

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANNE BRANDOLT LARRÉ
FOSFODIESTERASE ISOFORMA TIPO 5 NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂPSIA

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA**

ANNE BRANDOLT LARRÉ

**FOSFODIESTERASE ISOFORMA TIPO 5
NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA**

PORTO ALEGRE

2019

ANNE BRANDOLT LARRÉ

**FOSFODIESTERASE ISOFORMA TIPO 5
NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPZIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do Título de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Coorientação: Prof^a. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa

Porto Alegre
2019

Ficha Catalográfica

L334f Larré, Anne Brandolt

Fosfodiesterase Isoforma tipo 5 na Síndrome de Pré-Eclâmpsia /
Anne Brandolt Larré . – 2019.

96 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e
Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa.

1. Síndrome de Pré-Eclâmpsia. 2. Fosfodiesterases. 3. Hipertensão.
4. Proteinúria. 5. Vasoconstrição. I. Poli de Figueiredo, Carlos
Eduardo. II. da Costa, Bartira Ercília Pinheiro. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

ANNE BRANDOLT LARRÉ

**FOSFODIESTERASE ISOFORMA TIPO 5
NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do Título de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Aprovada em: 25 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Liane Nanci Rotta-UFCSPA

Prof^ª. Dra. Daniele Cristóvão Escouto-PUCRS

Prof^ª. Dra Denise Cantarelli Machado- PUCRS

Dra. Marta Ribeiro Hentschke- PUCRS

Prof. Dr. Giovani Gadonski- PUCRS (suplente)

Porto Alegre

2019

Dedico esta tese aos meus amados Pais Eduardo & Helaine. Ao meu querido irmão Antônio Hyran, ao meu parceiro de caminhada & amor- José Inácio Von Ameln Ferreira e Silva. Ao meu grande Mestre, colega e amigo de longa data e, para sempre Incentivador Científico – Prof. Dr. Geraldo Atílio De Carli (in memoriam). Para minha estimada e amável Avó Lilly Jardim Gomes (in memoriam), para minha Madrinha e Educadora admirável- Maria José Faraco Rodrigues (in memoriam), para meu amado, estimado e inesquecível Tio Avô José Bicca Larré (in memoriam), para minha amada amiga e colega de faculdade Veruska Golin (in memoriam) e para todas bravas & abençoadas guerreiras, as mulheres (as quais sem elas, não teríamos tido a dádiva da vida).

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu Deus, gratidão.

Agradeço imensamente ao meu Orientador Professor Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo por ter me acolhido no grupo de Pesquisa da Nefrologia, propiciando meu Doutorado. Agradeço uma pessoa que foi essencial na realização deste trabalho, minha Coorientadora Professora Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa, obrigada pela coragem em transpor os obstáculos que surgiram ao longo do caminho, ao meu lado. Pelos conselhos, ensinamentos, parceria, carinho, amizade, dedicação (que tens conosco, seus filhos científicos). És uma verdadeira Mestra! E isso é um dom, ofertado para poucos, sabia? Continue assim: firme, forte e um grande exemplo de inspiração para todos nós. *Merci beaucoup!*

Agradeço aqueles que estiveram sempre torcendo por mim: *Meus Amados Pais, Eduardo & Helaine*, por terem me dado a vida e me ensinarem a fazer o bem, a ter respeito, disciplina e boa educação para com todos, sem distinções. Obrigada Pai e Mãe, pelo incentivo, confiança, apoio e pelos conselhos, além do carinho e do amor sempre recebido. Essa conquista é nossa! Ao meu irmão, *Antônio Hyran* pelo amor e carinho, por me dar o prazer de saber como é bom ter um anjo perto de mim! Minha amada “Florzinha” & enteada: *Bruna Bonatto Ferreira e Silva*- outra grande bênção recebida, ao longo deste período- para lembrar como é especial cultivar a criança dentro de nós! *Ao meu amor & parceiro de vida, José Inácio Von Ameln Ferreira e Silva*, meu muitíssimo obrigado pela compreensão, amor e paciência. Por me dar força nos momentos mais difíceis, segurar minhas mãos, além do apoio incondicional, pela torcida e vibração para que tudo desse certo, ao longo do caminho. *Aos meus queridos Sogros: Renata & Antônio Inácio Ferreira e Silva*, agradeço pelo amor, carinho e preocupação nesses quatro anos, demonstrando imenso apreço por mim e sendo importantes suportes, no decorrer desta trajetória. *Aos meus queridos cunhados: Caroline & Pedro Inácio e seus amores: Vanderlei e Liandra*, por me acompanharem e me incentivarem também. Certamente consolidamos nossa amizade, mediante muito respeito e admiração mútua. Neste interím, nos conhecemos melhor e crescemos juntos espiritualmente e profissionalmente, tenho certeza. Os quais me abençoaram com a chegada de mais dois anjos (Miguel & Isabella- pequenos e amados sobrinhos), juntamente com meu *afilhado amado, Arthur Azevedo* e os manos: *Ana Júlia & Breno Barrios* (sobrinhos da “ala jovem”).

Débora Montenegro Pasin, minha grande e estimada amiga (melhor presente do Pós), agora Doutora também, *thank you, my sweetheart!* Para ti todo meu carinho, aplauso, respeito, admiração e agradecimento. Sem teus conselhos, companhia e força (até os 45 minutos do segundo tempo), certamente o caminho teria sido mais difícil. Tornaste nossos desafios diários mais leves, divertidos e foste meu *Porto Seguro* em muitas ocasiões. Além disso, ganhei uma “*Madrinha de Vida e do Amor*”, amiga-irmã, conselheira e uma familiar de brinde (Sandro & Stella Sophia) - de gente do bem e de coração nobre! Enfim, vencemos *Debbie* e Deus olhou por nós e seguirá nos abençoando sempre. Amém!

Meu agradecimento mais sincero e afetuoso as *queridas amigas de fé e vida*: as quais eu tive a honra de ser presenteada por Deus, durante esta trajetória de forma agradabilíssima foram essenciais em instantes pontuais, mesmo que algumas não estivessem próximas fisicamente: Juliete Rode, Fernanda Pires Borges, Alessandra Gonçalves, Âneliz Iarto, Ariele Ravalha Dias, Daniella Riesgo, Laura Petersen, Letice Dalla Lana, Mirian Rozsanyi De Carli & Cristina De Carli, Roberta Katzap, Simone Denise Salamoni, Zaquer Costa Ferro, Júlia Gabriela Motta e suas filhas, Sara & Maria Clara (minha afilhada amada).

Muito obrigada a todos que passaram pelo *Laboratório de Nefrologia da Escola de Medicina*- sem vocês eu não teria conseguido transpor os obstáculos que surgiram no percurso, afinal, não fazemos nada sozinhos. Principalmente, aos *bolsistas de iniciação científica (ICs) da ESMED*: Aline Parisotto, Bruna Rockenbach, Isadora Mosmann, Jéssica Enderle, Rayssa Ruszkowski, as irmãs Nathália & Letícia Paludo, Alessandra Côrte Real Lança, Camila Novack, Ana Luiza Siqueira, Luisa de Vasconcelos, Angélica Cardoso, Eduardo Vieira de Souza, Alan Marinho. As demais iniciantes científicas (*ICs*): Bruna Caloni e Thaís dos Santos. Inclusive, as (*ICs Júnior*): Pietra Machado, Danielle Kayser pelas incansáveis idas e vindas ao centro obstétrico- CO do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL), auxiliando nas coletas e pelo apoio incondicional e moral em nossa rotina diária laboratorial. *Aos doutorandos*: Carlos Gabriel Moreira de Almeida, Fernando Sontag, Daniela Moraes, Joice Nedel Ott, Mirian Baron, Diego Silveira Siqueira, Luísa Pretto, além dos *Doutores*: Dra. Daniele Cristóvão Escouto, Dra. Rejane Grecco, Dra. Pâmela Nunes de Azevedo, Dra. Rafaela Caron e aos *Pós-Doutorandos*: colegas de jornada acadêmica: Dra. Marta Hentschke, Dra. Angela Zanatta, Dra. Gabriele Zanirati, Dra. Gabriela Carra Forte & o Prof. Dr. Daniel Marinovic (Professor Adjunto da ESMED), pelas maravilhosas trocas de experiências interdisciplinares, apoio, confraternizações e amizade que me foram muito positivas e acalentaram minha alma. Agradeço também a *todos os Professores da Escola de Medicina*, pois fizeram parte do meu crescimento e processo de aprendizagem. Meu muito obrigado

principalmente aos professores e doutores, Dr. Alexandre Vontobel Padoin, Dra. Denise Cantarelli Machado, Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, Dra. Magda Lahorgue Nunes, Dr. Domingos Otávio Lorenzoni Dávila, Dr. Ivan Carlos Ferreira Antonello, Dr. André Palmi, Dra. Livia Haygert Pithan. Ao pessoal da secretaria da ESMED, em especial, Rodrigo Lemos e Bruna Remédios- sempre incansáveis e receptivos para atender aos alunos da melhor maneira. Às Equipes Médicas e de Enfermagem do Centro Obstétrico do HSL, por terem oportunizado a possibilidade de realização das coletas e inclusive, por terem me agraciado com amizades únicas, as quais levarei ao longo da vida.

Meus agradecimentos também a todas gestantes que participaram do estudo e que me ensinaram a viver de forma mais digna, corajosa e simples! Namastê!

Agradeço imensamente a PUCRS, minha instituição de formação e coração. Ao CNPq, pelo auxílio financeiro durante esses quatro anos de Doutorado.

À banca examinadora, por aceitar o convite.

*O sucesso não é o final e o fracasso não é fatal.
É a coragem para continuar que conta.*

Winston Churchill

RESUMO

Introdução: A fosfodiesterase é um nucleotídeo cíclico responsável pela hidrólise de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico e/ou monofosfato cíclico de guanosina, que apresenta grande importância clínica. A atividade da fosfodiesterase está elevada no soro de pacientes com Síndrome de Pré-Eclâmpsia (SPE). Essa síndrome multissistêmica e complexa permanece com etiologia desconhecida, seus mecanismos estão relacionados com disfunção endotelial e abrange uma parcela considerável de gestantes no mundo. **Objetivos:** Em gestantes com ou sem SPE: a) comparar a concentração da proteína PDE5 no sangue materno; b) comparar a atividade enzimática da PDE5 na placenta; c) comparar a expressão de mRNA da PDE5 na placenta. **Metodologia:** Estudo de caso-controle incluindo 151 pacientes (100 controles (GC) e 51 com SPE). A concentração de PDE5 no plasma materno foi avaliada com um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, a atividade enzimática na placenta foi realizada utilizando um ensaio colorimétrico e a expressão placentária por qRT-PCR. **Resultados:** A concentração de PDE5 no plasma materno não foi significativamente diferente entre os grupos (GC: $0,11 \pm 0,04$ ng / mL; PE: $0,11 \pm 0,01$ ng / mL, $p = 0,307$, Teste *t* de Student). No entanto, a expressão de PDE5 no tecido placentário foi 1,125 vezes maior no grupo com SPE ($p > 0,001$), sendo 0,1 o valor mínimo e 5,454,9 o máximo. A atividade enzimática da PDE foi semelhante entre os dois grupos (NC: $0,41 \pm 0,28$; PE: $0,42 \pm 0,26$ nmol; $p = 0,955$; teste de Mann Whitney). **Conclusão:** Os níveis de PDE5 encontrados aumentados na placenta podem representar um evento fisiopatológico ou fenômeno adaptativo. Considerando-se os níveis normais da enzima no plasma das pacientes com SPE e a expressão elevada nas placentas das mesmas- sugere-se que a placenta tenha um papel central na fisiologia da SPE. As alterações associadas à PDE5 na SPE sugerem que esta enzima tenha um papel relevante nos processos fisiopatológicos associados à vasoconstrição apresentada por estas mulheres.

Palavras-chave: Fosfodiesterases. Vasoconstrição. Hipertensão. Proteinúria. Placenta.

ABSTRACT

Introduction: Phosphodiesterase is a cyclic nucleotide responsible for the hydrolysis of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and / or cyclic guanosine monophosphate, which is important for clinical aspects. Phosphodiesterase activity is elevated in the serum of patients with Pre-Eclampsia Syndrome (SPE). This complex multisystemic syndrome remains with unknown etiology, its mechanisms are related to endothelial dysfunction and it covers a considerable fraction of pregnant women in the world. **Objectives:** In pregnant women with or without SPE: a) to compare the concentration of PDE5 protein in maternal plasma; b) to compare PDE5 enzymatic activity in the placenta; c) to compare placenta PDE5 mRNA expression. **Methodology:** Case-control study including 151 pregnant (100 controls and 51 with SPE). The concentration of PDE5 in maternal plasma was evaluated with an Enzyme Immunoabsorption Assay, enzymatic activity in the placenta was performed using a colorimetric assay and placental expression by qRT-PCR. **Results:** The concentration of PDE5 in maternal plasma was not different between groups (GC: 0.11 ± 0.04 ng / mL, SPE: 0.11 ± 0.01 ng / mL, $p = 0.307$, t Student). However, the expression of PDE5 in placental tissue was 1,125 times higher in SPE group ($p > 0.001$), with 0.1 being the minimum value and 5,454.9 being the maximum. The enzymatic activity of PDE was similar between groups (GC: 0.41 ± 0.28 , SPE: 0.42 ± 0.26 nmol, $p = 0.955$, Mann Whitney test). **Conclusion:** Increased levels of PDE5 found in placenta may represent a pathophysiological event or adaptive phenomenon. Considering the normal levels of the enzyme in SPE plasma and high expression in placentas of the same group - it is suggested that the placenta plays a central role in SPE physiology. The alterations associated with PDE5 in SPE suggest that this enzyme has a relevant role in the pathophysiological processes associated with the vasoconstriction presented by these women.

Keywords: Phosphodiesterases. Vasoconstriction. Hypertension. Proteinuria. Placenta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia da Placenta Normal.	21
Figura 2- Fotografia das Placentas de Pré-Eclâmpticas.	22
Quadro 1 - Classificação da Doença Hipertensiva Gestacional	23
Figura 3 - Esquema ilustrativo da Patogênese da Pré-Eclâmpsia.....	26
Figura 4 - Artérias espiraladas: a) Paciente não grávida; b) alterações desencadeadas pela invasão do trofoblasto na pré-eclâmpsia; c) alterações desencadeadas pela invasão do trofoblasto na gestação normal.	27
Figura 5 - Via L-arginina-NO-GMPc no sistema vascular demonstrando a vasodilatação induzida pelo GMPc (pontilhado em azul).	29
Figura 6 - Diagrama da Fosfodiesterase e Via L-arginina-NO-GMPc.....	30
Figura 7 - Visão geral das isoformas das enzimas PDE suas funções e localizações.	33
Figura 8 - Fluxograma referente à coleta dos materiais das gestantes.	43
Figura 9 - Ilustração da coleta do tecido placentário.....	44
Figura 10 - Microplaca para verificação de atividade enzimática da PDE. No poço A e B da coluna 1 estão as amostras de branco, seguidas das concentrações em ordem crescente até os poços G e H da coluna 2. Demais poços com amostras de pacientes conforme espelho de planejamento.....	47
Figura 11 - Microplaca de PDE5A - KIT PDE5A ELISA. No poço A e B da coluna 1 estão as amostras de branco, seguidas das concentrações em ordem crescente até os poços G e H da coluna 2. Demais poços com amostras de pacientes conforme espelho de planejamento.	48
Quadro 2 - Sequência de PRIMERS.....	49
Figura 12 - Tubos dos Primers complementares utilizados na sequência do mRNA.....	50
Figura 13 - Thermo Fisher Scientific-NanoDrop™ NanoDROP Lite.....	51
Figura 14 - StepOnePlus™ Real-Time PCR System	52
Figura 15 - Atividade Enzimática da Fosfodiesterase em placentas.	57
Figura 16 - Concentração da Fosfodiesterase-5 no plasma materno por método ELISA.	57
Figura 17 - Expressão relativa do mRNA da PDE5 em pacientes com SPE.....	58
Figura 18 – Representação gráfica da expressão relativa de mRNA de gravidez normotensa e Pré-Eclâmpsia (Fase de Amplificação)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos dados clínicos e demográficos maternos.	55
Tabela 2 - Dados clínicos do recém-nascido de gestantes normotensas e com SPE.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIG-** Adequada para Idade Gestacional (classificação do Recém-nascido)
- Avidina-HRP-** Avidina Peroxidase de Rábano Silvestre
- cAMP-** Adenosina 3',5'-monofosfato Cíclico
- cDNA-** DNA complementar
- cGMP-** Monofosfato Cíclico de Guanosina
- CNPq-** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CO-** Centro Obstétrico
- DHG-** Doença Hipertensiva Gestacional
- dH₂O-** Água Deionizada
- DP-** Desvio padrão
- EDTA-** Ácido Etilenodiaminotetracético
- ELISA-** Ensaio Imunoadsorvente ligado à enzima
- eNOS-** Óxido Nítrico Sintetase endotelial
- EQU-** Exame Qualitativo de Urina
- ET-1-** Endotelina
- GAPDH-** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GN-** Grupo Normotenso
- GIG-** Grande para Idade Gestacional
- GPE-** Grupo Pré-Eclâmpsias
- HC-** Hipertensão Crônica
- HELLP-** sigla em inglês da Hemólise, Elevação Enzimas Hepáticas e Plaquetopenia
- HG-** Hipertensão Gestacional
- HSL-** Hospital São Lucas;
- IG-** Idade Gestacional
- IHC-** Imunohistoquímica
- mRNA-** RNA mensageiro
- NO-** Óxido Nítrico
- NOS-** Óxido Nítrico Sintetase
- OMS-** Organização Mundial da Saúde
- PAS-** Pressão Arterial Sistólica
- PAD-** Pressão Arterial Diastólica

P/C- Razão Proteinúria/Creteinúria

PDE- Fosfodiesterase ou suas isoformas 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11

PDE5- Isoforma 5 que possui três subtipos (A1, A2, A3)

PE- Pré-eclâmpsia

PES- PE sobreposta

PIGF- Fator de crescimento placentário

PIG- Pequeno para Idade Gestacional (classificação do Recém-nascido)

PUCRS- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PPGMCS- Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

qRT-PCR- Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

RNA- Ácido ribonucleico

RNA Later- solução de estabilização imediata de RNA

RN- Recém-nascido

sEng- Endoglina solúvel

sFlt-1- Tirosina solúvel em fms quinase 1

SPE- Síndrome de PE

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMB-Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina

UK- Sigla em inglês do *Reino Unido*

USA- Sigla em inglês dos *Estados Unidos*

V_{máx}- Velocidade Máxima inicial

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

Via L-arginina-NO-GMPc ou Via L-arginina-Óxido Nítrico-cGMP- Monofosfato Cíclico de Guanosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
1.2.1 Placentação: membranas envolvidas, estrutura e função.....	21
1.2.2 Hipertensão Arterial Sistêmica.....	22
1.2.3 Doença Hipertensiva Gestacional.....	22
1.2.4 Pré-eclâmpsia.....	24
1.2.5 PE: Tratamento e abordagens atuais.....	26
1.2.6 Disfunção Endotelial na Pré-Eclâmpsia.....	26
1.2.7 Fisiopatologia da Pré-Eclâmpsia.....	27
1.2.8 Via L-arginina-NO-GMPc na Pré-Eclâmpsia.....	29
1.2.9 Fosfodiesterases.....	31
1.2.10 Fosfodiesterases e PE.....	33
1.2.11 Fosfodiesterase-5.....	34
1.2.12 Fosfodiesterases e seus Inibidores.....	35
3 HIPÓTESES.....	37
3.1 Nula.....	37
3.2 Alternativa.....	37
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 OBJETIVO GERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 DELINEAMENTO.....	40
5.2 DEFINIÇÕES.....	40
5.3 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	41
5.3.1 Procedimento Amostral.....	41
5.3.2 Critério de Seleção.....	41
5.4 COLETAS DE DADOS.....	42
5.4.1 Coleta de amostras em pacientes.....	42
5.4.2 Parâmetros analisados.....	44
5.5 MÉTODOS DE EXAME.....	44
5.5.1 Técnicas de Mensuração e Ensaio.....	44

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5.6.1 Cálculo do Tamanho Amostral.....	52
5.6.2. Análise dos dados	52
5.7 APOIO FINANCEIRO.....	53
6. RESULTADOS	55
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÃO.....	68
8.1 Perspectivas	69
9. REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	83
APÊNDICE B - Protocolo de Coleta Padronizado.....	85
APÊNDICE C - ORÇAMENTO DO CONSELHO DE PESQUISA CIENTÍFICA	88
APÊNDICE D - ARTIGO 1 PARA SUBMISSÃO.....	89
APÊNDICE E - ARTIGOS PUBLICADOS (2, 3, 4 e 5).....	90
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Conselho de Ética em Pesquisa.....	95

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A presente pesquisa abrange um dos estudos realizados pelo Grupo de Nefrologia do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), juntamente com o apoio do Serviço de Obstetrícia; integra os dados da Tese de Doutorado da bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), edital 2015/1.

