgM. Os aumentos de albumina e de IgG estavam positivamente relacionados com a pressão arterial média.

Adelberg et al.⁽⁴⁶⁾ quantificaram as proteinúrias de 8 horas e 12 horas, correlacionando-as com a proteinúria de 24 horas, para a confirmação do diagnóstico de pré-eclâmpsia. Os resultados de 8 horas mostraram correlação positiva com os de 24 horas para as pacientes com pré-eclâmpsia leve e grave. As amostras de 12 horas mostraram correlação positiva com as de 24 horas para pacientes normais, com proteinúria leve e grave.

Khedun et al.⁽⁴⁷⁾ determinaram na urina o heparan sulfato e a condroitina sulfato proteoglicam em gestantes normais, hipertensas sem proteinúria e com pré-eclâmpsia, observando que esses proteoglicans estavam normais nas gestantes normotensas e hipertensas sem proteinúria e, duplicados na urina das pacientes com pré-eclâmpsia. Encontraram forte correlação entre a gravidade da proteinúria e a perda dessas cargas aniônicas, o que reforça a hipótese de que a perda de carga glomerular induz alterações estruturais da barreira de filtração e pode ser o mecanismo responsável pela proteinúria da pré-eclâmpsia.

Portanto, a presença de proteinúria é uma ocorrência de alto significado na gestação. Além de definir uma das formas de manifestação da hipertensão arterial na gestação, a pré-eclâmpsia, está associada com piores resultados maternos e perinatais.

A presença de proteinúria representa o alerta para que essas gestantes tenham um acompanhamento diferenciado, uma vez que, as piores

complicações da hipertensão arterial, representadas pela eclâmpsia e síndrome HELLP, estão intimamente relacionadas com a pré-eclâmpsia.

Referências Bibliográficas*

- 01- Elden CA, Cooney JW. The Addis sediment count and blood urea clearance test in normal pregnant women. J Clin Invest 1935; 14:889-91.
- 02- Dieckmann WJ. The toxemia of pregnancy. In: Mosby CV, editor. St Louis: 1941. p.163-6.
- 03- Addis T. Glomerular nephritis, diagnosis and treatment. New York: Mac Millan, 1948.
- 04- Dieckmann WJ. The toxemia of pregnancy. 2nd ed. In: Mosby CV. St Louis: 1952.
- 05- Nettles JB, Flanigan WJ. Counseling the pregnant patient with renal disease. Clin Obstet Gynecol 1968; 11:594-608.
- 06- Kuo VS, Koumantakis G, Gallery EDM. Proteinuria and its assessment in normal and hipertensive pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1992; 167:723-8.
- 07- Higby K, Suiter CR, Phelps JY, Siler-Khodr T, Langer O. Normal values of urinary albumin and total protein excretion during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1994; 171:984-9.

* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. J Pediatr 1997; 73: 213-24.
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 240p.

- 08- Hemmingsen L, Skaarup P. Investigation of urinary protein and lactate dehydrogenase in normal pregnancy and in pre-eclampsia by means of disc electrophoresis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1970; 49:303-10.
- 09- Misiani R, Marchesi D, Tiraboschi G, Gualandris L, Pagni R, Goglio A, et al. Urinary albumin excretion in normal and pregnancy induced hypertension. *Nephron* 1991; 59:416-22.
- 10- Lopez-Espinoza I, Dhar H, Humphreys S, Redman CWG. Urinary albumin excretion in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:176-81.
- 11- Douma CE, Vanderpost JAM, Van Acker BAC, Boer K, Koopman MG. Circadian variation of urinary albumin excretion in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102:107-10.
- 12- Bar J, Hod M, Erman A, Friedman S, Ovadia J. Prognostic and therapeutic implications in diabetic and hypertensive pregnancy. *Diabet Med* 1995; 12: 649-56.
- 13- Erman A, Neri A, Sharoni R, Rabinov M, Kaplan B, Rosenfeld JB, et al. Enhanced urinary albumin excretion after 35 weeks of gestation and during labour in normal pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52:409-13.
- 14- Wright A, Steele P, Bennett JK, Watts G, Polak A. The urinary excretion of albumin in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94:408-12.
- 15- Rodriguez-Thompson D, Lieberman ES. Use of a random urinary protein-to-creatinine ratio for the diagnosis of significant proteinuria during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:808-11.

- 16- Neithardt AB, Dooley SL, Bonensztajn J. Prediction of 24 hour protein excretion in pregnancy with a single voided urine protein-to-creatinine ratio. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:883-6.
- 17- Ramos JGL, Martins-Costa SH, Mathias MM, Guerin YLS, Barros EG. Urinary protein/creatinine ratio in hypertensive pregnant women. *Hypertens Pregnancy* 1999; 18:209-18.
- 18- Das V, Bhargava T, Das SK, Pandey S. Microalbuminuria: a predictor of pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103:928-30.
- 19- Beaufils M. Hypertension in pregnancy. *Arch Mal Coeur* 2001; 94:1077-86.
- 20- Zhang J, Klebanoff MA, Roberts JM. Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 261-7.
- 21- Lin CC, Lindheimer MD, Moawad AH. Fetal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142:255-60.
- 22- Schiff E, Friedman SA, Kao L, Sibai BM. The importance of urinary protein excretion during conservative management of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:1313-6.
- 23- Ferrazzani S, Caruso A, De Corolis S, Martino IV, Mancuso S. Proteinuria and outcome of 444 pregnancies complicated by hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:366-71.
- 24- Chua S, Redman CWG. Prognosis for pre-eclampsia complicated by 5g or more of proteinuria in 24 hours. *Eur J Obstet Gynaecol* 1992; 43:9-12.

- 25- Bar J, Hod M, Eiman G, Ovadia J. Microalbuminuria as an early predictor of hypertensive complications in pregnant women at high risk. *Am J Kidney Dis* 1996; 28:220-5.
- 26- Seshadri L, Venkataraman I. Hypertension in pregnancy outcomes, proteinuria vs nonproteinuria. *J Reprod Med* 1997; 42:88-90.
- 27- Knuist M, Bonsel GJ, Zondervan HA, Treffers PE. Intensification of fetal and maternal surveillance pregnant women with hypertensive disorders. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 61:127-33.
- 28- Moodley J, Mphatsoe M, Gouws E. Pregnancy outcome in primigravidae with late onset hypertensive disease. *East Afr. Med J* 1999; 76:490-4.
- 29- Hall DR, Odendaal HJ, Steyn DW, Grove D. Urinary protein excretion and expectant management of early onset, severe pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77:6.
- 30- Parviainem S, Soiva K, Ehrnrooth CA. Eletrophoretic study of proteinuria in toxemia of late pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 1951; 3:282-7.
- 31- McEwan HP. Investigation of proteinuria in pregnancy by immuno-electrophoresis. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1968; 75:289-94.
- 32- MacLean PR, Paterson WG, Smart GE, Petrie JJ, Robson JS, Thomson D. Proteinuria in toxemia and abruptio placentae. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1972; 79:321-6.
- 33- Kaltenbach FJ, Boesken WH, Wilhelm CH, Ziupa J, Toussaint MN, Quaas L. Urinary protein patterns and pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens* 1983; 2: 133-44.

- 34- Quaas L, Wilhelm C, Wego J, Boesken WH, Hillemanns HG, Kaltenbach FJ. Selectivity of glomerular proteinuria a clinical parameters in patients with EPH – Gestosis. *Excerpta Med.* 1985; 657:385.
- 35- Quaas L, Wilhelm C, Klosa W, Hillemanns HG, Thaiss F. Urinary protein patterns and EPH-Gestosis. *Clin Nephrol* 1987; 27:107-10.
- 36- Moodley J, Malleck N, Gita R, Randiree I. Clinical significance of sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of urinary proteins in pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1977; 16:11-7.
- 37- Raidt H, Lison AE, Dame WR, Baumgart P, Beller FK. Glomerular proteinuria in pregnancy hypertension. *Wien Klin Wochenschr* 1984; 20:761-6.
- 38- Winkler U, Lison AE, Seitzer B, Niedner W. Urinary protein patterns of early detection of pre-eclampsia. *Contrib Nephrol* 1988; 68:227-9.
- 39- Krieger MS, Moodley J, Norman RJ, Jilial I. Reversible tubular lesion in pregnancy-induced hypertension detected by urinary beta₂ microglobulin. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 533-6.
- 40- Marshall T, McBride DR, Willians KM. An evaluation of urinary protein content and distribution in pregnancy induced hypertension. *Biochem Soc Trans.* 1987; 12:682-3.
- 41- Nesselhut T, Rath W, Grospietsch G, Weber MH, Kuhn W. Urinary protein electrophoresis profile in normal and hypertensive pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 1989; 246:97-105.

