

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEOTIDASES NA
HEMOSTASIA E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MULHERES GRÁVIDAS NORMAIS, COM DIABETES
MELITO GESTACIONAL, PRÉ-ECLAMPSIA E
PORTADORAS DO VÍRUS HIV**

TESE DE DOUTORADO

CLAUDIO ALBERTO MARTINS LEAL

Porto Alegre, RS, Brasil

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEOTIDASES NA
HEMOSTASIA E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MULHERES GRÁVIDAS NORMAIS, COM DIABETES
MELITO GESTACIONAL, PRÉ-ECLAMPSIA E PORTADORAS
DO VÍRUS HIV**

CLAUDIO ALBERTO MARTINS LEAL

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2010

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minhas filhas Júlia e Manuela que está por
nacer, meus maiores tesouros que Deus me deu.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela corre por nossa conta.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Daniela, pelo apoio, pela paciência e pelo auxílio dado no decorrer do trabalho.

Aos meus pais, Nomitor e Cleri, por torcerem sempre por mim, me apoiarem e me incentivarem nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos Clarissa e Mauro e cunhado Henri e cunhada Bárbara pelo incentivo.

A minha orientadora, professora Maria Rosa, por ter me dado esta oportunidade de aprender a pesquisar e ter me auxiliado durante os anos de estudo.

E, finalmente, agradeço a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na tese de doutorado intitulada “Avaliação da atividade de nucleotidases na hemostasia e parâmetros de estresse oxidativo em mulheres grávidas normais, com diabetes melito gestacional, pré-eclâmpsia e portadoras do vírus HIV” O trabalho está estruturado em três partes: resumo, introdução e objetivos (parte I), manuscritos e artigo (parte II), discussão, conclusões, referências e anexos (parte III).

Os resultados, a discussão e a conclusão contêm dados e comentários referentes aos manuscritos e artigos apresentados neste trabalho.

Nas referências bibliográficas estão apenas as citações utilizadas para desenvolver os itens introdução e discussão.

Nos anexos está a carta de aprovação do projeto dado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, assim como um exemplo do termo de consentimento livre e esclarecido utilizado para captação das pacientes gestantes e o questionário de avaliação utilizadas neste trabalho.

ÍNDICE

PARTE I	
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
1.1 Metabolismo na gestação.....	4
1.2 Metabolismo de glicose na gestação normal.....	5
1.3 Diabete Melito Gestacional.....	6
1.3.1 Rastreamento da Diabete Melito Gestacional.....	8
1.4 Pré-eclampsia.....	8
1.4.1 Diagnóstico da Pré-eclampsia.....	9
1.5 Gravidez e vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	10
1.6 Hemostasia.....	12
1.6.1 Endotélio vascular.....	13
1.6.2 Plaquetas sanguíneas.....	15
1.6.2.1 Adesão plaquetária.....	15
1.6.2.2 Ativação plaquetária.....	15
1.6.2.3 Secreção plaquetária.....	16
1.6.2.4 Agregação plaquetária.....	16
1.6.3 Coagulação sanguínea.....	18
1.7 Hemostasia na gestação.....	19
1.8 Sistema Purinérgico.....	22
1.8.1 Nucleotídeos e nucleosídeos como moléculas sinalizadoras....	22
1.8.2 Receptores purinérgicos.....	24
1.8.3 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	25
1.8.3.1 E-NTPDases e 5`-nucleotidases.....	26
1.8.3.2 Ecto-Nucleotideo Pirofosfatase Fosfodiesterase (E-NPPs)....	29

1.8.3.3 Adenosina desaminase.....	30
1.9 Estresse Oxidativo.....	31
1.9.1 Definição de radicais livres e antioxidantes.....	31
1.9.2 Estresse oxidativo no processo gestacional.....	33
OBJETIVOS.....	35
PARTE II	
CAPÍTULO I.....	37
CAPÍTULO II.....	67
CAPÍTULO III.....	97
PARTE III	
DISCUSSÃO.....	104
CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

Resumo

O período gestacional é bastante complexo e do ponto de vista vascular, ocorrem inúmeras alterações e adaptações no sistema circulatório, na funcionalidade plaquetária e no sistema endotelial com o objetivo de prevenir futuras complicações na mãe ou no concepto no momento do parto e após o nascimento. Além das alterações na circulação, nos processos vasculares e no sistema imune que são inerentes a este período, existem trabalhos demonstrando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) as quais poderão desencadear um desequilíbrio do balanço redox. Os nucleotídeos de purina ATP, ADP, AMP, além do nucleosídeo adenosina participam da regulação vascular endotelial, de processos inflamatórios e do controle imunológico entre outras funções. O controle da produção e dos níveis intracelulares e extracelulares destes nucleotídeos e nucleosídeos são regulados por uma cascata enzimática, na qual, participam as enzimas E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfodrolase), E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase Fosfodiesterase), 5'-Nucleotidase e adenosina desaminase. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade de enzimas envolvidas no processo hemostático de gestantes normais e com complicações, como a diabetes melito gestacional, a pré-eclampsia e contaminadas com o vírus HIV, além de alguns parâmetros de estresse oxidativo e a agregação plaquetária durante o terceiro trimestre gestacional. Os resultados obtidos demonstram um aumento na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normais e com diabetes melito gestacional e pré-eclampsia comparadas com mulheres não grávidas. Ocorreu um aumento na atividade da enzima adenosina desaminase no soro de gestantes normais e com diabetes melito gestacional, pré-eclampsia e contaminadas com o vírus HIV. Foi verificado, também, um aumento na atividade plaquetária, através da medida da agregação plaquetária, nas gestantes normais e com diabetes melito gestacional, pré-eclampsia e contaminadas com o vírus HIV. Por outro lado, foi verificado um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, butirilcolinesterase e acetilcolinesterase juntamente com um aumento da peroxidação lipídica e uma redução dos níveis de ácido ascórbico e conteúdo sulfidrílico total. Além disso, não foi encontrada alteração significativa na análise de carbonilação protéica. Os resultados apresentados aqui sugerem que estas ectonucleotidases atuam na modulação de respostas vasculares, inflamatórias, imunes e circulatórias. Finalmente, foi detectado um aumento na atividade de enzimas antioxidantes e uma redução no conteúdo de moléculas antioxidantes, acompanhadas de um aumento no dano oxidativo aos lipídios de membrana o que remete à uma produção aumentada de espécies reativas e a uma tentativa do organismo em combater este desequilíbrio.

Palavras Chave: gravidez, ectonucleotidases, plaquetas, soro, estresse oxidativo.

Abstract

The pregnancy stage is very complex in the vascular point of view, occurring many changes and adjusts in the circulatory system, in the platelets functionality and in the endothelial system with the function of prevent future complications to the pregnant or to the newborn at the delivery and in the afterbirth. Besides the circulation changes, in the vascular processes and in the immune system that are inherent to this stage, there are studies that report the generation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS), which could trigger an imbalance in the redox status. The purine nucleotides ATP, ADP, AMP and the nucleoside adenosine participate in the endothelial vascular regulation, inflammatory events, immune regulation, among other functions. The control of the production, the intracellular and extracellular levels of these nucleotides and nucleosides are regulated by an enzymatic cascade, in which, participate the enzymes E-NTPDases (ectonucleotise triphosphate diphosphohydrolases), E-NPPs (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. The purpose of this study was to investigate the activity of enzymes involved in the hemostatic dynamics from normal pregnant and those with complications, such as the gestational diabetes mellitus, the pre-eclampsia and infected with the HIV. We also investigated some oxidative stress parameters and the platelets aggregation during the third gestational trimester. The results demonstrated an increase in the enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase in platelets from normal pregnant and those with gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia compared with not-pregnant women. It was also observed an increase in the enzyme adenosine deaminase activity in the serum from normal pregnant and those with gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia and infected with the HIV. It was also verified an increase in the platelets activity through the measure of platelets aggregation in the normal pregnant, those with gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia and infected with the HIV. Otherwise, it was verified an increase in the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase together with an increase in the lipid peroxidation and a decrease in the ascorbic acid and total sulphhydryl groups content. Moreover, it was not observed any significant alteration in the protein carbonilation. The results showed here suggest that these ectonucleotidases participate in the modulation of vascular, inflammatory, immune and circulatory responses. Finally, it was detected an increase in the activity of antioxidant enzymes and a decrease in the antioxidant molecules content, together with an increase in the membrane lipids oxidative damage, which brings about an increased production of reactive species and a struggle of the body to combat this unbalance.

Keyword: pregnancy, ectonucleotidases, platelets, serum, oxidative stress.

Lista de Abreviaturas

DHEG - Doença Hipertensiva Específica da Gravidez

DMG – Diabete Mellitus Gestacional

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

ATP – Adenosina Trifosfato

ADP – Adenosina Difosfato

AMP – Adenosina Monofosfato

GTP – Guanosina Difosfato

E-NTPDases - Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase

E-NPPs - Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase Fosfodiesterase

ADA - Adenosina Deaminase

ERO - Espécies Radicalares de Oxigênio

ERN - Espécies Radicalares de Nitrogênio

GPx – Glutathione Peroxidase

CAT – Catalase

SOD – Superóxido Dismutase

MDA - Malondialdeído

UTP – Uridina Trifosfato

UDP – Uridina Difosfato

CoQH₂ – Ubiquinol

GSH – Glutathione Reduzida

1. Introdução

Na gravidez são profundas as adaptações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que acontecem na mulher a curto espaço de tempo. Elas começam logo após a fertilização e continuam durante toda a gravidez (duração média de 266 dias a partir da fertilização ou de 280 dias a partir da última menstruação) desaparecendo rápida e quase por completo após o parto e término da lactação. O entendimento desta adaptação do organismo materno é fundamental para que se diferencie o fisiológico do patológico e se possa prevenir, diagnosticar e tratar as intercorrências induzidas ou coincidentes com a gestação (Bussâmara, 2006).

1.1 Metabolismo na gestação

O conceito de metabolismo descreve as mudanças químicas que ocorrem continuamente nas células da matéria viva e remonta ao século XVIII. Envolve processo pelo qual o alimento ou matéria nutritiva é construído (anabolismo), ou pelo qual o protoplasma é quebrado a uma simples matéria (catabolismo). O metabolismo durante a gravidez foi inicialmente interpretado como uma introdução de um “parasito” sobre o organismo de uma mulher não grávida. As adaptações maternas eram descritas como uma reação ao estresse ou a depleção de reservas pelo feto. Este conceito é falho por inúmeras razões, entre elas, a de que muitos dos ajustes metabólicos acontecem nos estágios iniciais da gravidez quando o feto ainda é muito

pequeno para exigir considerável demanda metabólica da mãe (Hadden & McLaughlin 2009).

Já nos períodos finais da gravidez os processos metabólicos tornam-se mais complicados devido às interações entre o organismo materno e o desenvolvimento do feto. Portanto, as adaptações metabólicas durante a gravidez são essenciais para assegurar adequado crescimento e desenvolvimento para o feto; para garantir a este um estoque de energia e substrato que serão necessários após o nascimento; para atender as alterações necessárias no organismo materno para o aumento da demanda fisiológica da gravidez; para fornecer a mãe estoques de energia e substratos suficientes para fazer frente às demandas da gravidez tanto quanto aquelas do trabalho e lactação (Hadden & McLaughlin 2009).

1.2 Metabolismo da glicose na gestação normal

Na gravidez normal, o crescimento da unidade fetal-placentária aumenta os níveis de cortisol, do hormônio do crescimento, do hormônio lactogênio placentário humano, da progesterona e da prolactina, os quais podem resultar em hiperinsulinemia, resistência a insulina, hipoglicemia de jejum e hiperglicemia pós-prandial (Kuhl, C. 1998; Butte, N. 2000).

Por sua vez, ocorre um aumento e uma adaptação da função da célula beta pancreática para compensar a diminuição da sensibilidade à insulina e o aumento da demanda de energia. Morfologicamente, ocorre hiperplasia e hipertrofia das células pancreáticas maternas. Em resposta aos níveis de insulina elevados, o organismo materno utiliza a glicose muscular periférica e

os estoques de glicogênio teciduais para manter a sensibilidade a insulina normal no primeiro trimestre de gravidez. À medida que a gravidez avança, estas respostas tornam-se inadequadas para a demanda de energia exigida pelo feto e, então, a resistência a insulina desenvolve-se. A resistência à insulina em gestações normais é aumentada em cerca de 40% a 70% no terceiro trimestre de gestação (Pridjian & Benjamin, 2010).

1.3 Diabetes Mellito Gestacional

Este tipo de diabetes tem sido definido como algum grau de intolerância a glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (ADA, 2010), sendo diferente do diabetes tipo 1 ou 2 pré-diagnosticada ou de uma diabete do jovem com início na maturidade (MODY). Esse distúrbio é uma das complicações mais comuns da gestação, com uma prevalência de 2 a 15%, dependendo da população estudada e dos critérios diagnósticos utilizados (Montenegro et al., 2000).

Esta ampla definição de diabetes mellitus gestacional pode incluir mulheres cuja intolerância desenvolveu-se durante a gravidez e aquelas que eram portadoras de diabetes pré-existente e ainda não tinham sido diagnosticadas antes da gravidez. Esta distinção é muito importante visto que diferentemente da maioria dos bebês de mulheres que desenvolveram intolerância na gravidez, aqueles bebês de mulheres com diabete pré-existente podem estar expostos à hiperglicemia nos primeiros dois trimestres de gravidez resultando em um aumento do risco de várias anormalidades em seu sistema

cardiovascular, sistema nervoso central e músculo-esquelético (Corrigan et al., 2009; Correa et al., 2008). Comparado com as mulheres grávidas normais, mulheres com diabetes melito gestacional possuem a função das células- β pancreáticas prejudicadas e ocorre uma redução da adaptação destas células resultando na insuficiente secreção de insulina, responsável por manter os níveis de glicemia normais. Mulheres com diabetes melito gestacional e mulheres obesas com diabetes melito gestacional apresentam enorme resistência à insulina e menor produção de glicose hepática do que mulheres sem diabetes melito gestacional (Devlieger et al., 2008).

A realização de exames pré-natais é fundamental visto que a gestação em mulheres diabéticas é uma condição reconhecidamente associada a uma maior freqüência de anormalidades, quando comparada a gestações normais. Sabe-se que a hiperglicemia, nesse período, pode resultar em aumento da mortalidade fetal, além de uma maior freqüência de complicações no bebê tais como malformações, macrossomia, hipoglicemia, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, cardiomiopatia hipertrófica e síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido. Para a gestante, o mau controle metabólico está implicado em maiores índices de abortos espontâneos, infecções, hipertensão arterial, DHEG, partos pré-termo e cesáreas. Embora ainda não estejam completamente definidos os níveis ideais de glicemia durante a gestação nas pacientes diabéticas, já está demonstrado que um bom controle metabólico está associado à redução dessas complicações (Rudge et al., & Rugolo, 2000).

1.3.1 Rastreamento da Diabete Melito Gestacional

O rastreamento consiste, inicialmente, no teste oral de tolerância à glicose com 50 gramas (TOTG-50), e medidas de glicemia plasmática venosa, de jejum e de 1 h após a sobrecarga. A medida da glicemia plasmática venosa, em jejum, servirá para identificação de casos assintomáticos de Diabetes mellitus prévio. Um resultado de glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL, confirmado com repetição do exame, é considerado como diagnóstico de DMG. Caso contrário deve ser analisado a glicemia de 1 h do TOTG-50. Considera-se rastreamento positivo, quando a glicemia de 1 h após o TOTG-50 for maior ou igual a 130 mg/dL, estando indicado o teste de tolerância à glicose com 75 gramas para diagnóstico. Se a glicemia de 1 h, no teste com 50 gramas, for menor que 130 mg/dL, consideram-se rastreamento negativo, devendo ser repetido entre a 24^a e 28^a semanas e analisado, utilizando-se os mesmos critérios (Montenegro et al., 2000).

1.4 Pré-eclampsia

É uma desordem multisistêmica de causa ainda desconhecida que é unicamente da gravidez humana. É a maior causa de mortalidade e morbidade materna (15 a 20% em países desenvolvidos), morte perinatal, prematuridade e restrição do crescimento intrauterino. Esta é caracterizada por uma resposta vascular anormal durante a placentação a qual é associada com um aumento sistêmico da resistência vascular, aumento da agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e disfunção das células endoteliais. O quadro clínico

da pré-eclampsia pode se manifestar como uma síndrome maternal (hipertensão e proteinúria sem ou com outras anormalidades multisistêmicas) ou uma síndrome fetal (restrição do crescimento fetal, fluido amniótico reduzido e oxigenação anormal) (Sibai, 2003).

A pré-eclampsia é o maior problema obstétrico que leva a substancial mortalidade e morbidade maternal e perinatal, especialmente em países desenvolvidos (Duley, 2003). As conseqüências na pré-eclampsia dependem de um ou mais dos seguintes fatores: idade gestacional no momento do início da doença, severidade da doença, qualidade do desenvolvimento e presença ou ausência de desordens médicas pré-existentes (Kupferminc, 2003).

Em geral, as conseqüências perinatais e maternas são usualmente favoráveis em mulheres com suave pré-eclampsia desenvolvida em torno da 36ª semana gestacional. Ao contrário, a morbidade e mortalidade são aumentadas em mulheres que desenvolvem esta desordem após a 30ª semana de gestação (Zhang et al, 2003), naquelas com desordens médicas pré-existentes (Sibai, 2004) e naquelas pertencentes a países desenvolvidos (Sibai, 2003).

1.4.1 Diagnóstico da Pré-eclampsia

A pré-eclampsia é usualmente diagnosticada na presença de hipertensão associada com proteinúria. A hipertensão é definida como uma pressão sanguínea de 140 mm Hg (sistólica) ou 90 mm Hg (diastólica) em pelo menos duas ocasiões com um intervalo de medida de pelo menos 4 a 6 horas, sendo esta medição feita após a 20ª semana gestacional em mulheres conhecidamente normotensas antes da gestação (Brown et al., 2000).

As medições da pressão sanguínea destas gestantes para estabelecer o diagnóstico não devem ter um intervalo maior que uma semana. A hipertensão é considerada grave se ocorrer aumento sustentado da pressão sanguínea até o valor de 160 mm Hg (sistólica) e 110 mm Hg (diastólica) separadamente ou ambas (Hauth et al., 2000). A proteinúria é definida como a excreção de 300 mg ou mais de proteínas a cada 24 horas. Se as amostras de urina de 24 horas não são disponíveis, a proteinúria é definida como uma concentração protéica de 300 mg/L ou mais (1+ on dipstick) em pelo menos duas medidas utilizando amostras de urina aleatórias obtidas com um intervalo máximo de 4-6 horas entre uma coleta e a outra (Sibai, 2003).

Na ausência de proteinúria, a pré-eclampsia pode ser considerada quando a hipertensão está associada com sintomas cerebrais, dor no quadrante superior direito ou dor epigástrica juntamente com náuseas e vômitos e, também, diminuição do número total de plaquetas (trombocitopenia) e alterações dos níveis de enzimas hepáticas (Brown et al., 2000). A pré-eclampsia é considerada grave se a hipertensão severa esta associada com proteinúria ou se a hipertensão está associada com proteinúria severa (excreção de 5 g de proteína por dia) (Waugh et al., 2004).

1.5 Gravidez e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A incidência e a prevalência da infecção pelo HIV em mulheres vêm aumentando gradativamente desde a década de 1980, quando menos de 10% dos pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) eram do

sexo feminino. Atualmente, quase metade (44-47%) das pessoas infectadas pelo HIV são mulheres (Craft et al., 2007).

As principais formas de exposição na população feminina são os relacionamentos heterossexuais e o uso de drogas injetáveis, compreendendo 95% dos casos novos, com maior importância epidemiológica de forma direta para a exposição heterossexual, responsável pela infecção em 63% dos casos. Existem diversos fatores que aumentam a probabilidade de contágio pelo HIV durante o contato sexual com um indivíduo infectado, tais como a prática do sexo anal, a coexistência de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), lesões ulceradas, escoriações ou inflamação na mucosa genital, método contraceptivo usado e, ainda, relações sexuais durante o período menstrual (Cohen et al., 2008).

Com o drástico aumento da prevalência do HIV nas mulheres, sendo que a maior parcela desta está em idade reprodutiva (Craft et al., 2007) e, ainda, conhecendo-se a possibilidade não desprezível de transmissão do vírus da mãe infectada para seu filho durante a gestação, parto e lactações, foram elaboradas intervenções visando a reduzir o risco desta modalidade de transmissão. Tais medidas, utilizadas desde 1994, incluem o uso de alguns retrovirais como, por exemplo, a zidovudina (AZT), estabelecido a partir de um estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos e na França (Connor et al., 1994).

As drogas antiretrovirais são supressivas, elas não podem curar a infecção com HIV-1. Contudo, a terapia antiretroviral tem mudado a infecção com HIV-1 de uma infecção quase uniformemente fatal para uma doença crônica. Na verdade o uso generalizado da terapia antiretroviral ao redor do

mundo levou a um rápido e notável declínio na morbidade e mortalidade dos pacientes infectados (Palella et al., 1998). Contudo, logo após o sucesso do primeiro agente, azidotimidina (AZT), ficou claro que a terapia deveria requerer uma combinação de agentes, referidos como “HAART” (“highly active antiretroviral therapy”) (Larder, 2001).

As combinações de antiretrovirais são projetadas para retardar o aparecimento de mutantes resistentes à droga e permitir uma supressão viral mais duradoura, mas elas também complicam o tratamento. Além disso, o uso descontínuo de HAART leva a uma rápida perda da supressão viral, assim como outras conseqüências adversas, incluindo aumento do risco de infecções oportunistas, complicações cardiovasculares e a morte (Kaufmann et al., 2004).

Além disso, diversos estudos têm mostrado que a replicação do HIV é um importante determinante de disfunção endotelial (Solages et al., 2006). Como conseqüências da função endotelial prejudicada, pacientes infectados com HIV podem estar em um estado de hipercoagulabilidade (Wolf et al., 2002). Nestes pacientes as células endoteliais ativadas promovem ativação plaquetária, reações inflamatórias e progressão da aterosclerose (Tsakiris et al., 1999).

1.6 Hemostasia

A hemostasia refere-se ao mecanismo relacionado à parada do sangramento seguinte a uma injúria de um vaso sanguíneo. Após uma violação a integridade vascular, ocorre um complexo de reações que levam a uma rápida transformação do sangue da forma fluída até a forma de trombo

localizado no sítio do tecido danificado. A hemostasia é, portanto, projetada para minimizar a perda sanguínea, restaurar a integridade vascular e preservar a vida. Já a 10.000 a.c evidências sugeriram que os homens primitivos entenderam de procedimentos cirúrgicos e reconheceram os riscos de um sangramento não controlado. Embora nosso entendimento do complexo fisiológico da hemostasia permaneça ainda muito limitado. Estudos têm demonstrado que o dano à parede de um vaso sanguíneo leva a uma interação complexa de quatro componentes chaves: endotélio vascular, plaquetas, via de coagulação e finalmente a fibrinólise (Eyre & Gamlin, 2010).

1.6.1 Endotélio Vascular

A morfologia vascular normal compreende três camadas: a íntima que consiste de uma monocamada de células endoteliais não trombogênicas, uma membrana basal interna acima do músculo liso e uma membrana adventícia, a qual consiste de uma membrana externa que suporta o tecido conetivo. O endotélio vascular é equipado com um número de mecanismos que atenuam a formação do trombo. Eles previnem a ativação plaquetária através da produção de prostaciclina e óxido nítrico (ambos os quais são vasodilatadores) além de ectonucleotidases e sulfatos de heparina. Existem os fatores que interrompem a cascata da coagulação, como a antitrombina III, trombomodulina e o inibidor da via do fator tecidual. No endotélio vascular é produzido o fator de von Willebrand, o qual serve de mediador para a adesão plaquetária e pode disparar e regular a fibrinólise através da síntese e da liberação do ativador de

plasminogênio tecidual e da inibição do fator inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (PAI-1) (Van Hinsbergh, 2001).

Quando o endotélio vascular é fisicamente danificado, ele torna-se proinflamatório e protrombótico (tabela 1) e caracteriza-se pela vasoconstrição, ativação e adesão de leucócitos e plaquetas, promoção da formação da fibrina e deposição da fibrina na parede vascular (Becker et al., 2000).

Efeitos no endotélio vascular	Mediador conhecido
Vasoconstrição	Reflexo nervoso inicial, sustentado pela liberação de grânulos plaquetários
Adesão e ativação de leucócitos e plaquetas	Expressão do fator de von Willebrand e ativação de fatores plaquetários, P-seletina
Promoção da formação de trombina e coagulação	Iniciação pelo complexo fator VII-fator tecidual
Deposição de fibrina na parede vascular	Expressão do fator tecidual e inibidor do ativador do plasminogênio

Tabela 1. Eventos ocasionados pelo rompimento do endotélio vascular.

(adaptado de Becker et al., 2000).

1.6.2 Plaquetas sanguíneas

As plaquetas são células não nucleadas em forma de disco, medem cerca de 2 - 4 µm de diâmetro e são derivados dos megacariócitos. Sua faixa de vida útil é de 8 a 14 dias. Sob circunstâncias normais elas circulam livremente sem interação, porém na presença de dano ao endotélio, uma cadeia de eventos é disparada levando a formação do coágulo rico em plaquetas. O papel das plaquetas na hemostasia pode ser dividido em adesão, ativação, secreção e agregação (figura 1) (Bhatt, 2008)

1.6.2.1 Adesão Plaquetária

As plaquetas aderem avidamente ao endotélio danificado ou aos componentes subendoteliais expostos. A aderência é mediada via fatores derivados da parede dos vasos ligados a glicoproteínas específicas das membranas plaquetárias. Por exemplo, o colágeno exposto liga-se ao receptor de glicoproteína GPIa, enquanto o fator de von Willebrandt liga-se ao receptor de glicoproteína GPIb. O fator de von Willebrandt (vWF) é uma grande glicoproteína presente no plasma e produzida no endotélio, megacariócitos e tecido conectivo subendotelial (Bhatt, 2008).

1.6.2.2 Ativação Plaquetária

Após a adesão plaquetária muitos agonistas, por exemplo, colágeno e trombina, assim como alguns produzidos pelas plaquetas (adenosina difosfato)

ligam-se aos receptores de glicoproteína e iniciam a transdução de sinal através da membrana plaquetária via segundo mensageiros como a fosfolipase A2, a qual produz ácido araquidônico, o primeiro passo na síntese de prostaglandinas incluindo o proagregatório tromboxano A2. A ativação plaquetária pode ser vista como resultado de uma mudança na conformação plaquetária, de disco para esfera com subsequente formação de pseudópodes seguido pelo aumento do contato com outras plaquetas. Isto pode ser facilitado pelo aumento na concentração do cálcio intracelular, o qual é, também, necessário para ação de outras enzimas. Finalmente a ativação resulta em um aumento na secreção de grânulos e agregação plaquetária (Bhatt, 2008).

1.6.2.3 Secreção Plaquetária

As plaquetas contêm dois tipos de grânulos no seu interior, os grânulos α e os corpos densos. Os primeiros contêm proteínas específicas plaquetárias, por exemplo, fator de crescimento derivado das plaquetas, trombospondinas, fator V e proteína S entre outros. Os corpos densos contêm adeninas não metabólicas (ADP, GTP) assim como cátions divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} e serotonina. A secreção promove a formação do tampão plaquetário por aumento da produção de plaquetas adicionais (Bhatt, 2008).

1.6.2.4 Agregação Plaquetária

Seguindo a ativação plaquetária, o receptor de glicoproteína GPIIb/IIIa ocasiona a mudança de conformação plaquetária, aumentando sua capacidade

de ligar-se ao fibrinogênio, o qual leva a formação de múltiplas ligações estáveis entre plaquetas adjacentes. Como muitos dos estímulos pró-agregatórios (por exemplo, ADP e Tromboxane A_2) estão também envolvidos na ativação plaquetária, ocorre um efeito *feedback* positivo e uma acumulação rápida de plaquetas no sítio da injúria (Bhatt, 2008).

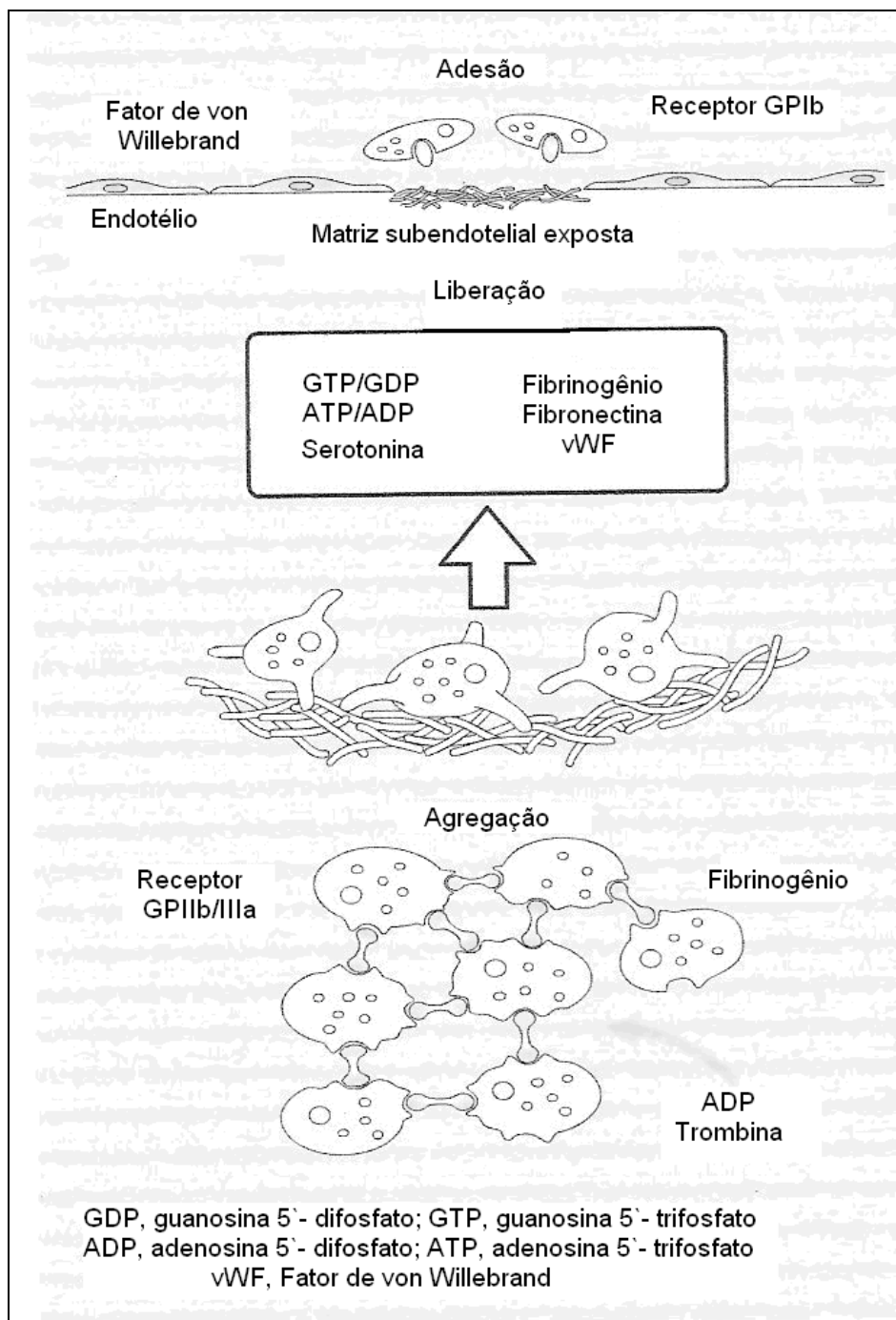


Figura 1. Papel desempenhado pelas plaquetas. (Bhatt, 2008).

1.6.3 Coagulação Sanguínea

A formação do tampão plaquetário é freqüentemente referida como hemostasia primária, enquanto que a hemostasia secundária envolve a complexa interação de fatores de coagulação, os quais formam filamentos de fibrina usados para fortalecer o tampão plaquetário. A clássica descrição das vias extrínsecas e intrínsecas tem sido largamente ignorada já que não se correlaciona muito bem com o processo *in vivo* (Bombeli & Spahn, 2004; Curry & Pierce, 2007).

Contudo, este conceito permanece útil para o entendimento da ação de anticoagulantes e dos estudos da cascata da coagulação. Desta maneira, pode-se dividir o processo de coagulação nas seguintes etapas: Iniciação, Amplificação, Propagação e Estabilização (Bombeli & Spahn, 2004; Curry & Pierce, 2007) (Figura 2).

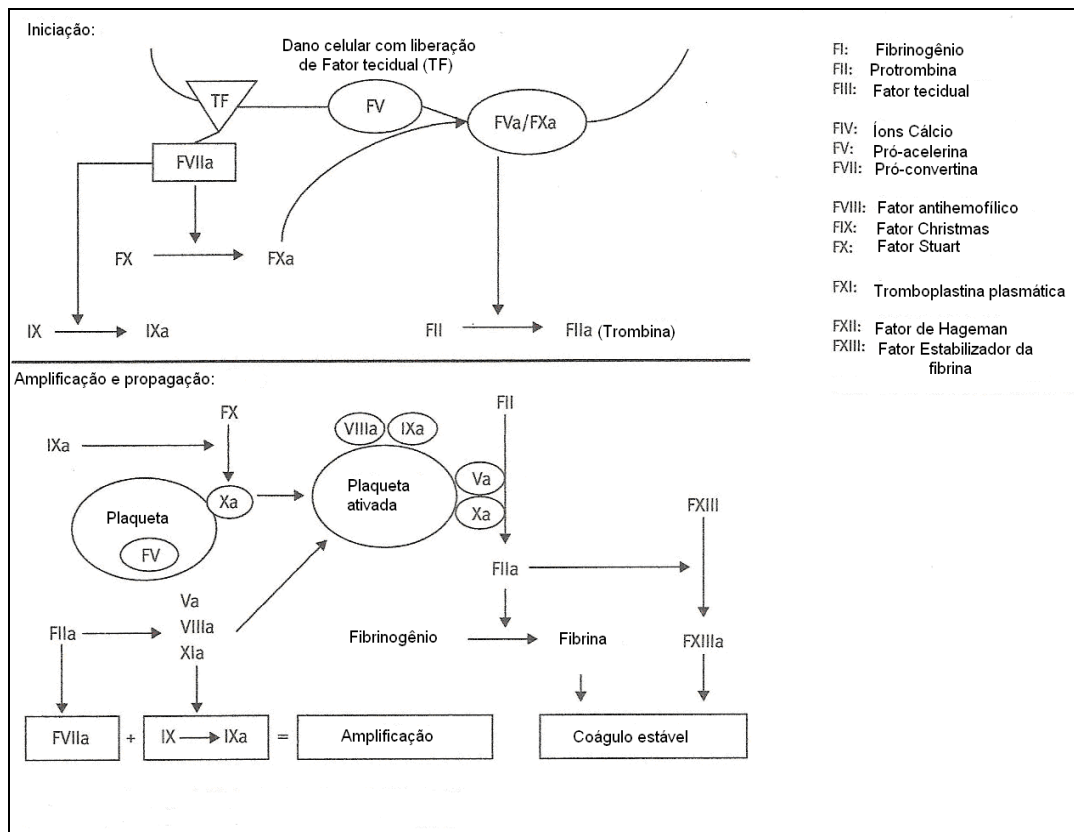


Figura 2. Mecanismo da Cascata da coagulação.

(Bombeli & Spahn, 2004; Curry & Pierce, 2007).

1.7 Hemostasia na gestação

O processo de hemostasia é o equilíbrio dinâmico entre a coagulação e o sistema de degradação da fibrina. A gravidez normal está associada com enormes mudanças na hemostasia. Estas mudanças no processo gestacional parecem fazer parte de uma adaptação fisiológica a qual assegura um rápido controle do sangramento no sítio placentário durante a expansão placentária, enquanto permite a expansão da circulação fetal e materna na interface uteroplacentária durante o processo gestacional (O’Riordan & Higgins, 2003).

Por isso, durante a gravidez, os riscos de sangramento e complicações tromboembólicas estão aumentados. A unidade útero-placenta é única e a mais importante função é estabelecer o contato entre a circulação materna e a fetal, a qual é uma exigência para a sobrevivência do feto. A fronteira entre a circulação materna e a fetal permite a troca de gases como oxigênio e CO₂ e, também, de nutrientes importantes para o feto. Qualquer sangramento e eventos trombóticos podem interromper esta importante função, portanto, diversos sistemas estão envolvidos no reparo da circulação útero-placentária (Sheppard & Bonnar, 1999).

A separação placentária representa uma profunda mudança local da hemostasia. O processo ocorre rapidamente, e o fluxo sanguíneo maternal de aproximadamente 700 mL/minuto no sítio placentário tem de ser estancado por efeitos combinados da compressão extravascular do miométrio e oclusão trombótica dos vasos maternos (O’Riordan & Higgins, 2003).

Portanto, as mulheres grávidas têm um aumento da reserva de fatores precursores da coagulação sanguínea e fibrinogênio para uso na conexão com a ativação da hemostasia naquela ocasião. As contrações do miométrio inicialmente param o sangramento e os mecanismos hemostáticos interrompem o fluxo sanguíneo através da produção de coágulos nos vasos sanguíneos, os quais limitam o sangramento quando as contrações miométriais subsequentemente diminuem e cessam (Hellgren, 2003). A ativação do sistema de coagulação na circulação uteroplacentária predispõe a formação de fibrina anormal neste local. Como consequência, a trombose uteroplacentária excessiva torna-se uma patologia importante de diversas complicações clínicas da gravidez. (O’Riordan & Higgins, 2003).

Apesar de muitos avanços terem sido feitos na medicina reprodutiva durante o último quarto de século, dentre as complicações o aborto recorrente permanece sendo a mais comum da gravidez e esta patologia é tradicionalmente definida como 3 ou mais perdas consecutivas antes da 20ª semana pós-menstruação (Bricker & Farquharson, 2002).

Existem hipóteses históricas de que o aborto recorrente afeta apenas mulheres que já possuem estados protrombóticos antes da gravidez, mas evidências têm sido acumuladas ao longo dos anos que alguns casos de aborto recorrente são resultado de respostas hemostáticas como demonstrado por estudos de trombose placentária (Van Horn et al., 2004), complexos trombina-antitrombina (Vincent et al., 1998) e micropartículas circulantes (Laude et al., 2001).

Dentro deste contexto, pode-se dizer que as plaquetas com seus agentes autócrinos ADP e ATP liberados dos grânulos densos plaquetários desempenham um papel chave na formação do trombo induzido pelo colágeno. Elas possuem dois receptores para ATP $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$ e um receptor para ADP $P2X_1$. Este último medeia o aumento de cálcio intracelular o qual leva a mudança de forma plaquetária e contribui para a ativação plaquetária por outros agonistas. O receptor $P2Y_1$ sinaliza via $Gq\alpha$ e causa mobilização de cálcio via fosfolipase C, levando a mudança de forma plaquetária, liberação de tromboxano A2 e agregação inicial (Cauwenberghs et al., 2006). Desta maneira torna-se importante a hidrólise destes nucleotídeos através das enzimas nucleotidases como uma forma de controle desta formação de trombos.

1.8 Sistema Purinérgico

A hipótese de um sistema de sinalização purinérgica, usando nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares como mediadores, foi primeiramente proposto a mais de três décadas em estudos de neurotransmissão (Burnstock, 1972).

Subseqüentes trabalhos começaram a detalhar como os nucleotídeos extracelulares poderiam ser mensageiros modulando sistemas endócrinos e exócrinos, os mecanismos vasculares e hemostáticos, os musculoesqueléticos e das células imunes e inflamatórias (Burnstock & Knight, 2004).

1.8.1 Nucleotídeos e Nucleosídeos como moléculas sinalizadoras

Os nucleosídeos são glicosilaminas que surgem pela ligação de uma nucleobase (purina ou pirimidina) a um açúcar pentose. Como exemplos destas moléculas podem-se citar citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina e inosina. Estes nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas da célula e produzem os nucleotídeos. Estes nucleotídeos desempenham importantes funções no transporte e transformação de energia celular (nucleosídeos trifosfatados como ATP são produtos finais ricos em energia da maioria das vias de liberação energética bioquímicas) e são tipicamente associados na regulação de enzimas e como mensageiros intracelulares. Eles são liberados de diversas células vasculares e sanguíneas como, por exemplo, os eritrócitos, plaquetas, leucócitos e células endoteliais (Atkinson et al., 2006).

O ATP presente nos compartimentos extracelulares é responsável pela regulação de uma multiplicidade de processos biológicos, como a neurotransmissão, a função cardíaca, o metabolismo ósseo, o metabolismo do glicogênio hepático e a inflamação (Hoebertz et al., 2003).

Os nucleosídeos difosfatados e trifosfatados como o ADP e o ATP, juntamente com a adenosina, são bem conhecidos por controlar a resposta vascular a injúria endotelial. O ADP é o mais importante promotor da agregação plaquetária, enquanto que a adenosina é um potente inibidor deste processo. O ATP é importante no transporte de cloretos, na vasodilatação, na contração muscular, na função renal e nas doenças de cartilagem (Schetinger et al., 2007).

O ATP em baixas concentrações aumenta a quantidade de colágeno, tromboxano A₂ e trombina favorecendo desta maneira a agregação plaquetária (Soslau & Youngprapakorn, 1997). Este mesmo nucleotídeo em altas concentrações é inibidor da agregação plaquetária causada pelo ADP, provavelmente devido ao ATP ser hidrolizado a adenosina, a qual é inibidora da atividade plaquetária (Birk et al., 2002). A adenosina por sua vez é um produto metabólico da degradação de nucleotídeos de adenina e desempenha funções que irão depender do tipo de receptor em cada tecido e da origem do dano (Borowiec et al, 2006) (figura 3).

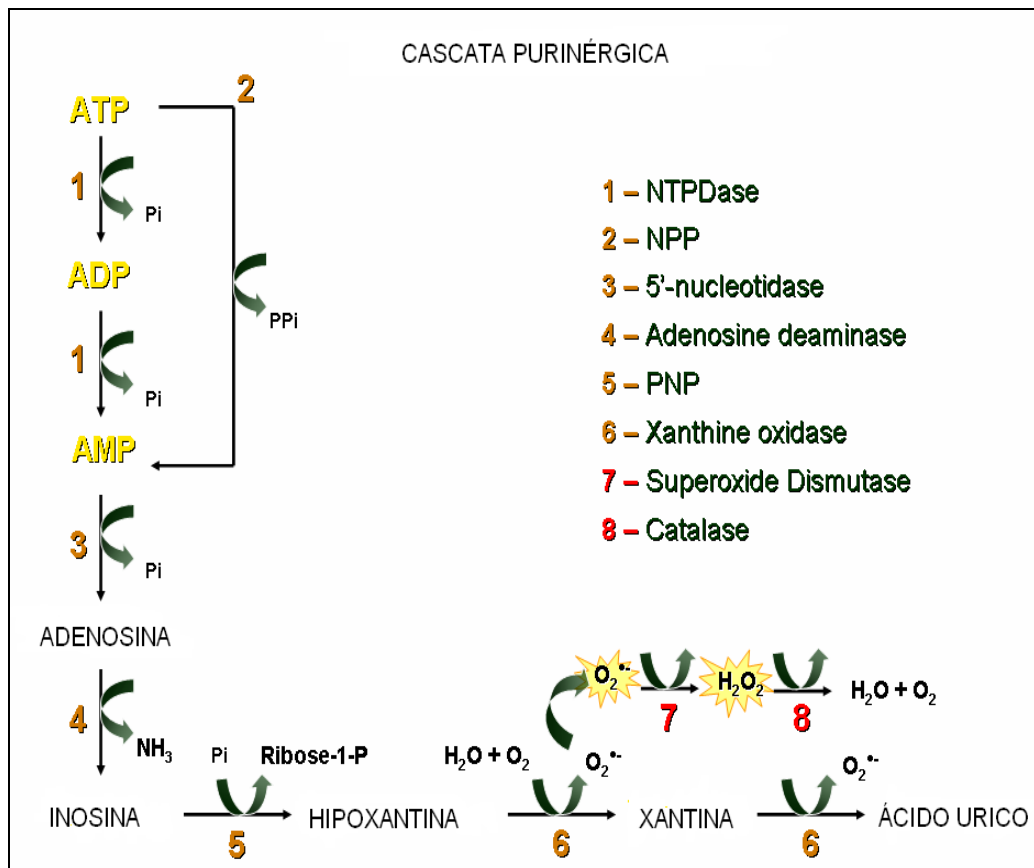


Figura 3. Esquema da cascata purinérgica.

1.8.2 Receptores purinérgicos

Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares são mediados por receptores de superfície celular seletivos para nucleotídeos pertencentes a duas famílias distintas estruturalmente de receptores P2: P2X e P2Y. Os receptores P2X são acoplados a canais de íons e compreendem 7 subtipos (P2X₁₋₇). Os receptores P2Y são receptores acoplados a proteína-G e compreendem 14 subtipos (P2Y₁₋₁₄). (Yegutkin, 2008).

Os receptores para adenosina por sua vez, compreendem 4 subtipos de receptores P1 nomeados de A1, A2A, A2B e A3. Todos os receptores P1 de

adenosina são proteínas transmembrana acopladas à proteína-G (figura 3) (Burnstock, 2006).

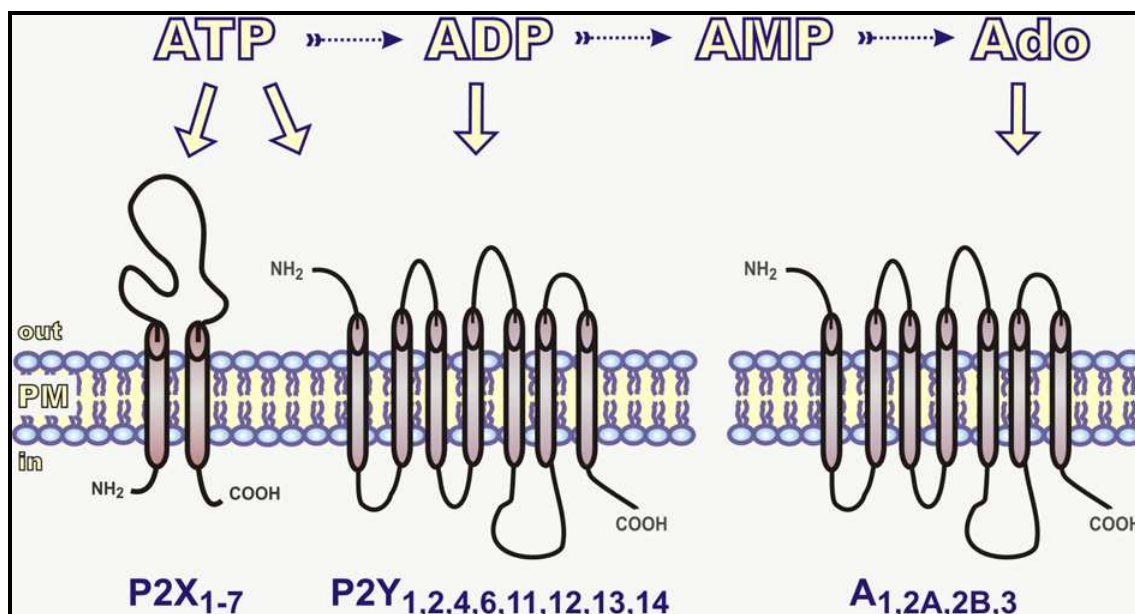


Figura 4. Receptores P1 e P2 para nucleotídeos e nucleosídeos

(Yegutkin, 2008)

1.8.3 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

O controle dos níveis de nucleotídeos é importante na manutenção da fisiologia dos processos de sinalização mediados pelos nucleotídeos. Este controle é exercido por uma família de enzimas que hidrolizam os nucleotídeos e conseqüentemente geram seus respectivos metabólitos (Borowiec et al., 2006). Estas enzimas incluem as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase

Fosfodiesterase), 5'-nucleotidase, Adenosina Deaminase e PNP (Purina Nucleosídeo Fosforilase) (Yegutkin, 2008) (Figura 4).

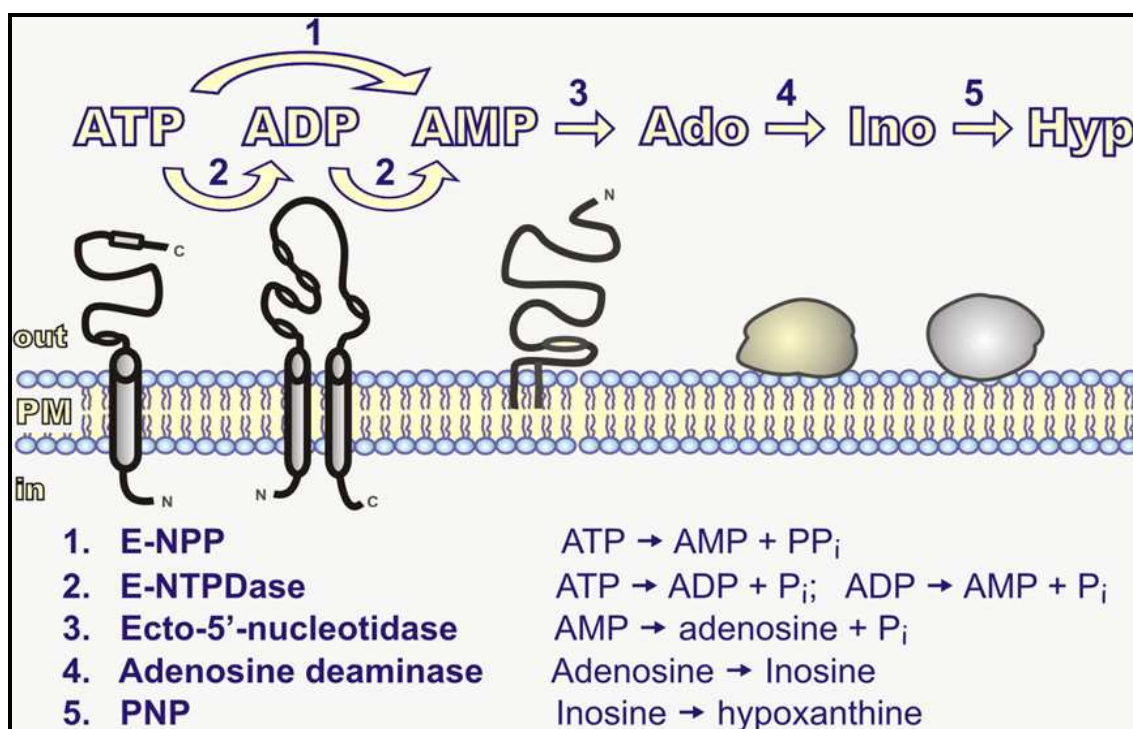


Figura 5. Enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos (adaptado de Yegutkin, 2008).

1.8.3.1 E-NTPDases e 5'- nucleotidase

Estas ectoenzimas são capazes de degradar nucleotídeos tri e difosfatados, mas não monofosfatados. Existem oito tipos de enzimas desta família nomeados NTPDase 1, 2, 3 e 8 localizados na superfície celular e NTPDase 4, 5, 6 e 7 de localização intracelular (Figura 5) (Robson et al., 2006).

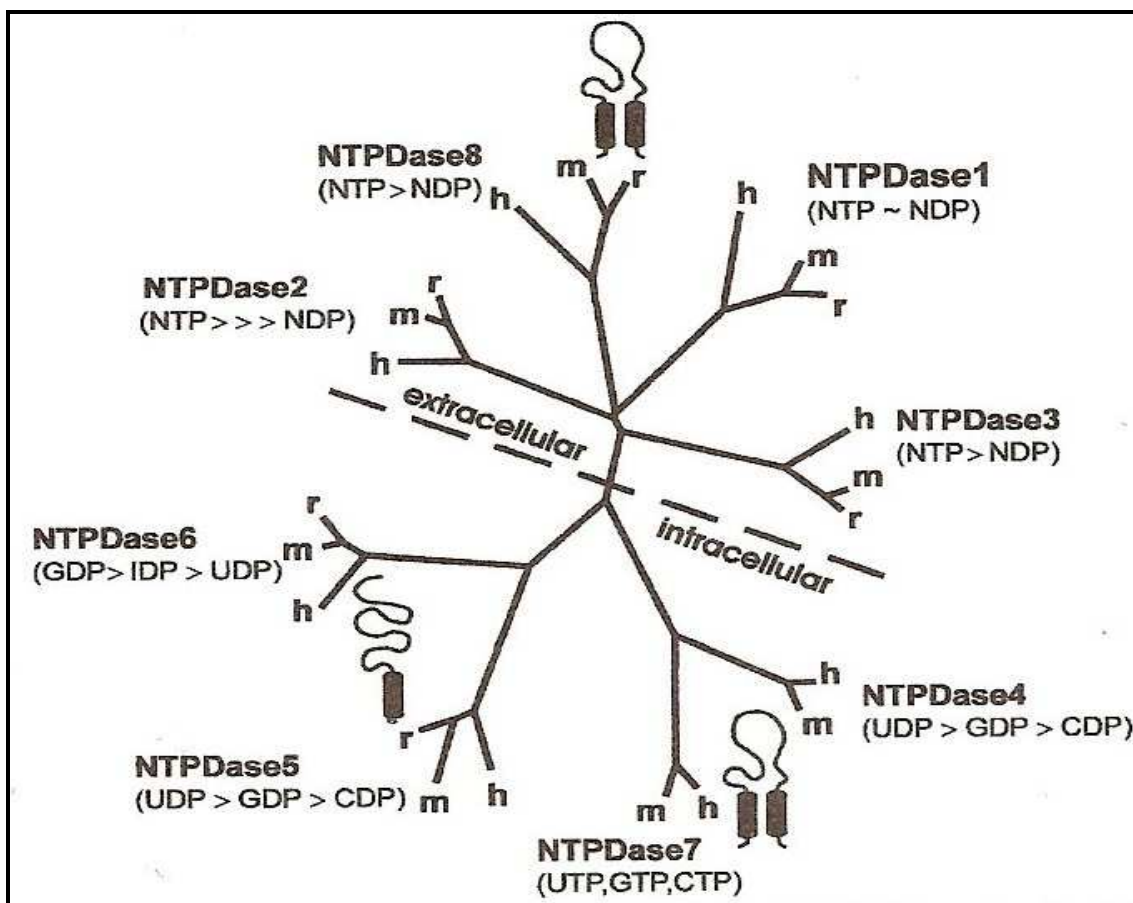


Figura 6. Localização dos membros da família NTPDase (adaptado de Robson et al., 2006).

As taxas de hidrólise de nucleotídeos diferem entre ambos os subtipos de enzimas da família NTPDase. A NTPDase 1 hidroliza ATP e ADP de forma quase equivalente a uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,5 a 1:0,9 (Heine et al., 1999), e está ancorada a membrana via dois domínios transmembrana que são importantes para a manutenção da atividade catalítica e especificidade ao substrato (Grinthal & Guidotti, 2006)

Essa enzima é expressa também nas células endoteliais vasculares (Sevigny et al., 2002), e possui propriedades antitrombóticas preservando desta maneira a permeabilidade vascular (Pinsky et al., 2002). Ela converte o ADP pró-agregatório em adenosina anti-agregatório. Além disso, as formas de

NTPDase 1 solúveis e recombinantes bloqueiam a agregação plaquetária *in vitro* induzida pelo ADP, e inibem a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (Zimmermann, 2001).

Posteriormente, à hidrólise do ATP e ADP em adenosina monofosfato (AMP) pela NTPDase1 tem-se a ação da ecto-5'-nucleotidase, a qual, hidroliza o AMP em adenosina que é um modulador do tônus vascular e um inibidor da agregação plaquetária (Kawashima et al., 2000).

Esta enzima está ancorada na membrana plasmática via glicosil fosfatidilinositol (GPI), onde é conhecida como proteína de superfície do linfócito (CD73), sendo um marcador de superfície dos linfócitos T e B. A enzima catalisa a fase final da degradação de nucleotídeos extracelulares, ou seja, a hidrólise do nucleosídeo 5'-monofosfato ao seu respectivo nucleosídeo e fosfato. É a principal enzima responsável pela formação de adenosina extracelular e a subsequente ativação de receptores de adenosina (P1). Ocorre na forma de dímero e seu peso molecular está na faixa de 62 a 74 kDa (Zimmermann, 1999).

A ecto-5'-nucleotidase é amplamente encontrada em uma variedade de tecidos como rins, fígado, encéfalo, pulmão, endotélio vascular, plaquetas e nas células do sistema imune (Colgan, 2006). A atividade das enzimas NTPDase 1 e ecto-5'-nucleotidase tem sido investigada em várias patologias como diabetes, câncer de mama e infecção pelo HIV (Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2005; Leal et al., 2005) entre outras.

1.8.3.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase Fosfodiesterase (E-NPPs)

A família E-NPP consiste de 7 ectoenzimas (NPP1-NPP7) numeradas de acordo com a ordem de descoberta. Os membros desta família possuem surpreendente especificidade pelo substrato e são capazes de hidrolizar ligações fosfodiéster e pirofosfato em nucleotídeos, ácidos nucléicos, açúcares de nucleotídeos e, também, em ésteres de fosfato de colina e lisofosfolípidios (Stefan et al., 2005).

Somente três membros desta família (NPP1-NPP3) são capazes de hidrolizar vários nucleotídeos e, portanto, são relevantes no contexto da cascata de sinalização purinérgica (Goding et al., 2003). Estas enzimas representam uma família de proteínas conservadas e ubíquas que são ou expressas como ectoenzimas ou como proteínas secretadas. Como resultado seu sítio catalítico é extracelular e elas são denominadas ecto-NPPs (Gijssbers et al., 2001).

Com exceção a NPP-2, que é secretada no meio extracelular, todos os demais membros são ligados à membrana por um único domínio transmembrana do tipo II, com sua porção aminoterminal voltada para o meio intracelular, enquanto que as NPPs 4-7 têm uma orientação do tipo I com sua porção aminoterminal voltada para o meio extracelular (figura 5) (Stefan et al, 2006).

As E-NPPs são frequentemente alteradas em situações patológicas onde sua atividade pode se tornar, juntamente com outros exames clínicos e biológicos, uma ferramenta útil para avaliar a progressão de doenças. Tal

atividade tem sido encontrada aumentada em grávidas normais, em alguns tipos de câncer e doenças colestáticas do fígado (Maldonado, 2008).

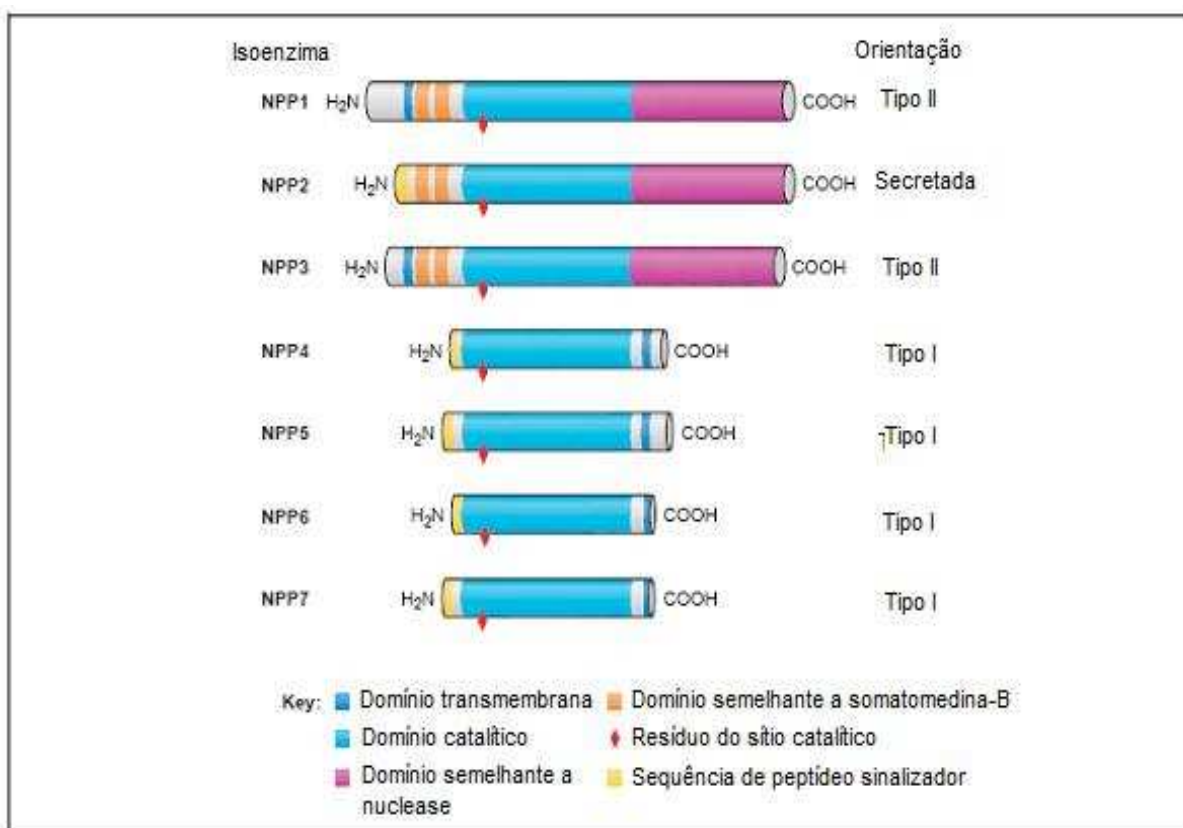


Figura 7. Estrutura das enzimas da família E-NPP (adaptado de Stefan, 2005)

1.8.3.3 Adenosina Desaminase

É uma importante enzima da cadeia de inativação de purinas, a qual cataliza a reação de desaminação irreversível de adenosina a inosina e 2'-deoxiadenosina a 2'-deoxiinosina, respectivamente, e é largamente expressa no intestino, timo, baço e outros tecidos linfóides e não linfóides (Spychala, 2000). Esta enzima existe em pelo menos três isoformas moleculares, ADA1, ADA2 e ADA1 e ADA complexada a proteína (Galanti et al, 1981). A homeostase destas isoformas e a atividade das enzimas ADA1 e ADA2 em

células humanas são de extrema importância na manutenção do equilíbrio entre adenosina e 2'-deoxiadenosina em monócitos e macrófagos (Gakis, 1996).

Ela é uma enzima essencial para a diferenciação de células linfóides e tem sido utilizada para o monitoramento de diversas doenças nas quais a imunidade do paciente está alterada (Martinez-Hernandez, 1988). Como indicador de alteração da imunidade celular, tem-se medido a atividade desta enzima no soro já que a mesma está aumentada em doenças que causam alteração da resposta imune mediada por células, como por exemplo, na artrite reumatóide, no lupus eritematoso sistêmico e na tuberculose (Hitoglou et al, 2001; Moon et al, 2005).

1.9 Estresse oxidativo

1.9.1 Definição de Radicais livres e Antioxidantes

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons não pareados. Um elétron não pareado é um elétron que ocupa um orbital atômico ou molecular por si só (Halliwell & Gutteridge, 2006).

Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-

se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies radicalares de oxigênio (ERO) ou espécies radicalares de nitrogênio (ERN) danosas. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$) e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (Barreiros & David, 2006).

No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como a artrite, o choque hemorrágico, as doenças do coração, a catarata, as disfunções cognitivas, o câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (Barreiros & David, 2006).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. O antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (Halliwell, 2000).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente a exemplo de glutathiona (GSH),

peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e ubiquinol (CoQH₂) (Barreiros & David, 2006). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (Pietta, 2000).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e a sua eliminação pelos antioxidantes corporais. O estresse oxidativo ocorre quando este equilíbrio é rompido e ocorre um predomínio de formas pró-oxidantes em detrimento das antioxidantes. Esta situação pode ocorrer devido a uma diminuição dos antioxidantes corporais ou pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (Barreiros & David, 2006).

1.9.2 Estresse oxidativo no processo gestacional

Existem estudos mostrando que ocorre um aumento do estresse oxidativo durante o período gestacional, e o dano oxidativo torna-se mais exagerado se a gestação for complicada por algum motivo, por exemplo, por uma desordem hipertensiva (Hubel, 1999). As informações relacionando os níveis de estresse oxidativo e o status antioxidante em mulheres com uma gravidez não complicada por nenhum tipo de agravante ainda são escassas (Litle, 1999) e a exata causa do aumento do estresse oxidativo durante a gravidez é desconhecida. No entanto, evidências acumuladas sugerem que a placenta desempenha um importante papel no aumento do estresse oxidativo durante o processo gestacional (Burton & Jauniaux 2004).

Outro fator que está envolvido no estresse oxidativo na gravidez pode ser a suplementação com ferro. Sabe-se que a deficiência de ferro é a mais comum desordem nutricional do mundo, especialmente nos países desenvolvidos. Durante a gravidez, a suplementação com ferro é universal a partir do segundo trimestre, sendo uma recomendação padrão devido à alta prevalência de anemia, pobre liberação da dieta e inabilidade de encontrar o aumento requerido na gravidez. Portanto, o ferro em excesso, o qual é um participante ativo da reação de Fenton, resulta na produção de radicais livres e peroxidação lipídica (Gutteridge, 1996). Esta, por sua vez, encontrou-se aumentada em mulheres que receberam suplementos com vitamina C e ferro diariamente quando comparados com mulheres grávidas sem suplementação (Lachili et al., 2001). Outros trabalhos evidenciaram que a suplementação com 100mg/dia ou uma sobrecarga de ferro pode resultar no aumento dos níveis de MDA ou estresse oxidativo no plasma materno e placenta durante a gravidez (Devrin et al., 2006).

Outra substância em que há um grande interesse é o óxido nítrico, o qual é aceito como um importante mediador de múltiplas funções celulares inclusive podendo participar da formação de radicais livres derivados de nitrogênio. Nas células vivas o óxido nítrico é sintetizado a partir da L-arginina via ação catalítica de uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOSs) (Mayer & Hemmens, 1997).

Desta maneira, o óxido nítrico gerado endógenamente é um radical livre gasoso de curta meia-vida que reage com muitas substâncias incluindo o oxigênio molecular e ânion superóxido formando derivados do óxido nítrico, como dióxido de nitrogênio, peroxinitrito e nitratos (Moncada et al, 1991). O nitrato, quando em altas concentrações na circulação, é resultado do aumento

da produção de óxido nítrico pelos tecidos maternos, a placenta ou ambos (Baylis, 1999). O ânion peroxinitrito (ONOO^-) é um potente oxidante de uma variedade de biomoléculas e é citotóxico uma vez que inibe o transporte de elétrons mitocondrial resultando na inibição da respiração celular, oxidação dos grupos sulfidril de proteínas, iniciação da peroxidação lipídica sem a exigência de metais de transição e afetando muitas vias de transdução de sinal (Myatt & Cui, 2004).

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a atividade de enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos, assim como alguns parâmetros de estresse oxidativo e a agregação plaquetária em gestantes normais e com complicações gestacionais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normais e diagnosticadas com pré-eclampsia e diabetes gestacional.

- Avaliar a atividade da enzima adenosina deaminase em soro de gestantes normais e diagnosticadas com pré-eclampsia, diabetes gestacional e portadoras de HIV.

- Avaliar a agregação plaquetária em gestantes normais e diagnosticadas com pré-eclampsia, diabetes gestacional e portadoras de HIV.

- Avaliar a carbonilação protéica, peroxidação lipídica a atividade da superóxido dismutase, catalase os níveis de ácido ascórbico, conteúdo sulfidrílico total e atividade das colinesterases (Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase) em gestantes normais e diagnosticadas com pré-eclampsia, diabetes gestacional e portadoras de HIV.

3. Metodologia e Resultados

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois manuscritos e um artigo científico. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos manuscritos e no artigo científico.

A carta de aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Questionário utilizado na captação das gestantes que permitiu a realização do estudo estão nos anexos I, II e III, respectivamente.

Capítulo 1

Manuscrito I

Adenosine Deaminase (ADA) activities and platelet aggregation in women with pregnancy complications

Claudio A. M. Leal, Maria R. C. Schetinger , Daniela B. R. Leal , Vera M. Morsch , José E. P. da Silva, João F. P. Rezer, Faída H. Abdalla, Maria B.

Moretto

Submetido a revista Biomedicine and Pharmacotherapy

Category of submission: Original article

Adenosine Deaminase (ADA) activities and platelet aggregation in women with pregnancy complications

*Claudio A. M. Leal^b, Maria R. C. Schetinger^b, Daniela B. R. Leal^c, Vera M. Morsch^b, José E. P. da Silva^a, João F. P. Rezer^b, Faída H. Abdalla^a, Maria B. Moretto^a

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

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

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

*** Corresponding author:**

Claudio Alberto Martins Leal

Tel: +55-55-3225-1281 Fax: +55-55-3220-8018

E-mail: camleal@terra.com.br

Summary

Background: Platelet aggregation and adenosine deaminase activity were examined of women with pregnancy complications.

Methods: The groups of the research were divided as follows: a control group (n=15), a normal pregnancy (n=15), a hypertensive pregnancy (n=7), a gestational mellitus diabetes (n=10) and a human immunodeficiency virus (n=12) group. The activity of the enzyme was verified for colorimetric method and the platelet aggregation was checked for an optical aggregometer.

Results: The percentage of platelet aggregation with 5 μM of agonist adenosine diphosphate was enhanced in the normal pregnancy, hypertensive pregnancy, gestational mellitus diabetes and in human immunodeficiency virus groups when compared to the control group and with 10 μM of the same agonist was enhanced in the hypertensive pregnancy, gestational mellitus diabetes and human immunodeficiency virus groups when compared to the control group. Adenosine deaminase activity was enhanced in the normal pregnancy, hypertensive pregnancy, gestational mellitus diabetes and human immunodeficiency virus groups when compared to the control group.

Conclusions: The increased of platelet aggregation and adenosine deaminase activity indicates that they may act together to help local hemostasis and some inflammatory process in that pregnancy complications.

Keywords: Adenosine deaminase; platelet aggregation; pregnancy complications.

Introduction

Since 1929 it has been recognized, in animal studies, that the endogenous purine nucleoside, adenosine, can act as an extracellular signaling molecule, affecting heart rate, blood pressure, and coronary blood flow. [1] Continuous research on the metabolism and effects of adenosine has led to the concept that adenosine formation increases rapidly in situations of impending tissue danger, such as during ischemia, and that subsequent adenosine receptor stimulation induces a wide range of effects, aimed at protecting the stressed tissue [2].

Pharmacological studies and recent insights from genetically modified mice have indicated that adenosine acts not only as a neuroprotective agent in situations of an imbalance between energy supply and energy demand, but is also involved in basal physiological functions, in particular in the nervous and cardiovascular systems. The wide variety of adenosine actions and the potential of adenosine receptors as targets for therapeutic agents to treat human diseases have been the topic of recent extensive reviews [3].

Adenosine is produced or degraded by several enzymes, including 5'-nucleotidase, ADA, and AK [4]. In the present study was investigated the adenosine deaminase (E.C.3.5.4.4) which is an enzyme present in a great number of plants and animals, from simple invertebrates to human beings. This important enzyme catalyzes the deamination of adenosine and deoxyadenosine into their respective inosine nucleosides [5].

This conversion is an initial step in a series of reactions responsible for lymphocyte proliferation and differentiation. Moreover, ADA is considered an indicator of cellular immunity and fundamental for the differentiation of lymphocytes [6]. In humans, the lack of this enzyme results in severe lymphopenia and immunodeficiency, denoting the risk of early death for the affected individuals [7]. This enzyme is found in several human diseases, lymphocytic effusions, including those consequent of tuberculosis, neoplasms and some acute viral infections, suggesting that high ADA activity is indirectly related to subsets of T cell lymphocytes involved in the inflammatory response [8].

ADA has been accepted as an important enzyme in the maturation and function of T lymphocytes. Its activity increases substantially during mitogenic and antigenic responses of lymphocytes, and conversely, lymphocyte blastogenesis is inhibited by ADA inhibitors. It is, therefore, known that ADA activity is higher in T cells than B lymphocytes. As an indicator of cellular immunity, plasma activity of this enzyme has been suggested to be increased in inflammatory diseases, which causes a cell-mediated immune response [9]. In recent years, there have been several reports on increased levels of serum/plasma ADA activity among HIV-infected individuals [10].

Human ADA exists in at least three molecular isoforms, ADA1, ADA2 and ADA, and in an ADA-complexing protein [11]. While ADA1 is present in almost all human tissues and cells, and most of ADA activity is derived from ADA1, ADA2 is the predominant isoenzyme in the serum of normal subjects [12]. Normal pregnancy is characterized by depressed cell-mediated immunity [13] and, therefore, serum ADA activity may be altered. In normal pregnancy, only a few

studies have reported serum ADA activity as increased [14] or decreased [15], making important the study this enzyme in some problems related to pregnancies.

Another focus of this study is platelet aggregation, which plays a very important role in hemostasis and thrombosis. The subendothelial tissue exposed following endothelial damage is pivotal for platelets to collect at the damage area. The binding of von Willebrand factor (vWF) to the glycoprotein (GP) Ib-IX-V receptors on the platelet surface facilitates the adherence of platelets on the damaged vascular region. Platelets change their shape, secrete the contents of their granules and synthesized substances such as thromboxane A₂ (TxA₂) and platelet-activating factor (PAF), and form aggregates under the effect of stimulating substances such as collagen (Col), adenosine diphosphate (ADP), epinephrine (Epi), thrombin and serotonin. Platelet aggregation is a fibrinogen-dependent intercellular adhesion process as a result of the activation of fibrinogen receptors in the cell membrane [16].

At sites of endothelial layer damage, platelets adhere rapidly to the traumatized exposed subendothelium, thereby confirming the role of the endothelium in thromboregulation [17]. Platelet adhesion is regarded as the trigger for hemostasis and thrombosis. Clinical evidence has shown the existence of at least three major thromboregulatory mechanisms associated with the vascular endothelium. These mechanisms involve the endothelial release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF), nitric oxide (NO), ectonucleotidases, and eicosanoids [18].

Venous thromboembolism, pre-eclampsia and pregnancy loss are nowadays the most frequent pregnancy complications. Heritable prothrombotic factors

lead to an increased risk of thromboembolism and may significantly impair the outcome of pregnancy and play a considerable role in the pathogenesis of spontaneous abortions. Recurrent abortion involves more than 500.000 women in the United States per year [19].

Within the past ten years interest in correlations between thrombophilia and pregnancy complications has remarkably increased. Thrombophilia is present in at least 15% of the Western population and is found in up to 50% of individuals with venous thromboembolism. It apparently plays a critical role in the development of pregnancy related deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Thrombotic processes may also be involved in other serious obstetric complications, such as recurrent pregnancy loss, pre-eclampsia, intrauterine growth retardation (IUGR) and placental abruption by impairment of placental perfusion. Pregnancy itself induces a physiological hypercoagulable state that might be aggravated by inherited or acquired thrombophilia [20]. Therefore the objective of this study was to investigate any possible link between either ADA activity or platelet aggregation and pregnancy complications.

Materials and methods

Materials

Adenosine nucleoside, sodium phosphate buffer, was purchased from Sigma (St. Louis, Mo, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

Patients and controls

Fifty-nine women from the Federal University of Santa Maria Hospital (UFSM, Santa Maria, RS, Brazil) were included in the study. None of these women had a history of inherited hemostatic disorders or other relevant disease states. Women with unfavorable outcome of pregnancy were excluded from this investigation. Each group were carefully selected by a clinical evaluation and separated in five patient groups with an average age among the groups of 36.37 (± 0.7122 , SEM) years (table 1).

The control group (CG), consisted of 15 nonpregnant healthy volunteers women who did not present any disease and had not been submitted to any pharmacological therapy during the previous month. The second group, normal pregnancy (NP), consisted of 15 pregnant women (singlet pregnancy), with diastolic blood pressure ≤ 85 mmHg and with no proteinuria. The third group, hipertensive pregnancy (HP), consisted of 7 pregnant women and were considered as preeclamptic condition if they developed hypertension during pregnancy: systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and diastolic pressure ≥ 90 mmHg in two occasions (table 1) and proteinuria defined as > 0.3 g of protein in 24 h urine collection or $\geq 1+$ on the urine dipstick test.

The fourth group, gestational mellitus diabetes (GMD), consisted of 10 pregnant women presenting an abnormal glucose challenge test (GCT) result (> 7.8 mmol/L [>140 mg/dL]) as well as a change of the abnormal glucose oral tolerance test (OGTT). Women were diagnosed with GDM if two or more of the 100 gram OGTT glucose levels exceeded the ADA criteria [21]: fasting > 5.3 mmol/L; 1-hour > 10.0 mmol/L; 2-hour >8.6 mmol/L; 3 hour > 7.8 mmol/L.

The fifth group which presented human immunodeficiency virus (HIV) consisted of 12 pregnant women considered infected with HIV-1 when two different serum samples were found to be positive for HIV-1 antibodies by ELISA and confirmed by Western blot. The all HIV-1 infected patients were previously treated with antiretroviral drugs. The Human Ethics Committee of UFSM approved the project 86-2006 and subjects gave informed consent.

Blood samples

Fifteen milliliters of peripheral blood was collected by venous puncture from ante-cubital region into a one plastic tube containing anticoagulant K3.EDTA 5% and other two plastic tubes with sodium citrate 3.2% and without anticoagulant. The samples obtained from each participant were used for platelet-rich plasma and platelet-poor plasma preparations and biochemical and hematological determinations. Blood samples from the pregnant women were obtained from the gestational third trimester.

Platelet aggregation ex vivo

Platelet aggregation was measured by the method of Born and Cross [22] by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK[®] Model 810-CA software for Windows version 5.1. The preparation of platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of blood for 20 min at 1000 rpm and the preparation of platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the sample by 3700 rpm for 30 minutes. 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 then performed. Aggregation was measured at 37°C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline at 5 min after the addition of the agonist adenosine diphosphate (ADP) 10 µM and 5 µM, with platelet poor plasma as a reference.

Enzyme assay

Serum adenosine deaminase activities were estimated by the method of Guisti and Galanti [23] which is based on the direct measurement of the formation of ammonia, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. The serum (50 µL) was added to the reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). The samples were pre-incubated for 15 minute at 37°. The reaction was started by addition of the substrate (adenosine) to a final concentration of 21 mM and incubations were carried out for 1 h at 37°. The reaction was stopped by adding 106 mM/0.16mM phenol-nitroprusside/mL solution. The reaction mixtures were immediately mixed to 125 mM/11 mM alkaline-hypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed. Ammonium sulphate of 75 µM was used as ammonium standard. The lower concentrations in which adenosine deaminase activity reached a maximum level of activity were chosen for experimental exposure. Protein determination was measured by the method of Peterson with bovine serum albumin used as a standard [24]. The values were expressed as U/L of adenosine. All experiments were performed in triplicate and mean was used for calculation.

Hematological and biochemical parameters

Quantitative determinations of platelets were performed using an ABX MICROS 60 hematology analyzer (Sysmed Lab Inc. Chicago, USA). Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were determined with a Coag-a-mate-MTX apparatus (Organon Teknica, Durham, NC, USA). The blood glucose measurements used the Cobas Integra Systems (Roche Diagnostics).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the nonparametric Kruskal-Wallis test, considering a level of significance of 5%. Values of $P < 0.05$ were regarded as statistically significant.

Results

Platelet aggregation ex vivo

Platelet function was assessed by monitoring platelet aggregation in response to stimulation by adenosine diphosphate (ADP). The results obtained for percentage of platelet aggregation are presented in figures 1, 3, 4 and table 3.

Figure 3 shows the percentage of platelet aggregation at a concentration of 5 μM of ADP as agonist. Percentage of platelet aggregation at 5 μM of ADP as agonist was enhanced in the NP (79.4 ± 1.52 , SEM), HP (82.4 ± 1.93 , SEM), GMD (85.9 ± 2.25 , SEM) and HIV (81.3 ± 2.81 , SEM) pregnancy groups ($p < 0.05$) when compared to the CG group (70.2 ± 1.52 , SEM). No significant

differences ($p > 0.05$) for percentage of platelet aggregation with 5 μM of ADP as agonist were observed between the pregnancy groups (NP, HP, GDM and HIV).

Figure 4 shows the percentage of platelet aggregation at a concentration of 10 μM of ADP as agonist. Percentage of platelet aggregation with 10 μM of ADP as agonist was enhanced in the HP (90.4 ± 1.91 , SEM), GDM (93.2 ± 2.93 , SEM) and HIV (90.4 ± 2.31 , SEM) pregnancy groups ($p < 0.05$) when compared to the CG group (79.6 ± 1.25 , SEM). No significant differences ($p > 0.05$) for the percentage of platelet aggregation with 10 μM of ADP as agonist were observed between the NP group (83.0 ± 1.364 , SEM) and the CG group (79.6 ± 1.257 , SEM). No significant differences ($p > 0.05$) for percentage of platelet aggregation with 10 μM of ADP as agonist were observed between the pregnancy groups (NP, HP, GDM and HIV).

Enzyme assay

The results obtained for serum ADA activity are presented in figure 2. Adenosine deaminase activity was enhanced in the NP (18.2 ± 0.81 , SEM), HP (16.8 ± 0.73 , SEM) GDM (17.2 ± 0.64 , SEM) and HIV (21.6 ± 1.28 , SEM) with $p < 0.05$ when compared to the CG group (12.2 ± 0.50 , SEM).

Hematological and biochemical parameters

The NP, HP and HIV groups presented normal blood glucose levels and OGTT whereas the GDM group presented elevated fasting blood glucose levels ($>140\text{mg/dL}$) and glucose oral tolerance test (OGTT) (data not shown).

Quantitative analysis demonstrated that platelet counts obtained from all pregnant women were at normal levels ($150 - 350 \times 10^3$ platelets/mm³). Hematological determinations for Prothrombin Time (PT) showed lower activity in the NP, HP and GMD groups in comparison to the CG group and the activated partial thromboplastin time (PTTa) showed no significant differences in the NP, HP, GMD and HIV groups (table 2).

Discussion and Conclusion

The present study was carried out to determine whether there is a relation between either adenosine deaminase activities or platelet aggregation and pregnancy either without complications or with complications such as hypertension, gestational mellitus diabetes and HIV. Alterations in serum ADA activity during pregnancy are likely to reflect, at least in part, changes in the immunological status throughout normal pregnancy [25]. However, to our current knowledge, there have been few reports providing reference values of serum ADA activity throughout normal pregnancy [15].

Related studies [26] have measured serum activities of total ADA and ADA2 in normal pregnant women in the third trimester and the values were lower than those of non-pregnant women, while there was no difference in ADA1 activity. These results suggest that reduced serum total ADA activity reflects decreased ADA2 activity, which may be partly associated with depressed cell-mediated immunity during normal pregnancy. There continues to be controversy in this field as Suzuki et al. [27] have shown that there were no significant differences

in the serum ADA levels between non-pregnant and pregnant women. In other reports [14], researchers found that serum ADA in normal pregnant women was significantly higher than that of non-pregnant women.

In addition, in pregnancies complicated by preeclampsia which is characterized by enhanced cell-mediated immunity, ADA activities of the maternal serum were increased [28]. Other centers have also suggested increased ADA activity among HIV seropositive patients [10] but ambiguity persists with respect to the diagnostic and prognostic significance of this parameter. Moreover, other pathologies have been associated with altered ADA activity and further studies are needed to completely elucidate the mode of action and mechanism, for example, in gestational mellitus diabetes [29] and uterine cervix neoplasia [30].

In our study, ADA activity was increased in all groups of pregnancies women. In the normal pregnancy group, where findings of several studies have been controversial, we can suppose that the increase in the amount of erythrocytes, in other words, a higher metabolic request by the pregnant women, verified at the beginning of the third gestational period, was being responsible for a higher release of erythrocytes and platelet adenosine in the circulatory system which could be leading to vasodilation and an increase in the uterine and placental bloodstream. In turn, ADA activity would be increased in order to degrade the higher levels of adenosine found in that location and maintain local hemostasis until labor.

At the group of HIV positive pregnant women, it can be inferred that increased ADA activity was a result of cytotoxicity from the antiretroviral therapy which the patients were undergoing, since decreased enzymatic activity would be expected as the patients present a permanent deficit in cell immunity. As

demonstrated in other studies [31], increased levels of plasma ADA activity among asymptomatic HIV seropositive patients and also the persistent increased enzyme activity among subjects on antiretroviral therapy (ART), appear to be a sensitive indicator of primary (viral) and secondary (bacterial) infection and/or secondary to pharmacotherapy. Hence, subclinical cytotoxicity from ART may also result in increased serum ADA activity.

In pregnant women with gestational mellitus diabetes and hypertensive status where the inflammatory process are raised due the pathology condition associated we can suppose that the increase of the adenosine deaminase activity occurred for degrade the excessive amount of adenosine found at the serum these pregnant women. This suggestion is based on the properties of adenosine as a tumor facilitating agent, since this nucleoside causes induction of vasodilation, neurovasculogenesis and the reduction of hypoxia and inflammation [32].

On the other hand the measurement of platelet activation in various platelet disorders is increasingly popular because of recent advances in automated blood cell counters [33]. In pre-eclampsia, platelets are more prone to adhering to the endothelium and releasing alpha and dense-granule constituents. Thromboxane A₂ and serotonin are then released, contributing to platelet aggregation and inducing the formation of fibrin to stabilize platelet thrombi which may eventually occlude maternal blood flow to the placenta, leading to placental infarction. The increased levels of circulating, platelet-derived serotonin induce further platelet aggregation, and may also amplify the vasoconstrictor action of certain neurohumoral mediators, thereby causing direct contraction of vascular smooth muscle [34].

The vascular complications also are the leading cause of morbidity and mortality in diabetic patients. In these patients group the platelets have a key function in thromboembolic complications. They express and secrete a wide array of factors that affect intercellular interactions, adhesion, signaling events in target cells, and trans-endothelial cell migration. Platelets are involved in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. Their membrane glycoprotein Ia/IIa, $\alpha 2\beta 1$ integrin, serves as a platelet receptor for collagen and mediates platelet primary adhesion to sub-endothelial tissues, which is an essential first step in thrombus formation [35].

At that time with regard to platelet aggregation, the present findings show that patients with pregnancy complications presented elevated procoagulant activity at both concentrations used. We can suppose that this was due to a higher platelet request during the chosen gestational period, which would lead to an expressive increase in the number of reticulated platelets, which are enzymatically and metabolically more active and are produced by the bone marrow as a compensatory mechanism. It is also possible to presume that hematologic alterations, such as osmotic variation and pH alteration, caused platelet membrane alterations, thus releasing vasoactive amines, which would promote increased platelet aggregation by stimulating their surface purinergic receptors.

In relation to the HIV positive pregnant women, it can be suggested that the hematologic disorder caused by antiretroviral therapy, more specifically anemia, would be, at least in part, responsible for platelet reactivity, since there are reports of a negative correlation between hematocrit and high platelet

reactivity. In other words, a low level of hematocrit causes a high aggregatory platelet response [36].

With respect to synergic action of the adenosine deaminase and platelet aggregation verified in these pregnant groups we can conclude that the increased of this enzyme (ADA) with a consequent hydrolysis of adenosine could be causing the increased of the platelet aggregation, since that adenosine displays an important action in platelet aggregation inhibition [32]. Then the serum ADA activity and platelet aggregation may be markers of pregnancy complications but the regulatory mechanisms which alter enzymatic activity and platelet function in these pathologies need still further studies.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq, CAPES, FAPERGS and Federal University of Santa Maria Hospital.

References

- [1] Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with reference to their action upon the mammalian. *Heart J Physiol* 1929;68:213-37.
- [2] Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol* 2005;67:1385-387.

[3] Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:385-412.

[4] Asakura M, Asanuma H, Kim J, Lia Y, Nakamura K, Fujita M et al. Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure. *Hypertens Res* 2007;0:781-87.

[5] Akalal DB, Schein CH & Nagle GT. Mollusk-derived growth factor and the new subfamily of adenosine deaminase-related growth factors. *Curr Pharmaceut Des* 2004;10:3893-900.

[6] Blake J & Berman P. The use of adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculosis. *S Afr Med J* 1982;62:19-21.

[7] Blackburn MR & Kellems RE. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Advanc Immunol* 2005;86:1-41.

[8] Komsuoglu B, Goldeli O, Kulan K & Komsuoglu SS. The diagnostic and prognostic value of adenosine deaminase in tuberculous pericarditis. *Europ Heart J* 1995;16:1126-30.

[9] Galanti B, Nardiello S, Russo M, Fiorentino F. Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever. *Scand J Infect Dis* 1981;13:47-50.

[10] Valls V, Ena J, Roca V, Perez-Oteyza C, Angeles FM, Enriquez-de-Salamanca R. Significance of adenosine deaminase measurement in sera of patients with HIV-1 infection. *AIDS* 1990;4:365-66.

[11] Ratech H, Martiniuk F, Borer WZ, Rappaport H. Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. *Blood* 1988;72:1627-32.

[12] Uungerer JPJ, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJH. Serum adenosine deaminase: isoenzyme and diagnostic application. *Clin Chem* 1992;38:1322-26.

[13] Mallmann P, Dietrich K. Cell mediated immunity in fertility. *Arc Gynecol Obstet* 1992;252:55-63.

[14] Henkiewicz J, Michalski J. Adenosine deaminase in pregnancy and in some gynecological diseases. *Enzymol* 1971;41:261-77.

[15] Jaqueti J, Martinez-Hernandez D, Hernandez-Garcia R, Navarro-Gallar F. Adenosine deaminase in pregnancy serum. *Clin Chem* 1990;36:2144.

[16] Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124:18-25.

[17] Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993;7: 516-22.

[18] Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ et al. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Thromb Haemost* 1995;74(1):213-17.

[19] Bick RL. Recurrent miscarriage syndrome due to blood coagulation protein/platelet defects: prevalence, treatment and outcome results. DRW Metroplex Recurrent Miscarriage Syndrome Cooperative Group. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000;6:115-25.

[20] Clarck P, Brennand J, Conkie JA, McCall F, Greer IA, Wlaker ID. Activated protein C sensivity, protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1998;79:1166-70.

[21] Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004, 27(Suppl 1):88-90.

[22] Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;95:168-78.

[23] Giusti G, Galanti B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor, *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim; 1984. p. 315-23.

[24] Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977;83:346-56.

[25] Weinberg ED. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis* 1984;6:814-31.

[26] Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, et al. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in women with normal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2003;267:205-07.

[27] Suzuki S, Yoneyama Y, Sawa R, Araki T. Relation between maternal serum adenosine deaminase and plasma adenosine levels in twin pregnancies. *Clin Biochem* 2002;354:417-19.

[28] Karabulut AB, Kafkasli A, Burak F, Gozukara EM. Maternal and fetal plasma adenosine deaminase, xanthine oxidase and malondialdehyde levels in pre-eclampsia. *Cell Biochem Funct* 2005;23:279-83.

[29] Mokhtari M, Hashemi M, Yaghmaei M, et al. Serum adenosine deaminase activity in gestational diabetes mellitus and normal pregnancy. DOI 10.1007/s00404-009-1148-3

[30] Maldonado PA, Correa MC, Becker LV, et al. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clin Biochem* 2008;41:400-06.

[31] Chittiprol S, Satishchandra P, Bhimasenarao RS, et al. Plasma adenosine deaminase activity among HIV1 Clade C seropositives: Relation to CD4 T cell population and antiretroviral therapy. *Clin Chim Acta* 2007;377:133-37.

[32] Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 2006;53:269–78.

[33] Giacomini A, Legovini P, Gessoni G, et al. Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA 120 in reference subjects and patients. *Clin Lab Haematol* 2001;23:181-86.

[34] Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Lagos M, Gonzalez C. Plasma and platelet concentration and platelet uptake of serotonin in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Life Sciences* 1998;15:1323-32.

[35] Vitkovski Y, Kuznik B, Solpov A, Magen E. Status of platelet-lymphocyte aggregation in circulating blood of patients with type 1 diabetes with and without diabetic nephropathy. *IMAJ* 2008;10:691-94.

[36] Cavusoglu E, Chopra V, Gupta A, Clarck LT, Eng C, Marmur JD. Usefulness of anemia in men as an independent predictor of two-year cardiovascular outcome in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2006;98:580-84.

Tables

Table 1 : Clinical characteristics of the different pregnancy groups

	Groups			
	NP	HP	GMD	HIV
Age (years)	35.8 ± 1.324	38.42 ± 1.251	36.2 ± 1.855	35.16 ± 1.522
Gestational age (weeks/range)	29.8 ± 0.711	29.71 ± 1.523	28.7 ± 1.044	30.08 ± 0.792
Systolic blood press (mmHg)	111 ± 2.895	153.57 ± 3.891	110.5 ± 5.241	112.5 ± 3.168
Diastolic blood press (mmHg)	70.66 ± 2.175	95 ± 1.543***	71.5 ± 2,693	72.91 ± 2.497
n	15	7	10	12

Results are expressed as mean value ± S.E.M (n=44).

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the nonparametric Kruskal-Wallis test, considering a level of significance of 5%.

(***) P < 0, 001 for NP versus HP; P > 0, 05 for NP versus GMD and HIV.

Table 2 : Coagulation parameters in control group and the different pregnancy groups

	Groups				
	CG	NP	HP	GMD	HIV
PLT (10^3 /mm ³)	239,7 ± 10,37 (189-350)	219 ± 7,28 (135-257)	213 ± 8,85 (186-250)	224 ± 8,60 (170-259)	209 ± 7,58 (150-211)
PT	90.26 ± 0,95 (82-96)	76.13 ± 2,06 (65-90)	73.14 ± 0,91*** (70-77)	73.20 ± 2,04*** (65-85)	85.66 ± 1,12 (79-90)
APTT	29,48 ± 0,98 (25-40)	29,93 ± 1,11 (23-37)	28,00 ± 1,77 (23-35)	30,45 ± 1,28 (25-37)	29,85 ± 1,20 (25,3-40)
n	15	15	7	10	12

Results are expressed as mean value ± S.E.M (n=59).

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the nonparametric Kruskal-Wallis test, considering a level of significance of 5%.

(***) P < 0, 001 for NP versus HP and GMD.

PT: Standard value was considered as 100% of activity.

APTT: Standard value was 25 s.

PT and APTT reference values are used as parameters, for healthy people, at the Federal University of Santa Maria Hospital.

Table 3 : Platelet aggregation in different pregnancy groups.

	ADP agonist concentration	
	5 μ M	10 μ M
CG (n = 15)	70.2 \pm 1.52	79.6 \pm 1.25
NP (n = 15)	79.4 \pm 1.52*	83.0 \pm 1.36
HP (n = 7)	82.4 \pm 1.93***	90.4 \pm 1.91*
GMD (n = 10)	85.9 \pm 2.25**	93.2 \pm 2.93***
HIV (n = 12)	81.3 \pm 2.81***	90.4 \pm 2.31**

Results are expressed as mean value \pm S.E.M (n=59).

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the nonparametric Kruskal-Wallis test, considering a level of significance of 5%.

(*) P < 0,05 for CG versus NP; (***) P < 0,001 for CG versus HP and HIV; (**) P < 0,01 for CG versus GMD for 5 μ M of agonist; (*) P < 0,05 for CG versus HP; (***) P < 0,001 for CG versus GMD; (**) P < 0,01 for CG versus HIV for 10 μ M of agonist;

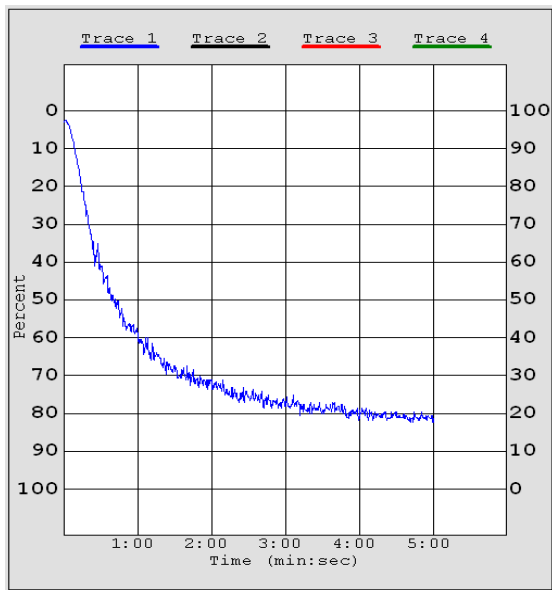
Figures

Fig. 1. Representative aggregatory tracings of PRP. The x axis shows the time of platelet aggregation and the y axis the percent light transmission. PRP was mixed with 10 μ M of ADP agonists. Measurement 1 = PRP of Control group; Measurement 2 = PRP of hypertensive pregnant.

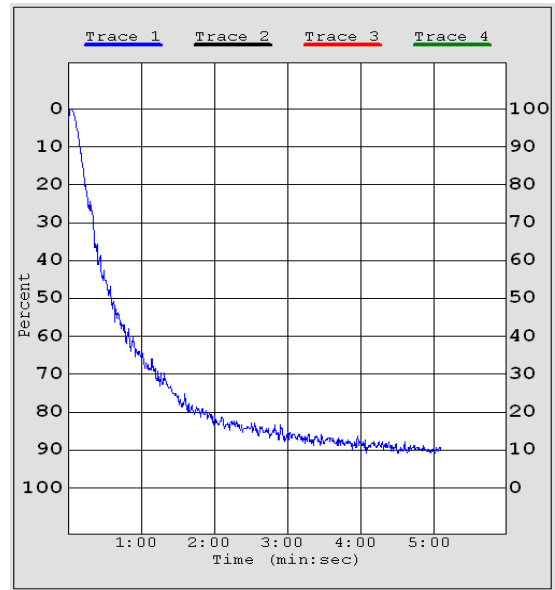
Fig. 2. Box-whisker-plot of ADA activity in serum obtained from control group (CG), normal pregnant (NP), pregnant with hypertension (HP), pregnant with gestational mellitus diabetes (GMD) and pregnant HIV soropositive. Data represent the mean value \pm standard error of mean of 59 individuals. ***P < 0,001 for CG versus NP and HIV; *P < 0,05 for CG versus HP; **P < 0,01 for CG versus GMD.

Fig. 3. Box-whisker-plot of platelet aggregation with agonist ADP 5 μ M in serum obtained from control group (CG), normal pregnant (NP), pregnant with hypertension (HP), pregnant with gestational mellitus diabetes (GMD) and pregnant HIV soropositive. Data represent the mean value \pm standard error of mean of 59 individuals. *P < 0,05 for CG versus NP; **P < 0,01 for CG versus HP and HIV; ***P < 0,001 for CG versus GMD.

Fig. 4. Box-whisker-plot of platelet aggregation with agonist ADP 10 μ M in serum obtained from control group (CG), normal pregnant (NP), pregnant with hypertension (HP), pregnant with gestational mellitus diabetes (GMD) and pregnant HIV soropositive. Data represent the mean value \pm standard error of mean of 59 individuals. P > 0,05 for CG versus NP; *P < 0,05 for CG versus HP; ***P < 0,001 for CG versus GMD; **P < 0,01 for CG versus HIV.



Measurement 1



Measurement 2

Fig. 1

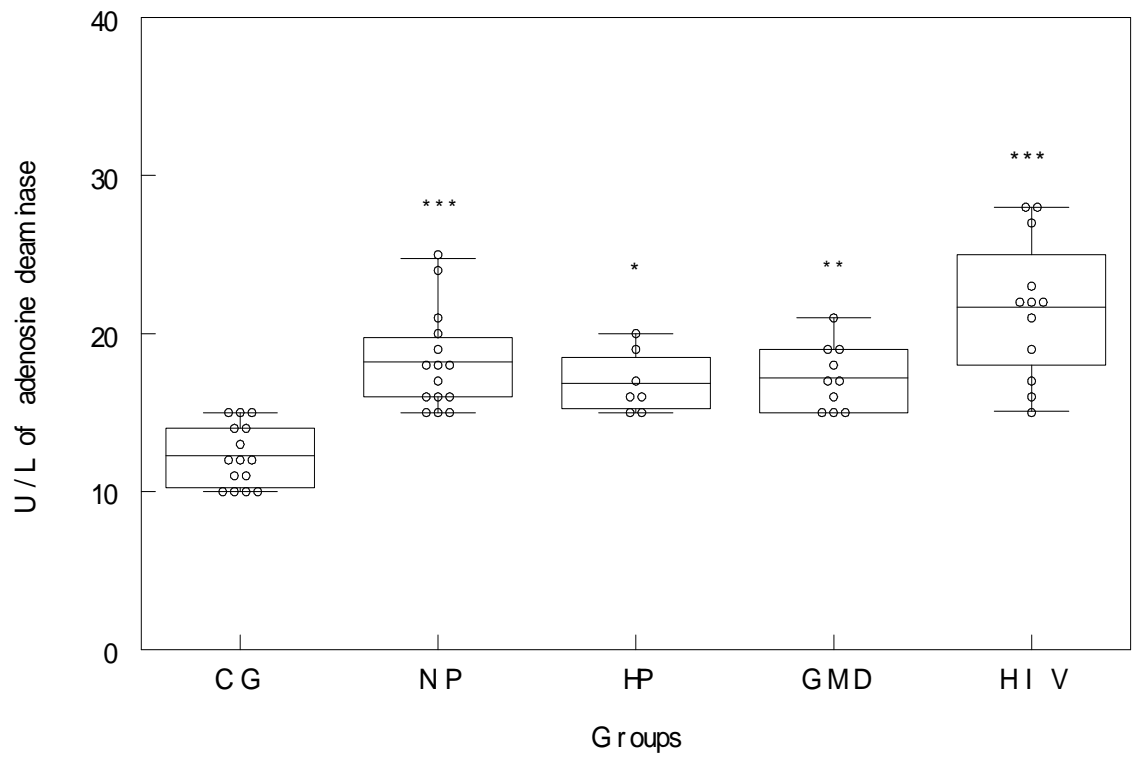


Fig. 2.

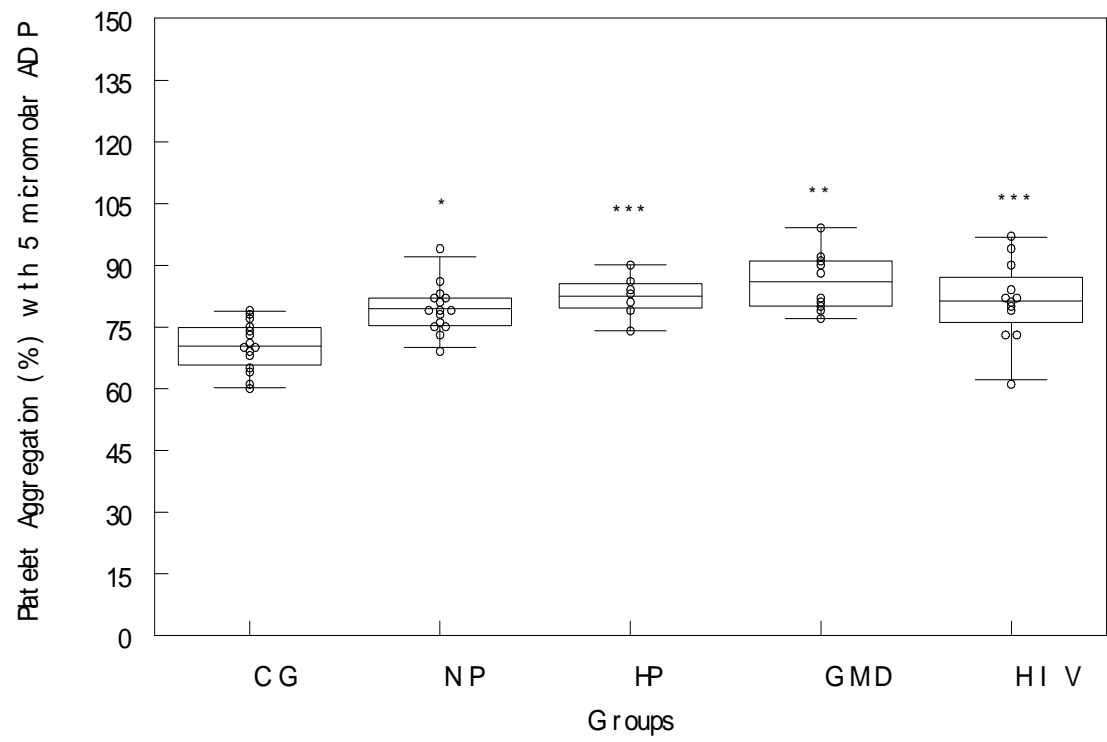


Fig. 3.

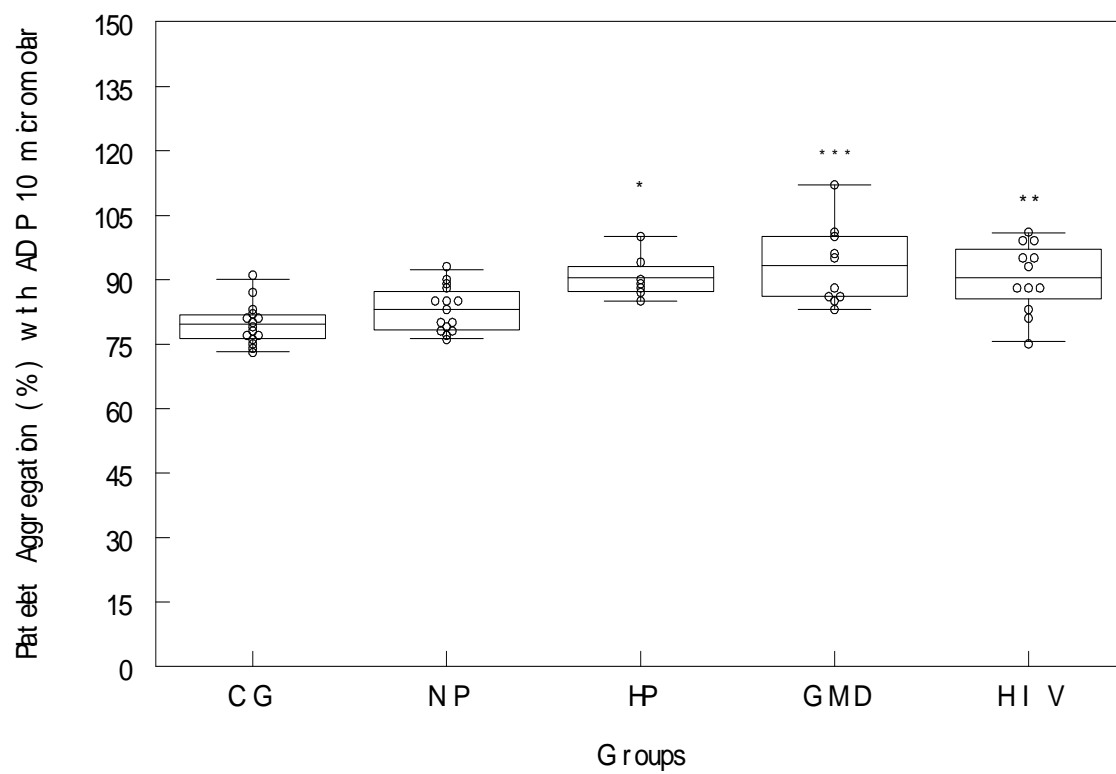


Fig. 4.

Capítulo 2

Manuscrito II

Oxidative stress and antioxidants defenses in women with an uncomplicated pregnancy

Claudio Alberto Martins Leal, Maria Rosa Chitolina Schetinger , Daniela Bitencourt Rosa Leal , Vera Maria Morsch, João Felipe Peres Rezer, André Valle de Barrios, Jamile Fabbrin Gonçalves, Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Submetido a revista Redox and Report

Category of submission: research article

Oxidative stress and antioxidants defenses in women with an uncomplicated pregnancy

Claudio Alberto Martins Leal³, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Daniela Bitencourt Rosa Leal², Vera Maria Morsch¹, João Felipe Peres Rezer¹, André Valle de Barrios¹, Jamile Fabbrin Gonçalves¹, Jeandre Augusto dos Santos Jaques¹

¹ *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

² *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

³ *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

*** Corresponding author:**

Claudio A. M. Leal and Maria Rosa Chitolina Schetinger

Fax: + 55-5532-208031

E-mail: camleal@terra.com.br and mariaschetinger@gmail.com

Abstract

Oxidative stress is defined as an imbalance in the production of reactive oxygen species and a change in antioxidant defenses. So the objective of this work was to investigate oxidative stress and antioxidant capacity in women with uncomplicated pregnancy. This study was performed in thirty-nine women with uncomplicated pregnancy and was evaluated the oxidative status, antioxidant capacity and cholinesterases activity in serum and whole blood. The results for antioxidants demonstrated an increased for superoxide dismutase and catalase activities with $p < 0.05$ and $p < 0.01$ and a decreased for ascorbic acid and total content sulphhydryl with $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. On the other hand when the pro-oxidant system was verified we found an increased ($p < 0.01$) for MDA and no significant change ($p > 0.05$) for protein carbonylation. For cholinesterases enzymes occurred an increase ($p < 0.001$) in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. This study demonstrated that there is a change of the pro-oxidant and also the antioxidant defenses associated with body changes and circulatory inherent to pregnancy process.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, uncomplicated pregnancy, whole blood, serum.

Introduction

The aerobic organism have antioxidant defense systems that dealing with reactive oxygen species (ROS) produced as a consequence of aerobic

respiration and substrate oxidation. Small amounts of ROS, including hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrogen peroxide, are constantly generated in aerobic organisms in response to both external and internal stimuli¹. They are very transient species due to their high chemical reactivity that leads to lipid peroxidation and oxidation of some enzymes, and a massive protein oxidation and degradation².

Regardless, they attack the phospholipids of cell membranes and react with polyunsaturated fatty acids to form lipid peroxides resulting in cellular injury. Reactive oxygen species have been proposed as a promoter of lipid peroxidation and the endothelial cell dysfunction that is commonly associated with disorders of pregnancy³. The prevention of lipid peroxidation is an essential process in all the aerobic organisms, as lipid peroxidation products can cause DNA damage. In turn the increased of lipid peroxidation and decreased antioxidant protection frequently occurs, thus epoxides may spontaneously react with nucleophilic centers in the cell and thereby covalently bind to DNA, RNA and protein⁴.

Low levels of ROS are indispensable in many biochemical processes, including intracellular messaging in the cell differentiation and cell progression or the control of growth, apoptosis⁵, immunity and defense against microorganisms⁶. In contrast, high doses and/or inadequate removal of ROS result in oxidative stress, which may cause severe metabolic malfunctions and damage to biological macromolecules⁷.

We can define the oxidative stress (OS) as an imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS) and the ability of antioxidant defenses to scavenge them. It can arise from increased production of ROS

and/or a decrease in antioxidant capacity. These ROS are free radicals and they induce cellular damage by acting on proteins and lipids.

Many studies have shown that there is increased oxidative stress during pregnancy, and oxidative damage is exaggerated in pregnancy complicated by disorders such as preeclampsia⁸. However, there is only scattered information regarding baseline levels of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies⁹. The cause of increased maternal oxidative stress during pregnancy is unknown; nevertheless, accumulating evidence suggest that the placenta plays an important role in the production of oxidative stress^{10,11}.

Therefore, the objective of this study was to investigate maternal oxidative stress and antioxidant capacity in pregnancy of the women with uncomplicated pregnancies. So we will check lipid peroxidation; protein oxidative profile; antioxidant defenses and cholinesterases activities on this physiological condition.

Materials and Methods

Patients and controls

Thirty-nine women from the Federal University of Santa Maria Hospital (UFSM, Santa Maria, RS, Brazil) were included in the study. None of these women had a history of other relevant disease states. Women with unfavorable outcome of pregnancy were excluded from this investigation. Each woman were carefully selected by a clinical evaluation and separated in two patient groups. The

control group (CG), consisted of n= 9 nonpregnant healthy volunteers women who did not present any disease and had not been submitted to any pharmacological therapy during the previous month. The second group, normal pregnancy (NP), consisted of n = 30 pregnant women with a singlet pregnancy, with a normal diastolic and systolic blood pressure (mmHg) and with an age ranged from 27-45 years among the groups conform table 1. All women of the group of normal pregnant were being treated with ferrous sulfate. The Human Ethics Committee of UFSM approved the project under number 86-2006 and subjects gave informed consent.

Blood samples collection

Eighteen milliliters of peripheral blood was collected by venous puncture from ante-cubital region into a three vacutainer plastic tube containing anticoagulant sodium citrate 3.2%, EDTA (K3E) and other tube with serum clot activator and without anticoagulant for the separation of blood fractions for preparations of samples and determinations. All Blood samples from the pregnant women were obtained from the gestational third trimester of pregnancy (table 1).

Hematological parameters

The erythrocytes count, hemoglobin and hematocrit of the all controls and patients were performed with an automatic cell counter brand ABX Micros 60 (ABX Horiba).

Determination of lipid peroxidation

As an index of lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described by Jentzsch et al. [12]. Briefly, 200 μ l of serum samples were mixed with 1.5 ml of 0.2 M orthophosphoric acid, 250 μ l of 0.1M of thiobarbituric acid and 550 μ l of distilled water; subsequently they were heated in a boiling water bath for 45 minutes. TBARS were determined by the absorbance at 532 nm and were expressed as malondialdehyde equivalents (nmol MDA/ml of serum).

Determination of total sulphhydryl content

Total plasma sulphhydryl groups were determined as described by Ellman¹³. In short, an aliquot of plasma was reacted with 250 μ M DTNB in a final volume of 2 ml, and the absorbance was read at 412 nm. A standard curve with cysteine was constructed in order to calculate the total sulphhydryl in the samples.

Carbonylation of serum proteins

Protein carbonyl was measured by reaction with 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) following the method of Levine et al.¹⁴. Assays were performed in duplicate for both the DNPH treated samples and blanks. Thus, a serum aliquot containing ~5mg protein diluted in 20 mM Hepes buffer, pH 7.2, was placed in 4 tubes. A half volume of 10% trichloroacetic acid was added to precipitate protein. Tubes were centrifuged at 3.700 rpm for 5 minutes in a tabletop centrifuge, discarding the supernatant. Two tubes, then received 250 μ l of 10 mM DNPH in 2M HCl and the other two the same volume of 2M HCl and pellets were resuspended using a pipet tip and vigorous vortexing. The reaction was let in the dark, at room temperature, for 30 minutes, vortexing after 15 minutes.

Protein was precipitated by addition of 250 μ l of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation for 5 minutes at 3.700 rpm. After discarding the supernatant, the pellet protein was washed 2 times with 1.0 ml ethyl acetate:ethanol, 1:1, at room temperature. Pellets were broken up with a pipet tip and vortexing, and then centrifuged at 3.700 rpm for 5 minutes before discarding the supernatant. After the 3rd wash, the pellets were incubated at 37°C at 10 minutes in 1.5 ml of 80 mM PBS Buffer (SDS 2%, EDTA 0,5%), pH 8.0, and then read at 370 nm. The results were expressed as nmol protein carbonyl/mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities

Citrated whole blood was used to determine SOD and CAT activities. SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation as absorbance at 480 nm as Bannister and Calabrese¹⁵. CAT activity was measured by the rate of decrease in H₂O₂ at 240 nm according Aebi¹⁶.

Ascorbic acid (Vitamin C) quantification

Vitamin C analysis followed the method described by Lloyd et al., with modifications¹⁷. The serum samples was desproteinized with trichloroacetic acid (TCA) 15%, using 400 μ l of sample and 800 μ l of TCA 15%, vortex-mixed for 15s and centrifuged at 1800 x g for 15 minutes. Then, 400 μ l of supernatant was removed to the other tube and 120 μ l of DTC (solution of 5ml of 2.4 dinitrophenylhydrazine 0.1 mol/l in H₂SO₄ 4.5M; 0.25 ml of thiourea 0.66 mol/L; 0,25 ml of cupric sulfate 0.027 mol/l) was added. Samples were vortex-mixed for 10s, closed with filmed paper and incubated at 60 °C for 60 minutes. After, samples were transferred to an ice bath for 10 minutes, and then, 600 μ l

of H₂SO₄ 12M was added. Samples were vortex-mixed for 10s and read at 520 nm. All samples were measurement in duplicate. It was used calibration curves with L(+)-ascorbic acid (Vetec Quimica Fina Ltda) to determine the concentration, following the same procedure of the samples.

Erythrocyte acetylcholinesterase activity (AChE)

Erythrocyte AChE activity was determined by the method of Ellmann et al.¹⁸, modified by Worek et al.¹⁹. To achieve temperature equilibration and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for 10 minutes prior to addition of substrate. Enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. The butyrylcholinesterase (BChE EC 3.1.1.8) was inhibited by ethopropazine. AChE activity was measured at 436 nm and 37°C using polystyrol cuvetts. The activity of AChE was calculated from the quotient between AChE activity and protein content and the results are expressed as $\mu\text{mol/h/mg}$ of protein.

Serum butyrylcholinesterase (BuChE) enzymatic assay

The BuChE enzymatic assay was determined in serum by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. [18] as previously described by Rocha et al.²⁰. The reaction mixture (2 ml final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid, measured by absorbance at 412 nm during 2-min incubation at 25°C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 8

mM butyrylthiocholine iodide (BuSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol BuSCh/h/mg}$ of protein.

Protein determination

Protein was determined by the method of Bradford²¹ using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by unpaired t test, considering a level of significance of 5%. Values of $P < 0.05$ were regarded as statistically significant. Correlation was evaluated by Pearson`s test considering $p < 0.05$ significant.

Results

The results of the erythrocytes count, hemoglobin and hematocrit was decreased in the NP group with $p < 0.01$ when compared to control group (table 1). In order to verify the changes in membrane lipids the first measurement performed was the MDA activity which was enhanced in the NP group (17.75 ± 0.71 , SEM) with $p < 0.01$ when compared to the CG group (13.42 ± 1.13 , SEM) as figure B.

The plasma total content sulphhydryl was decreased in the NP (0.36 ± 0.02 , SEM) with $p < 0.001$ when compared to the CG group (0.67 ± 0.04 , SEM) (table 2). The protein oxidation of the normal pregnancy group NP (1.54 ± 0.05 , SEM) demonstrated increased carbonyl content when compared to the control

group (1.34 ± 0.12 , SEM), but this difference is not significant statistically ($p > 0.05$) (figure A).

The results obtained for dosage of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities are presented in table 2. The superoxide dismutase activity was increased in the NP group (43.5 ± 1.47 , SEM) with $p < 0.05$ when compared to the CG group (38.0 ± 2.09 , SEM). The catalase activity was increased in the NP group (17.15 ± 0.33 , SEM) with $p < 0.01$ when compared to the CG group (13.75 ± 1.43 , SEM). Analyzing the correlations, SOD and CAT demonstrated a positive correlation according figure E ($p < 0.05$).

The plasmatic vitamin C quantification was decreased in the NP (2.77 ± 0.25 , SEM) with $p < 0.05$ when compared to the CG group (4.25 ± 0.75 , SEM) (table 2).

The erythrocyte AChE activity is shown in figure D. It can be observed that there was a significant difference between the patients and the controls. The erythrocyte AChE activity was increased in the NP (237.51 ± 11.64 , SEM) with $p < 0.001$ when compared to the CG group (133.55 ± 6.69 , SEM). The serum BuChE enzymatic assay was increased in the NP (37.7 ± 1.22 , SEM) with $p < 0.001$ when compared to the CG group (26.25 ± 3.33 , SEM) as shown figure C.

Discussion

In relation to pro-oxidants our results showed that the amounts of MDA were increased in the third trimester of gestation in women pregnant. In parallel

with this change, there was an increase of the antioxidants SOD and CAT in the same period, as well as an increase of the cholinesterase activities. As previously^{10,11}, the placenta plays an important role at stress oxidative in pregnancy.

The human placenta is classified as hemochorial type, and the establishment of the maternal placental circulation is influenced by the trophoblastic invasion. Extravillous trophoblastic invasion transforms the low-caliber, high-resistance spiral arteries into high-caliber and low resistance²². This remodeling of the placental vascular bed causes invasion of the cytotrophoblast cells on the maternal spiral arteries feeding intervillous space (involving endothelium and muscular tunica media), making them lose their smooth muscle and become sinusoids, thus lacking any contractibility and resulting in an oxidative burst²³.

So the maternal-placental interface is formed by syncytiotrophoblast (STB), this cell is the likely origin of the factors which disturb maternal endothelium. Significant quantities of syncytiotrophoblast microparticles (STBMs), a product of the normal turnover and renewal of the syncytial surface by apoptosis, circulate in maternal blood during pregnancy²⁴. The syncytiotrophoblast microparticles may lead to activation of maternal neutrophils and subsequent production of reactive oxygen species mediated by (NAD [P] H) oxidase²⁵.

The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD[P]H) oxidase is an important enzyme that generates superoxide radicals localized in the placenta syncytial microvillous membrane^{26,27}. This enzyme may play a role in placental lipid peroxidation by generating increased amounts of the superoxide

radical which could explain the increased activity of the enzyme superoxide dismutase observed in this work. We also can presume that the placenta is the cause of the increased oxidative stress during pregnancy, probably due to STBMs released in the maternal-placental interface.

Also other researchers reported that the pregnancy itself may produce oxidative stress as a result of increased metabolic activity in placental mitochondria and reduced scavenging power of antioxidants. Increased plasma thiols and placental lipid peroxides in pregnant women and decreased expression of antioxidants have been reported^{28,29}.

Moreover substantial increases in OS have been hypothesized to lead to acute pregnancy complications³⁰ or spontaneous abortion³¹. Also under pro-thrombotic conditions related with both thrombophilia and pregnancy, haemostatic response and microthrombi are generated, which could lead to ischemic conditions and mechanical stress in blood vessels and consequent generation of reactive oxygen species (ROS)^{32,33}.

Still there factors intricately associated with endothelium injury and coagulation as inflammation, under which increased activity of leukocytes results in oxidative burst. Thus a cascade of events initiated by oxidative stress, leads to series of responses, such as vasoconstriction, membrane oxidation and further pro-coagulation, each of which includes further generation of ROS³⁴.

In our study were found increased activity of cholinesterase enzymes, then we could assume that this increased activity of these enzymes would be derived from erythrocytes, platelets and lymphocytes employed in the inflammatory process inherent to the process of pregnancy, since there is

endothelial dysfunction, especially in the maternal-placental interface. This assumption can be confirmed and we can say that these cells would be releasing these enzymes as it has been found high levels of AChE activity in non-neuronal tissues^{35,36}. Adding to this, it is known that butyrylcholinesterase detoxifies anticholinesterases (AC) that are responsible to threaten pregnancy³⁷.

Regarding the increased activity of serum butyrylcholinesterase we could speculate that it is related to a possible change in the levels of adipocytokines caused by the accumulation of visceral fat occurred during pregnancy. It is well known that these substances are bioactive compounds derived from adipose tissue, such as leptin, tumor necrosis factor (TNF- α), adiponectin, among others. In the case of adiponectin in contrast to other types of adipocytokines, it is reduced in patients with excess visceral fat³⁸. Thus this substance would not be exerting its protective effect and anti-inflammatory thus favoring the elevation of the enzyme activity butyrylcholinesterase.

Also, our results are consistent with the literature³⁹, whereas the increase of SOD should be followed by increased catalase activity because it is known that SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion (O_2^-) into peroxide (H_2O_2) and oxygen (O_2) becomes an important antioxidant defense system. In turn, the peroxide, which is a co-product of SOD is converted to water by catalase.

Another cause for the increase of pro-oxidants in normal pregnancy reported here could be iron supplementation to these women who were undergoing. We could suppose that the deposits of iron could be diminished since the hematological parameters like hemoglobin are diminished, but serum

iron supplementation would be the responsible for stress. The iron supplementation in pregnancy is currently a routine practice in most pregnancy care centers particularly in developing countries. Reports indicate that iron is a free radical generator⁴⁰. Indeed the chemical properties of Fe render it a potential hazard within the organism and that ferrous ion (Fe^{2+}) in small non-protein shielded chelates can catalyze the production of oxygen radicals or reactive oxygen species (ROS), which in turn can lead to peroxidation and radical chain reaction with molecular damage⁴¹.

Iron also is involved in the Fenton reaction, generating hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) which is particularly toxic. Indeed it is one of the most reactive forms of the free radicals. Thus iron is important in toxic cellular injury⁴² and is probably responsible for a portion of the formation of ROS in pregnant women.

Taking together these results and knowing the importance that the balance between the generation of oxygen species and antioxidant systems play in our body we can suggest that more studies should be conducted with the objective of determine other important enzymes involved in the stress oxidative in uncomplicated gestational process.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

1. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J* 1998; 335:85-94.
2. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32:595-603.
3. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS *et al.* Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 2002; 90:1274-1281.
4. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153:83–104.
5. Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:13182-13187.
6. Le YJ, Galoforo SS, Berns CM *et al.* Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273:5294-5299

7. Chopra S, Wallace HM. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species *Biochem Pharmacol* 1998; 55:1119-1123
8. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):222-235.
9. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999; 13(5):347-352.
10. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11(6)342-352.
11. Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006; 45(3):189-200.
12. Jentsch, AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:251-256.
13. Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70-77.

14. Levine LR, Garland D, Oliver CN *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-478.
15. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987; 32:279-312.
16. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
17. Lloyd B, Sinclair HM, Webster GR. The estimation of ascorbic acid for clinical purposes by the hydrazine method. *Biochem J* 1945; 39:17.
18. Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Flatherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-95.
19. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Dieplod C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Chim Clin Acta* 1999; 288:73-90.
20. Rocha JBT., Emanuelli T, Pereira ME., Effects of early undernutrition on 15 kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobio. Exp* 1993; 53 431-437.

21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1975; 72:248-254.
22. Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60(12):807-816.
23. Chamy MV, Lepe J, Catalán A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 2006; 39:229-236.
24. Huppertz B, Frank HG, Kingdon JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*. 1998; 110(5):495-508.
25. Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL, Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in preeclampsia. *J Hypertens* 2003; 21(2):395-402.
26. Matsubara S, Sato I. Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy. *Histochem Cell Biol* 2001; 116:1-7.

27. Raijmakers MT, Peters WH, Steegers EA *et al.* NAD(P)H oxidase associated superoxide production in human placenta from normotensive and pre-eclamptic women. *Placenta* 2004; 25:S85-89.
28. Wisdon SJ, Wilson R, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1701-1704.
29. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122:369-382.
30. Wang Y, Sharma KR, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril* 1997; 68:826-830
31. Vural P, Akgul C, Yildirim A, Canbaz M. Antioxidant defense in recurrent abortion. *Clin Chim Acta* 2000; 295:169–177
32. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res* 2007; 41(12):1364-1375
33. Laude I, Rongieres-Bertrand C, Boyer-Neumann C *et al.* Circulating procoagulant microparticles in women with unexplained pregnancy loss: a new insight. *Thromb Haemost* 2001; 85(1):18-21

34. Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive Oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1988-1996.
35. Corrêa CM, Maldonado P, Rosa CS *et al.* Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. *Biomed Pharmacother* 2008; 62:317-324.
36. Rakonczay Z, Horváth Z, Juhász A, Kálmán J. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer`s disease. *Chem Biol Interact* 2005; 157-158:233-238.
37. Mahmoud FF, Haines DD, Abul HT, Omu AE, Abu-Donia MB. Butyrylcholinesterase activity in gestational diabetes: correlation with lymphocyte subpopulations in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56:185-192.
38. Mori T, Shinohara K, Wakatsuki A, Watanabe K, Fujimaki A. Adipocytokines and endothelial function in preclamptic women. *Hypertens Res* 2010, 33:250-254.
39. Grissa O, Atégbo J-M, Yessoufou A *et al.* Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia. *Transl Res* 2007; 150(3):164-171.

40. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, England, 1998.
41. Simsek M, Naziroglu M, Simsek H, Cay M, Aksakal M, Kumru S. Blood plasma levels of lipoperoxide, glutathione peroxidase, beta-carotene, vitamins A and E in women with habitual abortions. *Cell Biochem Funct* 1998; 16:227-231.
42. Hubel CA, Kozlov AV, Kagan VE *et al.*. Decreased transferrin and increased transferrin saturation in sera of women with pre-eclampsia: implications for oxidative stress. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:692-700.

Tables

Table 1: Some clinical characteristics of the study population.

	Groups	
	Control	Normal Pregnancy
Age (years)	35.16 ± 1.522	35.80 ± 1.324
Gestational age (weeks/range)	_____	29.8 ± 0.711
Systolic blood pressure (mmHg)	112.5 ± 3.168	110.0 ± 2.076
Diastolic blood pressure (mmHg)	72.90 ± 2.497	70.66 ± 2.175
Erythrocytes (RBC) (10 ⁶ /mm ³)	4.378 ± 0.074	3.89 ± 0.115 **
Hemoglobin (HGB) (g/dL)	13.26 ± 0.253	11.98 ± 0.299 **
Hematocrit (HCT) (%)	39.96 ± 0.765	35.24 ± 0.879 ***
n	8-9	14-30

Results are expressed as mean value ± S.E.M (n=39). Data were analyzed statistically by unpaired "t". (**) p< 0.01; (***) p< 0.001.

Table 2: Values of the antioxidant substances of the normal pregnancy and controls.

	Controls	Normal Pregnancy
Superoxide dismutase (U SOD/mg protein)	38.0 ± 2.09	43.5 ± 1.47*
Catalase (pmol/mg of protein)	13.75 ± 1.43	17.15 ± 0.33**
Ascorbic acid (µmol/l)	4.25 ± 0.75	2.77 ± 0.25*
Total sulfhydryl content (umol de SH/ml of plasma)	0.67 ± 0.04	0.36 ± 0.02***
n	7-9	11-30

Results are expressed as mean value ± S.E.M for n = 7-30 independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed statistically by unpaired “t” test. (*) p < 0.05; (**) p < 0.01; (***) p < 0.001.

Figures

Fig. A. Box-whisker-plot of protein carbonyls content in serum obtained from control group (C) and normal pregnant (NP). Data represent the mean value \pm standard error of mean of 23 individuals. $p > 0.05$ for NP when compared to control group.

Fig. B. Box-whisker-plot of malondialdehyde content in serum obtained from control group (C) and normal pregnant (NP). Data represent the mean value \pm standard error of mean of 27 individuals. ** $p < 0.01$ for NP when compared to control group.

Fig. C. Box-whisker-plot of Butyrylcholinesterase activity in serum obtained from control group (C) and normal pregnant (NP). Data represent the mean value \pm standard error of mean of 38 individuals. *** $p < 0.001$ for NP when compared to control group.

Fig. D. Box-whisker-plot of Acetylcholinesterase activity in serum obtained from control group (C) and normal pregnant (NP). Data represent the mean value \pm standard error of mean of 38 individuals. *** $p < 0.001$ for NP when compared to control group.

Fig. E. Pearson`s correlation between SOD and CAT in citrated whole blood ($p < 0,05$).

Fig A.

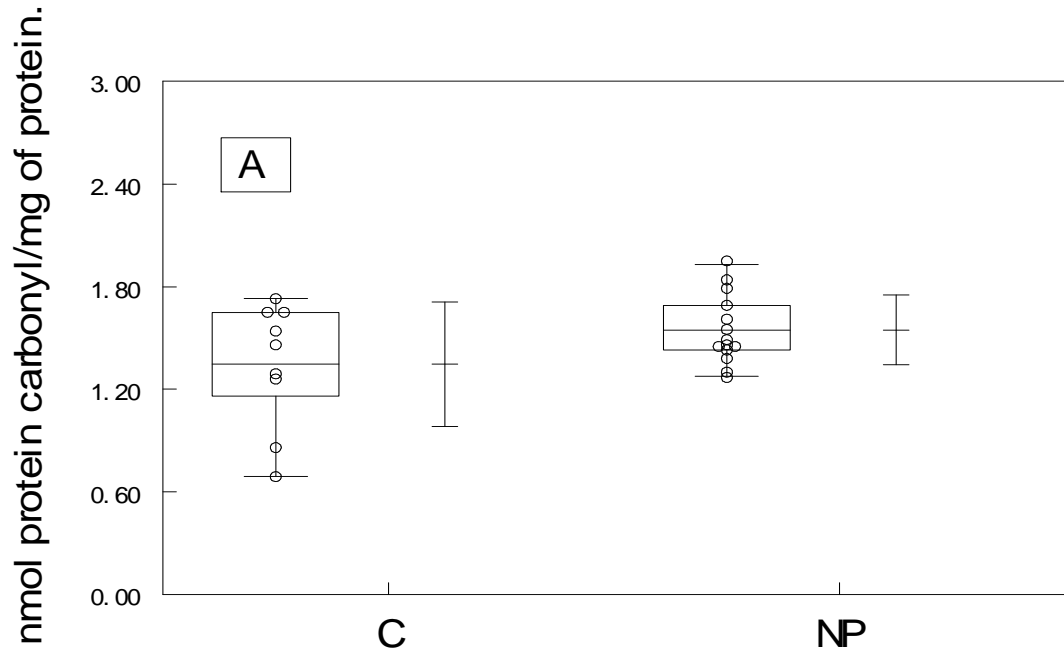


Fig B.

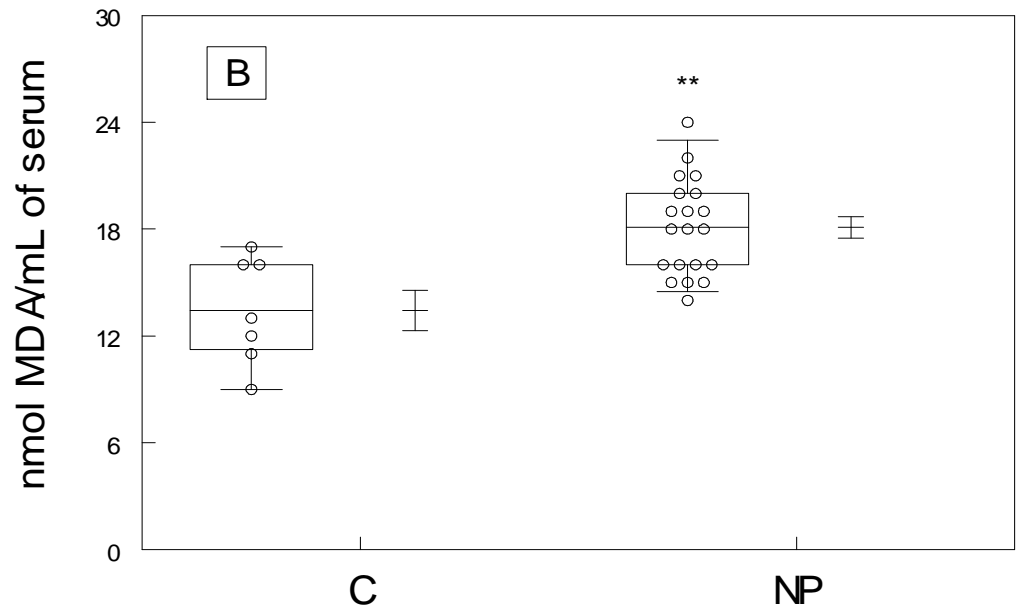


Fig.C.

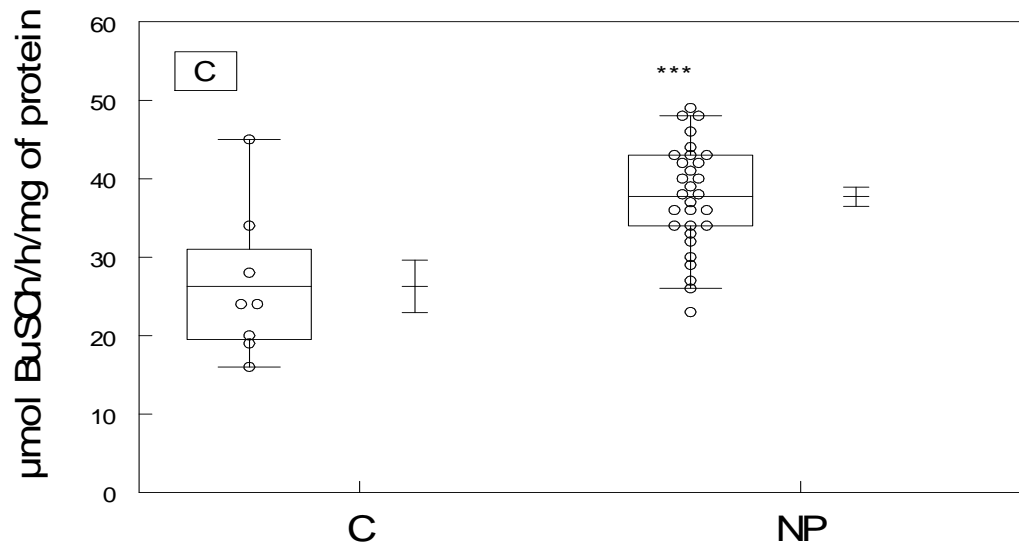


Fig. D.

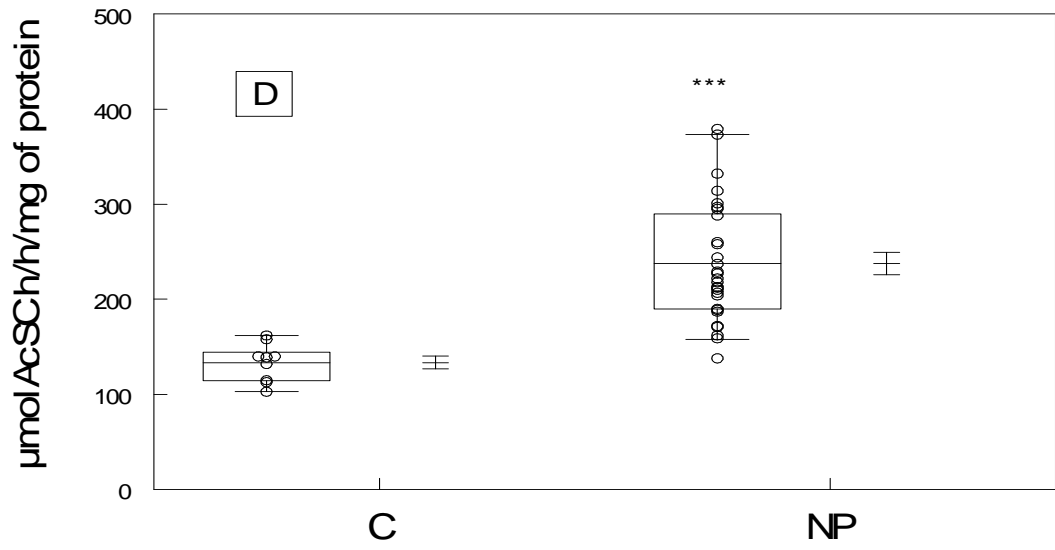
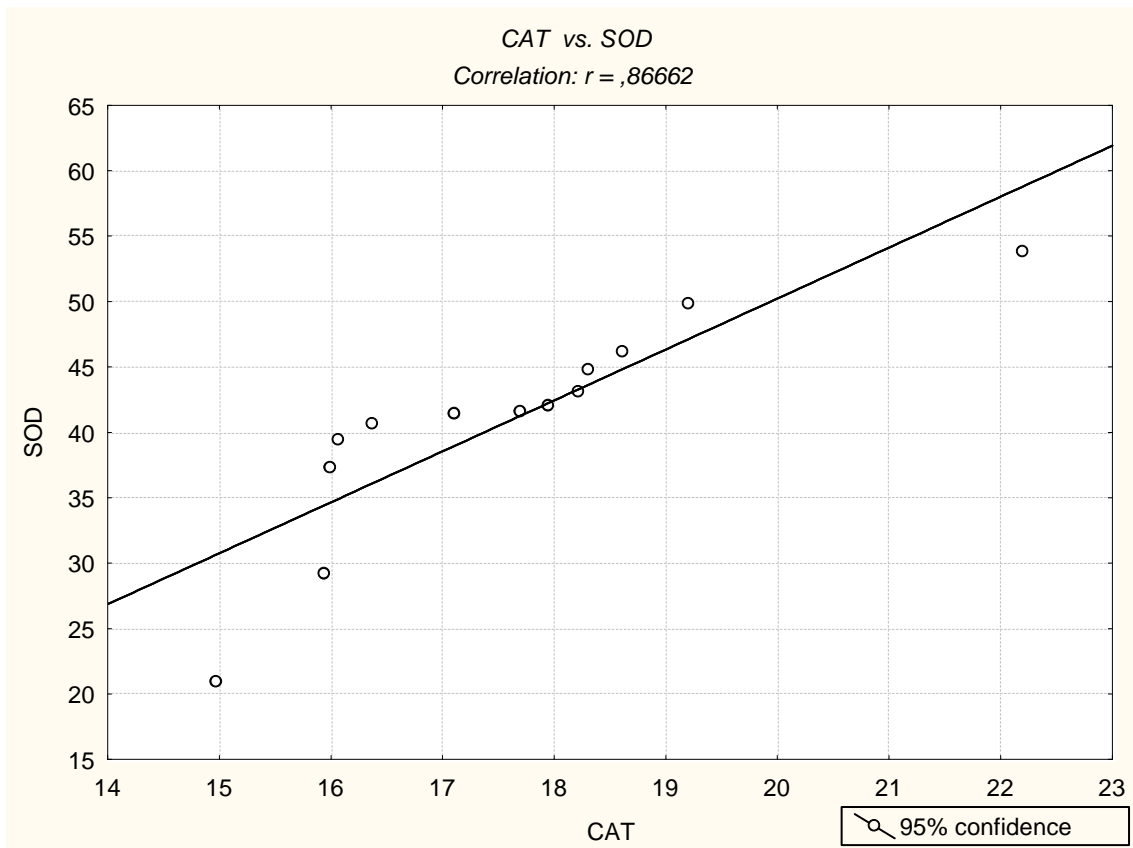


Fig. E



Capítulo 3

Artigo

NTPDase and 5'-Nucleotidase Activities in Platelets of Human Pregnants with a Normal or High Risk for Thrombosis

Claudio A. M. Leal, Maria R. C. Schetinger, Daniela B. R. Leal, Karine
Bauchspiess, Clarissa M. L. Schrekker, Paula A. Maldonado, Vera M. Morsch,
José E. P. da Silva

Publicado na revista Molecular and Cellular Biochemistry

NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis

Claudio A. M. Leal · Maria R. C. Schetinger ·
 Daniela B. R. Leal · Karine Bauchspiess · Clarissa M. L. Schrekker ·
 Paula A. Maldonado · Vera M. Morsch · José E. P. da Silva

Received: 23 February 2007 / Accepted: 16 May 2007 / Published online: 8 June 2007
 © Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract The nucleotide degrading enzymes, ectonucleotidases, present on the platelet surface of human pregnant with a normal (without complications) or high risk for thrombosis (hypertension and gestational diabetes) were studied. NTPDase (E.C. 3.6.1.5, CD39) and 5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) activities of four patient groups, non-pregnant (NP, $n = 18$), pregnant without complications (P, $n = 25$), pregnant with hypertension (HP, $n = 15$) and pregnant with gestational diabetes mellitus (GDP, $n = 10$), were analyzed. Increased NTPDase activities were observed in the groups P (37.0%, S.D. = 2.03 and 34.0%, S.D. = 3.19), HP (40.0%, S.D. = 3.32 and 56.0%, S.D. = 3.25) and GDP (23.0%, S.D. = 2.30 and 42.0%, S.D. = 2.26) in comparison to the control group NP ($p < 0.01$, S.D. = 1.92 and S.D. = 2.48) when ATP and ADP were used as substrate, respectively. AMP was used as substrate to determine the 5'-nucleotidase activities, which showed to be elevated in the groups P (45.0%, S.D. = 1.73), HP (54.0%, S.D. = 2.64) and GDP (68.0%, S.D. = 1.69) when compared to the control group NP ($p < 0.01$, S.D. = 1.26). However, no statistically significant differences were observed between the groups P, HP

and GDP. As a consequence, the enhanced ATP, ADP and AMP hydrolysis was ascribed to the pregnancy itself, independent of a normal or high risk for thrombosis. The enhanced NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets suggest that these enzymes are involved in the thromboregulation process in the pregnancy.

Keywords Ectonucleotidases · NTPDase · 5'-nucleotidase · Pregnancy

Introduction

Pregnancy is a risk factor for thrombosis and venous thromboembolism (VTE), which is one of the main obstetric causes of maternal mortality [1]. Thrombosis is a multicellular process [2]. Erythrocytes, neutrophils, monocytes and platelets are observed as active components in the microenvironment of evolving thrombi [3]. After vascular injury platelets initially adhere to the exposed sub-endothelium collagen via intermediary of the von Willebrand factor [3]. This attachment of the von Willebrand factor to the platelet GPIb/IX/V receptor initiates a sequence of processes, including an increased phospholipase C activity and an increased calcium flux, which causes platelet activation. Finally, degranulation of the activated platelets causes platelet aggregation [4].

VTE occurs in 1 of 1000 deliveries and its occurrence is higher during the third trimester of pregnancy and puerperium [5]. In pregnant, many coagulation factors are increased by around two times in contrast to these of non-pregnant [6]. The modifications of the coagulation system result from hormonal changes that are part of the physiological adaptation to pregnancy, which is necessary for an effective control of placental bleeding [7].

C. A. M. Leal · K. Bauchspiess · C. M. L. Schrekker ·
 J. E. P. da Silva
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de
 Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av.
 Roraima, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

M. R. C. Schetinger (✉) · D. B. R. Leal ·
 P. A. Maldonado · V. M. Morsch
 Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e
 Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima,
 Santa Maria, RS 97105-900, Brazil
 e-mail: mariarosa@sma.ufsm.br; mariaschetinger@gmail.com

Pregnancy related complications, such as gestational hypertension, diabetes and placental abruption, are associated with changes in hemostatic parameters [8]. Haemostasis is a complex, dynamic and self-regulatory system made up of subsystems [9]. The body regulates the formation of haemostatic plugs as a response to vascular injury, preventing intravascular clot formation and vessel occlusion [10]. During this process, the blood vessel wall, leukocytes, platelets and many plasma proteins act to control haemostasis, thrombosis and fibrinolysis [10]. As a consequence, there is a predisposition to thrombus formation in type 2 diabetes and hypertension [11, 12].

Extracellular nucleotides are messengers that modulate the exocrine and endocrine systems, the vasculature and haemostatic mechanisms, musculoskeletal, immune and inflammatory cells [13]. Essentially, “purinergic/pyrimid-nergic signaling” has three components at any inflammatory site: (i) sources of extracellular nucleotides [14]; (ii) specific receptors for these molecular transmitters or derivatives [15]; (iii) ectonucleotidases that modulate the cellular responses by hydrolyzing nucleotides [16].

Platelets play a fundamental role in hemostasis [17]. The enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase have an important function in the coagulation cascade, regulating the platelet aggregation [10, 11]. Activated platelets release ADP, the final common agonist in platelet activation and recruitment, which is metabolized to adenosine monophosphate (AMP) by NTPDase on the endothelial and platelet cell surfaces [18–20]. After this, AMP is metabolized to adenosine by 5'-nucleotidase. Extracellular adenine nucleotides such as ATP and ADP, and the nucleoside adenosine, regulate the vascular response to endothelial injury. In comparison, ADP is the principal promoter of platelet aggregation, whereas adenosine and ATP are inhibitors [21]. Together, NTPDase and 5'-nucleotidase, control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors, and, consequently, the duration and extend of receptor activation [22].

The activities of NTPDase and 5'-nucleotidase in platelets were investigated in several pathologies like diabetes, hypertension, breast cancer, chronic renal failure, and in lymphocytes of HIV infected patients [23–26]. NTPDase activities are enhanced in type 2 diabetic, hypertensive and type 2 diabetic/hypertensive patients with ATP as substrate, together with an increased ADP hydrolysis [23]. The 5'-nucleotidase activity was only enhanced for the hypertensive and type 2 diabetes/hypertensive groups. However, the activity of these enzymes in thromboembolic diseases during pregnancy is unknown [1]. The objective of the present study was to determine the NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. After

that, we attempt to obtain a better understanding of the thromboregulatory role of these enzymes during pregnancy.

Materials and methods

Materials

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

Participants

The blood samples were taken from patients from the Federal University of Santa Maria Hospital (Santa Maria, RS, Brazil). None of these women had a history of haemostatic disorders or other relevant diseases. Eight milliliters of blood were obtained from each participant. These blood samples were used for platelet-rich plasma preparations, and biochemical and hematological determinations. Blood samples of pregnant were taken between the 35th and 40th gestational week. All participants signed a term of declared consent. The Human Ethics Committee of the Health Science Center, Federal University of Santa Maria, approved the project.

The participants were carefully selected by a clinical evaluation. Four participant groups consisted of a total of 68 individuals with an average age of 32 ± 6 years. The control group, NP, consisted of 18 healthy non-pregnant and did not undergo a pharmacological therapy during the last month. The second group, pregnant without complications, P, consisted of 25 pregnant without proteinuria, and their diastolic blood pressure was ≤ 85 mm Hg. The third group, HP, consisted of 15 pregnant with hypertension. They presented elevated blood pressures ($\geq 140/90$ mm Hg) at two or more measurements and proteinuria (≥ 0.3 g/24 h or $\geq 1+$ on the dipstick test). The fourth group, pregnant with gestational diabetes mellitus, GDP, consisted of 10 pregnant that presented an abnormal glucose test (>7.8 mmol/l [>140 mg/dl]) and an abnormal glucose tolerance test [27, 28].

Platelet-rich plasma preparation (PRP)

PRP was prepared by the method of Pilla et al. [19]. Blood was collected into 0.129 M citrate and centrifuged at 160g for 10 min. The PRP was centrifuged at 1400g for 15 min and washed twice with 3.5 mM HEPES isosmolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES

buffer and protein was adjusted to 0.3–0.5 mg/ml, where 10–15 µg of protein was used per tube to ensure linearity in the enzyme assay.

NTPDase (E.C. 3.6.1.5, CD39) and 5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) activities

NTPDase activity was determined by measuring the amount of liberated inorganic phosphate, using a colorimetric assay. This method was chosen because it does not require radioactive substances, and no significant differences were observed when comparing with radioactive assays [23, 29].

Twenty microliters PRP preparation, 10–15 µg protein, were added to either a mixture of reaction for NTPDase or 5'-nucleotidase, and the resulting reaction mixture was preincubated for 10 min. at 37°C, until a final volume of 200 µl was reached. NTPDase activity was determined by the method of Pilla et al. [19] in a reaction medium, containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 6 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, with pH 7.4. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate and its final concentration was 1.0 mM. The 5'-nucleotidase activity for AMP hydrolysis was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂ and a 2 mM AMP was added [19]. The incubation time for both enzymatic assays were one hour. The NTPDase and 5'-nucleotidase reactions were stopped by the addition of 200 µl 10% trichloroacetic acid (TCA), which provided a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was measured by the method of Chan et al. [30], using KH₂PO₄ as standard. Controls were prepared to correct no enzymatic hydrolysis by adding PRP after TCA addition. All determinations were performed in triplicate. Enzyme activities are reported in nmol Pi released/min/mg protein.

Biochemical and hematological parameters

Quantitative determinations of platelets were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami, USA). Prothrombin

time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were determined with a Coag-a-mate-MTX apparatus (Organon Teknica, Durham, NC, USA). The blood glucose measurements used an enzymatic method with hexokinase of the Cobas Integra Systems (Roche Diagnostics).

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard as described by Bradford [31].

LDH measurement

LDH enzyme activities were measured using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer).

Statistical analysis

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

Results

Biochemical and hematological parameters

The groups NP, P and HP presented normal blood glucose levels (70–110 mg/dl), whereas the GDP group presented elevated blood glucose levels (>140 mg/dl). These results are presented in Table 1.

Quantitative analysis demonstrated that platelet counts obtained from all pregnant were at normal levels (150,000–400,000 platelets/mm³). Hematological determinations for prothrombin time showed higher levels in the P, HP and GDP groups in comparison to the control group NP, and the activated partial thromboplastin time were within the

Table 1 Determination of glucose, PT and aPTT levels in the groups NP, P, HP and GDP

Groups	NP	P	HP	GDP
Glucose	79.83 ± 1.64	87.92 ± 1.70	93.93 ± 1.90	163.4 ± 7.91*
PT	11.90 ± 0.34	17.32 ± 0.48*	17.96 ± 0.60*	18.08 ± 0.83*
aPTT	30.84 ± 0.88	31.25 ± 0.71*	31.32 ± 0.64*	30.61 ± 0.88*
n	18	25	15	10

Results are expressed as mean value ± S.E. (n = 68). Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) or Tukey–Kramer test

**p* < 0.01 for P, HP and GDP versus NP and GDP versus NP, P and HP

normal range for the P, HP and GDP groups, as shown in Table 1.

Cellular integrity

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

ATP, ADP and AMP hydrolysis

The results obtained with NTPDase and 5'-nucleotidase are presented in Figs. 1–3. NTPDase activity was enhanced in the P, HP and GDP groups with ATP as substrate

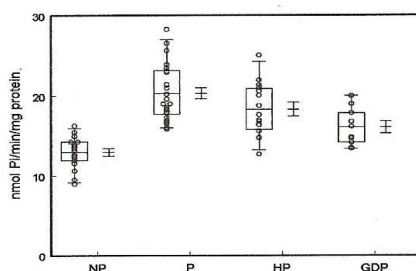


Fig. 1 Box-whisker-plot of NTPDase activity in platelets obtained from non-pregnant (NP), pregnant without complications (P), pregnant with hypertension (HP) and pregnant with gestational diabetes mellitus (GDP), using ATP as substrate. Data represent the mean value \pm standard error of 68 individuals. $p < 0.01$ for P, HP and GDP versus NP

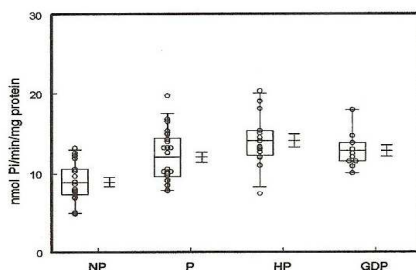


Fig. 2 Box-whisker-plot of NTPDase activity in platelets obtained from non-pregnant (NP), pregnant without complications (P), pregnant with hypertension (HP) and pregnant with gestational diabetes mellitus (GDP), using ADP as substrate. Data represent the mean value \pm standard error of 68 individuals. $p < 0.01$ for P, HP and GDP versus NP

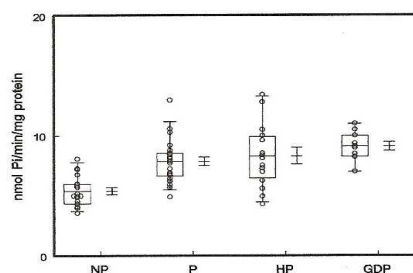


Fig. 3 Box-whisker-plot of 5'-nucleotidase activity in platelets obtained from non-pregnant (NP), pregnant without complications (P), pregnant with hypertension (HP) and pregnant with gestational diabetes mellitus (GDP), using AMP as substrate. Data represent the mean value \pm standard error of 68 individuals. $p < 0.01$ for P, HP and GDP versus NP

($p < 0.01$) when compared to the control group. ADP hydrolysis was also increased in the P, HP, and GDP groups, differing significantly from the control group ($p < 0.01$).

5'-nucleotidase activity was also altered in the P, HP, GDP groups with AMP as substrate ($p < 0.01$), differing significantly from the control group.

No significant differences for the NTPDase and 5'-nucleotidase activities were observed between the groups of pregnancy (P, HP and GDP).

Discussion

This study gives important information about the changes in NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets of pregnant between the 35th and 40th gestational week during pregnancy without complications and with a high risk for thrombosis. Similar increases in platelet NTPDase activity in the groups of pregnant without complications (37% and 34%), pregnant with hypertension (41% and 56%) and pregnant with gestational diabetes mellitus (23% and 42%) were observed with ATP and ADP as substrate, respectively. The 5'-nucleotidase activity was also elevated in the groups of pregnant without complications (45%), pregnant with hypertension (54%) and pregnant with gestational diabetes mellitus (68%). These results confirm for the first time that these enzymes are involved in the thromboregulatory system of pregnant.

Related work [23] showed an enhanced NTPDase activity in humans with type 2 diabetes (34%), hypertension (32%) and type 2 diabetes/hypertension (30%), using ATP as substrate. An increased ADP hydrolysis was observed for humans with type 2 diabetes (72%), hypertension

(70%) and type 2 diabetes/hypertension (55%). The 5'-nucleotidase activity was also altered for the hypertensive (60%) and type 2 diabetes/hypertensive (53%) groups.

Surprisingly, no accumulative effect was observed in our study for the groups of pregnant with hypertension and pregnant with gestational diabetes mellitus. The groups of pregnant without complications and the two groups of pregnant with complications showed no statistical differences. These results suggest that the final enzyme activities of platelets in pregnant, was reported previously [35, 36]. Hyperprolactinemia causes an increased platelet aggregation via ADP stimulation. Hence, this finding indicates that prolactin could be a physiological cofactor for the coagulation balance during pregnancy and puerperium, which could explain the increased risk for venous thromboembolism in pregnant around delivery.

Previously, other scientists [32, 33] reported that purified, unstimulated platelets lack or have minimal NTPDase functional activity and indicated that microparticles circulating in the plasma express NTPDase biochemical activity. It was suggested that released NTPDase, present on microparticles, could be a key modulatory factor in thrombosis. However, an important point that needs to be clarified is the presence of NTPDase in platelet membranes of pregnant. The platelets are abundant and mobile cells with an important contribution, even when presenting minimal activity compared to other sources, such as endothelial cells or microparticles. The results reported herein unquestionably confirm the presence of NTPDase in the platelet membranes.

Haemostatic changes during pregnancy are responsible for increased prothrombin complex factors (II, VII, X) [34]. These factors cause a procoagulant activity with more formation of fibrin. Prothrombin time (PT), is an estimate for the extrinsic pathway of coagulation, principally factor VII. An increased PT was observed in our groups of pregnant with a normal or high risk for thrombosis. This supposes that the increased NTPDase and 5'-nucleotidase activities occurred to keep up the haemostatic balance under these conditions, since these enzymes could be involved in the anticoagulant process.

In conclusion, pregnant with a normal and high risk for thrombosis have enhanced NTPDase and 5'-nucleotidase activities on their platelet surface. This response could avoid the formation of local microthrombus and regulates the vascular tonus, since ATP is a potent vasoconstrictor. Furthermore, the enhanced hydrolysis of AMP to adenosine by 5'-nucleotidase limits the procoagulant action of ADP. These enzymes could be important in the delivery or

puerperium of pregnant in order to prevent a possible thrombotic event.

References

- Knijff SCM (ed) (2000) Summary of contraindication to oral contraceptives. Parthenon Publishing Group, New York
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al (2001) Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 178–182
- Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB et al (1982) Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 109: 130–137
- Lockwood CJ (2006) Pregnancy-associated changes in the hemostatic system. *Clin Obstet Gynecol* 49(4):836–843
- Toglia M, John G (1996) Venous thromboembolism during pregnancy. *N Engl J Med* 335:108–114
- Bellart J, Gilabert R, Fontcuberta L (1998) Coagulation and fibrinolytic parameters in normal pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth retardation. *Am J Perinatol* 15:81–85
- O'Riordan MN, Higgins JR (2003) Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 17:385–396
- Eichinger S (2004) D-Dimer testing in pregnancy. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33:327–329
- Norris LA (2003) Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 17(3):369–383
- Zimmermann H (1999) Nucleotides and CD39: principal modulatory players in hemostasis and thrombus. *Nature Med* 5:987–988
- Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H (2000) Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96:2157–2162
- Carr ME (2001) Diabetes Mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Its Complicat* 15:44–54
- Burnstock G, Knight G (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:301–304
- Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoreceptors-Are there families of P2X and P2Y purinoreceptors. *Pharmacol Ther* 64(3):445–475
- Palmer TM, Stiles GL (1995) Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 34:683–694
- Plesner L (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 158:141–214
- Sobol AB, Watala C (2000) The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract* 50:1–16
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al (2001) Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases. *Ital Heart J* 2:824–830
- Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS et al (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7:225–230
- Frassetto SS, Schetinger MRC, Schierholt R et al (2000) Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res* 33:1369–1377
- Soslau G, McKenzie RJ, Brodsky I et al (1995) Extracellular ATP inhibits agonist-induced mobilization of internal calcium in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1268:73–80

22. Chen W, Guidotti G (2001) Soluble apyrase release ADP during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 282:90–95
23. Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F et al (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2183:1–6
24. Silva AC, Morsch ALB, Zanin RF et al (2005) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: relationship between hemostatic defects and renal failure severity. *Biochim Biophys Acta* 1741:282–288
25. Araújo MC, Morsch A, Zanin R et al (2005) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1740:421–426
26. Leal DBR, Streher CA, Neu TN et al (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5.) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1721:9–15
27. Yang HX, Gao XL, Dong Y et al (2005) Analysis of oral glucose tolerance test in pregnant women with abnormal glucose metabolism. *CM J* 118:995–999
28. Yang HX, Zhou SM (1993) Clinical Analysis of perinatal outcomes in gestational diabetes mellitus. *Clin J Obstet Gynecol* 28:139–142
29. Koziak K, Sévigny J, Robson SC et al (1999) Analysis of CD39/ATP Diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1538:1538–1544
30. Chan K, Delfert K, Jungner KD (1986) A direct colorimetric assay for the Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
31. Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
32. Falati S, Liu Q, Gross P et al (2003) Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 197(11):1585–1598
33. Atkinson B, Dwyer K, Enyoji K et al (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36:217–222
34. Bremme KA (2003) Haemostatic changes in pregnancy. *Best Practice Res Clin Haematol* 16(2):153–168
35. Wallaschofski H, Donné M, Eigenthaler M et al (2001) Prolactin as a novel potent cofactor for platelet aggregation. *J Clin Endocrinol Metab* 86(12):5912–5919
36. Wallaschofski H, Kobsar A, Sokolova O et al (2004) Co-activation of platelets by prolactin or leptin-pathophysiological findings and clinical implications. *Horm Metab Res* 36(1):1–6

4.0 Discussão

Há muito tempo que o papel dos nucleotídeos ATP, ADP, UTP, UDP está sendo relacionado à sinalização intercelular em diversos tecidos do corpo humano. Entre as principais funções pode-se dizer que os mesmos estão envolvidos na neurotransmissão, na contratilidade muscular, na função cardíaca, nas funções hepáticas e gastrointestinais, na distribuição de fluxo sanguíneo, nas respostas imunes, no controle do tráfego de leucócitos entre o sangue e os tecidos, na agregação e na ativação das plaquetas no sítio da injúria celular e, também, na regulação das respostas celulares dos epitélios, entre outras (Yegutkin, 2008).

Entre as enzimas que são responsáveis pelo controle destes nucleotídeos pode-se citar as NTPDases, as NPPs, 5'-nucleotidases e adenosina desaminase, as quais desempenham um importante papel na trombo-regulação nas respostas imunes e inflamatórias (Zimmermann et al., 2007). Dentro desse contexto estas enzimas têm sido extensivamente pesquisadas em várias patologias e condições clínicas além de modelos experimentais dos mais diversos tipos (Lunkes et al., 2003; Leal et al., 2005; Araújo et al., 2005; Maldonado et al., 2008; Silva et al., 2005). Desta maneira, neste trabalho procurou-se verificar a atividade de algumas destas enzimas e, também, a agregação plaquetária em gestantes normais e de alto risco para problemas trombolíticos. Além disso, verificaram-se também alguns parâmetros de estresse oxidativo em gestantes normais.

Dentro deste contexto, foi escolhido como grupo teste as gestantes devido ao fato de que a gravidez, desde a etapa de implantação até o momento

do parto, apresenta profundas mudanças no sistema hemostático destas mulheres. Durante a gravidez, podem ocorrer potenciais sangramentos no momento da implantação e da invasão trofoblástica endovascular das artérias espiraladas maternas. O risco de hemorragia atinge o pico durante o terceiro estágio da gravidez quando a placenta não apresenta a decídua basal e expõem uma grande quantidade de artérias espirais desnudas de sua musculatura lisa. Estas mudanças fazem com que o organismo materno experimente alterações profundas no seu sistema de coagulação (Lockwood, 2006).

Por exemplo, sabe-se que a gravidez é acompanhada por um aumento de 2 a 3 vezes nas concentrações de fibrinogênio e 20 até 1000% nos fatores de coagulação VII, VIII, IX, X e XII todos os quais com seu pico máximo ao termo (Bremme, 2003). Os níveis do fator de von Willebrand chegam a aumentar 400%. Por outro lado, os níveis de pró-trombina e fator V permanecem inalterados enquanto os níveis dos fatores XIII e XI declinam modestamente. Na verdade, há evidências de geração crônica de baixos níveis de trombina e fibrina evidenciados pelo aumento dos níveis de fragmento 1-2 da pro-trombina, complexos trombina-antitrombina e polímeros de fibrina solúvel (Ku et al., 2003).

Outro fator importante diz respeito à aderência plaquetária. As plaquetas aderem avidamente ao endotélio danificado ou aos componentes subendoteliais expostos via ligantes derivados das paredes dos vasos e que se ligarão aos receptores de membrana plaquetários específicos. Por exemplo, o colágeno exposto liga-se ao receptor plaquetário GPIa, enquanto o fator de von Willebrand liga-se ao receptor plaquetário GPIb (Eyre & Gamlin, 2010).

Desta maneira, todas estas mudanças hemostáticas podem estar repercutindo na atividade das enzimas estudadas nos grupos de gestantes, pois assim como ocorre na gestação normal, as gestantes com hipertensão diabetes gestacional e ruptura placentária são associadas com mudanças nos parâmetros hemostáticos (O'Riordan & Higgins, 2003). Assim, neste trabalho ocorreram aumentos similares na atividade da NTPDase de plaquetas nos grupos de gestantes sem complicações (37% e 34%), gestantes com hipertensão (41% e 56%) e gestantes com diabetes mellitus gestacional (23% and 42%) com ATP e ADP como substrato, respectivamente. A atividade da enzima 5'- nucleotidase também foi elevada nos grupos de gestantes sem complicações (45%), gestantes com hipertensão (54%) e gestantes com diabetes mellitus gestacional (68%). Estes resultados mostram pela primeira vez que estas enzimas estão envolvidas no sistema tromborregulatório das gestantes.

Esses resultados sugerem que as atividades finais das enzimas de gestantes podem ser devidas ao próprio estado gestacional. Além disso, não há dúvida de que os nucleotídeos de adenina desempenham papéis importantes na hemostasia destas mulheres, pois o ADP é o maior promotor de agregação plaquetária enquanto a adenosina, ao contrário, é um dos maiores inibidores desta função e, também, um modulador do tônus vascular (Rozalski et al., 2005). Portanto, a ação conjunta das enzimas NTPDase e 5'- nucleotidase são fundamentais para a circulação sanguínea dessas mulheres pois a degradação extracelular de ATP, ADP, AMP e a conseqüente geração do nucleosídeo adenosina (Robson et al, 2006) podem estar minimizando de

alguma maneira algum efeito deletério provocado pelas alterações pró-coagulantes deste período gestacional.

Por outro lado, as atividades das ectonucleotidases encontram-se elevadas em pacientes com diabetes e patologias associadas. Estudos têm mostrado que pacientes com hiperglicemia crônica frequentemente tem hipercoagulabilidade sanguínea, como evidenciado pelo aumento dos fatores de coagulação plasmáticos, redução da tromboresistência endotelial e hiperreatividade plaquetária (Sobol & Watala, 2000). Neste trabalho, pode-se evidenciar o estado de hipercoagulação pelo tempo de protrombina (TP), o qual se encontrou aumentado em todas as gestantes com complicações. Desta forma poderíamos supor, que as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase plaquetárias estariam funcionando como uma espécie de anticoagulantes desempenhando funções semelhantes a antitrombina III e a trombomodulina das células endoteliais.

Permanecendo na mesma linha de raciocínio, ou seja, a influência destas enzimas na hemostasia destas gestantes, este trabalho encontrou a atividade da adenosina desaminase elevada em todos os grupos estudados. Sabe-se que o nucleosídeo adenosina aumenta rapidamente em situações onde o organismo requer impedimento de dano tecidual como, por exemplo, a isquemia cerebral, e que a subsequente estimulação dos receptores de adenosina induz uma grande variedade de efeitos com o objetivo principal de proteger o tecido estressado (Linden, 2005).

Sabe-se que as principais fontes de adenosina são intracelulares. Uma outra alternativa e fonte menos importante é a hidrólise intracelular de S-adenosilhomocisteína. A degradação de adenosina é principalmente confinada

ao citosol, onde ela é irreversivelmente desaminada pela adenosina desaminase ou refosforilada pela adenosina cinase (Deussen, 2000). Então, pode-se justificar em parte o aumento da atividade da enzima adenosina deaminase no soro das gestantes normais, com pré-eclampsia, com diabetes gestacional e contaminada pelo vírus HIV, visto que a atividade da enzima 5`-nucleotidase encontrou-se elevada nestes grupos.

Outra explicação plausível para o aumento da atividade da adenosina desaminase poderia ser encontrado no fato de que sob certas circunstâncias de aumento exagerado do estresse metabólico o aumento dos níveis de adenosina verificado pela continua degradação de nucleotídeos nestas situações facilmente causaria saturação da enzima adenosina cinase e, conseqüentemente, o excesso de adenosina estaria sendo metabolizado até inosina e hipoxantina pela adenosina desaminase (Olson & Pearson, 1990).

Além disso, a formação intracelular de adenosina aumenta concomitantemente com o aumento do trabalho celular e o aumento está relacionado a índices como o consumo de oxigênio e liberação de transmissores excitatórios (Fredholm, 2007).

Com relação ao consumo de oxigênio, é interessante lembrar que as gestantes estão no terceiro trimestre gestacional, no qual, há uma grande demanda metabólica no organismo materno, sendo assim existe uma proporcional quantidade de eritrócitos plaquetas e leucócitos, entre outras células no sistema circulatório destas pacientes o que pode estar colaborando para a liberação de adenosina que auxiliaria no aumento do fluxo sanguíneo na interface utero-placenta e, isto, seria mais um fator para explicar a atividade aumentada da enzima adenosina desaminase.

Por sua vez se pode presumir que este aumento da atividade da enzima adenosina desaminase e a conseqüente hidrólise do nucleosídeo antiagregante adenosina estaria favorecendo, de certo modo, o aumento da agregação plaquetária observado no grupo de gestantes.

Além disso, não se pode deixar de considerar a influência que os hormônios femininos exercem sobre a agregação plaquetária. Entre esses hormônios está a prolactina que é um dos hormônios proeminentes e que aumentam durante a gravidez e lactação. Existem trabalhos que relatam que a hiperprolactinemia é um potente co-estimulador da agregação plaquetária e que poderia ser uma das causas do estado de hipercoagulabilidade observado na gravidez e puerperio (Wallaschofski et al., 2001). Assim, a prolactina poderia ser um cofator fisiológico para o balanço da coagulação durante a gravidez e puerpério, o qual poderia explicar o risco aumentado para tromboembolismo venoso em grávidas ao redor do parto (Leal et al., 2005).

Outro fator que poderia estar causando disfunções de maneira significativa no endotélio dessas gestantes e a lipotoxicidade, o qual pode estar alterando a função e o metabolismo placentário. Esta alteração é, particularmente, importante em grávidas com complicações, como diabetes gestacional, pré-eclampsia e contaminadas pelo vírus HIV. No fígado, por exemplo, a oxidação anormal ou excessiva de ácidos graxos leva a produção de espécies reativas de oxigênio, distúrbios no metabolismo dos ácidos graxos e na composição de fosfolipídios da membrana celular além de alterações no conteúdo de colesterol (Jarvie et al., 2010).

Além disso, o estresse oxidativo pode surgir do acúmulo intracelular de triacilgliceróis tendo impacto na eficiência mitocondrial, resultando em acúmulo

de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, os quais reagiriam com o oxigênio para formar radicais superóxido. A combinação de altos níveis de lipídios e estresse oxidativo leva à produção de alguns tipos de lipídios oxidados: peróxidos lipídicos, lipoproteínas oxidadas e derivados oxidados do colesterol (oxiesteróis) (Vejud & Lizard, 2009). Isto poderia explicar em parte o aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) verificado nas gestantes normais neste trabalho. Nesse contexto, provavelmente, a própria suplementação com ferro por essas gestantes pode estar colaborando para o aumento da enzima superóxido dismutase, visto que a mesma possui três isoformas MnSOD, CuZnSOD e FeSOD (Guemori et al., 1991).

Esses radicais superóxidos podem atacar os fosfolipídios das membranas biológicas e reagirem com os ácidos graxos poliinsaturados formando peróxidos lipídicos que resultam em injúria celular. Essas espécies de reativas de oxigênio têm sido propostas como promotoras da peroxidação lipídica e disfunção endotelial que é comumente associada com as desordens da gravidez (Hung et al., 2002). Entre esses produtos, o malondialdeído é freqüentemente utilizado como um marcador indireto de peroxidação lipídica sendo detectado pela medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Grissa et al., 2007). Neste trabalho foi encontrada uma elevação significativa do TBARS nas gestantes normais.

Alguns trabalhos relatam que as enzimas do sistema antioxidante presentes no tecido placentário podem parcialmente proteger o sangue materno da quantidade excessiva de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e, se essa proteção ficar comprometida durante a gravidez, condições pro-trombóticas

podem ocasionar problemas trombolíticos que podem ser exacerbados principalmente após o parto (Toglia & Nolan, 1997).

5.0 Conclusões

Esse trabalho possui extrema relevância, visto que foi o primeiro a verificar a atividade de ectonucleotidases em plaquetas de gestantes normais e com complicações na gravidez. Dessa maneira foi possível confirmar que essas enzimas participam da regulação hemostática durante o período gestacional. Apesar da existência de outros fatores importantes no sistema de regulação plaquetária e no processo de coagulação que não foram avaliados nesses pacientes, torna-se evidente com esses resultados obtidos que essas enzimas auxiliam no reparo do tônus vascular e disfunções endoteliais inerentes a este período.

Além disso, a participação da enzima adenosina deaminase juntamente com o processo de agregação plaquetária estão em consonância com os demais resultados encontrados e vem comprovar que, também, exercem importantes funções trombaregulatórias, a fim de auxiliar na prevenção de futuros problemas vasculares nessas pacientes.

Adicionalmente, foi detectada a produção de espécies reativas de oxigênio durante o período gestacional que participam dessa situação de injúria celular. Apesar disso, foi possível observar que o organismo materno consegue responder de maneira eficaz por meio de suas defesas antioxidantes endógenas com o intuito de manter o equilíbrio homeostático desejável.

6.0 Referências

American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, Suppl. 1, S62–S69.

Araújo, M.C.; Rocha, J.B.T.; Morsch, A.; Zanin, R.; Bauchspiess, R.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.S. (2005). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740:421-426.

Atkinson, B.; Dwyer, K.; Enjyoji, K.; Robson, S.C. (2006). Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 36:217-222.

Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* 29:113-123.

Baylis, S.A.; Strijbos, P.J.L.M.; Sandra, A.; Russell, R.J.; Rijhsinghani, A.; Charles, I.G.; Weiner, C.P. (1999). Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol. Hum. Reprod.* 5:277–286.

Becker, B.F.; Heindl, B.; Kupatt, C.; Zahler, S. (2000). Endothelial function and hemostasis. *Clin. Res. Cardiol.* 89:160-167.

Bhatt, D.L. (2008). Platelets in cardiovascular disease, 1st edn. London: Imperial College Press.

Birk, A.V.; Broekman, M.J.; Gladek, E.M. Robertson, H.D.; Drosopoulos, J.H.; Marcus, A.J.; Szeto, H.H. (2002). Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J. Lab. Clin. Med.* 140:166–175.

Bombeli T, Spahn DR. (2004). Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *Br. J. Anaesth.* 93: 275-287.

Borowiec, A.; Lechward, K.; Tkacz-Stachowska, K.; Skladanowski, A.C. (2006). Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim. Pol.* 53:269–278.

Bremme, K.A. (2003). Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 16:153–168.

Bricker, L.; Farquharson, R.G. (2002). Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Hum. Reprod.* 17:1345-1350.

Brown, M.A.; Hague, W.M.; Higgins, J.; Lowe, S.; McCowan, L.; Oats, J.; Peek, M.J.; Rowan, J.A.; Walters, B.N. (2000). The detection, investigation and

management of hypertension in pregnancy: executive summary. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 40:133–138.

Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24:509-581.

Burnstock, G. (2006). Purinergic signaling. *British Journal of Pharmacology.* 147:S172-S181.

Burnstock, G.; Knight, G. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240:31-304.

Burton, G.J.; Jauniaux, E. (2004). Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11:342-352.

Bussâmara, N. (2006). *Obstetricia Básica*. Ed. Sarvier, 3ª edição, pg. 36-37.

Butte, N. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1256S-1261S.

Cauwenberghs, S., Feijge, M.A.H., Hageman, G., Hoylaerts, M., Akkerman, J-W.N., Curvers, J., Heemskerk, J.W.M. (2006). Plasma ectonucleotidases prevent desensitization of purinergic receptors in stored platelets: importance for platelet activity during thrombus formation. *Transfusion* 46:1018-1028.

Cohen, M.S.; Hellmann, N.; Levy, J.A.; DeCock, K.; Lange, J. (2008). The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *J. Clin. Invest.* 118:1244-54.

Colgan, P.S.; Eltzschig, K.H.; Eckle, T.; Thompson, L.F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* 2:351–360.

Connor, E.M.; Sperling, S.R.; Gelber, R.; Kiselev, P.; Scoot, G.; O'Sullivan, M.J. (1994). Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. For the Pediatric AIDS Trials Group Protocol 076 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 331:1173-1180.

Correa, A.; Gilboa SM, Besser LM, Botto, L.D.; Moore, C.A.; Hobbs, C.A.; Cleves, M.A.; Riehle-Colarusso, T.J.; Waller, K.D.; Reece, E.A.; National Birth Defects Prevention Study. (2008) Diabetes mellitus and birth defects. *AM. J. Obstet. Gynecol.* 199: 237.e1–237.e9.

Corrigan, N., Brazil, D.P.; McAuliffe, F. (2009). Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy. *Birth Defects Res. A. Clin. Mo.l Teratol.* 85, 523–530.

Craft, S.M.; Delaney, R.O.; Bautista, D.T.; Serovich, J.M. (2007). Pregnancy decisions among women with HIV. *AIDS Behav.* 11:927-35.

Curry, A.; Pierce, J.M. (2007). Conventional and near-patient tests of coagulation. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care. Pain.* 7:45-50.

Deussen, A. (2000). Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 351–363.

Devlieger, R.; Casteels, K.; Van Assche, F.A. (2008). Reduced adaptation of the pancreatic B cells during pregnancy is the major causal factor for gestational diabetes: current knowledge and metabolic effects on the offspring. *Acta Obstet. Gynecol.* 87:1266–1270.

Devrim, E.; Tarhan, I.; Erguder, I.B.; Durak, I. (2006). Oxidant/antioxidant status of placenta, blood, and cord blood samples from pregnant women supplemented with iron. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13:502–505.

Duley, L. (2003). Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *Br. Med. Bull* 67:161–176.

Eyre, L.; Gamlin, F. (2010). Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 11:244-246.

Fredholm, B.B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death and Differentiation* 14:1315–1323.

Gakis, C. (1996). Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA 2: diagnostic and biological role. *Eur. Respir. J.* 9:632-633.

Galanti, S.; Nardiello, M.; Russo, F.; Fiorentino, M. (1981). Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever. *Scand. J. Infect Dis.* 13:47-50.

Gijsbers, R.; Ceulemans, H.; Stalmans, W.; Bollen, M. (2001). Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 276:1361–1368.

Goding, J.W.; Grobber, B.; Slegers, H. (2003). Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase family. *Biochem. Biophys. Acta* 1638:1–19.

Grinthal, A.; Guidotti, G. (2006). CD39, NTPDase1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signalling* 2:391-398.

Grissa, O.; Ategbo J-M.; Yessoufou, A.; Tabka, Z.; Miled, A.; Jerbi, M.; Dramane, K.L.; Moutariou, K.; Prost, J.; Hichami, A.; Khan, N.A. (2007). Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia *Translational Research* 150:164-171.

Guemouri, L.; Artur, Y.; Herbeth, B. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin. Chem.* 37:1932–1397.

Gutteridge, J.M. (1996). Iron and free radicals. In: Hallberg L, Asp N-G (eds). *Iron Nutrition in Health and Disease*. London: John Libbey & Co, 239–246.

Hadden, D.R.; McLaughlin, C. (2009). Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Seminars in fetal & Neonatal Medicine* 14: 66-71.

Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet* 355:1179-1180.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biol. Med.* 18:125–126.

Hauth, J.C.; Ewell, M.G.; Levine, R.L.; Esterlitz, J.R.; Sibai, B.M.; Curet, L.B. (2000). Pregnancy outcomes in healthy nulliparous women who subsequently developed hypertension. *Obstet. Gynecol.* 95: 24-28.

Heine, P.; Braun, N.; Zimmermann, H. (1999). Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP difosfohidrolase after heterologous expression in cho cells. *Eur. J. Biochem.* 262:102-107.

Hellgren, M. (2003). Haemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin. Thromb. Hemost.* 29:125-130.

Hitoglou, S.; Hatzistilianou, M.; Gougoustamou, D.; Athanassiadou, F.; Kotsis, A.; Catriu, D. (2001). Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 20: 411-416.

Hoebertz, A.; Arnett, T.R.; Burnstock, G. (2003). Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines *Trends Pharmacol. Sci.* 24:290–297.

Hubel, C.A. (1999). Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:222-235.

Hung, T.H.; Skepper, J.N.; Charnock-Jones, D.S. (2002). Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ. Res.* 90:1274-1281.

Jarvie, E.; Hauguel-de-Mouzon, S.; Nelson, S.M.; Sattar, N.; Catalano, P.M.; Freeman, D.J. (2010). Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clinical Science* 119: 123–129.

Kaufmann, D.E., Lichtenfeld, M.; Altfeld, M.; Addo, M.M.; Johnston, M.N.; Lee, P.Q.; Wagner, B.S.; Kalife, E.T.; Strick, D.; Rosenberg, E.S.; Walker, B.D. (2004). Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS Med.* 1:e36.

Kawashima, Y.; Nagasawa, T.; Ninomiya, H. (2000). Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96:2157-2162.

Ku, D.H.; Arkel, Y.S.; Paidas, M.P.; (2003). Circulating levels of inflammatory cytokines (IL-1 beta and TNF-alpha), resistance to activated protein C, thrombin and fibrin generation in uncomplicated pregnancies. *Thromb. Haemost.* 90:1074– 1079.

Kuhl, C. (1998). Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 21:B19–26.

Kupferminc, M.J. (2003). Thrombophilia and pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:111–166.

Lachili, B.; Hininger, I.; Faure, H.; Arnaud, J.; Richard, M.J.; Favier, A.; Roussel, A.M.; (2001). Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biol. Trace Elem. Res.* 83:103–110.

Larder, B. 2001. Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *AIDS.* 15(Suppl. 5):S27–S34.

Laude, I.; Rongières-Bertrand, C.; Boyer-Neumann, C. (2001). Circulating procoagulant microparticles in women with unexplained pregnancy loss: a new insight. *Thromb. Haemost.* 85:18-21.

Leal, C.A.M.; Schetinger, M.R.C.; Leal, D.B.R.; Bauchspiess, K.; Schrekker, C.M.L.; Maldonado, P.A.; Morsch, V.M.; Silva, J.E.P. (2007). NTPDase and 5'-Nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. *Mol. Cell Biochem.* 304:325-330.

Leal, D.B.R.; Streher, C.A.; Neu, T.N.; Bittencourt, F.P.; Leal, C.A.; da Silva, J.E.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R. (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5.) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1721:9-15.

Linden, J., (2005). Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol. Pharmacol.* 67:1385–1387.

Little, R.E.; Gladen, B.C. (1999). Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 13:347-352.

Lockwood, C.J. (2006). Pregnancy-associated changes in the hemostatic system. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 49: 836–843.

Lunkes, G.I.; Lunkes, D.; Stefanello, F.; Morsch, A.; Morsch, V.M.; Mazzanti, C.M.; Schetinger, M.R. (2003). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 109:189-194.

Maldonado, P.A.; Corrêa, M.C.; Becker, L.V.; Flores, C.; Moretto, M.B.; Morsch, V.; Schetinger, M.R.C. (2008). Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia *Clinical Biochemistry* 41:400–406.

Martinez-Hernandez, D.; Arenas-Barbero, J.; Navarro-Gallar, F.; Garcia-Esteban, R.; Santos-Sancho, J.M.; Gomez-de-Terreros, F.J. (1988). Adenosine deaminase in acquired immunodeficiency syndrome [letter]. *Clin. Chem.* 34: 1949.

Mayer, B.; Hemmens, B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biol. Sci.* 22:477–481.

Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43:109–142.

Montenegro jr. R.M.; Paccola, G.M.G.F.; Foss, M.C.; Torquato, M.T.C.G.; Yano, R.K.; Mauad filho F.; Nogueira, A.A.; Berezowski, A.T. & Duarte, G. (2000). Protocolo de detecção, diagnóstico e tratamento do Diabetes mellitus na gravidez. *Medicina, Ribeirão Preto*, 33:520-527.

Moon, J.; Han, C.; Kang, S.; Park, M.; Hwang, S.; Byun, M.; Chung, W.; Hwang, H.; Kim, Y.; Kim, S.; Chang, J.; Kim, S. (2005) The relationship between age and pleural fluid adenosine deaminase activity in pleural tuberculosis. *Tuberc. Respir. Dis.* 58:459-464.

Myatt, L.; Cui, X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* 122:369–382.

O’Riordan, M.N.; Higgins, J.R. (2003). Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Practice & Clinical Obstetrics & Gynaecology* 17:385-396.

Olsson, R.A.; Pearson, J.D. (1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.* 70:761-845.

Palella, F.J. Jr.; Delaney, K.M.; Moorman, A.C.; Loveless, M.O.; Fuhrer, J.; Satten, J.A.; Aschman, D.J.; Holmberg, S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 338:853–860.

Pietta, P. Pier-J. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Nat. Prod.* 63:1035-1042.

Pinsky, D.J.; Broekman, M.J.; Peschon, J.J.; Stocking, K.L.; Fujita, T.; Amasamy, R. (2002). Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 109:1031–1040.

Pridjian, G.; Benjamin, TD. (2010). Update on Gestational Diabetes. *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.* 37:255–267.

Robson, S.C.; Sevigny, J.; Zimmermann, H. (2006). The E-TPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2:409-430.

Rozalski, M.; Nocun, M.; Watala, C. (2005). Adenosine diphosphate receptors on blood platelets — potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim. Pol.* 52:411-415.

Rudge, M.V.; Calderon, I.M.; Ramos, M.D.; Abbade, J.F. & Rugolo, I.M. (2000). Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes a retrospective 10 years analysis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 50:108-112.

Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M.; Bonan, C.D.; Wyse, A.T.S. (2007). NTPDase and 5-Nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health *Biofactors* 30:1-22.

Sevigny, J.; Sundberg, C.; Braun, N.; Guckelberger, O.; Csizmadia, E.; Qawi, I. (2002). Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99:2801–2809.

Sheppard, B.L.; Bonnar, J. (1999). Uteroplacental hemostasis in intrauterine fetal growth retardation. *Semin. Thromb. Hemost.* 25:443-446.

Sibai, B.M. (2003). Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 102:181–192.

Sibai, B.M. (2004). Diagnosis, controversies, and management of HELLP syndrome. *Obstet. Gynecol.* 103:981–991.

Silva AC, Morsch ALB, Zanin RF, Corrêa, M.C.; Arantes, L.C.; Araujo, M.C.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R. (2005) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity. *Biochim. Biophys. Acta* 1741:282-288.

Sobol, A.B.; Watala, C. (2000). The role of platelets in diabetes related vascular complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 50:1–16.

Solages, A.; Vita, J.A.; Thornton, D.J.; Murray, J.; Heeren, T.; Craven, D.E.; Horsburgh, Jr. C.R. (2006) Endothelial function in HIV-infected persons. *Clin. Infect. Dis.* 42:1325–1332.

Soslau, G.; Youngprapakorn, D. (1997). A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1355:131–140.

Spychala, J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine, *Pharmacol. Ther.* 87:161–173.

Stefan, C.; Jansen, S.; Bollen, M. (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity, *Trends Biochem. Sci.* 30:542–550.

Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group. (2006). CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N. Engl. J. Med.* 355:2283–2296.

Toglia, M.R.; Nolan, T.E. (1997). Venous thromboembolism during pregnancy: A current review of diagnosis and management. *Obstet. Gynecol. Surv.* 52:60-72.

Tsakiris, D.A.; Tschopl, M.; Jager, K.; Haefeli, W.E.; Wolf, F.; Marbet, G.A. (1999). Circulating cell adhesion molecules and endothelial markers before and after transluminal angioplasty in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 142:193–200.

Van Hinsbergh, V. (2001). The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 95:198-201.

Van Horn, J.T.; Craven, C.; Ward, K.; Branch, D.W.; Silver, R.M. (2004). Histologic features of placentas and abortion specimens from women with antiphospholipid and antiphospholipid-like syndromes. *Placenta* 25:642-648.

Vejux, A.; Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative

and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Aspects Med.* 30:153–170.

Vincent, T.; Rai, R.; Regan, L.; Cohen, H. (1998). Increased thrombin generation in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 352:116.

Wallaschofski, H.; Donné, M.; Eigenthaler, M.; Hentschel, B.; Faber, R.; Stepan, H.; Kokschi, M.; Lohmann, T. (2001). PRL as a novel potent cofactor for platelet aggregation. *The Journal of Endocrinology & Metabolism* 86:5912-5919.

Waugh, J.J.S.; Clark, T.J.; Divakaran, T.G.; Khan, K.S.; Kilby, M.D. (2004). Accuracy of urinalysis dipstick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 103:769–777.

Wolf, K.; Tsakiris, D.A.; Weber, R.; Erb, P.; Battegay, M. (2002). Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 185:456–462.

Yegutkin, G.G. (2008). Nucleotide – and nucleoside converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic armácia cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:673–694.

Zhang, J.; Meikle, S.; Trumble, A. (2003). Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens. Pregnancy* 22:203–212.

Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 52:44-56.

Zimmermann, H.; Mishra, S.; Shukla, V.; Langer, D.; Gampe, k.; Grimm, I.; Delic, J.; Braun, N. (2007). Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *Anales de La Real Academia Nacional de armácia* 73:537-566.

Anexos

Anexo I

**Carta de aprovação do comitê de ética da Universidade Federal
de Santa Maria para realização de estudos envolvendo
gestantes do Hospital Universitário de Santa Maria**



Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa

CARTA DE APROVAÇÃO

Título do Projeto de Pesquisa: "Avaliação da atividade das enzimas NTPDase 1 e Ecto5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normais e de alto-risco".

Número do Processo: 23081.000982/2006-86.

CAAE: 0001.0.246.000-06.

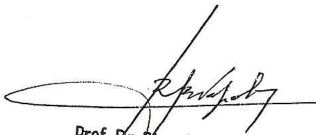
Pesquisador Responsável:

Nome: José Edson Paz da Silva.

Telefone: 3220-8464.

E-mail: camleal@terra.com.br

Projeto Aprovado: 04/04/06.



Prof. Dr. Ricardo Bins Di Napoli
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - UFSM

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



PERMISSÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – TÍTULO

Avaliação da atividade, cinética e expressão das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase e marcadores de estresse oxidativo na gravidez

2 – OBJETIVOS

2.1 Determinar a atividade, cinética e expressão das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de gestantes normais e de alto risco

2.2 Determinar marcadores de estresse oxidativo em gestantes normais e de alto risco

3 – REGISTRO

O estudo será desenvolvido no Departamento de Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria. Este projeto está registrado e possui a anuência do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

4 – PROCEDIMENTOS

Os pacientes serão submetidos a punção venosa. O material biológico obtido será destinado às dosagens bioquímicas.

5 – RISCOS DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

6 – ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue que restarem nos testes bioquímicos serão descartadas, obedecendo às normas de biossegurança.

7 – PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação dos pacientes nesse estudo é livre e voluntária. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo e não comprometerá o cuidado médico do paciente.

8 – CONFIDENCIALIDADE

A identidade do participante permanecerá em sigilo. Os registros do prontuário e os demais dados obtidos dos indivíduos em estudo também serão confidenciais e serão armazenados em lugar apropriado e seguro no Departamento de Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria.

Local para contato: Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, prédio 18, laboratório nº 2208, UFSM, CEP 97105-900, telefone 55-3220-8665; responsável: prof.Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger (orientador); doutorando: Cláudio A. M. Leal (55-9926-0372).

9 – IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____

RG: _____

.....
Pesquisador responsável

Anexo III

Questionário utilizado na captação das gestantes

QUESTIONÁRIO



Nome:.....Data:.....

1. Qual a sua idade?
2. Qual o seu peso e altura?
3. É a sua primeira gravidez?
 Sim.
 Não. Em sua primeira gravidez ocorreu algum problema gestacional?
Quantos filhos a senhora possui?
4. Em que semana gestacional se encontra a sua gravidez?
5. Qual a sua pressão arterial? (sistólica = alta e diastólica = baixa).
Confirmar com algum documento se a paciente tiver!
6. A senhora está em uso de algum medicamento no momento?
 Sim. Qual o(s) medicamento(s)?
 Não. A senhora tomou algum medicamento no último mês?
7. Como se encontra a sua glicemia sanguínea (glicose)?
8. A senhora realizou algum exame laboratorial até o momento?
 Sim. Quais exames? Copiar os resultados!
 Não.

OBS: Copiar todos os resultados de exames e informações que a paciente tiver a disposição!

.....
Pesquisador responsável