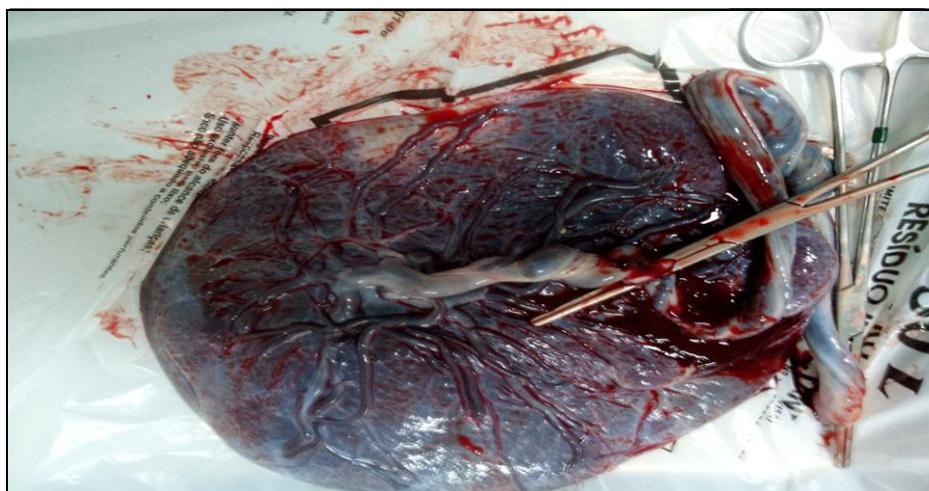
A estruturação do trabalho segue as orientações do Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (PPGMCS) da PUCRS com Introdução, Desenvolvimento, Discussão, Perspectivas, Conclusão e Considerações Finais. No encerramento foram incluídos publicações realizadas em parceria com o grupo de Nefrologia da PUCRS (Medical Hypothesis 2017- com fator de impacto de 1.120 e na Current Hypertension Reports 2018- com fator de impacto de 3.234), além do artigo final que será submetido à American Journal of Obstetrics and Gynecology (fator de impacto de 5.732). O trabalho conta também com mais dois artigos: um na Revista Cuidado em Enfermagem do Centro Universitário do Inedi, Janeiro/2016 e outro no Journal Diabetes & Metabolism/2016- fator de impacto 3.744, totalizando 5 publicações ao final do Doutorado- realizadas, publicadas e submetidas ao longo do período, em parceria com colegas do Pós-Graduação, em disciplinas específicas, as quais estimularam esta prática. No que se refere ao modelo da Tese, seguimos as orientações estabelecidas pela Biblioteca Central Irmão José Otão da PUCRS-2018 (disponível no site da instituição).

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Placentação: membranas envolvidas, estrutura e função

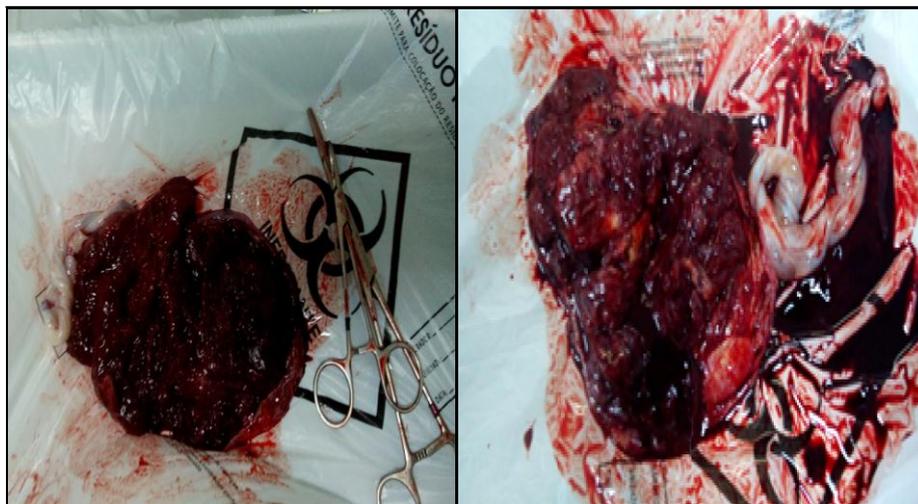
Um dos órgãos mais importantes já estudado na pré-eclâmpsia é a placenta. Essa tem o papel de atuar como importante mediadora da comunicação essencial entre mãe e feto. (DE MOORE KL et al, 2004; HILL, 2007; MONTENEGRO et al, 2018). Responsável também pela transmissão de anticorpos maternos, detoxificação de substâncias, realização das trocas gasosas, de eletrólitos e de nutrientes, consegue sanar as necessidades impostas pelo feto durante o aumento dos fatores nutricionais responsáveis pelas significativas mudanças que acontecem. A placenta humana é do tipo hemocorial e possui dois componentes especiais- a porção fetal (derivada do cório frondoso ou cório viloso) e uma porção materna, a qual se deriva da decídua basal. Já os chamados espaços intervilosos são preenchidos com sangue, e esta zona entre as placas coriônicas e decidual contém aproximadamente 150 mL de sangue materno, renovados de 3-4 vezes por minuto (DE PAOLI, 2015). A Figura 1 mostra a face fetal de uma placenta de gestante saudável e a Figura 2, a face materna de placentas com pré-eclâmpsia contendo regiões com hemorragia e calcificações.

Figura 1 - Fotografia da Placenta Normal.



Legenda: Face fetal da placenta. Fonte: A Autora (2018)

Figura 2- Fotografia das Placentas de Pré-Eclâmpticas.



Nota: Em ambas as fotos há placentas tipicamente formadas em condições adversas, muito comuns na Pré-Eclâmpsia (Fonte: A Autora 2018).

1.2.2 Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial é uma manifestação clínica, advinda de múltiplos fatores e caracterizada por aumento nos níveis de pressões arteriais ≥ 140 mmHg (pressão arterial sistólica - PAS) e/ou ≥ 90 mmHg (pressão arterial diastólica-PAD) (MALACHIAS et al, 2016). As gestantes acabam convivendo com esta manifestação em muitas ocasiões, e observa-se que a elevação da pressão arterial pode acometer a saúde materna e fetal.

1.2.3 Doença Hipertensiva Gestacional

A Doença Hipertensiva Gestacional (DHG) é a patologia que mais se apresenta durante a gravidez, sendo que sua ocorrência pode alcançar 7,5% das gestantes, as quais apresentam-se predominantemente em 2,3% com Pré-Eclâmpsia (PE) e 0,5% de Pré-Eclâmpsia Sobreposta (PES) no Brasil (GAIO et al, 2001), provocando algumas manifestações e complicações hipertensivas, que afetam de 5-10% de gestações e aumentam consideravelmente, as taxas de morbimortalidades maternas (CUNNINGHAM et al, 2001; HNAT et al, 2002; ACOG, 2013). Sua classificação apresenta-se da seguinte forma: Hipertensão na Gestação (HG) definida pela pressão arterial $\geq 140 \times 90$ mmHg; PE quando é diagnosticada após a 20ª semana gestacional associada à proteinúria ($\geq 0,3$ g de proteína na urina de 24 horas ou ≥ 2 cruces em

amostra de EQU - exame qualitativo de urina - com normalização de ambas até 12 semanas após o parto); Hipertensão Crônica (HC) identificada antes da gestação ou anteriormente a 20ª semana gestacional; PES quando a mulher possui níveis pressóricos previamente elevados e desenvolve proteinúria após a 20ª semana de gestação (Quadro 1) (NHBPEPWG, 2000).

Quadro 1 - Classificação da Doença Hipertensiva Gestacional

Classificação	Hipertensão		Proteinúria
	IG<20	IG>20	IG>20
Hipertensão Gestacional	-	+	-
Hipertensão Crônica	+	+	-
Pré-eclâmpsia	-	+	+
Pré-eclâmpsia sobreposta	+	+	+

Legenda: IG (Idade Gestacional) (Fonte: Adaptado de NHBPEPWG, 2000)

A DHG pode ser assintomática e os sintomas depende do seu diagnóstico o qual se restringe ao exame físico e dados laboratoriais. A eclâmpsia é quando há progressão da doença com sintomatologia específica: paciente apresenta convulsões, pressão arterial sistólica acima de 140 mmHg e presença de proteinúria patológica associada. Em casos mais graves pode ocorrer a Síndrome HELLP (NHBPEPWG, 2000; RATH et al, 2000; MARTIN, 2013; TRANQUILLI et al, 2014; LOWE et al, 2014; MALACHIAS et al, 2017.; MONTENEGRO E REZENDE, 2012; ACOG, 2013). A denominação HELLP, deve-se ao acrônimo dos três critérios estabelecidos para sua presença: H= hemólise, EL: elevação das enzimas hepáticas, LP: contagem baixa de plaquetas. Apresenta frequência que varia de 0,5 a 0,9% durante as gestações e expressa-se geralmente, entre a 27ª e a 37ª semana de gravidez e após o parto, quando temos ocorrência de 30% dos casos (SIBAI et al, 1993; BARTON E SIBAI, 2005; WEINSTEIN, 2005). Foi descrita primeiramente em 1982, por Louis Weinstein que relatou a descoberta e observação de 29 casos de PE, nos quais foi constatada trombocitopenia, hemólise intravascular evidenciada nos achados de esfregaços sanguíneos e alterações nos testes de função hepática.

1.2.4 Pré-eclâmpsia

É um distúrbio acompanhado de um aumento de morbimortalidade materna e perinatal, dependente da gravidade da patologia. Pode ser fatal, sendo o principal tratamento a retirada da placenta culminando no término da gestação. Quando há viabilidade fetal é importante tentar postergar a interrupção da gestação, e nesta situação medicamentos estabilizadores, como os anti-hipertensivos, são empregados (BYRNE, 2015; MOL BWJ et al, 2016). Há também mecanismos fisiopatológicos que podem provocar alteração metabólica, estresse oxidativo e interferência de fatores de risco, como: obesidade, tabagismo, idade avançada, doença renal, diabetes, entre outros (REDMAN E SARGENT, 2005; FACCA, 2012).

Dividi-se em dois estágios propostos por Redman: o primeiro corresponde à placentação insuficiente, acarretando aumento na resistência da circulação uteroplacentária; o segundo envolve a reação materna por ativação da resposta inflamatória e da disfunção endotelial (ROBERTS E HUBEL, 2009; REDMAN et al, 2014; REIS et al, 2010; BYRNE, 2015).

Outras teorias foram e continuam sendo propostas na tentativa de entender sua etiologia e manifestações clínicas. Algumas pesquisas mencionam a liberação de fatores na circulação materna e a existência de aspectos imunogenéticos- como respostas adaptativas associados ao sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano) e formação do Óxido Nítrico (NO), ambos considerados potenciais estopins fisiopatológicos da PE. (DAVIES, 1985; ROBERTS et al, 1989; REDMAN et al, 1999; ROBERTS E COOPER, 2001; LEVINE et al, 2004; WAREING et al, 2004; PINHEIRO DA COSTA et al, 2006; FOUNDS et al, 2009; REDMAN E SARGENT, 2010; POWE et al, 2011; MERT et al, 2012; SALLES et al, 2012; CHAIWORAPONGSA et al, 2014).

Em 2014, Redman propôs a existência de *seis estágios* para o distúrbio em questão, após anos de estudos e hipotetizações ligadas a distintas teorias. No entanto, com o avanço das pesquisas observamos mudanças em relação ao assunto e tudo leva a crer que no primeiro estágio ainda temos a isquemia placentária. Na segunda fase teríamos o período da manifestação clínica da doença, no terceiro existe uma placentação defeituosa, nos demais estágios (do 4º ao 6º) acontecem na segunda metade da gravidez. Em cada novo estágio temos o surgimento de determinados episódios, por

exemplo: no 1º temos uma fase assintomática e pré-clínica, no decorrer da 8ª e 18ª semanas de gestação ocorre à remodelação das artérias espiraladas. Porém, já sabemos que há envolvimento de muitos outros fatores responsáveis pelo estopim da PE, os quais acarretam uma ativação leucocitária e endotelial, a qual atinge de forma multissistêmica, distintos órgãos e sistemas maternos.

Assim, torna-se relevante entendermos os demais estágios:

- a) 2º *estágio* - trata da expressão da doença clinicamente nomeada de nova hipertensão e nova proteinúria, afetando após implantação, tanto a saúde quanto o desenvolvimento do embrião;
- b) logo após a 8ª semana, ocorre a abertura da placenta - fato que pode ser considerado prematuro e pode vir a tornar existente uma má-placentação, constituindo o *estágio 3*;
- c) os demais estágios que correspondem ao 4º, 5º e 6º, no estágio 4º existem fatores derivados do excesso e do déficit do sangue materno na placenta, os quais se apresentam previamente aos sinais clínicos;
- d) o início do 5º estágio - ocorre quando há diagnóstico de PE;
- e) no 6º estágio - menos da metade das pré-eclâmpticas são afetadas, nele há maior diminuição da perfusão uteroplacentária predispondo à trombose da artéria espiralada e criando um ambiente responsável pelo evento de isquemia placentária (REDMAN, 2014).

O entendimento da PE tomou maiores dimensões, considerando que essa é uma síndrome que atinge distintos órgãos e sistemas do corpo da gestante, sendo complexa e de etiologia ainda desconhecida, abrange uma parcela considerável de gestantes em todo mundo. Acredita-se ser um distúrbio em que vários fatores influenciam sua natureza, apresentando em comum, o surgimento ou progressão da hipertensão arterial e excreção urinária de proteínas após a 20ª semana gestacional (NICE, 2010; SOGC, 2014; BYRNE, 2015; LOWE et al, 2014). Já os dados epidemiológicos nos dizem que um número considerável de gestações (0,2-5%) é complicado pela hipertensão prévia e a PE. Na Austrália especificamente, quando presente durante a segunda metade da gravidez, acomete cerca de 22% das mulheres com hipertensão crônica (LOWE et al, 2014).

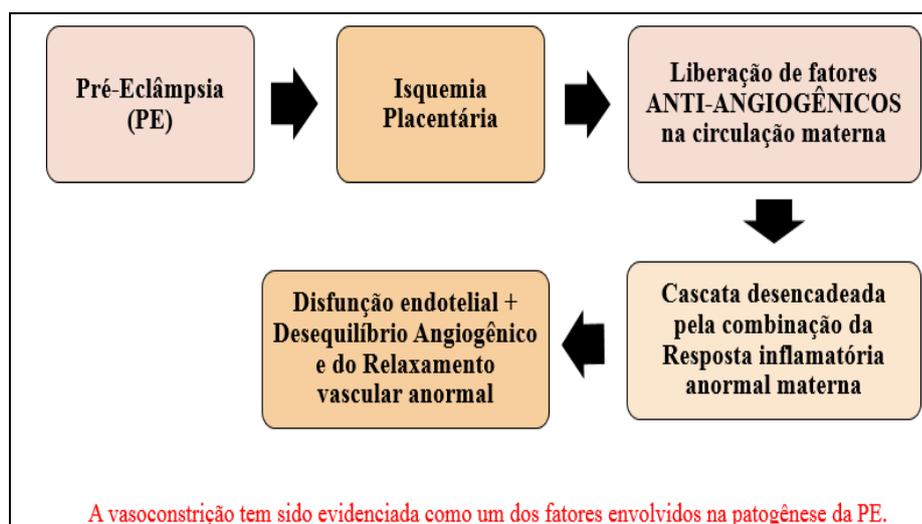
1.2.5 PE: Tratamento e abordagens atuais

O tratamento mais eficaz ainda é a retirada da placenta com a interrupção da gestação, mesmo que possa ser de risco para o feto devido às complicações relacionadas à prematuridade. O tempo de interrupção é baseado na idade gestacional, nas condições materno-fetais e na gravidade da doença. É muito importante avaliar o âmbito clínico total como: sinais premonitórios, doenças associadas e Síndrome HELLP (HADDAD et al, 2000; VIGIL-DE GRACIA 2001; LEUNG et al, 2018).

1.2.6 Disfunção Endotelial na Pré-Eclâmpsia

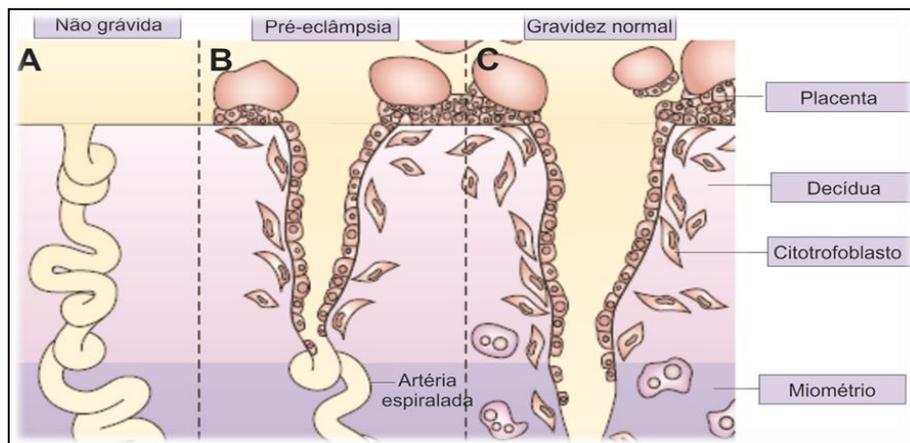
A circulação uteroplacentária inadequada causa uma cadeia de eventos responsável pela isquemia, liberação de substâncias vasoativas na mãe, geração de danos endoteliais e consequentes modificações na sua função. Essa disfunção endotelial sistêmica forma uma série de mudanças na conexão sangue-tecido, incluindo o processo trofoblástico defeituoso nas artérias uterinas, gerando um ambiente hipoxêmico (GRANGER et al, 2001) (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da Patogênese da Pré-Eclâmpsia



(Fonte: A Autora, 2018)

Figura 4 - Artérias espiraladas: a) Paciente não grávida; b) Pré-eclâmpsia; c) Gravidez normal.



(Fonte: Adaptado de Moffett-King A, Nat. Rev. Immunol 2002)

Em decorrência ao quadro isquêmico do tecido placentário, alguns fatores nocivos ao endotélio vascular são liberados, dentre eles as espécies reativas de oxigênio, agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação, elevação da permeabilidade da parede do vaso, aumento da reatividade e desregulação do controle do tônus da parede vascular, interligado com elevação da pressão arterial, gerando a ativação endotelial sistêmica materna, conhecida como segundo estágio da pré-eclâmpsia devido à resposta inflamatória, placentação anormal e hipóxia placentária (GREER et al., 1994; REDMAN E STAFF, 2015; FOLK, 2018). Placentas com PE passam a produzir mais peróxidos lipídicos do que quando temos uma placenta em gravidez normal. Assim, estes peróxidos lipídicos são considerados possíveis toxinas placentárias liberadas na circulação materna durante a pré-eclâmpsia (MOMBOULI E VANHOUTTE, 1999; CHAMBERS et al., 2001).

1.2.7 Fisiopatologia da Pré-Eclâmpsia

As alterações presentes nos níveis circulantes de agentes vasoativos, como os encontrados no endotélio, no caso as catecolaminas, angiotensina, prostaciclina e óxido nítrico refletem uma ativação anormal encontrada no endotélio vascular materno. Quanto aos mecanismos descritos na fisiopatologia da PE, temos a vasodilatação

antagonista, principalmente quando há uma ação interrompida do NO originando uma vasoconstrição no músculo liso vascular através da hidrólise do - Monofosfato Cíclico de Guanosina (GMPc), realizada pela(s) Fosfodiesterase(s) (PDE). Enquanto isto, se sugere que na pré-eclâmpsia a atividade das PDE possa estar aumentada em diversos locais como: no plasma materno e na placenta, mais especificamente o subtipo fosfodiesterase-5, podendo estar ligado a manifestações clínicas dessa síndrome (PINHEIRO DA COSTA et al, 2006; NELSON et al, 2014; STARK et al, 2014; LARRÉ et al, 2017). Então, o aumento dessa atividade fosfodiesterásica indicaria que a ação do óxido nítrico não é adequadamente efetivada nos vasos de mulheres com pré-eclâmpsia, resultando em vasoconstrição. A gestação normal é um estado de vasodilatação no segundo trimestre, enquanto a PE está intimamente associada à vasoconstrição (IZUMI et al, 1994; PINHEIRO DA COSTA et al, 2006). Porém, é na má placentação decorrente da invasão trofoblástica frustada que encontra-se a responsabilidade pela produção de fatores maternos relevantes, dentre eles: os comportamentais ou ambientais, desencadeadores das manifestações enfrentadas por essas pacientes (REDMAN et al, 2014). Além da liberação de outros fatores como os placentários, por exemplo, *Feline McDonough Sarcoma-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1), endoglina solúvel, autoanticorpos agonistas ao receptor de angiotensina tipo 1 e citocinas inflamatórias (REDMAN E STAFF, 2015) (ROBERTS E HUBEL, 2009; REIS et al, 2010; NELSON et al, 2014; STARK et al, 2014). Outros agentes vinculadores que merecem destaque são os encarregados pela conexão entre os dois estágios: *o estresse oxidativo* (estimulado pela placenta hipóxica) e os *fragmentos de sinciotrofoblasto* os quais são nanopartículas que encontram-se liberadas na circulação materna e contribuem para o desequilíbrio gerado nos fatores angiogênicos em relação aos fatores antiangiogênicos. Esses, dependendo do grupo de mulheres estudado, podem fornecer informações únicas, relacionadas às distintas ligações e aos subtipos de pré-eclâmpsia. Na investigação da fisiopatologia e das novas opções terapêuticas que auxiliariam na prevenção do estágio 2 (o qual pode ser uma resposta fetal adaptativa ao acesso junto aos nutrientes), alguns autores defendem a busca de um denominador comum preexistente. (ROBERTS E HUBEL, 2009; NELSON et al, 2014; STARK et al, 2014).