- 42- Nesselhut T, Rath W, Grunow E, Kaufholz G, Ostermai U, Cillien N, et al. The relationship between urinary Tamm-Horsfall glycoprotein excretion and urinary activity of glycosidases in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993; 48:23-31.
- 43- Yamamoto T, Yoshimura S, Sasamori Y, Sakamoto T, Ogino M, Kambegawa A, et al. Analysis of urinary protein by immunoblot method using unconcentrated urine in preeclampsia. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1992; 18:177-85.
- 44- Alvarez AS. Perfil electroforético de la proteinúria en el embarazo normal y en la hipertension gestacional. *Ginecol Obstet Méx* 1995; 63:147-51.
- 45- Li J, Chu Y, Zhou J. Urinary proteins during pregnancy in women with and without pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 1995; 30: 395-7.
- 46- Adelberg AM, Miller J, Doerzbacher M, Lambers DS. Correlation of quantitative protein measurements in 8, 12 and 24 hour urine samples for diagnosis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 804-7.
- 47- Khedun SM, Naicker D, Moodley J, Gathiram P. Urinary heparan sulfate protoglycan excretion in black African women with pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:308-12.
- 48- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:s1-22.

Resumo

A proteinúria tem sido considerada um sinal importante para identificar o tipo de hipertensão que ocorre na gestação e está relacionada com o resultado materno e perinatal.

Objetivo: o objetivo deste estudo foi avaliar, em gestantes hipertensas, por meio da eletroforese, o padrão das proteínas urinárias e seus pesos moleculares.

Sujeitos e métodos: eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em urina de 143 gestantes hipertensas, divididas em quatro grupos:

hipertensão arterial crônica (HAC), pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE), hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia (HAC+PE) e hipertensão gestacional (HG). A presença e o número de bandas das proteínas tubular e glomerular e, seus pesos moleculares foram correlacionados com o tipo de hipertensão arterial, a presença (≥ 300 mg/24horas) ou não de proteinúria, o grau de proteinúria (leve: < 2 g/24horas e grave: ≥ 2 g/24horas) e o valor do ácido úrico (< 6 mg% e ≥ 6 mg%). Para comparação das variáveis qualitativas foi usado o teste do qui-quadrado e para comparação das variáveis quantitativas foi usado o teste *t* de Student. Foi considerado significância quando valor de $p < 0,05$.

Resultados: em todas as gestantes avaliadas foram encontradas proteínas tubular e glomerular e o número de bandas de proteínas não diferenciou os tipos de hipertensão arterial. A presença de pelo menos quatro bandas glomerulares foi significativamente maior nas gestantes com PE e HAC+PE, com proteinúria significativa, com proteinúria grave e com valor de ácido úrico ≥ 6 mg%. Quando comparada com proteínas de peso molecular ≤ 90 kDa a porcentagem de proteínas com peso molecular ≥ 160 kDa foi significativamente maior nas gestantes com PE, HAC+PE e HG, nas gestantes com proteinúria significativa e com ácido úrico ≥ 6 mg%.

Conclusões: O número de bandas de proteína urinária glomerular e o peso molecular ≥ 160 kDa identificam as gestantes com pré-eclâmpsia, com proteinúria significativa e com valor de ácido úrico ≥ 6 mg%.

Abstract

Proteinuria has been considered an important sign to identify the hypertensive disorders encountered during pregnancy and it is related to the maternal and perinatal outcomes.

Objective: the aim of this study was to evaluate the urinary protein patterns and their molecular weight in hypertensive pregnant women, through urinary electrophoresis.

Subjects and methods: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on the urine of

143 hypertensive pregnant women that were divided into the following groups: chronic hypertension (CH), pre-eclampsia/eclampsia (PE), pre-eclampsia superimposed upon chronic hypertension (CH+PE), and gestational hypertension (GH). Presence and the number of tubular and glomerular protein bands, and their molecular weight were correlated with the type of hypertension, the proteinuria level (present: ≥ 300 mg/24h or absent: < 300 mg/24h; mild: < 2 mg/24h or severe: ≥ 2 mg/24h) and the uric acid level (< 6.0 mg/dL or ≥ 6.0 mg/dL). The chi-square test was used for comparing the qualitative data and the Student *t* test was used to compare the quantitative data. A *p* value of 0.05 was regarded as statistically significant.

Results: glomerular and tubular proteins were found on all the hypertensive pregnant women and there were no significant differences in the number of protein bands. The glomerular protein band number was significantly higher in PE and CH+PE groups, in pregnant women with proteinuria, in pregnant women with severe proteinuria, and in pregnant women with uric acid level ≥ 6 mg/dL. When compared with the protein of molecular mass ≤ 90 kDa the percentage of protein of molecular mass ≥ 160 kDa was higher in the PE, CH+PE and GH groups, in pregnant women with positive proteinuria, and in pregnant women with uric acid ≥ 6 mg/dL.

Conclusion: the type of urinary protein didn't identify the types of hypertension in pregnancy. The number of glomerular protein bands and the molecular mass ≥ 160 kDa identify the pregnant women with pre-eclampsia, positive proteinuria, and uric acid level ≥ 6 mg/dL.

Introdução

A hipertensão arterial é a segunda intercorrência clínica mais comum da gestação, perdendo para a anemia⁽¹⁾. No mínimo, entre 7% e 10% de todas as gestações manifestam alguma forma de hipertensão arterial⁽²⁾, fator que contribui significativamente com os índices de morbidade e mortalidade materna e perinatal⁽³⁾.

Juntamente com a aferição da pressão arterial, a análise da urina quanto a presença de proteinúria é fundamental, uma vez que esta é essencial no diagnóstico de uma das formas de manifestação da hipertensão

arterial na gravidez – a pré-eclâmpsia, é importante marcador da gravidade e progressão da doença e, está associada com restrição de crescimento intra-uterino e mortalidade perinatal. Portanto, a presença de proteinúria significa pior prognóstico materno e perinatal⁽⁴⁻¹⁰⁾.

Segundo Beaufils⁽¹¹⁾, 10% a 20% das gestantes hipertensas desenvolverão proteinúria.

Entre os critérios de definição de pré-eclâmpsia grave encontra-se a proteinúria com valor de pelo menos 2 g em urina de 24 horas. Entre os critérios de indicação de resolução da gestação na pré-eclâmpsia está a deterioração progressiva da função renal, avaliada pelo aumento da creatinina sérica e da proteinúria⁽³⁾.

A importância da proteinúria pode também ser avaliada pela comparação dos resultados obtidos em gestantes com hipertensão arterial crônica isolada e superposta por pré-eclâmpsia. Sibai⁽¹²⁾ verificou que a hipertensão arterial crônica leve sem superposição de pré-eclâmpsia tem evolução semelhante às mulheres normotensas. A superposição de pré-eclâmpsia na hipertensão leve determina mortalidade neonatal de 24%⁽¹³⁾ e nas situações em que ocorre hipertensão arterial grave (pressão arterial $\geq 175 \times 110$ mmHg) a mortalidade materna ocorre em aproximadamente 15% e as perdas fetais em 60% dos casos⁽¹⁴⁾.

É conhecido que a excreção de proteína na urina aumenta de maneira progressiva desde o início da gestação⁽¹⁵⁾ e que a excreção urinária de albumina é maior no 3º que no 2º e 1º trimestres e que nas mulheres não grávidas^(16,17). Na gravidez normal a proteinúria não deve ultrapassar 260

mg/24hs e a albuminúria não deve ultrapassar 30 mg/24hs⁽¹⁸⁾. A presença de 300 mg ou mais em urina de 24 horas é considerada uma excreção patológica, definindo a pré-eclâmpsia⁽³⁾.

A presença e a gravidade da proteinúria têm relação com complicações fetais, o que é comprovado por estudos que mostram excreção de albumina nove vezes maior nas gestações com fetos que apresentam restrição de crescimento intrauterino, comparadas com gestantes cujos fetos têm crescimento intrauterino normal⁽¹⁹⁾. Comparando gestantes hipertensas, com e sem proteinúria, observa-se respectivamente restrição de crescimento intrauterino (51% x 16%), parto prematuro (27% x 6,5%) e morte neonatal (17% x 1,5%)⁽²⁰⁾.

A prevalência de restrição de crescimento intrauterino em hipertensão arterial crônica é semelhante à da população geral (12%), porém quando aparece proteinúria o risco é quatro vezes maior (52%), o que também acontece na pré-eclâmpsia, determinando uma taxa de mortalidade neonatal em torno de 25%^(5,8,21).

