

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

Taís Corrêa Almeida

**Avaliação dos índices plaquetários, atividade da E-NTPDase e da Ecto-5'-
nucleotidase em plaquetas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia**

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Taís Corrêa Almeida

Avaliação dos índices plaquetários, atividade da E-NTPDase e da Ecto-5-nucleotidase em plaquetas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Coorientadora: Prof^a. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Corrêa Almeida, Taís

Avaliação dos índices plaquetários, atividade da E NTPDase e da Ecto-5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia / Taís Corrêa Almeida.- 2018.

135 p.; 30 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva

Coorientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Pré-eclâmpsia 2. Plaquetas 3. Sistema Purinérgico
I. Paz da Silva, José Edson II. Bitencourt Rosa Leal,
Daniela III. Título.

Taís Corrêa Almeida

Avaliação dos índices plaquetários, atividade da E-NTPDase e da Ecto-5'nucleotidase em plaquetas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas.**

Aprovada em 28 de agosto de 2018:

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

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)

Jane Dagmar Pollo Renner, Dra. (UNISC)

Maria Amalia Pavanato, Dra. (UFSM)

Margarete Dulce Bagatini, Dra. (UFFS) - Parecer

Maria Rosa Chitolina, Dra. (UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais, Vânia e Carlos Rufino, à minha irmã Iasmin, à minha vó Marina e ao meu noivo Caio por todo o incentivo, amor, compreensão e apoio para que esse sonho pudesse ser concretizado.

Também dedico à minha estrela mais brilhante do céu, meu avô José. Tenho certeza que estás sempre presente comigo iluminando meus caminhos!

Vocês são a minha base...

Sem vocês nada disso teria acontecido!

“Cada um terá a vista da montanha que subir”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e iluminar os meus caminhos; pela força e persistência necessárias para a construção deste trabalho. Agradeço às oportunidades, amparo e orientação nas dificuldades diárias. Que essa presença seja constante na minha vida.

Aos meus pais, Vânia e Carlos Rufino, pelo amor incondicional, por me concederem segurança e base em minhas escolhas, pelos ensinamentos, pelos valores a mim passados, pelo contínuo apoio, pela fundamentação sólida em que fui criada o que possibilitou a minha formação profissional e intelectual.

À minha irmã Iasmin, pela companhia em momentos difíceis, pela torcida, pela amizade, pelo apoio recebido ao longo dessa caminhada.

Ao meu noivo Caio, que de uma forma especial e carinhosa me deu força e coragem, apoio nos momentos difíceis, pela paciência, pela vibração e comemorações a cada conquista, pela compreensão, pelo amor e companheirismo diário, tornando-se parte fundamental para essa conquista!

Aos meus amorzinhos, Akira, Polly e Maya, por tornarem os meus dias mais alegres através do carinho, lealdade e por me mostrarem que a beleza da vida está em perceber a sutileza das ações diárias.

Em especial ao meu orientador, professor José Edson, pela oportunidade concedida, confiança a mim depositada, por estar sempre disposto a ajudar, pela compreensão, pela divisão de conhecimentos e experiência. Foste muito mais que um orientador, foste um amigo em que me aconselhou e tranquilizou a respeito das minhas preocupações acerca do futuro,

À minha coorientadora professora Daniela, a qual na graduação me apresentou esse lindo mundo imunológico. Agradeço por ter esse “coração de mãe” e me conceder a oportunidade e confiança em trabalhar com o seu grupo de pesquisa, por estar presente em todas as etapas, pela preocupação, “puxões de orelha” e pela construção de conhecimentos que adquiri desde a graduação até os dias de hoje.

Meus orientadores, José Edson e Daniela, vocês possuem um papel fundamental para o meu amadurecimento. O cuidado com que vocês dispensaram a mim foi o bastante para perceber que o doutorado é uma soma de valores: conhecimento, respeito, responsabilidade, compreensão e amizade. Tenham certeza que vocês cumpriram os seus papéis de disseminadores do conhecimento.

Às minhas queridas Karla e Pâmela, pelo dedicação e colaboração nas dosagens laboratoriais realizadas no LAC.

Ao meu colega Luiz, pela dedicação e responsabilidade em realizar as coletas sanguíneas.

Ao meu aluno de iniciação-científica Matheus, pela responsabilidade, dedicação, pela parceria, apoio e principalmente amizade em que pude dividir não só as alegrias, mas também as angústias perante as dificuldades encontradas ao longo dessa trajetória.

À minha querida amiga Karine, a qual admiro sua inteligência e dedicação desde quando fomos colegas na graduação. Pacientemente me ensinou as técnicas as quais por desconhecimento eram temidas por mim, por me socorrer em diferentes fases dessa trajetória estando sempre disposta a ajudar, por me mostrar que a força interior é maior que qualquer obstáculo, por rir em nossos momentos de “pânico compartilhado”, enfim, por ser essa guerreira a qual admiro muito.

À minha querida colega Lara, por pacientemente compartilhar o seu conhecimento, conversas e risos.

À minha querida colega Renata, por ser essa pessoa tão doce e benevolente, por torcer por mim em diferentes momentos, pelas conversas, risos e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao meu colega Cláudio, o qual foi meu professor na graduação e o reencontrei no doutorado. Obrigada por compartilhar o seu conhecimento e estar sempre disposto a auxiliar.

À minha colega Dani Passos, pela dedicação e estar sempre disposta a ajudar.

A todos do grupo do Labibio, pelo convívio, auxílio e compartilhamento de conhecimento!

À minha querida amiga Dani Gardini, por mesmo longe ser uma pessoa tão presente na minha vida. Agradeço pelas vibrações positivas, pelo apoio, risos, compartilhamento de ideias, planos, sonhos, anseios e por nossos momentos de divagações a respeito da vida.

À minha querida amiga Flor, por também mesmo longe ser uma pessoa iluminada, que me aconselha, vibra pelas minhas conquistas e me auxilia nesse processo de constante evolução em que nos encontramos.

Às minhas pacientes do HUSM e da UBS Wilson Paulo Noal por colaborarem voluntariamente nessa pesquisa com suas amostras e compartilhando suas histórias.

Enfim, a todos que cruzaram pelo meu caminho saibam que direta ou indiretamente vocês contribuíram nessa trajetória deixando um pouco das suas energias e luz! Simplesmente...gratidão!!

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa na nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”

Charlies Chaplim

As nuvens sempre passam. Podem ser claras ou escuras, mas sempre passam. Talvez tenha que chover uma tempestade, mas ela também passa. Compreenda que você não é a nuvem, você é o céu.

Sri Prem Baba

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS, ATIVIDADE DA E-NTPDASE E DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES NORMOTENSAS E COM PRÉ-ECLÂMPSIA

AUTOR: Taís Corrêa Almeida

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

COORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

A pré-eclâmpsia constitui-se na complicação médica mais encontrada na gravidez, sendo responsável pela principal causa da mortalidade e morbidade materna e perinatal. Sua etiologia ainda permanece desconhecida, o que dificulta a prevenção primária. Sabe-se que a gestação possui um desequilíbrio hemostático com tendência à hipercoagulabilidade e aumento do risco de trombose. Essas alterações envolvem a sinalização purinérgica, a qual é composta por nucleotídeos e nucleosídeos, seus respectivos receptores, além de enzimas responsáveis por sua degradação. Durante o processo inflamatório, dentre os mediadores capazes de modular as ações das plaquetas, destacam-se ATP, ADP, AMP e adenosina, os quais se correlacionam diretamente com a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-NPP e E-ADA. Os nucleotídeos da adenina podem interagir com receptores purinérgicos na superfície celular. Os efeitos do ATP extracelular são controlados pela ação das ectonucleotidasas E-NTPDase e Ecto-5'-nucleotidase, que agem sobre o ATP e seus produtos de degradação, reduzindo sua concentração no meio e culminando na produção de adenosina, que atua como imunomodulador ou é convertida à inosina pela adenosina desaminase (E-ADA). Considerando que as alterações hemostáticas e inflamatórias associadas à gestação normal estão mais exacerbadas na PE torna-se relevante o estudo desses mecanismos como forma de entender o perfil desse desequilíbrio podendo atuar preventivamente. Sendo assim, realizou-se a análise de parâmetros plaquetários, assim como atividade e expressão da E-NTPDase e Ecto-5' nucleotidase em 150 mulheres divididas em três grupos: não-gestante ($n = 50$), gestante normotensa ($n = 50$) e gestante com PE ($n = 50$). Os resultados demonstraram um aumento de 74 ($P < 0,001$) e 72% ($P < 0,01$) da agregação plaquetária na adição de $5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$, respectivamente, do agonista adenosina difosfato (ADP); redução de 19% ($P < 0,05$) da contagem de plaquetas; aumento de 39% ($P < 0,05$) do fração de plaquetas imaturas (IPF); aumento de 7 vezes ($P < 0,001$) na atividade da E-ADA; redução de 37 ($P < 0,001$) e 36% ($P < 0,05$) na hidrólise do ATP e ADP, respectivamente e uma correlação entre contagem de plaquetas, IPF, atividade e expressão da E-NTPDase e da Ecto-5'-nucleotidase em gestantes com PE. Em conjunto, os resultados sugerem que a disfunção endotelial presente em gestantes com PE exacerba os mecanismos inflamatórios e de agregação plaquetária. O organismo tenta reagir frente a esse microambiente inflamatório através da hidrólise reduzida do ATP, com consequente inibição plaquetária. No entanto, esse mecanismo não parece ser suficiente, já que a doença é mantida. Portanto, o processo de agregação plaquetária assim como a sinalização purinérgica parece desempenhar um papel importante na resposta imune e inflamatória contribuindo para a evolução clínica da PE. Consequentemente a avaliação desses parâmetros podem levar ao desenvolvimento de protocolos para prevenir ou tratar essa patologia de forma eficaz.

Palavras-chaves: Pré-eclâmpsia. Plaquetas. Fração de plaquetas imaturas. Sistema purinérgico.

ABSTRACT

EVALUATION OF PLATELET INDEX AND ACTIVITY OF NTPDASE AND ECTO-5'-NUCLEOTIDASE IN PLATELETS OF NORMOTENSIVE AND PREECLAMPTIC PREGNANT WOMEN

AUTHOR: Taís Corrêa Almeida

ADVISOR: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

CO-ADVISOR: Prof.^a. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Preeclampsia is the most common medical complication in pregnancy, accounting for the main cause of maternal and perinatal mortality and morbidity. Its etiology remains unknown which makes primary prevention difficult. It is a fact that gestation has a hemostatic imbalance with a tendency to hypercoagulability and an increased risk of thrombosis. These changes involve the purinergic signaling, which is composed of nucleotides and nucleosides, their respective receptors, and enzymes responsible for their degradation. During the inflammatory process, ATP, ADP, AMP and adenosine, which correlate directly with the activity of E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-NPP and E-ADA. Adenine nucleotides may interact with purinergic receptors on the cell surface. The effects of extracellular ATP are controlled by the ectonucleotidases E-NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase, which act on ATP and its degradation products, reducing its concentration in the medium and culminating in the production of adenosine, which acts as an immunomodulator or is converted to inosine by adenosine deaminase (E-ADA). Considering that hemostatic and inflammatory changes associated with normal pregnancy are more exacerbated in PE, it becomes relevant to study these mechanisms as a way of understanding the profile of this imbalance and act preventively. Therefore, the analysis of platelet parameters, as well as activity and expression of E-NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase were performed in 150 women divided into three groups: non-pregnant ($n = 50$), normotensive pregnant women ($n = 50$) and pregnant women with PE ($n = 50$). The results showed an increase of 74 ($P < 0.001$) and 72% ($P < 0.01$) in platelet aggregation in the addition of 5 μM and 10 μM , respectively, of adenosine diphosphate agonist (ADP); reduction of 19% ($P < 0.05$) of platelet count; 39% ($P < 0.05$) increase in immature platelet fraction (IPF); 7-fold increase ($P < 0.001$) in the E-ADA activity; reduction of 37 ($P < 0.001$) and 36% ($P < 0.05$) in the hydrolysis of ATP and ADP, respectively, and a correlation between platelet count, IPF, E-NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase activity and expression in pregnant women with PE. Together, these results suggest that the endothelial dysfunction present in pregnant women with PE exacerbates the inflammatory and platelet aggregation mechanisms. The organism reacts to this inflammatory microenvironment through the reduced hydrolysis of ATP, with consequent platelet inhibition. However, this mechanism does not seem to be sufficient to overcome the disease since the disease is maintained. Therefore, the process of platelet aggregation as well as purinergic signaling seems to play an important role in the immune and inflammatory responses contributing to the clinical evolution of PE. Consequently, the evaluation of these parameters can lead to the development of protocols to prevent or treat this pathology effectively.

Keywords: Preeclampsia. Platelets. Fraction of immature platelets. Purinergic system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Distribuição entre os países da desordem hipertensiva como causa de morte materna	22
Figura 2 – Abordagem ao diagnóstico da hipertensão gestacional e da pré-eclâmpsia com base na classificação modificada da ACOG	24
Figura 3 – Evolução história sobre o entendimento da pré-eclâmpsia	27
Figura 4 – Estabelecimento da circulação intervilosa materna	29
Figura 5 – Funções plaquetárias na hemostasia	32
Figura 6 – Ativação da cascata de coagulação	33
Figura 7 – Citograma da contagem óptica de plaquetas pelo analisador hematológico Sysmex XE2100	37
Figura 8 – Sinalização purinérgica	38

MANUSCRITO I

Figure 1. Platelet aggregation with agonist adenosine diphosphate (ADP). 1A. Platelet aggregation with agonist adenosine diphosphate (ADP) 05 μ M in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE). 1B. Platelet aggregation with agonist adenosine diphosphate (ADP) 10 μ M in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE).	68
Figure 2. Immature platelet fraction (IPF) platelets in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE)	69
Figure 3. ADA activity in the platelets in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE)	70
Figure 4. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) activity [hydrolysis of ATP (A) and ADP (B)] and Ecto-5'-nucleotidase [hydrolysis of AMP (C)] in platelets in nonP, NP and PE group	71
Figure 5. Correlation between platelet count, IPF, enzymatic activity and expression of E-NTPDase and E-5'-nucleotidase hydrolysis in the platelets in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE)	72

MANUSCRITO II

Figure 1. Factors influencing the change in purinergic signaling in preeclampsia	101
Figure 2. Involvement of risk factors in preeclampsia	102

DISCUSSÃO

Figura 9 – Resumo esquemático - Gestantes com pré-eclâmpsia 108

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Definição da pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia severa	25
--	----

MANUSCRITO I

Table I – Demographic and clinical data	73
Table II – Table coagulation parameters of patients	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Ca ²⁺	Íon cálcio
CD62P	Selectina-P
E-ADA	Ecto-Adenosina Desaminase
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
E-NPP	Nucleosídeo Pirofosfato/Fosfodiesterase
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
FT	Fator Tissular
GP	Glicoproteína
HELLP	<i>Hemolytic anemia, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count.</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-1 β	Interleucina 1- beta
IL-6	Interleucina 6
IL-18	Interleucina 4
IPF	Fração de Plaquetas Imaturas
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
PE	Pré-eclâmpsia
PG	Prostaglandina
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
TXA2	Tromboxano A2
VPM	Volume Plaquetário Médio

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A –	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	126
APÊNDICE B –	FORMULÁRIO DOS PACIENTES	128

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	– CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	129
ANEXO B	– CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I	134
ANEXO C	– CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II	135

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 PRÉ-ECLÂMPSIA	22
2.1.1 Epidemiologia e definição	22
2.1.2 Uma visão histórica	25
2.1.3 Fisiopatologia	27
2.1.4 Fatores de risco	30
2.2 PLAQUETAS	30
2.2.1 Aspectos gerais	30
2.2.2 Gestação e o envolvimento de plaquetas	33
2.3 ÍNDICES PLAQUETÁRIOS	34
2.3.1 Volume Plaquetário Médio e a Associação com Patologias	35
2.3.2 Plaquetas imaturas	36
2.3 SISTEMA PURINÉRGICO	38
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVOS GERAIS	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MANUSCRITOS	44
4.1 MANUSCRITO I	45
4.2 MANUSCRITO II	75
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÃO	110
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	126
APÊNDICE B – FORMULÁRIO DOS PACIENTES	128
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	129
ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I	134
ANEXO C – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II	135

APRESENTAÇÃO

Esta tese está escrita da seguinte forma: primeiro são apresentados a introdução, a revisão bibliográfica e os objetivos. A seguir, a metodologia e os resultados estão apresentados na forma de dois manuscritos. Os itens discussão e conclusão contêm interpretações e comentários gerais referentes aos manuscritos. Por fim, as referências bibliográficas apresentadas no final da tese referem-se às citações que aparecem nas seções introdução, revisão bibliográfica, discussão e conclusão. Salienta-se que a formatação dessa tese atende à MDT de 2015 da UFSM.

1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios hipertensivos são uma das complicações mais frequentes da gestação e contribuem significativamente para a morbidade e mortalidade materna e fetal (AMARAL et al., 2017; CORREA et al., 2016). As gestantes hipertensas estão predispostas ao desenvolvimento de diversas complicações como deslocamento de placenta, coagulação intravascular disseminada e doença renal aguda (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; GOEL et al., 2014; WU et al., 2015). Destaca-se a importância da diferenciação entre os distúrbios hipertensivos de uma doença potencialmente mais ameaçadora, como a pré-eclâmpsia (PE). Essa distinção é essencial devido às considerações de tratamento e prognóstico que impactam fortemente no manejo do paciente. A PE é uma síndrome específica da gestação caracterizada por disfunção placentária e uma resposta materna levando à inflamação sistêmica com a ativação do endotélio e da coagulação (CHAIWORAPONGSA et al., 2014; DOUGLAS B. CINES, 2017; YANG et al., 2014). Essa doença multifatorial evidencia-se por um conjunto de sinais e sintomas com anormalidades hematológicas e bioquímicas associadas. Caracteriza-se, principalmente pela elevação da pressão arterial, proteinúria patológica e edema após a vigésima semana de gestação. No entanto, as manifestações clínicas desta síndrome são muito heterogêneas (ANDRIETTI et al., 2016; BEZERRA MAIA E HOLANDA MOURA et al., 2012; BRETT C. YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010; COSTA, 2015; LI et al., 2015; MABRY-HERNANDEZ; ROMANO, 2018).

A integridade do endotélio materno é crucial para a adaptação fisiológica em uma gestação normal. No entanto, a disfunção generalizada faz parte da patologia multissistêmica da PE (CHAIWORAPONGSA et al., 2014; GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Mulheres com distúrbios clínicos preexistentes caracterizados por disfunção endotelial, como a hipertensão e o diabetes, assim como os fatores de risco cardiovascular predispõem gestantes à PE (MAYNARD; KARUMANCHI, 2011; SAN MARTÍN; SOBREVIA, 2006; STEEGERS et al., 2010). Além disso, os fatores genéticos e imunológicos referentes à mãe e ao feto estão fortemente relacionados ao desenvolvimento da PE. Os fatores de risco para a PE constituem em importantes sinais de alerta para que se encaminhe a gestante a um tratamento adequado.

Diversos estudos têm sido direcionados ao papel do endotélio vascular na adaptação cardiovascular à gestação e na patogenia da PE (CHARNOCK-JONES, 2016; ESCUDERO; SOBREVIA, 2008; TAN; TAN, 2013; UZAN et al., 2011). O dano vascular provoca o aumento da permeabilidade capilar favorecendo a trombose plaquetária e elevação do tônus vascular. Sendo assim, acredita-se que a ativação da cascata da coagulação tem um papel

importante na patogênese dessa doença. Consequentemente, as plaquetas vêm assumindo um papel relevante na fisiopatologia da PE. Há evidências de que a ativação e agregação plaquetária precedam o aparecimento dos sintomas clínicos (EVERETT et al., 2014; MORAES et al., 2015). As plaquetas são consideradas estruturas heterogênicas a respeito do seu volume e densidade. Entre os índices plaquetários, vem merecendo destaque o volume plaquetário médio (VPM), por se tratar de variável biológica que determina a função e atividade plaquetária (ALTINBAS et al., 2012; CEYHAN et al., 2006; KASHANIAN et al., 2013). A importância clínica de volumes plaquetários maiores tem sido relacionada com a presença de agregação plaquetária aumentada, visto que há estudos demonstrando esse processo em gestantes com PE (JÄREMO et al., 2000; LATTOVA et al., 2013). Outro parâmetro associado à hipercoagulabilidade é a fração de plaquetas imaturas (IPF), a qual é classificada como marcador clínico da trombocitopoiese. A IPF tem sido sugerida como um índice sensível para monitorar mudanças na produção e destruição plaquetária (EVERETT et al., 2014; MORAES et al., 2015). Sendo assim, este parâmetro seria uma ferramenta precoce de detecção da alteração das plaquetas anteriormente ao aparecimento do VPM aumentado em gestantes pré-eclâmpticas.

Tendo em vista que a PE possui um estado de hipercoagulabilidade e de inflamação mais acentuado que as gestações normais a avaliação da resposta imune se torna interessante. Um importante sistema envolvido nas vias de biossinalização capaz de modular as respostas imunes e inflamatórias é o sistema purinérgico. Esse sistema estabelece suas funções através de três componentes principais: nucleotídeos e/ou nucleosídeos, receptores purinérgicos e enzimas específicas. Os nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) e seu derivado adenosina, são secretados por plaquetas, leucócitos e células endoteliais danificadas. Representam uma importante classe de moléculas extracelulares que desempenham um papel importante na modulação da resposta imune (BURNSTOCK, 2015; KOSZALKA et al., 2004). Essas moléculas interagem com os receptores purinérgicos presentes na superfície celular e desencadeiam uma cascata de eventos que modulam diversos processos biológicos como a agregação plaquetária e a inflamação (BURNSTOCK, 2014; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). O trifosfato de adenosina (ATP) é liberado nos tecidos danificados gerando resposta inflamatória. Esse nucleotídeo possui a capacidade tanto para induzir quanto para inibir a agregação plaquetária. Em baixas concentrações o ATP aumenta a quantidade de colágeno, aumentando assim, a agregação plaquetária. Já em altas concentrações inibe a agregação plaquetária causada pela adenosina difosfato (ADP), provavelmente devido ao fato do ATP ser hidrolisado em adenosina, a qual é inibidora da atividade plaquetária (BOURS et

al., 2006; BURNSTOCK, 2015; ROSA et al., 2007). O ADP no meio extracelular atua como mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregatório após danos teciduais. A adenosina, metabólito da degradação de nucleotídeos da adenina, desempenha funções importantes como efeitos neuromodulatórios, regulação de processos inflamatórios, inibição da agregação plaquetária e vasodilatação, sendo considerada um agente cardioprotetor (BOURS et al., 2006; MENZIES et al., [s.d.]; VIRGILIO; VUERICH, 2015). As moléculas de nucleotídeos após desempenhar suas funções orgânicas, devem ser degradadas de modo a manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. Para isto, existe um sistema responsável pelo controle dos seus níveis extracelulares, exercido por enzimas ancoradas na membrana plasmática das células, como plaquetas, linfócitos e células endoteliais. As enzimas que hidrolisam nucleotídeos são conhecidas como ecto-nucleotidases e podem ser classificadas como família das E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase ou apirase; EC 3.6.1.5), família das E-NPP (nucleosídeo pirofosfato/fosfodiesterase; EC 3.1.4.1), fosfatases alcalinas e E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima E-5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001). Ainda, seguindo a sequência de degradação dos nucleotídeos, existe a enzima E-ADA (adenosina desaminase; EC 3.5.4.4), a qual regula as concentrações de adenosina, através da conversão e formação de inosina (BOURS et al., 2006; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Além de possuírem importante atividade na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, as ectoenzimas possuem ações extremamente importantes no sistema imunológico (YEGUTKIN, 2008; YEGUTKIN; SAMBURSKI; JALKANEN, 2003). A E-NTPDase inicia a cascata de hidrólise de nucleotídeos da adenina, sendo conhecida como um marcador de superfície celular (CD39). Em plaquetas intactas, essa enzima está envolvida na regulação de nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular. Estudos indicam que a CD39 se constitui em um potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos (ALLARD; LONGHI; JOHN, 2017; LA SALA et al., 2003). Por sua vez, a enzima E-5'-nucleotidase é um marcador de superfície celular (CD73), o qual hidrolisa o AMP em adenosina. É uma glicoproteína intrínseca da membrana plasmática encontrada em diferentes tipos celulares, como as plaquetas e tecido nervoso. Na vasculatura, a E-5'-nucleotidase é predominantemente

associada ao endotélio vascular de grandes vasos, como a aorta, artéria carótida e coronária (YEGUTKIN, 2008).

Considerando a complexidade da PE, bem como as lacunas existentes na literatura este estudo se justificou para gerar conhecimentos que poderão resultar em benefícios para o diagnóstico, bem como para o entendimento da fisiopatologia da PE. Embora estudos prévios tenham apresentado alterações no sistema purinérgico na membrana das plaquetas de gestantes, a participação dos nucleotídeos no desenvolvimento da doença ainda é pouco explorada. Portanto, torna-se relevante analisar os padrões plaquetários e atividade e a expressão de enzimas do sistema purinérgico na superfície de plaquetas durante a PE. O entendimento no papel das plaquetas na fisiopatologia da PE é de grande valor, visto que podem se tornar importantes marcadores precoces do desenvolvimento desta doença.

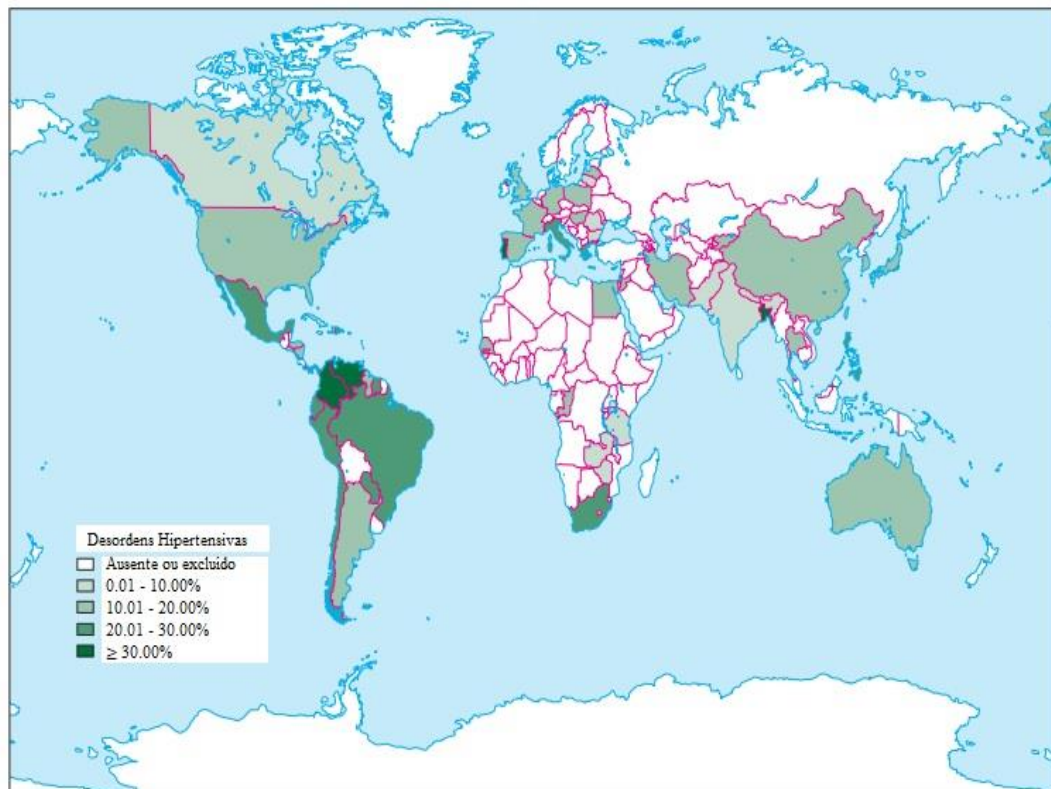
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRÉ-ECLÂMPSIA

2.1.1 Epidemiologia e definição

Os distúrbios hipertensivos correspondem às complicações mais frequentemente encontradas nas gestantes. Na América Latina, são responsáveis por 26% da causa de morte materna (KHAN et al., 2006; SAY et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição entre os países da desordem hipertensiva como causa de morte materna



Fonte: Adaptação de Say et al. (2014).