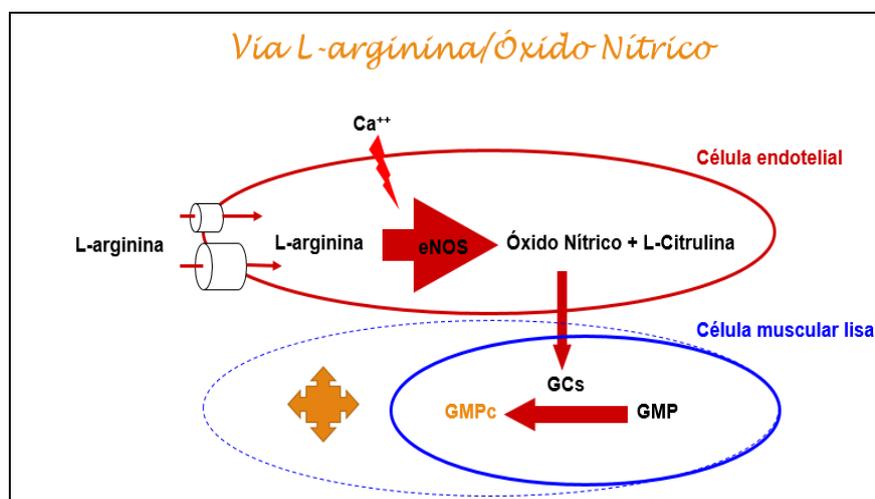
George e colaboradores (2012), tornaram público a importância de estudar também a ativação do Sistema Endotelina, para verificar possíveis relações com a

fisiopatologia da PE. É uma potente substância vasoconstritora do sistema cardiovascular denominada Endotelina (ET-1). É composta por 21 aminoácidos, liberada e produzida a partir de células endoteliais que atuam quando há liberação do ET-1. Ambos promovem adequado equilíbrio arterial durante a gravidez, através das irregulares sinalizações oriundas de receptores, estimulam a vasoconstrição e a hipertensão na pré-eclâmpsia, fortalecendo a possibilidade de que ET-1 participe da patogênese da síndrome atuando secundariamente junto aos fatores anti-angiogênicos, sFlt-1 e endogлина solúvel (sEng) liberados pela placenta.

1.2.8 Via L-arginina-NO-GMPc na Pré-Eclâmpsia

Um dos principais reguladores dos tónus vascular e potente mensageiro químico vasodilatador que aumenta o fluxo sanguíneo uterino, é o NO. Produzido a partir da L-arginina, o NO é um relaxante do músculo liso vascular que também inibe a agregação plaquetária. As vias da L-arginina e do NO podem estar envolvidas nas alterações hemodinâmicas e de vasoconstrição da PE- pois quando temos a presença das PDE neste ciclo, ocorre a inibição do GMPc e este acaba por não desencadear a vasodilatação, mecanismo associado à hipertensão presente na síndrome (BYRNE, 2015; BRANDÃO, 2011) (Figura 5).

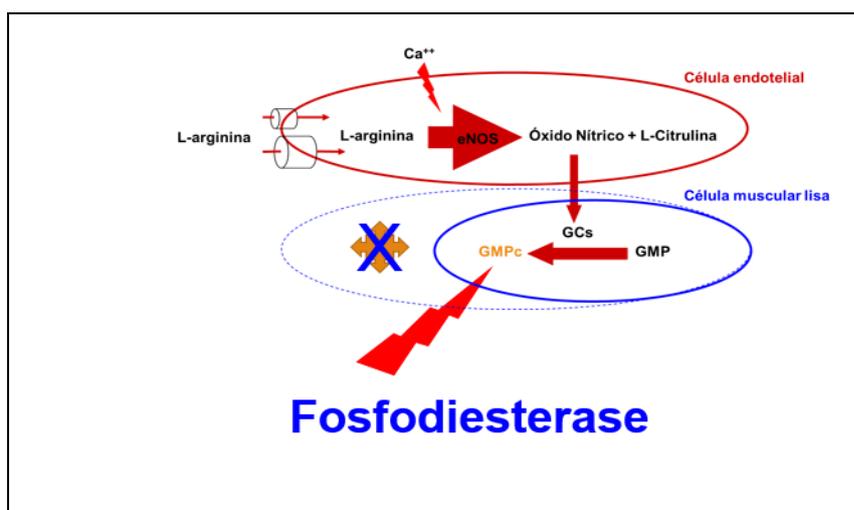
Figura 5 - Via L-arginina-NO-GMPc no sistema vascular demonstrando a vasodilatação induzida pelo GMPc (pontilhado em azul).



LEGENDA: Via L-arginina-NO-GMPc (Fonte: Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo, 2016)

Como consequência direta dessas ações, acontece o vasoespasmio arteriolar generalizado- o qual, promove mudanças funcionais e morfológicas no sistema vascular, sendo a primeira delas a elevação dos níveis pressóricos, seguida de lesão endotelial renal, levando a glomerulonefrite e proteinúria clinicamente patológica, resultando na expressão clássica diagnosticada como PE em gestantes (BYRNE, 2015; BRANDÃO, 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Diagrama da Fosfodiesterase e Via L-arginina-NO-GMPc.



LEGENDA: Relação da Fosfodiesterase e Via L-arginina-NO-GMPc (Fonte: Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo, 2016)

No endotélio, esse gás é formado pela enzima sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS) por meio da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO, a qual tem um papel crucial na gravidez. (PINHEIRO DA COSTA, 2003; GALÃO et al, 2004; RODRIGUES, 2012; BRANDÃO, 2011; ALMEIDA E SOUZA, 2016).

As principais vias endoteliais mais conhecidas estão aumentadas na gravidez, são elas: NO, prostaciclina, fator endotelial hiperpolarizante, sulfeto de hidrogênio (HADDAD et al., 2000; KUKREJA et al, 2004; GOKINA E GOECKS, 2006; GOKINA et al, 2010; HENTSCHKE, 2013; SHEIBANI et al, 2017). No entanto, a maioria delas encontram-se suprimidas durante o período gestacional da PE-repercutindo no fracasso dos processos adaptativos vasculares. Já que se comprovou

que há sim é uma diminuição nos fatores responsáveis pela regulação, os quais são responsáveis pela disfunção multissistêmica (GEORGE E GRANGER, 2017).

Nesse ambiente há uma elevação do estresse oxidativo e da inflamação, liberação de citocinas, levando ao aumento generalizado e desenfreado da disfunção endotelial materna (REDMAN E SARGENT, 2009; CHAIWORAPONGSA et al, 2014; SASSER et al, 2015).

Na gravidez saudável temos um útero que sofre uma invasão citotrofoblástica em suas artérias espiraladas, as quais promovem uma alteração no endotélio vascular, que terá um suprimento sanguíneo elevado e adequado com consequente diminuição de sua resistência (KHONG et al, 1986). Na angiogênese contamos com os fatores angiogênicos (PIGF; VEGF), durante a remodelação vascular. Esses são necessários para geração de um suprimento apropriado existente no desenvolvimento tanto fetal, quanto do tecido placentário (EMILI et al, 2002; GEORGE, 2014). Neste momento nas gestantes acometidas pela PE, o óxido nítrico endotelial através da ativação da guanilato-ciclase, produz o GMPc, induzindo relaxamento vascular. A fosfodiesterase então, regula a atividade do GMPc e quando acontece temos desequilíbrio no relaxamento vascular útero-placentário e inibição da agregação plaquetária. Quando a fosfodiesterase 5 age no GMPc, temos um aumento de PA e uma vasoconstrição (DAVIES, 1985; MONCADA E HIGGS, 1993; SCHNEIDER et al, 1996; PINHEIRO DA COSTA et al, 2006).

Essa seria a principal razão que relaciona PDE e NO, sugerindo o uso de inibidores da PDE como possíveis alvos terapêuticos para a pré-eclâmpsia; com possível efetividade na rotina diária dos centros obstétricos, uma vez que poderiam prolongar a gravidez e melhora considerável do conjunto feto-materno, diminuindo a hipóxia e melhorando a perfusão uteroplacentária (DOWNING et al, 2004; PINHEIRO DA COSTA et al, 2006; EVERETT et al, 2012; LARRÉ et al, 2017; SIBLEY, 2017; TANAKA et al, 2017).

1.2.9 Fosfodiesterases

A PDE é um nucleotídeo cíclico formado por um conjunto de enzimas integradas por uma família relacionada à catalização da hidrólise seletiva da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e/ou monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), moléculas de sinalização, as quais tem grande importância clínica. Os avanços ocorridos

na biologia, além de identificarem os seus subtipos adicionais, permitiram também uma maior compreensão quanto à distribuição nos tecidos e sua própria funcionalidade junto à classe (BEAVO E BRUNTON, 2002; DENINNO, 2012).

Segundo Pinheiro da Costa e colaboradores (2006), os níveis plasmáticos das fosfodiesterases encontraram-se aumentados em pacientes acometidas pela PE, tornando as PDE um importante fator de estudo na fisiopatologia dessa síndrome. São enzimas cuja principal função é regular os níveis celulares dos segundos mensageiros cAMP e cGMP, controlar suas velocidades de degradação, regular a amplitude de sinalização dentro dos domínios subcelulares, a localização e a duração das respostas desencadeadas por esses. Os mensageiros agem como adenilil ciclase e guanilil ciclase- ao controlar uma grande variedade de respostas biológicas- incluindo o relaxamento uteroplacentário, da vasculatura e inibição da agregação plaquetária, na regulação tanto da amplitude quanto da duração das respostas desencadeadas pelos hormônios e pelos neurotransmissores, sendo importantes reguladores da transdução de sinal (FRANCIS et al, 2001; BEAVO E BRUNTON, 2002; RYBALKIN et al, 2003; SANTOS-SILVA et al, 2008; DENINNO, 2012; MAURICE et al, 2014; ACAUAN FILHO et al, 2016; LARRÉ et al, 2017; CURI, 2002).

A superfamília de enzimas PDE, em mamíferos, é composta por 11 diferentes isoformas e classificada de acordo com as seguintes características: sua estrutura tridimensional- sequência, propriedades cinéticas, formas de regulação, função, localização intracelular, expressão celular, sensibilidade inibitória, propriedades catalíticas e respostas aos ativadores específicos, inibidores e efetores, bem como nos seus mecanismos de regulação (KERAVIS E LUGNIER, 2012; MAURICE et al, 2014; LARRÉ et al, 2017; CARDARELLI et al, 2018).

A maior parte das células contém representantes de mais de um subtipo ou isoforma de PDE, mas em quantidades distintas, sendo suas funções e localizações subcelulares variáveis. Encontram-se da seguinte forma distribuídas em nosso corpo: PDE1 (cérebro, coração e músculo liso), PDE2 (córtex adrenal, cérebro e coração), PDE3 (coração, tecido adiposo, pâncreas, plaquetas e rins) e PDE5 (plaquetas, útero, músculo liso, coração e rins), justificando sua importância junto à expressão tecidual, mesmo em outros lugares relacionados a outras isoformas (Tabela1) (FRANCIS et al, 2001; BEAVO E BRUNTON, 2002; BENDER E BEAVO, 2006; MAURICE et al, 2014; SIGMA, 2016).

As PDE são codificadas por vinte e quatro genes, sendo que essa classificação se baseia na sequência de aminoácidos, especificidades do substrato, propriedades regulatórias, farmacológicas e distribuição tecidual (BEAVO E BRUNTON, 2002; CURI, 2002).

As PDE de mamíferos, por exemplo: PDE4, PDE7 e PDE8 são específicas para o cAMP, enquanto que PDE5, PDE6 e PDE9 são específicas para cGMP, outras hidrolisam ao mesmo tempo cAMP e cGMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11) (BEAVO E BRUNTON, 2002; ROTELLA, 2002; KUKREJA et al, 2004; BENDER E BEAVO, 2006; SIGMA, 2016) (Figura 7).

Figura 7 - Visão geral das isoformas das enzimas PDE suas funções e localizações.

PDEs	Isoforms or Known Genes	Descriptive Name	Structural Information	Regulators	Inhibitors	Substrate Specificities	Tissue Expression	Physiological Function	Disease/Relevance
PDE 1	1A, 1B and 1C	Ca/CAM dependent	535aa, HSPDE 1A1	Ca2+/CAM	SCH51866, Vinpocetine, IC224 (KOS), K86340	cAMP or cGMP	Cardiac and vascular myocytes, central and peripheral neurons, lymphoid cells (B and T) and myeloid (monocytes and macrophages), testicles and sperm	Development and maturation of spermatocyte, macrophage differentiation, regulation of the olfactory neuron, and neuronal regulation	Fertility, inflammation, smell
PDE 2	2A	cGMP-activated	941aa, HSPDE 2A3	cGMP	PDP, IC933, EHNA, BAY60-7550, Oxidole	cAMP or cGMP	Cardiac myocytes, brain, liver, adrenal cortex, endothelium and platelets	Regulation [α2β3] of cardiac myocytes and endothelial cell function	Heart disease, anti-angiogenic
PDE 3	3A and 3B	cGMP- Inhibited	1141aa, HSPDE 3A1	cGMP, insulin and leptin	Glostamide, Enoximone, Imazodan, Trequinin, Miltirone	cAMP or cGMP	Cardiac myocytes and vascular, brain, liver, adipose tissue, pancreatic β-cells, endothelium, epithelium, oocytes and platelets	Platelet and adipocyte functions	Intermittent claudication, peripheral arterial occlusive disease, retinosis, obesity and type 2 diabetes
PDE 4	4A, 4B, 4C and 4D	cAMP-specific	647aa, HSPDE 4A1	PKA, ERK and folic acid	Rolipram, Rolimilast, Ro20-1724, Cilomilast, RP73401, SCH351591, V-11294A	cAMP	Cells of the cardiovascular, nervous, immune and inflammatory systems.	Regulating monocytes, T cells, macrophages, eosinophils, neutrophils. Act on the function and neuronal differentiation, function of inflammatory cells and vascular myocytes. Inhibition of bone loss	Airway inflammation (asthma, COPD), rheumatoid arthritis, Crohn's disease, learning, memory, schizophrenia, spinal cord injury, stroke, retinosis, chronic lymphocytic leukemia B cells, Parkinson's disease, osteopenia
PDE 5	5A	cGMP-activated and cGMP-specific	874aa, HSPDE 5A1	PKG	Sildenafil, Vardenafil, Dipyridamole	cGMP	Cardiac and vascular myocytes, lungs, brain, platelets, kidneys, gastrointestinal tissue and penis	Act on different functions of inflammatory cells and smooth muscle cells. Relaxation of vascular myocytes	Erectile dysfunction, asthma, COPD, pulmonary hypertension, migraine
PDE 6	6A, 6B and 6C	cGMP-activated and cGMP-specific, photoreceptor	860aa, HSPDE 6A1	Light	Dipyridamole, Zaprinast	cGMP	Photoreceptors and pineal gland	Visual signal transduction	Pigmented retinitis
PDE 7	7A and 7B	cAMP- Specific high-affinity cAMP-specific	482aa, HSPDE 7A1	Unknown	BRL50481, IC 242	cAMP	Spleen, brain, lungs, kidney and lymphoid and myeloid cells	Unknown	Unknown
PDE 8	8A and 8B	cAMP- Specific high-affinity cAMP-specific	713aa, HSPDE 8A1	Unknown	Dipyridamole	cAMP	Testicles, liver and thyroid	Thyroid function and activation of T cells	Hyperthyroidism and metabolic bone disease
PDE 9	9A	cGMP- Specific high-affinity	593aa, HSPDE 9A1	Unknown	SCH51866, BAY73-6691	cGMP	Spleen, brain and intestinal cells	Unknown	Fertility
PDE 10	10A	Dual specificity	778aa, HSPDE 10A1	PKA	SCH51866, Zaprinast, Dipyridamole	cAMP or cGMP	Brain and testicles	Act on functions of striatal neurons	Parkinson's disease, schizophrenia, obsessive compulsive disorder and addictions
PDE 11	11A	Dual specificity	490aa, HSPDE 11A1	Unknown	Dipyridamole, Zaprinast	cAMP or cGMP	Prostate, testicles and salivary glands and pituitary gland.	Act on sperm function (motility, number)	Fertility

Legenda: Fonte: Larré et al, 2017

1.2.10 Fosfodiesterases e PE

A relação entre as PDE e a PE- ainda é discutida, principalmente, quando associada à fisiopatologia. E tanto a placenta quanto a isquemia comportam-se como elementos centrais no espectro da pré-eclâmpsia. Enquanto, a PDE apresenta-se como importante regulador da reatividade vascular na Via L-arginina-NO-GMPc, fato que

auxilia na compreensão das PDE serem potenciais alvos terapêuticos no desenvolvimento de fármacos, justifica inclusive a presente pesquisa. Por outro lado na PE ainda não haviam elementos cruciais que estabeleçam a ligação entre a elevação dos níveis de PDE na placenta (DOWNING et al, 2004; SANTOS-SILVA et al, 2008; LARRÉ et al, 2017; LARRÉ et al, 2018).

Contraditoriamente, na literatura já haviam achados associados aos níveis de Óxido Nítrico Sintetase (NOS) na PE, os quais encontravam-se elevados nos relatos de Rutherford e colaboradores (1995) e diminuídos segundo Brennecke e colaboradores (1997), corroborando para um entendimento de um estado multifatorial (aquele em que há ativação de distintos sistemas e órgãos), durante a PE. Já Pinheiro da Costa e colaboradores (2006) mostraram evidências de um aumento significativo da atividade fosfodiesterásica no plasma materno de mulheres com PE, sugerindo uma alteração na resposta endotelial materna pela Via L-arginina-NO-GMPc.

1.2.11 Fosfodiesterase-5

Uma das enzimas mais importantes constituinte da superfamília das PDE, é a PDE5. Possui três subtipos (A1, A2, A3), os quais, apresentam níveis distintos de expressão, localização subcelular e especificidade junto aos tecidos (LIN et al, 2006; CALIXTO, 2014; CAMPOLO et al, 2018).

A PDE5 mantém um papel importantíssimo em conjunto com cGMP, sendo responsável por diversas pesquisas relacionadas ao fato de ser um iminente alvo molecular para muitos fármacos utilizados e conhecidos no tratamento de hipertensão pulmonar e disfunção erétil (CALIXTO, 2014; IOAKEIMIDIS E KOSTIS, 2014; CARDARELLI et al, 2018). Age concomitantemente como co-expresso nas PDE-1 e PDE-3, ligado a parte muscular lisa inclusive. Wang e colaboradores defendem que a PDE5 é um elemento formador do complexo de proteínas quinase G1 (PKG1) durante a sinalização sendo robustamente ativada. Portanto, a PDE5 passou a ser o alvo de alguns fármacos como Sildenafil, Tadalafil e Vardenafil em tratamentos para hipertensão pulmonar e disfunção erétil (WANG et al, 2006; LARRÉ et al, 2018).

A PDE5 é a mais explorada enzima na PE, cooperando para a elevação dos níveis pressóricos durante a gestação, pela sua ação vasoconstritora. Esses

medicamentos já foram testados em animais e deles foram obtidos resultados eficazes e encorajadores relacionados à PE (SEIBEL et al, 2002; RYBALKIN et al, 2003; WAREING et al, 2004; GHOFRANI et al, 2006; SANTOS-SILVA et al, 2008; MAURICE et al, 2014; BURKE et al, 2016; LARRÉ et al, 2017).

1.2.12 Fosfodiesterases e seus Inibidores

No cenário da PE sabemos que ainda há um ambiente adverso, no qual observamos níveis pressóricos aumentados, ativação da Via L-arginina-NO-GMPc, os quais estão associados a uma maior atividade da PDE e aquele panorama clássico de hipóxia. Nessa conjunção, como causa ocorre o aumento do estresse oxidativo e liberação de citocinas inflamatórias, responsáveis pela disfunção endotelial materna que geralmente apresenta-se de forma sistêmica e generalizada (GAIO et al, 2001; KOUVELAS et al, 2009; REDMAN E SARGENT, 2009; CHAIWORAPONGSA et al, 2014; SASSER et al, 2015).

A utilização de inibidores de PDE passou a ser recomendada em relação à PE como hipotéticos alvos terapêuticos. Dentre os mais relevantes fármacos está o Vardenafil - é responsável pela elevação da produção de PIGF em células de gestantes acometidas pela síndrome em um estudo in VITRO, apontando sua capacidade de proteção contra a mesma. O mecanismo de ação, deve estar envolvido com a inibição antiangiogênica sistêmica e materna que leva à PE (KAKIGANO et al, 2015; TRAPANI et al, 2016). Enquanto o Tadalafil e o Udenafil, também são constituintes da ordem desses medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* para esse uso, mesmo estando menos em voga (KOUVELAS et al, 2009).