A origem da proteinúria, de acordo com o setor em que o nefron está comprometido, pode ser dividida em glomerular, tubular e mista. Essa origem pode ter relação com complicações fetais, tendo Quaas et al.⁽²²⁾ demonstrado alta incidência de prematuridade, restrição de crescimento intrauterino e mortalidade perinatal em gestantes hipertensas com proteinúria glomerular e mista em concentração maior que um grama por 24 horas.

Alvarez⁽²³⁾, comparando eletroforese de proteínas urinárias, identificou proteinúria mista em gestantes normais e com hipertensão da

gestação e também mostrou que as proteinúrias diferem quantitativamente tanto de modo absoluto como relativo, sendo que as gestantes hipertensas apresentam maior quantidade de proteínas e maior quantidade de globulinas que as gestantes normais.

Moodley et al.⁽²⁴⁾, avaliando em gestantes com pré-eclâmpsia o resultado da eletroforese de proteínas urinárias, observaram que as pressões arteriais sistólica e diastólica eram significativamente maiores nas gestantes com proteinúria mista que nas gestantes com proteinúria glomerular.

Os dados da literatura não deixam dúvida quanto a importância da presença da proteinúria e da quantidade da mesma em gestantes hipertensas. Alguns autores têm realizado uma análise mais detalhada da proteinúria da gestante hipertensa, procurando determinar o papel da origem de proteinúria no resultado materno e perinatal. Nossa intenção foi compartilhar dessa maneira de pensar procurando correlacionar a origem de proteinúria com as formas de manifestação da hipertensão arterial na gravidez e com alguns parâmetros que caracterizam essas formas.

Objetivos

Objetivo Geral

Diferenciar, por meio de eletroforese, a origem e o peso molecular da proteína urinária que ocorre nas diferentes formas de manifestação da hipertensão arterial na gestação.

Objetivos Específicos

- Identificar a origem e o peso molecular da proteína urinária que ocorre na hipertensão gestacional.
- Identificar a origem e o peso molecular da proteína urinária que ocorre na pré-eclâmpsia/eclâmpsia.
- Identificar a origem e o peso molecular da proteína urinária que ocorre na hipertensão arterial crônica.
- Identificar a origem e o peso molecular da proteína urinária que ocorre na hipertensão arterial crônica superposta pela pré-eclâmpsia/eclâmpsia.
- Correlacionar a origem e o peso molecular da proteína urinária com o valor de proteinúria em urina de 24 horas.
- Correlacionar a origem e o peso molecular da proteína urinária com o valor de ácido úrico.

Sujeitos e Métodos

1- Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo de validação de teste diagnóstico e prospectivo.

2- População estudada

Foram estudadas 143 gestantes portadoras de hipertensão arterial, classificadas de acordo com a sua forma de manifestação⁽³⁾:

- Hipertensão Gestacional (HG) – 30 casos
- Pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE) – 57 casos
- Hipertensão arterial crônica (HAC) – 23 casos
- Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia/eclâmpsia (HAC+PE) – 33 casos

3- Seleção dos Sujeitos

A população estudada foi constituída de gestantes internadas na enfermaria de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e de gestantes internadas na enfermaria de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Materno Infantil da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA.

3.1- Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo gestantes com feto único, idade gestacional de pelo menos 24 semanas e portadoras de hipertensão arterial.

3.2- Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo mulheres com gestação múltipla, idade gestacional inferior a 24 semanas ou com complicações clínicas como diabetes, cardiopatia, nefropatia prévia e infecção do trato urinário.

4- VARIÁVEIS

4.1- Variáveis de Controle

Faixa etária – foi dividida em três grupos:

- Menor que 18 anos
- Entre 19 e 34 anos
- Igual ou maior que 35 anos

Raça – foram consideradas raça branca e não branca.

Paridade – definida como o número de partos antes da gestação atual. Foram divididas em dois grupos:

- Nulíparas – nenhum parto anterior
- Multíparas – um ou mais partos anteriores

4.2- Variáveis Independentes

Tipos de hipertensão arterial – foram considerados quatro tipos:

- Hipertensão Gestacional
- Pré-clâmpsia/eclâmpsia
- Hipertensão arterial Crônica
- Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia/eclâmpsia.

Proteinúria – foram considerados os seguintes aspectos:

- Presente: ≥ 300 mg em urina de 24 horas
- Ausente: < 300 mg em urina de 24 horas

- Leve: < 2 gramas por 24 hs
- Grave: $\geq$ 2 gramas por 24 hs

Ácido úrico plasmático – foram considerados dois níveis:

- < 6 mg/dl
- $\geq$ 6 mg/dl

4.3- Variáveis dependentes

Origem de proteinúria – foram considerados três tipos:

- Glomerular
- Tubular
- Mista

Seletividade da proteinúria

- Seletiva: presença de apenas uma banda com peso molecular maior que o da albumina, correspondente a transferrina.
- Não seletiva: presença de pelo menos duas bandas com peso molecular maior que o da albumina.

Peso molecular das bandas – foram classificadas em três tipos:

- $\leq$ 90 Da – correspondente a transferrina
- > 90 Da e < 160 Da
- $\geq$ 160 Da – correspondente a gama-globulina

5- CONCEITOS

Hipertensão Arterial: quando o valor da pressão arterial, após duas ou mais medidas sucessivas, manteve-se em valores iguais ou maiores que 140x90 mmHg.

Hipertensão arterial crônica: hipertensão arterial conhecida previamente à gestação ou diagnosticada antes da vigésima semana de gestação.

Pré-eclâmpsia/eclâmpsia: ausência de história de hipertensão prévia à gestação, com manifestação de hipertensão arterial a partir da vigésima semana e proteinúria de 24 horas igual ou maior que 300 mg.

Hipertensão gestacional: ausência de história de hipertensão prévia à gestação, com manifestação de hipertensão arterial a partir da vigésima semana e proteinúria de 24 horas menor que 300 mg.

Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia/eclâmpsia: hipertensão arterial crônica com aparecimento de proteinúria de 24 horas igual ou maior que 300 mg a partir da vigésima semana de gestação.

Proteinúria glomerular: presença de proteínas urinárias com peso molecular maior que 66,409 Da.

Proteinúria tubular: presença de proteínas urinárias com peso molecular menor que 66,409 Da.

Proteinúria mista: presença de proteinúria glomerular e tubular.

6- TÉCNICAS LABORATORIAIS

6.1- Proteinúria de 24 horas

Foi colhida urina de 24 horas para dosagem quantitativa de proteínas urinárias pelo método da reação colorimétrica vermelho de Pirogalol, no aparelho de automação Dade Behring, modelo Dimension RXL.

6.2- Eletroforese de proteínas

Foram separados 10 ml da urina de 24 horas e, conservados a -20 °C até o momento da realização da eletroforese de proteínas. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras e em sistema descontínuo⁽²⁵⁾. Foi usado o sistema de gradiente 7–15% de acrilamida e as amostras das urinas foram diluídas na proporção 1:3 (uma parte de urina para 3 partes do diluente em uma concentração de 40 ug a 100 ug de proteína) no tampão de amostra (SDS 1%, 2-mercaptoetanol 128 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%, Tris-HCl 500 mM pH 6,8) e fervidas durante 3 minutos. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical, sob corrente inicial de 80 V, passando-se após 15 minutos para 120 V até o término da corrida (2 horas aproximadamente).

O padrão de proteínas (Protein Marker, Broad Range P7702S BioLabs), composto pelas proteínas relacionadas abaixo, foram incluídos em todas as corridas eletroforéticas.

Proteína	Peso molecular (Da)
Miosina	212,000 ¹
MBP – β -galactosidase	158,194
β -galactosidase	116,351
Fosforilase b	97,184
Albumina bovina	66,409
Dehidrogenase glutâmica	55,561
MBP 2	42,710
Lactato dehidrogenase M	36,487
Triosefosfato isomerase	26,625
Inibidor tripsina	(20,040–20,167)
Lisozima	14,313
Aprotinina	6,517
Cadeia de Insulina A, B	(2,340–3,400)

A coloração do gel foi feita segundo técnica descrita por Wray et al.⁽²⁶⁾. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram fixados em metanol a 50% por no mínimo uma hora, rehidratados durante 20 minutos em água contendo formaldeído a 0,037% e, lavados duas vezes (10 min./lavagem) em água destilada. Em seguida, foram incubados em solução de prata amoniacal, sob agitação lenta e na ausência de luz, durante 20 minutos. Após a incubação em solução corante, os géis foram lavados em água destilada durante 20 minutos e em seguida, incubados por 5-10 minutos em solução reveladora

(citrato a 2,5% e formaldeído a 37%). Após o aparecimento das bandas de proteínas a reação foi interrompida pela adição de solução inativadora (metanol a 45% e ácido acético a 10%).