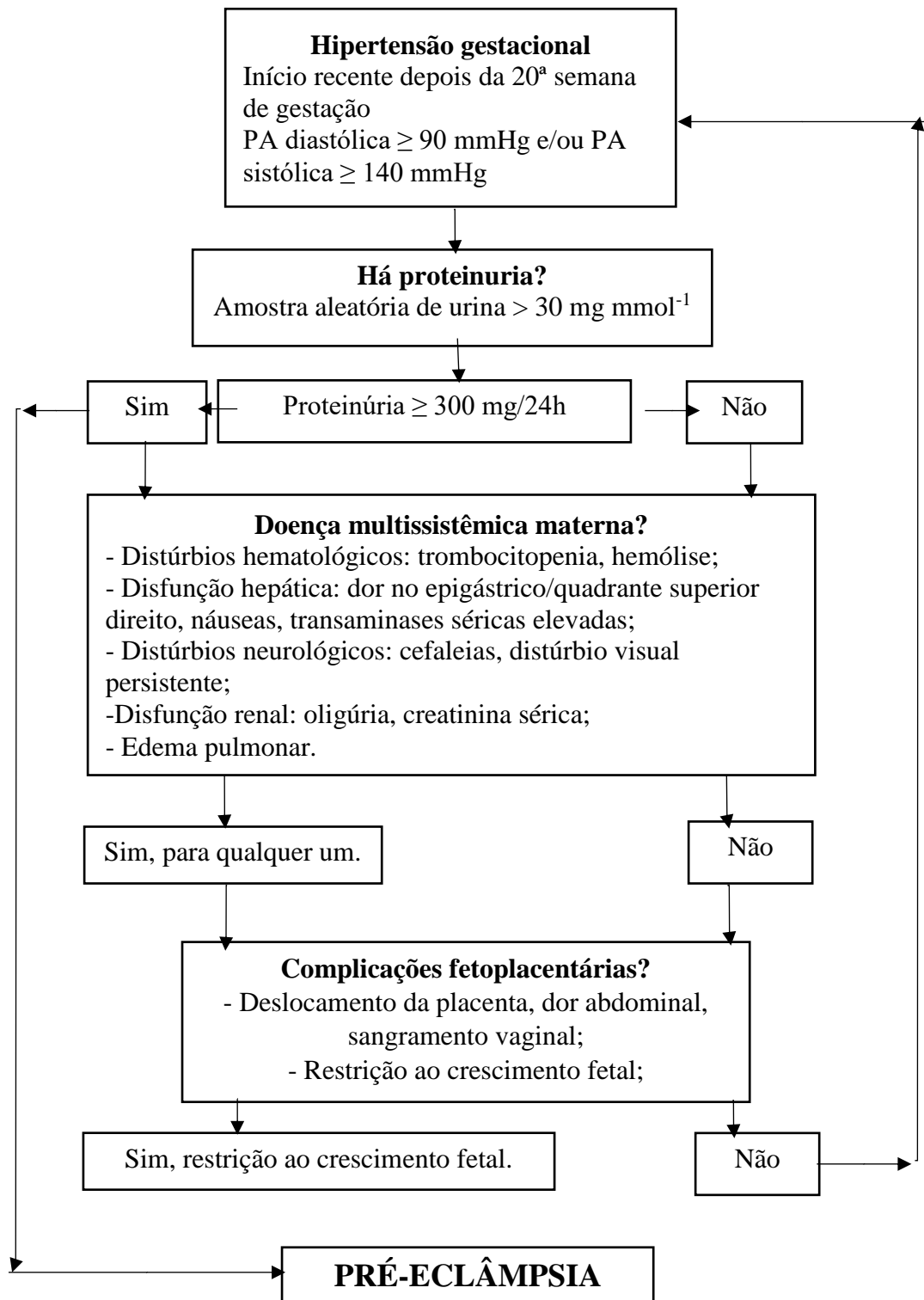
A pré-eclâmpsia (PE) é um distúrbio específico da gestação e afeta em torno de 3 – 5% das mulheres grávidas em todo o mundo (KHAN et al., 2006). Esse percentual poderá ser maior em ambientes socioeconômicos menos favoráveis e em países com maior prevalência de doença cardiovascular (CURIEL-BALSERA et al., 2011). Em países em desenvolvimento,

nos quais os cuidados com a saúde são limitados, a PE é uma das principais causas da morte materna, causando uma estimativa de mais de 60 mil mortes anuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Já nos países desenvolvidos, a indução ao parto prematuro para proteger a saúde da mãe pré-eclâmptica resulta em significativa morbimortalidade para o neonato, devido às sequelas da prematuridade e baixo peso ao nascer (YOUNG et al., 2010).

Com base na classificação de *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) (Figura 2) a PE é definida como pressão arterial elevada após a 20ª semana de gestação (≥ 140 mmHg sistólica e ≥ 90 mmHg diastólica) associada com proteinúria de ≥ 300 mg/24H (NORTH et al., 2011; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

A PE pode ser classificada em duas fases: a primeira é assintomática (PE leve), caracterizada pelo crescimento placentário anormal durante o primeiro trimestre da gestação, produzindo uma quantidade excessiva de materiais placentários na circulação materna (REYNA-VILLASMIL et al., 2011). A produção desses fatores faz com que se constitua a segunda fase da pré-eclâmpsia (PE grave) a qual passa a ser sintomática, tipicamente caracterizada pelo aparecimento da hipertensão associada à disfunção dos órgãos maternos, incluindo o cérebro, fígado, rim e placenta após 20ª semana de gestação. As manifestações clínicas da lesão dos órgãos pode incluir proteinúria, insuficiência renal, doença hepática, problemas neurológicos, distúrbios, hematológicos ou restrição do crescimento fetal (Tabela 1) (ARULKUMARAN; LIGHTSTONE, 2013; SIBAI, 2013). Caso a pré-eclâmpsia não for tratada poderá evoluir para um estado convulsivo conhecido como eclâmpsia. Por muito tempo, acreditou-se que a eclâmpsia fosse o resultado final da pré-eclâmpsia, justificando a origem do termo. Hoje, está claro que as convulsões constituem apenas uma das manifestações clínicas da PE grave. As complicações clínicas da PE advém principalmente da elevada pressão intravascular juntamente com o endotélio lesado, o que provoca movimento do líquido dos espaços intravascular para o extravascular, tendo como consequência, edema no cérebro, retina, pulmões, fígado e tecidos subcutâneos. A hipertensão e o dano endotelial levam à proteinúria. O movimento do fluido no espaço intravascular para os tecidos subcutâneos produz edema, sintoma característico da PE (KONGWATTANAKUL et al., 2018).

Figura 2 – Abordagem ao diagnóstico da hipertensão gestacional e da pré-eclâmpsia com base na classificação modificada da ACOG



Fonte: Adaptação de North et al. (2006).

Tabela 1 – Definição da pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia severa

Pré-eclâmpsia leve	Pré-eclâmpsia severa
1. Pressão sanguínea sistólica: ≥ 140 mmHg ou diastólica ≥ 90 mmHg após a 20ª semana de gestação em uma mulher normotensa.	1. Pressão sanguínea sistólica: ≥ 160 mmHg ou diastólica ≥ 110 mmHg em 2 ocasiões separadas em pelo menos 6h de intervalo.
E	OU
2. Proteinúria ≥ 300 mg em uma coleta de urina de 24h.	2. Proteinúria $\geq 1g$ em uma coleta de 24h e associada com pré-eclâmpsia. 3. Envolvimento de órgãos-alvo em associação com a pré-eclâmpsia: a) Oligúria (<400 ml/dia); b) Trombocitopenia c) Testes de função hepática prejudicados; d) Dor epigástrica/quadrante superior direito; e) Perturbações cerebrais ou visuais; f) Edema pulmonar.

Fonte: Adaptação de Arukulmaran et al. (2013).

Além disso, em torno de 19% das pacientes com pré-eclâmpsia podem evoluir para um quadro com hemólise, níveis elevados de enzimas hepáticas e contagem baixa de plaquetas o que constitui a síndrome HELLP, que está associada ao aumento da morbimortalidade perinatal (CURIEL-BALSERA et al., 2011). O termo HELLP é o acrônimo utilizado para descrever hemólise (do inglês, *hemolysis*), enzimas hepáticas elevadas (do inglês, *elevated liver enzymes*) e plaquetas baixas (do inglês, *low platelets*). A causa exata da HELLP é desconhecida, mas a ativação geral da cascata de coagulação é considerada o principal problema subjacente. Isto leva a uma anemia hemolítica microangiopática e ao consumo de plaquetas (MIRANDA et al., 2011). Sendo assim, é um achado extremo do espectro de alterações que ocorrem na hipertensão induzida pela gestação e como seus sinais e sintomas são confundidos com os da pré-eclâmpsia grave (dor epigástrica ou no quadrante superior direito, náusea e mal-estar), as formas leves podem não ser diagnosticadas. Assim, a sua identificação ocorre quando a síndrome HELLP está bastante avançada (KONGWATTANAKUL et al., 2018).

2.1.2 Uma visão histórica

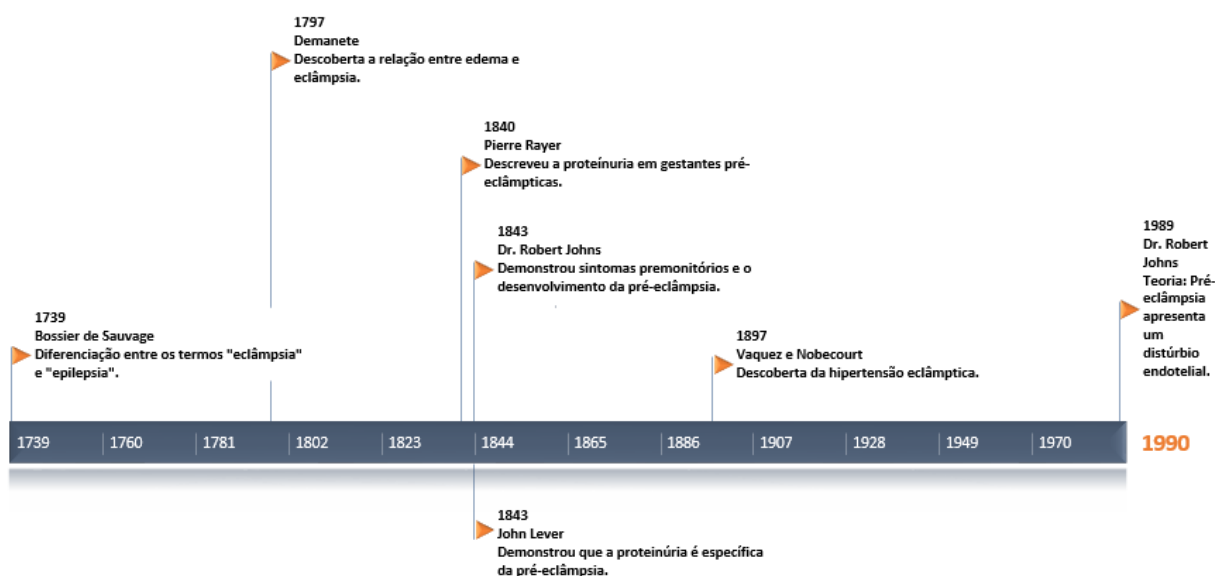
Os distúrbios decorrentes da gestação sempre despertaram a curiosidade da humanidade. Registros datados em 3.000 a.C, em países de diferentes continentes, referem crises convulsivas em mulheres grávidas. Mesmo antes da invenção dos escritos se tem

indícios de ocorrência de eclâmpsia na história. Uma sepultura datada em 28.000 a.C, considerada a “mãe humana mais antiga” foi encontrada por paleontólogos, sendo descrita como uma mulher de 20 anos enterrada com o bebê no seu útero com aproximadamente 8 meses de gestação, o qual se propõe que tenha ido à óbito devido à eclâmpsia (ROBILLARD et al., 2018). Deste então, as convulsões associadas ao parto têm constantemente acompanhado a humanidade como uma possível eventualidade durante a gestação. Fato que justifica o nome da doença, já que eclâmpsia deriva da palavra grega *eclamptis* que significa relâmpago, refletindo o início súbito de convulsões em mulheres grávidas. Como as convulsões epiléticas provocam contrações musculares involuntárias, distúrbios visuais, movimentos incomuns na cabeça ou nos olhos, alterações na boca, perda da consciência e amnésia completa após o evento, esses sintomas foram interpretados em todas as civilizações como uma possessão do mau espírito ou que alguém tinha lançado um feitiço sobre a gestante (ROBILLARD et al., 2017).

Ao longo dos anos e de estudos observacionais o homem foi buscando esclarecimentos a respeito dessa patologia (Figura 3). No entanto, apenas no século XVIII (1739) ocorreu a diferenciação entre os termos: epilepsia e eclâmpsia proposto por Bossier de Sauvage, uma vez que constatou que a eclâmpsia é de natureza aguda e cessa quando o evento precipitante é removido diferentemente do que ocorre com a epilepsia (MANDY J. BELL, 2010). No ano de 1797, Demanet observou a ligação existente entre o edema e a eclâmpsia em mulheres gestantes. Pierre Rayer é conhecido por ter sido o primeiro a descrever proteinúria em gestantes eclâmpticas, no ano de 1840. Esse conhecimento auxiliou John Lever, no ano de 1843, a demonstrar pela primeira vez que a proteinúria que acompanhava a eclâmpsia era específica da doença e não fazia parte de um distúrbio geral (MANDY J. BELL, 2010). Além disso, no mesmo ano, o Dr. Robert Johns descreveu a conexão entre os sintomas premonitórios durante os últimos meses da gestação e o desenvolvimento de convulsões. Esses sintomas incluíam a presença de dor de cabeça, perda temporária da visão, dor severa no estômago e edema nas mãos, braços, pés e face (JOHNS, 1843). O ano de 1897, foi considerado um novo marco para a história da obstetrícia, já que através de Vaquez e Nobecourt realizaram a descoberta da hipertensão eclâmptica. Como resultado dessas contribuições o conceito pré-eclâmptico foi reconhecido. Sendo assim, quando há a presença de edema, proteinúria e dores de cabeça há uma maior preocupação frente a essa gestante já que existe a possibilidade da manifestação de convulsões (CHESLEY, 1984). Até hoje a pré-eclâmpsia é conhecida como a “doença das teorias”. Sendo assim, em 1989 foi postulado a teoria do Dr. Robert e seus colegas, a qual continua orientar pesquisas relacionadas à etiologia

da pré-eclâmpsia e eclâmpsia. Dr. Robert e seus colegas postularam que a pré-eclâmpsia representava um distúrbio endotelial. Baseando-se em trabalhos anteriores e infelizmente de autor desconhecido, a equipe do Dr. Robert associou a pré-eclâmpsia com a invasão superficial de trofoblasto e subsequente redução na perfusão placentária. Com isso, a equipe hipotetizou que o fator circulante causasse disfunção endotelial e levaria a ativação da cascata de coagulação, anormalidades da pressão arterial e perda do líquido do espaço intravascular (ROBERTS et al., 1989).

Figura 3 – Evolução história sobre o entendimento da pré-eclâmpsia



Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1.3 Fisiopatologia

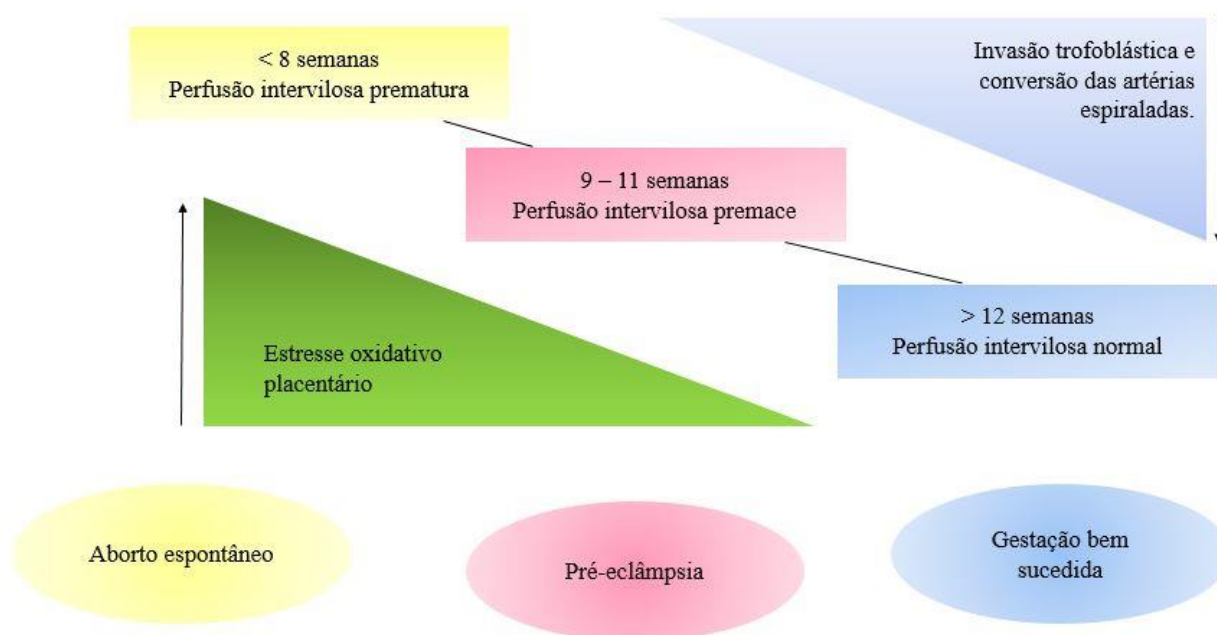
O papel da placenta é fundamental para a etiologia da PE. Uma vez que essa doença ocorre apenas na gestação, uma condição fisiológica na qual células alogênicas de dois indivíduos entram em contato direto. Sabe-se que o desenvolvimento dessa complicação gestacional depende apenas da presença da placenta e não do feto, isso porque a PE ocorre na mola hidatiforme. Além disso, quanto maior a massa placentária, maior o risco de adquirir PE, o que se justifica pela maior incidência de PE em gestações gemelares (FOX et al., 2014). Importante salientar que não existe cura para essa patologia, sendo que a única intervenção capaz de resolver a PE é a retirada da placenta (MC LEAN; REYES; VELARDE, 2017).

A teoria mais aceita para a sua etiopatogenia é a da invasão trofoblástica anormal. Durante a gestação normal, ocorre aumento do fluxo sanguíneo uterino com o objetivo de permitir a perfusão do espaço intervilo da placenta e suportar o crescimento fetal. Sendo assim, ocorre uma transformação fisiológica das artérias espiraladas do útero para que possa receber esse aumento do fluxo sanguíneo. Para isso, os trofoblastos invadem a parede arterial e transformam as artérias espirais de diâmetros estreitos para vasos de grande diâmetro, permitindo a perfusão adequada da placenta (REDMAN, 2011). No entanto, na PE a artéria espiralada não realiza essa transformação fisiológica, provocando uma isquemia úteroplacentária. Além disso, as artérias espiraladas não transformadas tornam-se propensas à aterosose, a qual caracteriza-se pela presença de células espumosas na parede da artéria e pela acumulação de depósito de fibrina no lúmen arterial. Isso faz com que haja uma presença de macrófagos carregados de lipídios e infiltrados mononucleares (STAFF; DECHEND; REDMAN, 2013). Essas lesões assemelham-se com as placas ateroscleróticas, as quais supõe-se em serem responsáveis por diversos mecanismos presentes na PE, entre eles a reação imunológica contra o tecido fetal, fluxo sanguíneo anormal com características de cisalhamento e resposta inflamatória sistêmica (STAFF; DECHEND; REDMAN, 2013).

Além disso, a redução do fluxo sanguíneo pode provocar um baixo crescimento fetal, disfunção sistêmica materna devida às substâncias liberadas na placenta isquêmica e conseqüentemente os sintomas da PE. É importante salientar que essa falha na transformação fisiológica das artérias espiraladas não é exclusiva e nem suficiente para causar a PE. Isso porque também observou-se a mesma falha em processos como aborto espontâneo, deslocamento prematuro da placenta e trabalho de parto prematuro (KIM et al., 2002, 2003). Entretanto, os mecanismos responsáveis pela falha na transformação fisiológica das artérias espiraladas ainda não foram elucidados. Existem linhas de pesquisa que indicam que os trofoblastos, responsáveis pela transformação das artérias espiraladas, estejam anormais provocando uma placentação deficiente. O grande aporte de sangue no espaço intervilo da placenta gera um estresse oxidativo nos trofoblastos, promovendo a diferenciação trofoblástica de um fenótipo proliferativo para um invasivo. Sendo assim, esses trofoblastos invadem as artérias espiraladas (TROGSTAD; MAGNUS; STOLTENBERG, 2011). O objetivo central da invasão trofoblástica é fixar a placenta ao útero e transformar as artérias espiraladas em vasos de baixa resistência. Conseqüentemente a invasão trofoblástica também proporciona a comunicação com as células imunes da mãe, produção de hormônios e citocinas, substituição das células endoteliais e angiogênese. Caso ocorra uma inadequada

invasão trofoblástica as consequências são um possível aborto ou a perfusão placentária continua de maneira ineficaz gerando a PE (REDMAN; SARGENT, 2010) (Figura 4).

Figura 4 – Estabelecimento da circulação intervívosa materna



Fonte: Adaptação de Redman et al (2010).

Embora a invasão trofoblástica anormal seja um precursor conhecido do desenvolvimento da PE, não se sabe se a PE é a causa ou o resultado da hipóxia placentária (GRANGER; SPRADLEY; BAKRANIA, 2018; MAKRIS et al., 2007). O que é consenso entre os pesquisadores é que a isquemia placentária provoca a liberação de fatores endoteliais prejudiciais à circulação materna. A redução do suprimento sanguíneo para a placenta leva a função anormal de células endoteliais, possivelmente como resultado de estresse oxidativo. Essa disfunção endotelial resulta em vasoconstrição generalizada, ativação plaquetária, trombose e diminuição do volume plasmático com subsequente redução do suprimento sanguíneo para múltiplos órgãos. Sendo assim, a PE é caracterizada pela disfunção endotelial generalizada e uma resposta inflamatória sistêmica exagerada (MEHER; DULEY, 2011)

2.1.4 Fatores de risco

A identificação apropriada das gestantes que se encontram sob risco aumentado de PE possibilita o encaminhamento adequado à assistência pré-natal, assim como um diagnóstico e início do manejo precoce. Entre os fatores de risco relevantes para o desenvolvimento da doença, destaca-se a má-adaptação imunológica e a incompatibilidade genética.

Acredita-se que o risco que a nuliparidade provoca ao desenvolvimento da PE seja devido ao mecanismo imunológico, uma vez que o organismo materno desenvolve tolerância aos aloantígenos paternos após a exposição ao líquido seminal. Sendo assim, uma prolongada exposição ao sêmen pode servir como maneira de diminuir o risco de desenvolvimento da PE (REDMAN; SARGENT, 2010). Possivelmente esse mesmo mecanismo explique a maior incidência de PE em gestantes que tiveram um menor tempo de coabitação sexual, que se submeteram a processos de inseminação artificial, utilizaram métodos contraceptivos de barreira, mulheres múltiparas que mudaram de parceiros da gestação anterior (REDMAN; SARGENT, 2010). Além disso, estudos demonstram que existe o risco aumentado em adquirir pré-eclâmpsia em 80% se o cônjuge masculino já teve uma gestação anterior que resultou em PE. Com isso, acredita-se que o antígeno leucocitário humano (HLA) específico e fatores seminais (níveis mais baixos de TGF- β) estejam relacionados nessa predisposição genética (BIGGAR et al., 2010).

Como a PE é considerada uma doença multissistêmica, diferentes fatores podem estar relacionados com o risco de seu desenvolvimento. Entre eles destacam-se: idade materna extrema ($17 \text{ anos} \leq e \leq 35 \text{ anos}$), obesidade, diabetes gestacional e hipertensão crônica (MOL et al., 2015).

2.2 PLAQUETAS

2.2.1 Aspectos gerais

Em 1862, Giulio Bizzozero, o chamado "pai da plaqueta", descreveu um "elemento morfológico" novo no sangue com um papel importante na hemorragia e trombose. Seriam então, as plaquetas as quais são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos (MAZZARELLO; CALLIGARO; CALLIGARO, 2001). Esses estão presentes na medula óssea e sua diferenciação e maturação depende da trombopoietina e de interleucinas (IL) IL-3, IL-6 e IL-11. A fragmentação citoplasmática dos megacariócitos ocorre na medula óssea e as

plaquetas são lançadas na circulação, isoladas ou agrupadas. Em condições normais, as plaquetas apresentam diâmetro de 3mm a 4mm e cerca de 1mm de espessura. Não possuem material nuclear e apresentam vida média de oito a dez dias. O intervalo de referência da contagem de plaquetas no sangue periférico é de 150.000 a 400.000/ μ L (MCINTOSH et al., 2018). Por muito tempo acreditou-se que as plaquetas apenas participavam do processo de hemostasia (JURK et al., 2005). Atualmente, está claro que elas exercem um papel essencial nesse processo e apresentam outras funções importantes, como a manutenção do tônus vascular, por meio da secreção de diversas substâncias incluindo serotonina, tromboxano e prostaglandinas (PG) e a liberação de mediadores inflamatórios (KOSZALKA et al., 2004).

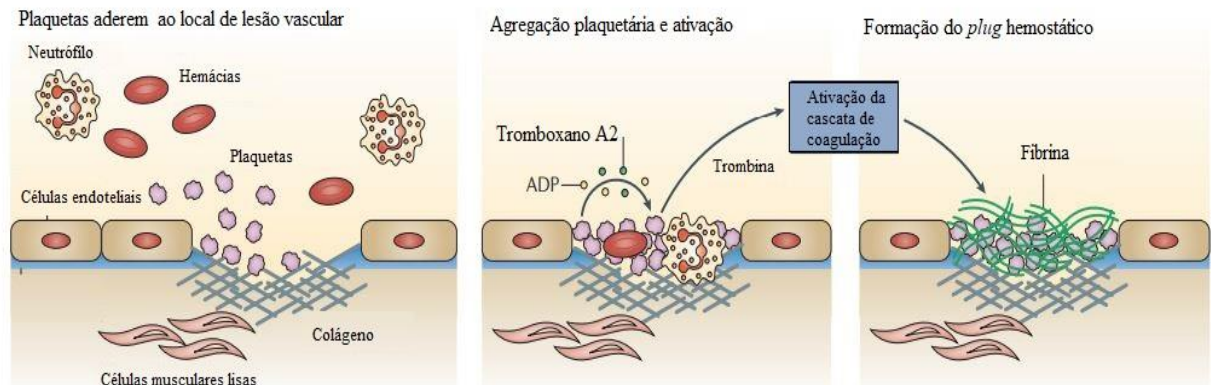
Está bem estabelecida a participação das plaquetas como contribuidoras e moduladoras de diversos distúrbios, uma vez que secretam e expressam um grande número de substâncias mediadoras nos processos de coagulação, inflamação, aterosclerose, podendo incluir a doença arterial coronariana, trombose venosa profunda, doenças mieloproliferativas, fibrilação atrial, câncer, acidente vascular cerebral (AVC), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), doença renal, diabetes, doença intestinal inflamatória e esclerose múltipla (WACHOWICZ et al., 2016). A função das plaquetas no processo hemostático inclui o recrutamento na circulação sanguínea para a matriz subendotelial sempre que ocorre dano vascular e liberação de fator tissular (FT). Quando ativadas, as plaquetas expressam rapidamente glicoproteínas (GP) de superfície que interagem com outras plaquetas, endotélio vascular e células inflamatórias (PANKRATZ et al., 2016).

As reações plaquetárias são mediadas por moléculas de adesão expressas na superfície que estabelecem interações entre plaquetas (homotípicas), leucócitos, células endoteliais e matriz extracelular (heterotípicas) (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011). Uma sucessão de eventos incluindo contato, adesão, ativação, secreção e agregação culmina na formação do *plug* plaquetário, que impede temporariamente a perda sanguínea, conforme a Figura 5.