Conforme publicado por Larré e colaboradores (2018), há muitas divergências na análise dos mecanismos efetivos desses medicamentos, já que as pesquisas atuais enfatizam e correlacionam contradições quanto aos benefícios do uso, decorrentes da falta de evidências na evolução clínica das gestantes. Então, os desfechos clínicos são até agora inexpressivos, a ponto de não dar margem a orientação de aplicabilidade rotineira dos fármacos.

2. JUSTIFICATIVA

Torna-se importante estudarmos a patogênese da PE devido a sua relevância e também ao fato de na literatura vigente ainda haver uma lacuna, sobre esse assunto. Uma vez que não existem estudos comparativos, entre as relações, locais de atuação e dosagens da PDE5, concomitantemente. Já que a PDE se efetiva como recomendável alvo terapêutico e de diagnóstico, frente aos pacientes acometidos por esta patologia.

3 HIPÓTESES

3.1 NULA

A concentração plasmática da PDE5, bem como a atividade da PDE e a expressão de mRNA da PDE5 na placenta não são diferentes entre as pacientes com PE e grupo controle.

3.2 ALTERNATIVA

A concentração plasmática da PDE5, bem como a atividade da PDE e a expressão de mRNA da PDE5 na placenta são diferentes entre as pacientes com PE e grupo controle.

Desenvolvimento

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a PDE5 na PE.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em gestantes com e sem PE:

- a) Comparar as concentrações da proteína PDE5 no plasma materno;
- b) Comparar a atividade enzimática da PDE na placenta;
- c) Comparar a expressão de mRNA da PDE5 na placenta.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Estudo observacional e caso-controle.

5.2 DEFINIÇÕES

Baseado nas definições das diretrizes NHBPEPWG e do ACOG (NHBPEPWG, 2000; ACOG, 2013).

- a) Pré-eclâmpsia (PE): síndrome definida pela presença de hipertensão (Pressão arterial $> 140/90$ mmHg) após a 20^a semana associada a relação proteinúria/creatininúria $\geq 0,3$.
- b) Eclâmpsia: definida como a presença de convulsões em gestante com PE.
- c) Hipertensão crônica (de qualquer etiologia) (HC): definida pela detecção de hipertensão precedendo a gestação ou antes de 20 semanas.
- d) PE sobreposta (PES): hipertensão crônica detectada antes da gestação, ou antes de 20 semanas de gravidez associada a relação proteinúria/creatininúria $\geq 0,3$.
- e) Hipertensão gestacional (HG): caracterizada pela ocorrência de hipertensão após a 20^a semana sem a presença de proteinúria.
- f) Síndrome HELLP: a denominação deve-se ao acrônimo dos três critérios estabelecidos para sua presença: H= hemólise, EL: elevação das enzimas hepáticas, LP: contagem baixa de plaquetas.

Obs: A proteinúria foi avaliada pela razão P/C= proteinúria sobre creatininúria, nas amostras de urina das gestantes com suspeita de SPE. Esse é o exame solicitado rotineiramente no Centro Obstétrico (CO) do HSL.

5.3 POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra foi composta de gestantes com e sem diagnóstico de SPE hospitalizadas no CO do HSL/PUCRS. Todas as pacientes submetidas ao estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), sendo esse estudo aprovado pelo Comitê de Ética da PUCRS (ANEXO A). Para coleta de dados, foi utilizado Protocolo Padrão de Coletas do Grupo de Pesquisa em Nefrologia, que consta de dados de anamnese, exame físico, exames complementares, dados do parto e do recém-nascido (RN) (APÊNDICE B).

5.3.1 Procedimento Amostral

Os dados de pesquisa tem origem na amostra composta por n=151 gestantes divididas em 2 grupos: 51 com SPE e 100 normotensas (Grupo Normotenso - GN) selecionadas aleatoriamente por busca diária de gestantes que preenchiam os critérios de inclusão.

5.3.2 Critério de Seleção

5.3.2.1 Critério de Inclusão

- a) Mulheres SPE hospitalizadas no CO do HSL/PUCRS, com mais de 20 semanas de gravidez, feto único, maiores de 18 anos;
- b) Pacientes com Síndrome HELLP total ou parcial;
- c) Grupo controle: composto por mulheres normotensas, com mais de 20 semanas de gravidez, feto único;

5.3.2.2 Critérios de Exclusão

- a) Gestantes que não conseguiram responder ao Protocolo Padrão, nem ao TCLE e/ou coletar as amostras;
- b) Gestantes com diagnóstico prévio de Nefropatia, Hepatopatia, Tireoidopatias e Infecções ativas, diabetes mellitus gestacional, gestações múltiplas.

5.4 COLETAS DE DADOS

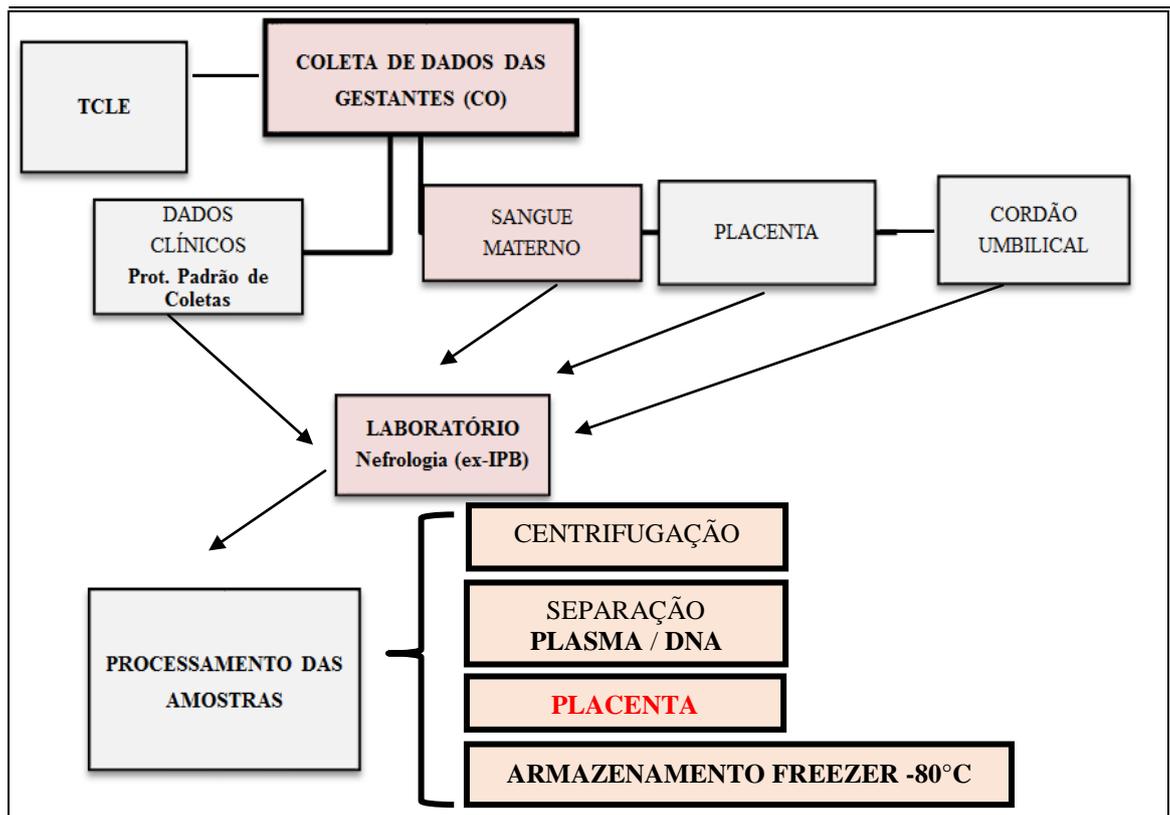
5.4.1 Coleta de amostras em pacientes

As amostras foram coletadas no CO do HSL-PUCRS, onde formamos uma equipe previamente treinada (coletas-piloto foram realizadas para avaliar o desempenho do treino dos pesquisadores). Na ocasião, os pesquisadores disponibilizaram praticamente 12 horas diárias e alguns finais de semana, em esquema de escala de plantões, para que as coletas acontecessem no menor tempo possível. O TCLE e o Protocolo Padrão de Coletas do Grupo de Pesquisa em Nefrologia foram adequados e realizados para cada paciente do grupo SPE e normotensas GN. Desta forma, após o consentimento prévio da paciente, realizou-se uma explanação de como funcionaria o estudo. A seguir, era realizada a primeira parte da coleta: coleta de sangue materno (feita pelas profissionais da equipe de enfermagem do CO). No segundo momento, após o parto, tínhamos a coleta do sangue do cordão umbilical e da placenta. Esse material era imediatamente transportado ao Laboratório de Nefrologia e processado para armazenamento em freezer -80°C, conforme demonstra o fluxograma da Figura 8.

5.4.1.1 Coleta de plasma materno

Foram coletados em média 4 mL de sangue materno em tubo Vacutainer® contendo EDTA e 4 mL também de sangue materno em tubo sem EDTA antes do parto. As amostras foram transportadas em isopor com gelo e imediatamente processadas no Laboratório de Nefrologia da ESMED-HSL/PUCRS, sendo centrifugadas a 3.000g por 10 minutos, em temperatura ambiente. O plasma foi estocado em tubo de centrifugação de 0,6 mL e após armazenado a -80°C, até o momento da dosagem.

Figura 8 - Fluxograma referente à coleta dos materiais das gestantes.

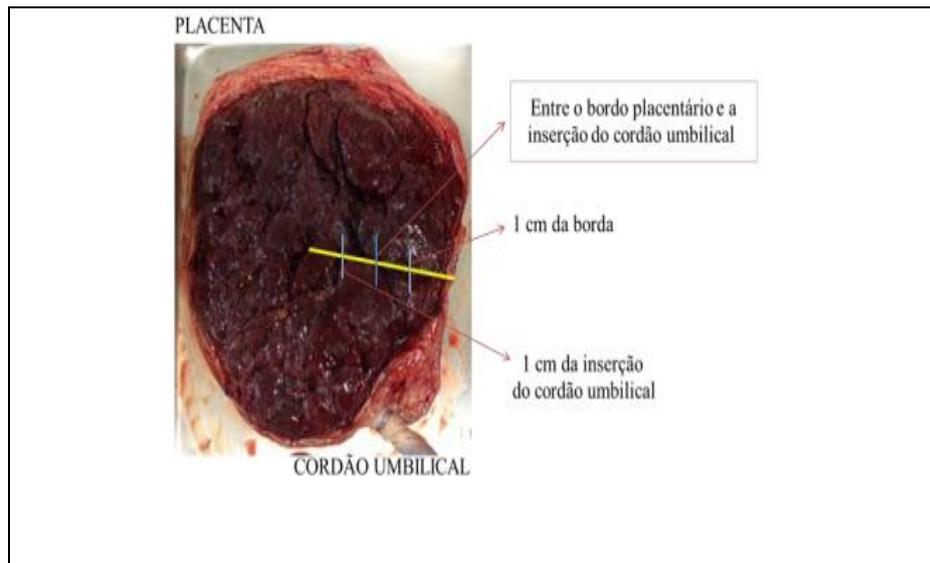


(Fonte: A Autora, 2017)

5.4.1.2 Coleta de placenta

Imediatamente após o parto, eram dissecados da face materna da placenta seis cubos de aproximadamente 1 cm do centro de um cotilédone localizado na metade da distância entre o cordão umbilical e a extremidade do órgão. Esse material foi armazenado em tubo de centrifugação de 1,5 mL contendo RNA Later, o qual auxilia na conservação do material coletado (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil) (Figura 9).

Figura 9 - Ilustração da coleta do tecido placentário



Legenda: coleta realizada no ponto médio da distância entre a borda placentária e a inserção do cordão umbilical (Fonte: Marta Hentschke, 2012).

5.4.2 Parâmetros analisados

- a) Concentração plasmática da PDE5;
- b) Expressão da atividade enzimática da PDE ($V_{m\acute{a}x}$) na placenta;
- c) Expressão de mRNA da PDE5 na placenta;
- d) Dados das pacientes (entrevistas realizadas no CO e dados levantados dos prontuários).

5.5 MÉTODOS DE EXAME

5.5.1 Técnicas de Mensuração e Ensaio

5.5.1.1 Ensaio da PDE

Protocolo 1- Ensaio da ATIVIDADE ENZIMÁTICA: Verificação da “ATIVIDADE DA PDE NA PLACENTA” - Abcam139460 - Activity Assay Kit (colorimetric), (Cambridge UK, 2017).

Protocolo de Preparação das amostras

Após coleta das amostras e posterior maceração das placentas (com auxílio do cadinho e pistilo- onde foi adicionado tampão TRIS para auxiliar no processo), realizou-se a etapa da dessalinização. Na sequência, preparou-se a curva padrão pela diluição do padrão em 5 desdobramentos conforme instruções do fabricante. Adicionamos 5'-nucleotidase a cada poço e homogenizamos, posteriormente, incubamos por 30 minutos a 30°C. Terminando a reação com adição do Reagente de Ensaio Verde. No Ensaio de Linearidade- cuidando o tempo das reações, diluímos o substrato cGMP e adicionamos nos poços da placa; em seguida colocou-se o tampão de ensaio em cada poço e adicionou-se 5'-nucleotidase. Após diluiu-se a enzima PDE para adicioná-la em cada poço, com intervalos de 5 minutos. A reação com Reagente de Ensaio Verde foi parada. Prepararou-se as amostras com enzima PDE, substrato e teste composto. Incubamos essas amostras a temperatura e tempo adequados e terminamos a reação, adicionando Reagente de Ensaio Verde.

A dessalinização foi realizada a fim de remover o excesso de fosfato e nucleotídeos (que são lentamente hidrolisados para liberar fosfato livre na presença do Reagente de Ensaio Verde) na alta velocidade, com extrato sobrenadante. Reidratou-se a resina de dessalinização em um tubo de centrifugação de 50 mL adicionando 20 mL de dH₂O livre de fosfato e misturar, no vórtex brevemente, após 4 horas à temperatura ambiente o conteúdo decantou sendo adicionado dH₂O a uma proporção de 1: 1 na resina reidratada (~ 10 mL). Para reidratar a resina adiciona-se dH₂O à coluna de dessalinização, a fim de obter um volume de leite fixo de aproximadamente 5,5 cm de altura. Remove-se a ponta da coluna, permitindo que a dH₂O drene por gravidade. Equilibra-se a coluna adicionando 8 mL de tampão de ensaio, deixando a drenagem ocorrer por gravidade. Coloca-se a coluna em um tubo de centrifugação de 15 mL, centrifuga-se a 800 x g por 3 min a 4°C para deslocar o buffer da coluna, descartando o volume restante. Coloca-se a coluna em um tubo de centrifugação de 15 mL extremamente limpo. Sequencialmente adiciona-se até 350 µL de amostra à coluna. Centrifuga-se a amostra a 800 g por 3 min, na centrífuga Hettich Zentrifugen - Modelo Universal 320R. Reservar a extração resultado do lisado celular dessalinizado, que será testado para atividade de PDE. Finalmente, efetua-se o armazenamento da amostra imediatamente a -80 °C. Nota: A remoção efetiva de fosfato nucleotídeos do extrato foi testada qualitativamente pela adição de 100 µL Reagente de Ensaio Verde a 1 µL

extrato, e uma amostra separada de 1 μL dH_2O . Em caso do material não ter fosfato as amostras deveriam tonalizar em amarelo ao longo de um período de 30 min. O desenvolvimento da cor verde visível indica a contaminação por fosfato, que deve ser eliminado das amostras antes de prosseguir.

Etapa 3: Protocolo de Preparação dos Reagentes do Ensaio

Inicialmente descongelou-se o tampão de ensaio 5'-nucleotidase, o substrato 3',5'-cGMP, o padrão 5'-GMP, mantendo-se tudo a 4°C (banho de gelo). Preparou-se solução 20 U/mL de PDE adicionando 200 μL de tampão a um dos frascos de enzima liofilizada.

Etapa 4: Preparo da Curva Padrão

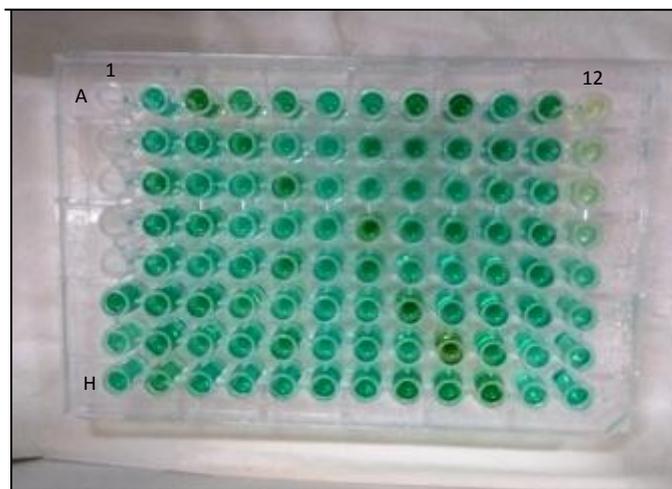
Inicialmente preparamos duas diluições com tampão de ensaio PDE, 75 μM e 50 μM , usando o padrão 5'-GMP. Utilizou-se o tampão PDE, preparando dois conjuntos de diluições seriadas 1:1 de 75 μM e 50 μM do padrão 5'-GMP, além de um tampão de ensaio branco (40 μL por poço). As concentrações de 75, 50, 37,5, 25, 18, 75, 12,5, 6,25 μM corresponderam a 3, 2, 1,5, 1,0, 0,75, 0,50 e 0,25 nmol de 5'-GMP. Adicionou-se 80 μL de padrão 75 μM 5'-GMP (Etapa 1) ao poço A da placa, e 80 μL do padrão 50 μM para poço B. Após, adicionou-se 40 μL de tampão de ensaio 1X dos poços C ao H. Retirou-se 40 μL do poço A e adicionou-se ao poço C. Misturou-se pela agitação com pipeta várias vezes. Removeu-se 40 μL do poço C e adicionou-se ao poço E. Misturou-se bem o conteúdo do poço E, removeu-se e descartou-se 40 μL . Removeu-se 40 μL do poço B e adicionou-se ao poço D. Repetiu-se o processo de mistura e transferência de 40 μL do poço D para F e depois do F para G. Não se esquecendo de retirar e eliminar 40 μL do poço G. Adicionou-se 10 μL de 5'-nucleotidase a cada poço e misturou-se bem. Incubou-se a 30°C por 30 minutos.

Etapa 5: Preparo do Término das Reações

Logo após a incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 100 μL de Reagente Verde. Agitou-se a placa e aguardou-se o desenvolvimento da cor por 20 a 30 minutos. O comprimento de onda de 620 nm foi escolhido no leitor de placas

Spectramax (Leitor de Microplacas Multimodo Série- Moleculardevices: USA, 2016) (Figura 10).

Figura 10 - Microplaca para verificação de atividade enzimática da PDE. No poço A e B da coluna 1 estão as amostras de branco, seguidas das concentrações em ordem crescente até os poços G e H da coluna 2. Demais poços com amostras de pacientes conforme espelho de planejamento.



(Fonte: A Autora, 2018)

Protocolo 2- Ensaio de ELISA: Verificação da quantidade de proteínas de PDE5 no plasma materno: “*CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA PDE5A ELISA*” (da Aviva Systems Biology (Humana- OKEH04321) - San Diego USA 2017).

Etapa 1: Preparação das amostras

Amostras de sangue foram centrifugadas imediatamente após coleta em 3000 g durante 10 minutos, e posteriormente estocadas a -80°C no Laboratório de Nefrologia do HSL-PUCRS, até momento da análise.

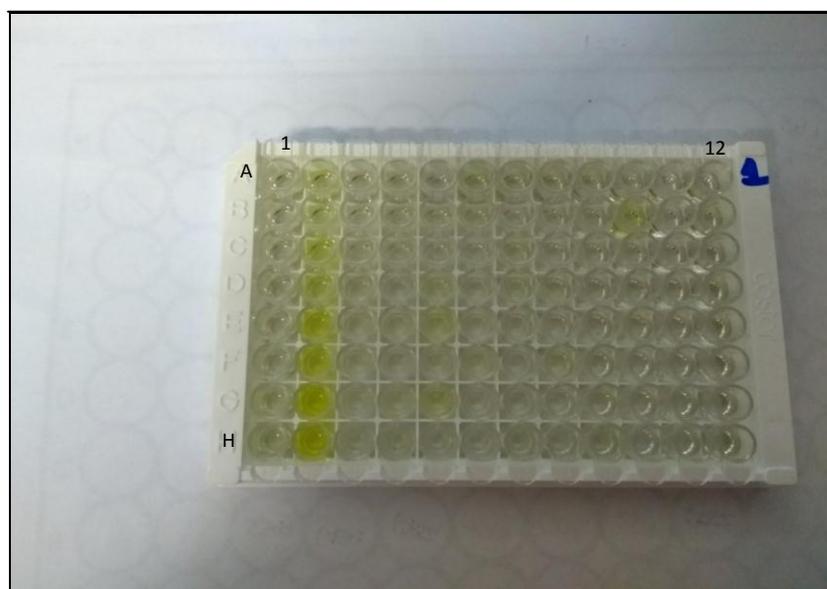
Etapa 2: Procedimento do Ensaio

Para a realização do ensaio todos os reagentes e materiais foram deixados à temperatura ambiente. Adicionou-se 100 µl de padrões titulados em série, amostras diluídas ou branco nos poços da placa. Do mesmo modo que o ensaio da atividade, a

cura de calibração foi realizada em diluições seriadas e pipetada em duplicata. Cubriu-se totalmente a placa com adesivo e incubou-se durante 2 horas. Removeu-se o adesivo da placa e descartou-se todo o líquido dos poços. Retirou-se qualquer líquido restante dos poços sobrepondo a placa invertida sobre papel absorvente na bancada. Adicionou-se 100 μL de Anticorpo detector de PDE5A 1x Biotinilado preparado em cada poço – cobriu-se mais uma vez a placa com adesivo, e incubou-se por 60 minutos. O líquido restante foi retirado dos poços por inversão da placa em papel absorvente. Lavou-se a placa 3 vezes com Tampão de Lavagem 1X pela adição de 300 μL a cada poço. Após descartou-se o líquido dos poços e secou-se a placa por inversão em papel absorvente. Esse procedimento foi repetido por três vezes.