Inicialmente foi realizada a leitura direta de bandas (frações) protéicas em cada amostra de urina e contadas as bandas acima (glomerular) e abaixo (tubular) da banda correspondente a albumina (Figura 1).

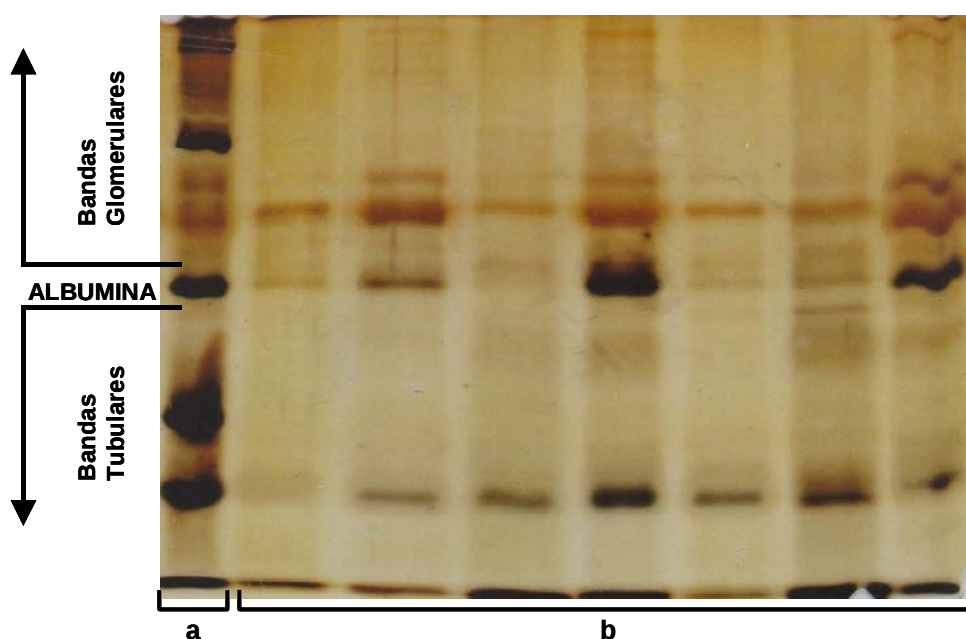


Figura 1 – Gel de eletroforese com amostras padrão (a) e de gestantes hipertensas (b)

Para identificação das frações e densitometria, foram empregados o Analisador de Imagens VDS (Pharmacia-Biotech) e o programa computacional Image Master VDS (Pharmacia-Biotech). O programa em uso fez a interpolação das bandas de proteínas identificadas por eletroforese, tendo como referência os pesos moleculares das proteínas contidas no padrão (Figura 2).

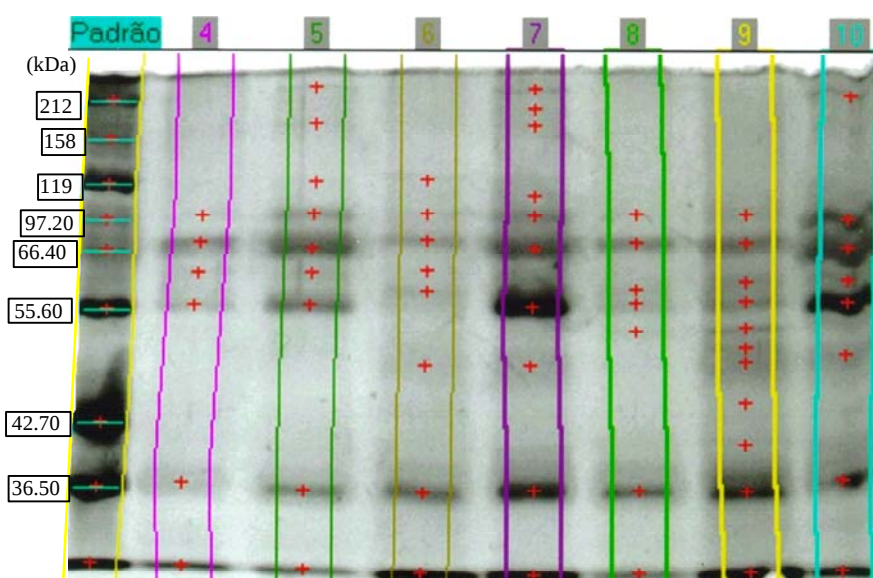


Figura 2 – Identificação das bandas no gel de eletroforese

A densitometria é um método biofísico que permite a quantificação das frações protéicas obtidas na separação eletroforética, descrevendo uma série de curvas conforme o número e a intensidade de coloração de cada fração. Foi feito cálculo da área descrita sob as curvas obtendo-se, em porcentagem, as quantidades relativas de cada fração (Figura 3). Os resultados foram registrados em planilhas especiais (Anexo 1).

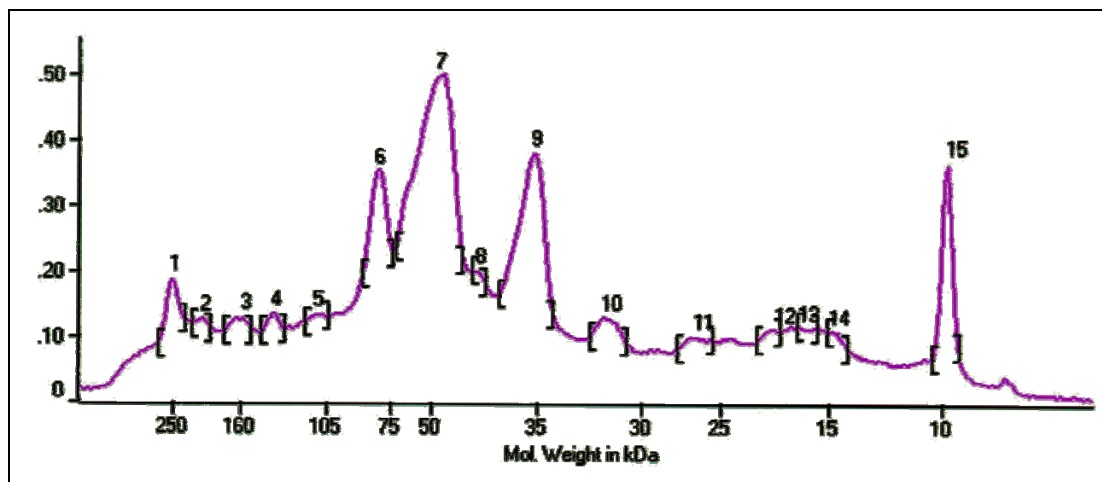


Figura 3 – Determinação do peso molecular das bandas de proteínas pelo analisador de imagens VDS

6.3- Dosagem de ácido úrico

A dosagem de ácido úrico foi realizada no equipamento Dimension (DADE BEHRING) e expressa em mg/dl.

7- Análise dos dados

O banco de dados foi elaborado no programa estatístico Epi-Info – programa de análise estatística e epidemiológica, versão 6,04⁽²⁷⁾.

Para análise das variáveis qualitativas foram empregados o teste de Qui-quadrado (X^2) e o Teste Exato de Fisher nas comparações estatísticas. Para análise das variáveis quantitativas foi utilizado o teste t de Student. Foi considerado o limite de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

Para análise estatística foi utilizado o programa Statistical Package in Social Science para Windows (SPSS Inc, Chicago) versão 10,0.

8- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA (Anexos 2 e 3).

Resultados

O presente estudo avaliou 143 gestantes portadoras de hipertensão arterial.

As características demográficas da população de gestantes hipertensas encontram-se na Tabela 1. Verificamos predomínio de gestantes na faixa etária entre 19 e 34 anos e de cor branca. A distribuição entre nulíparas e multíparas foi semelhante. A análise das diferentes formas de manifestação de hipertensão arterial mostrou maior porcentagem de gestantes com pré-eclâmpsia (PE). Quando foi comparada a presença (como

manifestação isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica) ou não de PE também houve predomínio de gestantes com PE.