As plaquetas possuem meia-vida curta de aproximadamente 10 dias (BRIGGS; HARRISON; MACHIN, 2007). Em condições normais, as plaquetas não são ativadas pela superfície endotelial. A camada endotelial monocelular atua como uma superfície antitrombótica, na medida em que não permite a interação das plaquetas com as proteínas subendoteliais e pela produção de prostaciclina I₂ e óxido nítrico, ambos inibidores da ativação plaquetária. As células endoteliais também expressam a enzima CD39, que converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e esta em adenosina monofosfato (AMP), evitando a ativação plaquetária pelo ATP e ADP (OQUELI et al., 2007). A presença

de mecanismo enzimático que hidrolisa ADP na circulação é muito importante para limitar a agregação plaquetária e consequentemente a formação de trombo (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

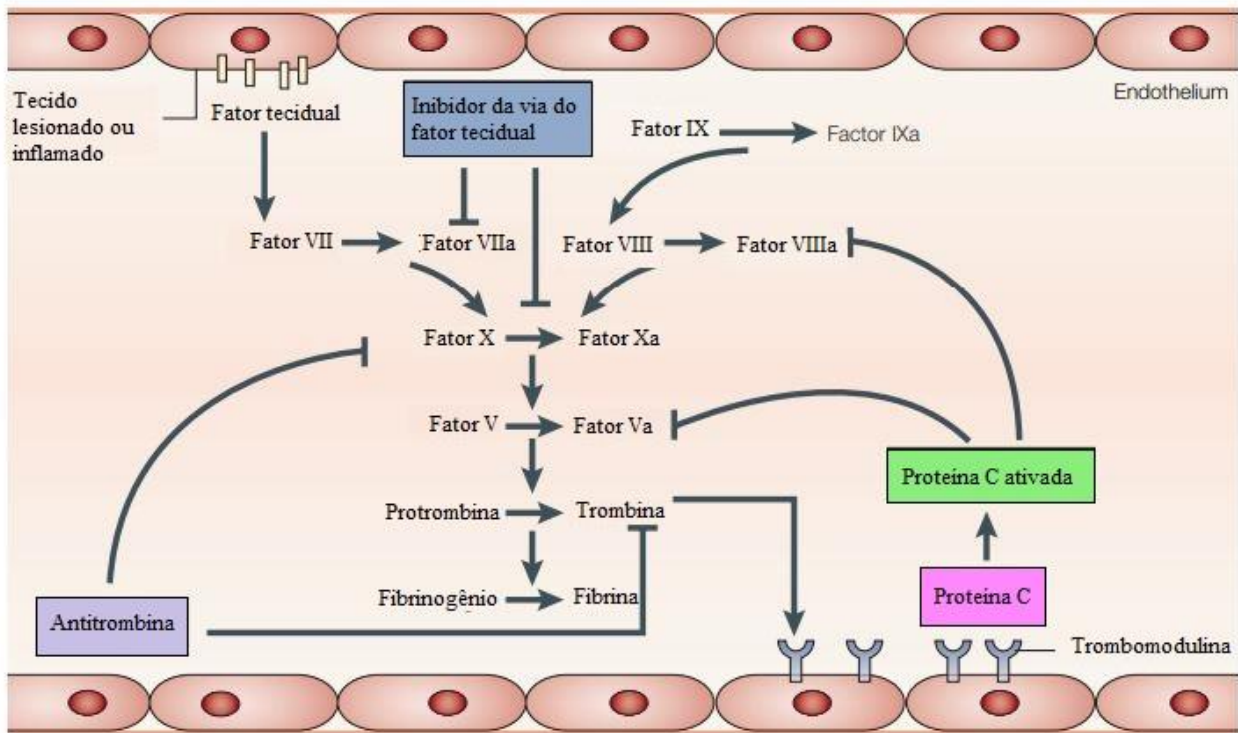
Figura 5 – Funções plaquetárias na hemostasia



Fonte: Adaptação de Semple et al (2011).

Na presença de dano ou trauma vascular, as proteínas subendoteliais, como o fator de *Von Willebrand* e o colágeno, são expostas e a adesão plaquetária ocorre com a finalidade de promover a cicatrização tecidual. A interação entre estas proteínas e as plaquetas acontece através de diversos receptores na superfície plaquetária (GPIb α , GPVI $\alpha 2\beta 1$) e, concomitante à adesão, ocorre a ativação plaquetária. Múltiplas vias metabólicas são estimuladas, causando um aumento na concentração intracelular de cálcio. Este aumento ativa a fosfolipase A2 e a actina-miosina ATPase, levando à formação de tromboxano A2 e à alteração na conformação das plaquetas, respectivamente. Quando ativadas, as plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos (ATP, ADP, serotonina, cálcio, fibrinogênio, fator de *Von Willebrand*, citocinas e fatores pró-trombóticos), o que proporciona seu aumento volumétrico e reatividade. A conexão entre as plaquetas para a formação desse agregado ocorre através da ligação entre o fibrinogênio e o receptor da glicoproteína IIb/IIIa (NURDEN, 2011). Com isso, as plaquetas também contribuem para a hemostasia secundária, ativando a cascata da coagulação, na qual ocorre a formação do coágulo de fibrina, tamponando de forma mais eficiente o local lesado, conforme a Figura 6.

Figura 6 – Ativação da cascata de coagulação



Fonte: Adaptação de Marshall et. al. (2003).

2.2.2 Gestação e o envolvimento de plaquetas

A gestação normal está associada a um estado inflamatório e à exacerbação da coagulação. A hipercoagulabilidade visa proteger a mulher de uma potencial hemorragia no momento do parto. Um aumento fisiológico na concentração de vários fatores da coagulação e uma hiperativação plaquetária, mediada pela elevação de cálcio, tem sido observado ao longo da gestação (SOUZA; BATISTA FILHO; FERREIRA, 2002).

Um papel importante na fisiopatologia da pré-eclâmpsia tem sido atribuído às plaquetas. Isso porque se acredita que a ativação e agregação das plaquetas precedam o aparecimento dos sintomas clínicos (CHAIWORAPONGSA et al., 2014). Atualmente, está bem estabelecido que as plaquetas, além da ação essencial no processo hemostático, participam da resposta inflamatória (FREITAS et al., 2014). A contagem de plaquetas normalmente decresce na PE, mas somente cerca de 18% das pacientes desenvolvem plaquetopenia (BERGMANN; RATH, 2015; LEAL et al., 2007). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a plaquetopenia, como a geração de trombina na presença de imunocomplexos circulantes e lesão vascular, a agregação plaquetária e a destruição mediada

por mecanismos imunes. Na PE, a membrana plaquetária apresenta uma composição lipídica anormal, com um aumento da relação colesterol/fosfolípide, aumento da atividade da proteína quinase C no citosol e na membrana das plaquetas, além de uma redução da atividade da Na^+/K^+ ATPase. No entanto, a atividade da Ca^{2+} ATPase permanece elevada como na gestação normal (KAZMI et al., 2011).

Dados da literatura revelam que as desordens hipertensivas na gestação cursam com ativação plaquetária, elevação dos níveis de fibrinogênio e moléculas de adesão, derivadas do endotélio vascular (GARDINER; VATISH, 2017). Com a ativação plaquetária ocorre uma mudança conformacional da GPIIb/IIIa, localizada na superfície das plaquetas, favorecendo a ligação ao fibrinogênio, a agregação plaquetária e liberação do conteúdo dos seus grânulos. A degranulação contribui para alterações vasculares placentárias e sistêmicas, especialmente pela liberação de substâncias vasoativas, mitogênicas e mioproliferativas, como o TXA₂, fatores de crescimento e de transformação derivados das plaquetas e de β -tromboglobulina (LATTOVA et al., 2013). As alterações plaquetárias maternas na PE também podem repercutir no neonato. Um estudo realizado em gestantes com PE e gestantes saudáveis, e seus respectivos neonatos, revelou um aumento da expressão de CD62P, CD63, CD41, CD9 e CD36 em gestantes saudáveis e seus neonatos após ativação *in vitro* das plaquetas com trombina. Os neonatos de mulheres com PE, entretanto, apresentaram menor expressão de CD62P, CD63, CD9 e CD36. Além disso, as plaquetas foram menos responsivas à ativação *in vitro*. Esses achados sugerem que a PE influencia a expressão de GP de superfície plaquetária nas gestantes e nos seus neonatos, que podem apresentar a função das plaquetas alterada, contribuindo para um risco adicional de sangramento em neonatos trombocitopênicos (PALTA et al., 2015).

2.3 ÍNDICES PLAQUETÁRIOS

Algum tempo atrás, os estudos plaquetários limitavam-se, principalmente, à contagem de plaquetas e às referências morfológicas sobre macroplaquetas, satelitismo e agregação plaquetária. Com o surgimento dos analisadores hematológicos de segunda geração, na década de 1980, tornou-se possível a medição automática de vários parâmetros (CRABBE; POUCKE, 2002). Entre esses índices, vem merecendo destaque o Volume Plaquetário Médio (VPM), por se tratar de uma variável biológica que determina a função e a atividade plaquetária (SANTOS; FILHO, 2004). Além disso, a contagem das plaquetas imaturas (IPF)

através de uma marcação fluorescente tem sido uma importante ferramenta de avaliação de trombocitopoiese (BRIGGS; HARRISON; MACHIN, 2007).

2.3.1 Volume Plaquetário Médio e a Associação com Patologias

O VPM é um parâmetro universalmente disponível nas contagens de sangue de rotina por hemogramas automatizados e, portanto, é um índice atraente para estudar em cenários clínicos (BUYUKKAYA et al., 2014). O VPM é um parâmetro fornecido no hemograma que não gera custos adicionais para o laboratório. Esse parâmetro é um sensível indicador de desordens plaquetárias *in vivo*, no entanto, é tecnicamente difícil sua avaliação *in vitro* devido aos interferentes analíticos, como o tempo de armazenamento da amostra e o uso de anticoagulantes.

O VPM apresenta relação inversamente proporcional à ploidia do megacariócito. Além disso, possui uma correlação não linear com a contagem das plaquetas, já que representa a renovação das mesmas (KASHANIAN et al., 2013). Este parâmetro é correlacionado com a função plaquetária e pode ser um índice mais sensível que o número de plaquetas, como marcador de interesse clínico em diversas desordens. O volume plaquetário elevado por ser encontrado em diabetes (SCHMOELLER et al., 2017; ZHOU et al., 2018), doenças cardíacas (SANSANAYUDH et al., 2014; VAROL; OZAYDIN, 2014), hipertireoidismo (BALDANE et al., 2015; BAYHAN et al., 2016), esplenectomia (GRADY et al., 1985), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (NKAMBULE; DAVISON; IPP, 2015; QADRI et al., 2013) e púrpura trombocitopênica idiopática (LEE; KIM, 2010; NTAIOS et al., 2008).

O tamanho das plaquetas, avaliado através do VPM, pode ser considerado um marcador de ativação plaquetária uma vez que as plaquetas de tamanho maior se tornam mais reativas, produzem mais fatores pró-trombóticos, agregando mais facilmente (COLKESEN et al., 2008). As macroplaquetas apresentam um tamanho de 4 a 7 μ m de diâmetro e plaquetas gigantes maiores que 7 μ m, geralmente 10 a 20 μ m. Embora a avaliação cuidadosa no tamanho, em uma distensão sanguínea, seja rápida e acurada, acaba sendo subjetiva, uma vez que a morfologia é enganosa para a estimativa do tamanho plaquetário. Isso se deve pelo fato de que plaquetas grandes sejam mais atrativas que os menores, então, frequentemente quando uma distensão é lida, mostra erroneamente “plaquetas gigantes” (VAN DER MEER; MACKENZIE; DINNISSEN, 2003). O uso de VPM, determinado pelos analisadores hematológicos, melhorará a descrição de várias desordens plaquetárias.

Como já discutido anteriormente, durante a pré-eclâmpsia ocorre um processo sistêmico de disfunção endotelial. Como consequência, haverá uma destruição em massa das plaquetas o que reduz a sua vida útil. Observa-se, o aumento do tamanho das plaquetas durante a pré-eclâmpsia, uma vez que as plaquetas mais jovens são maiores que as plaquetas adultas. Estudos têm demonstrado que os valores do VPM estão proporcionalmente aumentados em relação à gravidade da pré-eclâmpsia quando comparados a um grupo de gestantes normotensas (KASHANIAN et al., 2013; YANG et al., 2014). Apesar de haver um aumento de VPM, a utilização desse parâmetro como teste de triagem possui algumas limitações. Embora o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) seja o anticoagulante de escolha para a contagem de células sanguíneas, pode induzir alterações na forma e na ultraestrutura das plaquetas, devido ao tempo e temperatura, tornando-as esféricas (KASHANIAN et al., 2013). Logo o índice, VPM é considerado bastante instável e pouco confiável (DASTJERDI; EMAMI; NAJAFIAN, 2016).

2.3.2 Plaquetas imaturas

As plaquetas imaturas (IPF) são plaquetas maiores e mais reativas do que as plaquetas maduras. Essas plaquetas jovens possuem pequena quantidade de mRNA residual (ácido ribonucleico), o qual é rapidamente degradado após a liberação das plaquetas na circulação. Esse resíduo pode ser facilmente detectado utilizando marcação de esfregaços sanguíneos com corantes supravitais, como o azul de metileno, ou através de corantes fluorescentes e até mesmo fazendo o uso da citometria de fluxo. Utilizando esta última metodologia, a contagem da fração de plaquetas imaturas tem um grande potencial clínico (BRIGGS; HARRISON; MACHIN, 2007).

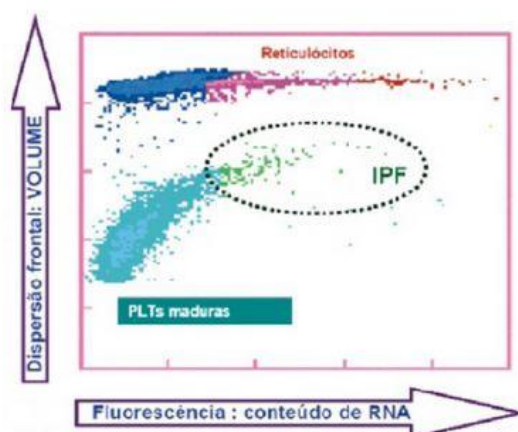
As IPFs são análogas aos reticulócitos da série dos eritrócitos, também chamadas de plaquetas reticuladas. O número de IPFs reflete o grau de atividade da trombopoiese e pode ser utilizado para distinguir as causas de trombocitopenia (JUNG, et al. 2010) sendo um parâmetro mais estável que o VPM (BRIGGS, et al., 2004). Quando a trombocitopenia for causada por falha na medula óssea o percentual de IPFs estará diminuído, enquanto que no caso da trombocitopenia causada por destruição periférica, o percentual de IPFs estará aumentado (JUNG et al., 2010).

Outra importante utilização deste parâmetro é o monitoramento da recuperação da medula óssea após o transplante. Nesse procedimento, observou-se que a contagem de IPFs se recupera significativamente mais rápido que a contagem total de plaquetas (ML et al., 2006).

Elas são também utilizadas no monitoramento de transfusões sanguíneas, implementando uma política de transfusão profilática de plaquetas mais controlada e definindo limites de contagens específicos, principalmente quando a recuperação plaquetária é iminente. Auxilia também na redução do uso de concentrados plaquetários e as possíveis infecções adquiridas por transfusão (BRIGGS; HARRISON; MACHIN, 2007). Pacientes que possuem a atividade do megacariócito diminuída possuem plaquetas com pouco RNA em seu citoplasma enquanto que, quando a atividade do megacariócito está elevada ocorre um aumento do RNA citoplasmático. Estas plaquetas são quantificadas nos novos aparelhos automatizados que empregam citometria de fluxo fluorescente, através da IPF. A IPF é fornecida em porcentagem e em valores absolutos. O valor de referência para mulheres deste parâmetro varia de 3,3 – 6,4% (CUI et al., 2017).

A metodologia utilizada para a obtenção da IPF é a citometria de fluxo com fluorescência ótica, utilizando corantes específicos, o polimetina e o oxazina. Estes dois corantes penetram no citoplasma das plaquetas e dos eritrócitos corando o RNA das mesmas, sendo a metodologia utilizada também para contagem de reticulócitos. As células passam através de um feixe de laser semiconductor onde o volume celular e a intensidade da fluorescência gerada são mensurados. Após, um algoritmo informatizado separa as plaquetas maduras das plaquetas imaturas. Este processo de separação é realizado através das cores, as plaquetas imaturas são plotadas com pontos verdes, enquanto as plaquetas maduras são plotadas com pontos azuis, conforme Figura 7.

Figura 7 – Citograma da contagem óptica de plaquetas pelo analisador hematológico Sysmex XE2100



IPF: Fração de plaquetas imaturas; PLT maduras: plaquetas maduras.

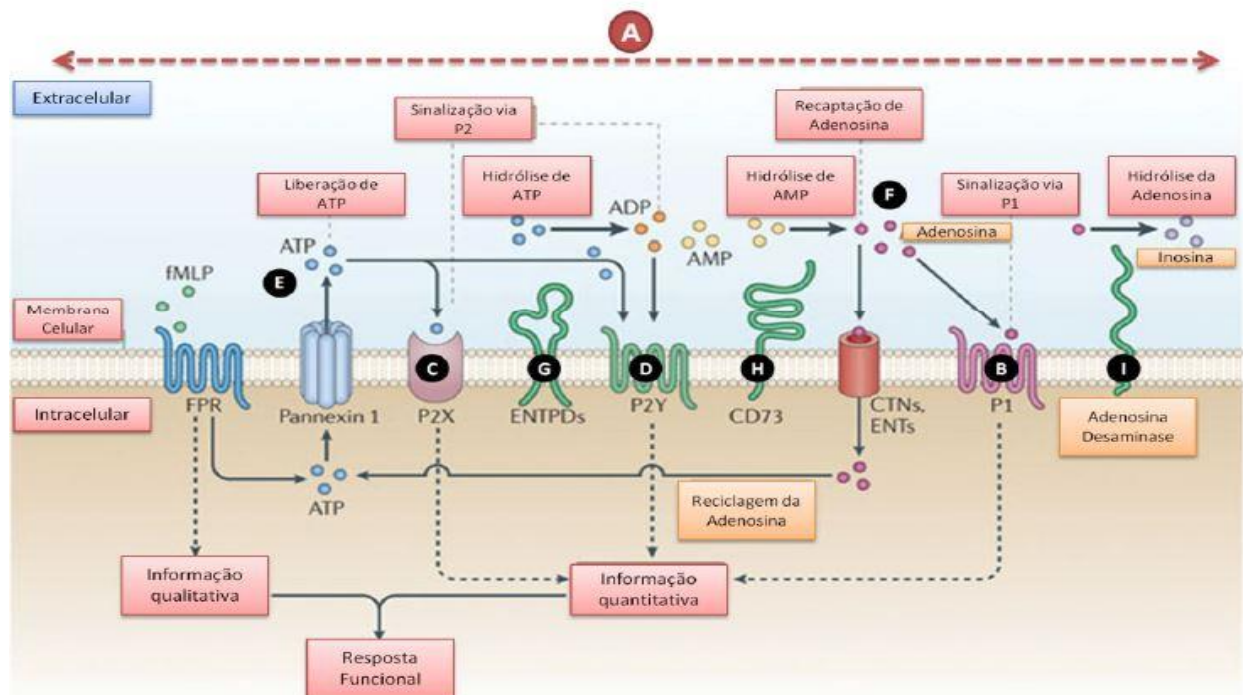
Fonte: CONSULTORIA CIENTÍFICA DA SYMEX AMÉRICA LATINA (2007).

Estudos demonstraram a diminuição das plaquetas circulantes e um aumento do VPM em mulheres com pré-eclâmpsia (DUNDAR et al., 2008; FREITAS et al., 2013; JÄREMO et al., 2000), mas raros são os dados sobre plaquetas imaturas. A contagem das plaquetas e mensuração dos índices plaquetários são métodos rápidos, baratos e de fácil obtenção em laboratórios e hospitais que trabalham com tecnologia avançada de automação, podendo ser útil, como teste de triagem, para identificação precoce de pré-eclâmpsia e eclâmpsia (ANNAM; SRINIVASA; YATNATTI, 2011).

2.3 SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico envolve três principais componentes: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares com os mediadores da sinalização (receptores, através dos quais estes nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos) e as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (YEGUTKIN, 2008) (Figura 8).

Figura 8 – Sinalização purinérgica



Componentes da sinalização purinérgica (A); receptor do tipo P1 (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D); ATP liberado extracelularmente (E); Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD73 (F); E-NTPDase (ou CD39) (G); 5' nucleotidase (ou CD 73) (H); e E-ADA (I).

Fonte: Adaptação de Junger et al. (2011).

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, desencadeando múltiplos efeitos celulares, incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003). Quando ativadas, as plaquetas liberam nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) na circulação (SUN et al., 2012). O ATP exerce efeitos na tromborregulação, pois é liberado dos grânulos plaquetários, juntamente com a adenosina difosfato (ADP), no momento que ocorre ativação das plaquetas (SOSLAU, 1997). O ADP, nas plaquetas, age como um importante mediador da agregação plaquetária e da tromborregulação, podendo ser liberado na circulação sanguínea após danos teciduais (ZIMMERMANN, 1999). Em situações de disfunção ou dano vascular, o ADP é liberado do interior de grânulos existentes nas plaquetas, sendo então considerado o agonista mais importante do recrutamento plaquetário e o indutor da formação de trombos no interior de vasos (MARCUS et al., 2003). Já o AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI; IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001). A adenosina é reconhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras, neuroprotetoras (JACOBSON; GAO, 2006) e imunossupressoras (J SPYCHALA, 1997), além de atuar como um potente inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006). Em condições fisiológicas, os nucleotídeos e nucleosídeo da adenina são encontrados no meio extracelular em baixas concentrações não atravessando a membrana celular, mas podendo realizar suas ações biológicas através de receptores específicos presentes na superfície celular, denominados receptores purinérgicos (VIRGILIO et al., 2001). O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por duas famílias de receptores purinérgicos, P1 e P2, presentes na superfície de diversas células cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP e ADP, respectivamente (BURNSTOCK, 2015). Os purinoreceptores P2 podem ainda ser divididos em duas subclasses: acoplados à proteína G (metabotrópicos), chamados de P2Y e os ligados a canais iônicos, designados P2X (LA SALA et al., 2003). Em especial, o receptor subtipo P2X7 pode funcionar como um poro iônico não-seletivo em mastócitos, plaquetas, macrófagos e linfócitos (DUBYAK, 1993; VIRGILIO et al., 2001). A liberação de grande quantidade de ATP intracelular durante o processo inflamatório aumenta a sinalização purinérgica através da ativação do receptor P2X7 desencadeando eventos pró-inflamatórios. A liberação da principal citocina, a IL-1 β , durante o processo inflamatório, está associada com a atividade do receptor P2X7 (LISTER et al., 2007). Estudos relacionando a ativação do receptor P2X7 à liberação e ativação de outras

citocinas como IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-18 e TNF- α também têm sido descritos (JACOB; NOVO; BACHERT, 2013; LOOMIS et al., 2003; MEHTA; HART; WEWERS, 2001; SMITH; ALVAREZ; ESTES, 2001).

O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos da adenina e da adenosina, bem como a consequente sinalização purinérgica por eles induzida através dos receptores, é fundamental na manutenção dos processos fisiológicos de sinalização purinérgica como secreção, inflamação, fluxo sanguíneo, dentre outros (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Este controle é realizado por uma variedade de enzimas ancoradas à superfície celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Essas enzimas são conhecidas como ectonucleotidases e podem ser classificadas como E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase ou apirase; EC 3.6.1.5), E-NPP (nucleosídeo pirofosfato/fosfodiesterase; EC 3.1.4.1), fosfatases alcalinas e Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 1999).

Estas enzimas atuam formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima Ecto-5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (GODING, 2000; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Ainda, seguindo a sequência de degradação dos nucleotídeos, a enzima E-ADA (adenosina desaminase; EC 3.5.4.4) regula as concentrações de adenosina, através da conversão em inosina (BOURS et al., 2006).

Além de possuírem papel essencial na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, as ectoenzimas possuem ações extremamente importantes no sistema imunológico. A E-NTPDase é conhecida como um marcador de superfície celular (CD39). No sistema vascular, a NTPDase-1 desempenha um papel importante no sistema hemostático, uma vez que ela controla os efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios de nucleotídeos como o ATP e o ADP, prevenindo assim a formação de coágulos e a vaso-oclusão (YEGUTKIN, 2008). Por sua vez, a enzima Ecto-5'-nucleotidase é um marcador de superfície celular (CD73) e a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular, enquanto a ADA, tornou-se conhecida como um marcador molecular de ativação de células T (FRANCO et al., 1997), sendo que alterações em sua atividade têm sido consideradas indicadores de distúrbios imunológicos (POURSHARIFI et al., 2009).

O sistema purinérgico desempenha função importante na manutenção da homeostasia normal, prevenindo excessiva agregação plaquetária e estando relacionado à resposta

inflamatória. Tendo em vista que o quadro de disfunção generalizada no endotélio, durante o processo de pré-eclâmpsia, pode ser responsável por todos os aspectos clínicos dessa síndrome torna-se de interesse científico a avaliação da sinalização purinérgica nas pacientes acometidas com essa alteração patológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os índices plaquetários, atividade da E-NTPDase e da Ecto-5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a agregação plaquetária em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Determinar os valores de IPF e VPM em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Avaliar a atividade e a expressão das enzimas E-NTPDase e E-5-nucleotidase em plaquetas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Correlacionar os parâmetros de agregação plaquetária, IPF e a atividade e expressão das enzimas E-NTPDase e E-5-nucleotidase;
- Verificar relação do envolvimento do sistema purinérgico entre os fatores de risco e o surgimento da pré-eclâmpsia.

4 MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob forma de dois manuscritos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo os próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para os quais foram submetidos: Blood Coagulation & Fibrinolysis, (Manuscrito I) e Journal of Applied Biomedicine (Manuscrito II).

Manuscrito I: Preeclampsia: relationship between platelet parameters and system purinergic.

Manuscrito II: Preeclampsia: risk factors associated of purinergic system.

4.1 MANUSCRITO I

Preeclampsia: relationship between platelet parameters and system purinergic.

Taís C. Almeida^{1,3*}, Matheus H. Jantsch⁴, Luiz F. Carli⁴, Karine L. Silveira^{1,3}, Karla N. Pereira⁵, Pâmela B. Soares⁵, Luana P. Pelinson², Jucimara Baldissarelli², Maria Rosa C. Schetinger², Daniela B. R. Leal^{1,2,4}, José E. P. Silva^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul Brazil

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

⁵Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author: Dr. Taís Corrêa Almeida

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1357,

Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil. Tel.: + 55 55 2208464

E-mail: tais.correa@yahoo.com.br

Abstract

Background: Haemostatic and immunological changes occur during pregnancy and are exacerbated in pregnant women with hypertensive disorder, and with preeclampsia (PE). We investigated platelet indices, E-NTPDase and Ecto-5-nucleotidase activity in platelets of normotensive pregnant women and with PE. *Methods:* Platelet aggregation, immature platelet fraction (IPF), adenosine deaminase activity (E-ADA), activity and expression of E-NTPDase (CD39) e E-5'-nucleotidase (CD73) and platelet activation marker (CD63) were measured in 150 woman divided into three groups: non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnant (NP) and preeclamptic woman (PE). *Results:* The results showed an increase of 74% and 72% of platelet aggregation after addition of 5 μ M and 10 μ M, respectively, of the adenosine diphosphate agonist (ADP); reduction of 9% platelet counts; 39% increase in IPF; 7-fold increase in ADA activity; reduction of 37% and 36% of ATP and ADP hydrolysis, respectively; correlation between platelet count, activation markers and activity and expression of enzymes in pregnant women with pre-eclampsia. *Conclusions:* Our results demonstrate a direct relationship between increased platelet aggregation, IPF and ADA activity. In addition, it was found that PE is associated with a greater number of correlations suggesting that the process is multifactorial. It is possible that analysis these parameters may be useful peripheral markers of PE.

Keywords: preeclampsia, immature platelet fraction, platelets, adenosine deaminase activity, purinergic system, platelet activation markers, biomarker

Introduction

Gestational hypertensive disorders are one of the leading causes of fetal-maternal morbidity and mortality [1]. The aetiology of preeclampsia (PE) is unknown, and its pathophysiological mechanisms are related to placental ischaemia, inflammation, and changes in coagulation [2-4]. These mechanisms appear to be a consequence of a complex interaction of the placental and maternal tissue, leading to generalised endothelial dysfunction [5-6]. This causes a further accentuation in the normal shift of haemostatic equilibrium toward hypercoagulability.

Hypercoagulability is observed in normal pregnancies, however, this phenomenon is potentiated in PE [7]. Platelet aggregation can be stimulated by some substances, including collagen, adenosine diphosphate (ADP), epinephrine, thrombin, and serotonin. Platelet adhesion may therefore trigger homeostasis and thrombosis in endothelial cells. Three major thromboregulatory mechanisms exist that are associated with the vascular endothelium, including endothelial release of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide, ectonucleotidases and eicosanoids [8].

