

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE E 5'-
NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES
NORMAIS E DE ALTO RISCO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Claudio Alberto Martins Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE E 5'-
NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES
NORMAIS E DE ALTO RISCO**

por

Claudio Alberto Martins Leal

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof^o. Dr^o. José Edson Paz da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de
mestrado

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE E 5'-
NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES
NORMAIS E DE ALTO RISCO**

elaborada por

Cláudio Alberto Martins Leal

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

José Edson Paz da Silva, Dr^o (UFSM).
(Presidente/Orientador)

Cleci Menezes Moreira, Dr^a (UNIPAMPA)

Sandra Trevisan Beck, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 27 de novembro de 2006.

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais hora realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu”.

(Luiz Antonio Veríssimo)

Dedico esta dissertação a meus pais, Nomitor e Cleri, a minha esposa Daniela e nossa filha Julia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa, Daniela, pelo apoio e pela paciência nos momentos em que tive que me dedicar a este trabalho.

Agradeço a meus pais, Nomitor e Cleri, por torcerem sempre por mim e me tranquilizarem nos momentos de ansiedade.

Agradeço a meu orientador professor Dr. José Edson por todo auxílio em relação à conclusão deste trabalho.

Agradeço ao doutor Costa Neto em relação à busca dos pacientes do setor de pré-natal.

Agradeço à professora Maria Rosa pela co-orientação e auxílio prestado em relação ao desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço a força dada pelos colegas de mestrado, com os quais convivi por algum tempo.

Agradeço a Paula, Lara e Karine pelo auxílio dado na realização da parte prática deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Hemostasia.....	2
Nucleotídeos extracelulares e seu metabolismo.....	5
Ectonucleotídeses.....	5
Complicações durante a gravidez.....	13
OBJETIVOS.....	16
MATERIAIS E METODOLOGIA.....	17
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÕES.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	35
APENDICE.....	43
ANEXO.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Níveis de glicose em mg/dL entre os grupos estudados	21
TABELA 2 – Valores de TP e TTPa entre os grupos estudados	23
TABELA 3 – Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase plaquetárias em nmol Pi/min/mg de proteína dos grupos estudados.....	25

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Representação de hemostasia primária em um vaso sanguíneo lesado.....3
- FIGURA 2** – Topografia e propriedades catalíticas dos membros da família E-NTPDase.....6
- FIGURA 3** - Representação de uma célula plaquetária.....8
- FIGURA 4** – “Box-whisker-plots” da atividade da NTPDase em plaquetas dos grupos controle (NP), grávidas normais (P), grávidas hipertensas (HP) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). O ATP foi usado como substrato. Os dados representam a média \pm E.P.M de 68 indivíduos.....26
- FIGURA 5** – “Box-whisker-plots” da atividade da NTPDase em plaquetas dos grupos controle (NP), grávidas normais (P), grávidas hipertensas (HP) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). O ADP foi usado como substrato. Os dados representam a média \pm E.P.M de 68 indivíduos.....27
- FIGURA 6** – “Box-whisker-plots” da atividade da 5'-nucleotidase em plaquetas dos grupos controle (NP), grávidas normais (P), grávidas hipertensas (HP) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). O AMP foi usado como substrato. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 68 indivíduos.....28

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Valores da glicose entre os grupos NP, P, HP e GDP.....21

GRÁFICO 2 - Valores TP entre os grupos NP, P, HP e GDP
.....24

GRÁFICO 3 – Valores do TTP entre os grupos NP, P, HP e GDP
.....24

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE E 5'- NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES NORMAIS E DE ALTO RISCO

AUTOR: CLAUDIO ALBERTO MARTINS LEAL

ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 27 de março de 2006.

Hemostasia é um processo complexo que envolve o equilíbrio entre a coagulação e o sistema fibrinolítico. Além disso, a expressão espacial e temporal da NTPDase na vasculatura parece controlar a ativação plaquetária, tamanho do trombo e estabilidade, por regular a atividade fosfolitolítica e a conseqüente sinalização através de receptores P_2 . Este trabalho teve por objetivo estudar a atividade das ectonucleotidases na superfície plaquetária de mulheres grávidas normais e mulheres grávidas com complicações (alto risco). A atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase foi analisada em plaquetas de quatro grupos de pacientes compostos de mulheres distribuídas da seguinte maneira: não grávidas (NP), grávidas sem complicações (P), grávidas com hipertensão (HP) (preeclampsia) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). A atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase encontrou-se aumentada nos grupos P, HP e GDP quando comparados com o grupo controle (NP) com um

valor de $p < 0.01$. A atividade das ectonucleotidases em plaquetas dos grupos P, HP e GDP encontraram-se aumentadas, mostrando que a gravidez sem e com complicações aumenta a hidrólise de ATP, ADP e AMP. Este fato é muito importante, pois reforça o papel tromboregulatório destas enzimas em condições fisiológicas e patológicas.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

NTPDase and 5'- nucleotidase activity of enzymes in platelets from normal and high-risk pregnancy

(ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE E 5'-NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES NORMAIS E DE ALTO RISCO)

AUTOR: CLAUDIO ALBERTO MARTINS LEAL

ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 27 de novembro de 2006.

Hemostasis is a complex process that involves equilibrium between the coagulation and fibrinolytic systems. Furthermore, the spatial and temporal expression of NTPDases in the vasculature appears to control platelet activation, thrombus size and stability, by regulating phosphohydrolytic activity and consequent P2 receptor signaling. Here we show the activity of ectonucleotidases on the platelet surface of normal pregnant women and pregnant women with complications. The activities of the enzymes, NTPDase and 5'-nucleotidase, were analyzed in the platelets of four patient groups composed of women divided into the following way: nonpregnant (NP), pregnant without complications (P), pregnant with hypertension (HP) (preeclampsia) and pregnant with gestational diabetes mellitus (GDP). Increased NTPDase and 5'-nucleotidase activities were observed in

the groups of P, HP and GDP when compared to control ($p < 0.01$). Ectonucleotidase activity in platelets from group P, HP and GDP were enhanced, showing that pregnancy with and without complications enhanced ATP, ADP and AMP hydrolysis. This fact is very important to corroborate with the thromboregulatory role of this enzyme in physiological and pathological conditions.

INTRODUÇÃO

A hemostasia é o equilíbrio entre pró-coagulantes e anticoagulantes com o objetivo de prevenir a perda de sangue. Toda vez que um vaso sofre lesão, ou ruptura, a hemostasia é realizada por meio de vários mecanismos. Entre eles, está o espasmo vascular, formação do tampão plaquetário, formação de coágulo sanguíneo e crescimento final de tecido fibroso.

Na gravidez, devido às várias alterações fisiológicas e hormonais do organismo materno há um predomínio de pró-coagulantes em relação aos anticoagulantes. Entre as alterações estão a estase venosa, dano endotelial e o aumento de vários fatores da coagulação. Isto acontece com o objetivo de controlar rápido e efetivamente o sangramento no sítio placentário e para prevenir uma hemorragia fatal durante o parto e puerpério.

De particular importância, estão as alterações das plaquetas, as quais, estão presentes em grande quantidade na corrente sanguínea e possuem várias substâncias em seu interior e superfície, as quais, são liberadas quando as mesmas são ativadas. Dentre essas substâncias estão os nucleotídeos ATP, ADP, tromboxano A_2 , serotonina, entre outras.

Dessa forma, o presente trabalho procurou verificar a atividade de enzimas ectonucleotidasas na superfície de plaquetas em grávidas normais e grávidas com hipertensão (preeclampsia) e diabetes mellitus gestacional. As enzimas estudadas foram a NTPDase e a 5'-nucleotidase, ambas já caracterizadas e identificadas em outros tipos de patologias, mas ainda não descritas em gestantes.

REVISÃO DE LITERATURA

1. HEMOSTASIA

O processo hemostático consiste de uma série de reações bioquímicas e fisiológicas que culminam no impedimento do sangramento dos vasos sanguíneos, os quais tenham sido quimicamente ou fisicamente traumatizados. Hemostasia é realizada através da interação de três sistemas biológicos: (1) componentes da vasculatura, incluindo células endoteliais; (2) plaquetas sanguíneas; (3) proteínas plasmáticas das vias de coagulação intrínseca e extrínseca. Deficiências qualitativas ou quantitativas em alguns desses sistemas resultam em um defeito da hemostasia, coagulação ou ambos. Essas anormalidades podem levar a diátese hemorrágica leve, moderada ou severa. Há um aspecto paradoxo quanto à eficiência do processo hemostático. Em um sítio danificado do vaso sanguíneo, como uma placa aterosclerótica fissurada ou necrótica, por exemplo, estas estruturas tornam-se agonistas ativando o sistema hemostático e promovendo a coagulação sanguínea, culminando numa deposição de fibrina trombótica, a qual, pode levar a ocorrência de uma trombose arterial ou venosa. (MARCUS, 1999).

Quando a continuidade de um vaso sanguíneo é interrompida uma série de reações bioquímicas e fisiológicas são evocadas, as quais, são definidas como resposta hemostática primária, que pode ser evidenciada na figura 1. Os eventos iniciais são modulados pela exposição dos componentes dos vasos sanguíneos, como as microfibrilas, membrana basal e colágeno. Concomitantemente, ocorre a adesão plaquetária a matriz subendotelial e conseqüentemente a ativação plaquetária. Até este momento, as proteínas do sistema de coagulação não são diretamente envolvidas, embora o fator tecidual (lipoproteína presente nas membranas celulares, a qual quando ligada ao fator VII, ativa a via extrínseca da cascata de coagulação) já esteja presente (KONIGSBERG et al., 2001).

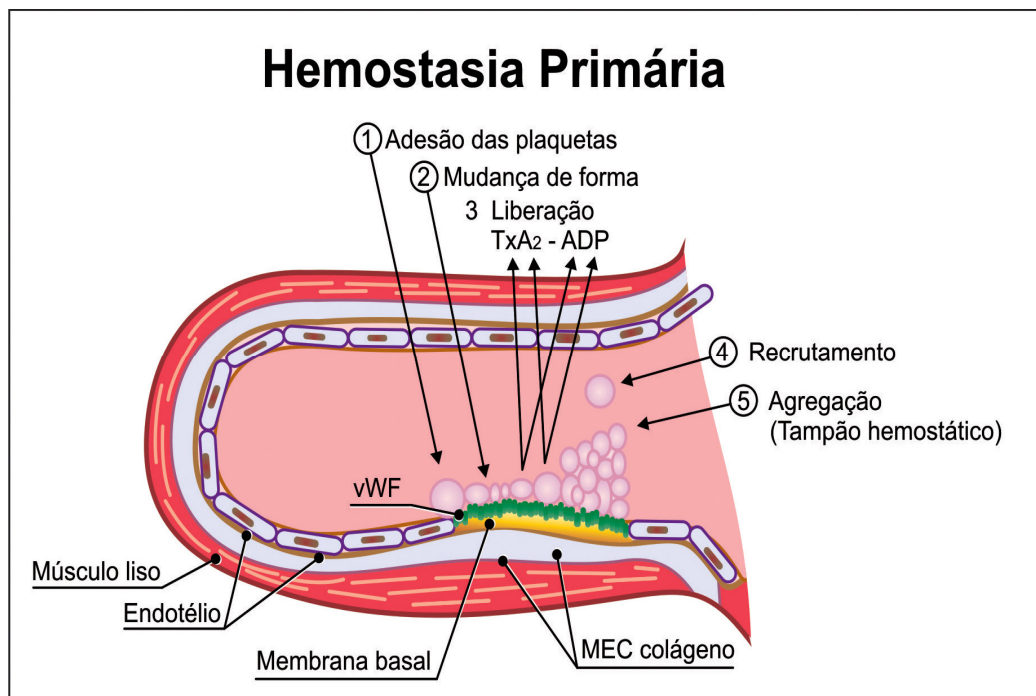


Figura 1: Representação da hemostasia primária em um vaso sanguíneo lesado

Estudos microscópicos tem demonstrado que as paredes dos vasos rapidamente se retraem e as plaquetas já são vistas imediatamente aderidas ao subendotélio. Subseqüentemente, à adesão das plaquetas ao colágeno, o fator de von Willebrand (vWF) plasmático e da matriz subendotelial rapidamente adsorve ao sítio do dano vascular e serve de mediador promovendo a adesão plaquetária através de uma interação com o complexo de receptores glicoproteína Ib-IX-V plaquetários (KUNICKI e RUGERI, 2001).

Os eventos acima são acompanhados pela ativação da glicoproteína IIb/IIIa. As plaquetas, então, mudam a forma de discos lisos para esferas espinhosas e se aderem as superfícies do vaso danificadas. Essas plaquetas geram metabolicamente a liberação de uma grande variedade de compostos ativos biologicamente, os quais, foram originalmente estocados nos compartimentos granulares do restante das plaquetas. Alguns desses compostos servem como agentes recrutadores de plaquetas das proximidades do sítio da injúria. O recrutamento plaquetário é um passo essencial na geração do “plug” hemostático e promoverá a oclusão total do vaso sanguíneo pela massa plaquetária, a qual, gradualmente, se tornará reforçada e consolidada pela deposição de fibrina (MARCUS et al., 2001).

A avaliação da importância das interações célula-célula nos vasos sanguíneos tanto quanto o metabolismo transcelular é imprescindível para o entendimento do processo de trombose e inflamação. Estes fenômenos são relacionados às plaquetas, leucócitos, eritrócitos e células endoteliais. A reatividade plaquetária é controlada pelas células endoteliais utilizando algumas substâncias como a NTPDase1, tromboxane A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e óxido nítrico. Todas estas substâncias são sintetizadas e liberadas por ativação do endotélio e plaquetas (MARCUS, 1999).

O endotélio é uma monocamada de células achatadas poligonais que se estendem continuamente sobre a superfície luminal da totalidade dos vasos, uma barreira estrategicamente localizada entre a musculatura lisa vascular e a corrente sanguínea. As funções do endotélio são numerosas e variam de acordo com o tamanho e a distribuição dos vasos sanguíneos (LUSCHER e BARTON, 1997). O endotélio participa na modulação do tônus vascular, controle da hemostasia primária, defesa contra hospedeiros e inflamação, transporte de nutrientes e outros solutos, juntamente com a ativação e inativação de vários hormônios. A disfunção endotelial é caracterizada por uma mudança das ações do endotélio, como redução da vasodilatação, um estado pró-inflamatório e propriedades pró-trombóticas (ENDEMANN e SCHIFFRIN, 2004).

Originalmente, o papel dos eucosanóides como PGI2 foi estudada nas interações célula endotelial-plaquetas. Ao mesmo tempo, a inibição da agregação plaquetária foi demonstrada via geração de PGI2 sintetizada pelas células endoteliais tratadas com aspirina utilizando endoperóxidos das plaquetas ativadas nas proximidades (SCHAFER et al., 1984). Subseqüentemente, demonstrou-se que a reatividade plaquetária poderia ser inibida por óxido nítrico liberado pelas células endoteliais de veia umbilical humana em suspensão (BROEKMAN et al., 1991). Em contrapartida, as células endoteliais que produziram óxido nítrico foram neutralizadas pela hemoglobina e ambas plaquetas e células endoteliais, as quais, foram tratadas com aspirina inibiram toda produção de PGI2. Estes resultados demonstram que as células endoteliais tratadas com aspirina, deficientes em óxido nítrico poderiam inibir a função plaquetária por metabolização do ADP liberado das plaquetas ativadas (GORDON, 1986).

2. NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES E SEU METABOLISMO

Nucleotídeos extracelulares como ATP, ADP, UTP, UDP e, também, polifosfatos de diadenosina como as moléculas Ap4A a Ap5A (tetrafosfato de diadenosina a pentafofosfato de diadenosina) (MIRAS-PORTUGAL et al, 1998) atuam como moléculas sinalizadoras e são inativadas por hidrólise via ectonucleotidasas. Estas enzimas encontram-se localizadas na superfície celular ou solubilizadas no meio intersticial e, também, dentro dos fluídos corporais. Os nucleosídeos 5'- trifosfatos e difosfatos são hidrolizados por várias enzimas, entre elas, as pertencentes a família E-NTPDase (ectonucleosídeos trifosfatos difosfohidrolase), E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase) e fosfatase alcalina. Os nucleosídeos 5'-monofosfatos estão sujeitos a hidrólise por ecto-5'-nucleotidase mas, também, por fosfatase alcalina e por alguns membros da família E-NPP. E, ainda, os polifosfatos de diadenosina os quais são hidrolisados por membros da família E-NPP (ZIMMERMANN, 2001).

Os nucleotídeos são hidrolizados por uma cascata de hidrólise extracelular a qual resultam na formação de seu respectivo nucleosídeo e fosfato livre. Mais tarde estes nucleosídeos podem ser reciclados pelas células ao redor e novamente usados para resíntese de nucleotídeos. A atividade catalítica máxima das nucleotidasas é adaptada ao ambiente extracelular e requer a presença de cátions divalentes como cálcio ou magnésio e um pH alcalino (ZIMMERMANN, 2000).

3. ECTONUCLEOTIDASES

3.1 Família E-NTPDase

Em mamíferos já foram clonados e caracterizados oito membros desta família de enzimas, as quais, hidrolisam nucleosídeos 5'-trifosfatos e difosfatos com uma grande preferência para tipos específicos de nucleotídeos, conforme figura 2. Nem todas as enzimas da família E-NTPDase são extracelulares (ectoenzimas) pois algumas estão presentes no meio intracelular, no lúmen de organelas como o complexo de golgi e o retículo endoplasmático. Estas enzimas não existem somente nos vertebrados, estão presentes também, em invertebrados, plantas,

fungos e protozoários. Todos os membros da família E-NTPDase possuem cinco domínios de seqüência altamente conservada, chamadas de “regiões conservadas da apirase” (ACRs) que são de grande relevância para a atividade catalítica (HANDA e GUIDOTTI, 1996).

Família E-NTPDase

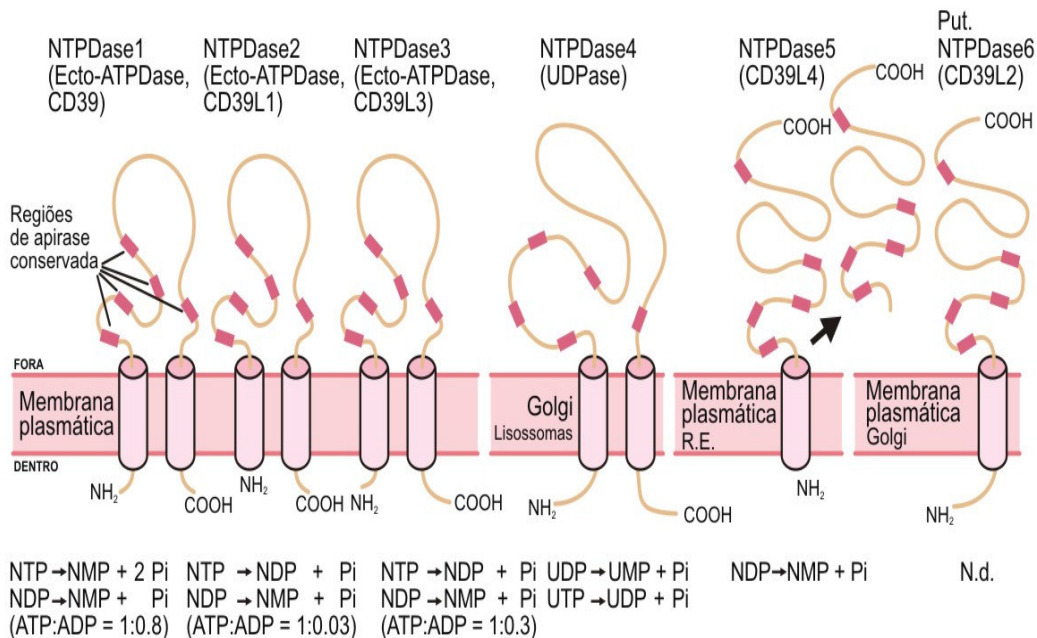


Figura 2. Topografia e propriedades catalíticas dos membros da família E-NTPDase (ZIMMERMANN, 2000).

3.1.1 NTPDase 1, NTPDase 2 e NTPDase 3

As três enzimas são expressas na superfície celular e elas expressam uma grande especificidade de substrato. Elas hidrolisam nucleotídeos de purina tão bem quanto de pirimidina, e a massa molecular destas enzimas glicosiladas está na ordem de 70 a 80 kDa (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase1 (EC 3.6.1.5) é uma enzima ligada à membrana plasmática que desempenha um importante papel na hidrólise de nucleosídeos extracelulares difosfatos e trifosfatos. Estes nucleotídeos estão presentes na circulação e são liberados de células ativadas ou tecidos danificados sendo envolvidos na agregação plaquetária, contratilidade cardíaca, regulação do tônus vascular e neurotransmissão. Esta enzima inibe a agregação plaquetária pela hidrólise do

ADP a AMP agindo como um fator tromboregulatório. Desta maneira, ela poderia modular os efeitos do ATP e ADP dentro dos vasos e nos sítios de inflamação (KOZIAK et al., 1999).

A NTPDase 1 (CD39, ecto-apirase, ecto-difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP a uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,5 a 1:0,9 (KACSMAREK et al., 1996; WANG e GUIDOTTI, 1996; HEINE et al., 1999). Esta atividade enzimática foi observada em enzimas purificadas de tecidos como placenta humana (CHRISTOFORIDIS et al., 1995), aorta bovina (PICHER et al., 1996) e pâncreas suíno (LEBEL et al., 1980). A NTPDase1 é uma ectonucleotidase da família das E-NTPDase sendo enzimas expressas na superfície celular. O valor do Km para o ATP da enzima purificada está na faixa micromolar. A massa molecular das enzimas glicosiladas está na ordem de 70-80 Kda, sendo encontrada na superfície luminal de células endoteliais e musculares lisas e desempenhando um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese. A NTPDase1 endotelial converte ADP próagregatório em adenosina antiagregatório. Em conformidade, a NTPDase1 solúvel recombinante e ativo cataliticamente bloqueia a agregação plaquetária in vitro induzida pelo ADP, e inibe a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (ZIMMERMANN, 2001).

NTPDase-2 (CD39L1, ecto-ATPase) hidrolisa mais ATP do que ADP com uma razão molecular de ATP:ADP de 1:0,03 ou menos (MATEO et al., 1999). A NTPDase-3 é um intermediário funcional que possui uma taxa molecular de ATP:ADP de 1:0,23 (SMITH e KIRLEY, 1998).

3.1.2 NTPDase 4

Esta nucleotidase existe de duas formas, UDPase localizada no complexo de golgi (WANG e GUIDOTTI, 1998) e a LALP70 uma forma lisossomal que está localizada nos vacúolos autofágicos (BIEDERBICK et al., 1999). A NTPDase4 possui função de UDPase, portanto, hidrolisa UDP e, também, outros nucleosídeos di e trifosfatados, mas não tem capacidade de hidrolisar ATP e ADP (ZIMMERMANN, 2000).

3.1.3 NTPDase 5 e NTPDase 6

A NTPDase 5 (CD39L4) tem uma alta preferência para nucleosídeos 5'-difosfatos, especialmente UDP e GDP, esta enzima foi localizada no retículo endoplasmático (ER-UDPase) (TROMBETTA e HELENIUS, 1999). Porém, a expressão de NTPDase-5 em células COS-7 resultou numa forma enzimática solúvel e secretada, a qual, esta localizada nos macrófagos e pode afetar a hemostasia e agregação plaquetária (MULERO et al, 1999). A NTPDase6 (CD39L2) que ainda não se encontra funcionalmente caracterizada está situada no aparato de Golgi e em pequena extensão na membrana plasmática (BRAUN et al, 2000).

3.1.4 NTPDase7 e NTPDase8

Estas duas enzimas foram recentemente caracterizadas em mamíferos. A NTPDase7 (LALP1) foi clonada e caracterizada em humanos e ratos e possui localização intracelular (endo-apirase), com preferência pelos substratos UTP, GTP e CTP (SHI et al., 2001). E, também, a NTPDase8, a qual foi clonada e caracterizada em ratos, e regula os níveis de nucleotídeos extracelulares de maneira distinta de outras ectonucleotidases (BIGONNESSE et al, 2004).

3.2. FAMÍLIA E-NPP

Apresentam ampla distribuição tecidual e revelam atividade fosfodiesterase e pirofosfatase. São capazes de hidrolizar 3',5'- cAMP a AMP, ATP a AMP e PPi, ADP a AMP e Pi, ou NAD⁺ a AMP e nicotinamida mononucleotídeo. Esta família enzimática pode hidrolisar tanto nucleotídeos purínicos quanto pirimidínicos e existem em três formas, NPP-1, NPP-2 e NPP3. Os membros da família E-NPP possuem peso molecular de 110 a 125 KDa (ZIMMERMANN, 2000). A atividade destas enzimas é dependente de cátions divalentes, pH alcalino e possui valores de K_m entre 10 e 50 μ M, o que é similar à família E-NTPDase (ZIMMERMANN, 2001).

3.3. FOSFATASE ALCALINA

São ecto-fosfomonoesterases não específicas, as quais hidrolisam uma variedade de compostos inorgânicos incluindo nucleosídeos 5'-tri-, -di-, e monofosfatos. Em contraste com os membros das famílias de enzimas E-NTPDase e E-NPP, o valor do Km das fosfatases alcalinas para uma variedade de substratos está na faixa milimolar baixa. E, também, são similares as ecto-5'-nucleotidases, pois são ancoradas na membrana plasmática via GPI (glicosil fosfatidil inositol) e possuem formas solúveis no soro (ZIMMERMANN, 2001).

3.4. ECTO-5'-NUCLEOTIDASE

Posteriormente, à hidrólise do ATP e ADP em adenosina monofosfato (AMP) pela NTPDase1 tem-se a ação da ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73), a qual, hidroliza o AMP em adenosina que é um modulador do tônus vascular e um inibidor da agregação plaquetária. Ambos NTPDase1 e ecto-5'- nucleotidase estão localizados na membrana plaquetária e desempenham um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese (MARCUS et al., 2003; KAWASHIMA et al., 2000). A ecto-5'- nucleotidase participa do metabolismo de nucleotídeos de adenina na superfície das células endoteliais (ZIMMERMANN, 1992; ZIMMERMANN, 1996). Amplamente distribuído em bactérias, células de plantas e tecidos de vertebrados a ecto-5'-NT é classificada em 4 grupos de acordo com a localização celular e propriedades bioquímicas: uma ecto-5'-NT localizada na membrana, uma forma solúvel e duas formas citoplasmáticas. A ecto-5'-NT da membrana plasmática é distribuída em uma variedade de células incluindo hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos e células gliais (RESTA, 1973).

Esta enzima está, também, ancorada na membrana plasmática via GPI, onde é conhecida como proteína de superfície do linfócito (CD73), sendo, então, um marcador de superfície dos linfócitos T e B. A enzima catalisa a fase final da degradação de nucleotídeos extracelulares, ou seja, a hidrólise do nucleosídeo 5'-monofosfato ao seu respectivo nucleosídeo e fosfato. É a principal enzima responsável pela formação de adenosina extracelular e a subsequente ativação de

receptores de adenosina (P1). Ocorre na forma de dímero e seu peso molecular está na faixa de 62 a 74 Kda (ZIMMERMANN e BRAUN, 1999).

Receptores de adenosina são expressos numa variedade de tecidos e tipos celulares, e servem como mediadores importantes em respostas fisiológicas, como débito cardíaca e contratilidade, neurotransmissão, função renal, vasodilatação da musculatura lisa, agregação plaquetária, geração de ânion superóxido, lipólise e ativação de mastócitos (ROSI et al., 2002). A atividade das enzimas NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase tem sido investigada em várias patologias como diabetes, câncer de mama e infecção pelo HIV (LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; LEAL et al., 2005) entre outras, mas, ainda, não há relatos da influência destas enzimas na gravidez.

4.0 PLAQUETAS

Plaquetas representam uma importante fonte dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP que atuam na agregação plaquetária. Esses nucleotídeos parecem regular a homeostase através da ativação e cooperação de 3 receptores purinérgicos plaquetários do tipo P-2, chamados P2Y, P2X e ainda P2T (DI VIRGILIO et al., 2001). A concentração destes nucleotídeos depende da quantidade liberada, do efeito da diluição no espaço extracelular e da capacidade de enzimas catabólicas como ectonucleotidases. Depois de liberados estes nucleotídeos, interagem com os receptores P-2 purinérgicos e imediatamente são degradados até adenosina por um conjunto de nucleotidases. Estudos biológicos comprovam que ADP, AMP e adenosina no metabolismo extracelular têm controles distintos e funções opostas (GORDON, 1986).

As plaquetas são células incompletas, liberadas do citoplasma dos megacariócitos medulares que passam à circulação, conforme figura 3. Nelas se reconhecem 3 zonas: (1) zona externa ou periférica que condiciona a propriedade de adesão. Na membrana plasmática estão localizados glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. (2) Uma zona sol-gel ou citossol com proteínas actinomiosina e tubulina, formando microtúbulos e microfilamentos. (3) Uma zona de organelas contendo corpúsculos densos (Ca^{++} , ADP, ATP, Serotonina, Pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores

da coagulação e proteínas de adesão) e um sistema de membrana, local de síntese de prostaglandinas e tromboxane A_2 (LORENZI, 2003).