Tabela 1 - Características demográficas da população de gestantes hipertensas

Características		n	%
Faixa etária (anos)	< 19	18	12,6
	19 – 34	97	67,8*
	> 34	28	19,6
Cor	Branca	105	73,4*
	Não branca	38	26,6
Paridade	Nulípara	71	49,7
	Múltipara	72	50,3
Tipo Hipertensão arterial	HAC	30	21,0
	PE	57	39,9*#
	HAC+PE	23	16,1#
	HG	33	23,0

*# presença x ausência de PE (p<0,05)

O resultado da eletroforese das proteínas urinárias foi analisado quanto ao número e peso molecular das bandas identificadas no gel.

Para análise do número de bandas de proteínas consideramos a banda correspondente a albumina, com peso molecular de 66,4 kDa, como banda limítrofe na identificação de proteinúria glomerular (peso molecular maior que 66,4 kDa) e proteinúria tubular (peso molecular menor que 66,4 kDa). Na

Tabela 2 encontram-se as médias e desvios padrão dos números de bandas abaixo e acima da banda correspondente a albumina. O número de bandas glomerulares e tubulares foi estatisticamente semelhante entre as diferentes formas de manifestação de hipertensão arterial. O número de bandas tubulares foi significativamente maior que o de bandas glomerulares, independente da forma de manifestação de hipertensão arterial.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão dos números de bandas de proteínas glomerulares e tubulares, detectadas na eletroforese urinária, segundo o tipo de hipertensão arterial

Tipo banda	Tipo hipertensão arterial			
	HAC	PE	HAC+PE	HG
Glomerular	2,7 ± 1,2	3,3 ± 1,6	3,3 ± 1,8	2,4 ± 1,4
Tubular	7,7 ± 3,1*	7,0 ± 3,1*	6,8 ± 3,5*	6,9 ± 3,1*
Total	10,3 ± 3,9	10,3 ± 4,3	10,1 ± 4,8	9,4 ± 3,9

* número de bandas glomerular x tubular ($p < 0,05$)

Na tabela 3 encontra-se a distribuição das gestantes hipertensas segundo a presença (até uma banda com peso molecular maior que o da albumina) ou não (pelo menos duas bandas com peso molecular maior que o da albumina) de seletividade da proteinúria em relação ao tipo de hipertensão arterial. A ausência de seletividade foi significativamente maior que a presença, demonstrando a perda de proteínas glomerulares em todos os

tipos de hipertensão arterial. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 3 - Presença ou não de seletividade de proteínas, detectada na eletroforese urinária, segundo o tipo de hipertensão arterial

Seletividade	Tipo hipertensão arterial							
	HAC		PE		HAC+PE		HG	
	n	%	n	%	n	%	n	%
presente	04	13,3	11	19,3	05	21,7	09	27,3
ausente	26	86,7*	46	80,7*	18	78,3*	24	72,7*

*Seletividade presente x ausente ($p < 0,05$)

Na tabela 4 encontra-se a distribuição do número e porcentagem de bandas glomerulares e tubulares, detectadas na eletroforese urinária, segundo a forma de manifestação da hipertensão arterial. Nos grupos de gestantes com hipertensão arterial crônica (HAC) e hipertensão gestacional (HG), em que o valor da proteinúria de 24 horas foi menor que 300 mg, verificamos que a média mais um desvio padrão do número de bandas glomerulares foi semelhante e menor que quatro, enquanto a média mais um desvio padrão do número de bandas tubulares foi semelhante e menor que 11.

Verificamos diferença significativa entre os grupos com pré-eclâmpsia (PE e HAC+PE) em relação aos grupos sem pré-eclâmpsia (HAC e HG), apresentando os grupos com PE maior porcentagem de casos com

número igual ou maior que quatro bandas glomerulares. A porcentagem de casos com número de bandas tubulares menor que 11 é significativamente maior que a porcentagem de casos com número igual ou maior que 11, porém não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 4 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares e tubulares, detectadas na eletroforese urinária, segundo o tipo de hipertensão arterial

Tipo banda	Tipo hipertensão arterial							
	HAC		PE		HAC+PE		HG	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Glomerular < 4	22	73,3	28	49,1	11	47,8	26	78,8
Glomerular ≥ 4	08	26,7	29	50,9*	12	52,2*	07	21,2
Tubular < 11	25	83,3	51	89,5	19	82,6	29	87,9
Tubular ≥ 11	05	16,7	06	10,5	04	17,4	04	12,1

*% de bandas glomerulares ≥4: (HG = HAC) < (PE = HAC+PE) (p<0,05)

Na Tabela 5 encontra-se a distribuição do número e porcentagem de bandas glomerulares e tubulares em relação a presença (≥300 mg/24h) ou não de proteinúria. A porcentagem do número de bandas glomerulares igual ou maior que quatro foi significativamente maior nas gestantes com proteinúria positiva, enquanto na ausência de proteinúria

predominou o número de bandas menor que quatro. A porcentagem de bandas tubulares não esteve relacionada com a presença ou não de proteinúria.

Tabela 5 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares e tubulares, detectadas na eletroforese urinária, segundo a presença (≥ 300 mg/24h) ou não de proteinúria

Tipo de banda	Proteinúria			
	Presente		Ausente	
	n	%	n	%
Glomerular < 4	40	50,0	48	76,2*
Glomerular ≥ 4	40	50,0*	15	23,8
Tubular < 11	70	87,5	54	85,7
Tubular ≥ 11	10	12,5	09	14,3

* proteinúria presente x ausente ($p < 0,05$)

Na Tabela 6 encontra-se a distribuição do número e porcentagem de bandas glomerulares e tubulares em relação aos graus leve e grave de proteinúria. A porcentagem do número de bandas glomerulares igual ou maior que quatro foi significativamente maior nas gestantes com proteinúria grave, enquanto na proteinúria leve predominou o número de bandas menor que quatro. A porcentagem de bandas tubulares não esteve relacionada com a gravidade da proteinúria.

Tabela 6 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares e tubulares, detectadas na eletroforese urinária, segundo os graus leve e grave de proteinúria

Tipo de banda	Grau de proteinúria			
	Leve (< 2g/24h)		Grave (≥ 2g/24h)	
	n	%	n	%
Glomerular < 4	26	60,5*	14	37,8
Glomerular ≥ 4	17	39,5	23	62,2*
Tubular < 11	38	88,4	32	86,5
Tubular ≥ 11	05	11,6	05	13,5

* proteinúria leve x grave (p<0,05)

Na Tabela 7 encontra-se a distribuição do número e porcentagem de bandas glomerulares e tubulares em relação aos valores de ácido úrico. A porcentagem do número de bandas glomerulares igual ou maior que quatro foi significativamente maior nas gestantes com valor de ácido úrico ≥6, enquanto o número de bandas menor que quatro predominou nas gestantes com valor de ácido úrico <6. A porcentagem de bandas tubulares não esteve relacionada com o valor de ácido úrico.

Tabela 7 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares e tubulares, detectadas na eletroforese urinária, segundo o valor de ácido úrico (mg%)

Tipo de banda	Ácido úrico			
	< 6		≥ 6	
	n	%	n	%
Glomerular < 4	63	75,0*	28	47,5
Glomerular ≥ 4	21	25,0	31	52,5*
Tubular < 11	78	83,9	44	88,0
Tubular ≥ 11	15	16,1	06	12,0

* ácido úrico ≥6,0 x ácido úrico < 6,0 (p<0,05)

A análise da eletroforese quanto ao peso molecular das bandas foi realizada em urina de 124 gestantes hipertensas, considerando-se o grau de lesão do glomérulo. Assim, as gestantes foram divididas em três grupos: peso molecular ≤90 kDa, maior que 90 kDa e menor que 160 kDa e, ≥160 kDa. O peso molecular de 90 kDa corresponde a transferrina e o peso molecular de 160 kDa corresponde a γ -globulina.

Na Tabela 8 encontra-se a distribuição do número e porcentagem de bandas de proteínas urinárias classificadas quanto ao peso molecular em relação ao tipo de hipertensão arterial. O peso molecular ≥160 kDa diferenciou as gestantes portadoras de PE dos grupos com HAC e HG.

Gestantes com PE, como manifestação isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica e, gestantes com HG apresentam maior porcentagem de bandas com peso molecular igual ou maior que 160 kDa, quando comparadas com a porcentagem de bandas com peso molecular ≤ 90 kDa .