Thrombus formation causes endothelial damage which can generate a vascular response through extracellular adenine nucleotides, such as adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine, which interact with specific platelet and endothelial cell receptors [9]. In the vascular system these molecules participate in platelet activity, and ADP is involved in the recruitment and aggregation of platelets [10]. In addition, these molecules also participate in the activation or inhibition of the immune system. Depending on the concentration, ATP has pro-inflammatory functions, as it is responsible for the stimulation and proliferation of lymphocytes, these cells being involved in the release of cytokines [11]. Meanwhile, adenosine appears as an anti-inflammatory molecule [12]. Adenine nucleotides and adenosine released into the extracellular space play their biological roles through their

binding to the purinergic receptors present on the cell membrane [13]. These enzymes act together, forming an enzymatic chain that begins with the action of E-NTPDase (EC 3.6.1.5) and E-NPP, which hydrolyze ATP, forming the AMP. Eight subtypes of E-NTPDase are known, and E-NTPDase-1, which is known as CD39, plays a critical role in modulating the effect of ATP in inflammation. E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), also known as CD73, hydrolyzes AMP to adenosine and is involved in immunomodulation and inflammatory processes [10]. Finally, adenosine is deaminated by Ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4) in inosine [14]. Adenosine is an endogenous regulatory metabolite and inhibitor of platelet aggregation. Thus, ADA removes the adenosine produced by further degradation of ATP and ADP, thereby rendering it unavailable to reduce the degree of aggregation that occurs through an effect on cyclic platelet adenosine monophosphate [15]. Leal et al.[16] demonstrated an increase in ADA activity with the consequent hydrolysis of adenosine in pregnant women with PE, suggesting serum ADA activity and the aggregation of peripheral markers of pregnancy are associated with PE. In addition, the purinergic cascade is still controlled by enzymes that regulate levels of other purines known as hypoxanthine, xanthine and uric acid, the latter being a potent antioxidant molecule [17].

Due to exaggerated platelet aggregation, thrombocytopenia is commonly observed in pregnant women [18]. The immature platelet fraction (IPF) corresponds to the level of platelet production in the bone marrow. It reflects the stage of thrombopoiesis and can be used to distinguish the causes of thrombocytopenia, as it is a more stable parameter than mean platelet volume (MPV) [19,20]. Studies suggest that IPF and MPV would be increased and total platelet numbers decreased in hypertensive compared with normotensive pregnancy [19].

In addition to their value in understanding the pathophysiology of PE, some markers of these changes can also be used for the clinical management of complicated pregnancies. Since purinergic system enzymes are present in the platelet membranes, playing an important role in

the maintenance of normal hemostasis and in the inflammatory response, it is relevant and of scientific interest to evaluate the activity of the ectonucleotidases involved in the degradation of nucleotides and nucleoside adenine in pregnant women with preeclampsia.

Considering that hemostatic and inflammatory changes associated with normal pregnancy are more exacerbated in PE, it becomes relevant to study these mechanisms as a way of understanding the profile of this imbalance and act preventively. Therefore, this study proposes analyze the relationship between platelet parameters, as well as activity and expression of E-NTPDase and Ecto-5'nucleotidase were performed in normotensive-pregnant and preeclamptic woman.

Methods

Chemicals

Adenosine nucleoside, Coomassie Brilliant Blue G, and bovine serum albumin were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and ADP was obtained from Chrono-Log Corporation (Havertown, USA). All other reagents were of analytical grade and of the highest purity available.

Patients

A cross-sectional study was conducted on 150 women. Patients were divided into three groups: non-pregnant woman (nonP, $n = 50$), normotensive-pregnant (NP, $n = 50$) and preeclamptic woman (PE, $n = 50$). Normotensive-pregnant and woman non-pregnant woman were recruited at the Basic Health Unit Wilson Noal, Santa Maria, RS and preeclamptic woman were recruited at the Federal University of Santa Maria Santa Maria, RS, Brazil, and all participants signed an informed consent form. The Human Ethics Committee of the Health Science Centre from Federal University of Santa Maria, protocol number

42347615.6.0000.5346, Brazil, approved the protocol. Each group was carefully selected by a clinical evaluation. None of these women had other relevant disease states. Women with an unfavourable outcome of pregnancy were excluded from the investigation. Inclusion of women sought to maintain similarity of age and gestational age among the groups, seeking greater homogeneity among subjects. Blood samples from pregnant women were obtained from the twentieth week of gestation.

The NP group consisted of pregnant women (simple pregnancy), with systolic/diastolic blood pressure $\leq 120 \times 80$ mmHg and no proteinuria. The PE group was selected based on the criteria of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy [16]. PE was defined as systolic and diastolic blood pressure of $\geq 140 \times 90$ and/or ≥ 90 mmHg, respectively, accompanied by proteinuria ≥ 0.3 g/24 h after 20 weeks of gestation.

Blood samples

Peripheral blood (10 mL) was collected by venous puncture from the antecubital region into one Vacutainer[®] tube containing 5% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and two Vacutainer[®] tubes containing 0.126 M sodium citrate anticoagulant (1:9). The samples obtained from each participant were used for the preparation of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP). Biochemical and haematological parameters were subsequently determined in EDTA blood.

Platelet aggregation

For platelet aggregation, 4 mL of blood in the Vacutainer[®] system was treated with 0.126 M sodium citrate anticoagulant (1:9). Was analyzed by the method of Born and Cross [21] across turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer,

AGGRO/LINK[®] Model 810-CA software for Windows (version 5.1). PRP was prepared by centrifugation for 12 min at 1000 rpm and PPP was prepared by centrifugation of the sample at 3700 rpm for 30 min. After calibration of the aggregometer, the patient's data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the patient's test was performed. Aggregation was measured at 37°C and expressed as the maximal percentage change in light transmittance from baseline at 5 min after the addition of 5 and 10 µM of the agonist ADP, with PPP as a reference. The results were expressed as percentage of aggregation.

Immature platelet fraction (IPF) and mean platelet volume (MPV)

The evaluation of IPF was performed within 2 h of the collection of 2 mL of blood in tubes with EDTA using the XE-5000[®] (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) automated hematology system. The platelets and platelet index counts were conducted using the impedance method, which also provided MPV and platelet distribution width (PDW). IPF was quantified using the optical fluorescence method conducted in the reticulocyte/optical platelet channel of the same equipment. In this approach, a polymethine fluorescent dye is used to stain the DNA and RNA of the reticulated cells, platelet membranes, and granules. This method allows the simultaneous counting of reticulocytes, erythrocytes, and fluorescent platelets.

Coagulation parameters

Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin (PTT) and fibrinogen were determined in the samples containing citrate through automated system ACL TOP 300 IL.

Platelet preparation

For platelet isolation, platelets were separated from PRP from the collector in the vacutainer system with 0.126 M sodium citrate anticoagulant (1:9) according to Pilla et al. [22] with modifications by Lunkes et al. [23]. Initially, whole blood was centrifuged for 12 min at 1000 rpm to obtain PRP. The PRP was centrifuged at 3700 rpm for 30 min, washed twice with 3.5 mM HEPES buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose, and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The washed platelets were resuspended in HEPES buffer and the protein concentration was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL and used to determine enzymatic activities.

Protein determination

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford [24], using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein, which is accompanied by measurement of the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

Determination of enzymatic activity of E-NTPDase and E-5'-nucleotidase in platelets

The enzymatic activity of E-NTPDase in platelets was performed in duplicate and determined by colorimetric assay by quantifying the inorganic phosphate released in the nucleotide hydrolysis reaction, according to Pilla et al. (1996) and Ecto-5'-nucleotidase by the same method, but with some modifications, and the colorimetric assay according to Chan et al. (1986).

ADA assay

ADA activity from platelets was determined as described by Guisti and Galanti [25]. This method is based on the direct measurement of the formation of ammonia, which is

produced when ADA acts in excess of adenosine. Briefly, 50 μ L of platelets was reacted with 21 mmol/L of adenosine (pH 6.5) and incubated at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of 106 mM sodium nitroprussiate and 167.8 mM hypochlorite solution. Ammonium sulfate (75 mM) was used as the ammonium standard. All experiments were performed in triplicate and the values were expressed in nmol/NH₃/min/mg of protein. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per min from adenosine at standard assay conditions.

Determination of expression of CD39, CD63 and CD73 in platelets by flow cytometry

E-NTPDase (CD39), E-5'-Nucleotidase (CD73) and CD63 expressions were assessed by flow cytometry. The cells were then incubated with anti-CD39, anti-CD73 and anti-CD63 and were analyzed by flow cytometry using the BD Accuri C6 flow cytometer.

Statistical analysis

Normality of data was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. The data were analyzed using unpaired one-way analysis of variance followed by Tukey. The results were given as mean \pm standard error of the mean (mean \pm SEM) or median \pm interquartile range and values of $P < 0.05$ were considered significant. Pearson's test correlation analysis was used to evaluate the correlation. Should be noted that in some analyzes there were not enough samples, so n is reduced.

Results

Subjects

The demographic and clinical data are shown in Table I. There were significant differences in the PE group in terms body mass index (31.92; SEM = 0.82; $n = 50$; *** $P <$

0.001), systolic blood pressure (159.00; SEM = 3.31; $n = 50$; $***P < 0.001$), diastolic blood pressure (99.80; SEM = 3.35; $n = 50$; $***P < 0.001$), compared with the nonP group. However, there were no significant differences between groups in terms of nulliparity, gestational age and previous abortions.

Platelet aggregation

Platelet function was assessed by monitoring platelet aggregation in response to stimulation by ADP. Using 5 μM of ADP as agonist, the percentages of platelet aggregation presented an increase of 73.60% in the PE group (66.80; SEM = 7.69; $n = 15$; $***P < 0.001$) compared with the NP group (38.47; SEM = 2.30; $n = 15$; $*P < 0.05$) and 2-fold higher compared with the nonP group (29.47; SEM = 3.13; $n = 15$; $***P < 0.001$) (Figure 1A). Figure 1B shows the percentage of platelet aggregation when 10 μM of ADP was used as an agonist. Percentages of platelet aggregation presented an increase of 72.18% the PE group (66.24; SEM = 6.86; $n = 15$; $**P < 0.01$) compared with the NP group (38.47; SEM = 3.36; $n = 17$; $*P < 0.05$) and 2-fold higher compared with the nonP group (32.76; SEM = 2.57; $n = 17$; $***P < 0.001$).

Coagulation parameters

The coagulation parameters, platelets, PT and fibrinogen, they are altered in patients with PE (Table 2). Platelets were reduced by 18.70% in the PE group ($196.70 \times 10^3 \mu\text{L}$; SEM = 7.30; $n = 50$; $*P < 0.05$) compared with the NP group ($233.60 \times 10^3 \mu\text{L}$; SEM = 8.81; $n = 50$; $P < 0.05$) and 28.10% compared with the nonP group ($273.60 \times 10^3 \mu\text{L}$; SEM = 9.46; $n = 50$; $*P < 0.05$). An increase of 36.10% and 38.70% of the fibrinogen in the PE group (438.5 mg/dL; SEM = 11.27; $n = 50$; $***P < 0.001$) and NP group (446.90 mg/dL; SEM = 7.92; $n = 50$; $***P < 0.001$), respectively, was observed when compared to the nonP group (322.2

mg/dL; SEM = 39.64; $n = 50$). However, there no was significant difference observed in the analysis of MPV, PDW and PTT.

Pregnant preeclamptic presented a significant increase of 39.20% in IPF (7.82%; SEM = 0.64; $n = 50$; $*P < 0.05$) compared with the NP group (5.61%; SEM = 0.49; $n = 50$; $*P < 0.05$) and 4-fold higher than the nonP (3.44%; SEM = 0.23; $n = 50$; $***P < 0.001$) (Figure 2).

ADA activity

Results obtained for adenosine deamination by E-ADA are shown in Figure 3. The adenosine deamination activity was altered in groups of pregnant women PE. This activity was increased 7-fold in the PE group patients (59.17 U ADA/mg of protein; SEM = 4.87; $n = 40$; $***P < 0.001$) compared with the NP group (8.49 U ADA/mg of protein; SEM = 0.88; $n = 40$; $***P < 0.001$) and 4-fold in the nonP group (14.88 U ADA/mg of protein; SEM = 1.54; $n = 40$; $***P < 0.001$).

E-NTPDase activity

The results of E-NTPDase activity on platelets using ATP as a substrate are shown in Figure 4A. The hydrolysis of ATP is reduced by 36.87% in the PE group (7.48 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 0,67; $n = 40$; $***P < 0.001$) when compared to NP group (11.85 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 0.80; $n = 40$; $***P < 0.001$) and 31.25 % when compared to nonP group (10.88 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 0.74; $n = 40$; $**P < 0.01$). The results obtained for E-NTPDase activity when ADP is used as the substrate are shown in Figure 4B. The hydrolysis of ADP is also reduced by 35.78% in the PE group (6.82 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 0.55; $n = 40$; $*P < 0.05$) when compared to NP group (10.62 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 1.18; $n = 40$; $*P < 0.05$) and 27.70% when compared to the nonP group (9.18 nmol Pi/min/mg protein; SEM = 0.54; $n = 40$ $*P < 0.05$).

Activity of Ecto-5'-nucleotidase

Figure 4C shows the hydrolysis of AMP by Ecto-5'-nucleotidase in platelets of different groups. However, there was no significant difference among the three groups.

Correlation between platelet count, IPF, enzymatic activity and expression of E-NTPDase and E-5'-nucleotidase hydrolysis in the platelets

In order to evaluate the correlation between the platelet count and the cytometric analysis, Pearson correlation was performed. Figure 5 shows the correlation coefficients (r) obtained for all parameters in each of the groups studied. In the PE group, seven significant correlations were observed; in the NP group, three significant correlations and in the control group only a significant correlation was observed.

Discussion

Platelet aggregation, immature platelet fraction (IPF), adenosine deaminase activity (ADA), activity and expression of E-NTPDase (CD39) e E-5'-nucleotidase (CD73) and platelet activation marker (CD63) were measured in preeclamptic woman. The findings of the present study demonstrate that patients with PE exhibit increased platelet aggregation compared with the NP group. Leal et al. [16] also showed changes in coagulation in pregnant women with PE using the same concentrations of agonist as this study. This may be a result of abnormal placental perfusion in pregnant women with PE. The pathophysiology of PE has not been elucidated, however, the main hypothesis involves placental ischaemia [26]. An abnormal trophoblastic invasion is believed to occur, causing a reduction in placental blood flow and consequently maternal endothelial dysfunction and increased vascular permeability. Therefore, the contact of platelets with the injured endothelium activates the coagulation system, which can increase both consumption and bone marrow production of platelets [27].

The observed increase in platelet aggregation should lead to platelet exhaustion and consumption and consequent lowering of the platelet count. The results of this study are in agreement with Leal et al. [16], Alsheeha et al. [28], and Sahin et al. [29], in that the platelet count was decreased significantly in patients with PE compared with the NP group. The reflection of excess platelet consumption can also be visualised through PT. This parameter is high in our study in pregnant women with PE demonstrating a short time to coagulate due to a drop in platelet count.

It has been suggested that the pathophysiological process of PE provokes a cascade effect on maternal coagulation obtaining inversely proportional parameters: increased platelet aggregation and decreased platelet count. Consequently, this coagulation process changes the number of immature platelets in pregnant women with PE. This study investigated the IPF and showed a significant increase in pregnant women with PE compared with the NP group. Although there are few studies on IPF, Everett et al. [30] and Moraes et al. [19] has been demonstrated results that are consistent with this study. Evaluation of the IPF is an early marker signalling an increase in platelet consumption due to exaggerated coagulation. We considered IPF as an early marker of PE since the marker of platelet function (MPV) was not significant in pregnant women with PE in this study. The decrease in the number of platelets stimulates increased synthesis with the consequent release of younger platelets, which tend to be larger, into the circulation. This heterogeneity with respect to the volume and density of platelets is evaluated by the MPV [4]. It is believed that it is not possible to observe the increase in MPV because this process occurs later compared with the IPF. Studies consider IPF as a more stable parameter for evaluation of thrombocytopenia compared with MPV [31,32]. Although MPV is altered in pregnant women with PE, this parameter has a low value for predicting the disease [19,20]. The principle of evaluation and laboratory identification of the IPF is due to the fact that these platelets have cytoplasmic RNA configuring as immature

denoting that the bone marrow has released them into the circulation early. Therefore, the IPF corresponds to the level of immature platelets that are larger and more reactive than mature platelets, reflecting the stage of thrombopoiesis [19,33]. When thrombocytopenia is caused by bone marrow failure, the percentage of immature platelets will be decreased, whereas in the case of thrombocytopenia caused by peripheral destruction, the percentage of immature platelets will be increased, as observed previously [34]. In-depth study of the IPF is relevant since this method is rapid and accessible, and can be introduced into the care of pregnant women with PE. This study provides important information regarding the relevance of platelets in this syndrome. It has been suggested that this parameter, which is thought to be of little clinical use, be used as a screening test for early laboratory identification of thrombocytopenia provoked by PE due to the increase in the peripheral destruction of platelets.

As has already been shown, the hypercoagulation present in pregnant women with PE is due to platelet hyperactivity. However, platelet aggregation occurs after signalling the inflammatory process by endothelial dysfunction caused by placental ischaemia. This cell-mediated immune response may be seen in this study as the increased ADA activity in pregnant women with PE. The association between elevated ADA activity and PE was first reported by Yoneyama et al. [35,36] and the results are in agreement with this study. Leal et al. [16] also observed increased ADA activity and platelet aggregation, suggesting them as peripheral markers of pregnancy associated with diabetes, PE, and HIV. We can relate this increase in ADA activity with the platelet aggregation observed in this study. The fact that ADA activity is increased in patients with PE may lead to a decrease in the concentration of adenosine, which would favour the stages of thrombosis. Adenosine degradation by ADA is probably due to elevated systemic inflammation, a characteristic of PE response [6]. In addition, the levels of ADA are increased when cellular immunity is stimulated and PE is a

condition in which there is enhanced cell-mediated immunity [26]. ADA activity is correlated with high levels of pro-inflammatory genes. Thus, the degradation of adenosine through ADA is probably an inflammatory response to PE [29]. In support of this, the increase in ADA would cause a decrease in the amount of adenosine, an important anti-aggregation marker, and with this there will be increased platelet aggregation, and consequently, platelet consumption will not be restored by the bone marrow in sufficient time, causing the release of immature platelets into the bloodstream.

As platelet aggregation also causes an inflammatory process, it is important to evaluate damage markers. Extracellular ATP is an important immune modulator that can be promptly released with other cellular components following stress or injury. In the immune system, ATP functions as an indicator of tissue destruction [37]. Extracellular ATP acts on inflammatory responses by binding to purinergic P2 receptors, which are expressed by almost all cell types, including cells of the immune system [38]. ATP levels can be regulated during inflammatory and immune responses by ectoenzymes [39]. Under normal physiological conditions, a large amount of ATP is stored inside the cells, while in the extracellular medium the ATP level is low. However, when there is process of hypoxia or oxidative stress large amounts of ATP are released into the extracellular medium [40]. In our study, a reduction of the ATP hydrolysis was observed which would provoke a greater amount of ATP in the extracellular environment. The actual cause of increased ATP in preeclampsia pregnant women is unknown, but it is possible that placental hypoxia, as well as activation of immune and endothelial cells and platelet aggregation, may lead to increased ATP [41,42]. The results of Spaans et al. [42] are consistent with ours, since they also observed a reduction in ATP hydrolysis, confirming through the low expression of CD39 in the placenta of pregnant women with PE. In addition, circulating ATP increases blood pressure in pregnant women with pre-eclampsia. This phenomenon can occur in two ways: through the activation of the

inflammatory response or inactivation of hemopexin activity [43,44]. Hemohepxine has serine protease activity and is considered a free heme sequestrant [45]. In pregnant women with PE, the activity of hemopexin is reduced by ATP, causing an increase in the expression of angiotensin II receptor 1 and consequent increase in blood pressure [43,45]. Direct evidence of the role of ATP in the symptomatology of PE has been demonstrated in a study with pregnant rats in which infusion of ATP induced PE-like syndrome, including proteinuria, generalized inflammation, and increased blood pressure [46-48]. Thus, the balance of ATP is disturbed in pregnant women with PE. Which induces hypertension, activation of endothelial cells and systemic inflammation, configuring ATP as an important sign of danger in these pregnant women.

As well as ATP, the ADP does not normally circulate in plasma, it is stored in the platelet granules. However, when a hemostatic plug or thrombus formation process occurs, collagen and thrombin stimulate platelets to release ADP [49]. ADP is recognized for its platelet aggregation power, by changing the shape, refractoriness of cells and potentializing the effects of other aggregating agents [50]. In agreement with the results regarding platelet aggregation in pregnant women with PE of this study, reduced hydrolysis of ADP was observed, providing a greater amount of this substrate in the extracellular environment in pre-eclamptic pregnant women. Thus, ADP stimulated by PE factors exacerbates the platelet aggregation process in these pregnant women.

In order to evaluate different parameters present in the PE process, the correlation between the platelet count and the cytometric analysis between platelet parameters, as well as its activity and expression of the purinergic system was evaluated. This finding is interesting and shows that there are an increasing number of parameters that correlate confirming the multifactorial process of PE. This allows us to infer that platelet activation occurs during pregnancy, which is more intense in PE. With this, it is understood that platelet activation is

stimulated by platelet exhaustion and consumption, which may suggest that platelet production would be intensified in the early stages of PE. In addition, the presence of IPF confirms the hypothesis that the decrease in the number of platelets would only be present when the activation of these exceeded its synthesis.

Conclusions

We conclude that there is a relationship between the increase in platelet aggregation, IPF, and ADA activity in pregnant women with PE. It is believed that the endothelial dysfunction present in women with PE exacerbates these inflammatory and platelet aggregation mechanisms. Therefore, it is possible that analysis of parameters such as IPF, platelet aggregation, and ADA activity may be useful peripheral markers of PE.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Declaration of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

- [1] Neiger R. Long-Term Effects of Pregnancy Complications on Maternal Health: A Review. *J Clin Med*. 2017. 6(8): p. 76.
- [2] LaMarca B., Amaral L.M., Harmon A.C., Cornelius D.C., Faulkner J.L., Cunningham M.W. Placental Ischemia and Resultant Phenotype in Animal Models of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep*. 2016. 18(5): p.38.

- [1] Neiger R. Long-Term Effects of Pregnancy Complications on Maternal Health: A Review. *J Clin Med*. 2017. 6(8): p. 76.
- [2] LaMarca B., Amaral L.M., Harmon A.C., Cornelius D.C., Faulkner J.L., Cunningham M.W. Placental Ischemia and Resultant Phenotype in Animal Models of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep*. 2016. 18(5): p.38.
- [3] Attar A, Monabati A, Parsanezhad M-E. Endothelial progenitor cell subsets and preeclampsia: Findings and controversies. *J Chinese Med Assoc*. 2017. 80(10): p. 615-622.
- [4] Gathiram P., Moodley J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovasc J Afr*. 2016. 27(2): p. 71–8.
- [5] Stanhewicz A.E., Jandu S., Santhanam L., Alexander L.M. Increased Angiotensin II Sensitivity Contributes to Microvascular Dysfunction in Women Who Have Had Preeclampsia. 2017. 70(2): p. 382-389.
- [6] Giorgi V.S. et al. Elevated circulating adenosine deaminase activity in women with preeclampsia: association with pro-inflammatory cytokine production and uric acid levels. *Pregnancy Hypertens An Int J Women’s Cardiovasc Heal* 2016. 6(4): p. 400-5.
- [7] Estensen M.E. et al. Elevated inflammatory markers in preeclamptic pregnancies, but no relation to systemic arterial stiffness. *Pregnancy Hypertens* 2015. 5(4): p. :325–9.
- [8] Deaglio S., Robson S.C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. *Adv Pharmacol*. 2011. 61: p. 301-32.
- [9] Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System 2017. 120 (1): p. 207–29.
- [10] Johnston-Cox H.A., Ravid K. Adenosine and blood platelets. *Purinergic Signal*. 2011. 7(3): p. 357–65.
- [11] Dosch M. Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int J Mol Sci*. 2018. 19(4): p. 1–16.
- [12] Antonioli L., Fornai M., Blandizzi C., Pacher P., Haskó G. Adenosine signaling and the immune system : When a lot could be too much. *Immunol Lett*. 2018.
- [13] Junger W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 2014. 11(3): p. 201–12.
- [14] Burnstock G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. *Purinergic Signal*. 2015. 11(4): p. 411–34.
- [15] Huang A. et al. Elevated Adenosine Induces Placental DNA Hypomethylation Independent of A2B Receptor Signaling in Preeclampsia. *Hypertension* 2017. 70(1): p.

209–18.

- [16] Leal C.A.M. et al. Platelet aggregation and serum adenosine deaminase (ADA) activity in pregnancy associated with diabetes, hypertension and HIV. *Cell Biochem Funct.* 2016. 34(5): p. 343 - 50.
- [17] Ralevic V., Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* 2003. 16(3): p. 133–40.
- [18] Douglas B. Cines L.D.L. Thrombocytopenia in Pregnancy. *Blood* 2017. 130(21): p. 2271-77.
- [19] Moraes D. et al. Immature platelet fraction in hypertensive pregnancy. *Platelets.* 2015. 27(4): p. 333-7.
- [20] Kashanian M., Hajjaran M., Khatami E., Sheikhansari N. Evaluation of the value of the first and third trimester maternal mean platelet volume (MPV) for prediction of pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2013. 3(4): p. 222–6.
- [21] Born G.V.R., Cross M.J. The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* 1963. 168(1): p. 178–95.
- [22] Pilla C., Emanuelli T., Frassetto S.S., Battastini A.M., Dias R.D., Sarkis J.J. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets.* 1996. 7(4): p. 225–30.
- [23] Lunkes G.I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res.* 2003. 109(4): p. 189–94.
- [24] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72(2): p. 248–54.
- [25] Giusti G., Galanti B. Adenosine deaminase: colorimetric method. *Methods Enzym Anal.* 1984. 4: p. 315–23.
- [26] Jadhav A.A., Jain A. Adenosine deaminase activity in normal pregnancy and pregnancy associated disorders. *Arch Physiol Biochem.* 2013. 119(2): p. 88–91.
- [27] Maynard S.E., Karumanchi S.A. Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2011. 31(1): p. 33–46.
- [28] AlSheeha M.A., Alaboudi R.S., Alghasham M.A., Iqbal J., Adam I. Platelet count and platelet indices in women with preeclampsia. *Vasc Health Risk Manag.* 2016. 12: p. 477–80.
- [29] Sahin S. et al. The impact of platelet functions and inflammatory status on the severity of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015. 28(6): p. 643–8.

- [30] Everett T.R., Garner S.F., Lees C.C., Goodall A.H. Immature platelet fraction analysis demonstrates a difference in thrombopoiesis between normotensive and preeclamptic pregnancies. *Thromb Haemost.* 2014. 111(6): p. 1177–9.
- [31] Abe Y. et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 2006. 118(4): p. 463–9.
- [32] Briggs C., Harrison P., Machin S.J. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol.* 2007. 29(2): p. 77–91.
- [33] Järemo P., Lindahl T.L., Lennmarken C., Forsgren H. The use of platelet density and volume measurements to estimate the severity of pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest.* 2000. 30(12): p. 1113–8.
- [34] Jung H., Jeon H.K., Kim H.J., Kim S.H. Immature platelet fraction: Establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med.* 2010. 30(5): p. 451–9.
- [35] Yoneyama Y. et al. Regulation of plasma adenosine levels in normal pregnancy. *Gynecol Obs Invest.* 2002. 53(2): p. 71–4.
- [36] Yoneyama Y. et al. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in women with normal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2003. 267(4): p. 205–7.
- [37] la Sala A., Ferrari D., Di Virgilio F., Idzko M., Norgauer J., Girolomoni G.. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol.* 2003. 73(3): p. 339–43.
- [38] Cekic C., Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2016. 16(3): p. 177–92.
- [39] Bours M.J.L., Swennen E.L.R., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006. 112(2): p. :358–404.
- [40] Roberts V.H.J., Webster R.P., Brockman D.E., Pitzer B.A., Myatt L. Post-Translational Modifications of the P2X4 Purinergic Receptor Subtype in the Human Placenta are Altered in Preeclampsia. *Placenta.* 2007. 28(4): p. 270–7.
- [41] Burnstock G., Ralevic V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. *Pharmacol Rev.* 2014. 66(1): 102–92.
- [42] Spaans F., De Vos P., Bakker W.W., Van Goor H., Faas M.M. Danger signals from ATP and adenosine in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension* 2014. 63(6): P. 1154–60.
- [43] Bakker W.W. et al. Plasma Hemopexin as a Potential Regulator of Vascular

- Responsiveness to Angiotensin II. *Reprod Sci.* 2013. 20(3): p. 234–7.
- [44] Bakker W.W. et al. Vascular Contraction and Preeclampsia Downregulation of the Angiotensin Receptor 1 by Hemopexin In Vitro. *Hypertension.* 2015. 53(6): p. 959–64.
- [45] Bakker W.W. et al. Plasma hemopexin activity in pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2007. 26(2): p. 227–39.
- [46] Blume C. et al. Autoimmunity in CD73 / Ecto-5' -Nucleotidase Deficient Mice Induces Renal Injury. *PLoS One.* 2012. 7: p. 1–14.
- [47] Faas M.M. et al. Extracellular ATP induces albuminuria in pregnant rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2010. 25(8): p. 2468–78.
- [48] Thompson L.F. et al. Crucial Role for Ecto-5' -Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia. *J Exp Med.* 2004. 200.
- [49] Packham M.A., Rand M.L. Historical perspective on ADP-induced platelet activation. *Purinergic Signal.* 2011. 7(3): p. 283–92.
- [50] Menzies R.I., Tam F.W., Unwin R.J., Bailey M.A. Purinergic signaling in kidney disease. *Kidney Int.* 2017. 91(2): p. 315-23.