A seguir adicionou-se 100 μL do Conjugado Avidina-HRP 1X, incubando por 60 minutos. Descartou-se o líquido dos poços e procedeu-se a lavagem da mesma forma que no passo anterior. Adicionou-se 90 μL de Substrato TMB a cada poço e incubou-se no escuro por 15-30 minutos. Aguardou-se o desenvolvimento da coloração azul. Adicionou-se 50 μL de solução de parada em cada poço. A cor foi alterada para amarelo. (Figura 11). A placa foi lida na absorvância de 450 nm com um leitor de placas Biochrom Anthos Zenyth 340r Microplate Reader.

Figura 11 - Microplaca de PDE5A - KIT PDE5A ELISA. No poço A e B da coluna 1 estão as amostras de branco, seguidas das concentrações em ordem crescente até os poços G e H da coluna 2. Demais poços com amostras de pacientes conforme espelho de planejamento.



(Fonte: A Autora, 2018)

Protocolo 3- Ensaio qRT-PCR: Verificação da expressão de mRNA de genes na placenta “*REAÇÃO DE PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL*”: kit RNA Isolation System SV-Total (Promega Corporation), Madison, USA 2016.

Verificação da expressão de mRNA de genes - REAÇÃO DE PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL;

Foram realizadas análises de expressão dos genes envolvidos na investigação da PDE5 na placenta, através do método qRT-PCR. A seguir será descrito os passos empregados.

Quadro 2 - Sequência de PRIMERS

Gene	Primer	Primers Sequence
GAPDH	hGAPDH-F	5'GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA C 3'
	hGAPDH-R	5'AGA GTT AAA AGC AGC CCT GGT 3'
PDE5A	hPDE5A-F	5'CCC TGG CCT ATT CAA CAA CGG 3'
	hPDE5A-R	5'ACG TGG GTC AGG GCC TCA TA. 3'

GAPDH: Proteína desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato; PDE5A: Fosfodiesterase isotipo 5A; Bases nitrogenadas: Purinas (Adenina e Guanina); Pirimidinas (citosina, timina e uracila).

Etapa 1: Extração de mRNA

O RNA foi extraído utilizando kit RNA SV-Total (Promega Corporation). As amostras foram expostas a um tampão de lise, aquecidas a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 200 µL de álcool 95%.

O conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Foram adicionados 600 µL de tampão e novamente centrifugado a 12000 g por 1 minuto e então adicionado Desoxirribonuclease diluída em tampão e cloreto de magnésio (MgCl₂).

O material foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado tampão de bloqueio da enzima e as colunas foram novamente centrifugadas a 12000 g por 1 minuto. As colunas foram lavadas com tampão de lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100 μ L de água livre de RNase através de centrifugação a 12000 g por 2 minutos.

Figura 12 - Tubos dos Primers complementares utilizados na sequência do mRNA



(Fonte: A Autora, 2018)

Etapas 2: Quantificação mRNA

QUANTIFICAÇÃO (Thermo Fisher Scientific NANODROP LITE, Wilmington, USA 2012).

O RNA extraído foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop™ onde foi realizada a leitura para quantificação. Pipetou-se 100 μ L de “Branco”- RNase Free e colocou-se no aparelho para calibrá-lo. Colocou-se o mesmo valor de 100 μ L de amostra no centro do aparelho e mensurou-se o RNA, respectivamente. O resultado foi fornecido em ng/L (Figura 13).

Figura 13 - Thermo Fisher Scientific-NanoDrop™ NanoDROp Lite



(Fonte: A Autora, 2018)

Etapa 3: Amplificação mRNA

AMPLIFICAÇÃO- Superscript VILO MASTERMIX (Life Technologies, Carlsbad, USA 2016).

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada utilizando GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega Corporation), conforme orientação do fabricante. Foi adicionado 16 μ L de RNA em 4 μ L da Master Mix SuperScript VILO e expostas aos ciclos térmicos 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos. O material foi amplificado através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR-RT) em tempo real utilizando o aparelho SpetOne Plus (Life Thecnologies), Sri Lanka, Cingapura 2014, e realizada análise de expressão relativa utilizando o gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), como controle endógeno. (Figura 14)

Alíquotas de 1 μ L de cada amostra de cDNA foram adicionados a 199 μ L de tampão contendo uma sonda de ensaio ssDNA (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação. Foram realizadas amplificações a partir de 20 ng de cDNA para cada amostra. Os ensaios foram realizados em placas individuais para cada gene em duplicata. Para análise da expressão do PDE5A foram utilizados primers (Invitrogen

Custom Primers) USA 2017, complementares a sequência dos mRNAs dos seguintes genes: hGAPDH-F, hGAPDH-R, hPDE5A-F, hPDE5A-R. As sequências de primers utilizados está descrita no Quadro 2.

Figura 14 - StepOnePlus™ Real-Time PCR System



(Fonte: A Autora, 2018)

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.6.1 Cálculo do Tamanho Amostral

O tamanho da amostra foi calculado para detectar diferenças padronizadas entre as médias $\geq 0,5$ unidades de desvio padrão, poder estatístico de 90% $(1-\beta) \times 100$ e nível de significância (α) de 5%. Considerando o número de controles duas vezes maior que o número de pacientes com síndrome de pré-eclâmpsia, seriam necessárias 100 gestantes normotensas para 51 pacientes com SPE.

5.6.2. Análise dos dados

Estatística descritiva da amostra permitiu relatar os dados por média \pm desvio padrão, mediana (mínimo e máximo) e números absolutos e percentuais para variáveis categóricas. As comparações foram realizadas utilizando teste t de Student quando as variáveis apresentavam distribuição normal, e Mann-Whitney para

distribuições assimétricas. Correlações foram verificadas pelos testes de correlação de Pearson ou Spearman.

Na análise dos dados relacionados à expressão gênica, o método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para obter a expressão do gene PDE5 em relação ao controle endógeno GAPDH. Considerando os valores do grupo de gestantes controles como sendo de referência, foi possível estabelecer uma comparação utilizando a Regressão de Poisson, juntamente com seu subtipo Binomial Negativa.

Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software Statistical Package for Social Sciences para Windows, Inc, versão 21.0.

5.7 APOIO FINANCEIRO

O projeto recebeu apoio financeiro do CNPq. Esse orçamento foi custeado pela referida agência governamental com contrapartida do HSL/PUCRS (APÊNDICE C).

Resultados

6. RESULTADOS

A amostra foi composta por 151 gestantes, sendo 100 normotensas (GN) e 51 com SPE. No grupo SPE apenas 1 paciente desenvolveu 1 HELLP e 1 eclâmpsia. Os dados clínicos e demográficos maternos estão apresentados na Tabela 1, e os dos neonatos estão apresentados na Tabela 2. Os resultados encontrados nas distintas técnicas de dosagem referentes à Atividade Enzimática, Concentração e o Método qRT-PCR estão apresentados nas Figuras 15, 16, 17 e 18. Todos esses ensaios foram realizados no Laboratório de Nefrologia/ESMED/PUCRS (durante o período de novembro de 2017 a novembro de 2018).

Tabela 1 - Características dos dados clínicos e demográficos maternos.

Variáveis	GN (n=100)	SPE (n=51)	P
Idade (anos)	26,8±6,62	28,3±7,46	0,194
Raça (n (%))			
Caucasiana	61 (61%)	44 (86,3%)	0,003**
Peso (kg)	79,6±14,4	84,1±16,0	0,086
Altura (cm)	161,6±6,5	161,1±6,4	0,639
PAS (mmHg)	122,3±10,3	150,5±12,4	<0,001
PAD (mmHg)	74,9±9,0	92,1±10,2	<0,001
IGO (semanas) da inclusão no estudo	39,3±1,4	36,3±3,8	<0,001
Número de Gestações	2,2±1,3	2,2±1,4	0,911*
Número de Partos	1,0± 1,2	1,14± 1,3	0,661*

GN: Gestante normotensa; SPE: Síndrome de Pré-eclâmpsia; Teste *t* de Student; *Teste Mann-Whitney; ** Qui-quadrado; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IGO: Idade gestacional obstétrica.

Tabela 2 - Dados clínicos do recém-nascido de gestantes normotensas e com SPE.

Variáveis	GN (n=100)	SPE (n=51)	P
Peso do RN (gramas)	3320±399	2719±847	<0,001
Apgar 1 minuto	8,5±0,9	7,9±1,7	0,008
Apgar 5 minutos	9,1±0,5	8,8±1,4	0,048
Classificação do RN (n (%))			
AIG	54 (54,5%)	34 (66,7%)	
GIG	31 (31,3%)	2 (3,9%)	<0,001*
PIG	14 (14,1%)	15 (29,4%)	

Teste *t* de Student; *Teste Qui-Quadrado; AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional; PIG: pequeno para idade gestacional.

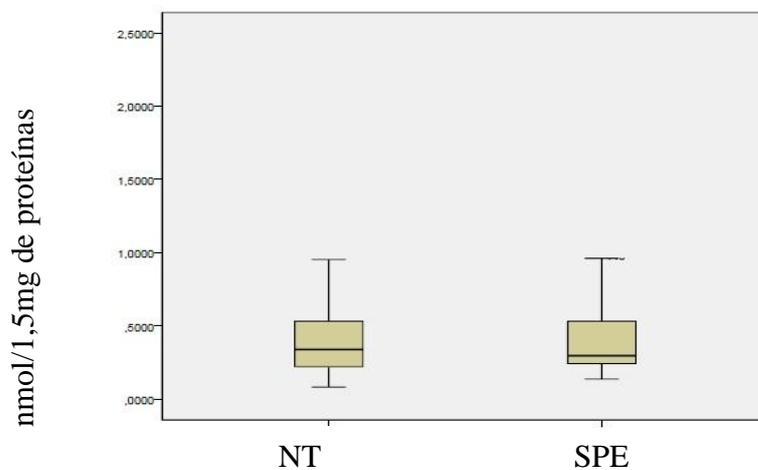
A idade gestacional e os pesos de RNs foram menores em pacientes com SPE quando comparadas ao grupo controle. Da mesma forma, as PAS e PAD, ambas foram mais elevadas nas gestantes com pré-eclâmpsia. A raça autodeclarada teve maior ocorrência de caucasianas, em especial, no grupo com pré-eclâmpsia. Em relação à classificação do RN: observou-se maior frequência de pequeno para idade gestacional (PIG) de pacientes com SPE e grande para idade gestacional (GIG) no grupo controle. Já a mediana da razão proteinúria P/C (proteinúria/creatininúria), dado avaliado apenas na SPE foi de 0,72 g/g (0,3-39,3).

A concentração de níveis plasmáticos de PDE5 não apresentou diferença significativa entre os valores encontrados nos grupos. No GN a média e o desvio padrão foram de 0,11±0,04 ng/mL, e nas gestantes com PE foi 0,11±0,01 ng/mL (utilizando teste Mann-Whitney $p=0,307$). A atividade enzimática da PDE foi apresentada em nmol/1,5 mg de proteínas (Método de Bradford), significando a quantidade de GMP liberado na reação por mg de proteína placentária na amostra. Avaliada no tecido placentário, a atividade enzimática da PDE foi equivalente entre os grupos de gestantes. A quantidade de proteína encontrada no grupo com SPE teve uma média de 0,42±0,26 nmol/1,5 mg de proteínas da placenta, enquanto no grupo de GN a média foi de

0,41±0,28 nmol/1,5 mg de proteínas ($p=0,955$), ambos valores corrigidos pela massa de proteína placentária, conforme instruções do fabricante.

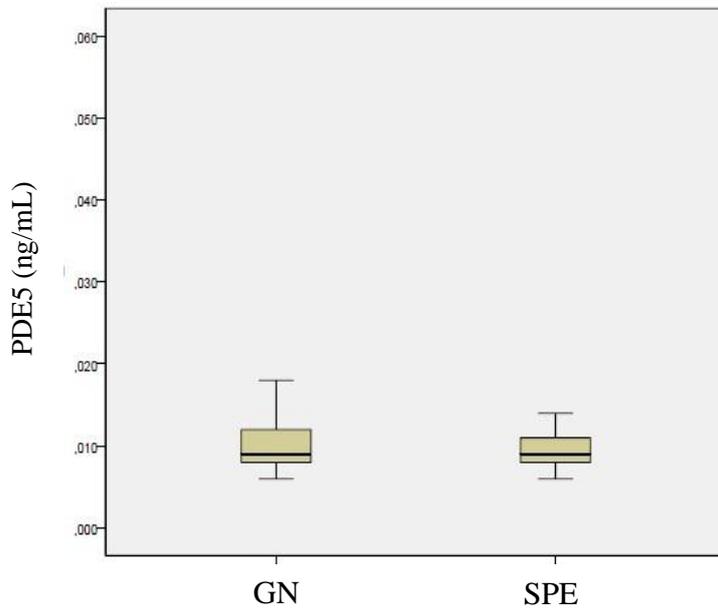
A expressão relativa média de mRNA na PDE5 no tecido placentário foi 1,125 vezes maior ($p>0,001$) nas gestantes com SPE. E a expressão gênica do GN foi utilizada como valor de referência, enquanto, na SPE os valores variaram de 0,1 até 5.454,9 vezes em relação ao grupo de referência - GN. A Figura 15 representa graficamente os resultados da atividade enzimática. Os demais resultados relacionados às Figuras 16 e 17 correspondem às mensurações da concentração e qRT-PCR, respectivamente.

Figura 15 - Atividade Enzimática da Fosfodiesterase em placentas.



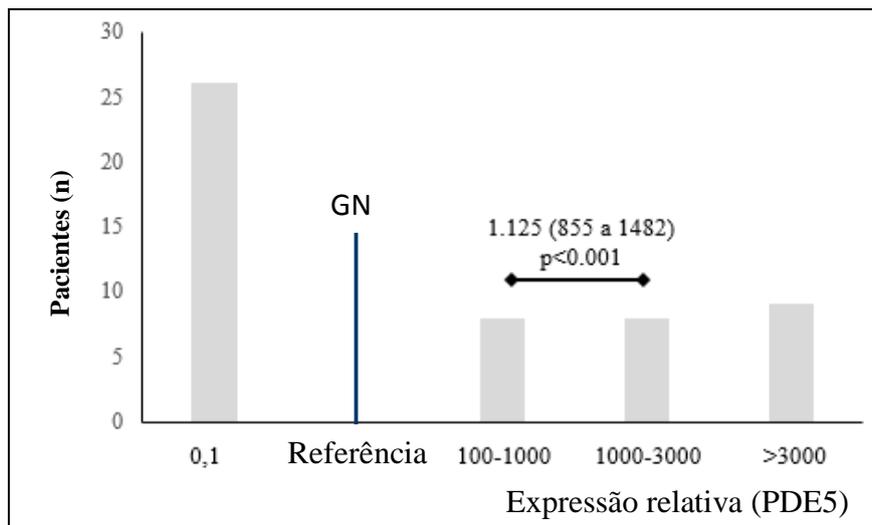
Legenda- GN: Grupo Normotensas, SPE: Síndrome de Pré-Eclâmpsia, PDE: Fosfodiesterase-Método Colorimétrico, $p= 0, 955$. (Fonte: A Autora, 2018)

Figura 16 - Concentração da Fosfodiesterase-5 no plasma materno por método ELISA.



Legenda- GN: Grupo Normotensas, SPE: Síndrome de Pré-Eclâmpsia, PDE5: Fosfodiesterase tipo 5, $p=0,307$. (Fonte: A Autora, 2018)

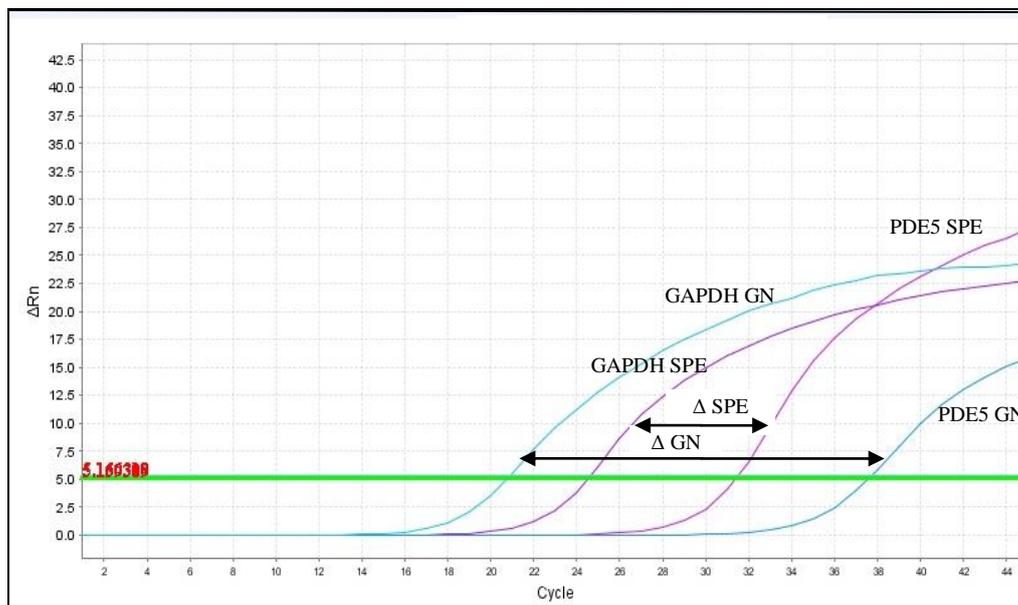
Figura 17 - Expressão relativa do mRNA da PDE5 em pacientes com SPE



Legenda: A gravidez normal foi usada como referência. A expressão relativa média (ERM) está representada. As barras correspondem a frequência nos diferentes intervalos de expressão relativa de mRNA de PDE5 no grupo da SPE em comparação com a referência média do grupo de gestantes normais. (Fonte: A Autora, 2018)

A Figura 18, correspondente ao gráfico que demonstra as fases de amplificação da expressão relativa de mRNA de PDE5 na placenta de gestantes normotensas e SPE e o do gene GAPDH como controle endógeno. O valor de delta (Δ) refere a variação entre o mínimo e o máximo de ciclos necessários para expressar o gene PDE5 em relação ao GAPDH, mostrando que na SPE são necessários menos ciclos para a transcrição do gene.

Figura 18 – Representação gráfica da expressão relativa de mRNA de gravidez normotensa e Pré-Eclâmpsia (Fase de Amplificação)



Legenda: GN: grupo controle normotensas (azul); SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia (roxo), GAPDH: Glicerladeído-3-fosfato desidrogenase. (Fonte: A Autora)

O APÊNDICE D apresenta o artigo contendo os principais resultados encontrados no presente estudo. O artigo será submetido ao periódico American Journal Obstetrics and Gynecology (AJOG). No APÊNDICE E, itens 2, 3, 4 e 5 estão apresentados os trabalhos produzidos durante o período de doutorado.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Os dados resultantes deste estudo demonstram, pela primeira vez na literatura, o aumento da expressão de mRNA da PDE5 nas placentas de gestantes com SPE, estabelecendo um perfil único em relação a população estudada. Por outro lado, a atividade enzimática da PDE placentária não foi diferente nas gestantes com SPE. Além dos dados placentários, no plasma materno foi verificado que a concentração de PDE5 não foi significativamente diferente entre os grupos.

A hipótese deste estudo era de que a concentração plasmática da PDE5, e a atividade enzimática e a expressão de mRNA da PDE5 seriam maiores em pacientes com SPE, em relação ao grupo controle. Avaliou-se as concentrações no plasma materno, a atividade enzimática e a expressão de mRNA no tecido placentário da PDE e PDE5 respectivamente nas gestantes normotensas e nas acometidas pela SPE. A hipótese foi confirmada apenas para a expressão placentária de mRNA.