Tabela 8 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares classificadas quanto ao peso molecular (kDa), detectadas na eletroforese urinária, segundo o tipo de hipertensão arterial

Peso molecular	Tipo hipertensão arterial							
	HAC		PE		HAC+PE		HG	
	n	%	n	%	n	%	n	%
≤ 90	08	42,1	12	24,5	03	15,0	10	27,8
> 90 e < 160	04	21,1	06	12,2	03	15,0	07	19,4
≥ 160	07	36,8	31	63,3*#	14	70,0*#	19	52,8*

* peso molecular ≥ 160 kDa > peso molecular ≤ 90 kDa: PE=HAC+PE=HG ($p < 0,05$)

peso molecular ≥ 160 kDa: (PE=HAC+PE) > (HAC=HG) ($p < 0,05$)

Na Tabela 9 comparamos a proteinúria quanto a presença e gravidade em relação ao peso molecular das bandas eletroforéticas. O peso molecular não diferenciou a presença ou não de proteinúria. Nas gestantes com proteinúria presente houve maior porcentagem de bandas com peso molecular ≥ 160 kDa. O peso molecular não diferenciou as gestantes com

proteinúria leve e grave e, nos dois grupos houve predomínio de bandas com peso molecular ≥ 160 kDa.

Tabela 9 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares classificadas quanto ao peso molecular (kDa), detectadas na eletroforese urinária, segundo a presença e a gravidade da proteinúria

Peso molecular	Proteinúria							
	Presente		Ausente		Leve		Grave	
	n	%	n	%	n	%	n	%
≤ 90	15	21,8	18	32,7	08	22,2	07	21,2
> 90 e < 160	11	15,9	11	20,0	08	22,2	03	9,1
≥ 160	43	63,3*	26	47,3	20	55,6#	23	69,7#

* peso molecular ≥ 160 kDa x peso molecular ≤ 90 kDa: proteinúria presente ($p < 0,05$)

#peso molecular ≥ 160 kDa x peso molecular ≤ 90 kDa: proteinúria leve e grave ($p < 0,05$)

A tabela 10 mostra a relação do valor do ácido úrico com o peso molecular das bandas eletroforéticas. Entre os grupos com valores de ácido úrico < 6 e ácido úrico ≥ 6 houve predomínio de bandas com peso molecular ≥ 160 kDa, em relação as bandas com peso molecular ≤ 90 kDa. Na comparação entre os valores de ácido úrico houve maior porcentagem de bandas com peso molecular ≥ 160 kDa.

Tabela 10 - Número e porcentagem de bandas de proteínas glomerulares classificadas quanto ao peso molecular (kDa), detectadas na eletroforese urinária, segundo o valor de ácido úrico (mg%)

Peso molecular	Ácido úrico			
	< 6		≥ 6	
	n	%	n	%
≤ 90	23	30,3	10	20,8
> 90 e < 160	16	21,1	06	12,5
≥ 160	37	48,7*	32	66,7*#

* peso molecular ≥160 kDa x peso molecular ≤90 kDa: ácido úrico ≥6 = ácido úrico <6 (p<0,05)

ácido úrico <6 x ácido úrico ≥6: peso molecular ≥160 kDa (p<0,05)

Discussão

Há décadas a literatura tem enfatizado a relação entre proteinúria e o resultado materno e perinatal.

Assim, a presença ou não de proteinúria define uma das formas de manifestação da hipertensão arterial na gravidez - a pré-eclâmpsia⁽³⁾ e tem sido considerada um dos fatores norteadores do desfecho da gestação, esperando-se pior prognóstico nas gestantes hipertensas com manifestação da mesma^(4,8,28-31).

Além da presença tem sido valorizada a concentração com que a proteinúria se manifesta, mostrando a literatura que o prognóstico materno e

perinatal está relacionado com a valor da mesma. Quando o valor de proteinúria atinge pelo menos dois gramas em 24 horas, o quadro clínico da pré-eclâmpsia é considerado grave e recomenda-se a interrupção da gestação^(3,32).

Entretanto, não há unanimidade na literatura em relação a esses conceitos, afirmando alguns pesquisadores que a presença de proteinúria⁽³³⁾ ou mesmo sua concentração^(9,34-37) não alteram o resultado materno e perinatal.

Outro aspecto avaliado pela literatura é o perfil das proteínas excretadas pela urina, que pode indicar o local da lesão renal, isto é, glomérulo ou túbulo proximal. As proteínas urinárias em humanos podem ser fracionadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS, em 26 bandas com pesos moleculares entre 14 e 230 kDa, sendo constituídas na sua maioria (mais de 90%) por albumina e a proteína de Tamm-Horsfall⁽³⁸⁾, embora possa ocorrer excreção de outras proteínas de maior peso molecular, como gamaglobulina M com peso molecular de 950 kDa.

Em gestantes a eletroforese de proteínas urinárias foi realizada pela primeira vez por Parviainen et al.⁽³⁹⁾, que usaram a técnica de eletroforese em papel. As pesquisas mais recentes utilizam a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e revelam que a proteinúria é constituída de diferentes proteínas, de origem principalmente plasmática, entre as quais se incluem albumina, α_1 e α_2 -globulinas, beta-globulina, gama-globulina (IgG, IgA e eventualmente IgM), ceruloplasmina, pseudo colinesterase e α_2 -macroglobulina⁽⁴⁰⁾.

Até o momento não foi identificado um padrão de proteinúria que corresponda a característica histopatológica da pré-eclâmpsia, isto é, da glomerulo endoteliose. Segundo Halligan et al.⁽¹⁰⁾, a identificação desse padrão pode ser de grande importância, uma vez que a origem de proteinúria, mais que a quantidade pode ter maior significado prognóstico.

O presente estudo utilizou o perfil de eletroforese em gel de poliacrilamida, de proteínas da urina de gestantes hipertensas, para diferenciá-las quanto a forma de manifestação clínica da doença. A origem de bandas presentes, isto é, glomerular, tubular e mista, não diferenciou as formas de manifestação da hipertensão arterial, uma vez que em todas as amostras de urina analisadas foram identificadas bandas glomerulares e tubulares, com predomínio significativo das últimas. No estudo de Alvarez⁽²³⁾ o padrão eletroforético mostrou nos três grupos estudados (gestante normal, com hipertensão gestacional e com pré-eclâmpsia) proteínas de baixo e alto peso molecular, isto é, misto (glomerular e tubular). Quaas et al.⁽²²⁾ verificaram que, na pré-eclâmpsia, quando a proteinúria ultrapassava valores de 500 mg/24 horas, eram identificadas bandas de origem glomerular ou misto, não se detectando proteinúria tubular pura.

A proteinúria glomerular tem sido associada a altas taxas de pré-eclâmpsia⁽⁴¹⁾. Quando na pré-eclâmpsia a proteinúria é de origem glomerular ou mista existe maior risco (80% e 75% respectivamente) de evolução da doença para as formas graves⁽²²⁾. Raidt et al.⁽⁴²⁾ e Winkler⁽⁴³⁾ encontraram predominância da proteinúria glomerular (69% e 90%) sobre proteinúria mista (18% e 10%) respectivamente.

A porcentagem de proteinúria não seletiva, nas diferentes formas de manifestação da hipertensão arterial, variou entre 72,7% e 86,7%, não diferenciando-as entre si. Esses achados mostram que, qualquer forma de manifestação de hipertensão arterial na gestação provoca lesão renal significativa, aumentando a permeabilidade do glomérulo, traduzida pela baixa ou ausente seletividade. A literatura mostra dados semelhantes em relação a pré-eclâmpsia e outras doenças com comprometimento renal⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾.

A análise do número de bandas tubulares, dividindo as gestantes em dois grupos, segundo a presença de até 10 bandas ou de pelo menos 11 bandas, não diferenciou as formas de manifestação da hipertensão arterial. A maioria dos pesquisadores têm observado aumento da excreção de proteínas de baixo peso molecular na gestação normal^(18,49-51). Como a excreção urinária de outras substâncias (glicose, aminoácidos, cálcio e ácido úrico), normalmente absorvidas pelo túbulo proximal, também aumenta durante a gestação^(52,53), esse fato pode indicar apenas comprometimento fisiológico da reabsorção tubular. Na pré-eclâmpsia os estudos mostram maior excreção quando comparada com gestação normal, o que provavelmente indica maior prejuízo da função tubular^(49,54,55).

Quando avaliamos o número de bandas glomerulares, as gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica, apresentaram maior porcentagem de casos com pelo menos quatro bandas. O achado das bandas glomerulares poderia ter o mesmo significado da presença de proteinúria seletiva ou não seletiva na síndrome nefrótica, ou seja, quanto mais intensa a lesão glomerular maior a presença de

proteinúria não seletiva. Neste trabalho, o número de bandas glomerulares maior que quatro pode significar maior lesão glomerular. Segundo Conrad & Lindheimer⁽⁴⁰⁾, na gestação humana normal não tem sido detectada permeabilidade de proteínas de alto peso molecular. A literatura mostra perda de proteínas glomerulares na pré-eclâmpsia, indicando alterações no glomérulo^(44,45,47,48).