Figure Legends

Figure 1. Platelet aggregation using agonist adenosine diphosphate (ADP).

1A. Platelet aggregation using ADP 05 μM in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE). **1B.** Platelet aggregation using ADP 10 μM in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE). Data represent the median \pm interquartile range. The symbol* represents statistical difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 45$). Kruskal-Wallis test for independent sample followed of Tukey test was used for the sample.

Figure 2. Immature platelet fraction (IPF) platelets in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE). Bars represent the median \pm interquartile range. The symbol* represents statistical difference from the between groups. (Kruskal-Wallis test for independent sample followed of Tukey test was used for the sample, * $P < 0.05$, $n = 150$).

Figure 3. ADA activity in the platelets in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE). Bars represent the median \pm interquartile range. The symbol* represents statistical difference from the between groups. (Kruskal-Wallis test for independent sample followed of Tukey test was used for the sample, * $P < 0.05$, $n = 120$).

Figure 4. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) activity [hydrolysis of ATP (A) and ADP (B)] and Ecto-5'-nucleotidase [hydrolysis of AMP (C)] in platelets in

nonP, NP and PE group. Bars represent the median \pm interquartile range. The symbol * represents statistical difference from the between groups. (Kruskal-Wallis test for independent sample followed of Tukey test was used for the sample, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, $n = 120$).

Figure 5. Correlation between platelet count, IPF, enzymatic activity and expression of E-NTPDase and E-5'-nucleotidase hydrolysis in the platelets in plasma obtained from non-pregnant woman (nonP), normotensive-pregnancy (NP) and preeclamptic woman (PE). In bold are the values o of r that were significant $*P < 0.05$, $n = 15$).

Figure 1

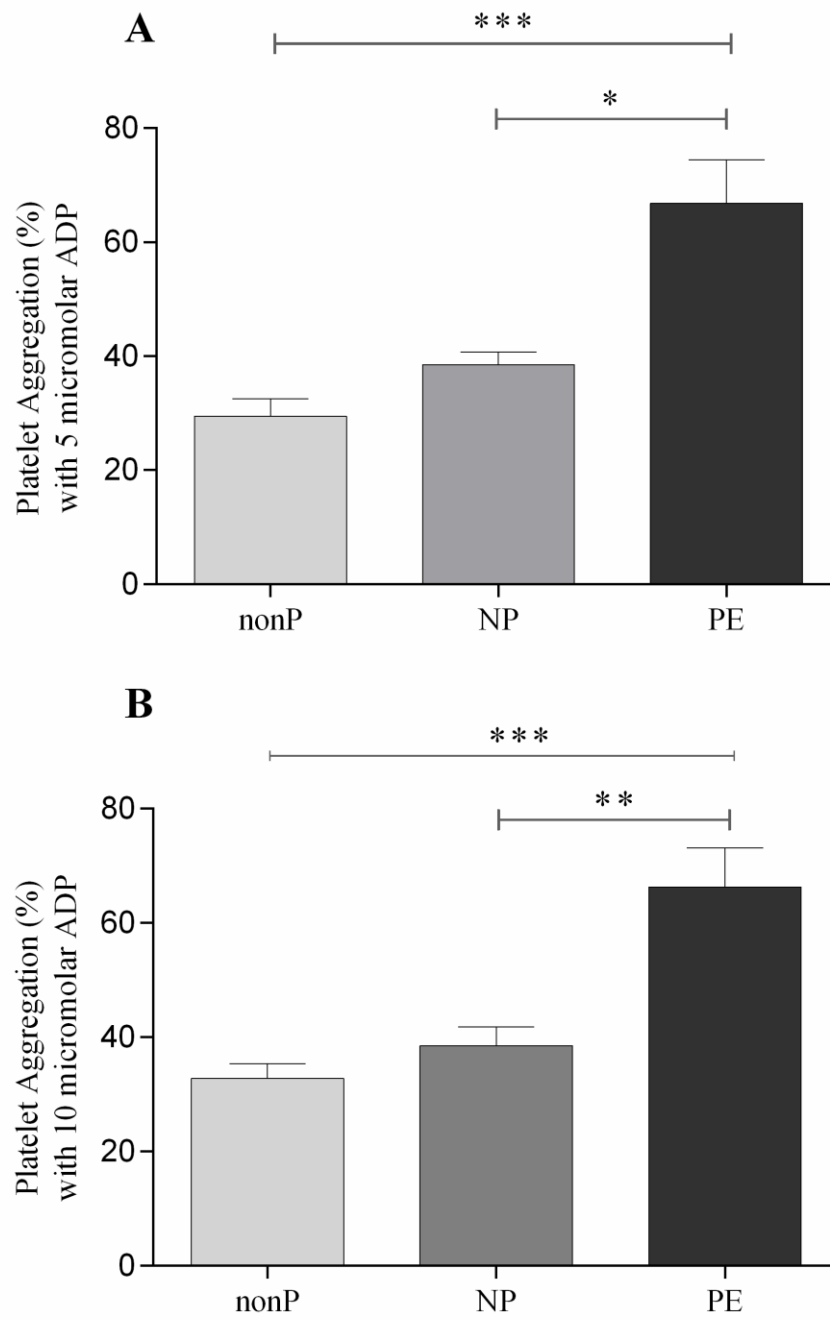


Figure 2

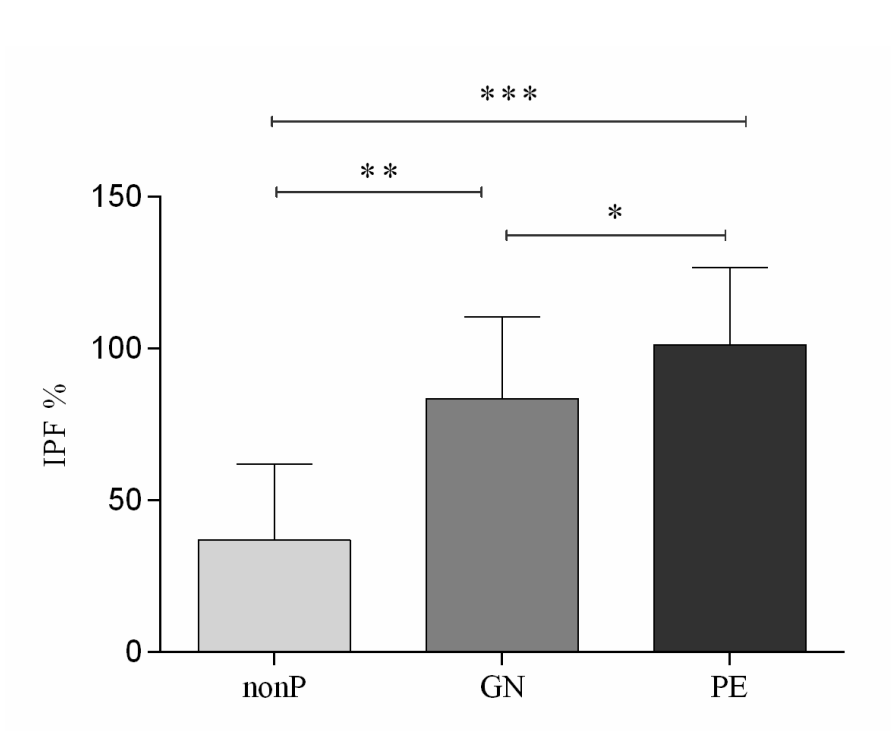


Figure 3

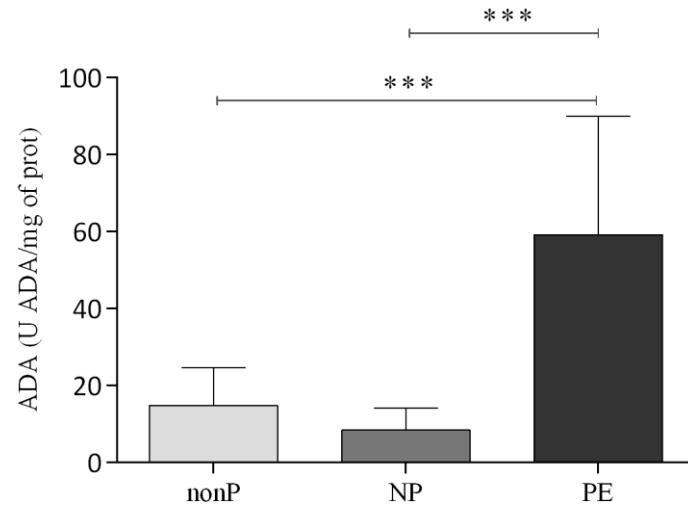


Figure 4

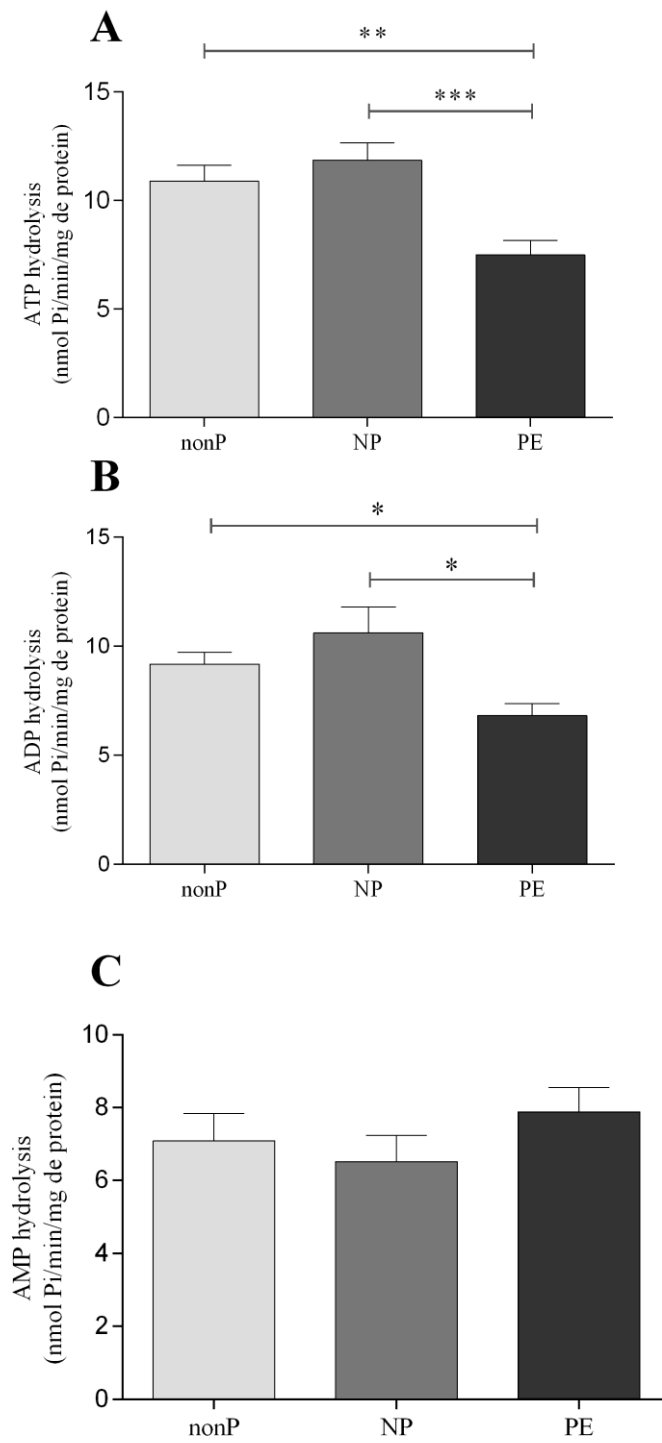


Figure 5

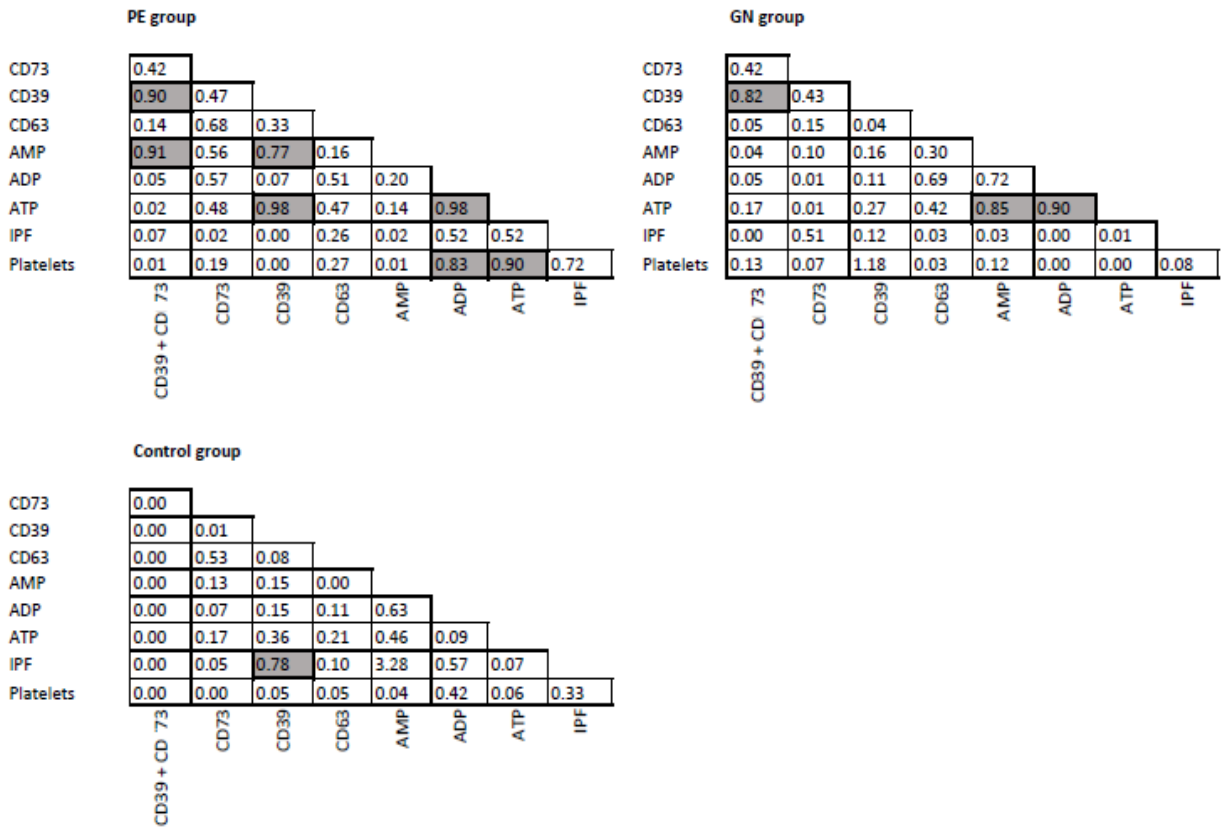


Table I. Demographic and clinical data.

	nonP (<i>n</i> = 50)	NP (<i>n</i> = 50)	PE (<i>n</i> = 50)
Age, years	27.50 ± 0.61	24.70 ± 0.79*	26.60 ± 1.09
BMI	22.95 ± 0.41	28.23 ± 0.60***	31.92 ± 0.82***
Nulliparous, <i>n</i> (%)	-	15 (30)	20 (40)
Gestational age, weeks	-	33 ± 8.00	33 ± 4.30
Previous abortions, <i>n</i> (%)	-	0	5 (10)
Systolic blood pressure, mmHg	116.00 ± 0.69	112.20 ± 1.40	159.00 ± 3.31***
Diastolic blood pressure mmHg	82.80 ± 0.99	71.60 ± 1.25***	99.80 ± 3.35***

Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey test. Values represent mean ± SEM.

P* < 0.05; *P* < 0.001 and ****P* < 0.001. nonP: non-pregnant woman; NP: normotensive pregnancy;

PE: preeclampsia.

Table 2. Coagulation parameters of patients

	nonP (n = 50)	NP (n = 50)	PE (n = 55)
MPV (fL)	10.43 ± 0.10	10.75 ± 0.17	10.77 ± 0.14
PDW (fL)	12.60 ± 0.23	13.59 ± 0.39	13.49 ± 0.29
PLT (10 ³ μL)	273.60 ± 9.46	233.60 ± 8.81**	196.70 ± 7.30***
PT (sec)	10.76 ± 0.18	10.28 ± 0.19*	9.75 ± 0.11***
PPT (sec)	27.95 ± 0.48	28.65 ± 1.31	26.41 ± 0.45
Fibrinogen (mg/dL)	322.20 ± 39.64	446.90 ± 7.92***	438.50 ± 11.27***

Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey test. Values represent mean ± SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ and *** $P < 0.001$. nonP: non-pregnant woman; NP: normotensive pregnancy; PE: preeclampsia. MPV: mean platelet volume, PDW: platelet distribution width, PLT: platelets, PT: prothrombin time, PPT: activated partial thromboplastin.

4.2 MANUSCRITO II

Preeclampsia: risk factors associated of purinergic system

Taís Corrêa Almeida^{1,3*}, Daniela Passos², Daniela Bitencourt Rosa Leal^{1,2,4}, José Edson Paz da Silva^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul Brazil

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1357, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.

Tel.: + 55 55 2208464

E-mail: jepazdasilva@gmail.com

Short title: Preeclampsia, risk factors and purinergic system

Conflicts of interest: The authors have declared that there is no conflict of interest.

Abstract

Preeclampsia (PE) is a common condition of pregnancy, marked by the onset of hypertension and proteinuria. The etiology is unknown and its pathophysiological mechanisms are related to placental hypoperfusion, endothelial dysfunction, inflammation, and coagulation disorders, leading to inadequate circulation in the mother, fetus and placenta. These processes involve purinergic signaling composed of nucleotides and nucleosides, as well as their respective receptors and the enzymes responsible for their degradation. During the inflammatory process, among the mediators capable of modulating the actions of lymphocytes and platelets, we highlight ATP, ADP, AMP and adenosine, which correlate directly with the activity of E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-NPP and E-ADA. Adenine nucleotides may interact with purinergic receptors on the cell surface. The effects of the extracellular concentrations ATP are controlled, in part, by the ectonucleotidases E-NTPDase and E-5'-nucleotidase, which act on ATP and its degradation products, reducing its concentration in the medium and culminating in the production of adenosine, which acts as an immunomodulator or is converted to inosine by adenosine deaminase (E-ADA). Several studies have reported changes in the activity and expression of these enzymes in some pathologies. Considering that PE is not a single disease, but a set of diseases with common clinical manifestations, it is interesting to evaluate the influence of these risk factors on the development of PE. Therefore, the purpose of this review is to establish a relationship between the purinergic signaling of risk factors and the development of PE.

Keywords: preeclampsia, purinergic system, E-NTPDase, E-5'-nucleotidase.

Introduction

Preeclampsia (PE) and other hypertensive disorders of pregnancy have major world-wide consequences, with high maternal and perinatal mortality (Mabry-Hernandez and Romano, 2018; Steegers et al., 2010). The diagnostic criteria of this multisystem disorder were defined by International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) as being the raised blood pressure higher than 140/90 mm Hg on two or more occasions at least 6 h apart with the patient at bed rest and proteinuria in excess of 300 mg protein/day after 20 weeks of gestation (Brown et al., 2018). The etiology is unknown and its pathophysiological mechanisms are related to placental hypoperfusion, endothelial dysfunction, inflammation and coagulation disorders, leading to inadequate circulation in the mother, fetus and placenta (Amaral et al., 2017). The clinical manifestation of PE is not always evident and can progress rapidly even in the absence of its symptoms (Brett C. Young et al., 2010). The epidemiology of PE reflects a wide range of risk factors as well as the complexity and heterogeneity of the disease. Risk factors can be classified into pregnancy specific characteristics and maternal pre-existing features. Although the cause of preeclampsia remains unclear, several clinical risk factors have been described and include obesity, maladaptation immunological, genetic incompatibility and diabetes (Bartsch et al., 2016; Bilano et al., 2014; Louise C. Kenny et al., 2014; Lisonkova and Joseph, 2013; Paré et al., 2014). Therefore, it is not a surprise that an increasing number of studies has demonstrated purinergic system alterations in the pathogenesis of PE. On the other hand, there are no studies evaluating the influence of purinergic signaling on risk factors on the development of PE. Therefore, this study proposes to present an overview of purinergic signaling and risk factors and how they may influence the development of PE.

Preeclampsia: purinergic signaling

Since the inflammatory process resulting from PE promotes activation of the immune and inflammatory responses, extracellular nucleotides are essential molecules for the initiation and maintenance of inflammatory reactions, since they are signaling molecules involved in a wide spectrum of biological effects (Virgilio and Vuerich, 2015). Their levels are controlled by a complex cell surface-located group of enzymes called ectonucleotidases and adenosine deaminase. There are four major families of ectonucleotidases, nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases/CD39), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs), alkaline phosphatases and ecto-5'-nucleotidase. The purinergic system It is characterized by being an important signaling pathway in several tissues, unleashing multiple cellular effects, including immune response, inflammation, platelet aggregation, endothelium mediated vasodilation and cell death (Rosa et al., 2007). The diphosphate and triphosphate nucleosides such as ADP and ATP, together with adenosine, are well known to control vascular response and endothelial damage. These nucleotides are secreted by platelets, leukocytes, damaged endothelial cells and represent an important class of extracellular molecules that play an important role in modulating the immune response (Burnstock, 2012; Robson et al., 2006). These molecules interact with purinergic receptors present on the cell surface and trigger the cascade of events that modulate various biological events, such as the immune response, platelet aggregation, and inflammation (Ralevic and Burnstock, 2003). ATP serves as a *Danger Associated Molecular Pattern* (DAMP) for the immune system (Bönner et al., 2013; Bours et al., 2006). Under physiological conditions there are minimal amounts of ATP in the extracellular environment, however, in situations like PE their amount can triple (Bours et al., 2006). It is an important nucleotide in the process of vasodilation. At low concentrations increases the amount of collagen, thromboxane A2 and thrombin, favoring platelet aggregation. However, at higher concentrations, ATP inhibits platelet aggregation, possibly due to the fact that ATP generates adenosine, an important platelet inhibitor

(Packham and Rand, 2011). In pregnant women with PE, the values of ATP are high when compared to normotensive pregnant women (Bakker et al., 2007; Spaans et al., 2014). The exact cause for the increase of this nucleotide is unknown, however, placental hypoxia and activated endothelial and immune cells release increased amounts of ATP (Bakker et al., 2013, 2007; Steegers et al., 2010).

The action of ADP on platelets is an important mediator of platelet aggregation and thromboregulation, being released into the bloodstream after tissue damage (Gachet, 2012; Packham and Rand, 2011). Data not yet published by our group, we observed a reduced NTPDase activity on the ADP substrate in pregnant women with PE compared to the non-pregnant group. It is assumed that there a greater amount of ADP circulating in the medium provides an increase in platelet aggregation.

Circulating adenosine plays many important biologic roles that relate to circulatory and metabolic control. The plasma level of adenosine is determined mainly by the balance between adenosine uptake and release from the platelets, vascular endothelium, and red blood cells (Yoneyama et al., 2000). In PE the activity of E-ADA is increased which provides a greater hydrolysis of adenosine, reducing its amount in the extracellular environment (Yoneyama et al., 2002, 2001). One of the possible reasons for this immune regulation is the increase in platelet aggregation in this group of pregnant women (Figure 1). In a study performed by Leal et al. (Leal et al., 2016), pregnant women with PE presented an increase in both E-ADA activity and platelet aggregation compared to the group of normotensive pregnant women.

Risk factors for preeclampsia

Some clinical disorders predispose women to acquire PE. The appropriate identification of women who are at increased risk of PE allows a better clinical and prognostic

management. In addition, PE screening and prevention techniques are more effective for women at high risk. It is important to emphasize that an important aspect for clinical practice is the individualized cumulative risk of these various risk factors in pregnant women. Thus, in this study we will address risk factors involving the process of obesity, diabetes, poor immunological adaptation and genetic incompatibility.

Obesity

The Global Health Organization (“Obesity and overweight,” 2015), estimates an increase in the percentage of overweight women (body mass index ≥ 25 kg/m²). The high prevalence of obesity has consequences such as miscarriage, thromboembolism and hypertensive complications (Oa et al., 2017; Yogev and Catalano, 2015). Given the obesity epidemic in the world, this is one of the largest attributable and potentially modifiable risk factors for PE. The risk of PE progressively increases with increasing BMI, even within the normal range. Obesity increases the overall risk of PE by approximately 3-fold (Bodnar et al., 2005). A meta-analysis showed that the risk of developing PE doubled with each 5kg/m² increase in pre-gestational BMI (Brien et al., 2002).

It is believed that obesity during gestation comes basically from the ingestion of foods and high caloric beverages (Albala et al., 2002; Claudia Bambs, Jaime Cerda, 2008; de Onis et al., 2010). Due to the growing number of obese pregnant women, the Institute of Medicine has established clinical guidelines for healthy ranges of weight gain in pregnancy, concluding that the greater the body mass index, the lower the weight gain (Leddy et al., 2008).

Obesity is associated with a low-grade systemic inflammation. In response the organism release TNF- α , one of the important cytokine what increase in concentration in adipose tissue (Burnstock and Gentile, 2018; Tang et al., 2015). The production of TNF- α , by adipose tissue is believed to regulate the size of adipocytes, constituting a homeostatic

mechanism in order to limit the size of adipocytes against excessive consumption (Cruz-Garcia et al., 2011). Adenosine is an endogenous anti-inflammatory metabolite and is capable of suppressing macrophage activation and limiting cytokine release (Kalogeris et al., 2014). In response to this inflammatory condition caused by obesity, adenosine is released to decrease the production of cytokines. Given that both the adipocyte and the placenta have all the machinery to produce adenosine, it is not surprising that adenosine levels are elevated in overweight pregnant women (Badillo et al., 2017; Strouch et al., 2005). Although we do not know the biological result of the increase of adenosine in overweight pregnant women, we can not rule out the role of adenosine in the metabolic adaptations of pregnancy (Badillo et al., 2017). However, E-ADA acts on this adenosine to convert it into inosine, thereby decreasing the concentration of in the extracellular medium adenosine. Study by Jadhav et al. (Jadhav and Jain, 2012) supports this mechanism as ADA activity is increased in both overweight and obese subjects and the increase is directly proportional to the increase in BMI. By inactivating extracellular adenosine which is spontaneously released by adipocytes, ADA impairs the insulin sensitivity for glucose transport (Green, 1987).