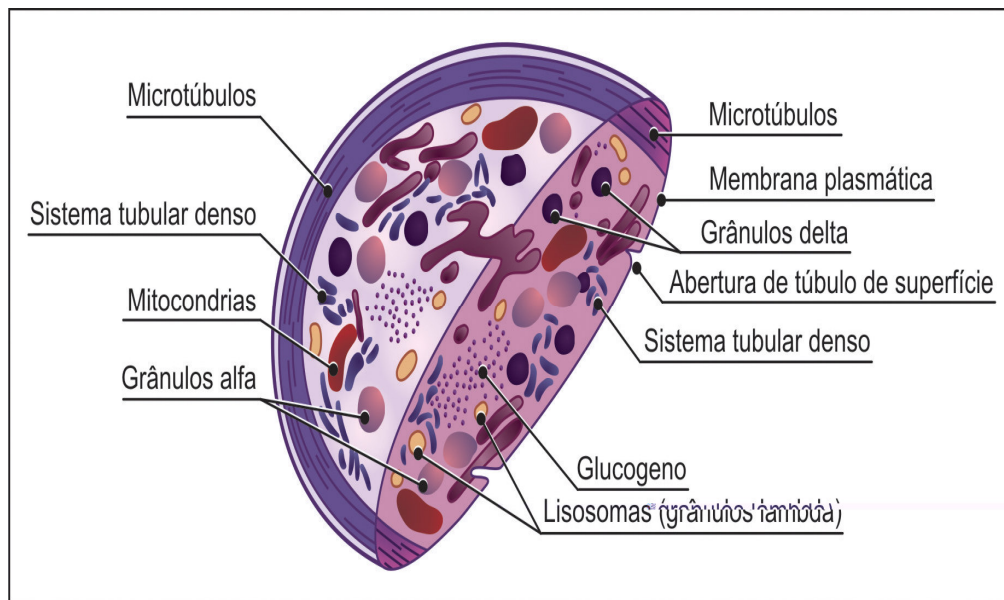


Figura 3: Representação de uma célula plaquetária.

As plaquetas circulam no sangue como discos lisos. ADP, trombina e colágeno como agonistas ativam plaquetas e mudam sua forma de discos lisos a esferas espinhosas. A ativação das plaquetas promove a agregação plaquetária. O ADP em baixas concentrações (0,1 a 0,5 μM) produz agregação reversível e em altas concentrações (2,0 a 5,0 μM) produz agregação secundária irreversível e libera o conteúdo de grânulos densos estocados nas plaquetas dentro da circulação sanguínea. O ATP é, também, liberado das plaquetas, eritrócitos rompidos e outras células dentro da circulação e é um indutor de choque. Então, a presença de mecanismo enzimático que hidrolisa ADP na circulação é muito importante para limitar a agregação plaquetária e conseqüentemente a formação de trombo (PILLA et al., 1996). Adicionalmente, estudos levam a proposta de que a principal molécula responsável pela inibição plaquetária nos vasos sanguíneos é uma ecto-nucleotidase conhecida como CD39, uma ATP-difosfohidrolase classificada como NTPDase, a qual, metaboliza ATP e ADP a AMP (KACZMAREK et al., 1996).

5.0 MUDANÇAS NA HEMOSTASIA DURANTE A GRAVIDEZ NORMAL

A gravidez normal está associada com extensas mudanças na hemostasia, a tal ponto que, o efeito dos pró-coagulantes tornam-se dominantes. Estas mudanças na gravidez são parte de um complexo processo de adaptação fisiológica o qual assegura o rápido e efetivo controle do sangramento do sítio placentário durante a separação placentária. O processo ocorre rapidamente, e o fluxo sanguíneo materno de aproximadamente 700 mL/min no sítio placentário é diminuído pelos efeitos combinados da compressão extravascular miometrial e oclusão trombótica dos vasos maternos danificados. A ativação do sistema de coagulação na circulação uteroplacentária, por outro lado, pode predispor a circulação local a um depósito de fibrina anormal. E, uma trombose uteroplacentária excessiva é uma característica de muitas complicações clínicas importantes da gravidez humana e tem sido mais bem descrita em estados de pré-eclampsia. Na circulação sistêmica, este aumento da coagulação é manifestado clinicamente como tromboembolismo venoso (VTE) (O'RIORDAN e HIGGINS, 2003).

Estimativas da incidência de VTE variam entre 1 em 1000 e 1 em 2000 partos, e a incidência é maior durante o terceiro trimestre de gravidez e puerpério (PABINGER e GRAFENHOFER, 2003). A gravidez é normalmente associada com mudanças significativas em todos os aspectos da tríade clássica de Virchow: estase venosa, dano endotelial e aumento da coagulação, a uma extensão que o efeito dos prócoagulantes tornam-se dominantes (UCHIKOVA e LEDJEV, 2005). A gravidez é um fator de risco independente para a trombose e o tromboembolismo venoso, o qual, pode levar a causa obstétrica de mortalidade materna (KNIJFF, 2000).

No final da gravidez a concentração de muitos fatores de coagulação estão aumentados até duas vezes mais do que nas mulheres não grávidas. As modificações do sistema de coagulação resultam de mudanças hormonais e são uma parte do mecanismo de adaptação fisiológico do organismo feminino humano à gravidez. Este propósito é para o controle rápido e efetivo de sangramento no sítio placentário e para prevenir uma hemorragia fatal durante a gravidez e puerpério. A separação placentária é uma mudança aguda e severa da hemostasia (BREMME, 2003).

6.0 COMPLICAÇÕES DURANTE A GRAVIDEZ

6.1 PREECLAMPSIA

Preeclampsia (PE) é uma desordem relacionada à gravidez caracterizada pelo aumento da pressão sanguínea e proteinúria ocorrendo no segundo ou terceiro trimestre da gravidez e é uma das principais causas da morbidade e mortalidade fetal e maternal. A causa da preeclampsia é provavelmente multifatorial. Fatores genéticos desempenham um importante papel, visto que, alguns estudos tem demonstrado uma certa predisposição familiar (MAGANN e MARTIN, 1998).

É uma síndrome que pode afetar a função renal, hepática, cerebral ou de coagulação maternal, este efeito pode ser sozinho ou em combinação. Hipertensão após a vigésima semana de gestação é essencial para o diagnóstico juntamente com uma ou mais das seguintes características: proteinúria, insuficiência renal, função prejudicada do fígado, problemas neurológicos como as convulsões, hiperreflexia, severas dores de cabeça e persistentes distúrbios visuais, distúrbios hematológicos como coagulação intravascular disseminada (CIVD) e hemólise, além de restrição ao crescimento fetal (BROWN et al., 2000).

Elevada pressão sanguínea é um diagnóstico essencial de PE e a alta pressão sanguínea previamente à gravidez, correlaciona-se com o desenvolvimento de PE (REISS et al., 1987). A doença constitui um espectro que inclui as chamadas preeclampsia “placentar” e “maternal”. Com a preeclampsia placentar, há uma placenta anormal em uma mulher normal sem qualquer doença de base. Com a PE maternal, ocorre o contrário, ou seja, uma placenta normal em uma mulher que sofre de algum problema, como uma doença cardiovascular ou diabetes. Na prática, muitas mulheres com preeclampsia tem ambos os tipos em variados graus (NESS e ROBERTS, 1996).

Em uma gravidez normal as células trofoblásticas da placenta invadem as artérias espirais maternas, causando a perda da musculatura lisa e possibilitando a expansão da capacidade vascular. Este processo, conhecido como placentação ocorre após vinte semanas de gestação. Em alguns casos de PE, as artérias espirais são fracamente remodeladas e o volume da circulação uteroplacentária é marcadamente reduzido. A teoria dos dois estágios da PE sugere que a placenta com hipóxia exporta substâncias tóxicas para a circulação materna, mais

provavelmente, resultado da disfunção endotelial materna generalizada. Recentes pesquisas indicam que as células trofoblásticas com hipóxia podem secretar um fator solúvel para o fator de crescimento endotelial (sFlt1) na circulação materna. Este fator pode ligar fatores de crescimento placentário e fatores de crescimento endotelial dos vasos, prejudicando o crescimento endotelial. Tem sido demonstrado que o sFlt1 está aumentado no plasma de mulheres com PE (MAYNARD et al., 2003). A disfunção generalizada do endotélio pode ser responsável por todos os aspectos clínicos da síndrome materna da PE (DAVISON et al., 2004).

Os fatores que provavelmente desempenham um papel importante ao prejudicar a função endotelial da célula normal em PE incluem isquemia placentar, toxicidade induzida por lipoproteínas, aumento das espécies reativas do oxigênio (ROS), efeitos antiangiogênicos e adaptações imunes prejudicadas, as quais resultam na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Embora a natureza desta doença mostre ser multifatorial, evidências acumuladas indicam que o stress oxidativo pode representar um ponto de convergência para diversos fatores que contribuem potencialmente levando a uma disfunção endotelial e, eventualmente, a manifestações clínicas de PE. A gravidez por si já leva o organismo materno a PE, devido ao aumento da atividade mitocondrial, redução potencial da limpeza antioxidante e ocorrência de eventos de reperfusão isquêmicos na placenta (WISDOM et al., 1991).

6.2 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

A gestação em mulheres diabéticas é uma condição reconhecidamente associada a uma maior frequência de anormalidades, quando comparada a gestações normais. Sabe-se que a hiperglicemia, nesse período, pode resultar em aumento da mortalidade fetal, além de uma maior frequência de complicações tais como malformações, macrossomia, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, cardiomiopatia hipertrófica e síndrome do desconforto respiratório do recém nascido. Para a gestante, o mau controle metabólico está implicado em maiores índices de abortos espontâneos, infecções, hipertensão arterial, doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG), partos pré-termo e

cesáreas. Embora ainda não estejam completamente definidos os níveis ideais de glicemia durante a gestação nas pacientes diabéticas, já está demonstrado que um bom controle metabólico está associado à redução dessas complicações (RUDGE et al., 2000).

A Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é definida como uma intolerância ao carboidrato de variada severidade primeiramente reconhecida durante a gravidez. A definição se aplica tanto para a gestante que usa insulina, como apenas com o tratamento por meio de dieta, e com persistência ou não da doença após a gestação. Não exclui a possibilidade de intolerância a glicose não reconhecida previamente ou o início concomitante com a gestação (METZGER e COUSTAN, 1998). A incidência do DMG varia amplamente, oscilando entre 1 e 14%, dependendo da população estudada e do método utilizado para rastreamento e diagnóstico. A incidência do DMG em mulheres com mais de 20 anos atendidas no sistema único de saúde (SUS) é de 7,6% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A mortalidade perinatal é quatro vezes maior entre os filhos de gestantes com DMG, e a morbidade perinatal também está aumentada, com altos índices de macrosomia, toco-traumatismo e complicações metabólicas (JACOBSON e COUSINS, 1989). O tratamento da diabetes durante a gestação visa um bom controle glicêmico. Quando ocorre falha na obtenção de bom controle glicêmico com dieta, associada ou não a exercícios físicos, está indicada a insulino-terapia (LANDON e GABBE, 1996). Não obstante a significativa redução na mortalidade perinatal observada na última década, a morbidade perinatal permanece alta entre as mulheres com DMG, ficando na faixa de 10% e 50% (LANGER, 2000).

A resistência a insulina presente na maioria dos indivíduos com diabetes tipo 2 parece ser um precursor comum de ambos diabetes e doença cardiovascular (REAVEN, 1988). É uma desordem multicelular que está associada com múltiplas alterações celulares e metabólicas. Entre os distúrbios metabólicos que comumente ocorrem em pacientes com IR estão dislipidemia aterogênica, hipertensão, intolerância a glicose e estados pró-trombóticos (GRUNDY, 1998). O estado pró-trombótico é um reconhecido componente da síndrome metabólica a qual exibe um padrão de fatores de coagulação que promove a trombose ou retarda a trombólise. As alterações mais características da coagulação são aumento dos níveis de fibrinogênio, aumento do inibidor do ativador do

plasminogênio (PAI-1) e diferentes anormalidades na função plaquetária (NOLAN e VINIK, 1996).

OBJETIVOS

1.0 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em grávidas normais e de alto risco

2.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Verificar se existe alguma relação significativa na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase da superfície plaquetária no sangue periférico de grávidas normais e de alto risco quando comparadas as mulheres não grávidas

2.2 Verificar se existe alterações no tempo de protrombina e no tempo de tromboplastina parcial ativada entre as grávidas normais e de alto risco e as mulheres não grávidas

2.3 Verificar se existe diferença significativa entre a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase da superfície plaquetária no sangue periférico de grávidas normais e de alto risco

MATERIAL E METODOLOGIA

1.0 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

- Espectrofotômetro
- Freezer a -80°C
- Centrífuga de mesa
- Banho Maria a 37°C
- Vórtex
- Vidrarias
- Homogêinizador de reativos
- Pipetas automáticas e pipetas de vidro
- Tubos a vácuo com anticoagulante citrato para coleta de sangue venoso
- Reagentes diversos todos de grau analítico e de alta pureza

2.0 AMOSTRAS

Foram provenientes de pacientes do sexo feminino e de voluntárias sadias do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Nenhuma delas tinham história de alguma desordem hemostática e de algum outro tipo de doença relevante que pudesse vir atrapalhar o desenvolvimento do trabalho. Oito mililitros de sangue com anticoagulante citrato foi obtido de cada participante e usado para preparação do plasma rico em plaquetas e para dosagens bioquímicas e hematológicas. As amostras sanguíneas das mulheres grávidas foram obtidas a partir da trigésima semana gestacional. Todos os indivíduos tiveram o termo de livre consentimento informado para poder participar do presente estudo. O comitê de ética humana do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria aprovou o projeto com o número de protocolo 23081.000982/2006-86.

As amostras foram cuidadosamente selecionadas por avaliação clínica e consistiram de 68 indivíduos do sexo feminino com idade entre 32.13 ± 6.14 anos

divididos em quatro grupos: grupo controle (NP), composto de 18 voluntárias sadias não grávidas, as quais, não apresentavam nenhuma doença e não tinham sido submetidas a alguma terapia farmacológica durante o último mês. O segundo grupo (P), consistia de 25 mulheres grávidas (gravidez simples), com pressão sanguínea diastólica ≤ 85 mmHg e sem proteinúria. O terceiro grupo (HP), consistia de 15 mulheres grávidas hipertensas, as quais, apresentavam pressão sanguínea elevada com valores $\geq 140/90$ mmHg em duas ou mais medidas e, também, proteinúria ≥ 0.3 g/24 h ou $\geq 1+$ no teste da fita.

O quarto grupo (GDP), consistia de 10 mulheres grávidas com diabetes mellitus gestacional, as quais, apresentavam no teste de glicemia de jejum um resultado ≥ 126 mg/dL, confirmado com repetição do exame. Em relação à seleção equitativa dos participantes, não houve distinção entre etnia, raça e classe social para os grupos estudados.

3.0 PREPARAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas foi preparado seguindo o método de PILLA et al., 1996. O sangue foi coletado em sistema “vacutainer” com anticoagulante citrato de sódio 0,126M e, inicialmente, centrifugado a 600 RPM por 20 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 3700 RPM por 30 minutos e depois se procedeu a 3 lavagens durante 10 minutos em alta rotação (3700 RPM) com tampão isosmolar HEPES 3.5 mM contendo 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl e 5.5 mM de glicose. As plaquetas lavadas foram ressuspensas em 300 μ L de tampão isosmolar HEPES 3.5 mM e a proteína foi ajustada a 0.3-0.5 mg/mL onde 10-15 μ g de proteína foi usada por tubo para assegurar a linearidade do ensaio enzimático.