Nos registros clínicos maternos, as gestantes apresentaram uma maior ocorrência da raça caucasiana autodeclarada, especialmente mulheres com SPE. Este achado era esperado, uma vez que a raça de afrodescendentes é ainda considerada um fator de risco para a hipertensão arterial, e por consequência para SPE (NHBPEPWG, 2000; FILHO, 2010; ARTERIAL DBDH, 2017). No Brasil existe grande miscigenação racial e seguindo orientações éticas a raça foi autodeclarada, o que pode ter contribuído para não uniformidade dos grupos. Além disso, no Sul do Brasil temos alta concentração de população caucasiana, corroborando com o perfil de pacientes do HSL. O peso das gestantes também é outro fator considerado de risco e predisponente para SPE (NHBPEPWG, 2000; SIBAI et al, 2005), no entanto, em nosso estudo não tivemos diferença significativa entre os grupos. Algumas das diferenças encontradas na Tabela 1 eram esperadas, pois eram dependentes da definição dos grupos, como a pressão arterial. A ocorrência de complicações maternas graves foi baixa, com apenas um caso de síndrome HELLP.

Em relação aos dados neonatais, verificamos consequências da SPE nos recém-nascidos destas mães. Os achados são característicos: menor peso, menor apgar e mais RN pequenos para PIG; a prematuridade também já era esperada (NHBPEPWG,

2000; SIBAI et al., 2005). O Índice de Apgar com 1 e 5 minutos são parâmetros para avaliação das condições dos RN após o nascimento, e o pior desempenho ocorreu nos RN das gestantes com SPE, provavelmente resultado da presença de hipoperfusão uteroplacentária e prematuridade (APGAR, 1953; VINNARS et al, 2014).

Os dados clínicos nos mostram achados típicos da SPE com consequências maternas e fetais. É uma doença de etiologia não conhecida e o diagnóstico é baseado na apresentação dos sinais e sintomas desta síndrome. O entendimento da fisiopatologia tem evoluído de forma rápida, mas ainda não está completamente elucidado. Como consequência a SPE é definida de maneira distinta por diferentes grupos e sociedades (NHBPEPWG, 2000; NICE, 2010; SOGC, 2014; ACOG, 2013).

Aspectos vasculares são fundamentais nas duas etapas. A regulação vascular é complexa e resulta da integração de diversas rotas. Uma das vias inicia com a entrada da L-arginina na célula endotelial, e os passos seguintes passam pela metabolização deste aminoácido pela sintase do óxido nítrico e consequente liberação do NO. O NO difunde para a célula muscular lisa ativando a guanilato ciclase e produzindo cGMP que irá efetivar o relaxamento vascular. Trabalhos no nosso laboratório mostraram que vários aspectos da Via L-arginina-NO-GMPc estão alterados na pré-eclâmpsia: aumento do transporte transmembrana de L-arginina (GALÃO et al, 2004), redução da função endotelial dependente do NO em concentrações variáveis no plasma das gestantes (ACAUAN FILHO et al, 2016) e particularmente aumento da ação fosfodiesterásica no soro na PE (PINHEIRO DA COSTA et al, 2006) achado motivador para a realização deste estudo. A fosfodiesterase hidrolisa o cGMP inativando sua ação, resultando de fato em uma redução na ação vasodilatadora do NO. O presente estudo buscou entender o que acontece neste seguimento da via.

A diminuição da biodisponibilidade do NO é elemento central da pré-eclâmpsia. O trabalho do nosso grupo levantou a hipótese de que a fosfodiesterase poderia ser importante neste efeito. O soro de gestantes com SPE apresentava atividade fosfodiesterásica aumentada (PINHEIRO DA COSTA et al, 2006). Na placenta, o aumento da expressão de PDE5 sugere que este possa ser um fator placentário participando na pré-elâmpsia. No modelo de roedores com redução da perfusão uterina (modelo RUPP) a isquemia placentária estava associada com 50% de aumento na PDE5 (GEORGE et al, 2013). Inibição da PDE5 atenua a isquemia placentária neste modelo, mas o estudo não examinou a expressão de PDE5 após a administração do Sildenafil.

O desbalanço angiogênico da SPE está intimamente relacionado com a disfunção endotelial e com a Via L-arginina-NO-GMPc. O aumento de sFlit, com consequente diminuição de VEGF e PLGF foi descrito recentemente. No modelo RUPP, apesar do sildenafil melhorar a perfusão placentária não ocorreu melhora na produção de sFlit ou nas concentrações da molécula proangiogênica VEGF (GEORGE et al, 2013). A alteração na expressão de PDE5 reforça a nossa hipótese de que intervenções nesta via tem potencial de prevenir a SPE, de melhorar a perfusão placentária e prevenir ou retardar a síndrome sistêmica materna.

A hipoxemia uteroplacentária leva a estresse oxidativo materno e estado inflamatório sistêmico que geram a síndrome clínica. A isquemia placentária leva a alterações oxidativas locais. A hipoxemia promove interação entre o NO e o anion superóxido com produção do potente oxidante peroxinitrito. A liberação de fatores placentários na circulação materna gera o quadro sistêmico com as manifestações em múltiplos órgãos da pré-eclâmpsia. O estado materno é de estresse oxidativo e inflamação generalizada com disfunção endotelial e vasoconstrição. Portanto, novamente a via da fosfodiesterase é um alvo para tratamento das manifestações sistêmicas como a hipertensão. A inibição da fosfodiesterase pode melhorar a perfusão placentária, mas também pode resultar em modificação da produção medular renal de cGMP (GEORGE et al., 2013). Os efeitos nesta via, portanto, podem também estar relacionados a alterações na fisiologia renal durante a gestação e/ou pré-eclâmpsia. O rim é um órgão chave e pode levar a hipertensão, proteinúria e injúria renal aguda.

A atividade enzimática placentária da PDE não foi diferente nas pré-eclâmplicas. Os dados referentes à PDE no tecido placentário ainda estão faltando para pacientes com PE (DOWNING et al, 2004). Reguladores da PDE podem participar. Uma das alternativas seria verificar as mudanças no regulador endógeno P54^{nrb}/NONO da PDE (LU E SEWER, 2015) ou em outros sistemas de inibição/degradação relacionados à transcrição de proteína como as proteínas de choque térmico (SHIN et al, 2011).

Ainda, é paradoxal que os níveis placentários de NOS na SPE estejam aumentados segundo Rutherford e colaboradores, 1995 e diminuídos de acordo com Brennecke e colaboradores, 1997. Estes achados nos sistemas biológicos podem estar relacionados aos aumentos de níveis de mRNA da PDE5 em uma tentativa de interagir com a alta produção de óxido nítrico placentário (SHAAMASH et al, 2001). Considerando que metade da amostra de PE no presente estudo mostrou aumento de

produção de PDE5, este achado pode explicar os achados controversos de Rutherford e colaboradores, 1995 e Brennecke e colaboradores, 1997.

A expressão relativa média de mRNA na PDE5 no tecido placentário, foi medida a partir da diferença entre o número de ciclos térmicos dos genes GAPDH e PDE5 foi maior, nas gestantes com SPE. O número de ciclos térmicos no qRT-PCR- foi estatisticamente menor neste grupo porque a diferença entre esses ciclos térmicos dos genes GAPDH e PDE5 foram mensurados relacionando o nível mínimo - na curva de cada gestante nesses dois grupos. Ou seja, quanto mais elevada for à expressão da enzima, é necessário menos tempo e/ou menos ciclos térmicos para haver essa manifestação. O valor resultante entre a diferença de GAPDH e PDE é conhecido como delta. E com base neste valor, calculou-se a expressão relativa da PDE5 no tecido placentário, usando o método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). E a expressão relativa média de mRNA da PDE5 no tecido placentário foi maior nas gestantes com SPE, ponto forte da pesquisa.

Obtivemos a maior diferença estatística nos níveis de mRNA da PDE5 na placenta, o que nos revelou de antemão, a possibilidade de a placenta ser o ponto central de origem dessa síndrome multifatorial, uma vez que libera fatores citotóxicos na circulação materna e promove disfunção endotelial (REDMAN, 1991; SIBAI et al, 1993; BORZYCHOWSKI et al, 2006; MUTTER E KARUMANCHI, 2008; JIM et al, 2010; KAHHALE E ZUGAIB, 2018).

O achado da atividade enzimática da PDE na placenta sem diferença entre os grupos parece ser antagônico, quando relacionado com a maior síntese de mRNA da PDE5 em condição de isquemia placentária. Entretanto, o cGMP, entre outros fatores, pode ser regulado pelos níveis de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que está alterado na PE (KARTERIS et al, 2005).

Os autores descreveram baixos níveis de cGMP na placenta que estaria em concordância com a falta de alteração da atividade da PDE. É possível que não seja necessário aumento da atividade, ou mesmo produção da PDE, para a degradação do cGMP. Guanilato ciclase solúvel é a responsável pela conversão de GMP em cGMP e polimorfismos foram descritos na placenta humana (RUSSWURM et al, 1998). Múltiplos são os alvos e determinantes moleculares da disfunção vascular na PE (RESLAN E KHALIL, 2010; YU et al, 2018).

O entendimento das interações entre estes diversos fatores bioativos e mediadores vasculares será importante para que possamos explicar todas as interrelações fisiológicas e patológicas na PE (YU et al, 2018).

Outro fator regulador da PDE é a proteína quinase G, responsável pela hidrólise da PDE, controlador da degradação de cGMP (RYBALKIN et al, 2003) e descrita com grandes concentrações na placenta humana (SANDBERG et al, 1989). Segundo Rybalkin e colaboradores, 2003 enfatiza-se a importância da Proteína quinase GI no mecanismo de regulação presente nos estágios chaves de terminação do relaxamento, é evidentemente na relação à Via L-arginina-NO-GMPc, e na preparação das células musculares lisas para novos ciclos de contração.

Considerando os altos níveis de NOS Rutherford e colaboradores, 1995 e NO na placenta (SHAAMASH et al., 2001), sugere aumento na produção de cGMP. Uma possível explicação para não detectarmos diferença entre os grupos pode ser o método de detecção da atividade enzimática disponível. O ensaio comercialmente disponível é um ensaio que avalia a totalidade da atividade de PDE e para definirmos o componente específico da PDE5 é necessário o emprego de inibidores.

A disfunção endotelial placentária e maternal (ACAUAN FILHO et al, 2016) apresentam componentes derivados do endotélio e relacionados com a alteração na biodisponibilidade de NO na SPE. A inibição da fosfodiesterase pelo Sildenafil e seus análogos (GEORGE et al, 2013) pode ser importante para reduzir a hipertensão relacionada com isquemia placentária.

Já a elevação da ação fosfodiesterásica do soro materno nas gestantes com pré-eclâmpsia resulta em menor ação do óxido nítrico na vasculatura das gestantes com PE, e forma um quadro típico de vasoconstrição, favorecendo o aumento da pressão arterial sistêmica (PINHEIRO DA COSTA et al, 2006). Segundo Acauan e colaboradores, 2016, há também um comportamento não satisfatório do cGMP em contribuição direta para essa vasoconstrição clássica presente na SPE. Em nossos achados porém, o nível de PDE5 circulante no plasma das gestantes não teve diferença significativa entre as normais e as pré-eclâmpicas. Os níveis de PDE5 sendo normais e a ação fosfodiesterásica aumentada na pré-eclâmpsia, pode estar relacionadas alteração funcional da enzima, seja a capacidade de transporte ($V_{m\acute{a}x}$) ou na afinidade (K_m), sem relação com a quantidade de enzima. Não podemos afastar que outras isoformas da fosfodiesterase sejam responsáveis pelo efeito da ação fosfodiesterásica do soro das pré-

eclâmptica, mas infelizmente não examinamos a atividade enzimática da PDE5 no presente estudo (não havendo kit específico, disponível no mercado atualmente).

Investigamos a concentração e não a atividade enzimática, no plasma materno especificamente, tendo presença de enzimas em menor quantidade, porém, possivelmente muito mais ativas. Quanto ao local de atuação da PDE5 na pré-eclâmpsia, o nosso estudo sugere indícios de que não é no plasma materno, e sim, na *placenta* o principal sítio de atuação. A isoforma estudada pode não ser a principal no plasma/soro materno e abre caminho para serem testados os demais isotipos 6 e 9 (os quais também são responsáveis pela degradação do substrato GMP cíclico (LIN et al, 2006; LARRÉ et al, 2017)).

O estudo apresentou algumas limitações. Dificuldades na abordagem e na coleta já que ambas aconteciam dentro do centro obstétrico do HSL. Para melhor caracterização do grupo de SPE e das gestantes normais usamos critérios rígidos, limitando o número de gestantes incluídas. Tivemos limitações de orçamento não sendo possível avaliar a atividade plasmática da PDE5 e avaliar os níveis das moléculas avaliadas no sangue do cordão umbilical, bem como não foi possível estudar o p54nrb/NONO (LU E SEWER, 2015) – proteína envolvida na regulação da expressão e do controle da degradação das diferentes isoformas de PDE, que desempenha um papel crucial no controle intracelular dos níveis de cAMP, assim agindo na sinalização cAMP- dependente. Sua ação, portanto, regula a habilidade do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ativando a biossíntese do cortisol, tornando-se um possível substrato de fármaco a ser investigado para auxiliar no tratamento da SPE, juntamente com as PDE (EMILI et al, 2002; LU e SEWER, 2015).

Os achados do presente estudo sugerem que em pacientes com SPE ocorre disfunção da Via L-arginina-NO-GMPc, especialmente na degradação de seu produto final pela PDE. A PDE5 é um dos componentes desta via e os nossos dados indicam que participa na disfunção placentária da pré-eclâmpsia. Estudo como esse contribuem para o entendimento do papel do Sildenafil e sua possível atuação na queda da pressão arterial pela prevenção da hidrólise do cGMP placentário, reduzindo a hipoperfusão, levando a prorrogação da gravidez. (SIBAI et al, 1993; DOWNING et al, 2004; EVERETT et al, 2012; LARRÉ et al, 2017; SIBLEY, 2017; TANAKA et al, 2017),

Conclusão

8. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou um aumento na expressão de mRNA de PDE5, através da realização do método qRT-PCR, nas placentas de gestantes com SPE quando comparadas às gestantes normotensas. Em relação aos demais experimentos: a atividade enzimática placentária da PDE apresentou equivalência em ambos grupos; enquanto a quantidade de PDE5 no plasma materno também não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Ao mesmo tempo, este estudo foi pioneiro na análise relacionada ao gene da PDE5 com posterior correlação com dados clínicos maternos e fetais. Além da análise da dosagem simultânea, realizada no plasma materno e nas placentas, evidenciando heterogeneidade entre as concentrações dos grupos de gestantes normotensas *versus* gestantes com SPE. Avaliando a correlação entre os achados e os dados clínicos disponíveis, foi possível verificar que o desfecho e as intercorrências durante a gestação, como o aumento da pressão arterial nas gestantes e o baixo ganho de peso fetal, foram mais nocivos nas pacientes com SPE quando comparados aos das pacientes normotensas.

Assim, findamos o presente estudo ofertando o embasamento necessário para futuras investigações de fármacos que possam amenizar as principais manifestações clínicas dessa síndrome, principalmente naqueles que atuem na Via L-arginina-NO-GMPc. Além de contribuirmos para melhora na prevenção e no tratamento deste quadro patológico tão recorrente, o qual ainda acomete de forma invasiva e alarmante, um número respeitável de gestantes pelo mundo.

8.1 PERSPECTIVAS

Como perspectivas pretendemos realizar a técnica de ensaio para Imunohistoquímica, e o PCR específico para P54^{nrb}/NONO, no tecido placentário. Almeja-se que o entendimento deste conjunto de ensaios e dosagens, possa levar a descoberta de um possível biomarcador- o qual passe a ser usado no início da gestação, antes da 20^a semana (para fins de diagnóstico ou potencial alvo terapêutico na SPE).

O artigo fruto deste trabalho localiza-se no APÊNDICE D - Artigo será enviado para Submissão.

9. REFERÊNCIAS

ACAUAN FILHO, B.J. et al. Serum nitrate and NO_x levels in preeclampsia are higher than in normal pregnancy. **Hypertens Pregnancy**, v. 35, n. 2, p. 226-233, May 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27003519>. Acesso em: 15 abril 2019.

ACOG- American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension In Pregnancy: Executive Summary. **Obstet Gynecol.**, v. 122, n. 5, p. 1122-1131, 2013. Disponível em: https://www.hypertasi.gr/UsersFiles/Documents/guidelines/2013_amerikaniko-kollegio-maieythrn_ypertash-kai-egkymosynh.pdf. Acesso em: 15 abril 2019.

ALMEIDA, G.B.S.; SOUZA, M.C.M. O conhecimento da gestante sobre a hipertensão na gravidez. **Rev. Aps.**, v. 19, p. 396-402, 2016.

APGAR, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. **Curr Res Anesth Analg**, v. 32, n. 4, p. 260-267, Jul-Aug 1953. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13083014>. Acesso: 15 abril 2019.

ARTERIAL, D.B.D.H. Pocket Book Light. **Diretrizes e Cardiologia**, 2017.

BARTON, J.R.; SIBAI, B.M. Diagnosis and management of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Clin Perinatol**, v. 31, n. 4, p. 807-33, VII, Dec 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519429>. Acesso em: 15 abril 2019.

BEAVO, J.A.; BRUNTON, L.L. Cyclic nucleotide research still expanding after half a century. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 9, p. 710-718, Sep 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209131>. Acesso em: 15 de abril 2019.

BENDER, A.T.; BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 488-520, Sep 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968949>. Acesso em: 15 de abril 2019.

BORZYCHOWSKI, A.M.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W. Inflammation and pre-eclampsia. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 11, n. 5, p. 309-316, Oct 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828580>. Acesso em: 15 de abril 2019.

BRANDÃO, A.H.F.E.A. Dilatação Fluxo-Mediada da artéria braquial como método de avaliação da função endotelial na PE e em gestantes normotensas. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, p. 9-13, 2011. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dic/publicacoes/revistadic/revista/2008/Revista01/06-dilatacao.pdf>. Acesso em: 15 de abril 2019.

BRANDÃO, A.H.F.E.A. Função Endotelial, Perfusão Uterina e Fluxo Central em Gestações Complicadas por Pré-Eclâmpsia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/2012nahead/aop08412.pdf>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

BRENNECKE S.P.; GUDE N.M.; DI IULIO J.L.; KING R.G. Reduction of placental nitric oxide synthase activity in pre-eclampsia. **Clin Sci.**, v. 93, ed. 1; p. 51-55, 1997. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9279203>. Acesso em: 15 de abril 2019.

BURKE, S.D. et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. **J Clin Invest**, v. 126, n. 7, p. 2561-2574, Jul 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27270170>. Acesso em: 15 de abril 2019.

BYRNE, T.J. A "cure" for preeclampsia: Improving neonatal outcomes by overcoming excess fetal placental vascular resistance. **Med Hypotheses**, v. 85, n. 3, p. 311-319, Sep 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26105573>. Acesso em: 15 de abril 2019.

CALIXTO, A.C.E.A. Predição de PE por dopplerfluxometria. **Revista de Radiologia Brasileira**, v. 47, p. 14-17, 2014. Disponível em: <file:C:/Users/DELL/Downloads/v47n1a08.pdf>. Acesso em: 15 de abril 2019.

CAMPOLO, F. et al. Identification of murine phosphodiesterase 5A isoforms and their functional characterization in HL-1 cardiac cell line. **J Cell Physiol**, v. 233, n.1, p. 325-337, Jan 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28247930>. Acesso em: 15 de abril 2019.

CARDARELLI, S. et al. The oligomeric assembly of the phosphodiesterase-5 is a mixture of dimers and tetramers: A putative role in the regulation of function. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**, v. 1862, n. 10, p. 2183-2190, Jul 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30025857>. Acesso em: 15 de abril 2019.

CHAIWORAPONGSA, T. et al. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. **Nat Rev Nephrol**, v. 10, n. 8, p. 466-80, Aug 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003615>. Acesso em: 15 de abril 2019.

CHAMBERS, J.C. et al. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. **JAMA**, v. 285, n. 12, p. 1607-12, Mar 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268269>. Acesso em: 15 de abril 2019.

CUNNINGHAM, F.G.; GANT, N.F.; LEVENO, K.J.; GILSTRAP, L.C.; HAUTH, J.C.; WENSTROM, K.D. **Hypertensive disorders in pregnancy**. In Willians Obstetrics, 21. ed., Nova York: McGraw-Hill, p.567-618, 2001.

CURI, R.E.A. **Entendendo as Gorduras - Os ácidos graxos**. Editora Manole, p. 580, 2002.

DAVIES, M. The formation of immune complexes in primiparous and multiparous human pregnancies. **Immunol Lett**, v. 10, n. 3-4, p. 199-205, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4044016>. Acesso em: 15 de abril 2019.

DE PAOLI, S. **Citologia e Embriologia**. 2.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2015.

DENINNO, M.P. Future directions in phosphodiesterase drug discovery. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n. 22, p. 6794-800, Nov 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046962>. Acesso em: 15 de abril 2019.

DE MOORE, K.L.; PERSAUD T.V.N. **Embriologia Clínica**.7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DOWNING, J.W. et al. Hypothesis: selective phosphodiesterase-5 inhibition improves outcome in preeclampsia. **Med Hypotheses**, v. 63, n. 6, p. 1057-1064, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504576>. Acesso em: 15 de abril 2019.

EMILI, A. et al. Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nono bind to the RNA polymerase II CTD. **RNA**, v. 8, n. 9, p. 1102-1111, Sep 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358429>. Acesso em: 15 de abril 2019.

EVERETT, T.R.; WILKINSON, I.B.; LEES, C.C. Drug development in preeclampsia: a 'no go' area? **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. 1, p. 50-52, Jan 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21391756>. Acesso em: 15 de abril 2019.

FACCA, T.A.E.A. Preeclampsia (marker of chronic kidney disease): from genesis to future risks. **J Bras Nefrol.**, p. 87-93, 2012. Disponível em : <file:///C:/Users/DELL/Downloads/v34n1a15.pdf>. Acesso em: 15 de abril 2019.

FILHO, J.R.M. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 95, p. 1-51, 2010. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2010/Diretriz_hipertensao_associados.pdf. Acesso em: 15 de abril 2019.

FOLK, D.M. Hypertensive Disorders of Pregnancy: Overview and Current Recommendations. **J Midwifery Womens Health**, v. 63, n. 3, p. 289-300, May 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29764001>. Acesso em: 15 de abril 2019.

FOUND, S.A. et al. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 15-24, Jan 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027158>. Acesso em: 15 de abril 2019.

FRANCIS, S.H.; TURKO, I.V.; CORBIN, J.D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 65, p. 1-52, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11008484>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GAIÃO, D.S. et al. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. **Hypertens Pregnancy**, v. 20, n. 3, p. 269-281, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044335>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GALÃO, A.O. et al. L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately postpartum. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, n. 2, p. 572-575, Aug 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15343239>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GEORGE, E.M. New approaches for managing preeclampsia: clues from clinical and basic research. **Clin Ther**, v. 36, n. 12, p. 1873-1881, Dec 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450475>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GEORGE, E.M.; GRANGER, J.P. Response to: Using Carbon Monoxide Releasing Molecules in Models of Pre-Eclampsia: When Should We Be Monitoring Vascular Effects? **Am J Hypertens**, v. 30, n. 10, p. e11, Oct 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911026>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GEORGE, E.M. et al. Sildenafil attenuates placental ischemia-induced hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, n. 4, p. R397-403, Aug 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23785075>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GEORGE, E.M.; PALEI, A.C.; GRANGER, J.P. Endothelin as a final common pathway in the pathophysiology of preeclampsia: therapeutic implications. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. v. 21, n. 2, p. 157-162, Mar, 2012. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446253/>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GHOFRANI, H.A.; OSTERLOH, I H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 8, p. 689-702, Aug 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883306>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GOKINA, N.I.; GOECKS, T. Upregulation of endothelial cell Ca²⁺ signaling contributes to pregnancy-enhanced vasodilation of rat uteroplacental arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 5, p. H2124-2135, May 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327017>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GOKINA, N.I.; KUZINA, O.Y.; VANCE, A.M. Augmented EDHF signaling in rat uteroplacental vasculature during late pregnancy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, n. 5, p.H1642-1652, Nov 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817830>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GRANGER, J.P.; ALEXANDER B.T.; LLINAS M.T.; BENNETT W.A.; KHALIL R. A. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 38, p. 718-722, 2001. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566964>. Acesso em: 15 de abril 2019.

GREER, I.A. et al. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? **Obstet Gynecol**, v. 84, n. 6, p. 937-940, Dec 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7526306>. Acesso em: 15 de abril 2019.

HADDAD, B. et al. HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome versus severe preeclampsia: onset at < or =28.0 weeks' gestation. **Am J Obstet Gynecol**, v.183, n.6, p.1475-1479, Dec 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120513>. Acesso em: 15 de abril 2019.

HENTSCHKE, M.R.E.A. Aumento dos níveis do receptor solúvel da Interleucina-6 em pacientes com PE em relação a gestantes normotensas. **Revista Scientia Medica (Porto Alegre)**, v. 23, p. 213-218, 2013. Disponível em: file:///C:/Users/DELL/Downloads/Aumento_dos_niveis_do_receptor_soluvell_da_Interleu.pdf. Acesso em: 15 de abril 2019.

HILL, M.A. Early human development. **Clin Obstet Gynecol**, v. 50, n. 1, p. 2-9, Mar 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304021>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304021>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

HNAT, M.D. et al. Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 3, p. 422-426, Mar 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904601>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

IZUMI, H.; GARFIELD, R.E.; MAKINO, Y.; SHIRAKAWA, K.; ITOH, T. Gestational changes in endothelium-dependent vasorelaxation in human umbilical artery. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 170 (1Pt 1), p. 236-245, Jan. 1994.

IOAKEIMIDIS, N.; KOSTIS, J.B. Pharmacologic therapy for erectile dysfunction and its interaction with the cardiovascular system. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 19, n. 1, p. 53-64, Jan 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281316>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

JIM, B. et al. Hypertension in pregnancy: a comprehensive update. **Cardiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 178-89, Jul-Aug 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539101>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KAHHALE S, F.R., ZUGAIB M. Pré-Eclampsia. **Revista Medicina da USP**, v. 2, p. 226-234, 2018. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/143203/140802>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KAKIGANO, A. et al. Drug Repositioning for Preeclampsia Therapeutics by In Vitro Screening: Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Restores Endothelial Dysfunction via Induction of Placental Growth Factor. **Reprod Sci**, v. 22, n. 10, p. 1272-1280, Oct 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25736325>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KARTERIS, E. et al. Preeclampsia is associated with impaired regulation of the placental nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway by corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-related peptides. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 6, p. 3680-3687, Jun 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784708>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 5, p. 1288-1305, Mar 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22014080>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KHONG, T.Y. et al. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 93, n. 10, p. 1049-1059, Oct 1986. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3790464>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KOUVELAS, D. et al. PDE5 inhibitors: in vitro and in vivo pharmacological profile. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 30, p. 3464-3475, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860692>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

KUKREJA, R.C. et al. Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 36, n. 2, p. 165-173, Feb 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871543>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LARRÉ, A.B. et al. Phosphodiesterases and preeclampsia. **Med Hypotheses**, v. 108, p. 94-100, Oct 2017. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29055408>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LARRÉ, A.B. et al. Phosphodiesterase Inhibition in the Treatment of Preeclampsia: What Is New? **Curr Hypertens Rep**, v. 20, n. 10, p. 83, Jul 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30051151>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LEUNG, H.Y.; SAINI, B.; RITCHIE, H.E. Medications and pregnancy: The role of community pharmacists - A descriptive study. **PLOS One**, v. 13, n. 5, p. e0195101, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29742159>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LEVINE, R.J. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 7, p. 672-683, Feb 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764923>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LIN, C.S. et al. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 27, p. 3439-357, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017938>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LOWE, S.A. et al. The Somanz Guidelines for the Management of Hypertensive Disorders of Pregnancy 2014. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 55, n. 1, p. 11-16, Feb

2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25308532>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

LU, J.Y.; SEWER, M.B. p54nrb/NONO regulates cyclic AMP-dependent glucocorticoid production by modulating phosphodiesterase mRNA splicing and degradation. **Mol Cell Biol**, v. 35, n. 7, p. 1223-1237, Apr 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605330>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MALACHIAS, M.V.B.; PLAVNIK, F.L.; MACHADO, C.A. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.107, n. 3, p. 10-13, Set 2016.

MALACHIAS, M.V.B.; PLAVNIK, F.L.; MACHADO, C.A. Guidelines for Arterial Hypertension Management in Primary Health Care in Portuguese Language Countries. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 109, São Paulo, 2017.

MARTIN, J.N. Milestones in the quest for best management of patients with HELLP syndrome (microangiopathic hemolytic anemia, hepatic dysfunction, thrombocytopenia). **Int J Gynaecol Obstet**, v. 121, n. 3, p. 202-207, Jun 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23528799>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MAURICE, D.H. et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 4, p. 290-314, Apr 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687066>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MERT, I. et al. Role of oxidative stress in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 38, n. 4, p. 658-664, Apr 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22380678>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MOFFETT-KING, A. et al. Natural killer cells and pregnancy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 656-663, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209134>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MOL, B.W.J. et al. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 999-1011, Mar 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26342729>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 1, p. 61-74, Jan 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072716>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, Dec 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

MONTENEGRO, C.A.B.; FILHO, J.R. **Obstetrícia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

MONTENEGRO, C.A.B.; REZENDE, F.J. **Obstetrícia Fundamental**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

MUTTER, W P.; KARUMANCHI, S.A. Molecular mechanisms of preeclampsia. **Microvasc Res**, v.75, n.1, p.1-8, Jan 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553534>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

NHBPEPWG - Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **American Journal of Obstetrics Gynecology**. v. 183, p. S1-S22, 2000. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920346>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

NELSON, D.B. et al. Placental pathology suggesting that preeclampsia is more than one disease. **Am J Obstet Gynecol**, v. 210, n. 1, p. 66 e1-7, Jan 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036400>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

NICE- National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines Hypertension in Pregnancy: the Management of Hypertensive Disorders during Pregnancy. **Commissioned by the National Institute for Health and Clinical Excellence**. London: RCOG Press, 2010. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg107/evidence/cg107-hypertension-in-pregnancy-full-guideline3>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

PINHEIRO DA COSTA, B.E. et al. Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia. **BJOG**, v. 113, n. 5, p. 577-579, May 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16637900>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

PINHEIRO DA COSTA, E. B. **Aspectos da via L-Arginina-óxido nítrico na gestação normal e com síndrome de pré-eclâmpsia**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Faculdade de Biologia, UFRGS, Porto Alegre, 2003.

POWE, C.E.; LEVINE, R.J.; KARUMANCHI, S.A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. **Circulation**, v. 123, n. 24, p. 2856-2869, Jun 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690502>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

RATH, W.; FARIDI, A.; DUDENHAUSEN, J.W. HELLP syndrome. **J Perinat Med**, v. 28, n. 4, p. 249-260, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031696>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN C.W. The six stages of pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertens.**, v. 4, n. 3, p. 246, Jul, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104649>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. **Placenta**, v. 12, n. 4, p. 301-308, Jul-Aug 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1946241>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 180, n. 2 Pt 1, p. 499-506, Feb 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988826>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L. Latest advances in understanding preeclampsia. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1592-1594, Jun 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947178>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. **Placenta**, v. 30 Suppl A, p. S38-S42, Mar 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138798>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L. Immunology of pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 534-543, Jun 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331588>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W.; STAFF, A.C. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 213, n. 4 Suppl, p. S9-S11, Oct 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26428507>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L.; STAFF, A.C. IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia- two placental causes of preeclampsia? **Placenta**, v. 35, p. Suppl: S20-25, Jan 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477207>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

REIS, Z.S. et al. Early-onset preeclampsia: is it a better classification for maternal and perinatal outcomes? **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 12, p. 584-590, Dec 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484026>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

RESLAN, O.M.; KHALIL, R.A. Molecular and vascular targets in the pathogenesis and management of the hypertension associated with preeclampsia. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v. 8, n. 4, p. 204-226, Oct 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923405>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

ROBERTS, J.M.; COOPER, D.W. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. **Lancet**, v. 357, n. 9249, p. 53-56, Jan 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11197372>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

ROBERTS, J.M.; HUBEL, C.A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. **Placenta**, v. 30, Suppl A, p. S32-S37, Mar 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070896>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

ROBERTS, J.M. et al. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. **Am J Obstet Gynecol**, v. 161, n. 5, p. 1200-1204, Nov 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2589440>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

RODRIGUES, F.S.M.E.A. Utilização do Verapamil em Pacientes Gestantes Hipertensas. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 4, p. 1, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032000000300013. Acesso em: 15 de abril de 2019.

ROTELLA, D.P. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 9, p. 674-682, Sep 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209148>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

RUSSWURM, M. et al. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. **Biochem J**, v. 335 (Pt 1), p. 125-130, Oct 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742221> Acesso em: 15 de abril de 2019.

RUTHERFORD, R.A. et al. Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and pre-eclamptic pregnancies. **Br Journal Pharmacol.**, vol. 116, ed. 1., p. 3099–3109, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719783>. Acessado em: 15 de abril de 2019.

RYBALKIN, S.D. et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circ Res**, v. 93, n. 4, p. 280-291, Aug 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933699>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SALLES, A.M. et al. Antioxidants for preventing preeclampsia: a systematic review. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 2434-2476, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593668>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SANDBERG, M. et al. Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat. **FEBS Lett**, v. 255, n. 2, p. 321-329, Sep 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2792381>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SANTOS-SILVA, A.J. et al. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. **Eur J Pharmacol**, v. 582, n. 1-3, p. 102-9, Mar 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234184>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SASSER, J.M.; MURPHY, S.R.; GRANGER, J P. Emerging drugs for preeclampsia-the endothelium as a target. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 20, n. 4, p. 527-530, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26138471>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SCHNEIDER, F. et al. Plasma cyclic GMP concentrations and their relationship with changes of blood pressure levels in pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 75, n. 1, p. 40-44, Jan 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8560995>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SEIBEL, I. et al. Efficacy of oral sildenafil in hemodialysis patients with erectile dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 11, p.2770-2775, Nov 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397048>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SIGMA, A. The Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction. Phosphodiesterases, 2016. Disponível em: <http://www.sigmaldrich.com/technical-Documents/articles/biology/rbi-handbook/intracellular-signaling-enzymes/receptors/phosphodiesterases.html>. Acessado em: 15 abril 2019.

SHAAMASH, A.H. et al. Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 72, n. 2, p. 127-133, Feb 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166745>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SHEIBANI, L. et al. Augmented H₂S production via cystathionine-beta-synthase upregulation plays a role in pregnancy-associated uterine vasodilation. **Biol Reprod**, v. 96, n. 3, p. 664-672, Mar 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28339573>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SHIN, J.K. et al. Proteomic analysis reveals an elevated expression of heat shock protein 27 in preeclamptic placentas. **Gynecol Obstet Invest**, v. 71, n. 3, p. 151-157, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21335933>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINEC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 365, n. 9461, p. 785-799, Feb 26-Mar 4, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733721> Acesso em: 15 de abril de 2019.

SIBAI, B.M. et al. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 4, p. 1000-1006, Oct 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238109>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

SIBLEY, C.P. Treating the dysfunctional placenta. **J Endocrinol**, v. 234, n. 2, p. R81-R97, Aug 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28483805> Acesso em: 15 de abril de 2019.

SOGC- SOCIETY OF OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS OF CANADA. Diagnosis, Evaluation, and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy. **Clinical Practice Guideline**, 2014. Disponível em: https://www.preeclampsia.org/pdf/gui206CPG0803_001.pdf. Acesso em: 15 de abril de 2019.

STARK, M.W.; CLARK, L.; CRAVER, R.D. Histologic differences in placentas of preeclamptic/eclamptic gestations by birthweight, placental weight, and time of onset. **Pediatr Dev Pathol**, v. 17, n. 3, p. 181-189, May-Jun 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625285>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

TANAKA, H. et al. Treatment using tadalafil for severe pre-eclampsia with fetal growth restriction. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 43, n.7, p. 1205-1208, Jul 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28503744>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

TRANQUILLI, A.L. et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. **Pregnancy Hypertens**, v. 4, n. 2, p. 97-104, Apr 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104417>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

TRAPANI, A. et al. Perinatal and Hemodynamic Evaluation of Sildenafil Citrate for Preeclampsia Treatment: A Randomized Controlled Trial. **Obstet Gynecol**, v. 128, n. 2, p. 253-259, Aug 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27400005>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

VIGIL-DE GRACIA , P. Pregnancy complicated by pre-eclampsia-eclampsia with HELLP syndrome. *Int J Gynaecol Obstet*, v. 72, n. 1, p. 17-23, Jan 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146072>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

VINNARS, M.T. et al. Association between placental pathology and neonatal outcome in preeclampsia: a large cohort study. **Hypertens Pregnancy**, v. 33, n. 2, p. 145-158, May 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24303993>.

WANG, H. et al. Multiple conformations of phosphodiesterase-5: implications for enzyme function and drug development. **J Biol Chem**, v. 281, n. 30, p. 21469-21479, Jul 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735511>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

WAREING, M. et al. Effects of a phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor on endothelium-dependent relaxation of myometrial small arteries. **Am J Obstet Gynecol**, v. 190, n. 5, p. 1283-1290, May 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15167831>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

WEINSTEIN, L. It has been a great ride: The history of HELLP syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, n.3 Pt 1, p. 860-863, Sep 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150288>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

YU, W. et al. Molecular determinants of microvascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. **Microcirculation**, p. e12508, Oct 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30338879>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Linha de Pesquisa em Nefrologia: enfoque na gestação e pressão arterial.

TCLE APROVADO PELO CEP EM 31/05/2005 (OF N° 440/05) -CEP E APROVADO PELO CONEP REGISTRO 11972.

Pesquisadores Responsáveis: Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Bartira Ercília Pinheiro da Costa.

Entrevistador da Equipe de Pesquisa: _____

Nome do Paciente: _____

SOBRE A PESQUISA:

A presente linha de pesquisa avalia aspectos da gravidez, como pressão sanguínea e pressão alta na busca do aumento de conhecimento, alívio do sofrimento e melhora da saúde de mulheres e crianças. Esta Linha de Pesquisa é parte do Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Nos estudos serão avaliados diversos aspectos que podem influenciar na doença, tais como: marcadores presentes no sangue, na urina, na placenta ou em tecidos; função dos vasos sanguíneos; função das células; função de órgãos, como os rins; sensibilidade gustativa ao sal; e fatores genéticos.

A ideia é estudar fatores que possam ser importantes para a ocorrência da doença pré-eclâmpsia, que é a elevação da pressão arterial na gestação com perda de proteína na urina. Estes testes poderão ajudar a diagnosticar as pessoas em risco ou com esta condição, ou eventualmente auxiliar na formulação de novos tratamentos.

O QUE SERÁ FEITO:

Você será convidada para uma entrevista com um dos membros da equipe de pesquisa. O pesquisador lhe dirá de que se trata a linha de pesquisa e o estudo que está sendo oferecido. Então será perguntado se deseja participar da pesquisa.

Caso concorde, após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão perguntados dados de sua história médica, coletado um volume de sangue venoso e/ou urina antes e depois do parto, além das coletas dos exames de rotina. Alguns dos estudos desta linha de pesquisa avaliam outros aspectos e também poderá ser coletada amostra de sangue do cordão umbilical após o parto e amostra da placenta, e/ou avaliação da função dos vasos por ecografia, e/ou medida da sensibilidade gustativa ao sal. Em alguns estudos, são avaliados a presença de marcadores genéticos. Os genes a serem estudados são extraídos do sangue ou da placenta, tentando identificar especificamente os possíveis causadores desta doença. Após o parto você poderá ser convidada a realizar acompanhamento clínico com o grupo no ambulatório Nefrologia. Este grupo atende e acompanha pacientes com hipertensão arterial sistêmica, doença hipertensiva da gestação (entre elas pré-eclâmpsia). As mulheres que desenvolvem complicação durante a gestação, têm um maior risco de doenças vasculares no futuro. A ideia do grupo é acompanhar estas mulheres, em longo prazo, com finalidade de observar a evolução, detectar fatores de risco ou sinais de doença, encaminhando a prevenção e/ou tratamento destes. Meses após o parto, poderá ser solicitado um exame de cintilografia renal que visa detectar a presença de cicatrizes no rim de mulheres em risco (cicatrizes são mais comuns em mulheres que desenvolveram hipertensão na gestação). Estas avaliações não interferirão nas suas avaliações e cuidados rotineiros.

O material biológico da pesquisa será coletado e congelado até a análise pelos colaboradores do Laboratório de Nefrologia da PUCRS. Os resultados serão publicados em revistas de circulação no meio médico e em congressos.

Para que os estudos possam ser realizados, é necessário que você faça a opção autorizando ou não a coleta dos diferentes materiais ou realização dos exames:
Acompanhamento ambulatorial: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)

Urina: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Placenta: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Sangue: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Sangue do Cordão Umbilical: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Ecografia dos vasos: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Análise genética: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Cintilografia renal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)
Sensibilidade Gustativa ao Sal: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO)

*OBS.: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo.

MATERIAL EM ESTUDO E ARMAZENAMENTO:

O material poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa, ou também ser armazenado para emprego em futuros estudos.

É necessário que você faça a opção autorizando ou não o armazenamento para emprego futuro: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Se houver possibilidade de fazermos novas análises com o material coletado, será novamente solicitada a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa para realizar a avaliação adicional. Os estudos são desenvolvidos de forma anônima. Os resultados da pesquisa estarão disponíveis a você em qualquer momento por qualquer motivo. Questionamos se você gostaria de ser comunicada sobre o resultado do estudo. É necessário que você faça a opção escrevendo SIM ou NÃO: _____ QUERO SABER O RESULTADO DA PESQUISA.

RISCOS E BENEFÍCIOS:

Os riscos ou desconfortos dessa pesquisa são considerados mínimos. Este estudo não lhe trará nenhum tipo de discriminação individual ou coletiva. A presente pesquisa se propõe a colaborar com o conhecimento sobre a gestação e suas doenças relacionadas com o controle da pressão arterial, não trazendo benefícios diretos para as pacientes participantes.

LIBERDADE:

A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária e você pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento e sem a necessidade de explicar o motivo.

Eu, _____ fui informada pelo(a) _____ dos objetivos e justificativas dessa pesquisa de forma bem clara e detalhada, Recebi informações sobre cada passo que estarei envolvida. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que as informações por mim fornecidas serão mantidas em segredo e usadas somente conforme opção acima. Fui informada que se existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme estabelece a lei. Também sei que não terei nenhum custo que seja relacionado à pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (051) 33367700, 33369599 ou 33203000 – Ramais 3174 ou 2344, para qualquer dúvida como participante deste estudo.

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, _____ de _____ de _____.

Paciente ou Responsável
CI

Investigador
CI/ CRF

***EQUIPE PARTICIPANTE:**

Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Bartira Ercília P. da Costa, Marta Hentschke e Anne Brandolt Larré

APÊNDICE B - Protocolo de Coleta Padronizado

Linha de Pesquisa Hipertensão na Gestação Laboratório de Nefrologia
PUCRS (ramal 2344)

IDENTIFICAÇÃO

Nome:
Endereço:
Cidade: Bairro:
Fone: ()
Data da Avaliação:
Registro HSL:
Nº do Lab: / /
Raça: branca mista negra
Data de nascimento: / / .
Idade:

HISTÓRIA FAMILIAR

HAS: Não Sim Parentesco: Mãe Pai Outros

EXAME LABORATORIAL

Data dos exames:

IG:	semanas	dias	TP (RNI):	/	(%)
Hematócrito:	%		KTTP:		
seg/seg					
Hemoglobina:	g/dL		Fibrinogênio:		mg/dL
Leucócitos totais:	uL		TGO:	uL	TGP: uL
Bastonados:	%	uL	LDH:	uL	
Segmentados:	%	uL	BD:	md/dL	BI: mg/dL
Basófilos:	%	UI			
Eosinófilos:	%	UI			
Monócitos:	%	uL	TSM:	ABO:	Rh:
Linfócitos:	%	uL			

APÊNDICE C - ORÇAMENTO DO CONSELHO DE PESQUISA CIENTÍFICA

ITENS A SEREM FINANCIADOS	QUANTIDADE	QUANTIDADE		VALOR UNITÁRIO	VALOR	*FONTE VIABILIZADORA
ESPECIFICAÇÕES	nº de animais	nº de mat ou equipamento	total	R\$	R\$	
	Quantidades	quantidades				
Exames/ Procedimentos					0,00	
			0	0,00	0,00	
Serviços:	Correção Português	100 páginas	500	0,00	500,00	6
	Xerox	670 páginas	100	0,00	100,00	6
	Encadernações	6 encadernações	150	0,00	150,00	6
	Auxílio Estatístico	5 horas/aula	1250	0,00	1.250,00	6
	Tradução Inglês	100 páginas	500	0,00	500,00	6
			0	0,00	0,00	
			0	0,00	0,00	
Materiais:	Borrachas	2 unidades	10	0,00	10,00	6
	Folhas A4	1000 folhas	30	0,00	30,00	6
	Pen driver 1G	1	35	0,00	35,00	6
	Cartucho Impressora	4	100	0,00	100,00	6
	Pastas de Escritório	20	1	0,00	20,00	6
	Canetas Esferográficas	6	2	0,00	12,00	6
	Material de Laboratório	20	49862	0,00	49.862,00	6
	Jalecos	2	200	0,00	200,00	6
			0	0,00	0,00	
Equipamento:	Computador	1	2750	0,00	2.750,00	6
TOTAL				0,00	55.519,00	

APÊNDICE D - ARTIGO 1 PARA SUBMISSÃO

AJOG- American Journal Obstetrics Gynecology

Anne Brandolt Larré, MSc¹; Bartira Ercília Pinheiro da Costa, PhD¹; Marta Ribeiro Hentschke, PhD¹; Hiten D Mistry, PhD²; Daniela Moraes MSc¹; Alessandra Côrte Real Lança¹; Gabriele Zanirati, PhD¹; Júlia Gabriela Motta¹; Daniel Rodrigo Marinowic, PhD¹; Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo, MD, PhD¹.

¹ Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences (Nephrology), São Lucas Hospital /School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Division of Child Health, Obstetrics and Gynecology, University of Nottingham, Nottingham, UK.

Institution: Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences (Nephrology), São Lucas Hospital /School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Name: Bartira Ercília Pinheiro da Costa

Address: Av Ipiranga 6690 – São Lucas Hospital - Zip code: 90 610 000

Telephone number: +55 51 33203000 ext: 2344

E-mail address: bart@pucrs.br

Abstract

Introduction: Preeclampsia (PE) is characterized by elevated blood pressure and pathological proteinuria after 20 weeks of pregnancy. In PE, endothelium-derived nitric oxide via acts in the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production to induce vascular relaxation. cGMP is hydrolysed by phosphodiesterase (PDE). PDE activity is increased in the serum of patients with PE. PDE5 is responsible for cGMP hydrolysis and is found in almost all cell types. **Objective:** To evaluate the activity and expression PDE5 in placenta, and its concentration in maternal plasma, in patients with preeclampsia compared to normotensive controls. **Study Design:** Case-control study including 151 patients (100 normal controls-NC and 51 with PE). The concentration of PDE5 in maternal plasma was evaluated with an Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Placental PDE enzymatic activity was performed using a colorimetric assay and placental PDE5 expression by qRT-PCR. **Results:** PDE5 concentration in maternal plasma was not significantly different between groups (NC: 0.11±0.04 ng/mL; PE: 0.11±0.01 ng/mL, p=0.307, Student t test). However, the expression of PDE5 in placental tissue was 1,125 folds higher (p<0.001) in PE, with 0.1 as minimum value and 5,454.9 as maximum. PDE enzymatic activity was equivalent between both groups (NC: 0.41±0.28; PE: 0.42±0.26 nmol; p=0.955; Mann Whitney test). **Conclusion:** Increase in PDE5 placental expression in PE placental tissue may be related with to placental ischemia, triggering the systemic maternal syndrome. This enzyme is probably relevant in a series of pathophysiological steps and may be involved in the vasoconstriction presented in preeclampsia.

Keywords: PDE5 Phosphodiesterases; Hypertension, Pregnancy Induced; Enzyme Assays; Nitric Oxide, Endothelium-Derived.

APÊNDICE E - ARTIGOS PUBLICADOS (2, 3, 4 e 5)

Medical Hypotheses 108 (2017) 94–100



Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy



Phosphodiesterases and preeclampsia



Anne Brandolt Larré, Aline Parisotto, Bruna Fagundes Rockenbach, Débora Montenegro Pasin, Cláudia Capellari, Daniele Cristovão Escouto, Bartira Ercília Pinheiro da Costa*, Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo

Institute of Biomedical Research – São Lucas Hospital/School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 October 2016
Accepted 3 August 2017

ABSTRACT

Antagonizing vasodilation has been considered one of the potential mechanisms underlying the pathophysiology of preeclampsia. Phosphodiesterases hydrolyze cGMP, interfering with the action of nitric oxide on vascular smooth muscle, thus causing vasoconstriction. We hypothesize that the phosphodiesterases in maternal plasma, phosphodiesterase-5 in particular, may be linked to clinical manifestations in preeclampsia syndrome.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Preeclampsia (PE) is a multisystemic syndrome [1,2] pregnancy-specific whose prevalence varies according to some authors, who suggest that the syndrome can complicate from 2% to 8% [3,4] of all pregnancies. It confers high morbidity and mortality to both mother and fetus [5,6]. It is characterized by elevated levels of blood pressure associated with the emergence of one or more maternal organ dysfunction after the 20th week of gestation [1,2]. The pathophysiology of the PE is complex, and it is still being elucidated. Many theories have proposed possible etiological mechanisms of such disease [7–13]. The main idea governing the understanding of PE is that the disease results from placental ischemia with the release of factors in the maternal circulation [11,14] and most studies suggest that the disease is triggered by a cascade combination of abnormal maternal inflammatory response and endothelial dysfunction associated with the angiogenic imbalance and abnormal vascular relaxation [9,13,15–18]. The vasoconstriction has been highlighted as one of the factors involved in the pathogenesis of PE. The release of nitric oxide by the endothelium promotes vasodilation, a major regulator of vascular tone that acts via the guanylate cyclase forming the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) [19]. This second messenger, in its turn, is hydrolyzed by the phosphodiesterase (PDE), a cyclic nucleotide responsible for regulating the cellular levels of cGMP and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [20].

Phosphodiesterase currently make up 11 structurally related families, but functionally variants. Some are specific for cAMP or

cGMP, and others for both [21]. Phosphodiesterase that perform the hydrolysis of cGMP in vascular myocytes, in particular PDE-5, – due to its significant expression in this region – are responsible for the regulation of the muscle tone in the vessels. They regulate blood pressure by antagonizing the catalysis of the second messenger responsible for the degradation of nitric oxide; thus, these enzymes antagonize the vasodilation [22,23].

Phosphodiesterase activity from the plasma of women with PE is higher than in regular pregnancies [24]. Accordingly, it is believed that such enzymes are involved in the pathogenesis of PE [23,25]. Few studies relate the expression of variants of PDE with the syndrome, focusing, primarily, on PDE-5 expression, which appears to be at high levels in maternal placental tissue [23,25–29].

Hypothesis

Most human studies that establish a link between PE and PDE analyze the PDE-5 in the placental tissue and umbilical cord [23,25,30–32]. We believe in the hypothesis that the PDE enzymatic activity and expression, particularly the PDE-5, is increased in the plasma and placenta of women with PE. This alteration follows as a conceptual basis, which justifies the use of inhibitors of PDE in the prevention and treatment of PE.

Evaluation of the hypothesis

Preeclampsia

Preeclampsia is diagnosed by hypertension, i.e. systolic blood pressure ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg, pre-

* Corresponding author at: Av Ipiranga 6690 – São Lucas Hospital, Zip code: 90 610 000, Brazil.

E-mail address: ba@pucrs.br (B.E. Pinheiro da Costa).



Phosphodiesterase Inhibition in the Treatment of Preeclampsia: What Is New?

Anne Brandolt Larré¹ · Fernando Sontag¹ · Débora Montenegro Pasin¹ · Nathália Paludo² · Rayssa Ruszkowski do Amaral² · Bartira Ercília Pinheiro da Costa^{3,4} · Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo³

Published online: 26 July 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose of Review The present study intends to review the possibility of using phosphodiesterase inhibitors as a treatment option for preeclampsia, addressing potential risks and benefits.

Recent Findings Preeclampsia is the most common hypertensive disorder of pregnancy, often responsible for severe maternal and fetal complications, which can lead to early pregnancy termination and death. Despite the numerous studies, its pathophysiology is still unclear, although it seems to involve a multiplicity of complex factors related to angiogenesis, ineffective vasodilation, oxidative stress, inflammatory cytokines, and endothelial dysfunction. It has been hypothetically suggested that the use of phosphodiesterase inhibitors is capable of improving placental and fetal perfusion, contributing to gestational scenario, by decreasing the symptomatology and severity of this syndrome. In this literature review, it has been found that most of the studies were conducted in animal models, and there is still lack of evidence supporting its use in clinical practice. Research in human indicates conflicting findings; randomized controlled trials were scarce and did not demonstrate any benefit in morbidity or mortality. Data regarding to pathophysiological and interventional research are described and commented in this review.

Summary The use of phosphodiesterase inhibitors in the treatment of preeclampsia is controversial and should not be encouraged taking into account recent data.

Keywords Sildenafil · Phosphodiesterase · Hypertension, pregnancy-induced · Models, animal

Introduction

Preeclampsia, a multisystemic and multifactorial disease, affects from 2 to 8% of all pregnancies, comprising one of the

three leading causes of maternal morbidity and mortality in the world [1••, 2]. Clinically, it is characterized by increased blood pressure levels ($\geq 140/90$ mmHg) associated with proteinuria (≥ 300 mg/day) after the 20th gestational week. It results in systemic maternal dysfunctions such as renal injury, intrauterine growth restriction, and neurological, hepatic, and hematological impairment [3••]. The progression and aggravation of the symptoms can lead to the early interruption of gestation, regarded today as the only cure option [4]. The management aims to maintain fetal viability and reduce maternal risks [5]. It is believed that the condition is a response to placental hypoperfusion, associated with inflammation and maternal endothelial dysfunction [6–8].

In some cases, the use of sildenafil citrate in the management of endothelial dysfunction has been discussed as a drug that promotes vascular relaxation by the inactivation of the phosphodiesterase (PDE), enzyme responsible for degrading the cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate (cGMP). These nucleotides are known to participate in the activation of intracellular protein kinases in

This article is part of the Topical Collection on *Preeclampsia*

✉ Bartira Ercília Pinheiro da Costa
bart@puers.br

¹ Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences (Nephrology), Laboratory of Nephrology—School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Department of Internal Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ São Lucas Hospital, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre 90 610 000, Brazil





Educational Interventions and Glycemic Control: Integrative Review

Capellari Claudia*, Pinheiro da Costa Bartira E, Larre Anne, Pasin Debora, Cardoso Angelica, Vasconcelos Luisa de and Figueiredo Ana E

Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Glycemic control is an important factor for individuals with diabetes prevent complications such as vascular and kidney disease. Educational interventions carried out by the health team, have the potential to support the necessary change in lifestyle, adherence to treatment and a restrictive diet. The aim of this review was to investigate the educational interventions, related to glycemic control in patients with diabetes, published by health professionals in the past 10 years. The following databases were queried:

Nursing Database (BDENF); Literature in the Health Sciences in Latin America and the Caribbean (LILACS); Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE); Scientific Electronic Library Online (SCIELO); Education Resources Information Center (ERIC); and, American Psychological Association (PsycINFO). The descriptors used for the search were "Diabetes" AND "self-care" AND "health education", and the period ranged from 2005 to 2015. The initial search resulted in 856 articles, which have gone through both title and summary and, then, to complete reading. After this phase, 11 articles were selected for a comprehensive review. The most cited professional in the intervention with patients was the nurse, in 09 of the 11 studies. Interventions included meeting groups, individual appointments, telephone coaching, advice by e-mail or website with informational material. Health education was predominant in all of them, and the recurring themes covered: disease knowledge, diet, glucose self-monitoring and physical exercise. Follow-up time was of 06-36 months. The glycated hemoglobin was reduced in 09 out of the 11 articles. In conclusion, we can say that multidisciplinary interventions of health education are powerful tools for the greatest benefit to the patient, providing necessary support for coping with the disease.

Keywords: Diabetes; Self-care; Education health; Patient education as topic

Introduction

Diabetes is a frequent clinical situation that affects about 382 million people worldwide, reaching 471 million in 2035 [1]. In Brazil, research indicates 6.2% of the population as having diabetes, which represents more than 9 million individuals [2]. Regarding age, the higher incidence is identified from 45 years old on, with prevalence ranging from 8.5% to 22.1% [3].

The recognition of Diabetes Mellitus (DM) as an epidemic and the management of hyperglycemia as a key for reducing damage and chronic complications anchors the development of research and therapies. Both the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), which are among the major studies on the subject, concluded that glycemic levels are directly proportional to complications in DM patients [4,5]. Since then, maintaining acceptable levels of glucose has shown benefits related to complications, particularly to those concerning microvasculopathy and neuropathy [4,6,7].

Diabetes causes significant damages such as micro and macrovascular changes, which may culminate with nephropathy, retinopathy, diabetic foot, changes in intestinal motility and atherosclerotic vascular disease [6,8]. Among the complications of diabetes, cardiovascular and kidney diseases are amid the most costly regarding human suffering and expenditures for health systems [9].

For a successful diabetes treatment, the patient requires adjustments that go beyond the use of medications. Changes in lifestyle, adherence to drug therapy and restrictive diet are some of the initiatives for the success of the treatment. Such patients need the support and coaching from the multidisciplinary health team professionals, who have the role of informing the user about their disease and assist in decision-making

[8]. Under this context, non-pharmacological treatment anchored in health education is fundamental. Among the purposes of this type of intervention, patient instrumentation concerning knowledge of their disease, complications inherent in the pathology and therapeutic management is paramount for greater autonomy and better quality of life [10].

Thus, health professionals have a major role, for they not only provide information, but must also act as motivators, facilitators, and promoters of individuals' awareness contributing to treatment adherence, development of self-care ability and lifestyle change [11,12]. Based on these considerations, the following research question was formulated: From an educational point of view, how do health professionals intervene in the glycemic control of patients with diabetes?

The present study aimed to investigate what are the educational interventions related to glycemic control in diabetic patients, with Diabetes type I or II, published by health professionals in the last 10 years.

Method

This is an integrative review whose production went through the following steps: guiding question establishment; inclusion and

*Corresponding author: Capellari Claudia, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, 1673 Av. Ipiranga, 66011 Partenon - Porto Alegre, Brazil, Tel: +55 51 31715941; E-mail: capellari@gmail.com

Received May 02, 2016; Accepted June 09, 2016; Published June 15, 2016

Citation: Capellari C, Pinheiro da Costa BE, Larre A, Pasin D, Cardoso A, et al. (2016) Educational Interventions and Glycemic Control: Integrative Review. J Diabetes Metab 7: 675. doi:10.4172/2155-6156.1000675

Copyright: © 2016 Capellari C, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



5. Estratégias de comunicação com pacientes afásicos vítimas de acidente vascular encefálico: revisão integrativa

5. Strategies of communication with patients aphasic accident victims of vascular brain: integrative review

Diego Silveira Siqueira¹

Anne Brandolt Larré²

RESUMO

Objetivos: caracterizar a produção científica no período de 2008 a 2015 acerca das evidências relacionadas às estratégias de comunicação com pacientes afásicos vítimas de acidente vascular encefálico (AVE). **Metodologia:** trata-se de uma revisão integrativa, com busca nas bases de dados LILACS, SCIELO, IBICS, PUBMED, utilizando os descritores acidente vascular cerebral, afasia, comunicação, equipe de enfermagem e relações enfermeiro paciente. Os critérios de inclusão foram: artigos indexados nas referidas bases; publicados em língua portuguesa e espanhola; disponíveis na íntegra. O levantamento bibliográfico foi realizado no período de setembro a novembro de 2015. Foram selecionados 10 artigos que atenderam aos critérios de inclusão. **Resultados:** identificaram-se inúmeras estratégias utilizadas pela equipe de enfermagem para a comunicação com pacientes afásicos, dentre elas: comunicação verbal e não verbal, incluindo alfabeto em papel, escrita, uso de figuras, manual de necessidades básicas impresso e equipamentos eletrônicos. **Conclusão:** a equipe de enfermagem possui fundamental importância no processo de comunicação de pacientes afásicos na identificação de suas necessidades humanas.

DESCRIPTORES: Acidente vascular cerebral; Afasia; Comunicação; Equipe de enfermagem; Relações enfermeiro paciente.

¹ Enfermeiro, Mestrando em Ciências Médicas (PUCRS), Enfermeiro Assistencial da Internação Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: diego@lucasa@pucrs.com.br

² Farmacêutica, Doutorando em Ciências Médicas (PUCRS), Bolsista do Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS, Brasil.

ANEXO

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Conselho de Ética em Pesquisa

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FOSFODIESTERASES NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA

Pesquisador: Carlos Eduardo Polli de Figueiredo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 50509015.8.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.383.972

Apresentação do Projeto:

Ver conclusões ou pendências.

Objetivo da Pesquisa:

Ver conclusões ou pendências.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver conclusões ou pendências.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver conclusões ou pendências.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver conclusões ou pendências.

Recomendações:

Ver conclusões ou pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O novo TCLE apresentado contempla as recomendações da resolução nº 422 de 2012, exceto na segunda página ao referir-se a cópia do termo, embora na página 1 conste duas vias. Recomenda-se a correção por parte dos pesquisadores antes da aplicação do referido TCLE.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.610-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 1.303.972

Considerações Finais a critério do CEP:

O novo TCLE apresentado contempla as recomendações da resolução nº 422 de 2012, exceto na segunda página ao referir-se a cópia do termo, embora na página 1 conste duas vias. Recomenda-se a correção por parte dos pesquisadores antes da aplicação do referido TCLE.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_609551.pdf	16/12/2015 15:34:35		Acelto
Outros	Documento.pdf	16/12/2015 15:33:31	Anne Larrié	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Anne161215_Final.pdf	16/12/2015 15:24:54	Anne Larrié	Acelto
Outros	CartaResposta.pdf	03/12/2015 14:16:30	Anne Larrié	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PlatBrasil_Pronto03122015_PD F.pdf	03/12/2015 14:08:59	Anne Larrié	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta.pdf	26/10/2015 08:58:49	Anne Larrié	Acelto
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	21/10/2015 13:38:45	Anne Larrié	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	20/10/2015 11:56:36	Anne Larrié	Acelto
Outros	Lattes.pdf	20/10/2015 11:51:50	Anne Larrié	Acelto
Outros	RESUMOS.pdf	20/10/2015 11:44:23	Anne Larrié	Acelto
Outros	vcartacheobstet.pdf	20/10/2015 11:15:05	Anne Larrié	Acelto
Orçamento	201510020835orcamento.pdf	20/10/2015 11:14:02	Anne Larrié	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
 Bairro: Partenon CEP: 90.619-000
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.303.972

PORTO ALEGRE, 05 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon CEP: 90.619-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@puors.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br