Diabetes

Worldwide, about 600 million individuals are predicted to have diabetes mellitus (DM) by the year 2035 (Zimmet et al., 2014). The definition DM comprises a group of metabolic disorders that are characterized by dysregulation of glucose metabolism, which results from defects in insulin secretion, decreased insulin sensitivity, or both (Shaw et al., 2010). Studies have demonstrated that DM alters the ectoenzymes of purinergic system on brain and platelets of alloxan-induced diabetic mice and rats (Ghneim and Kordee, 2003; Lunkes et al., 2004; Schmatz et al., 2009). Corroborating with these data, a study by Baldissera et al. (Baldissera et al., 2017) demonstrated alterations in enzymes of the

purinergic system in serum (NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA) of diabetic mice suggesting that these alterations may be due to the inflammation process caused by the hyperglycemia. Glucose homeostasis and pathophysiology of DM are regulated by adenosine (Antonioli et al., 2015; Johnston-cox et al., 2012; Yip et al., 2000). Adenosine alters insulin secretion and regulates β -cell homeostasis by controlling the proliferation and regeneration of β -cells in addition to maintaining their survival in an inflammatory environment (Andersson, 2013; Ohtani et al., 2013; Yang et al., 2012). Moreover, adenosine is recognized as a major regulator of cell responsiveness to insulin by controlling insulin signaling in adipose tissue, muscle and liver (Faulhaber-walter et al., 2011; Figler et al., 2011). ATP stimulates pancreatic insulin release through a glucose-dependent P2Y receptor-mediated mechanism and also modulates insulin secretion through interactions with ATP-sensitive potassium channels in islet β -cells. Biotin enhances ATP synthesis in pancreatic islets, resulting in reinforcement of glucose-induced insulin secretion (Burnstock, 2017). Pregnancy is a diabetogenic state with increasing burden on the mother's metabolism. Insulin resistance is often found during pregnancy leading to a compensatory increase in pancreatic β -cell response and eventually hyperinsulinemia. Changes in hormonal levels as well as secretion of placental hormones such as progesterone, cortisol, human placental lactogen, prolactin and growth hormone further cause insulin resistance during pregnancy (Weissgerber and Mudd, 2015). Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as glucose intolerance detected during pregnancy (American Diabetes Association, 2014). The prevalence of GDM is increasing and affects between 1 and 14% of all pregnancies, caused by a global increase in the number of women with obesity around reproductive age (Moses et al., 2011). Furthermore, diabetes practically doubles the risk of developing PE (Weissgerber and Mudd, 2015). Diabetes results from altered vascular function originating from endothelial dysfunction. Based on this information, there is a relationship between increased levels of adenosine and the onset of endothelial

dysfunction in human umbilical veins during gestational diabetes (Muñoz et al. 2006; Farías et al., 2010; San Martín and Sobrevia, 2006). However, evaluating pregnant women with diabetes and PE, Leal et al. (Leal et al., 2016) demonstrated that there is an increase in E-ADA activity with consequent hydrolysis of adenosine which could be partially related to increased platelet aggregation.

Maladaptation immunological

Studies suggest that maladaptation immunological is a factor of PE etiology (Djurisic and Hviid, 2014). Maladaptation immunological may cause superficial intravascular trophoblastic invasion and may elude placental ischemia and endothelial cell dysfunction. As a consequence can cause the secretion of toxic cytokines and free radicals (Walker, 2000). PE is a typically human disease, therefore, the expressive size of the human fetal brain necessitates a deep trophoblastic invasion. However, this process will only occur if there are significant immunogenic adaptations in terms of tolerance between maternal and paternal tissues (Robillard, Gustaaf and Dekker, 2002).

The causes of maladaptation immunological mainly involve the influence of inflammatory processes generated from the reaction of the maternal mechanism against the foreign paternal antigens causing a superficial trophoblastic invasion (Roberts and Lain, 2002).

It is believed that this maladaptation acts in response to the inflammatory reaction caused by gestation. Different immunological studies have led to the hypothesis that immunological mechanisms probably contribute to the pathogenesis of PE (Djurisic and Hviid, 2014; Roberts and Lain, 2002; Walker, 2000). However, the molecular and biological mechanisms responsible for this immune dysfunction are unclear. During gestation, the mother's immune systems should recognize the presence of foreign allogenic cells. Gestation

is characterized by a natural allograft and the mother may have genes against the paternal HLA which would belong to a group other than yours.

Research suggests that less time to exposure to the paternal antigens increases the risk of the PE (Louise C Kenny et al., 2014; Luo et al., 2007; Robillard et al., 1999, 1994). Besides that, practical evidence of poor immunological adaptation leading to the development of EP includes the introduction of multiparous women with a new partner, artificial insemination with donor sperm and use of barrier contraceptives. Research confirms that maternal exposure to sperm confers a protective mechanism (Einarsson et al., 2003; Saftlas et al., 2013).

In view of the fact that poor immune adaptation is related to a failure to change the inflammatory reaction. Purinergic signaling of this maladaptation manifests itself through the inflammatory process. With this, it is possible to deduce that in these cases there is an increase of extracellular ATP, since it is a signal of damage. The involvement of ATP in the inflammatory process occurs through the production and release of cytokines and release of histamine with consequent production of prostaglandins. A greater release adenosine is also present as it is a potent anti-inflammatory agent (la Sala et al., 2003).

Genetic incompatibility

Research indicates a possible involvement of the antigen recognition system through human leukocyte antigens (HLA). The three most commonly expressed subtypes are HLA A, B and D. It should be noted that cytotrophoblast cells do not express these more common types, but HLA C, G and E subtypes. This differentiated expression of the HLA is fundamental so that the mother does not recognize the fetus as a foreign body and thus does not begin a reaction of rejection to the fetal tissues (Rokhafrooz et al., 2018; Tersigni et al., 2018; Vianna et al., 2016). NK lymphocytes play a key role in pregnancy acceptance. They

bind to the HLA cytotrophoblast and stimulate the production of cytokines that will provide trophoblastic invasion (Emmery et al., 2017). A study by Hiby et al. (Hiby et al., 2004) showed that when the AA subtype in NK bound to the specific HLA-C subtype, the production of the trophoblast stimulating cytokines was much lower and that specific combination of NK-AA and HLA-C1 was found more frequently in women who developed PE. Since the gene that synthesizes HLA is inherited from the father and what synthesizes NK is inherited from the mother, they suggested that this could be one of the mechanisms involved in the pattern of genetic inheritance of PE. This study also demonstrated that different HLA-C subtypes in combination with different NK subtypes could stimulate or inhibit trophoblastic invasion to different degrees, reinforcing the hypothesis that the occurrence of PE will also depend on the genetic compatibility of the couple (Hiby et al., 2004).

As there are no studies relating the purinergic system and the genetic incompatibility existing in PE, we performed an analysis of the purinergic system in the mechanism of chronic rejection of transplanted organs. This relationship will be made since the mechanism of organ transplant rejection resembles the process of interaction between the mother's NK lymphocytes and the fetal HLA antigens. In episodes of chronic rejection, the endothelial layer is invariably damaged, triggering a collateral pathway of coagulation mediated through thrombin. The effects are mediated through protease-activated receptors and lead to the activation of platelets, endothelial cells and immune cells. This response is synergistically augmented through the release of ADP by activated platelets and endothelial cells, resulting in ectonucleotidase mediated production of AMP and adenosine (Shrivastava et al., 2007). Bearing in mind the destructive effects of thrombus formation in mediating transplant rejection and its biological pathways of formation, one can appreciate the role of ectonucleotidases in modulating of these responses (Imai et al., 2000; Zeiser and Robson,

2016). The expression of CD39 has been reported to be significantly decreased in chronic rejection. This fact was confirmed in a study involving model of rejection in mice. Mice that overexpressed human CD39 increased survival of cardiac allografts along with protection against thrombosis (Dwyer et al., 2004). Therefore, it is assumed that the genetic incompatibility between mother and fetus during PE also presents the imbalance of the purinergic cascade. The expression is reduced of CD39 and CD73 would provide an increase in platelet aggregation, potentiating the PE process.

Conclusions

Preeclampsia is characterized by inflammatory manifestations and platelet aggregation. The causal mechanisms of preeclampsia remain incompletely understood. Accumulating evidence supports a consensus that inflammation, immune maladaptation, and disturbances in pro- vs. anti-angiogenic factors are likely important contributing etiological factors. The causal mechanisms of PE remain incompletely understood. Accumulating evidence supports a consensus that oxidative stress, immune maladaptation, and disturbances in pro- vs. anti-angiogenic factors are likely important contributing etiological factors. The understanding of the pathogenic mechanisms and its risk factors involved in this disease may help uncover crucial information to clarify its origin and may enable the development of treatment targets. The signaling of the purinergic system becomes a great ally in the evidence of pathologies since it is responsible for the purinergic regulation of the immune and inflammatory response during the clinical evolution of the disease. Through this review, we realized that there is a relationship in the purinergic response between different risk factors (Figure 2). This reinforces the idea that PE consists in the sum of a set of diseases with common clinical manifestations

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Declaration of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Ethical approval

This review article does not contain any studies with human participants or animals performed by the authors.

References

- Albala, C., Vio, F., Kain, J., Uauy, R., 2002. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. *Public Health Nutr.* 5, 123–128. <https://doi.org/10.1079/PHN2001283>
- Amaral, L.M., Wallace, K., Owens, M., Lamarca, B., 2017. Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. *Curr. Hypertens. Rep.* 1, 19–21. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0757-7>
- Andersson, O., 2013. Role of adenosine signalling and metabolism in β -cell regeneration. *Exp. Cell Res.* 321, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.019>
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Csóka, B., Pacher, P., Haskó, G., 2015. Adenosine signalling in diabetes mellitus-pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 228–241. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.10>
- Badillo, P., Salgado, P., Bravo, P., Guevara, K., Acurio, J., Gonzalez, M.A., Oyarzun, C., San Martin, R., Escudero, C., 2017. High plasma adenosine levels in overweight/obese

pregnant women. *Purinergic Signal*. 13, 479–488. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9574-3>

Bakker, W.W., Donker, R.B., Timmer, A., van Pampus, M.G., van Son, W.J., Aarnoudse, J.G., van Goor, H., Niezen-Koning, K.E., Navis, G., Borghuis, T., Jongman, R.M., Faas, M.M., 2007. Plasma hemopexin activity in pregnancy and preeclampsia. *Hypertens. pregnancy* 26, 227–39. <https://doi.org/10.1080/10641950701274896>

Bakker, W.W., Spaans, F., Bakkali, L., Borghuis, T., Goor, H. Van, Dijk, E. Van, Buijnink, J., Faas, M.M., 2013. Plasma Hemopexin as a Potential Regulator of Vascular Responsiveness to Angiotensin II. *Reprod. Sci.* 20, 234–237. <https://doi.org/10.1177/1933719112446081>

Baldissera, M.D., Souza, C.F., Doleski, P.H., Grando, T.H., Sagrillo, M.R., Aleksandro, S., Leal, D.B.R., Monteiro, S.G., 2017. Treatment with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) for diabetic mice prevents changes in seric enzymes of the purinergic system : Improvement of immune system. *Biomed. Pharmacother.* 94, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.113>

Bartsch, E., Medcalf, K.E., Park, A.L., Ray, J.G., 2016. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ* i1753. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1753>

Bilano, V.L., Ota, E., Ganchimeg, T., Mori, R., Souza, J.P., 2014. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: A WHO secondary analysis. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091198>

Bodnar, L.M., Ness, R.B., Markovic, N., Roberts, J.M., 2005. The Risk of Preeclampsia Rises with Increasing Prepregnancy Body Mass Index. *Ann. Epidemiol.* <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2004.12.008>

- Bönner, F., Borg, N., Jacoby, C., Temme, S., Ding, Z., Flögel, U., Schrader, J., 2013. Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling. *Circ. Res.* 113, 301–312.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358–404.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>
- Brett C. Young, Levine, R.J., Karumanchi, S.A., 2010. Pathogenesis of preeclampsia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 5, 173–192.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000105>
- Brien, T.E.O., Ray, J.G., Chan, W., 2002. Maternal Body Mass Index and the Risk of 368–374.
- Brown, M.A., Magee, L.A., Kenny, L.C., Karumanchi, S.A., McCarthy, F.P., Saito, S., Hall, D.R., Warren, C.E., Adoyi, G., Ishaku, S., 2018. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.*
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.05.004>
- Burnstock, G., 2017. Purinergic signalling: Therapeutic developments. *Front. Pharmacol.* 8, 1–55. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
- Burnstock, G., 2012. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *BioEssays* 34, 218–225. <https://doi.org/10.1002/bies.201100130>
- Burnstock, G., Gentile, D., 2018. The involvement of purinergic signalling in obesity. *Purinergic Signal.* 14, 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9605-8>

- Claudia Bambs, Jaime Cerda, A.E., 2008. Morbid obesity in a developing country: the Chilean experience. *Public Health Nutr.* 86, 813–814.
<https://doi.org/10.1079/PHN2001283>
- Cruz-Garcia, L., Sánchez-Gurmaches, J., Bouraoui, L., Saera-Vila, A., Pérez-Sánchez, J., Gutiérrez, J., Navarro, I., 2011. Changes in adipocyte cell size, gene expression of lipid metabolism markers, and lipolytic responses induced by dietary fish oil replacement in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 158, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.024>
- de Onis, M., Blössner, M., Borghi, E., 2010. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 1257–1264.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29786.1>
- Djurisic, S., Hviid, T.V.F., 2014. HLA class Ib molecules and immune cells in pregnancy and preeclampsia. *Front. Immunol.* 5, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00652>
- Dwyer, K.M., Robson, S.C., Nandurkar, H.H., Campbell, D.J., Gock, H., Murray-segal, L.J., Fisicaro, N., Mysore, T.B., Kaczmarek, E., Cowan, P.J., Apice, A.J.F., 2004. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J. Clin. Invest.* 113, 1440–1446.
<https://doi.org/10.1172/JCI200419560.1440>
- Einarsson, J.I., Sangi-Haghpeykar, H., Gardner, M.O., 2003. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188, 1241–1243.
<https://doi.org/10.1067/mob.2003.401>
- Emmery, J., Christiansen, O.B., Nilsson, L.L., Dahl, M., Skovbo, P., Møller, A.M., Steffensen, R., Hviid, T.V.F., 2017. Associations between fetal HLA-G genotype and birth weight and placental weight in a large cohort of pregnant women – possible

implications for HLA diversity. *J. Reprod. Immunol.*

<https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.02.002>

Faulhaber-walter, R., Jou, W., Mizel, D., Li, L., Zhang, J., Kim, S.M., Huang, Y., Chen, M., Briggs, J.P., Gavrilova, O., Schnermann, J.B., 2011. Impaired Glucose Tolerance in the Absence of Adenosine 60. <https://doi.org/10.2337/db11-0058>

Figler, R.A., Wang, G., Srinivasan, S., Jung, D.Y., Zhang, Z., Pankow, J.S., Ravid, K., Fredholm, B., Hedrick, C.C., Rich, S.S., Kim, J.K., Lanoue, K.F., Linden, J., 2011. Links Between Insulin Resistance, Adenosine A 60, 669–679. <https://doi.org/10.2337/db10-1070>

Gachet, C., 2012. P2Y12 receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal.* 8, 609–619. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9303-x>

Ghneim, H.K., Kordee, Z.S., 2003. Changes in adenosine deaminase activity in ageing cultured human cells and the role of zinc. *Cell Biochem. Funct.* 21, 275–282.

Muñoz, G., San Martín R., Farias M., Vecchiola A., Casanello, P., Sobrevia, L., 2006. Insulin Restores Glucose Inhibition of Adenosine Transport by Increasing the Expression and Activity of the Equilibrative Nucleoside Transporter 2 in Human Umbilical Vein Endothelium. *J. Cell. Physiol.* 835, 826–835. <https://doi.org/10.1002/jcp>

Green, A., 1987. Adenosine receptor down-regulation and insulin resistance following prolonged incubation of adipocytes with an A1 adenosine receptor agonist. *J. Biol. Chem.* 262, 15702–15707.

Hiby, S.E., Walker, J.J., Shaughnessy, K.M.O., Redman, C.W.G., Carrington, M., Trowsdale, J., Moffett, A., 2004. Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. *J. Exp. Med.* 200, 957–965. <https://doi.org/10.1084/jem.20041214>

- Imai, M., Takigami, K., Guckelberger, O., Kaczmarek, E., Csizmadia, E., Bach, F.H., Robson, S.C., 2000. Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 70, 864–870.
<https://doi.org/10.1097/00007890-200009270-00003>
- Jadhav, A.A., Jain, A., 2012. Elevated adenosine deaminase activity in overweight and obese Indian subjects. *Arch. Physiol. Biochem.* 118, 1–5.
<https://doi.org/10.3109/13813455.2011.603341>
- Johnston-cox, H., Koupenova, M., Yang, D., Corkey, B., Gokce, N., 2012. The A2b Adenosine Receptor Modulates Glucose Homeostasis and Obesity. *PLoS One* 7, e40584.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040584>
- Kalogeris, T.J., Baines, C., Korthuis, R.J., 2014. Adenosine prevents TNF α -induced decrease in endothelial mitochondrial mass via activation of eNOS-PGC-1 α regulatory axis. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098459>
- Kenny, L.C., Black, M.A., Poston, L., Taylor, R., Myers, J.E., Baker, P.N., McCowan, L.M., Simpson, N.A.B., Dekker, G.A., Roberts, C.T., Rodems, K., Noland, B., Raymundo, M., Walker, J.J., North, R.A., 2014. Early pregnancy prediction of preeclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: The Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study. *Hypertension* 64, 644–652.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03578>
- Kenny, L.C., Black, M.A., Poston, L., Taylor, R., Myers, J.E., Philip, N., Mccowan, L.M., Simpson, N.A.B., Dekker, G.A., Roberts, C.T., Noland, B., Raymundo, M., Walker, J.J., North, R.A., Kenny, L.C., Black, M.A., Poston, L., Taylor, R., Myers, J.E., Baker, P.N., Mccowan, L.M., Simpson, N.A.B., Dekker, G.A., Roberts, C.T., Rodems, K., Noland, B., Raymundo, M., Walker, J.J., North, R.A., 2014. Early Pregnancy Prediction of

Preeclampsia in Nulliparous Women, Combining Clinical Risk and Biomarkers.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03578>

la Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., Girolomoni, G., 2003.

Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.*

73, 339–343. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802418>

Leal, C.A.M., Leal, D.B.R., Adefegha, S.A., Morsch, V.M., Silva, J.E.P., Rezer, J.F.P.,

Schrekker, C.M.L., Abdalla, F.H., Schetinger, M.R.C., 2016. Platelet aggregation and

serum adenosine deaminase (ADA) activity in pregnancy associated with diabetes,

hypertension and HIV. *Cell Biochem. Funct.* 343. <https://doi.org/10.1002/cbf.3197>

Leddy, M.A., Power, M.L., Schulkin, J., 2008. The impact of maternal obesity on maternal

and fetal health. *Rev. Obstet. Gynecol.* 1, 170–8. <https://doi.org/10.1111/ajo.12253>

Lisonkova, S., Joseph, K.S., 2013. Incidence of preeclampsia: Risk factors and outcomes

associated with early-versus late-onset disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 209.

<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.08.019>

Lunkes, G.I.L., Lunkes, D.S., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Morsch, A.L.B., Miron, R.,

Schetinger, M.R.C., 2004. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-

induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65, 1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2003.11.016>

Luo, Z., An, N., Xu, H., Larante, A., Audibert, F., Fraser, W.D., 2007. The effects and

mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia : a systematic review. *Paediatr.*

Perinat. Epidemiol. 21, 36–45.

Mabry-Hernandez, I., Romano, M.J., 2018. Screening for preeclampsia. *Am. Fam. Physician*

97, 117–118. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.3439>

Marcelo Fariñas, Carlos Puebla, Francisco Westermeier, Miguel J. Jo, Marc, al Pastor-

Anglada, Paola Casanello, and L.S., 2010. Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter

- activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP – C / EBP a in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes. *Cardiovasc. Res.* 86, 45–54. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp410>
- Moses, R.G., Morris, G.J., Petocz, P., San Gil, F., Garg, D., 2011. The impact of potential new diagnostic criteria on the prevalence of gestational diabetes mellitus in Australia. *Med J Aust* 194, 338–340. <https://doi.org/10.1111/aogs.12209>
- Babah O.A, Oluwole A.A, Ayanbode O.S, Ohazurike E.O, 2017. Obesity and preeclampsia : Role of fibrinogen and C - reactive protein. *Trop. J. Obstet. Gynaecol.* 34, 45–48. <https://doi.org/10.4103/TJOG.TJOG>
- Obesity and overweight, 2015. World Health Organization. 1–5.
- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37, 81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Ohtani, M., Oka, T., Ohura, K., 2013. General and Comparative Endocrinology Possible involvement of A 2A and A 3 receptors in modulation of insulin secretion and b -cell survival in mouse pancreatic islets. *Gen. Comp. Endocrinol.* 187, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.011>
- Packham, M.A., Rand, M.L., 2011. Historical perspective on ADP-induced platelet activation. *Purinergic Signal.* 7, 283–292. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9227-x>
- Paré, E., Parry, S., McElrath, T.F., Pucci, D., Newton, A., Lim, K.-H., 2014. Clinical risk factors for preeclampsia in the 21st century. *Obstet. Gynecol.* 124. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000451>
- Robillard, P.Y., Gustaaf, A., Dekker, A.T.C.H, 2002. Evolutionary Adaptations to Preeclampsia / Eclampsia in Humans : Low Fecundability Rate , Loss of Oestrus , Prohibitions of Incest and Systematic Polyandry. *Am. J. Reprod. Immunol.* 47, 104–111.

- Ralevic, V., Burnstock, G., 2003. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* 16, 133–40. <https://doi.org/372> [pii]
- Roberts, J.M., Lain, K.Y., 2002. Recent Insights into the Pathogenesis of Pre-eclampsia. *Placenta* 23, 359–372.
- Robillard, P., Dekker, G.A., Hulsey, T.C., 1999. Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia : primigravidity or primipaternity ? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 84, 37–41.
- Robillard, P.Y., Hulsey TC, Périanin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E, 1994. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet (London, England)* 8928, 973–975.
- Robson, S.C., Sévigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2, 409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>
- Rokhafrooz, S., Ghadiri, A., Ghandil, P., Ghafourian, M., Hossaini, H., Daraei, N., Najafian, M., Rouhizadeh, A., 2018. Association between HLA-G 14bp Gene Polymorphism and Serum sHLA-G Protein Concentrations in Preeclamptic Patients and Normal Pregnant Women Association between HLA-G 14bp Gene Polymorphism and Serum sHLA-G Protein Concentrations in Preeclamptic Patients a. *Immunol. Invest.* 00, 1–11. <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1467925>
- Rosa, M., Schetinger, C., Maria, V., Denise, C., Wyse, A.T.S., 2007. NTPDase and 5' - nucleotidase activities in physiological and disease conditions : New perspectives for human health. *Biofactors* 31, 77–98.
- Saftlas, A.F., Rubenstein, L., Prater, K., Harland, K.K., Field, E., Triche, E.W., 2013. Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.07.006>

- San Martín, R., Sobrevia, L., 2006. Gestational diabetes and the adenosine/L-arginine/nitric oxide (ALANO) pathway in human umbilical vein endothelium. *Placenta* 27, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.011>
- Schmatz, R., Mazzanti, C.M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Maldonado, P.A., Corrêa, M., Saydelles, C., Becker, L., Bagatini, M., Dos, J., Jaques, S., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., 2009. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain Res. Bull.* 80, 371–376.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.019>
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 4–14.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>
- Shrivastava, S., Mcvey, J.H., Dorling, A., 2007. The Interface Between Coagulation and Immunity 499–506. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01653.x>
- Spaans, F., De Vos, P., Bakker, W.W., Van Goor, H., Faas, M.M., 2014. Danger signals from ATP and adenosine in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension* 63, 1154–1160.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03240>
- Stegers, E.A.P., Von Dadelszen, P., Duvekot, J.J., Pijnenborg, R., 2010. Pre-eclampsia. *Lancet* 376, 631–644. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60279-6)
- Strouch, M.B., Jackson, E.K., Mi, Z.C., Metes, N.A., Carey, G.B., 2005. Extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in isolated adipocytes and adipose tissue. *Obes. Res.* 13, 974–981. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.114>
- Tang, L., Okamoto, S., Shiuchi, T., Toda, C., Takagi, K., Sato, T., Saito, K., Yokota, S., Minokoshi, Y., 2015. Sympathetic nerve activity maintains an anti-inflammatory state in

adipose tissue in male mice by inhibiting TNF- α gene expression in macrophages.

Endocrinology 156, 3680–3694. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1096>

Tersigni, C., Redman, C.W., Dragovic, R., Tannetta, D., Scambia, G., Simone, N. Di, Sargent, I., Vatish, M., 2018. HLA-DR is aberrantly expressed at feto-maternal interface in pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.06.024>

Vianna, P., Mondadori, A.G., Dornfeld, D., Alegre, P., Alegre, P., Alegre, P., 2016. HLA-G and CD8+ regulatory t cells in the inflammatory environment of preeclampsia 1–30.

Virgilio, F. Di, Vuerich, M., 2015. Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical Purinergic signaling in the immune system. *Auton. Neurosci. Basic Clin.*

<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>

Walker, J.J., 2000. Pre-eclampsia. *Seminars* 356, 1260–1265.

Weissgerber, T.L., Mudd, L.M., 2015. Preeclampsia and Diabetes. *Diabetes and Pregnancy* 15, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0579-4>

Yang, G.K., Fredholm, B.B., Kieffer, T.J., Kwok, Y.N., 2012. Improved blood glucose disposal and altered insulin secretion patterns in adenosine A 1 receptor knockout mice 180–191. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00050.2012>

Yip, L., Taylor, C., Whiting, C.C., Fathman, C.G., 2000. Diminished Adenosine A1 Receptor Expression in Pancreatic α -Cells May Contribute to the Pathology of Type 1 Diabetes. *Diabetes* 62, 4208–4219. <https://doi.org/10.2337/db13-0614>

Yogev, Y., Catalano, P.M., 2015. Pregnancy and Obesity. *Obstet. Gynecol. Clin. NA* 36, 285–300. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2009.03.003>

Yoneyama, Y., Sawa, R., Suzuki, S., Otsubo, Y., Miura, A., Kuwabara, Y., Ishino, H., Kiyokawa, Y., Doi, D., Yoneyama, K., Kobayashi, H., Araki, T., 2002. Serum adenosine deaminase activity in women with pre-eclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 54, 164–167. <https://doi.org/10.1159/000067885>

- Yoneyama, Y., Suzuki, S., Sawa, R., Kiyokawa, Y., Power, G.G., Araki, T., 2001. Plasma adenosine levels and P-selectin expression on platelets in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 97, 366–370. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(00\)01184-4](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(00)01184-4)
- Yoneyama, Y., Suzuki, S., Sawa, R., Otsubo, Y., Power, G.G., Araki, T., 2000. Plasma adenosine levels increase in women with normal pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 1200–1203. <https://doi.org/10.1067/mob.2000.104832>
- Zeiser, R., Robson, S.C., 2016. Unlocking the Potential of Purinergic Signaling in Transplantation. *Am. J. os Transplant.* 16, 2781–2794. <https://doi.org/10.1111/ajt.13801>
- Zimmet, P.Z., Magliano, D.J., Herman, W.H., Shaw, J.E., 2014. Diabetes: A 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 56–64. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70112-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70112-8)

Figure Legends

Figure 1. Factors influencing the change in purinergic signaling in preeclampsia

Preeclampsia is believed to be related to extensive vascular changes in the spiral arteries that carry maternal blood to the placenta. This characteristic of the pathology may result in abnormal supply of oxygen to the placenta leading to a potential of hypoxia or ischemia causing activation of several mechanisms resulting in a high level of oxidative stress and inflammation. This phenomenon is suggested to result from increased expression and activity of hypoxia. Oxidative stress results in endothelial dysfunction and most likely increases the release in the extracellular medium of ATP and ADP nucleotides. In addition to ATP being recognized as a damage marker, high concentrations in the extracellular medium confer a platelet inhibitory property, which indicates the mechanism of the organism against the disease. However, high concentrations of ADP in the extracellular medium induce platelet aggregation favoring the disease process. The systemic endothelial dysfunction present in PE causes an exaggerated coagulation in these pregnant women. Therefore, the extracellular levels of adenosine are reduced in this group of pregnant women.

Figure 2. Involvement of risk factors in preeclampsia.

Some clinical disorders predispose women to preeclampsia. Appropriate identification of women who are at increased risk for PE makes it possible to maximize the chances of establishing an early diagnosis and treatment. Analyzing the main risk factors of PE we have: as a means of regulating obesity there is the release of TNF-, which will have its concentration decreased in the extracellular medium through adenosine. In addition, there are studies demonstrating increased E-ADA in the body impairs insulin sensitivity to the glucose transporter. On the other hand, the inflammation caused by poor immune adaptation has high

levels of ATP and increased CD73 activity acting as antiaggregant. Diabetes and genetic incompatibility are related to each other through altered vascular function. This fact may lead to an increase in platelet aggregation and, consequently, an increased activity of E-ADA in diabetic pregnant women. Already the platelet aggregation induced by the altered vascular function causes increased ADP and AMP as a response to genetic incompatibility between mother and fetus and their levels increased through the reduced levels of CD39 and CD73. The signaling of the purinergic system becomes a great ally in the evidence of pathologies since it is responsible for the purinergic regulation of the immune and inflammatory response during the clinical evolution of the disease.

Figure 1

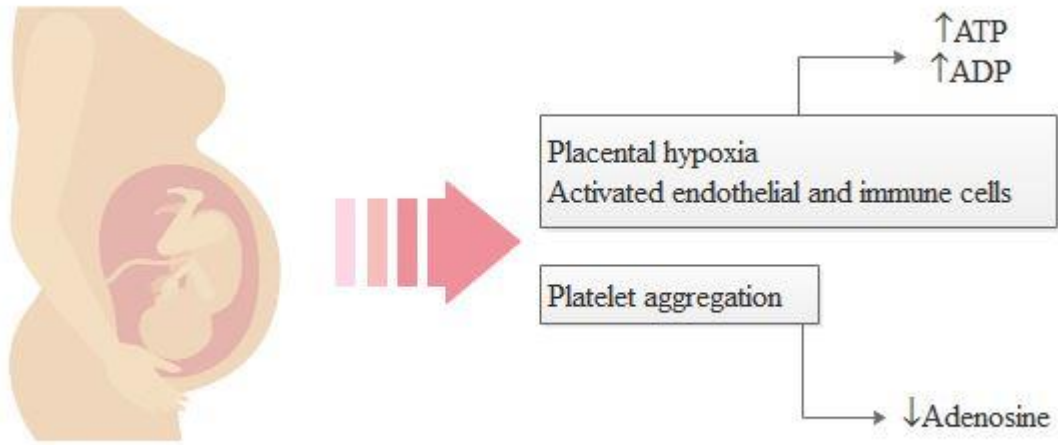
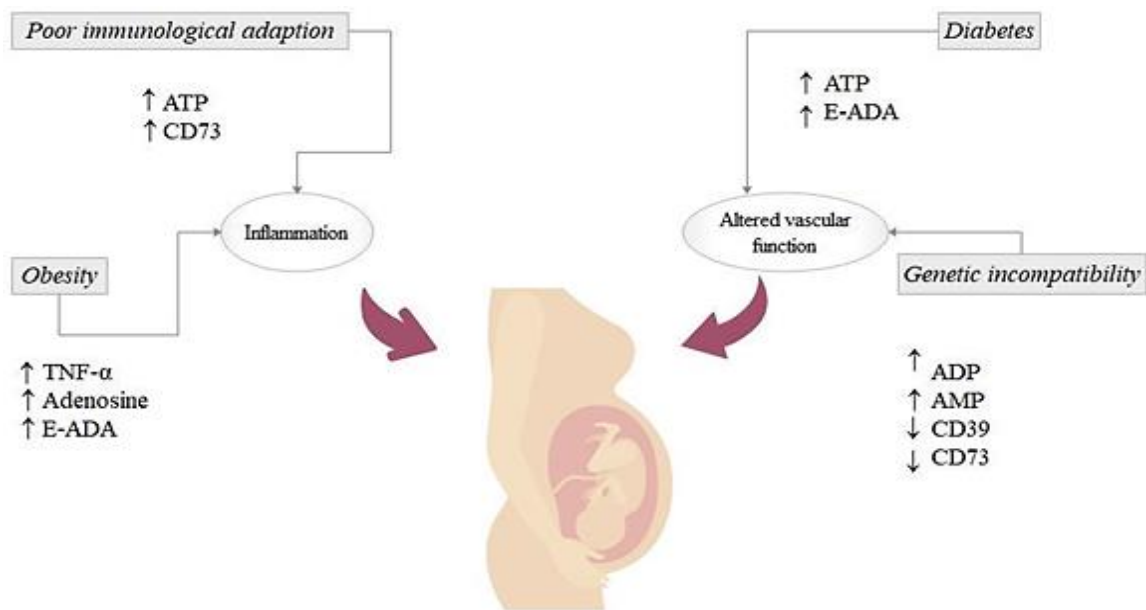


Figure 2



5 DISCUSSÃO

A gestação provoca ao organismo uma mudança brusca em um curto espaço de tempo. Riscos de sangramento ocorrem em diferentes fases da gestação que vão desde a implantação e invasão trofoblástica das artérias espiraladas à exposição dessas artérias durante o processo de formação da decídua basal que ocorre em torno de 18^o semana (KOOPMANS et al., 2014; TALUNGCHIT; LIABSUETRAKUL; LINDMARK, 2013). Além disso, as adaptações decorrem das medidas de proteção do organismo frente ao sangramento excessivo no momento do parto. Uma das consequências dessa mudança é o dano endotelial o qual impacta diretamente nas plaquetas e no processo de coagulação. Desse modo, podemos inferir que o aumento da agregação plaquetária no grupo de gestantes normais e pré-eclâmpticas, nesse estudo, pode ser devido a essas alterações fisiológicas. Além disso, é possível observar a diferenciação no aumento desse processo coagulatório entre as gestantes normais e as com PE, confirmando que essa patologia potencializa os processos de dano e coagulação (Figura 9).

A trombocitopenia é uma condição bastante comum em gestantes com PE. Sua incidência está em torno de 15 a 20% e pode chegar a 50% em casos de PE grave (JODKOWSKA et al., 2015; LEEMAN et al., 2016; PALTA et al., 2015). A etiologia é multifatorial, mas a trombocitopenia está relacionada com a lesão endotelial a qual provoca a ativação e consumo exagerado de plaquetas (PALTA et al., 2015). Fato esse que é observado nesse estudo ao analisar os parâmetros de contagem de plaquetas e IPF. Percebe-se que esses parâmetros são inversamente proporcionais. Na medida em que há uma acentuação na hipercoagulabilidade há uma elevação no consumo das plaquetas, diminuindo a sua quantidade na circulação sanguínea. Consequentemente, os valores de IPF aumentam, uma vez que o processo de coagulação está acelerado, com isso as plaquetas são recrutadas para a formação de trombos e a medula óssea não consegue produzir em tempo hábil a quantidade de plaquetas necessárias e acaba liberando na corrente sanguínea plaquetas jovens. A metodologia utilizada para a obtenção do IPF é acessível, simples e de baixo custo, já que é realizada no mesmo equipamento em que se realiza hemogramas de rotina. Sendo assim, a viabilidade da obtenção do IPF pode ser útil na avaliação de gestantes com PE. Os resultados aqui encontrados demonstram que esse parâmetro pode ajudar no diagnóstico diferencial em associação com outras informações clínicas a respeito da paciente.

Na PE a hipercoagulabilidade depende da via extrínseca da coagulação que altera a configuração dos fosfolipídios dentro da membrana celular sendo evidenciado pelo tempo de

protrombina (TP) (JEONG et al., 2013). Comparando-se os diferentes grupos nesse estudo, percebe-se que o parâmetro TP das gestantes com PE é maior que os outros grupos. Esse fato indica que a coagulação ocorre em um tempo menor, proporcionando o risco da formação de coágulos.

Avaliando esses diferentes parâmetros de coagulação no âmbito do sistema purinérgico é possível associar essas alterações ao mecanismo de resposta do organismo frente ao dano vascular. Os nucleotídeos representam um importante papel na regulação do fluxo normal (ZIMMERMANN, 1999). O ATP, uma importante molécula sinalizadora de dano, é liberado a partir de plaquetas ativadas e hemácias rompidas. Já o ADP possui a capacidade de induzir a agregação plaquetária de uma maneira irreversível, quando está em altas concentrações fazendo com que as plaquetas liberem o conteúdo dos seus grânulos na corrente sanguínea. A partir desses processos é possível justificar a importância das ectonucleotidases em hidrolisar os nucleotídeos até adenosina (BURNSTOCK, 2015). Sendo assim, pode-se sugerir que as alterações das atividades das enzimas NTPDase e E-5' nucleotidase nas gestantes com PE tenham sido desencadeadas a partir do dano vascular. Nesse estudo, os resultados encontrados nos parâmetros de coagulação relacionam-se com as atividades enzimáticas das NTPDase e E-5' nucleotidase.

O ATP é liberado por tecido hipóxico, nesse caso pela placenta hipóxica (BAKKER et al., 2013; BOURS et al., 2006). A liberação na circulação causa a ativação de células imunes e endoteliais que também podem produzir ATP, resultando em uma cascata de ativação (GERASIMOVSKAYA et al., 2002; IYER et al., 2009). Como mecanismo de proteção, o ATP pode ser hidrolisado em adenosina por diferentes enzimas extracelulares presentes nas células como as células endoteliais e as células trofoblásticas (BOURS et al., 2006; LEE et al., 2010). A baixa atividade da NTPDase em hidrolisar o ATP em gestantes com PE sugere que o organismo está tentando reverter a situação de hipercoagulabilidade em que se encontra, uma vez que altas concentrações de ATP na circulação promove a inibição plaquetária possivelmente pelo fato do ATP gerar adenosina, um importante inibidor de agregação plaquetária; além de ser considerado um vasoconstritor do endotélio. Por outro lado, esse mecanismo compensatório parece não ser suficiente, uma vez que a condição dessa patologia é mantida. Apesar desse estudo não ter avaliado a quantidade de ATP circulante, pode-se sugerir através da reduzida atividade de NTPDase que haja uma alta concentração de ATP nas gestantes com PE. Estudo de Bours et al., (2006), apresentou níveis plasmáticos aumentados de ATP extracelular em gestantes com PE. Sendo assim, considera-se que o ATP elevado

contribui para o desenvolvimento da doença, uma vez que o ATP extracelular é um considerado um sinal de perigo, além de aumentar a pressão arterial.

Outro fator que colabora para que a PE siga se manifestando nessas gestantes mesmo que a atividade da NTPDase frente ao ATP esteja em busca da homeostasia normal, é o fato da atividade reduzida da enzima sobre o ADP. Com isso sugere-se uma maior concentração de ADP na circulação o que promove ainda mais a agregação plaquetária. Sabe-se que quando ativadas, as plaquetas, liberam grandes quantidades de ATP e ADP. O papel do organismo é de tentar reverter esse processo através da atividade modulatória da NTPDase sobre esses substratos. No entanto, a partir de mecanismos ainda não elucidados, nem sempre é possível obter o equilíbrio hemostático. Diferentemente do que era esperado, os marcadores de expressão da NTPDase e da Ecto-5'-nucleotidase não apresentaram resultados significativos a respeito da ativação plaquetária.

O ADP induz a formação de adenosina a qual aumenta rapidamente em situação de dano tecidual (CEKIC; LINDEN, 2016). Nesse estudo, observou-se um grande aumento na atividade da enzima E-ADA. Corroborando com os nossos resultados, estudo de Leal et al. (2016), apresentou também uma grande elevação na atividade dessa enzima. Supõe-se que o aumento de agregação plaquetária induza uma maior atividade da E-ADA proporcionando uma menor quantidade de adenosina no meio extracelular. Como consequência, esse mecanismo exacerba o processo de coagulação, uma vez que a adenosina é um importante inibidor de agregação plaquetária. Por outro lado, nesse estudo não houve diferença significativa na expressão de CD39 e CD73, os quais normalmente estão elevados em circunstâncias de hipóxia e o seu aumento geraria um papel protetor através da geração de adenosina (DWYER et al., 2004; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Todas essas alterações a nível de coagulação observadas em gestantes com PE neste estudo podem estar relacionadas com os fatores de risco dessas mulheres. Em relação à obesidade, 13% das gestantes com PE encontram-se com o IMC acima dos valores recomendados. A causa da PE é desconhecida, porém, estudos encontraram uma associação entre IMC elevado e PE (RUDRA; WILLIAMS, 2005). Mulheres com menor índice corporal possuem menor risco em adquirir PE (BARTON, 2008; BELOGOLOVKIN et al., 2007). O mecanismo pelo qual a obesidade aumenta a incidência da PE inclui tanto o aumento à resistência à insulina quanto à inflamação (MCDONALD et al., 2012; WALSH, 2007). Além disso, a resistência à insulina ganha mais força na aquisição da PE, uma vez que provoca a redução de óxido nítrico podendo levar à hipertensão (ANDERSON, 2001; RAY JG, VERMEULEN MJ, SCHULL MJ, 2005; SKJAERVEN et al., 2012). Nossos resultados estão

de acordo com o estudo de Dantas et al., (2013), em que se acredita que o aumento da obesidade se deva ao aumento da urbanização e mudanças na dieta da população (CABRAL; LIRA, 2012; VÍTOLO; BUEN; GAMA, 2011). Além disso, estudos demonstram que mulheres latino-americanas possuem forte associação com maior IMC e PE (FORTNER et al., 2009; RENEE TURZANSKI FORTNER, PENELOPE S. PEKOW; BRIAN W. WHITCOMB, LYNNETTE LEIDY SIEVERT, GLENN MARKENSON; LISA CHASANTABER, 2011).

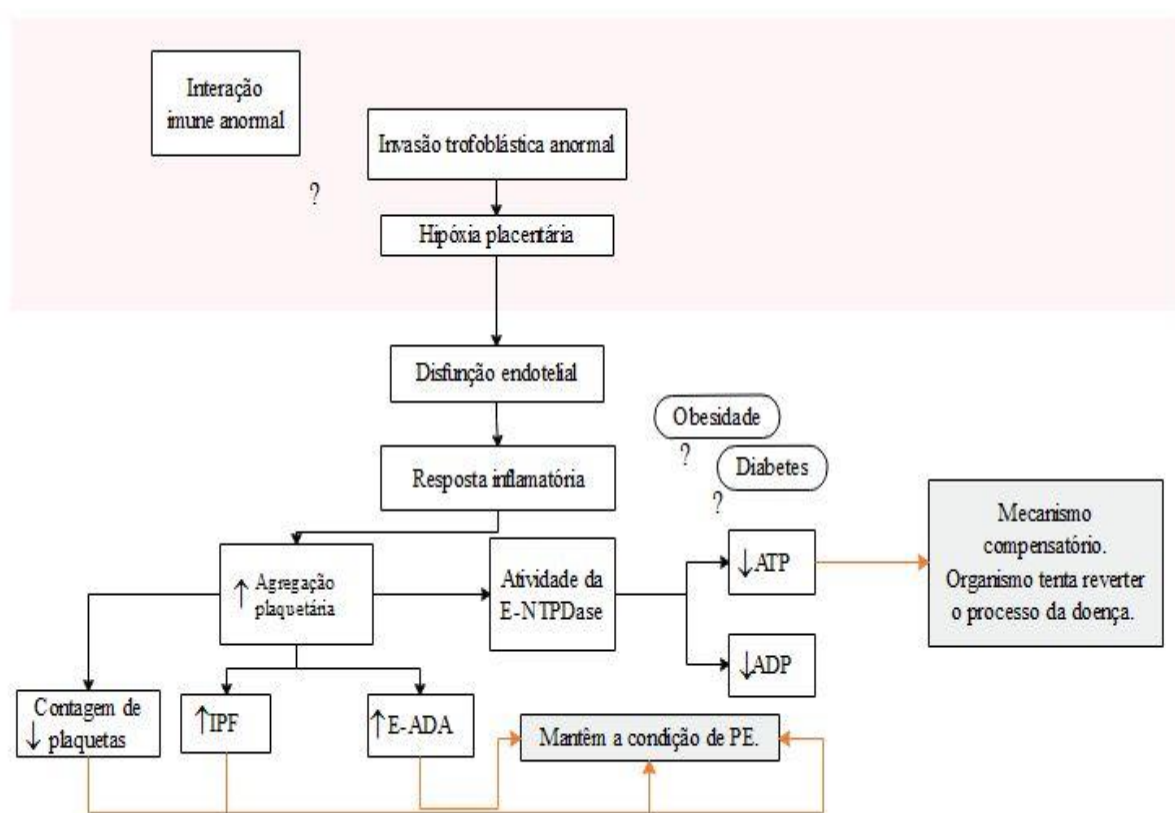
Além disso, todo esse processo inflamatório que desencadeou a alteração dos parâmetros de coagulação pode estar envolvidos no processo de distúrbio imunológico provocado pela PE. A partir do século XX, a hipótese de que o organismo materno tenta rejeitar a unidade feto-placentária por conter antígenos paternos estranhos ao organismo da mãe, ganhou força (BIGGAR et al., 2010; TERSIGNI et al., 2018). Relatos das pacientes com PE deste estudo demonstraram que houve um menor tempo de coabitação sexual e gestação com parceiro diferente da anterior, sugerindo que esses fatores imunológicos podem estar relacionados com a aquisição da PE. No entanto, é necessário mais estudos a respeito do HLA da mãe e do pai.

Contudo, esse trabalho evidenciou que a PE induz um forte processo de coagulação no organismo materno. Sendo assim, o aumento do consumo de plaquetas é maior que a sua reposição. Por esse motivo é evidenciado valores aumentados de IPF das gestantes com PE quando comparadas às gestantes normotensas. Além disso, esse parâmetro que é de fácil execução poderia ter uma maior aplicabilidade no auxílio do diagnóstico da PE uma vez que o VPM não mostrou alterações significativas nesse estudo, demonstrando ser um processo subsequente à liberação de plaquetas imaturas. Uma das vantagens da avaliação do IPF sobre o VPM consiste no fato de que o IPF mede o número de plaquetas recém liberadas pela medula óssea alteração mais precoce do que as apresentadas pelo VPM e contagem de plaquetas (BRIGGS et al., 2004; BRIGGS; HARRISON; MACHIN, 2007). Sendo assim a avaliação da IPF como um parâmetro de maior importância clínica podendo auxiliar no diagnóstico precoce o que evitaria maiores complicações materno-fetais e um manejo adequado a essas pacientes.

Portanto, a síndrome da PE que pode ter origem na invasão anormal dos trofoblastos na placenta pode gerar o início da disfunção endotelial e ativação plaquetária. O contato dessas plaquetas com o endotélio lesado pode desencadear a cascata de coagulação e o aumento do consumo plaquetário resultando na diminuição do número de plaquetas e obtendo aumento das plaquetas imaturas como forma de compensação por parte da medula óssea.

Associar as alterações dos parâmetros de coagulação com o sistema purinérgico é de extrema importância uma vez que demonstra que resposta do organismo frente à doença. Com isso, acredita-se que as plaquetas são importantes no acompanhamento clínico das gestantes com PE. Uma vez que são obtidas de uma maneira simples e de baixo custo o que favorece o seu uso como marcador de diagnóstico e prognóstico nas desordens hipertensivas da gestação. Além do mais, o seu estudo pode elucidar causas obscuras envolvendo o processo de PE.

Figura 9 - Resumo esquemático – Gestantes com pré-eclâmpsia



6 CONCLUSÃO

Os dados analisados em conjunto permitem concluir que:

- Há uma maior agregação plaquetária em gestantes com PE;
- Observou-se que os valores de IPF estão aumentados em gestantes com PE, no entanto não houve diferença significativa entre os valores de VPM. Com isso, deduz-se que IPF é um parâmetro mais sensível quando comparado com o VPM. Além disso, esses devido sua praticidade esse índice pode ser facilmente introduzido na assistência clínica de gestantes;
- A atividade das enzimas E-NTPDase e E-5' nucleotidase em plaquetas de gestantes com PE mostrou-se alterada.
- Diferentemente do que era esperado, não se observaram alterações significativas na expressão da atividade das enzimas E-NTPDase e E-5' nucleotidase;
- Observou-se que o aumento da agregação plaquetária teve como reflexo alterações no âmbito do sistema purinérgico, indicando que esses processos podem estarem relacionados entre si através de mecanismos de compensação ou de sinalização de danos celulares;
- Com base na pesquisa bibliográfica foi possível observar que os fatores de risco possuem mecanismos similares aos da PE. Sendo assim, pode-se criar duas teorias a respeito: os mecanismos dos fatores de risco envolvendo a obesidade, diabetes, má adaptação imunológica e incompatibilidade genética potencializam os efeitos da PE, uma vez que constituem em um acréscimo de alterações semelhantes; as alterações presentes nos fatores de risco podem induzir o processo de hipercoagulabilidade e de inflamação presente nas gestantes com PE.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar um acompanhamento dos valores plaquetários e da atividade enzimática do sistema purinérgico durante e após a gestação de mulheres com PE a fim de entender o comportamento da plaqueta frente à doença e após o seu término;
- Estratificar as gestantes com PE de acordo com o manejo clínico e avaliar o comportamento farmacológico sobre o sistema purinérgico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, B.; LONGHI, S.; JOHN, C. R. The ectonucleotidases CD39 and CD73 : Novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 276, p. 121–144, 2017.
- ALTINBAS, S. et al. Increased MPV Is not a significant predictor for preeclampsia during pregnancy. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Nova Iorque, v. 26, n. 5, p. 403–406, 2012.
- AMARAL, L. M. et al. Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. **Current Hypertension Reports**, Filadélfia, v. 1, p. 19–21, 2017.
- ANDERSON, E. G. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. **Only First BMJ**, Londres, v. 335, n. 7627, p. 974, 2001.
- ANDRIETTI, S. et al. Competing-risks model in screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 35–37 weeks' gestation. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, Carnforth, v. 48, n. 1, p. 72-79, 2016.
- ANNAM, V.; SRINIVASA, K.; YATNATTI, S. K. Evaluation of platelet indices and platelet counts and their significance in Pre eclampsia and eclampsia. **International Journal of Biological & Medical Research**, Coimbatore, v. 2, n. 1, p. 425–428, 2011.
- ARULKUMARAN, N.; LIGHTSTONE, L. Severe pre-eclampsia and hypertensive crises. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, Amsterdam, v. 27, p. 877–884, 2013.
- BAKKER, W. W. et al. Plasma Hemopexin as a Potential Regulator of Vascular Responsiveness to Angiotensin II. **Reproductive sciences**, Thousand Oaks, v. 20, n. 3, p. 234–237, 2013.
- BALDANE, S. et al. Mean platelet volume could be a possible biomarker for papillary thyroid carcinomas. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Tailândia, v. 16, n. 7, p. 2671–2674, 2015.
- BARSOTTI, C.; IPATA, P. L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 36, p. 2214–2225, 2004.
- BARTON, J. R. Preeclampsia. **Clinical Expert Series**, Nova Iorque, v. 112, n. 2, p. 359–372, 2008.
- BAYHAN, Z. et al. Mean platelet volume as a biomarker for thyroid carcinoma. **International Surgery**, Nova Iorque, v. 101, n. 1, p. 50–53, 2016.
- BELOGOLOVKIN, V. et al. The effect of low body mass index on the development of gestational hypertension and preeclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal**

Medicine, Nova Iorque, v. 20, n. 1171, p. 509–513, 2007.

BERGMANN, F.; RATH, W. The Differential Diagnosis of Thrombocytopenia in Pregnancy. **Deutsches Aerzteblatt Online**, Köln, p. 795–802, 2015.

BEZERRA M. et al. Prevention of preeclampsia. **Journal of Pregnancy**, Cairo, v. 2012, p. 1–9, 2012.

BIGGAR, R. J. et al. HLA antigen sharing between mother and fetus as a risk factor for eclampsia and preeclampsia. **Health information management: journal of the Health Information Management Association of Australia**, Thousand Oaks, v. 71, n. 3, p. 263–267, 2010.

BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function : production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, p. 269–278, 2006.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BRETT C. et al. Pathogenesis of preeclampsia. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, Filadélfia, v. 5, n. 2, p. 173–192, 2010.

BRIGGS, C. et al. Continuing developments with the automated platelet count. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 77–91, 2007.

BRIGGS, C. et al. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 126, n. 1, p. 93–99, 2004.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: From discovery to current developments. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 99, n. 1, p. 16–34, 2014.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. **Purinergic Signalling**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 411–434, 2015.

BUYUKKAYA, R. et al. Relationship between placental grade and mean platelet volume. **Platelets**, Londres, v. 25, n. 4, p. 229–233, 2014.

CABRAL, P. C.; LIRA, P. I. C. De. Overweight and associated factors in children from northeastern Brazil. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 347–352, 2012.

CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.

CEYHAN, T. et al. The effect of pre-eclampsia on complete blood count, platelet count and mean platelet volume. **Annals of Hematology**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 320–322, 2006.

CHAIWORAPONGSA, T. et al. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. **Nature Publishing Group**, Londres, v. 10, n. 10, p. 466–480, 2014.

CHARNOCK-JONES, D. S. Placental hypoxia, endoplasmic reticulum stress and maternal endothelial sensitisation by sFLT1 in pre-eclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 114, p. 81–85, 2016.

CHESLEY, L. C. History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Londres, v. 27, n. 4, p. 801-820, 1984.

COLKESEN, Y. et al. Mean platelet volume is elevated during paroxysmal atrial fibrillation: a marker of increased platelet activation? **Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis**, Londres, v. 19, n. 5, p. 411–414, 2008.

CONSULTORIA CIENTÍFICA DA SYMEX AMÉRICA LATINA. Novos parâmetros em Hematologia. **Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial: Exposição Técnico-científica**, Rio de Janeiro, 2007.

CORREA, P. J. et al. Etiopathogenesis, prediction, and prevention of preeclampsia. **Hypertension in Pregnancy**, Londres, v. 35, n. 3, p. 280–294, 2016.

COSTA, M. L. Preeclampsia : Reflections on How to Counsel About Preventing Recurrence. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, Toronto, v. 37, n. 10, p. 887–893, 2015.

CRABBE, G.; POUCKE, M. V. A. N. Artefactually-normal automated platelet counts due to malaria-infected RBC. **Oxford**, v. 24, n. 3, p. 179-182, 2002.

CRONSTEIN, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory. **American Physiological Society**, Bethesda, v. 76, n. 1, p. 5–13, 1994.

CUI, C.; et al. Trimester-specific coagulation and anticoagulation reference intervals for healthy pregnancy. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 156, p. 82–86, 2017.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 38, p. 107–125, 2001.

CURIEL-BALSERA, E. et al. Analysis of maternal morbidity and mortality among patients admitted to Obstetric Intensive Care with severe preeclampsia, eclampsia or HELLP syndrome. **Medicina intensiva: Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias**, Madrid, v. 35, n. 8, p. 478–483, 2011.

DASTJERDI, M. S.; EMAMI, T.; NAJAFIAN, A. Mean platelet volume measurement , EDTA or citrate? **Hematology**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 317-319, 2016.

DOUGLAS B. CINES, L. D. L. Thrombocytopenia in Pregnancy. **Blood**, Londres, v. 11, n. 1, p. 2271-2277, 2017.

DUBYAK, G. R. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **American Physiological Society**, Bethesda, p. C577–C606, 1993.

DUNDAR, O. et al. Longitudinal study of platelet size changes in gestation and predictive

power of elevated MPV in development of pre-eclampsia. **Prenatal diagnosis**, Chichester, v. 28, n. 11, p. 1052–1056, 2008.

DWYER, K. M. et al. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 113, n. 10, p. 1440–1446, 2004.

ESCUADERO, C.; SOBREVIA, L. A Hypothesis for Preeclampsia: Adenosine and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Placental Microvascular Endothelium. **Placenta**, Amsterdam, v. 29, n. 6, p. 469–483, 2008.

EVERETT, T. R. et al. Immature platelet fraction analysis demonstrates a difference in thrombopoiesis between normotensive and preeclamptic pregnancies. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 111, n. 6, p. 1177–1179, 2014.

FORTNER, R. T. et al. Prepregnancy body mass index , gestational weight gain , and risk of hypertensive pregnancy among Latina women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Nova Iorque, v. 200, n. 2, p. 167–169, 2009.

FOX, N. S. et al. Risk Factors for Preeclampsia in Twin Pregnancies. **American urnal of obstetrics and gynecology**, Nova Iorque, v. 1, n. 212, p. 360-364, 2014.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, Nova Iorque, v. 52, n. 4, p. 283–294, 1997.

FREITAS, L. G. et al. Preeclampsia: are platelet count and indices useful for its prognostic? **Hematology**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 360-364, 2013.

FREITAS, L. G. et al. Preeclampsia: Integrated network model of platelet biomarkers interaction as a tool to evaluate the hemostatic/immunological interface. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 436, p. 193–201, 2014.

GARDINER, C.; VATISH, M. Impact of haemostatic mechanisms on pathophysiology of preeclampsia. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 151, p. S48–S52, 2017.

GATHIRAM, P.; MOODLEY, J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. **Cardiovascular Journal of Africa**, Durbanville, v. 27, n. 2, p. 71–78, 2016.