4.0 DETERMINAÇÃO DA NTPDASE E 5'-NUCLEOTIDASE

A atividade da enzima NTPDase foi determinada pela medida da quantidade de fosfato inorgânico liberado usando-se um ensaio colorimétrico. Esta determinação foi escolhida porque tem sido explorada em nosso laboratório por

vários tipos de amostras e não requer substâncias radioativas. Outros autores já usaram os mesmos ensaios colorimétricos antes e não evidenciaram diferenças significativas quando comparados com os ensaios radioativos (KOZIAK et al., 1999).

Vinte microlitros de plasma rico em plaquetas (10-15 µg proteína) foram adicionados a mistura da reação de NTPDase ou 5'-nucleotidase e preincubados por 10 minutos a 37 °C até um volume final de 200µL. A atividade da NTPDase foi determinada pelo método de PILLA et al, 1996 em um meio de reação contendo 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 6 mM glicose, e 50 mM tampão Tris-HCL, pH 7.4. A reação foi iniciada pela adição de ATP ou ADP como substrato a uma concentração final de 1.0 mM.

Para a hidrólise de AMP, a enzima 5'-nucleotidase foi dosada como previamente descrita, exceto que 5mM CaCl₂ foi substituída por 10 mM MgCl₂ e o nucleotídeo adicionado foi 2mM AMP. As reações da NTPDase e 5'-nucleotidase foram paradas pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA) para providenciar uma concentração final de 5%. O fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP, ADP e AMP foi medido pelo método de CHAN et al, 1986 usando-se KH₂PO₄ como padrão. A leitura foi feita pelo espectrofotômetro em 630nm. Controle e amostras forão analisados em triplicatas. O controle da hidrólise não enzimática foi realizado conforme descrito para as amostras, porém sem adição de enzima. A atividade enzimática foi expressa em nmol Pi liberado/min/mg proteína.

5.0 DETERMINAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Determinações quantitativas de plaquetas foram realizadas usando o analisador hematológico Coulter-STKS (Miami, USA). Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram determinados com o aparelho de coagulação Coag-a-mate-MTX (Organon Teknica, Durham. NC, USA).

6.0 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram determinadas pelo método de Coomassie blue usando albumina sérica bovina como padrão, conforme descrito por BRADFORD, 1976. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 595 nm.

7.0 DETERMINAÇÃO DE LDH (LACTATO DESIDROGENASE)

A atividade do LDH foi determinada usando-se um método cinético, com o auxílio de um aparelho de dosagens bioquímicas semi-automatizado denominado comercialmente Labquest (Diagnostics Gold Analisa).

8.0 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE

A glicose foi determinada pelo método da glicose-oxidase utilizando-se o analisador automático Cobas Integra.

9.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste paramétrico de comparação múltipla Tukey-Kramer, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média).

10 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES

O local de realização dos exames foi no Departamento de Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas e no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde.

RESULTADOS

1.0 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os grupos NP, P e HP apresentaram níveis de glicose sanguínea normais (70-110 mg/dL), enquanto o grupo GDP apresentou níveis de glicose sanguínea elevada (≥ 126 mg/dL), conforme a tabela 1.

Tabela 1: Níveis de glicose em mg/dL dos grupos estudados

Grupos	NP	P	HP	GDP
Média	79,83 \pm 1.6	87,92 \pm 1.7	93,93 \pm 1.9	163,4 \pm 7.9*
n	18	25	15	10

* $p < 0,001$ (GDP versus NP, P e HP). Dados representam a média \pm D.P.M.

Usando-se o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer para os valores encontrados para a glicose sanguínea entre os grupos, tem-se que o grupo GDP diferiu significativamente dos grupos NP, P e HP com um valor de $p < 0,001$, o que pode ser observado no gráfico 1.

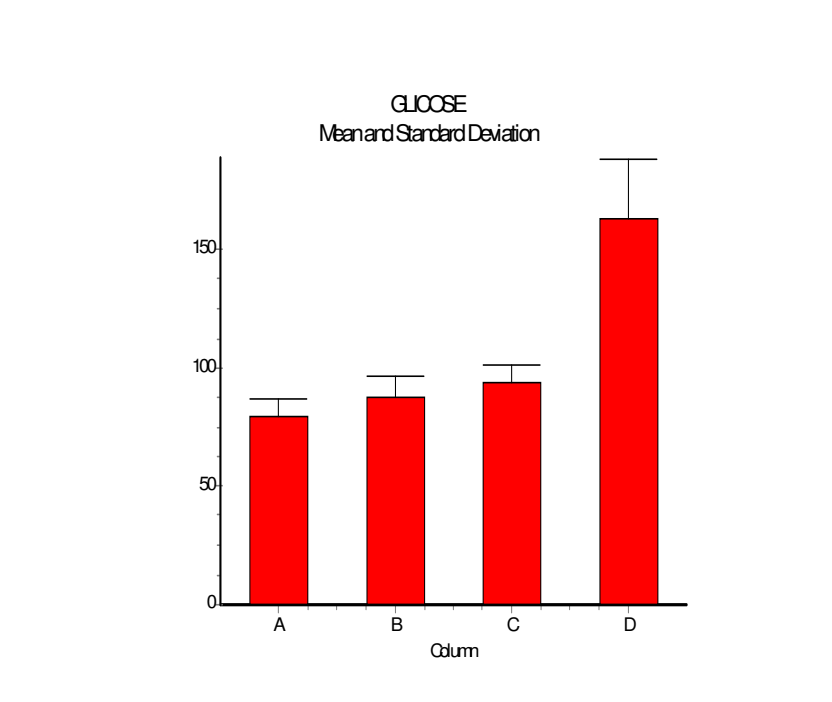


Gráfico 1: Valores da glicose entre os grupos NP (A), P (B), HP (C) e GDP (D).

(*) $p < 0,001$ (GDP versus NP, P e HP). Dados representam a média \pm D.P.M.

2.0 INTEGRIDADE CELULAR

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi usada como marcador da integridade celular. O resultado da maior parte das dosagens permaneceu dentro dos valores de referência (100-190 U/L). A medida da atividade, portanto, mostrou que a maior parte das células (aproximadamente 90%) permaneceu intacta após o procedimento de isolamento (dados não mostrados).

3.0 DETERMINAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Análises quantitativas demonstraram que a contagem de plaquetas obtidas de todas as mulheres grávidas encontraram-se dentro da faixa de normalidade

(150.000 a 400.000 plaquetas/mm³). Nossos resultados mostraram diferenças significativas nos resultados das determinações hematológicas para o Tempo de Protrombina (TP), o qual encontrou-se elevado nos grupos P, HP e GDP em relação ao grupo controle NP, enquanto que o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) encontrou-se dentro da faixa de normalidade para todos os grupos estudados, conforme pode ser observado na tabela 2 .

Tabela 2: Valores de TP e TTPa em segundos entre dos grupos estudados.

Grupos	NP	P	HP	GDP
TP	11.90 ± 0,34	17.32 ± 0.48*	17.96 ± 0.60*	18.08 ± 0.83*
TTPa	30.84 ± 0.88	31.25 ± 0.71	31.3 ± 0.64	30.61 ± 0.88
n	18	25	15	10

Os resultados são expressos como a média ± D.P.M (n=68). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via usando-se o teste de Comparação Múltipla de Tukey-Kramer.

(*) $P < 0.01$ (P, HP e GDP versus NP).

Valores de referência:

Tempo de Protrombina: 11,1-14,1 (segundos)

Tempo de Tromboplastina ativada: 30,0 -35,0 (segundos)

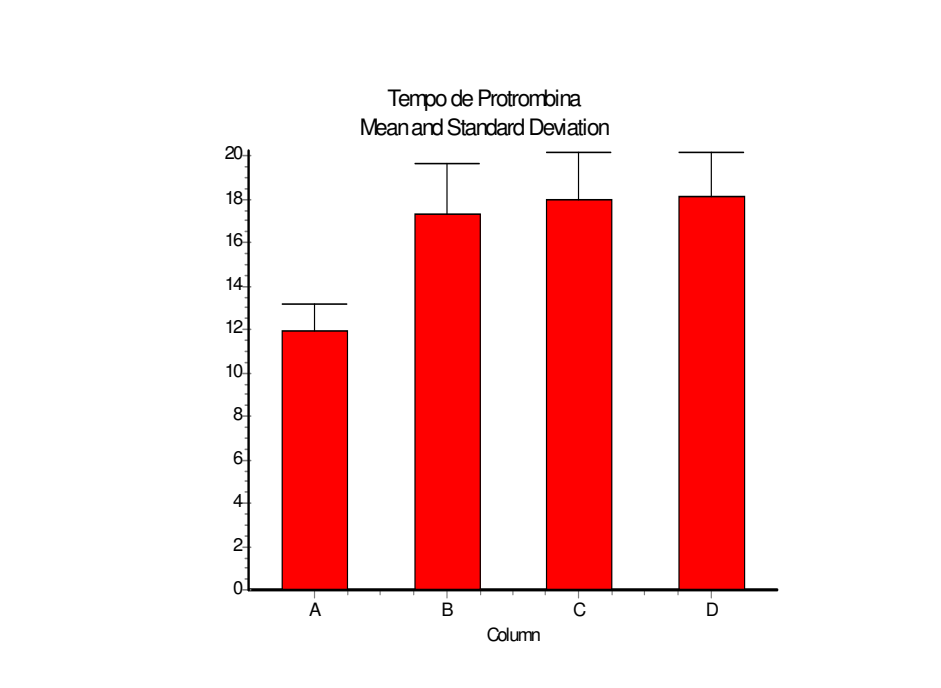


Gráfico 2 : Valores do TP entre os grupos NP (A), P (B), HP (C) e GDP (D).

* $p < 0,01$ (P, HP e GDP versus NP). Dados representam a média \pm D.P.M.

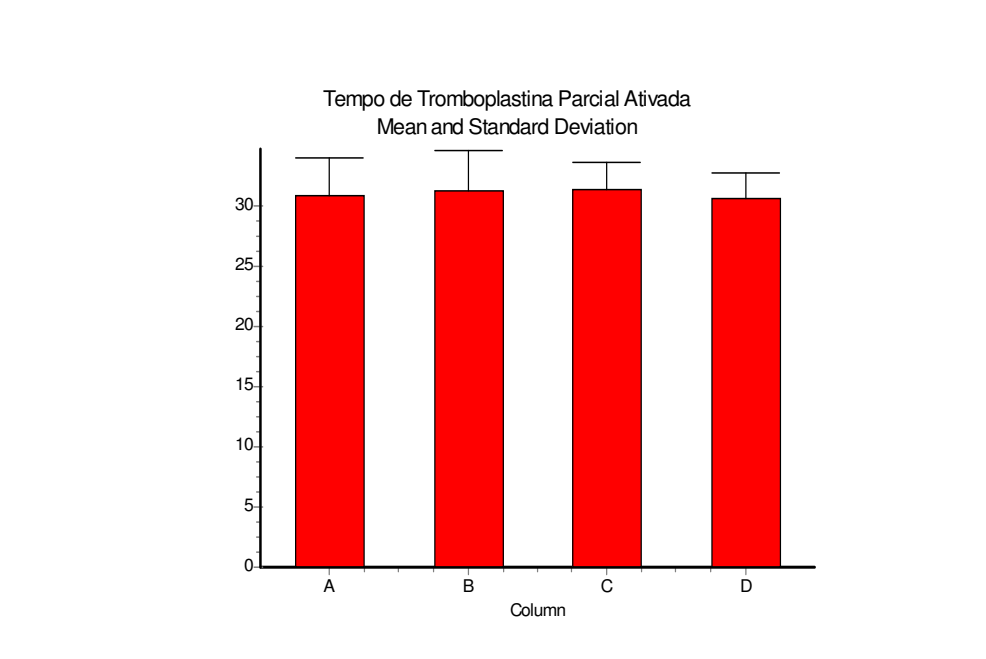


Gráfico 3: Valores do TTP entre os grupos NP (A), P (B), HP (C) e GDP (D).

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Dados representam a média \pm D.P.M

4.0 HIDRÓLISE DE ATP, ADP E AMP

Os resultados obtidos da atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase plaquetárias são mostrados na tabela 3 e nas figuras 3, 4 e 5. Como pode ser observado, a atividade da NTPDase encontrou-se aumentada nos grupos P, HP e GDP quando comparados com o grupo controle (NP), usando-se ATP como substrato ($p < 0.01$). A hidrólise do ADP, também, encontrou-se aumentada nos grupos P, HP, e GDP, diferindo significativamente do grupo controle (NP) ($p < 0.01$).

A atividade da 5'-nucleotidase, também, encontrou-se aumentada nos grupos P, HP, GDP diferindo significativamente do grupo controle (NP), usando-se AMP como substrato ($p < 0.01$). Observou-se, também, que não houve diferença significativa na hidrólise de ATP, ADP e AMP entre os grupos P, HP e GDP quando comparados entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3. Atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase plaquetárias em nmol Pi/min/mg de proteína dos grupos NP, P, HP e GDP.

Grupos	NTPDase ATP	NTPDase ADP	5'-Nucleotidase AMP
NP	13,01 ± 0,46	8,93 ± 0,59	5,38 ± 0,29
P	17,89 ± 0,40*	12,01 ± 0,64*	7,84 ± 0,35*
HP	18,31 ± 0,86*	14,09 ± 0,84*	8,29 ± 0,68*
GDP	16,05 ± 0,72*	12,74 ± 0,72*	9,09 ± 0,37*

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M (n=68). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via usando-se o teste de Comparação Múltipla de Tukey-Kramer.

* $P < 0.01$ (P, HP e GDP versus NP).

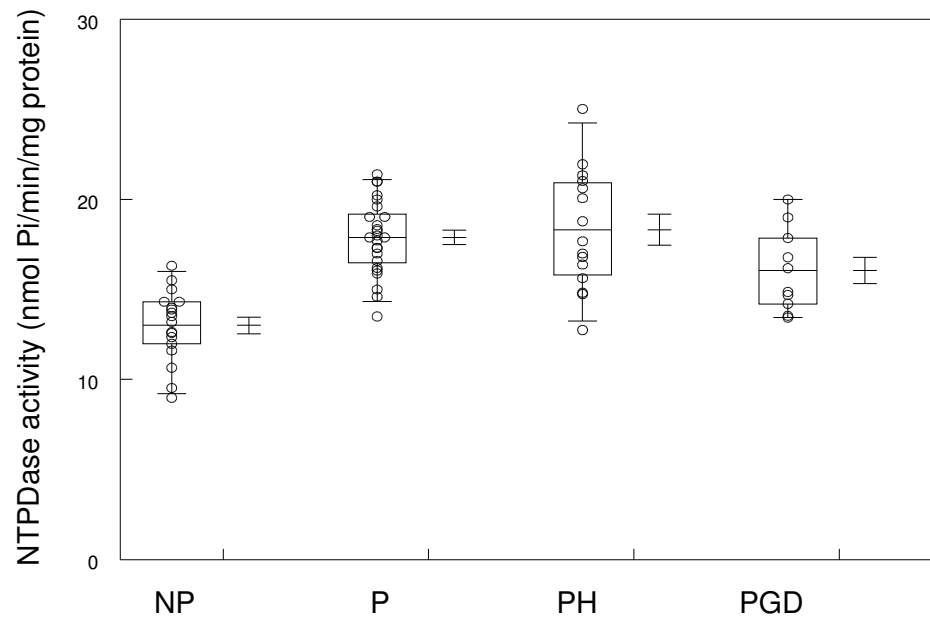


Figura 4: Box-whisker-plots da atividade da NTPDase em plaquetas dos grupos controle (NP), grávidas normais (P), grávidas hipertensas (HP) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). O ATP foi usado como substrato. Os dados representam a média \pm S.E.M de 68 indivíduos. * $P < 0.01$ (P, HP e GDP versus NP).