O número de bandas de proteínas urinárias parece ter relação com a gravidade da pré-eclâmpsia, como demonstrou por imunoelektroforese McEwam⁽⁵⁶⁾, onde gestantes portadoras de pré-eclâmpsia leve apresentaram seis frações e as graves nove frações, as mesmas seis dos casos de pré-eclâmpsia leve e outras três de peso molecular mais alto.

Quando analisamos o peso molecular das bandas de proteínas urinárias verificamos que nas gestantes com manifestação de pré-eclâmpsia, isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica, houve predomínio das bandas com maior peso molecular (≥ 160 kDa), diferenciando-as dos outros tipo de hipertensão arterial. Esse achado significa que, na pré-eclâmpsia existe maior disfunção do glomérulo, com diminuição da sua capacidade de reter proteínas de alto peso molecular. Com exceção das gestantes com HAC, em todas as formas de hipertensão arterial gestacional houve maior porcentagem de proteinúria de peso molecular alto (≥ 160 kDa).

O número de bandas também foi relacionado com a presença (≥ 300 mg/24 horas) ou não de proteinúria e com a quantidade da mesma. Nas duas situações houve relação positiva com o número de bandas glomerulares de pelo menos quatro. Este achado não está em acordo com Kaltenbach &

Wilhelm⁽⁵⁷⁾, que relataram concentração de proteínas urinárias três vezes maior nos casos em que houve maior seletividade de proteinúria glomerular.

O peso molecular não diferenciou a presença ou não de proteinúria e nem distinguiu os casos graves dos leves. Entretanto, quando a proteinúria foi significativa (≥ 300 mg/24 horas) houve maior porcentagem de bandas de proteínas com peso molecular ≥ 160 kDa, refletindo que a proteinúria que define a pré-eclâmpsia significa maior comprometimento da função do glomérulo, não apenas pela quantidade mas principalmente pela qualidade da proteína perdida.

O aumento do clearance renal de ácido úrico na gravidez está diretamente relacionado com o aumento da volemia. Na pré-eclâmpsia a queda do clearance e a conseqüente hiperuricemia têm como causa principal a hipovolemia secundária à proteinúria e hipoproteinemia⁽⁵⁸⁾. No presente estudo, gestantes hipertensas com valor de ácido úrico de pelo menos 6 mg% apresentaram maior porcentagem de número de bandas glomerulares de pelo menos quatro. Esse achado poderia ser justificado, nos casos com quatro ou mais bandas, pela presença de lesão glomerular mais intensa determinando maior proteinúria e hipovolemia e, conseqüentemente maior queda do clearance do ácido úrico e maiores níveis séricos do mesmo.

Gestantes com valor de ácido úrico ≥ 6 mg% tiveram maior porcentagem de bandas de proteínas urinárias com peso molecular ≥ 160 kDa, reforçando o significado de maior lesão glomerular.

Segundo Zatz⁽⁵⁹⁾, existem três mecanismos básicos que causam proteinúria: aumento da permeabilidade glomerular, diminuição da

reabsorção tubular e presença de proteínas anômalas na circulação. O aumento da permeabilidade glomerular é a causa mais comum da proteinúria, podendo ser conseqüente a disfunção do sistema de poros, a perda de cargas fixas eletromagnéticas ou a uma combinação entre esses dois mecanismos.

Portanto, a análise das bandas de proteínas urinárias, classificando-as tanto quanto à origem como quanto ao peso molecular, mostrou que a perda de proteína glomerular identifica as gestantes com proteinúria significativa, as portadoras de pré-eclâmpsia e, tem relação com a quantidade de proteína perdida e com o valor de ácido úrico.

Podemos afirmar que, entre as formas de manifestação da hipertensão arterial na gestação, a pré-eclâmpsia, isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica, representa lesão renal mais grave traduzida por aumento quantitativo e qualitativo da permeabilidade do glomérulo.

Conclusões

A análise dos resultados obtidos permite concluir que:

- A origem de proteína urinária (glomerular e tubular) não diferencia as formas de manifestação da hipertensão arterial.
- Na pré-eclâmpsia, isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica, existe maior número de bandas glomerulares e estas apresentam maior peso molecular.
- Maior número e maior peso molecular de bandas glomerulares estão associados com maior quantidade de proteinúria.

- Maior número e maior peso molecular de bandas glomerulares estão associados com maior valor de ácido úrico.

Referências Bibliográficas^{*}

- 1- Barrilleaux PS, Martin Jr JN. Hypertension therapy during pregnancy. Clin Obstet Gynecol 2002; 45:22-34.
- 2- Williams K. Hypertension in pregnancy. Can Fam Physician 1995; 41:626-32.
- 3- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000; 183:s1-22.
- 4- Page E W, Christianson R. Influence of blood pressure changes with and without proteinuria upon outcome of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1976; 126:821-9.
- 5- Lin CC, Lindheimer MD, River P, Moawad AH. Fetal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1982; 142:255-60.
- 6- Moore MP, Redman CWG. Case-control study of severe pre-eclampsia of early onset. Br Med J 1983; 287:580-3.

^{*} Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. J Pediatr 1997; 73: 213-24.
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 240p.

- 7- Gleicher N, Boler LR, Norusis, Del Granado A. Hypertensive diseases of pregnancy and parity. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:1044-9.
- 8- Ferrazzani S, Caruso A, De Carolis S, Martino IV, Mancuso S. Proteinuria and outcome of 444 pregnancies complicated by hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:366-71.
- 9- Chua S, Redman CWG. Prognosis for pre-eclampsia complicated by 5 g or more of proteinuria in 24 hours. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 43:9-12.
- 10- Halligan AWF, Bell SC, Taylor DJ. Dipstick proteinuria: caveat emptor. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106:1113-5.
- 11- Beaufils M. Hypertensions gravidiques. *Arch Mal Coeur* 2001; 94:1077-86.
- 12- Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnant women. *N Engl J Med* 1996; 335:257-65.
- 13- Sibai BM, Abdella TN, Anderson GD. Pregnancy outcome in 211 patients with mild chronic hypertension. *Obstet Gynecol* 1983; 61:571-6.
- 14- Paller MK. Hypertension in pregnancy. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:314-21.
- 15- Misiani R, Marchesi D, Tiraboschi G, Gualandris L, Pagni R, Goglio A et al. Urinary albumin excretion in normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Nephron* 1991; 59:416-22.
- 16- Douma CE, Van der Post JAM, Van Acker BAC, Boer K, Koopman MG. Circadian variation of urinary albumin excretion in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102:107-10.

- 17- Bar J, Hod M, Erman A, Friedman S, Ovadia Y. Microalbuminuria: prognostic and therapeutic implications in diabetic and hypertensive pregnancy. *Diabet Med* 1995; 12:649-56.
- 18- Higby K, Suiter CR, Phelps JY, Siler-Khodr T, Langer O. Normal values of urinary albumin and total protein excretion during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:984-9.
- 19- Bar J, Hod M, Erman A, Friedman S, Gelerenter I, Kaplan B et al. Microalbuminuria as an early predictor of hypertensive complications in pregnant women at high risk. *Am J Kidney Dis* 1996; 28:220-5.
- 20- Seshadri L, Venkataraman I. Hypertension in pregnancy: outcomes, proteinuric vs. nonproteinuric. *J Reprod Med* 1997; 42:88-90.
- 21- Sibai BM, Garland D, Anderson GD. Pregnancy outcome of intensive therapy in severe hypertension in first trimester. *Obstet Gynecol* 1986; 67:517-22.
- 22- Quaas L, Wilhelm CH, Klosa W, Hillemanns HG, Thaiss F. Urinary protein patterns and EPH-gestosis. *Clin Nephrol* 1987; 27:107-10.
- 23- Alvarez AS. Perfil electroforético de la proteinuria en el ambarazo normal y en la hipertensión gestacional. *Ginecol Obstet Méx* 1995; 63:147-51.
- 24- Moodley J, Malleck N, Ramjee G, Randeree I. Clinical significance of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of urinary proteins in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1997; 16:11-7.
- 25- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.