GERASIMOVSKAYA, E. V. et al. Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth: Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 47, p. 44638–44650, 2002.

GIUSTI G.; GALANTI B. Adenosine deaminase: colorimetric method, 3. ed. Nova Iorque: Ed. Hans Ulrich Bergmeyer, p. 315-323, 1984.

GODING, J. W. Ecto-enzymes : physiology meets pathology. **Journal of Leukocyte Biology**, Nova Iorque, v. 67, p. 285–311, 2000.

GOEL, A. et al. J. Pregnancy-related liver disorders. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, Gurgaon, v. 4, n. 2, p. 151–162, 2014.

GRADY, J. G. O. et al. Influence of splenectomy and the functional hyposplenism of coeliac disease on platelet count and volume. **Scandinavian Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 34, p. 425–428, 1985.

GRANGER, J. P.; SPRADLEY, F. T.; BAKRANIA, B. A. The Endothelin System: A Critical Player in the Pathophysiology of Preeclampsia. **Current Hypertension Reports**, Filadélfia, v. 20, n. 4, p. 1-13, 2018.

KOSZALKA P. et al. Targeted Disruption of CD73/Ecto-5'-Nucleotidase Alters Thromboregulation and Augments Vascular Inflammatory Response. **Circulation Research**, Baltimore, v. 95, n. 8, p. 814-821. 2004.

IYER, S. S. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Nova Deli, v. 106, n. 48, p. 20388–20393, 2009.

SPYCHALA J.; MITCHELL B. S.; BARANKIEWICZ J. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 158, p. 4947–4952, 1997.

JACOB, F.; NOVO, C. P.; BACHERT, C. Purinergic signaling in inflammatory cells : P2 receptor expression , functional effects , and modulation of inflammatory responses. **Purinergic signalling**, Netherlands, v. 9, p. 285–306, 2013.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, v. 5, p. 247–264, 2006.

JÄREMO, P. et al. The use of platelet density and volume measurements to estimate the severity of pre-eclampsia. **European Journal of Clinical Investigation**, Londres, v. 30, n. 12, p. 1113–1118, 2000.

JEONG, J. C. et al. Plasma haemostatic potential of haemodialysis patients assessed by thrombin generation assay: Hypercoagulability in patients with vascular access thrombosis. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 132, n. 5, p. 604–609, 2013.

JODKOWSKA, A. et al. Thrombocytopenia in pregnancy – pathogenesis and diagnostic approach. **Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej**, Polônia, p. 1215–1221, 2015.

JOHNS, R. Observations on puerperal convulsions. **Journal of Medical Science**, Dublin, v. 24, n. 1, p. 101–115, 1843.

JUNG, H. et al. Immature platelet fraction: Establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, Coréia, v. 30, n. 5, p. 451–459, 2010.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets : Physiology and Biochemistry. **Seminars in thrombosis**

and hemostasis, Nova Iorque, v. 31, p. 381–392, 2005.

KASHANIAN, M. et al. Evaluation of the value of the first and third trimester maternal mean platelet volume (MPV) for prediction of pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, Amsterdam, v. 3, p. 222-226, 2013.

KAZMI, R. S. et al. Platelet Function in Pre-Eclampsia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, Nova Iorque, v. 37, n. 2, p. 131–136, 2011.

KHAN, K. S. et al. Who analysis of causes of maternal death: a systematic review. **Lancet**, Nova Iorque, v. 367, n. 9516, p. 1066–1074, 2006.

KIM, Y. M. et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Nova Iorque, v. 189, n. 4, p. 1063–1069, 2003.

KONGWATTANAKUL, K et al. Incidence, characteristics, maternal complications, and perinatal outcomes associated with preeclampsia with severe features and HELLP syndrome. **International Journal of Women's Health**, Nova Zelândia, v. 10, p. 371–377, 2018.

KOOPMANS, C. M. et al. Prediction of postpartum hemorrhage in women with gestational hypertension or mild preeclampsia at term. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 399–407, 2014.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, Nova Iorque, v. 73, n. 3, p. 339–343, 2003.

LATTOVA, V. et al. Preeclampsia and thrombin generation test. **Ceska gynekologie**, República Checa, v. 78, n. 5, p. 466–472, 2013.

LEAL, C. A. M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Holanda, v. 304, n. 1–2, p. 325–330, 2007.

LEE, S. A. et al. P108 The expression of human CD39 and adenosine 2A receptor are augmented in the placenta from women with pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, Amsterdam, v. 1, p. S71, 2010.

LEE, W. S.; KIM, T. Y. Mean platelet volume and platelet distribution width are useful in the differential diagnosis of aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Nova Iorque, v. 48, n. 11, p. 1675–1676, 2010.

LEEMAN, L. et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy. **American Family Physician**, Kansas, v. 93, p. 121–127, 2016.

LI, X. L. et al. An analysis of the differences between early and late preeclampsia with severe hypertension. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 47-52.

LISTER, M. F. et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation.

Journal of Inflammation. Nova Iorque, v. 14, p. 1–14, 2007.

LOOMIS, W. H. et al. Hypertonic Stress Increases T Cell Interleukin-2 Expression through a Mechanism That Involves ATP Release, P2 Receptor, and p38 MAPK Activation*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 7, p. 4590–4596, 2003.

MABRY-HERNANDEZ, I.; ROMANO, M. J. Screening for preeclampsia. **American Family Physician**, Kansas, v. 97, n. 2, p. 117–118, 2018.

MAKRIS, A. et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. **Kidney International**, Nova Iorque, p. 977–984, 2007.

MANDY J. BELL. A historical overview of preeclampsia-eclampsia. **Journal of Obstetric, Gynecologic And Neonatal Nursing**, Filadélfia, v. 39, n. 5, p. 510–518, 2010.

MARCUS, A. J. et al. Metabolic Control of Excessive Extracellular Nucleotide Accumulation by CD39 / Ecto-Nucleotidase-1 : Implications for Ischemic Vascular Diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 305, n. 1, p. 9–16, 2003.

MAYNARD, S. E.; KARUMANCHI, S. A. Angiogenic Factors and Preeclampsia. **Seminars in Nephrology**, Filadélfia, v. 31, n. 1, p. 33–46, 2011.

MAZZARELLO, P.; CALLIGARO, A. L.; CALLIGARO, A. Giulio Bizzozero : a pioneer of cell biology. **Nature**, Londres, v. 2, n. October, p. 776–781, 2001.

MC LEAN, G.; REYES, O.; VELARDE, R. Effects of postpartum uterine curettage in the recovery from Preeclampsia/Eclampsia. A randomized, controlled trial. **Pregnancy Hypertension**, Amsterdam, v. 10, p. 64–69, 2017.

MCDONALD, S. D. et al. Research : Epidemiology Increased cardiovascular risk after pre-eclampsia in women with dysglycaemia. **Diabetic Medicine**, Oxford, v. 30, p. 1–7, 2012.

MCINTOSH, J. J. et al. Platelet Counts during Pregnancy. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 1379, p. 32–43, 2018.

MEHER, S.; DULEY, L. Progesterone for preventing pre-eclampsia and its complications. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. Oxford, v. 18, n. 4, p. 1-37, 2011.

MEHTA, V. B.; HART, J.; WEWERS, M. D. ATP-stimulated Release of Interleukin (IL) -1B and IL-18 Requires Priming by Lipopolysaccharide and Is Independent of Caspase-1 Cleavage. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 6, p. 3820–3826, 2001.

MENZIES, R. I. et al. Purinergic signaling in kidney disease. **Kidney International**, Nova Iorque, v. 91, n. 2, p. 315-323, 2017.

MIRANDA, M. L. et al. The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets): Clinical characteristics and maternal–fetal outcome in 172 patients. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women’s Cardiovascular Health**, Amsterdam, v. 1, p. p. 164-169, 2011.

ZUCKER, M. L. et al. Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 12, n. 3, p. 125-130, 2006.

MOL, B. W. J. et al. Pre-eclampsia. **Lancet**, Londres, v. 387, n. 10022, p. 999–1011, 2015.

MORAES, D. et al. Immature platelet fraction in hypertensive pregnancy. **Platelets**, Londres, v. 27, n. 4, p. 333-337, 2015.

NKAMBULE, B. B.; DAVISON, G. M.; IPP, H. The evaluation of platelet indices and markers of inflammation, coagulation and disease progression in treatment-naïve, asymptomatic HIV-infected individuals. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 450–458, 2015.

NORTH, R. A. et al. Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort. **BMJ**, Londres, v. 342, p. 1–11, 2011.

NTAIOS, G. et al. Increased values of mean platelet volume and platelet size deviation width may provide a safe positive diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. **Acta Haematologica**, Basel, v. 119, n. 3, p. 173–177, 2008.

NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 1, p. S13–S33, 2011.

PALTA, A. et al. Thrombocytopenia in pregnancy. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Tóquio, v. 36, p. 146–152, 2015.

PANKRATZ, S. et al. The inflammatory role of platelets: Translational insights from experimental studies of autoimmune disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 10, p. 1723, 2016.

POURSHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: The analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 42, n. 13–14, p. 1438–1443, 2009.

QADRI, S. et al. Mean platelet volume is decreased in HIV-infected women. **HIV Medicine**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 549–555, 2013.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug news & perspectives**, Nova Iorque, v. 16, n. 3, p. 133–40, 2003.

RAY J. G. et al. Cardiovascular Health After Maternal Placental Syndromes (CHAMPS): Population-Based Retrospective Cohort Study. **Lancet**, Londres, v. 366, p. 1797–1803, 2005.

REDMAN, C. W. Pre-eclampsia: Definitions, paternal contributions and a four stage model. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 2–5, 2011.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Immunology of Pre-Eclampsia. **American Journal of**

Reproductive Immunology, Nova Iorque, v. 63, n. 6, p. 534–543, 2010.

FORTNER, R. T. et al. Physical Activity and Hypertensive Disorders of Pregnancy among Hispanic Women. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**, Hagerstow, v. 43, p. 639–646, 2011.

REYNA-VILLASMIL, E. et al. Micropartículas endoteliales en preeclampsia y eclampsia. **Medicina Clinica**, Madri, v. 136, n. 12, p. 522–526, 2011.

ROBERTS, J. M. et al. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Nova Iorque, v. 161, n. 5, p. 1200–1204, 1989.

ROBILLARD, P. Y. et al. Historical evolution of ideas on eclampsia/preeclampsia: A proposed optimistic view of preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 123, n. May, p. 72–77, 2017.

ROBILLARD, P. Y. et al. La “Donna di Ostuni”, a case of eclampsia 28,000 years ago? **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Nova Iorque, v. 31, n. 10, p. 1381–1384, 2018.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, Netherlands, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROSA, M. et al. NTPDase and 5' -nucleotidase activities in physiological and disease conditions : New perspectives for human health. **Biofactors**, Netherlands, v. 31, p. 77–98, 2007.

RUDRA, C. L.; WILLIAMS, M. A. BMI as a modifying factor in the relations between age at menarche , menstrual cycle characteristics , and risk of preeclampsia. **Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, Londres, v. 21, n. October, p. 200–205, 2005.

SAN MARTÍN, R.; SOBREVIA, L. Gestational diabetes and the adenosine/L-arginine/nitric oxide (ALANO) pathway in human umbilical vein endothelium. **Placenta**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 1–10, 2006.

SANSANAYUDH, N. et al. Mean platelet volume and coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, Shannon, v. 175, n. 3, p. 433–440, 2014.

SANTOS, E. V. Dos; FILHO, J. M. Plaquetograma em Gestantes Normais e com Pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 201–206, 2004.

SAY, L. et al. Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. **The Lancet Global Health**, Londres, v. 2, n. 6, p. e323-33, 2014.

SCHMOELLER, D. et al. Mean Platelet Volume and Immature Platelet Fraction in Autoimmune Disorders. **Frontiers in Medicine**, Lausanne, v. 4, p. 1–5, 2017.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 11, n. 4, p. 264–74, 2011.

SIBAI, B. M. Reproductive endocrinology: Predictive biomarkers of pre-eclampsia in women with T1DM. **Nature Reviews Endocrinology**, Londres, v. 9, n. 11, p. 633–635, 2013.

SKJAERVEN, R. et al. Cardiovascular mortality after pre-eclampsia in one child mothers : prospective , population based cohort study. **BMJ**, Londres, v. 345, p. 16, 2012.

SMITH, R. A.; ALVAREZ, A. J.; ESTES, D. M. The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 78, p. 249–262, 2001.

SOSLAU, G. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, n. 1355, p. 131–140, 1997.

SOUZA, A. I.; BATISTA FILHO, M.; FERREIRA, L. O. C. Alterações hematológicas e gravidez. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 29–36, 2002.

STAFF, A. C.; DECHEND, R.; REDMAN, C. W. G. Review: Preeclampsia, acute atherosclerosis of the spiral arteries and future cardiovascular disease: Two new hypotheses. **Placenta**, Amsterdam, v. 34, p. S73–S78, 2013.

STEEGERS, E. A. P. et al. Pre-eclampsia. **The Lancet**, Londres, v. 376, n. 9741, p. 631–644, 2010.

SUN, S. et al. The ATP-P2X 7 Signaling Axis Is Dispensable for Obesity-Associated Inflammasome Activation in Adipose Tissue. **Diabetes**, Alexandria, v. 61, n. June, p. 1471–1478, 2012.

SUTTON, A. L. M.; HARPER, L. M.; TITA, A. T. N. Hypertensive Disorders in Pregnancy. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, Filadélfia, v. 45, n. 2, p. 333–347, 2018.

TALUNGCHIT, P.; LIABSUETRAKUL, T.; LINDMARK, G. Development and assessment of indicators for quality of care in severe preeclampsia/eclampsia and postpartum hemorrhage. **Journal for healthcare quality: official publication of the National Association for Healthcare Quality**, Skokie, v. 35, n. 3, p. 22–34, 2013.

TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 791–802, 2013.

TERSIGNI, C. et al. HLA-DR is aberrantly expressed at feto-maternal interface in pre-eclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, Limerick, v. 129, p. 48-52, 2018.

TROGSTAD, L.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C. Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, Amsterdam, v.

25, n. 3, p. 329–342, 2011.

UZAN, J. et al. Pre-eclampsia: Pathophysiology, diagnosis, and management. **Vascular Health and Risk Management**, Auckland, v. 7, n. 1, p. 467–474, 2011.

VAN DER MEER, W. et al. Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. **Journal of Clinical Pathology**. Londres, v. 56, p. 772–774, 2003.

VAROL, E.; OZAYDIN, M. Mean platelet volume in differentiating congestive heart failure from chronic obstructive pulmonary disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. e299, 2014.

VIRGILIO, F. Di et al. Nucleotide receptors : an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, Londres, v. 97, p. 587–600, 2001.

VIRGILIO, F. Di; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical Purinergic signaling in the immune system**. Amsterdam, v. 191, p. 117-123, 2015.

VÍTOLO, M. R.; BUEN, M. S. F.; GAMA, C. M. Impacto de um programa de orientação dietética sobre a velocidade de ganho de peso de gestantes atendidas em unidades de saúde. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v. 33, p. 13–19, 2011.

WACHOWICZ, B. et al. The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, Varsóvia, v. 76, n. 4, p. 269–281, 2016.

WALSH, S. W. Obesity: a risk factor for preeclampsia. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Nova Iorque, v. 18, n. 10, p. 365–370, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health report 2005: make every mother and child count. **World Health Organization**, Nova Iorque, p. 219, 2005.

WU, P. et al. Early pregnancy biomarkers in pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis, **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 16, . n. 9, p. 23035-23056, 2015.

YANG, S. W. et al. Significance of the platelet distribution width as a severity marker for the development of preeclampsia. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Limerick, v. 175, n. 1, p. 107–111, 2014.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

YEGUTKIN, G. G.; SAMBURSKI, S. S.; JALKANEN, S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. **The FASEB journal**: official publication of

the Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, v. 17, n. 10, p. 1328–1330, 2003.

ZHOU, Z. et al. Mean Platelet Volume and Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Diabetes Research**, Cairo, v. 2018, p. 1-10. 2018.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**, Londres, v. 5, n. 9, p. 987–988, 1999.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICES PLAQUETÁRIOS E ATIVIDADE DA NTPDASE E DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES NORMOTENSAS E COM PRÉ-ECLÂMPSIA

Pesquisador responsável: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria – Centro de Ciências da Saúde

Pesquisadores participantes: Ms. Taís Corrêa Almeida, Prof. Dr. José Édson Paz da Silva, Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal.

Telefone para contato: (55) 9131 1737 (Taís) ou (55) 3220.8346(José Edson)

Local da coleta dos dados: _____

Nome do paciente: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Responsável legal: _____

Você está sendo convidada para participar, como voluntário, em uma pesquisa.

Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Objetivo: Serão feitas algumas dosagens para avaliar a predição da pré-eclâmpsia.

Procedimento e riscos: **Os riscos a que as pacientes estarão sujeitas serão os inerentes à coleta de material biológico, o qual consiste em um desconforto devido a picada da agulha para a coleta de sangue, com possibilidade de mancha roxa no local de punção.**

Benefícios: os resultados do estudo não trarão benefícios diretos, porém sua contribuição é importante e consiste apenas para ajudar novos estudos sobre a evolução e tratamento da doença.

O projeto não lhe trará custos financeiros, não haverá recompensa pela sua participação e não ocorrerá penalidade caso você não aceite participar da pesquisa. Seu atendimento será mantido mesmo que você não participe da pesquisa. O material coletado (sangue e dados) será mantido sob guarda do pesquisador durante cinco anos e após será destruído.

Confidencialidade: sua identidade e dados pessoais não serão revelados, nem divulgados sem a sua autorização. Apenas os pesquisadores terão acesso às informações pessoais e aos resultados dos exames, os quais serão utilizados em conjunto com os dados de outros pacientes para a avaliação do estudo e em publicações científicas. Quando você assinar na linha abaixo, isto significa que concorda em participar da pesquisa descrita acima, Para esclarecimentos durante o período de pesquisa, contatar o pesquisador responsável, Prof. Dr. José Edson Paz da Silva. Você é livre para retirar seu consentimento a qualquer momento da pesquisa.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55)3220-8009 Email: comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br. Web: www.ufsm.br/cep

Eu _____ (paciente ou responsável), após ler/ouvir as informações sobre a pesquisa e esclarecer minhas dúvidas, concordo voluntariamente em participar desse estudo. Discuti com o pesquisador _____ sobre a minha decisão em participar dessa pesquisa, ficando claro para mim os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu tratamento neste serviço.

Afirmo ainda que, de livre e espontânea vontade, permito que os dados e informações a meu respeito sejam utilizados da forma como estabelecida entre eu e o pesquisador.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito da pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do participante Data:

.....

Assinatura do pesquisador Data:

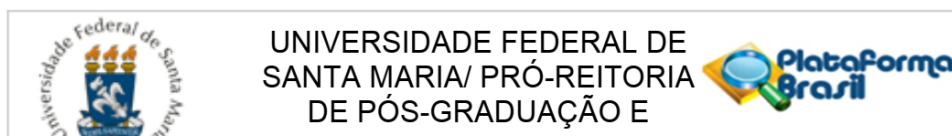
.....

APÊNDICE B – FORMULÁRIO PACIENTES

- 1.Nome: _____
- 2.Idade: _____
- 3.Telefone: _____
- 4.Endereço: _____
- 5.Escolaridade: _____
- 6.Profissão: _____
7. Número de filhos: _____
8. Gravidez planejada: _____
9. Pré-natal: _____ N° de consultas: _____
10. Parceiro fixo: _____
11. Idade gestacional: _____
12. Data da última gestação: _____
- 13.Peso: _____ Altura: _____
- 14.P.A: _____
15. Histórico de hipertensão arterial gestacional, pré-eclâmpsia ou eclampsia em gestações anteriores: _____
16. Uso de medicação: _____
17. HAS prévia: _____
18. Patologias: _____
19. Histórico de abortos anteriores: _____
20. Histórico familiar de hipertensão arterial, pré-eclâmpsia ou eclampsia: _____
21. Atividade física: _____

ANOTAÇÕES:

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICES PLAQUETÁRIOS E ATIVIDADE DA E-NTPDase E DA ECTO-5 β -NUCLEOTIDASE EM PLAQUETAS DE GESTANTES NORMOTENSAS E COM PRÉ-ECLÂMPSIA

Pesquisador: José Edson Paz da Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 42347615.6.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.118.436

Data da Relatoria: 16/06/2015

Apresentação do Projeto:

O trabalho corresponde a um projeto de tese vinculado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

O objetivo deste estudo será correlacionar os índices plaquetários (VPM, IPF) com a atividade das enzimas E-NTPDase, ecto-5 β -nucleotidase em gestantes normotensas e com síndrome de pré-eclâmpsia. Para isto, será realizado um estudo em aproximadamente 120 mulheres divididas em três grupos: grupo de gestantes normotensas, grupo de gestantes com pré-eclâmpsia e grupo de mulheres saudáveis e não grávidas atendidas no Ambulatório de pré-natal de Alto Risco, no Centro Obstétrico, no Centro de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Santa Maria, HUSM e na Unidade de Posto de Saúde da Família Urandia na cidade de Santa Maria, RS, no período do primeiro semestre de 2015 ao segundo semestre de 2016.

Para este estudo, serão avaliados o volume plaquetário médio (VPM) e fração de plaquetas imaturas (IPF), a atividade enzimática da E-NTPDase, da ecto-5 β -nucleotidase e o estado de ativação das plaquetas. As análises serão feitas a partir de amostras biológicas extras às quais serão solicitadas no encaminhamento do exame pelo próprio médico. Sendo assim, as coletas

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

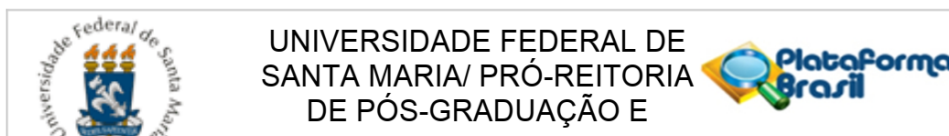
CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.118.436

serão realizadas durante o procedimento normal de cada paciente nos seus exames de rotina, por funcionários responsáveis pela coleta e as análises feitas no Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, setor de Hematologia. As pacientes gestantes normotensas e as voluntárias sadias não gestantes supostamente saudáveis serão abordadas a participarem do estudo durante sua consulta de rotina na Unidade Posto de Saúde da Família Urandia na cidade de Santa Maria, RS. A avaliação da ativação plaquetária será realizada no Laboratório de Imunologia Experimental e Aplicada (LABIBIO). O projeto será custeado com recursos do PROAP referente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), sem ônus para o HUSM. O projeto está concorrendo a editais de agências de fomento para obtenção de recursos adicionais.

O cronograma do projeto foi reapresentado e está adequado.

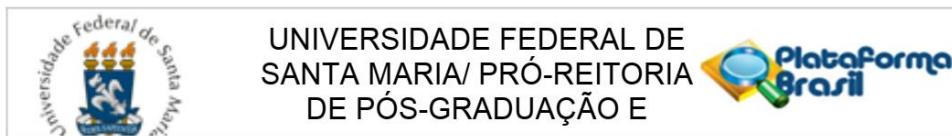
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: correlacionar índices plaquetários (volume plaquetário médio - VPM, fração de plaquetas imaturas - IPF) com a atividade das enzimas E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase em gestantes normotensas e com síndrome de pré-eclâmpsia.

Objetivos específicos

- Verificar a associação entre índices plaquetários a ocorrência de síndrome de pré-eclâmpsia;
- Comparar os índices plaquetários entre gestantes normotensas com gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia;
- Correlacionar a expressão de marcadores de ativação plaquetária com atividade das enzimas E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase através da citometria de fluxo em gestante normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Verificar se há correlação entre a atividade das enzimas E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de plaquetas com os índices plaquetários em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Relacionar a agregação plaquetária com o VPM em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Avaliar os parâmetros de tromboplastina ativada (TTP) e tempo de protrombina (TAP) em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Avaliar o processo de fibrinólise através dos parâmetros de plasmina e de D-dímero em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;
- Avaliar a influência da idade nos índices plaquetários e atividade das enzimas E-NTPDase e ecto-

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.118.436

5'- nucleotidase em gestantes normotensas e hipertensas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: os riscos a que as pacientes estarão sujeitas serão os inerentes a coleta de material biológico, o qual consiste em um desconforto devido a picada da agulha para a coleta de sangue, com possibilidade de mancha roxa no local de punção. Como forma de minimizar o risco, as coletas serão realizadas por profissionais experientes. Caso ocorra alguma intercorrência, como hematoma, esta paciente será acompanhada através de orientações como a utilização de pomada anti-inflamatória e compressa quente.

Benefícios: os benefícios esperados para esse estudo é tentar avaliar de maneira precoce a pré-eclampsia e auxiliar em novos estudos a respeito da evolução e tratamento dessa síndrome. Sendo assim, as participantes voluntárias deste trabalho tornam-se fundamentais na execução dessa pesquisa, por esse motivo compromete-se ao final do estudo apresentar ao centro de saúde o resultado desta pesquisa e o quão importante foi a colaboração dessas voluntarias para a concretização deste estudo. Além disso, as participantes receberão exames adicionais (hemograma) pelos pesquisadores.

Riscos e benefícios estão descritos de maneira adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

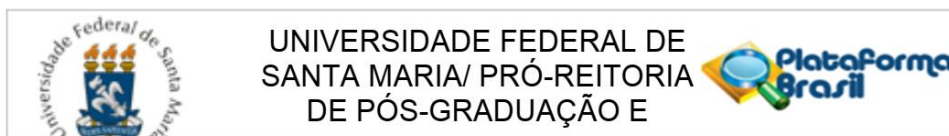
A revisão bibliográfica e bastante extensa e apresenta tema importante considerando a gravidade das alterações que a pré-eclampsia pode ocasionar tanto para a gestante como para o bebê.

Respondendo a solicitações anteriores, os pesquisadores apresentaram um documento onde foi esclarecido que os parceiros das gestantes normotensas e com pré-eclampsia seriam excluídos.

Parte das coletas irão acontecer na Unidade Posto de Saúde da Família Urandia. Pesquisadores apresentaram autorização da Secretaria Municipal de Saúde - Núcleo de Educação Permanente, autorizando as coletas na unidade.

Foram feitos esclarecimentos sobre os custos da coleta, que será feita na unidade mas sem onus para esta ou para o HUSM uma vez que todo o material necessário será fornecido pelos

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.118.436

pesquisadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Registro no GAP, folha de rosto, Termo de Confidencialidade e aprovação pela GEP estão apresentados de forma adequada.

Foi apresentado documento de autorização da Secretaria Municipal de Saúde - Núcleo de Educação Permanente, autorizando as coletas na unidade.

TCLE foi reapresentado e não apresenta mais inadequações.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

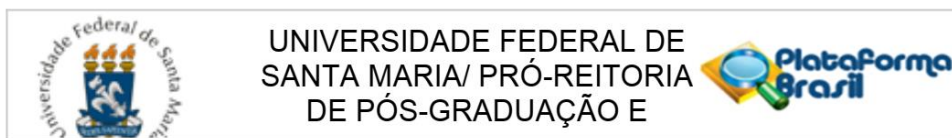
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 22 de Junho de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
 (Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.118.436

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I

Assunto: BCF Submission Confirmation for Preeclampsia: involvement between platelet parameters and system purinergic they are one danger signals.

De: em@editorialmanager.com

Para: tais.correa@yahoo.com.br

Data: terça-feira, 24 de julho de 2018 22:26:22 BRT

Jul 24, 2018

Dear Dr. Almeida,

Your submission entitled "Preeclampsia: involvement between platelet parameters and system purinergic they are one danger signals." has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<https://bcf.editorialmanager.com/>

Your username is: Dr. Taís

<https://bcf.editorialmanager.com/l.asp?i=122251&I=WEILHIZW>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

Blood Coagulation & Fibrinolysis

ANEXO C – CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II

----- Forwarded message -----

From: **Journal of Applied Biomedicine** <EviseSupport@elsevier.com>

Date: 2018-08-01 2:33 GMT-03:00

Subject: Successfully received: submission Preeclampsia: risk factors under aspect of purinergic system for Journal of Applied Biomedicine

To: jepazdasilva@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JAB_2018_296

Title: Preeclampsia: risk factors under aspect of purinergic system

Journal: Journal of Applied Biomedicine

Dear Professor Paz da Silva,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Applied Biomedicine. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JAB and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Applied Biomedicine

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier [B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands](#), Reg. No. 33156677.

--
José Edson Paz da Silva