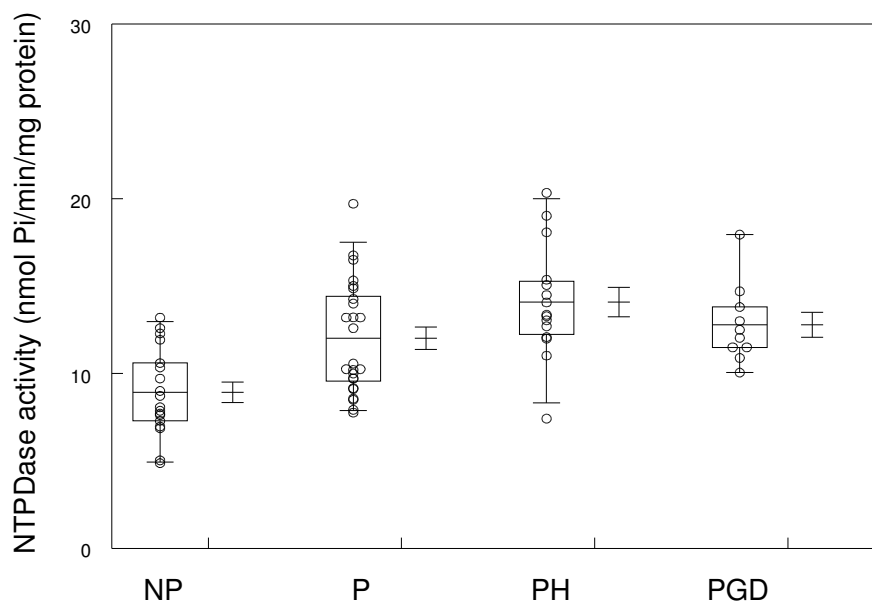


Figura 5: Box-whisker-plots da atividade da NTPDase em plaquetas dos grupos controle (NP), grávidas normais (P), grávidas hipertensas (HP) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). O ADP foi usado como substrato. Os dados representam a média \pm S.E.M de 68 indivíduos. * $P < 0.01$ (P, HP e GDP versus NP).

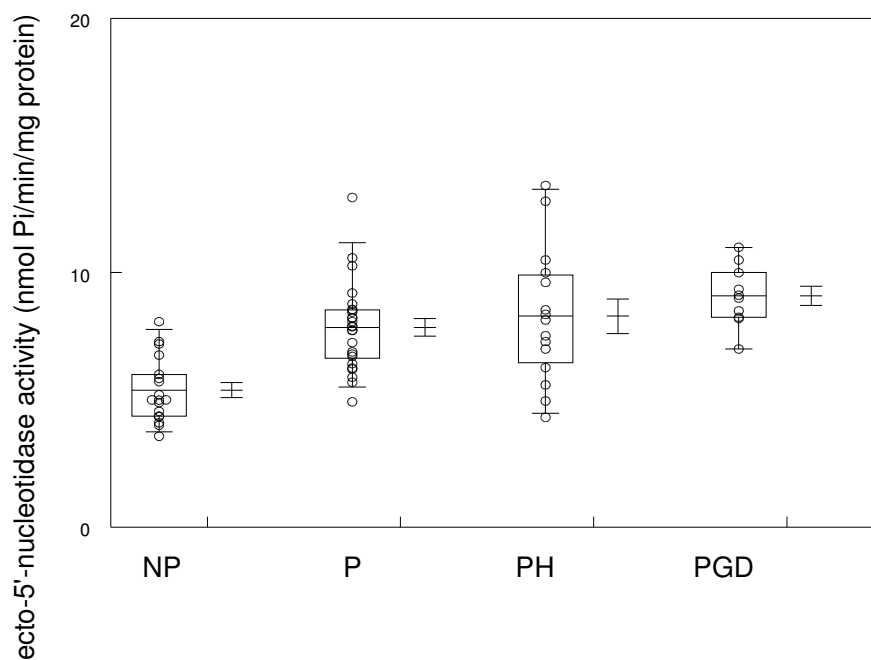


Figura 6: Box-whisker-plots da atividade da 5'-nucleotidase em plaquetas dos grupos controle (NP), grávidas normais (P), grávidas hipertensas (HP) e grávidas com diabetes mellitus gestacional (GDP). O AMP foi usado como substrato. Os dados representam a média \pm S.E.M de 68 indivíduos. * $P < 0.01$ (P, HP e GDP versus NP).

DISCUSSÃO

Hemostasia é um sistema complexo auto-regulatório e dinâmico composto de subsistemas que estão sob o controle de mecanismos neurais e humorais (NORRIS, 2003). Em resposta à injúria vascular, o corpo regula a formação de tampões hemostáticos, prevenindo a formação de coágulo intravascular excessivo e oclusão dos vasos. Durante este processo complexo, a parede dos vasos sanguíneos, leucócitos, plaquetas e muitas proteínas plasmáticas interagem para coordenar a hemostasia, trombose e fibrinólise. Em todos estes casos tem se tornado claro que nucleotídeos como ATP e ADP são importantes na regulação do fluxo sanguíneo normal (ZIMMERMANN, 1999).

As plaquetas circulam na corrente sanguínea como discos lisos. ADP, trombina e colágeno, como agonistas, ativam plaquetas e mudam sua forma de discos lisos a esferas espinhosas (HANTGAN, 1984). As plaquetas ativadas promovem agregação plaquetária. ADP a baixas concentrações (0.1 a 0.5 μM) produz agregação reversível e a altas concentrações (2.0 a 5.0 μM) produz agregação irreversível e libera o conteúdo dos grânulos densos estocados dentro das plaquetas na corrente sanguínea (BORN, 1962). O ATP é, também, liberado de plaquetas ativadas, eritrócitos rompidos e outras células da circulação, além de ser um indutor de choque. Então, a presença de um mecanismo enzimático que hidrolize ADP na circulação é muito importante para limitar a agregação plaquetária e, conseqüentemente, a formação de trombos indesejados em lugares impróprios. Por isso, as ectonucleotidases são muito importantes neste processo por hidrolizar os nucleotídeos extracelulares até adenosina (TRANS, 1980).

KUNAPULI et al, 1998 sugeriram que a agregação plaquetária induzida pelo ADP resulta da concomitante sinalização via dois tipos de receptores de nucleotídeos acoplados a proteína-G (P2Y₁ e P2T_{AC}). Subseqüentes estudos revelaram que os nucleotídeos extracelulares poderiam ser mensageiros modulando os sistemas exócrino e endócrino, os mecanismos hemostáticos e vasculares, músculo esquelético, imune e células inflamatórias (BURNSTOCK, 2004). Essencialmente, os sinalizadores purinérgicos ou pirimidinérgicos no sítio inflamatório têm três componentes essenciais: (i) fontes de nucleotídeos

extracelulares (ABBRACCHIO, 1994); (ii) receptores específicos para estas moléculas transmissoras (PALMER e STILES, 1995); (iii) ectonucleotidases que modulam a resposta celular pela hidrólise de nucleotídeos de uma maneira regulada (PLESNER, 1995).

Mulheres grávidas apresentam ativação do sistema hemostático, o qual, é um importante mecanismo protetor contra sangramento excessivo no parto (GILABERT, 1995). De acordo com outros estudos, as mudanças nas variáveis da coagulação, as quais, são mais significantes no terceiro trimestre da gravidez, são, provavelmente, devido a mudanças hormonais, e especialmente ao aumento dos níveis de estrogênio no decorrer do processo de gravidez. Muitas dessas mudanças hemostáticas, também, são observadas em mulheres que usam contraceptivos orais (BELLER, 1994). Além disso, mudanças relevantes no sistema fibrinolítico durante a gravidez são, também, discutidas na literatura (NAKASHIMA et al., 1996).

Como foi visto, anteriormente, a gravidez faz com que o organismo feminino passe por adaptações fisiológicas complexas com o objetivo de evitar o sangramento placentário excessivo e prevenir uma possível hemorragia fatal. Entre as conseqüências destas mudanças, está o dano endotelial, o qual, desencadeia diversas alterações na coagulação e nas plaquetas. Desta maneira, podemos sugerir que o aumento das atividades das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase entre as grávidas tanto normais quanto de alto risco encontrado neste trabalho, possa ser devido, indiretamente a estas alterações..

Múltiplos estudos de diferentes laboratórios oferecem evidências do aumento da ativação ou aumento da atividade plaquetária em pacientes diabéticos (CARR, 2001). No paciente diabético tipo 2 e nos hipertensos, existe uma maior predisposição a formação de trombos. Normalmente, as plaquetas mantêm um contato intrínseco com o endotélio e não é gerada nenhuma condição patológica. No microambiente do trombo, existe uma interação célula-célula entre plaquetas, neutrófilos, eritrócitos e células endoteliais (KAWASHIMA et al., 2000).

A disfunção endotelial e o estado de hipercoagulabilidade são causados, também, pelo estresse oxidativo ocasionado no grupo de pacientes hipertensos, ou seja, o aumento das espécies reativas de oxigênio resulta em uma diminuição do óxido nítrico e de prostaciclina, determinando o aumento da vasoconstrição que prejudica a hemostasia vascular normal, favorecendo estados pró-agregatórios.

Recentemente, LUNKES et al, 2003 mostrou que a atividade da NTPDase foi aumentada em pacientes diabéticos tipo 2, hipertensos e diabéticos tipo 2/hipertensos e associou esta alteração com uma resposta orgânica compensatória. Em outro trabalho, do mesmo autor, foi observado um aumento da atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase em ratos com diabetes induzida por aloxan (o qual produz um padrão típico de diabetes tipo 1) indicando que, provavelmente, o aumento dos níveis de glicose e outras alterações comuns que ocorrem em ambos os tipos de diabetes poderiam ser os fatores responsáveis para o aumento da hidrólise do nucleotídeo (LUNKES et al., 2004).

Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com os nossos achados. As mulheres grávidas normais, com hipertensão (pré-eclampsia) e diabetes mellitus gestacional, também, apresentaram elevação da hidrólise de ATP, ADP e AMP pela NTPDase e 5'-nucleotidase, quando comparadas as não grávidas. No caso das grávidas com diabetes mellitus gestacional, nós podemos presumir que o aumento da viscosidade e adesividade plaquetária, provocada, em parte, pelos níveis altos de glicose sanguínea e pelo dano endotelial gerado, faz com que as plaquetas secretem diversos componentes da via da coagulação, e a conseqüente ativação plaquetária gerada desencadeia mudanças na expressão de glicoproteínas de superfície plaquetária, as quais agem como receptores para agonistas plaquetários e proteínas de adesão envolvidas na agregação. Entre estes agonistas, encontram-se a serotonina, bradicinina e o ADP.

No estado de preeclampsia, a formação do microtrombo e o excesso de deposição de fibrina afetam múltiplos órgãos maternos e contribuem para a disfunção de vários sistemas, os quais, caracterizam a síndrome clínica. Há evidências de um aumento do consumo de fator VII, e um significativo aumento da atividade dos marcadores de trombina, incluindo, complexo TAT (complexo trombina-antitrombina), fator da protrombina 1+2, D-dímero de fibrina e fibrina solúvel (BREMME e BLOMBACK, 1996). Isto demonstra uma significativa elevação da atividade do sistema de regulação da coagulação intravascular em preeclampsia. A respeito do sistema fibrinolítico, ROES et al, 2002 relataram que em pacientes com severa preeclampsia, houve uma significativa redução no PAI-2 (inibidor da ativação da protrombina-2), refletindo uma insuficiência placentária e um aumento significativo nos níveis dos ativadores do plasminogênio tecidual, refletindo disfunção endotelial.

BREMME, 2003 analisando as mudanças hemostáticas na gravidez normal, encontrou um aumento dos fatores do complexo da protrombina (II, VII e X), com uma diminuição do tempo de protrombina, e uma contagem média de plaquetas dentro dos valores de referência. Em contraste com a pesquisa citada anteriormente, neste trabalho foi verificado um aumento do tempo de protrombina em grávidas normais.

FALLATI et al, 2003 propuseram que as plaquetas purificadas e não estimuladas perdiam ou tinham mínima atividade funcional de NTPDase e dados prévios indicaram que as micropartículas circulantes no plasma expressam atividade bioquímica de NTPDase. Então, eles propuseram que a liberação de NTPDase presente na micropartículas pode ser uma chave modulatória que influencia na trombose. ATKINSON et al, 2006 supôs que o trombo plaquetário forma micropartículas, as quais, ficam acumuladas nos agregados plaquetários em crescimento liberando grandes quantidades de NTPDase. Por esta razão, sugeriram que a NTPDase não é, inicialmente, parte substancial do trombo, mas somente acumula-se após a formação do trombo maduro. Eles propuseram que a expressão espacial e temporal da NTPDase nas micropartículas acumuladas podem regular o tamanho do trombo pela regulação da hidrólise e inativação do agonista plaquetário ADP, resultando em resposta de-agregatória.

Contudo, em nosso trabalho, um importante ponto a ser discutido é a inquestionável presença de NTPDase e 5'-nucleotidase na membrana plaquetária. As plaquetas são células muito abundantes, as quais, quando ativadas, liberam grandes quantidades dos nucleotídeos ATP e ADP, o que as torna muito importantes mesmo quando presentes em pequena quantidade quando comparadas com outras fontes, como as micropartículas. Este estudo traz importante informação sobre as mudanças na atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase na superfície plaquetária durante uma gravidez normal, gravidez com hipertensão (preeclampsia), e gravidez com diabetes mellitus gestacional. Nós podemos sugerir que o aumento do fator VII e dos marcadores de ativação da trombina evidenciados pelo aumento do tempo de protrombina em grávidas normais e de alto risco pode contribuir, indiretamente, para o aumento da hidrólise do ATP e ADP pela NTPDase, visto que estes fatores de coagulação presentes no complexo da protrombina funcionam como agonistas plaquetários, ativando mais plaquetas nas proximidades da lesão endotelial.

Portanto, este aumento da hidrólise de nucleotídeos ATP, ADP e AMP pelas enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase na superfície plaquetária de gestantes normais e de alto risco, possivelmente, ocorreu para evitar a formação de microtrombos locais e regular o tônus vascular. De certa forma, estas alterações promovem o balanço hemostático local, pois sabemos que o ATP é um vasoconstritor do endotélio vascular, o ADP é um poderoso agregante plaquetário e o AMP hidrolizado produz adenosina, que é um antiagregante. Então, nós sugerimos que a ação destas enzimas serve para limitar a ação vasoconstritora do ATP e pró-coagulante do ADP através da produção de adenosina. Isto pode ser importante no parto ou puerperium para ajudar a prevenir uma possível alteração na hemostasia normal.

CONCLUSÕES

I – Ocorreu aumento significativo na hidrólise de ATP, ADP e AMP pelas enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase na superfície plaquetária do sangue periférico de gestantes normais e de alto risco quando comparados ao grupo de mulheres não grávidas.

II – Houve um aumento do tempo de protrombina nas grávidas normais, hipertensas (pré-eclampsia) e com diabetes mellitus gestacional, confirmando achados anteriores de alterações dos fatores de coagulação do complexo da protrombina.

III – De acordo com os resultados obtidos, não houve diferenças significativas entre os grupos de gestantes normais, hipertensas (preeclampsia) e com diabetes mellitus gestacional, o que nos leva a sugerir que as patologias hipertensão e diabetes mellitus gestacional não tiveram efeitos aditivos sobre o aumento da atividade enzimática da NTPDase e 5'-nucleotidase nestas gestantes.

BIBLIOGRAFIA

ABBACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinoreceptors-Are there families of P2X and P2Y purinoreceptors. **Pharmacol Ther** n.3, v.64, p.445-475, 1994.

ARAUJO, M.C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1740, p.421-6, 2005.

ATKINSON, B, et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules and Diseases** v.36, p.217-222, 2006.

BELLER, F.K. Cardiovascular system: coagulation, thrombosis, and contraceptive steroids – is there a link? In: Goldzieher JW, Fortherby K, editors. **Pharmacology of the contraceptive steroid**. New York: Raven Press; 1994.p.304-34.

BIEDERBICK, A.; ROSE, S.; ELSÄSSER, H.P. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. **J Cell Sci** v.112, p.273-84, 1999.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry** v 43, p.5511-19, 2004.

BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature** v.194, p.927-9, 1962.

BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v.72, p.248-254, 1976.

BRAUN, N. et al. Sequencing, functional expression and characterization of NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochem J** v.351, p.639-647, 2000.

BREMME, K.; BLOMBACK, M. Hemostatic abnormalities may predict chronic hypertension after preeclampsia. **Gynecologic and Obstetric Investigation** v.41, p.20-26, 1996.

BREMME, K.A. Haemostatic changes in pregnancy. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.16, p. 153-168, 2003.

BROEKMAN, M.J.; EIROA, A.M.; MARCUS, A.J. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension. Blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. **Blood** v.78, p.1033-1040, 1991.

BROWM, et al. The detection investigation and management of hipertension in pregnancy. Executive summary and full consensus statement. **Aust. N. Z. W. Obstetric Gynecology**, v.40, p. 133-55, 2000.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol** v.240, p.301-304, 2004.

CARR, M.E. Diabetes Mellitus: a hypercoagulable state. **J Diabetes Its Complicat** v.15, p.44-54, 2001.

CHAN, K.; DELFERT, K.; JUNGNER, K.D. A direct colorimetric assay for the Ca^{2+} - ATPase activity. **Analytical Biochemistry** v.157, p.375-380, 1986.

CHRISTOFORIDIS, S. et al. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. **Eur J Biochem** v.234, p.66-74, 1995.

DAVISON, et al. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. **J Am Soc Nephrol**, v.15, p.2440-2448, 2004.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

ENDEMANN, D.H.; SCHIFFRIN, E.L. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v.15, p.1983-1992, 2004.

FALATTI, S. et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin **J Exp Med** n.11, v.197, p.1585-1598, 2003

GILABERT, J. Modificaciones de la hemostasia en obstetricia. **Rev. Iberoamer. Tromb. Hemostasia** v.8, p.102-12, 1995.

GODING, J.W. Ecto-enzimas: physiology meets pathology. **J Leukocyte Biol** v.67, p.285-311, 2000.

GORDON, J.L. Extracelular ATP: effects, sources and fate. **Biochem J** v.233, p.309-319, 1986.

GRUNDY, S.M. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. **Am J Cardiol**, v.81, p.18B-25B, 1998.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun** v.218, p.916-23, 1996.

HANTGAN, R.R. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. **Blood** v.64, p.896-906, 1984.

HEINE, P.; BRAUN, N.; ZIMMERMANN, H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP difosfohidrolase after heterologous expression in cho cells. **Eur J. Biochem** v.262, p.102:107, 1999.

JACOBSON, J.D.; COUSINS, L. A population-based study of maternal and perinatal outcome in patients with gestational diabetes. **Am Journal Obstetric Gynecology**, v.161, n.4, p.981-6, 1989.

KACZMAREK, E. **et al.** Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. **J Biol Chem** v.271, p.33116-33122, 1996.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endotelial cells. **Blood**, v.96, p.2157-2162, 2000.

KNIJFF, S.C.M., editor. Summary of contraindications to oral contraceptives. **New York: Parthenon Publishing Group**, 2000.

KONIGSBERG, W. **et al.** The TF:VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis. **Thrombosis Haemostasis**, v.86, p.757-771, 2001.

KOZIAK, K. et al. Analysis of CD39/ATP Diphosphohydrolase (ATPDase) Expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Thrombosis Haemostasis**, v.82, p.1538-44, 1999.

KUNAPULI, S.P. Múltiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function. **Trends Pharm Sci**. v.19, p.391-394, 1998.

KUNICKI, T.J.; RUGGERI, Z.M. Platelet collagen receptors and risk prediction in strock and coronary artery disease. **Circulation**, v.104, p.1451-1453, 2001.

LANDON, M.B.; GABBE, S.G. Diabete Mélitus. In: Barron, W.M.; Lindhemeir, M.D.; editores. **Complicações médicas na gravidez**. 2a ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996, p.55-77.

LANGER, O. Management of gestational diabetes. **Clin Obstet Gynecol**, v. 43, p.106-15, 2000.

LEAL, D.B.R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5.) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1721, p.9-15, 2005.

LEBEL, D. et al. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. **J Biol Chem** v.255, p.1227-33, 1980.

LORENZI. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3^a ed., Ed. Medsi., Rio de Janeiro, 2003.

LUNKES, G.I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice** v.65, p.1-6, 2004.

LUNKES, G.I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v.109, p.189-194, 2003.

LUSCHER, T.F.; BARTON, M. Biology of the endothelium. **Clin Cardiol** v.20, p.1103-1110, 1997.

MAGANN, E.F.; MARTIN, J.N. Preeclampsia/eclampsia. In: Knobil, E. and Neill, J.D. editors. **Encyclopedia of Reproduction**. v.3, San Diego: Academic Press, 1998. p.964-970.

MARCUS, A.J. et al. Heterologous cell-cell interactions, thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Trombosis and Haemostasis**, v.1, p.2497-2509, 2003.

MARCUS, A.J. Platelets: their role in hemostasis, thrombosis and inflammation. In: Gallin, J.I. and Spiderman, R. editors. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.77-95.

MARKUS, A.J. et al. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases. **Italy Hearth Journal**, v.2, p.824-830, 2001.

MATEO, J.; HARDEN, T.K.; BOYER, J.L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. **Br J Pharmacol** v.128, p.396-402, 1999.

MAYNARD, S.E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **Journal Clinical Investigation**, v. 111, p.649-58, 2003.

METZGER, B.E.; COUSTAN, D.R. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.21, p.B161-7, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. **Gestação de alto risco**. 3^a ed. Brasília (DF): SPS; 2000.

MIRAS-PORTUGAL, M.T.; GUALIX, J.; PINTOR, J. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. **FEBS Lett** v.430, p.78-82, 1998.

MULERO, J.J. et al. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **J Biol Chem** v.29, p.20064-67, 1999.

NAKASHIMA, A.; KOBAYASHI, T.; TERAOKA, T. Fibrinolysis during normal pregnancy and severe preeclampsia: relationships between plasma levels of plasminogen activators and inhibitors. **Gynecol Obstet Invest** v.42, p.95-101, 1996.

NESS, R.B.; ROBERTS, J.M. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. **Am Journal Obstetric Gynecology**, v.175, p.1365-70, 1996.

NOLAN, R.D.; VINIK, A.L. Patogénesis of platelet dysfunction in diabetes. In: **Diabetes Mellitus: A fundamental and Clinical Text**. LeRoith D, Olefsky, J.M.; Taylor S.I. editors. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, p.832-839.

NORRIS, L.A. Blood Coagulation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynecol** v.17, n.3, p.369-83, 2003.

O'RIORDAN, M.N.; HIGGINS, J.R. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. **Best Practice & Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.17, p.385-396, 2003.

PABINGER, I.; GRAFENHOFER, H. Pregnancy associated thrombosis. **Wien Klin Wochenschr**, v.115, p.482-484, 2003.

PALMER, T.M.; STILES, G.L. Adenosine receptors. **Neuropharmacology** v.34, p.683-694, 1995.

PICHER, M. et al. Hydrolysis of P₂-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidases from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. **Biochem Pharmacol** v.51, p.1453-60, 1996.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets **Platelets** v.7, p.225-230, 1996.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int Rev Cytol** v.158, p.141-214, 1995.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistanse in human disease. **Diabetes**, v.37, p.1595-1607, 1988.

REISS, et al. Retrospective comparison of blood pressure course during preeclamptic and matched control pregnancies. **Am Journal Obstetric Gynecology** v.156, p.894-898, 1987.

RESTA, R. et al. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. **Gene**, v.133, p.171-177, 1973.

ROES, E.M, et al. Levels of plasminogen activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v.187, p.1019-1025, 2002.

ROSI, F.; CARLUCCI, F.; MARINELLO, E.; TABUCCHI, A. Ecto-5'-nucleotidase in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Biomed Pharmacother** v.56, p.100-4, 2002.

RUDGE, et al. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes a retrospective 10 years analysis. **Gynecol Obstet Invest**, v. 50, p.108-112, 2000.

SCHAFER, A.I.; CRAWFORD, D.D.; GIMBRONE, M.A. Unidirectional transfer of prostaglandin endoperoxides between platelets and endothelial cells. **J Clin Invest** v.73, p.1105-1112, 1984.

SHI, et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **J Biol Chem** v. 276, p.17474-78, 2001.

SMITH, T.M.; KIRLEY, T.L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. **Biochim Biophys Acta** v.1386, p.65-78, 1998.

TRAMS, E.G. A proposal for the role of ecto-enzymes and adenylates in traumatic shock. **J Theor Biol** v.87, p.609-21, 1980.

TROMBETTA, E.S.; HELENIUS, A. Glycoprotein reglycosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. **EMBO** v.18, p.3282-3292, 1999.

UCHIKOVA, H.E.; LEDJEV, I.L. Changes in haemostasis during normal pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.119, p.185-188, 2005.

WANG, T.F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. **J Biol Chem** v.271, p.9898-9901, 1996.

WANG, T.F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. **J Biol Chem** v.273, p.11392-99, 1998.

WISDOM, et al. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. **Am J Obstet Gynecol**, v.165 (6), p.1701-4, 1991.

ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochemistry Journal**, v.285, p.345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v.49, p.589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in hemostasis and thrombus. **Nat Med** v.5, p.987-8, 1999.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic, properties, and functional roles in the nervous system. **Prog Brain Res** v.120, p.371-385, 1999.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.362, p.299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v.52, p.44-56, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Artigo científico submetido a revista “Blood Cells, Molecules and Diseases” em 30 de outubro de 2006 intitulado “NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets from normal and high-risk pregnant women”

Title of the article: NTPDase and 5'- nucleotidase activity in platelets from normal and high-risk pregnant women

Claudio Alberto Martins Leal^b, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a, Karine Bauchspiess^b, Clarissa Martins Leal Schrekker^b, Paula Acosta Maldonado^a, Vera Maria Morsch^a, José Edson Paz da Silva^{b,*}.

Name of the Department:

^a *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Fax: (55) 3220-8018

E-mail: mariarosa@smail.ufsm.br

Abstract

Hemostasis is a complex process that involves equilibrium between the coagulation and fibrinolytic systems. Furthermore, the spatial and temporal expression of NTPDases in the vasculature appears to control platelet activation, thrombus size and stability, by regulating phosphohydrolytic activity and consequent P2 receptor signaling. Here we show for the first time the behavior of nucleotide degrading enzymes (ectonucleotidases) on the platelet surface of normal pregnant women and pregnant women with complications. The activities of the enzymes, NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate phosphohydrolase, E-NTPDase/CD39), and 5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73), were analyzed in the platelets surface of four patient type composed of women divided into the following groups, called: nonpregnant (NP), pregnant without complications (P), pregnant with hypertension (HP) (preeclampsia) and pregnant with gestational diabetes mellitus (GDP). Increased platelet NTPDase activities were observed in the groups of P (37.0% and 34.0%), HP (40.0% and 56.0%) and GDP (23.0% and 42.0%) when compared to control ($p < 0.01$) using ATP and ADP as substrate, respectively. 5'-nucleotidase activity was elevated in the groups of P (45.0%), HP (54.0%) and GDP (68.0%) when compared to control ($p < 0.01$) with AMP as substrate. The ectonucleotidase activity in platelets from group P, HP and GDP were enhanced, showing that pregnancy with or without complications enhanced ATP, ADP and AMP hydrolysis. These enhanced NTPDase 1 and 5'-nucleotidase activities in platelets of normal pregnant or high risk pregnant suggest that these enzymes are involved in the human thromboregulation process in physiological and pathological conditions.

Keywords: NTPDase, hypertension, 5'-nucleotidase, gestational diabetes mellitus, platelets.

1. Introduction

Pregnancy is a risk factor for thrombosis and venous thromboembolism (VTE), which is one of the main obstetric causes of maternal mortality [1]. It is now recognized that thrombosis is a multicellular process [2]. Since the morphology of evolving thrombi was studied by light and electron microscopy, erythrocytes, neutrophils, some monocytes, and platelets have been observed to be in close proximity. Platelets are also adherent to the exposed subendothelium, and this could be attributed to glycoprotein Ib and the von Willebrand factor. Platelets, neutrophils, erythrocytes, and endothelial cells are all active components in the microenvironment of the thrombus. It is known that cell-cell interactions and transcellular metabolism in the evolving thrombus can result in the metabolic generation of novel mediators [3].

The incidence of VTE varies between 1 in 1000 and 1 in 2000 deliveries and is higher during the third trimester of pregnancy and in the puerperium [4]. In late pregnancy, many coagulation factors are increased by around two times that of nonpregnant women [5]. The modifications of the coagulation system result from hormonal changes and are a part of the human female organism's complex physiological adaptation to pregnancy. Its purpose is to ensure the rapid and effective control of bleeding from the placental site and prevent fatal hemorrhage during delivery and the puerperium. Placental separation is a severe and acute challenge in the case of hemostasis [6].

Chronic diseases, such as diabetes and hypertension, present high indices in the population [7,8]. Several studies have investigated whether pregnancy related complications, such as gestational hypertension, diabetes and placental abruption, are associated with changes in hemostatic parameters [9]. Platelets play a fundamental role in hemostasis, and investigation of their functioning in diabetic and hypertensive patients can contribute to a better

understanding of the pathophysiology of vascular disease. Alterations in components of the platelet membrane seem to represent important factors in the hypersensitivity and platelet function of diabetic patients [10].

Activated platelets release prostaglandin endoperoxides, which are then transformed by endothelial cells to prostacyclin, a strong platelet inhibitor and vasodilator. Activated platelets also release ADP, the final common agonist in platelet activation and recruitment, which is metabolized to adenosine monophosphate (AMP) by NTPDase on the endothelial cell surface. Subsequently, AMP is metabolized to adenosine by 5'-nucleotidase on the endothelial cell [11]. Extracellular adenine nucleotides, such as ATP, ADP, and adenosine, are known to regulate vascular response to endothelial injury. ADP is the main promoter of platelet aggregation, whereas adenosine is a potent inhibitor. High concentrations of ATP have been shown to inhibit ADP-induced platelet aggregation in vitro [12]. The presence of nucleotidase activity in human plasma was first suggested by Jorgensen [13]. The enzymes, NTPDase and 5'-nucleotidase, are located in the platelet membrane and complete the hydrolysis of ATP to its nucleoside, adenosine, in the extracellular medium [14,15]. In the coagulation cascade, these enzymes have an important function in the regulation of platelet aggregation [16,17].

The activity of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in platelets has been investigated in several pathologies, such as diabetes, hypertension and breast cancer, and there also are studies in the lymphocytes of patients with HIV infection [18,19,20]. However, there has not yet been any study on the influence of these enzymes on pregnancy. Thus, the objective of the present study is to determine the ectonucleotidase activity in platelets from normal and high-risk pregnant women in order to contribute to the understanding of the thromboregulatory role of these enzymes.

2. Materials

2.1. Materials

Nucleotides, sodium azide, HEPES, and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, Mo, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Patients

The blood samples were taken from patients from the Federal University of Santa Maria Hospital (Santa Maria, RS, Brazil). None of these women had a history of hemostatic disorders or other relevant disease states. Eight milliliters of blood was obtained from each participant and used for platelet-rich plasma preparations and biochemical and hematological determinations. Blood samples from the pregnant women were obtained between the 35th and 40th gestational weeks (GW). All subjects gave informed consent to participate in the study. The Human Ethics Committee of the Health Science Center, Federal University of Santa Maria, approved the project under protocol number 23081.000982/2006-86.

The samples were carefully selected by a clinical evaluation and the four patient groups consisted of a total of 68 individuals with an average age of 32.13 ± 6.14 years. The control group, NP, consisted of 18 nonpregnant healthy volunteers who did not present any disease and had not been submitted to any pharmacological therapy during the previous month. The second group, P, consisted of 25 pregnant women (singlet pregnancy), with diastolic blood pressure ≤ 85 mmHg and with no proteinuria. The third group, HP, consisted of 15 hypertensive pregnant women, presenting elevated maternal blood pressure ($\geq 140/90$ mm Hg) at 2 or more measurements and proteinuria (≥ 0.3 g/24 h or $\geq 1+$ on the dipstick test).

The fourth group, GDP, consisted of 10 pregnant women with gestational diabetes mellitus, presenting an abnormal glucose challenge test (GCT) result (> 7.8 mmol/L [>140 mg/dL]) as well as an abnormal glucose tolerance test (OGTT). A diagnosis of GDM is made if the fasting plasma glucose level is abnormal (> 5.8 mmol/L [>105 mg/dL]), or if two or more values are abnormal using the cut-off levels of 10.6 mmol/L (190 mg/dL) for the 1-h result; 9.2 mmol/L (165mg/dL) for the 2-h result; and 8.1 mmol/L (145 m/dL) for 3-h result [21,22].

2.3. Platelet-rich plasma preparation

Platelet-rich plasma was prepared by the method of Pilla et al. [14]. Briefly, blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at $160 \times g$ for 10 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at $1400 \times g$ for 15 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isosmolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES buffer and protein was adjusted to 0.3-0.5 mg/mL where 10-15 μ g of protein was used per tube to ensure linearity in the enzyme assay.

2.4. NTPDase and 5'-nucleotidase Determination

NTPDase activity was determined by measuring the amount of liberated inorganic phosphate using a colorimetric assay. This determination was chosen because it has been employed in our laboratory for various types of samples and does not require radioactive substances. Other authors have used the same colorimetric assay before, without evidencing a significant difference when compared with radioactive assays [23,18].

Twenty microliters of the PRP preparation (10-15 μ g protein) were added to either a solution of NTPDase or 5'-nucleotidase, and the resulting reaction mixture was preincubated for 10 min. at 37 °C, until a final volume of 200 μ L was reached. NTPDase activity was determined by the method of Pilla et al. [14] in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl,

4.0 mM KCl, 6 mM glucose, and 50 mM Tris-HCL buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂ and the nucleotide added was 2 mM AMP [14]. NTPDase1 and 5'-nucleotidase reactions were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was measured by the method of Chan et al. [24] using KH₂PO₄ as standard. Controls were prepared to correct nonenzymatic hydrolysis by adding PRP after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg protein.

2.5. Hematological Determinations

Quantitative determinations of platelets were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami, USA). Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were determined with a Coag-a-mate-MTX apparatus (Organon Teknica, Durham, NC, USA).

2.6. Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard as described by Bradford [25].

2.7. LDH measurement

LDH activity was measured using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analisa).

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by parametric Tukey-Kramer Multiple Comparisons test, considering a level of significance of 5%.

3. Results

3.1. Biochemical and Hematological Parameters

The groups NP, P, HP presented normal blood glucose levels (70-110 mg/dL), whereas the GDP group presented elevated blood glucose levels (>140mg/dL) as shown in table 1.

Quantitative analysis demonstrated that platelet counts obtained from all pregnant women were at normal levels (150.000 to 400.000 platelets/mm³). Our results showed differences in the results of hematological determinations for PT, which were higher in the P, HP and GDP groups in relation to the control group, while aPTT were within the normal range for P, HP and GDP groups as shown in table 1.

3.2. Cellular Integrity

The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was used as a marker of cell integrity. The measurement of LDH activity showed that most cells (approximately 90%) were intact after the isolation procedure (data not shown).

3.3. ATP, ADP and AMP hydrolysis

The results obtained with NTPDase and 5'-nucleotidase are shown in table 3. As could be observed, NTPDase activity was enhanced in the P, HP and GDP groups when compared to the control, with ATP as substrate ($p < 0.01$). ADP hydrolysis was also increased in the P, HP, and GDP groups, differing significantly from the control group ($p < 0.01$).

5'-nucleotidase activity was also altered in the P, HP, GDP groups differing significantly from the control group, with AMP as substrate ($p < 0.01$). Our results showed none significant difference for NTPDase and 5'-nucleotidase activity between the groups of pregnancy.

4. Discussion

Hemostasis is a complex, dynamic and self-regulatory system made up of subsystems that are under the control of neural and humoral mechanisms [26]. In response to vascular injury, the body regulates the formation of hemostatic plugs, preventing excessive intravascular clot formation and vessel occlusion. During this complex process, the blood vessel wall, leukocytes, platelets and many plasma proteins interact to coordinate hemostasis, thrombosis and fibrinolysis. It has become clear that nucleotides such as ATP and ADP are important in the regulation of regional blood flow [16].

The platelets circulate in the blood as smooth discs. ADP, thrombin and collagen, as agonists, activate platelets and change their shape from smooth discs to spiny spheres [27]. The activated platelets promote platelet aggregation. ADP at low concentrations (0.1 a 0.5 μM) produces reversible aggregation and at higher concentrations (2.0 a 5.0 μM) produces irreversible secondary aggregation and releases the contents of platelet storage granules into the bloodstream [28]. ADP released from dense granules causes further platelet aggregation and promotes an increasing release of ADP from dense granules with enhancement of the aggregation process. ATP is also released from platelets, disrupted erythrocytes and other cells into the circulation and is an inducer of shock. Thus, the presence of an enzymatic mechanism that hydrolyses ADP in the circulation is very important to limit platelet aggregation and consequently thrombus formation. Ectonucleotidases are very important in this process by hydrolyzing extracellular nucleotides to adenosine [29].

Kunapuli et al. [30] suggested that ADP-induced platelet aggregation results from concomitant signaling via two types of G-protein coupled nucleotide receptors (P2Y_1 and P2T_{AC}). Subsequent studies revealed that extracellular nucleotides could be messengers modulating the exocrine and endocrine systems, the vasculature and hemostatic mechanisms,

musculoskeletal, and immune and inflammatory cells [31]. Essentially, “purinergic/pyrimidinergic signaling” at any inflammatory site has three essential components: (i) sources of extracellular nucleotides [32]; (ii) specific receptors for these molecular transmitters (or derivatives) [33]; (iii) ectonucleotidases that modulate the cellular responses by hydrolyzing to nucleotides, in a regulated manner [34].

The significance of hypercoagulability during pregnancy and the risk of developing thromboembolic diseases is still not known [1]. Pregnant women normally present activation of the hemostatic system, which is an important protective mechanism against excessive bleeding in the delivery [35]. According to these other studies, the changes in the variables of coagulation, which are most significant in the third trimester of pregnancy, are probably due to hormonal changes, and especially to the increasing estrogen levels as pregnancy progresses. Most of these hemostatic changes are also observed in women who use oral contraceptives [36]. Furthermore, relevant changes in the fibrinolytic system are also detectable during pregnancy [37].

Multiple studies from different laboratories offer evidence of enhanced activation or increased platelet activity in patients with diabetes [38]. In type 2 diabetes and hypertension, there is a predisposition to thrombus formation. Normally, platelets maintain an intrinsic contact with the endothelium and no pathological conditions are generated. However, in the microenvironment of the thrombus, there is an intrinsic cell-cell interaction between platelets, neutrophils, erythrocytes and endothelial cells [17].

Recently, Lunkes et al. [18] showed that NTPDase activity was enhanced in type 2 diabetic (34%), hypertensive (32%) and type 2 diabetic/hypertensive (30%) patients with ATP as substrate, in both genders. ADP hydrolysis was also increased in the patients with type 2 diabetes (72%), hypertension (70%) and type 2 diabetes/hypertension (55%) compared to control, in both genders. The 5'-nucleotidase activity was also altered, with the control and type

2 diabetes groups differing from the hypertensive and type 2 diabetes/hypertensive groups which presented 60% and 53% activation.

In another study, the same author, observed an enhancement of NTPDase and 5'-nucleotidase activity in rats with alloxan-induced diabetes (which produces the pattern of type 1 diabetes), indicating that probably the enhanced glucose levels and other common alterations occurring in both types of diabetes could be the molecular factors responsible for the enhancement of nucleotide hydrolysis [39].

Here in our study we showed a similar increase in platelet NTPDase activity in the groups of normal pregnant women (37% and 34,4%), pregnant women with hypertension (pre-eclampsia) (40.7% and 56.0%) and gestational diabetes mellitus (23.3% and 42.6%) when compared with the control group, formed by non pregnant women, with ATP and ADP as substrate, respectively. 5'-nucleotidase activity was elevated in the groups of normal pregnant women (45.0%), pregnant women with hypertension (54.0%) and gestational diabetes mellitus (68.0%) when compared with the control group. Certainly, this result is very important because is the first time that these enzymes were measured concomitantly in pregnancy. Curiously, we did not found differences between the normal pregnant women and pregnant with hypertension and gestational diabetes mellitus. Thus, we have to suggest that this increase on NTPDase and 5'-nucleotidase could be due to pregnancy itself.

In preeclampsia, microthrombus formation and excess fibrin deposition affect multiple maternal organs and contribute to the dysfunction of various systems, which characterizes the clinical syndrome. There is evidence of an increased consumption of factor VII, and a significant increase in the markers of thrombin activity, including the TAT complex (thrombin-antithrombin complex), prothrombin factors 1 + 2, fibrin D-dimers and soluble fibrin [40]. This demonstrates a significant upregulation of the intravascular coagulation system in preeclampsia. On the fibrinolytic side, Roes et al. [41] reported that in patients with severe

preeclampsia, there was a significant reduction in PAI-2 (prothrombin activators inhibitors-2), reflecting placental insufficiency, and a significant increase in tissue plasminogen activator levels, reflecting endothelial dysfunction.

Chou et al. [42] suggested that a thrombus would grow as platelets accumulated, released ADP and activated more platelets. Clearly this is not the case, as the visualized thrombus decreases in size as bound platelets de-aggregate and return to the circulation. Fallati et al. [43] said that purified, unstimulated platelets lack or have minimal NTPDase functional activity and early data indicate that microparticles constitutively circulating in plasma express NTPDase biochemical activity. Thus they have proposed that released NTPDase present on microparticles may be a key modulatory influence in thrombosis. In this regard, monocyte-derived microparticles can bind to activated platelets in the developing thrombus in an interaction mediated by platelet P-selectin and microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1(PSGL-1). However, one important point to be discussed is the unquestionable presence of NTPDase in platelet membranes. Platelets are abundant and mobile cells, making them an important contribution even when presenting minimal activity when compared with other sources, such as endothelial cells or microparticles.

This study gives important information about the changes in NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets between the 35th and 40th GW during normal pregnancy, hypertensive pregnancy (preeclampsia), and gestational diabetes mellitus pregnancy. We may suggest that the enhancement of factor VII and thrombin activator markers in the hypertensive pregnancy may contribute to the enhancement of ATP and ADP hydrolysis by NTPDase activity, since these coagulation factors function as agonists, activating platelets [14].

Atkinson et al. [44] hypothesized that as the platelet thrombus forms, microparticles accumulate in the growing aggregate thus delivering greater quantities of NTPDase. Hence, NTPDase is not initially a substantial part of the thrombus, but only accumulates after platelet

thrombus formation matures. They proposed that the spatial and temporal expression of NTPDases in the accumulating microparticles may regulate thrombus size by regulating the hydrolysis and hence inactivation of the platelet agonist ADP, resulting in the observed de-aggregation responses.

Thus, we concluded in this study that alterations in the NTPDase and 5'-nucleotidase activities on the platelet surface of normal and high-risk pregnant women occur in order to avoid local microthrombus formation and regulate vascular tonus. We may suggest that enhanced hydrolysis of AMP to adenosine by 5'-nucleotidase limits the procoagulant action of the ADP, by producing adenosine. This may be important in the delivery or puerperium to prevent abnormal hemostasis.

5. References

- [1] S.C.M. Knijff (Ed.), Summary of contraindication to oral contraceptives, Parthenon Publishing Group, New York, 2000.
- [2] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, et al., Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 178-82.
- [3] A.J. Marcus, M.J. Broekman, L.B. Safier, et al., Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109 (1982) 130-7.
- [4] M. Toglia, G. John, Venous thromboembolism during pregnancy, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 108-14.

- [5] J. Bellart, R. Gilabert, L. Fontecuberta, et al., Coagulation and fibrinolytic parameters in normal pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth retardation, *Am. J. Perinatol.* 15 (1998) 81-5.
- [6] M.N. O'Riordan, J.R. Higgins, Haemostasis in normal and abnormal pregnancy, *Clin. Obstet. Gynaecol.* 17 (2003) 385-96.
- [7] A.I. Vinik, T. Erbas, T.S. Park, et al., Platelet dysfunction in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 24 (2001) 1746-85.
- [8] J.R. Sowers, M. Epstein, E.D. Frohlich, Diabetes, hypertensive, and cardiovascular disease: an update, *Hypertension* 37 (2001) 1053-9.
- [9] S. Eichinger, D-Dimer Testing in pregnancy, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33 (2004) 327-329.
- [10] A.B. Sobol, C. Watala, The role of platelets in diabetes-related vascular complications, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 50 (2000) 1-16.
- [11] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, et al., Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases, *Ital. Heart. J.* 2 (2001) 824-830.
- [12] G. Soslau, R.J. McKenzie, I. Brodsky, T.M. Devlin, Extracellular ATP inhibits agonist-induced mobilization of internal calcium in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta.* 1268 (1995) 73-80.
- [13] S. Jorgensen, Breakdown of adenine and hypoxanthine nucleotides in human plasma, *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 12 (1956) 294-302.
- [14] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, et al., ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets, *Platelets* 7 (1996) 225-30.

- [15] S.S. Frassetto, M.R.C. Schetinger, R. Schierholt, et al., Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naïve and preconditioned rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33 (2000) 1369-77.
- [16] H. Zimmermann, Nucleotides and CD39: principal modulatory players in hemostasis and thrombus, *Nat. Med.* 5 (1999) 987-8.
- [17] Y. Kawashima, T. Nagasawa, H. Ninomiya, Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells, *Blood.* 96 (2000) 2157-62.
- [18] G.I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, et al., Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 2183 (2003) 1-6.
- [19] M.C. Araújo, A. Morsch, R. Zanin, et al., Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740 (2005) 421-6.
- [20] D.B.R. Leal, C.A. Streher, T.N. Neu, et al., Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5.) activity in human lymphocytes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1721 (2005) 9-15.
- [21] H.X. Yang, X.L. Gao, Y. Dong, C.Y. Shi, Analysis of oral glucose tolerance test in pregnant women with abnormal glucose metabolism, *C.M.J.* 118 (2005) 995-9.
- [22] H.X. Yang, S.M. Zhou, Clinical Analysis of perinatal outcomes in gestational diabetes mellitus, *Clin. J. Obstet. Gynecol.* 28 (1993) 139-42.
- [23] K. Koziak, J. Sévigny, S.C. Robson, et al., Analysis of CD39/ATP Diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes, *Thromb. Haemost.* 1538 (1999) 1538-1544.
- [24] K. Chan, K. Delfert, K.D. Jungner, A direct colorimetric assay for the Ca^{2+} - ATPase activity, *Analytical Biochemistry* 157 (1986) 375-380.

- [25] M.M.A. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [26] L.A. Norris, Blood Coagulation, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol.* 17 (3) (2003) 369-83.
- [27] R.R. Hantgan, A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change, *Blood* 64 (1984) 896-906.
- [28] G.V.R. Born, Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature* 194 (1962) 927-9.
- [29] E.G. Trams, A proposal for the role of ecto-enzymes and adenylates in traumatic shock, *J. Theor. Biol.* 87 (1980) 609-21.
- [30] S.P. Kunapuli, Múltiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function, *Trends Pharm. Sci.* 19 (1998) 391-394.
- [31] G. Burnstock, G. Knight, Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems, *Int. Rev. Cytol.* 240 (2004) 301-304.
- [32] M.P. Abbracchio, G. Burnstock, Purinoreceptors-Are there families of P2X and P2Y purinoreceptors, *Pharmacol. Ther.* 64 (3) (1994) 445-475.
- [33] T.M. Palmer, G.L. Stiles, Adenosine receptors, *Neuropharmacology* 34 (1995) 683-694.
- [34] L. Plesner, Ecto-ATPases: identities and functions, *Int. Rev. Cytol.* 158 (1995) 141-214.
- [35] J. Gilabert, Modificaciones de la hemostasia en obstetricia, *Rev. Iberoamer. Tromb. Hemost.* 8 (1995) 102-12.
- [36] F.K. Beller, Cardiovascular system: coagulation, thrombosis, and contraceptive steroids – is there a link? In: J.W. Goldzieher, K. Fortherby (Eds.), *Pharmacology of the contraceptive steroid*, Raven Press, New York, 1994, pp. 304-34.

- [37] A. Nakashima, T. Kobayashi, T. Terao, Fibrinolysis during normal pregnancy and severe preeclampsia: relationships between plasma levels of plasminogen activators and inhibitors, *Gynecol. Obstet. Invest.* 42 (1996) 95-101.
- [38] M.E. Carr, Diabetes Mellitus: a hypercoagulable state, *J. Diabetes Its Complicat.* 15 (2001) 44-54.
- [39] G.I. Lunkes, D. Lunkes, V.M. Morsch, et al., NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 65 (2004) 1-6.
- [40] K. Bremme, M. Blomback, Hemostatic abnormalities may predict chronic hypertension after preeclampsia, *Gynecologic and Obstetric Investigation* 41 (1996) 20-26.
- [41] E.M. Roes, C.G. Sweep, C.M. Thomas, et al., Levels of plasminogen activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187 (2002) 1019-1025.
- [42] J. Chou, N. Mackman, G. Merrill-Skoloff, Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation, *Blood* 104 (2004) 3190-3197.
- [43] S. Falati, Q. Liu, P. Gross, et al., Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin, *J. Exp. Med.* 197, (11) (2003) 1585-1598.
- [44] B. Atkinson, K. Dwyer, K. Enjyoji, S.C. Robson, Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets, *Blood Cells, Molecules and Diseases* 36 (2006) 217-222.

6. Tables

Table 1: Comparison of glucose, PT, RNI e aPTT levels between groups NP, P, HP and GDP^a.

Groups	NP	P	HP	GDP
Glucose	79,83 ± 1.64	87,92 ± 1.7	93,93 ± 1.90	163,4 ± 7.91*
PT	11.90 ± 0,34*	17.32 ± 0.48	17.96 ± 0.60	18.08 ± 0.83
RNI	1.05 ± 0,03*	1.56 ± 0.04	1.62 ± 0.05	1.64 ± 0.07
aPTT	30.84 ± 0.88	31.25 ± 0.71	31.3 ± 0.64	30.61 ± 0.88
n	15	25	15	10

Table 1. ^a Results are expressed as mean±S.E. (n=65). Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) or Tukey-Kramer test. * Different from others ($P<0.01$).

Table 2. Platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities from NP, P, HP, GDP^a.

Groups	NTPDase ATP	NTPDase ADP	5'-Nucleotidase AMP
NP (n=15)	13,01 ± 0,46*	8,93 ± 0,59*	5,38 ± 0,29*
P (n=25)	17.89 ± 0,40	12,01 ± 0,64	7,84 ± 0,35
HP (n=15)	18,31 ± 0,86	14,09 ± 0,84	8,29 ± 0,68
GDP (n=10)	16,05 ± 0,72	12,74 ± 0,72	9,09 ± 0,37

Table 3. ^a Results are expressed as mean±S.E. (n=65). Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) or Tukey-Kramer test. * Different from others ($P<0.01$).

7. Figure captions

Fig. 1. Box-whisker-plots of NTPDase activity in platelets obtained from control group (NP), normal pregnant (P), hypertensive pregnant (HP) and gestational diabetes mellitus pregnant (GDP). ATP was used as substrate. Data represent the mean \pm standard error of 65 individuals.

Fig. 2. Box-whisker-plots of NTPDase activity in platelets obtained from control group (NP), normal pregnant (P), hypertensive pregnant (HP) and gestational diabetes mellitus pregnant (GDP). ADP was used as substrate. Data represent the mean \pm standard error of 65 individuals.

Fig. 3. Box-whisker-plots of 5'-nucleotidase activity in platelets obtained from control group (NP), normal pregnant (P), hypertensive pregnant (HP) and gestational diabetes mellitus pregnant (GDP). AMP was used as substrate. Data represent the mean \pm standard error of 65 individuals.

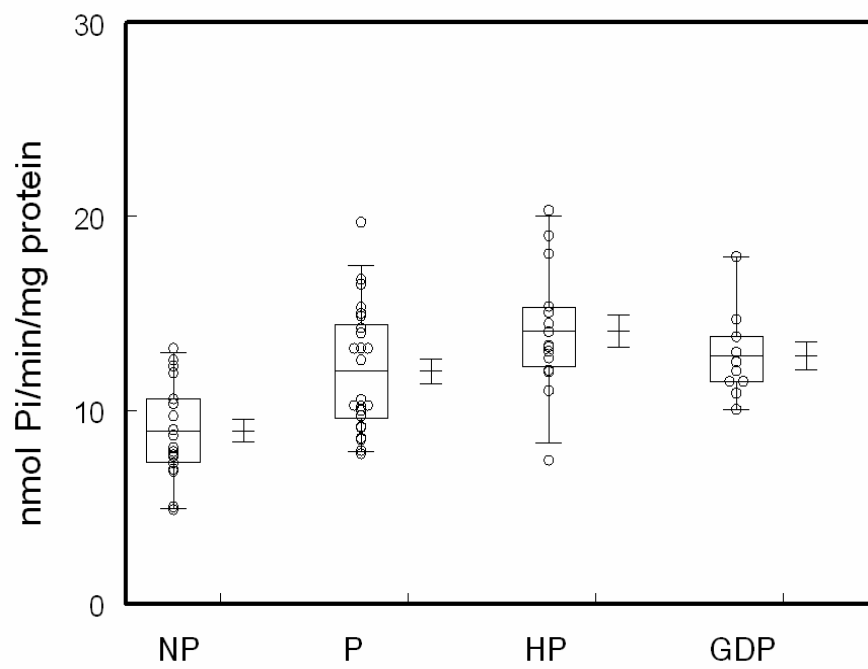


Fig.1

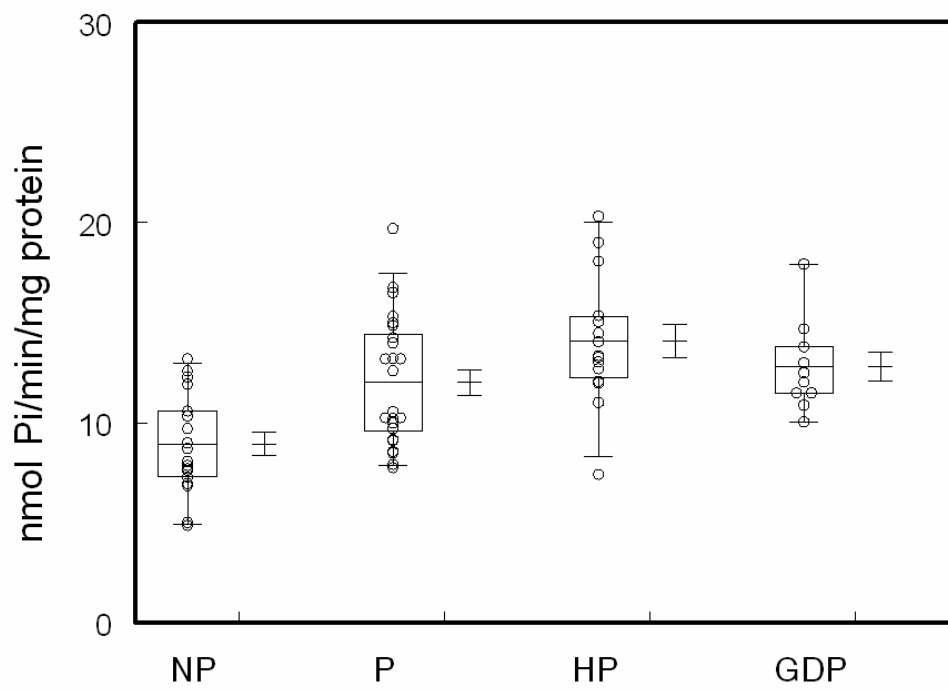


Fig. 2

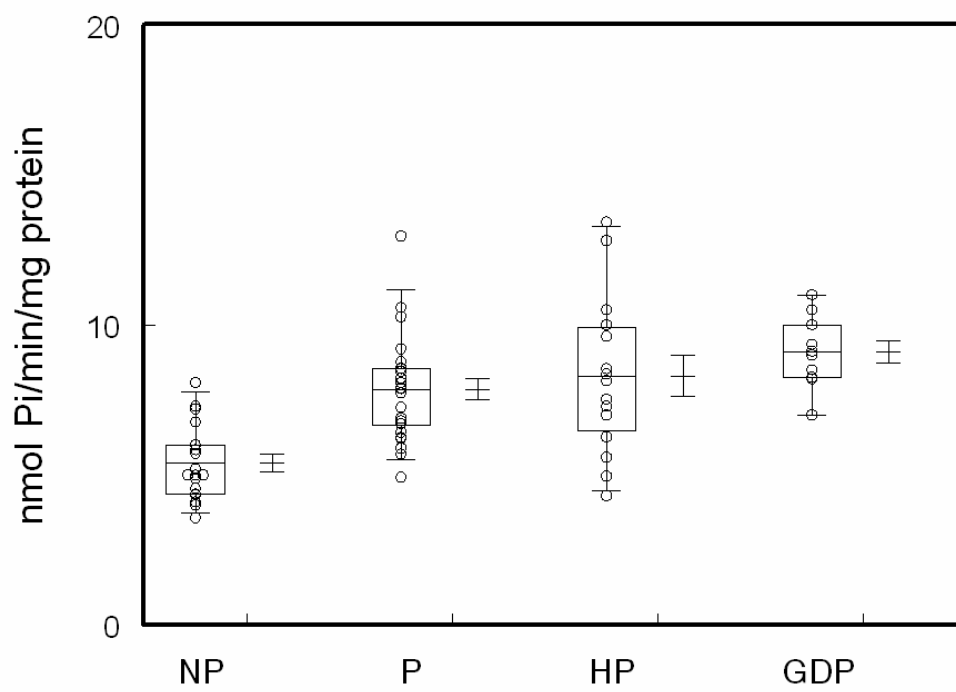


Fig. 3

ANEXO

ANEXO - Termo de consentimento livre e esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – TÍTULO

Avaliação da atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normais e de alto risco

2 – OBJETIVOS

Determinar a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normais e de alto risco

3 – REGISTRO

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde e no Departamento de Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria. Este projeto está registrado e possui a anuência do HUSM.

4 – PROCEDIMENTOS

Os pacientes serão submetidos a punção venosa. O material biológico, plasma citratado, será destinado para as dosagens laboratoriais.

5 – RISCOS DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos participantes, pois não será realizado nenhum procedimento além daquele usado de rotina para punção venosa.

6 – ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue que restarem dos testes laboratoriais serão descartadas, obedecendo às normas de biossegurança em vigor pela legislação.

7 – PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação dos pacientes nesse estudo é livre e voluntária. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo e não comprometerá o cuidado médico do paciente. Como benefício por participar deste estudo o Sr ou Sra terá acesso a todos os dados das dosagens efetuadas e caso necessário poderá ter uma orientação necessária a respeito dos mesmos.

8 – CONFIDENCIALIDADE

A identidade do participante permanecerá em sigilo. Os registros do prontuário e os demais dados obtidos dos indivíduos em estudo também serão confidenciais e serão armazenados no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde em lugar apropriado e seguro.

Local para contato: Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário de Camobi, prédio 26 – telefone 55 3220 8464; responsável técnico: prof.dr. José Edson Paz da Silva (orientador); mestrando: Cláudio A. M. Leal (55-9926-0372).

9 – IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____

Identidade: _____

Assinatura: _____

Pesquisador Responsável

Mestrando