-
- 26- Wray W, Bouliskas T, Wray VP, Hancock R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981; 118:197-203.
 - 27- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH et al. Epi-Info, version 6.04b: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention, 1996.
 - 28- Sibai BM. Chronic hypertension in pregnancy. *Clin Perinatol* 1991; 18:833-44.
 - 29- Brown MA, Buddle ML. The importance of nonproteinuric hypertension in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 1995; 14:57-65.
 - 30- Sibai BM. Prevention of preeclampsia: a big disappointment. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1275-8.
 - 31- Moodley J, Mphatsoe M, Gouws E. Pregnancy outcome in primigravidae with late onset hypertensive disease. *East Afr Med J* 1999; 76: 490-4.
 - 32- Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Hypertension in pregnancy. In: Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD, editors. *Williams obstetrics*. 21st ed. New York: McGraw-Hill, 2000. p.567-618.
 - 33- Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S, MacPherson C, Hauth J, Lindheimer MD et al. Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:66-71.

-
- 34- Schiff E, Friedman SA, Kao L, Sibai BM. The importance of urinary protein excretion during conservative management of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:1313-6.
 - 35- Hall DR, Odendaal HJ, Steyn DW, Grove D. Urinary protein excretion and expectant management of early onset, severe pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77:1-6.
 - 36- Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai BM, Curet LB et al. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. *Obstet Gynecol* 2000; 95:24-8.
 - 37- Newman MG, Robichaux AG, Stedman CM, Jaekle RK, Fontenot MT, Dotson T et al. Perinatal outcomes in preeclampsia that is complicated by massive proteinuria. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:264-8.
 - 38- Shiba KS, Kanamori K, Cho H, Furuhashi N, Harada T, Shiba A et al. Re-evaluation of normal human urinary proteins fractionated by one-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1988; 172:77-84.
 - 39- Parviainen S, Soiva K, Ehrnrooth CA. Electrophoretic study of proteinuria in toxemia of late pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 1951; 3:282-7.
 - 40- Conrad KP, Lindheimer MD. Renal and cardiovascular alterations. In: Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham FG, editors. *Hypertensive disorders in pregnancy*. Stamford: Appleton and Lange, 1999. p. 263-326.

- 41- Quaas L, Wilhelm CH, Wego J, Boesken WH, Hillemanns HG, Kaltenbach FJ. Selectivity of glomerular proteinuria: a clinical parameters in patients with EPH-gestosis. *Excerpta Med* 1985; 657:385.
- 42- Raidt H, Lison AE, Dame WR, Baumgart P, Beller FK. Glomerular proteinuria in pregnancy-induced hypertension. *Wien Klin Wochenschr* 1984; 96:761-7.
- 43- Winkler U, Lison AE, Seitzer B, Niedner W. Urinary protein patterns for early detection of preeclampsia. *Contrib Nephrol* 1988; 68:227-9.
- 44- MacLean PR, Paterson WG, Smart GE, Petrie JJ, Robson JS, Thomson D. Proteinuria in toxemia and abruptio placentae. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1972; 79:321-6.
- 45- Simanowitz MD, MacGregor WG, Hobbs JR. Proteinuria in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1973; 80:103-8.
- 46- Kelly AM, McEwan HP. Proteinuria in pre-eclamptic toxemia of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1973; 80:520-4.
- 47- Simanowitz MD, MacGregor WG. A critical evaluation of renal protein selectivity in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1974; 81:196-200.
- 48- Robson JS. Proteinuria and the renal lesion in preeclampsia and abruptio placentae. In: Lindheimer MD, Katz AI, Zuspan FP. *Hypertension in pregnancy*. New York; John Wiley & Sons, 1976. p.61-73.

- 49- Pedersen EB, Rasmussen AB, Johannesen P. Urinary excretion of albumin, beta-2-microglobulin and light chains in pre-eclampsia, essential hypertension in pregnancy and normotensive pregnant and non-pregnant control subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 41:777-84.
- 50- Beetham R, Dawnay A, Menabawy M, Silver A. Urinary excretion of albumin and retinol-binding protein during normal pregnancy. *J Clin Pathol* 1988; 41:1089-92.
- 51- Cheung CK, Lao T, Swaminathan R. Urinary excretion of some proteins and enzymes during normal pregnancy. *Clin Chem* 1989; 35:1978-80.
- 52- Conrad KP. Renal changes in pregnancy. *Urol Ann* 1992; 6:313-40.
- 53- Lindheimer MD, Katz AI. The normal and diseased kidney in pregnancy. In: Schrier RW, Gottshalk CW editors. *Diseases of the kidney*, 6st ed. Boston: Little Brown, 1997. p.2063-97.
- 54- Weise M, Prüfer D, Neubüser D. β_2 - microglobulin and other proteins in serum and urine during preeclampsia. *Klin Wochenschr* 1978; 56:333-6.
- 55- Krieger MS, Moodley J, Norman RJ, Jialal I. Reversible tubular lesion in pregnancy-induced hypertension detected by urinary β_2 -microglobulin. *Obstet Gynecol* 1984; 63:533-6.
- 56- McEwan HP. Investigation of proteinuria in pregnancy by immuno-electrophoresis. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1968; 75:289-94.
- 57- Kaltenbach FJ, Wilhelm C. Selectivity of glomerular proteinuria and liver function in gestosis. *Zentralbl Gynakol* 1994; 116:340-3.

- 58- Beaufrils M, Uzan S, DonSimoni R, Brault D, Colau JC. Metabolism of uric acid in normal and pathologic pregnancy. *Contrib Nephrol* 1981; 25:132-6.
- 59- Zatz R. Proteinúria. In: Rocha e Silva M ed. *Clínica fisiopatológica renal*. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. p.41-55.

Anexo 1 – Planilhas dos pesos moleculares das proteínas**Gel 7**

Lane 5		Lane 6		Lane 7		Lane 8		Lane 9	
mol.w.	amount	mol.w.	amount	mol.w.	amount	mol.w.	amount	mol.w.	amount
212	17.5								
158	.596								
119	1.25	119	1.97	119	2.92				
104.47	3.03								
97.20	6.07								
88.40	1.06	80.70	2.33	80.70	3.42				
66.40	3.78	65.320	20.4	65.320	45.4	65.320	5.16	65.320	3.55
						62.080	1.23		
55.60	10	56.320	11.2	56.320	16.1	56.320	3.78	56.320	2.29
42.70	4.16								
36.50	12.4								
32.833	1.09	36.133	.871						
26.60	24.4								
20	2.55								
18.518	6.66	18.518	14.9	18.518	2.40	18.518	9.87	18.518	2.80
18.062	1.74								
PADRÃO		HG		HAC		HAC		HAC	

Gel 17

Amostra 2		Amostra 3		Padrão		Amostra 5		Amostra 6	
Peso M.	%	Peso M.	%	Peso M.	%	Peso M.	%	Peso M.	%
				212	19,1	214,7	2,56		
				158	0,189	190,4	0,59	190,4	0,279
155,21	0,261					155,21	0,597	155,21	1,3
				119	0,269	144,07	0,915	144,07	1,15
				97,2	7,6	106,28	0,418	96,173	0,14
81,8	0,98	81,8	0,294			81,8	9,54	81,8	4,7
67,427	37,7	67,427	24,5	66,4	7,45	66,4	37	67,427	40,6
61,818	10,8	61,818	0,912					61,818	0,726
56,255	2,63	56,255	1,18			56,255	24,5	56,255	7,58
				55,6	11,2			53,255	0,834
						51,144	2,17	51,144	0,359
48,798	1,49					45,045	0,806		
		42,119	0,749	42,7	19,9	42,119	0,179	42,119	1,33
37,469	3,29	37,469	2,91	36,5	18,3	37,469	7,73	37,469	5,53
								33,879	0,725
								29,803	0,672
26,6	27,3	26,6	34,7	26,6	14,7	26,6	13	26,6	31,5
PE		PE		PADRÃO		HAC + PE		HAC + PE	

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – FMB/UNESP

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 13.618-970 – Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.com.br
e-mail Presidência: mjbvianna@uol.com.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de novembro de 2.001

Of. 396/2001-CEP
MJBV/asc

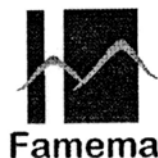
Prezado Senhor,

De ordem da Senhora Presidente deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa intitulado "Significado clínico do tipo de proteína urinária de pré-eclâmpsia", de autoria de José Cicero Guilhen, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05/11/2001

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. José Carlos Peraçoli
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina

Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – FAMEMA**FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA**
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

Marília, 19 de setembro de 2001.

Ilmo Sr.

Dr. José Cicero Guilhen

Marília/SP.

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, analisou em Reunião de 17/09/2001 o protocolo de estudo nº 298/01, intitulado: "A Eletroforese de Proteínas Urinárias nos Diferentes Tipos de Hipertensão Arterial na Gestação", considerou **APROVADO**, de acordo com as Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente.



Prof. Dr. Rubens Augusto Brazil Silvado
Presidente do Comitê de  tica em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos