

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM
GESTANTES DE RISCO**

SANDRA LUFT PALADINO

ORIENTADOR: PROFESSOR Dr. JEAN CARL SILVA
COORIENTADOR: Dr. RODRIGO BARBANO WEINGRILL

JOINVILLE – SC

2021

SANDRA LUFT PALADINO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM
GESTANTES DE RISCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, da Universidade da Região de Joinville (Univille), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, sob orientação do professor Dr. Jean Carl Silva.

Joinville – SC

2021

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Paladino, Sandra Luft

P153i Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares em gestantes de risco / Sandra Luft Paladino; orientador Dr. Jean Carl Silva. – Joinville: UNIVILLE, 2021.

90 f.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Hipertensão na gravidez. 2. Exossomos. 3. Gravidez – Complicações e sequelas. I. Silva, Jean Carl (orient.). II. Título.

CDD 618.3

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

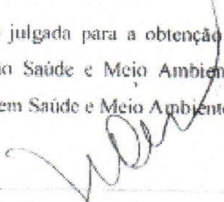
Termo de Aprovação

"Isolamento e Caracterização de Microvesículas em Gestação de Risco"

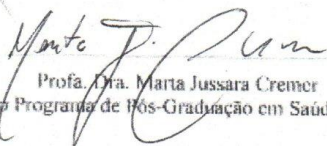
por

Sandra Luft Paladino

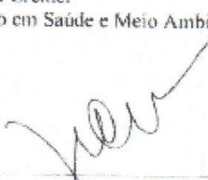
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.


Prof. Dr. Jean Carl Silva
Orientador (UNIVILLE)


Prof. Dr. Rodrigo Barbano Weingrill
Coorientador

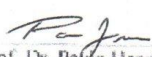

Profa. Dra. Marta Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Jean Carl Silva
Orientador (UNIVILLE)


Prof. Dr. Rodrigo Barbano Weingrill
Coorientador


Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely
(UFAL)


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
(UNIVILLE)

Joinville, 05 de março de 2021

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos, e que não constituem de clichê, são à minha família, especialmente ao meu esposo e filho, que durante toda a jornada do mestrado estiveram comigo, em apoio total a toda e qualquer circunstância deste caminho. Que não mediram esforços para me apoiar e incentivar, e que por muito tempo tiveram que conviver com minha ausência.

Agradeço ao Prof. Dr. Jean Carl Silva, que aceitou esse imenso desafio, de orientar um trabalho muito diferente de suas linhas de pesquisa, e que acima de tudo foi paciente e compreensivo com todas as dificuldades apresentadas.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Barbano Weingrill pela proposta de pesquisa apresentada, a alguém recém-chegada, desconhecida e sem uma trajetória em pesquisa, obrigada por acreditar que eu seria capaz.

Agradeço em nome do Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely, a toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular da UFAL além do laboratório de física, grandes parceiros deste estudo, e que me receberam muito bem. Professor obrigada por sua dedicação à ciência e obrigada por apoiar as mulheres na ciência, sua humildade supera qualquer título, um verdadeiro conhecedor das minúcias placentárias.

Não posso deixar de mencionar aqueles dos quais nenhuma etapa deste estudo teria ocorrido se não por suas mãos, os colegas e acadêmicos, ao Eduardo, Melody, Andreza, Matheus, Gustavo, Bruno, Milena, Leticia, Emily, que desde o início estiveram disponíveis à auxiliar neste processo e foram exímios, obrigada.

A todos os parceiros que este estudo teve o prazer de ter, à Univille, à Maternidade Darcy Vargas, ao Laboratório Gimenes, ao Laboratório Anatomopatológico CEDAP, à UFAL, à USP e principalmente a todas as participantes e suas famílias.

De fato, sem as mãos amigas ninguém se sustenta, e neste mestrado tive a oportunidade de conhecer mais algumas. Sejam amigos (as) do mestrado ou da vida, e que estiveram ao meu lado me apoiando de uma ou de outra forma a minha eterna gratidão por sua amizade, por sua fé e por toda sua paciência para comigo.

*“A água que não corre forma um pântano;
a mente que não pensa forma um tolo.”*

Victor Hugo

RESUMO

Os distúrbios gestacionais hipertensivos são bem conhecidos por causar parto prematuro, perda da gravidez e morbimortalidade materna. Infelizmente, o início da condição hipertensiva geralmente é notado após a 20ª semana de gestação, limitando a capacidade de diagnóstico precoce. Como protagonista durante a gestação, a placenta é diretamente responsável por modular a fisiologia local e sistêmica e o comportamento celular durante a remodelação vascular, comunicando-se por meio da liberação de vesículas extracelulares, principalmente exossomos. Os exossomos da placenta liberados na circulação materna têm a capacidade de se espalhar local e sistemicamente e modular a função celular durante a gestação normal e hipertensiva. Para entender melhor as diferenças na composição do plasma sanguíneo periférico enriquecido com exossomos e a presença de biomarcadores para o início de uma gestação hipertensiva, o plasma sanguíneo periférico de 35 mulheres grávidas (20 controles, 15 hipertensas) com e sem hipertensão foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman. A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as amostras de plasma eram enriquecidas com exossomos de 50-150nm, não contendo vesículas grandes e corpos apoptóticos (> 180nm). A espectroscopia Raman mostrou diferenças na análise de componentes principais (PCA), com 62% de variações no PC1. A maioria das diferenças foi encontrada nos aminoácidos, com aumento de metionina e triptofano e níveis mais baixos de tirosina, arginina e leucina. Além disso, foram encontrados aumento nas moléculas da estrutura do DNA, alterações no ácido mirístico, amida I e amida II, carotenoides e fosfolípidios. Os níveis mais elevados de fosfolípidios e compostos estruturais de RNA podem sugerir que o enriquecimento do plasma com exossomos pode fornecer uma melhor visualização da carga do exossomos durante o início da gestação, além de apresentar possíveis novos biomarcadores metabólicos para distúrbios gestacionais hipertensivos. Considerando isso, o uso de plasma enriquecido com exossomos como fonte de biomarcadores de gestação pode fornecer uma visão precoce da comunicação placentária na interface materno-fetal, com potencial para se tornar uma ferramenta poderosa para diagnóstico diferencial e prognóstico no final da gravidez.

Palavras-chave: gestação, Hipertensão Induzida pela Gravidez, microvesículas.

ABSTRACT

Hypertensive gestational disorders are well known to lead to preterm birth, pregnancy loss and maternal morbidity and mortality. Unfortunately, the onset of hypertensive condition is generally noticed after 20th weeks of gestation, limiting the ability of an earlier gestation diagnosis. As the major player during gestation, the placenta is directly responsible for modulating local and systemic physiology and cellular behavior during vascular remodeling, communicating through the release of extracellular vesicles, especially exosomes. Placental exosomes released at the maternal circulation have the ability to spread locally and systemically and modulates cellular function during normal and hypertensive gestation. To better understand the differences on exosome enriched peripheral blood plasma composition and the presence of biomarkers for the onset of a hypertensive gestation, the peripheral blood plasma of 35 pregnant women (20 controls, 15 hypertensive) with and without hypertension were evaluated by scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. The scanning electronic microscopy analysis showed that plasma samples were enriched with 50-150nm extracellular vesicles (exosomes), not containing large vesicles and apoptotic bodies (>180nm). Raman spectroscopy showed differences in principal component analysis (PCA), with 62% of variations in PC1. Most differences were found on amino acids, with increased methionine and tryptophane, and lower levels of tyrosine, arginine and leucine. Additionally, increased DNA backbone molecules, alterations on myristic acid, amide I and amide II, carotenoids and phospholipids were found. The higher levels of phospholipids and RNA structural compounds may suggest that the enrichment of plasma with exosomes can provide a better view of exosome cargo during early gestation, as well as presenting novel metabolic biomarkers for hypertensive gestational disorders. Considering that, the use of exosome enriched plasma as a source of gestation biomarkers can provide an early marker of placental communication at the maternal-fetal interface, with the potential to become a powerful tool for differential diagnosis and late-pregnancy prognosis.

Keywords: pregnancy, Pregnancy-Induced Hypertension, microvesicles.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Critérios para encaminhamento para serviços Ambulatoriais de Gestão de Alto Risco	67
ANEXO B – Termo de Exequibilidade MDV	68
ANEXO C – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética	69

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	85
APÊNDICE B – Questionário – Roteiro para entrevista	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da composição das principais vesículas extracelulares	29
FIGURA 2 – Esquema conceitual de preparação e armazenamento do plasma. 38	38
FIGURA 3 – Kit de Isolamento de exossomos Mag Capture	39
FIGURA 4 – Espalhamento Raman	40
FIGURA 5 – Espectroscopia de Raman	51
FIGURA 6 – Principais Componentes	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD – Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose

ACM – Artéria Cerebral Média

ACOG – Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CIVD – Coagulação intravascular disseminada

CO – Centro Obstétrico

CTEV – Células citotrofoblásticas extravilosas

DHEG – Doença Hipertensiva Específica da Gestação

EAP – Edema Agudo de Pulmão

FEBRASGO – Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HELLP – Hemólise, Elevação de Enzimas Hepáticas, Redução Plaquetária

ISEV – Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares

ISSHP – Sociedade Internacional para Estudo da Hipertensão na Gestação

MAPA – Monitoramento Ambulatorial da Pressão Arterial

MDV – Maternidade Darcy Vargas

MS – Ministério da Saúde

NK – *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

OPAS – Organização Panamericana da Saúde

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PE – Pré Eclâmpsia

PEG – Pré Eclampsia Grave

PNAR – Pré-natal de Alto Risco

PRAMS – Sistema de Monitoramento de Avaliação de Risco de Gravidez

PS – Fosfatidilserina

tEV – Vesículas Extracelulares de origem trofoblástica

Treg – Célula T reguladora

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1. REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 GESTAÇÃO E PLACENTAÇÃO	17
1.1.1 Invasão e placentação	17
1.1.2 Regulação da Placentação.....	18
1.1.3 Células Trofoblásticas Extravilosas.....	19
1.2 GESTAÇÃO DE ALTO RISCO	20
1.2.1 Conceituação e seguimento da gestação de risco	20
1.3 DOENÇAS HIPERTENSIVAS NA GESTAÇÃO	22
1.3.1 Classificação das doenças hipertensivas na gestação	22
1.3.2 Fisiopatogênia das doenças hipertensivas na gestação	24
1.4 EXOSSOMOS PLACENTÁRIOS	28
1.4.1 Classificação dos exossomos	28
2. INTERDISCIPLINARIDADE	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MÉTODOS	34
4.1 DELINEAMENTO	34
4.2 PERÍODO E LOCAL	34
4.3 PARTICIPANTES DO ESTUDO E COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	34
4.3.1 Seleção da amostra, Critérios de inclusão e exclusão	34

4.4 ASPECTOS ÉTICOS	35
4.5 RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO	36
4.6 COLETA DE DADOS	36
4.7 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	37
4.7.1 Preparação e armazenamento do plasma e isolamento	37
4.7.2 Caracterização	39
4.7.2.1 Espectroscopia RAMAN	39
4.7.2.2 Medições espectrais de Raman e Análises	41
5. RESULTADOS	43
6. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A – Critérios para encaminhamento para serviços Ambulatoriais de Gestaçã de Alto Risco	72
ANEXO B – Termo de Exequibilidade MDV	73
ANEXO C – Parecer CEP	74
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	86
APÊNDICE B – Questionário – Roteiro para entrevista	89

INTRODUÇÃO

A gestação, o parto e nascimento são momentos de maior impacto na vida de indivíduos e famílias, pois apesar de não configurar doença, tal momento requer cuidados e atenção de uma equipe multidisciplinar, garantindo o resultado esperado por eles e/ou o mínimo possível de eventos indesejados. Nesta perspectiva sabemos que a placenta toma uma função essencial, sendo um órgão transitório singular e com funções elementares como as trocas gasosas, o transporte de nutrientes, a excreção de metabólitos, a produção de hormônios e a transmissão de anticorpos (ZUGAIB, 2016; SADLER, 2016).

Dentre as doenças gestacionais de origem placentária está a pré-eclâmpsia, uma das principais causas de mortalidade materna em diversos países, que apresenta placentação de forma superficial devido a invasão debilitada do sinciciotrofoblasto no estroma uterino (SILVA *et al.*, 2016; ALPOIM *et al.*, 2013). Assim, há déficit na remodelação das artérias espiraladas uterinas, que deveriam modificar sua conformação para aumentar o aporte de oxigênio e nutrientes, comprometendo o desfecho gestacional e causando uma desordem inflamatória e hipertensiva sistêmica na gestante (ALPOIM *et al.*, 2013). Estima-se que a pré eclâmpsia complica de 2 a 8% das gestações em todo o mundo; na América Latina e no Caribe, os distúrbios hipertensivos da gravidez são responsáveis por quase 26% das mortes maternas (ACOG, 2019). Para redução destas mortes são necessárias estratégias como as de diagnóstico precoce, com possibilidade de uso de vesículas extracelulares de origem placentária (ZUGAIB, 2016).

Os mecanismos envolvidos no controle do processo de placentação ainda não foram totalmente elucidados. Neste contexto, recentemente, foi descrito o envolvimento de microvesículas extracelulares no controle dos processos de adesão e invasão das células trofoblásticas ao compartimento uterino materno. Desta forma, a possibilidade de isolamento e caracterização das microvesículas de origem trofoblástica, na corrente sanguínea materna durante a gestação, é uma ferramenta que permite o estudo da atividade das células trofoblásticas durante o processo de placentação. Como resultado, as diferenças encontradas na produção das microvesículas em gestantes normais e patológicas poderiam elucidar possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento normal e anormal da placenta, assim

como, mecanismos de comunicação celular na interface materno-fetal (THÉRY *et al.*, 2018; PILLAY *et al.*, 2017).

O diagnóstico por meio de técnicas modernas investigando microestruturas presentes nos fluidos corporais tem avançado juntamente com a tecnologia em saúde (SHAO *et al.*, 2018). As vesículas extracelulares, neste contexto, são algumas das microestruturas promissoras a respeito de seus papéis biológicos (SHAO *et al.*, 2018). Também denominadas microvesículas, micropartículas, exossomos ou ectossomos (CHEN *et al.*, 2018; THÉRY *et al.*, 2018), foram pela primeira vez descritas em 1967 por Wolf (1967).

Já foram encontradas evidências de que as vesículas extracelulares podem ser potenciais marcadores diagnósticos para o câncer, pela observação do seu papel na promoção do crescimento tumoral; assim como para as doenças renais; autoimunes e gestacionais (SUN *et al.*, 2018; MERCHANT *et al.*, 2017; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015; TONG; CHAMLEY, 2015). Nas patologias gestacionais, as causas são muitas vezes relacionadas a alterações na placentação; assim, dependendo da qualidade da formação embriológica desta estrutura, a placenta libera de forma diferenciada vesículas extracelulares para a circulação materna (TONG; CHAMLEY, 2015).

A liberação destas estruturas para a circulação materna ocorre especialmente na primeira metade da gestação, pelo trofoblasto extraviloso - responsável pelo remodelamento da delicada estrutura muscular das artérias espiraladas uterinas (TONG; CHAMLEY, 2015). Pouco se sabe acerca da finalidade destas vesículas a nível sistêmico; contudo, foi observado que na pré-eclâmpsia sua liberação está aumentada em relação a uma gestação com placentação normal (PILLAY *et al.*, 2017). O papel das vesículas extracelulares foi sugerido por Pillay *et al.*, (2017) como importante para a comunicação materno-fetal tanto em gestações normais quanto em patológicas, estando também associado aos aspectos imunológicos da gestação. Estes fatores elevam seu potencial como biomarcadores precoces de risco gestacional (PILLAY *et al.*, 2017).

Este estudo almejou alcançar benefícios na proteção ao binômio materno-fetal e na garantia do crescimento e desenvolvimento saudável da futura criança, visto que sem um diagnóstico precoce as doenças gestacionais podem ter desfechos

incapacitantes e letais para ambos (ACOG, 2019, SILVA *et al.*, 2016; ALPOIM *et al.*, 2013). Este propósito se encontra em consonância com o objetivo 3, dos Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas, que trata de “Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades” (UN, 2015). Na mortalidade materna, a intenção é de redução deste índice visto que nos países em desenvolvimento se encontra 14 vezes maior que nos desenvolvidos (UN, 2015).

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 GESTAÇÃO E PLACENTAÇÃO

1.1.1 Invasão e placentação

A placenta é um órgão transitório, constituído por duas estruturas principais: a porção fetal, formada pelo córion viloso; e a porção materna, formada pela decídua basal (MOORE; PERSAUD, 2008). Seu processo de formação inicia-se logo após a fertilização (ZUGAIB, 2016). O córion viloso é circundado externamente por células do sinciciotrofoblasto e revestidos internamente por células citotrofoblásticas, posicionadas sobre o mesênquima embrionário rico em capilares fetais e células de Hofbauer, que são macrófagos fetais, dos quais realizam atividade secretória ativa, fornecendo fatores que regulam o crescimento e a particularização do próprio tecido conjuntivo e dos vasos fetais. (MOORE; PERSAUD, 2008; ZUGAIB, 2016).

Na porção materna da placenta encontramos as células decíduais, responsáveis pelo processo de decidualização, necessário para o sucesso da implantação embrionária, as células imunológicas maternas, os capilares e artérias uterinas (BOYD, HAMILTON, 1970). Assim que o processo de implantação embrionária tem seu início e as células trofoblásticas invadem o estroma uterino materno, esta invasão é importante para a formação placentária, as células sinciciotrofoblásticas abrem os capilares uterinos mais superficiais, difundindo o sangue materno na interface entre embrião-endométrio, formando a primeira região de trocas gasosas e de nutrientes (BOYD, HAMILTON, 1970; ELLIOT, CRESPI, 2009). Posteriormente, grupos de células citotrofoblásticas que revestem internamente o córion viloso, formam os vilos de ancoragem junto ao estroma uterino materno, a partir deste ponto, células citotrofoblásticas extrapolam os limites dos vilos coriônicos e invadem o estroma uterino. Estas células passam então, a serem classificadas como células citotrofoblásticas extravilosas (CTEV) (RED-HORSE *et al.*, 2004).

As CTEV apresentam grande atividade invasiva, povoando o estroma endometrial sob a forma de células trofoblásticas gigantes multinucleadas, ou, invadindo e remodelando a estrutura vascular das artérias espiraladas uterinas,

modulando o aporte sanguíneo que chega à placenta e interagindo com o sistema imunológico materno (BENIRSCHKE, KAUFMANN, BARGEN, 2006; KAUFMANN, CASTELUCCI, 1997; KEMP *et al.*, 2002; LOREGGER *et al.*, 2003). Este conjunto de modificações celulares e interações materno-fetais, permitem que a placenta em formação controle com eficiência as trocas gasosas, sua capacidade de síntese e secreção de hormônios e proteínas regulatórias, a hematopoiese e a imunorregulação do sistema imune materno (BENIRSCHKE, KAUFMANN, BARGEN, 2006).

1.1.2 Regulação da Placentação

Dentre as moléculas e fatores mais conhecidos na regulação e controle do correto processo de placentação estão hormônios, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de matriz extracelular (glicosaminoglicanos, proteoglicanos, matriz metaloproteinases, microRNAs e concentração de oxigênio (CORVINUS *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003; YAGEL *et al.*, 1990). Estas moléculas sofrem efeitos da homeostase no organismo, assim fatores como a carência nutricional, desequilíbrio glicêmico, infecções, desordens hipertensivas, uso de drogas, alcoolismo e tabagismo e doenças autoimunes podem influenciar o processo de placentação, levando a alterações placentárias e gestacionais (TEDNER *et al.*, 2012; VO, HARDY, 2012). Como consequência, estas alterações na interface materno-fetal durante o processo de placentação e desenvolvimento embrionário, podem estimular o aparecimento de patologias que influenciarão até mesmo a vida adulta do recém-nascido (TEDNER *et al.*, 2012; VO, HARDY, 2012).

Para o sucesso da gestação, é essencial que ocorram modificações no perfil de produção de moléculas imunoreguladoras. Inicialmente, o processo de implantação embrionária cria um perfil imunológico pró-inflamatório (Th1), na interface materno-fetal, com a produção de TNF- α , IL-2 e interferon gama (IFN- γ) (CHAOUAT, 2007). Com o desenvolvimento da gestação, há uma mudança de perfil Th1 para Th2, que é anti-inflamatório, além de um perfil Treg. (célula T reguladora), com secreção de interleucinas IL-4, IL-6, IL-9 e IL-10 (CLARK, 1999; RAGHUPATHY, 1997). Além dos linfócitos, os macrófagos, as células dendríticas e as células natural killer uterinas, participam ativamente do desenvolvimento e da regulação dos processos de implantação embrionária e placentação. Seja na tolerância imunológica ao embrião implantando, na imunomodulação das demais células do sistema imune materno ou

na regulação da atividade das células trofoblásticas e homeostase do tecido endometrial (KAMMERER *et al.*, 2000; LASKARIN *et al.*, 2007; MOR, ABRAHAMS, 2003; SHIMADA *et al.*, 2006).

A placenta conserva, a partir do quarto mês até o termo, a estrutura geral desenvolvida até então. Apesar disto algumas mudanças são observadas como a interrupção da proliferação do citotrofoblasto, o citotrofoblasto das vilosidades torna-se rarefeito, fazendo o sincício unir-se ao endotélio capilar (membrana sinciciocapilar). Progressivo espessamento da placenta formando os septos intercotiledonares. Ocorrência de aumento placentário, especialmente pelo aumento de vilosidades periféricas (entre 25^a a 36^a semana), reduzindo nas últimas quatro semanas de gestação, o que resulta em redução da superfície de troca materno-fetal (ZUGAIB, 2016).

1.1.3 Células trofoblásticas extravilosas

As células trofoblásticas extravilosas (CTEV) possuem dois fenótipos conhecidos: as proliferativas e as invasivas. As CTEV com fenótipo proliferativo se organizam em colunas celulares proximais às vilosidades coriônicas. Distalmente, as células filhas geradas do processo proliferativo adquirem fenótipo invasivo e migram para o estroma endometrial (ENDERS, 1995, 1997; KAUFMANN, CASTELUCCI, 1997; KOSANKE *et al.*, 1998).

O processo de invasão trofoblástica das artérias espiraladas torna a resistência dos vasos uteroplacentários baixa, possibilitando maior perfusão uterina impelida pela pressão arterial materna. O processo de placentação inadequado, altera os fatores produzidos pela placenta, devido isquemia trofoblástica, implicando no surgimento de complicações gestacionais (ZUGAIB, 2016). A redução na invasividade das CTEV está associada a pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal intrauterino, podendo levar à morte materna (PIJNENBORG *et al.*, 1991; GERRETSEN, HUISJES, ELEMA, 1981). Já a exacerbação da atividade invasiva destas células está relacionada as placentas acretas, molas invasivas e coriocarcinoma, podendo causar hemorragia obstétrica massiva, ruptura uterina e morte materna (GOLDSTEIN, BERKOWITZ, 1982; O BRIEN *et al.*, 1996).

Embora de alta severidade, essas patologias não possuem biomarcadores específicos, métodos diagnósticos e opções de tratamento pouco invasivas, além de existir escassez de estudos básicos e translacionais, principalmente referentes às patologias de alta invasividade. A placenta sempre foi classificada como imunologicamente inerte, por não demonstrar capacidade de resposta imunológica. O mecanismo exato pelo qual o organismo materno não ativa seu sistema imune contra um enxerto semialogênico fetal ainda requer compreensão. Ao passo de que se sabe, as células *natural Killers* (NK) uterinas possuem um comportamento diferenciado de suas semelhantes presentes na corrente sanguínea. Ao produzir quimioquinas específicas o trofoblasto atrai mais células NK uterinas à transição materno fetal, com ativação diferenciada, e este controle de invasão é essencial ao desenvolvimento da gestação, e correlaciona-se as alterações supracitadas (ZUGAIB, 2016).

1.2 GESTAÇÃO DE ALTO RISCO

1.2.1 Conceituação e seguimento da gestação de risco

A gestação é um marco na vida das mulheres e de suas famílias, um processo fisiológico de grande transformação anatômica e funcional, que adapta o corpo desta mulher ao feto em desenvolvimento, essas adaptações envolvem processos de esfera molecular, bioquímica, hormonal, celular e tecidual nos mais diversos órgãos. É de extrema importância o conhecimento das alterações fisiológicas para que tão logo possa-se reconhecer e diferenciar uma gestação de risco habitual da gestação de alto risco (LEITE, *et al*, 2014; ZUGAIB, 2016).

Segundo descreve Brasil (2012a) a Gestação de Alto Risco é “aquela na qual a vida ou a saúde da mãe e/ou do feto e/ou do recém-nascido têm maiores chances de serem atingidas que as da média da população considerada”. É na assistência pré-natal, realizada pelo médico ou enfermeiro na atenção básica, que o processo de classificação de risco ocorre e permite a pronta identificação de fatores de risco a condições alteradas, incorrendo na necessidade de reclassificação contínua durante todo o pré-natal.

Os fatores definidos como de risco envolvem principalmente características individuais e condições sociodemográficas desfavoráveis (idade, escolaridade, condições ambientais, exposição ocupacional, situação conjugal, entre outras), história reprodutiva anterior (mau passado obstétrico, diabetes gestacional, abortamento recorrente, entre outros) e condições clínicas pré-existentes (doenças de base como diabetes, hipertensão, cardiopatias, pneumopatias, nefropatias, doenças infecciosas, ginecopatias, neoplasias, dentre outras tantas mais) (BRASIL, 2012a). Os fatores de risco podem surgir ou mesmo agravar-se com o decorrer da gestação como exposição accidental a componentes teratogênicos, doença obstétrica na gestação em curso e até mesmo intercorrências clínicas. A identificação destes fatores de risco é importante para melhor definir o risco gestacional e realizar encaminhamento de maneira oportuna.

Para correta estratificação do risco gestacional no estado de Santa Catarina é utilizado um questionário denominado *Critérios para encaminhamento para serviços Ambulatoriais de Gestação de Alto Risco* (Anexo 1), que classifica as gestantes com 10 ou mais pontos como alto risco (requer encaminhamento ao serviço especializado), 5 a 9 pontos como médio risco e até 4 pontos como baixo risco (risco habitual, mantém seguimento na atenção básica com médico e enfermeiro) (SOARES, 2015; BRASIL, 2012b). Mesmo que seja necessário o encaminhamento a um serviço especializado é relevante que a gestante mantenha o seguimento na unidade de origem concomitante, para que o vínculo seja mantido, e cada serviço possa direcionar o atendimento de maneira focal.

O simples fato, de utilizar uma classificação de risco, não elimina a possibilidade da ocorrência de complicações durante a gestação, parto e nascimento. Por isso faz-se necessário uma boa assistência Pré-natal. Conforme recomendações do Ministério da Saúde para o desenvolvimento de uma assistência pré-natal adequada é necessário que ocorra, além de captação precoce da gestante e da classificação do risco gestacional, um número mínimo de consultas (6-7 consultas) para que estratégias (avaliações, exames, diagnósticos, encaminhamentos) possam ser implementadas garantindo assim o bom andamento da gestação e se obtenha melhores desfechos (BRASIL, 2012b). A Organização Mundial da Saúde, por sua vez, recomenda um mínimo de oito consultas pré-natais, sendo que a primeira deva ocorrer antes da décima segunda semana de gestação (WHO, 2016).

As recomendações em relação ao acompanhamento de pré-natal no Brasil seguem descritas nos manuais do MS como o Caderno 32, relativo à Atenção ao Pré-Natal de Baixo Risco (BRASIL, 2012b), e o Manual Técnico de Gestação de Risco (BRASIL, 2012a). Nos Estados Unidos a ferramenta *Pregnancy Assessment Monitoring System* (PRAMS) é utilizada para o acompanhamento do risco gestacional. Ela é útil também para identificação das mudanças nos indicadores de saúde, com a finalidade de melhores desfechos maternos e neonatais (CDC, 2018).

A ocorrência de alterações no estado de saúde durante o período gestacional em associação aos desfechos ruins no processo parturitivo estão entre as maiores causas de morbimortalidade materna e neonatal no Brasil e no mundo, constituindo-se em um dos principais problemas de saúde pública voltada à mulher e gestação. Segundo a OPAS (2018) os países com maior desigualdade social e de condições socioeconômicas ruins tem as maiores taxas.

Dentre os desfechos gestacionais, a mortalidade materna, é expressa principalmente por hemorragias e doenças hipertensivas da gestação, a hipertensão que corresponde a 20% dos óbitos maternos no Brasil (FREITAS *et al.*, 2017). A prevalência entre as populações varia entre 6 a 22%. Na América Latina e Caribe, os transtornos hipertensivos são responsáveis por cerca de 26% das mortes maternas (ACOG, 2019; FREITAS, *et al.*, 2017).

1.3 DOENÇAS HIPERTENSIVAS NA GESTAÇÃO

1.3.1 Classificação das doenças hipertensivas na gestação

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos, com pressão sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg ou pressão diastólica (PAD) igual ou superior a 90 mmHg, tais valores devem preferencialmente ser obtidos por esfigmomanômetro com coluna de mercúrio, em condição de repouso da gestante, e conforme a *International Society for the Study in Hypertension and Pregnancy* (ISSHP) com um mínimo de duas medidas (ZUGAIB, 2016; FREITAS, *et al.*, 2017).

A maioria das mortes relacionadas a distúrbios hipertensivos pode ser evitada prestando cuidados em tempo hábil e eficazes às mulheres que apresentam complicações desse gênero. Assim, a otimização dos cuidados de saúde para mulheres durante a gravidez para prevenir e tratar distúrbios hipertensivos da gravidez é uma etapa necessária (OMS, 2018). Como existem diversas classificações descritas, em 2013, a ISSHP revisou a classificação dos distúrbios hipertensivos na gestação e os definiu em A) Hipertensão Arterial Crônica; B) Hipertensão Gestacional; C) Hipertensão do Avental Branco; e D) Pré-Eclâmpsia com ou sem HAS crônica sobreposta (FREITAS, 2017).

A instalação do quadro hipertensivo anterior a gestação é definida como Hipertensão Arterial Crônica, como muitas vezes a gestante não possui mensurações prévias considera-se HAS crônica até 20ª semana, em sua grande maioria definida também como essencial. Já a Hipertensão Gestacional, é aquela com surgimento posterior a 20ª semana de gestação, sem estar acompanhado de outro sinal ou sintoma que possa caracterizar Pré-Eclâmpsia (PE). A ISSHP reconheceu a hipertensão do Avental Branco como uma das condições possíveis, com percentual de 25% de aumento nas medidas de PA em consultório, o que requer o monitoramento ambulatorial (MAPA) para descartar a existência de uma doença hipertensiva (ZUGAIB, 2016; FREITAS, *et al*, 2017; FEBRASGO, 2017).

A PE, conhecida também por Doença Hipertensiva Específica da Gravidez (DHEG) ou mesmo toxemia gravídica (descrita pela primeira vez em 1894), é uma síndrome caracterizada pela elevação da PA, com valor maior ou igual a 140/90 mmHg a partir da 20ª semana, acompanhada de pelo menos um sinal clínico, laboratorial ou hemodinâmico de hiperatividade endotelial vascular (proteinúria, disfunções orgânicas maternas, disfunção uteroplacentária) (FREITAS, 2017; FEBRASGO, 2017).

Se a ocorrência da PE for na gestante com HAS crônica considera-se como PE sobreposta. Em caso de PE associada a complicações materno-fetais graves, como existe risco iminente materno-fetal, esta é considerada como pré-eclâmpsia grave (PEG), como a condição apresenta um quadro de descompensação significativa, a evolução desfavorável pode ocorrer rapidamente. Em situações específicas pode da ocorrência de crises tônico-clônicas (convulsões motoras

generalizadas), caracterizando assim o quadro eclâmtico, que pode ocorrer no período pré-parto (50% casos), parto (20%) e pós-parto (11-44%) (FREITAS, 2017). A PE pode ser complicada por condições clínicas ainda mais graves como a Síndrome de HELLP (*Haemolysis, elevated liver enzyme activity, low platelets*) e coagulação intravascular disseminada (CIVD) (ALPOIM, *et al*, 2013). Os principais fatores de risco para desenvolvimento da PE são primigestação, histórico familiar de PE, HAS crônica, diabetes, obesidade, trombofilias, colagenose e cor de pele negra. Estas requerem uma atenção especial no pré-natal para realizar o diagnóstico da pré-eclâmpsia o mais cedo possível (FEBRASGO, 2017).

1.3.2 Fisiopatogênia das doenças hipertensivas na gestação

A PE caracteriza-se por uma síndrome com manifestações em múltiplos órgãos. A fisiopatologia da pré-eclâmpsia ainda não é totalmente conhecida, tendo sido descrito fatores imunológicos genéticos e ambientais para a sua instalação. Embora não tenha causa única, é o resultado de um descompasso entre suprimento placentário e as demandas do feto, levando a manifestações inflamatórias sistêmicas materno-fetais. Em uma gestação normal, as artérias espiraladas uterinas são transformadas de vasos de alta resistência em vasos de baixa resistência para prover uma adequada implantação e crescimento do feto e isso se dá pela invasão trofoblástica das camadas arteriais (MOURA, *et al.*, 2011; FREITAS, *et al.*, 2017).

Nas mulheres que desenvolvem a pré-eclâmpsia, a invasão trofoblástica deixa de ocorrer, ou ocorre de maneira inadequada, resultando em vasos de alta resistência e circulação placentária com baixo fluxo. A hipoperfusão placentária e a hipóxia determinam lesão do endotélio vascular, agregação plaquetária bem como obstrução do fluxo sanguíneo placentário. A hipoxia placentária também aumenta a produção de peróxidos lipídicos que prejudicam a síntese de prostaciclina, potente vasodilatador. A síntese do óxido nítrico potente vasodilatador parece também estar afetada na PE. Observa-se que a alteração mais evidente é expressa por disfunção endotelial e vasoespasmo da circulação sistêmica periférica (MOURA, *et al.*, 2011; FREITAS, *et al.*, 2017).

A PE é uma doença bastante peculiar uma vez que ocorre principalmente em primigestas, em países desenvolvidos ela é vista em cerca de 6% das gestantes sendo

2 ou 3 vezes maior em países subdesenvolvidos (MOURA, *et al.*, 2011). Algumas literaturas sugerem duas hipóteses para ocorrência desta, sendo a má adaptação imunológica e a incompatibilidade genética (FREITAS, *et al.*, 2017). A primeira hipótese é reforçada pela descrição da FEBRASGO (2017), no trecho a seguir:

A partir de problemas de adaptação imunológica ao trofoblasto, ocorreriam problemas na perfusão do trofoblasto, com hipóxia consequente. Essas alterações primárias seriam o gatilho de uma série de fenômenos locais de hipóxia, e reoxigenação poderia amplificar os efeitos locais, tais como a formação de espécies reativas de oxigênio, ativação do sistema inflamatório materno, aceleração de processos de apoptose celular que limitariam o estabelecimento da placentação normal e desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos, como o VEGF e PLGF, e fatores solúveis antiangiogênicos, como o sFLT-1, com predomínio desses últimos, resultando no conjunto em ativação generalizada do sistema inflamatório materno, disfunção endotelial universal e limitação na vascularização placentária. O espasmo arteriolar universal devido à ativação endotelial resulta em processo insidioso e progressivo, culminando com insuficiência de múltiplos órgãos. A PE deve ser interpretada como doença crônica com potencial para insuficiência progressiva de múltiplos órgãos. Esse caráter evolutivo deve ser levado em consideração, bem como sua imprevisibilidade e instabilidade clínica nas decisões. A ativação endotelial determina basicamente: 1. Vasoconstrição e consequente aumento da resistência periférica; 2. Alterações na permeabilidade capilar, responsável pelo edema; 3. Ativação do sistema de coagulação (p. 13).

Em processos de adaptação circulatória materno fetal adequada as artérias uterinas desenvolvem-se por ação migratória intersticial e endovascular do trofoblasto nas artérias espiraladas do leito placentário (angiogênese acelerada). Este processo ocorre com grande produção de proteínas angiogênicas, como P1GF e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Ligadas aos seus receptores no endotélio vascular materno as proteínas de origem placentária favorecem a vasodilatação e produzem angiogênese, deste modo é possível estabelecimento de uma circulação uteroplacentária adequada. (FREITAS, *et al.*, 2017). É possível então observar quantidades significativas de prostaciclina, que tem ação vasodilatadora e inibidora de agregação plaquetária, um antagonista do tromboxano que possui efeito vasoconstritor e agregador plaquetário, desenvolvendo assim o equilíbrio necessário para o bom andamento da gestação.

Quando há inadequação deste processo a placentação ocorre de maneira superficial, estabelecendo uma circulação de má qualidade. Observa-se nesta condição angiogênese em substancial menor quantidade (menos P1GF) e elevação de antiangiogênese. A resposta inflamatória ocasionada pela invasão trofoblástica

inadequada segue em elevação no decorrer na gestação devido as demandas fetais. Observa-se ainda obstrução de algumas arteríolas espiraladas com material fibrinóide. Tal condição desencadeia mecanismos efetores secundários, como resultado tem-se a ocorrência do desequilíbrio angiogênico acima mencionado, aumento do estresse oxidativo materno, disfunção endotelial e imunológica, ocorrendo a perda da refratariedade vascular à angiotensina II, vasoespasmo e diminuição do volume plasmático intravascular (PILLAY, *et al*, 2017; FREITAS, *et al*, 2017). O sinal clínico evidenciado (elevação da PA) demonstra a tentativa do organismo em manter um fluxo sanguíneo adequado diante de um sistema de alta resistência (FREITAS, *et al.*, 2017).

Pelo pressuposto da adaptação imunológica após a disfunção endotelial e a resposta inflamatória sistêmica materna, conforme descreve Freitas (2017) há evidências de que o debris apoptóticos ou necróticos lançados a partir da superfície sincicial da placenta constituem um estímulo inflamatório em todas as gestações. Desta maneira a PE pode ser vista como uma exacerbação do processo inflamatório, contribuindo para a disfunção endotelial sistêmica, conforme modelo hipotético proposto por Pillay (2017).

As repercussões deste processo desordenado acometem todos os órgãos vitais. No aspecto hematológico é possível se observar hemoconcentração progressiva diretamente ligada ao edema, assim como a trombocitopenia (achado comum nas portadoras de PE). Alguns marcadores sensíveis como antitrombina III e fibronectina já demonstram alterações no desenvolvimento inicial desta condição, consequentes a lesão endotelial. O sistema cardiovascular também é sobrecarregado devido ao vasoespasmo generalizado elevando a pós-carga cardíaca. A função renal é afetada em 25% destas gestantes, com alteração da filtração glomerular e da perfusão renal. Esta alteração renal faz com que ocorra a elevação nos níveis de creatinina, redução da eliminação de uratos, elevando então os níveis séricos de ácido úrico (fator de aumento da morbidade neonatal). A proteinúria está diretamente ligada a intensidade do edema renal desta gestante e do depósito de material fibrinóide (FREITAS, *et al.*, 2017; ZUGAIB, 2016).

Em sua função hepática, o vasoespasmo provoca dano tecidual dos hepatócitos, ocasionando a distensão da cápsula de Glisson, que clinicamente

manifesta a dor em quadrante abdominal superior direito. Se da piora da condição pode inclusive culminar em ruptura hepática. Devido ocorrência de edema cerebral vasogênico a gestante manifesta sinais como a cefaleia, diplopia, visão turva, escotomas, em situações mais extremas do comprometimento cerebral desenvolvendo crises convulsivas e até mesmo acidente vascular encefálico hemorrágico (constituindo a principal causa de mortalidade materna). As alterações cerebrais são observadas por exames de imagem com alteração do fluxo sanguíneo de artéria cerebral média (ACM) e das artérias oftálmicas (FREITAS, *et al.*, 2017; ZUGAIB, 2016).

As alterações vasculares mencionadas alteram a pressão coloidosmótica, favorecendo a migração edematosa nos pulmões, podendo então desenvolver edema agudo de pulmão (EAP), afetando a hematose, o que por sua vez piora ainda mais a pós carga, em alguns casos é observado um quadro de pneumonia aspirativa ou mesmo de sofrimento respiratório. Na placenta, observa-se persistência da incisura protodiastólica bilateral nas artérias uterinas, especialmente até 23^a semana (FREITAS, *et al*, 2017). As evidências científicas acumuladas apontam a placenta como sítio de origem da doença. Entender como essas alterações assumem proporções sistêmicas no organismo materno pode ser a chave para impedir a progressão abrupta e violenta da doença. Certamente, o entendimento de todo o processo fisiopatológico é necessário para qualquer proposta de predição, prevenção ou terapia que possa diminuir as altíssimas taxas de mortalidade atribuídas à PE (ALPOIM, *et al*, 2013). Apesar de já ser possível predição de risco por meio de Doppler das artérias uterinas e calculadoras de risco (baseada em critérios específicos), o uso de biomarcadores ou marcadores plasmáticos relacionados ao desequilíbrio angiogênese/angiogênese tem sido descrito na literatura como ferramenta promissora na detecção precoce de PE (FEBRASGO, 2017; ALPOIM, *et al*, 2013; FREITAS, *et al*, 2017).

1.4 EXOSSOMOS PLACENTÁRIOS

1.4.1 Classificação dos exossomos

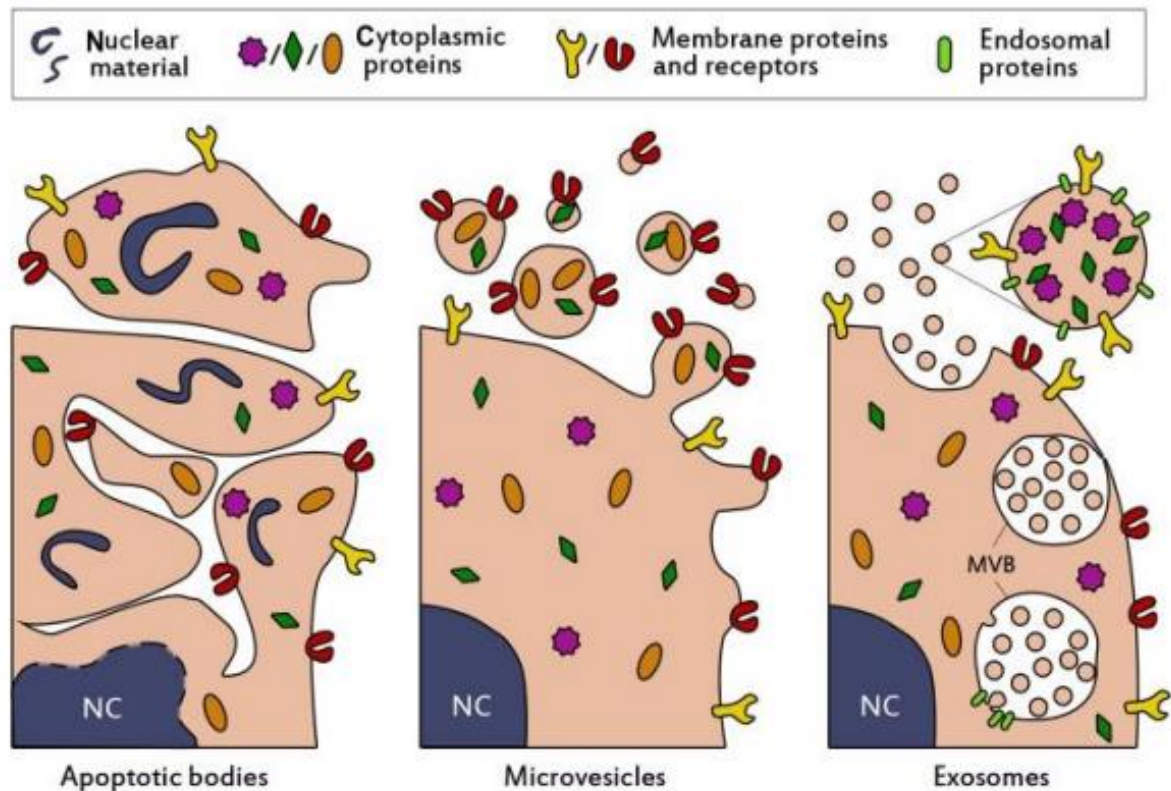
Na literatura nos deparamos com diferentes nomenclaturas para definir esta estrutura e suas semelhantes, porém como descreve Witwer, Théry (2019)

A recomendação de consenso da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares - ISEV sobre a nomenclatura é usar "vesícula extracelular" como o "termo genérico para partículas liberadas naturalmente da célula que são delimitadas por uma bicamada lipídica e não podem se replicar" e modificar "EV" com base em características claras e mensuráveis, como célula de origem, marcadores moleculares, tamanho, densidade, função, entre outros (p.1)

As vesículas extracelulares, são componentes extracelulares presentes em todo o organismo, inclusive na interface materno-fetal, atuando na comunicação celular local e sistêmica (SALOMON, *et al.*, 2014). São partículas naturalmente liberadas pela célula, delimitadas por uma bicamada lipídica e incapazes de se replicarem, ou seja, não contêm um núcleo funcional (THÉRY, *et al.*, 2018).

Sua função e conteúdo variam, e sua interação com a célula alvo pode acontecer via ativação direta de receptores de membrana, pela modificação da composição das moléculas de membrana ou transferindo seu conteúdo após fusão com a membrana plasmática da célula alvo. (ANDRE, *et al.*, 2002, 2004; PAN *et al.*, 1985; VIDAL, MANGEAT, HOEKSTRA, 1997). Com base em sua biogênese, as vesículas extracelulares são atualmente classificadas em três grupos amplos: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, conforme demonstrado na Figura – 1 abaixo (SHAO *et al.*, 2018).

Figura 1 - Representação esquemática da composição das principais de vesículas extracelulares.



Fonte: Figura adaptada de Kooijmans, 2012 *apud* PEREIRA, 2013.

Na gestação, a atividade biológica e a disponibilidade dos exossomos presentes no plasma sanguíneo de pacientes com alterações gestacionais como a pré-eclâmpsia, são alteradas, provavelmente, por ação das alterações no perfil celular dos componentes presentes na interface materno-fetal (SALOMON *et al.*, 2014; KOMAKI *et al.*, 2017). Em um modelo animal, já foi observado que o tráfego exossomal ocorre em duas vias, tanto do feto para a circulação materna, quanto o inverso (SHELLER-MILLER *et al.*, 2019). A exemplo, já foram encontradas evidências de aumento de enzimas como a neprisilina, associada a hipertensão, nos exossomos liberados para a circulação materna em gestações pré-eclâmplicas (GILL *et al.*, 2019).

Em relação a outras patologias, os exossomos podem exercer a função de ativação e inibição metabólica, atuando na progressão do diabetes do tipo 2 (LEE, PARK, KANG, 2016; PILLAY *et al.*, 2017; MORGAN, 2018). Estes achados fortalecem a hipótese de que a caracterização dos exossomos em alterações placentárias

poderia ser utilizada na descoberta de novos marcadores moleculares durante a gestação.

Exossomos trata-se de uma subpopulação de vesículas extracelulares de tamanho, densidade, conteúdo e biogênese distintos e, no sentido de atribuir funções biológicas e/ou diagnósticas e terapêuticas a essas partículas, alta especificidade e caracterização de seus conteúdos é obrigatória (MITCHELL, PEIRIS, KOBAYASHI, 2015). Os exossomos são definidos por uma biogênese endossômica, além do tamanho da partícula (40-120 nanômetros) e densidade (1.13-1.19 g/mL) (JIN, MENON, 2018). Essas vesículas extracelulares possuem em seu interior moléculas sinalizadoras específicas (proteínas, RNA mensageiro, microRNA, lipídios), são liberadas por exocitose nos compartimentos dos biofluidos e regulam a atividade de células próximas e distantes do sítio de liberação, modulando, por exemplo: angiogênese, proliferação, metabolismo e apoptose celular. Assim, a sinalização mediada por exossomos representa uma via fundamental de comunicação intercelular (JIN, MENON, 2018).

Durante a gravidez, a placenta secreta exossomos na circulação materna a partir da sexta semana de gestação e sua liberação é regulada por fatores como a tensão de oxigênio e a concentração de glicose e guarda relação com a massa e a perfusão placentária (SARKER *et al.*, 2016). A concentração de exossomos derivados da placenta no plasma materno aumenta progressivamente durante a gestação e evidências apoiam o envolvimento dos exossomos placentários no desenvolvimento normal da placenta e imunotolerância materna (SARKER *et al.*, 2016).

Em humanos, a manutenção da gravidez depende da formação normal placenta, que tem início com a invasão do trofoblasto na decídua, de modo que, nos estágios iniciais da gestação, tolerância imune, resposta inflamatória e adaptação à hipóxia precisam ser precisamente reguladas pelo microambiente placentário (NIEVES, ROVERA, 2016). Vários tipos de células, como trofoblásticas, endoteliais e imunes, células tronco mesenquimais e adipócitos induzem o desenvolvimento normal da placenta por interações intercelulares embasadas nas vesículas extracelulares, que podem ser utilizadas para diagnosticar várias doenças com base em seus conteúdos, que variam conforme o tipo de célula de origem e características patológicas (YANG, SONG & LIM, 2019). MicroRNAs e proteínas presentes nos

exossomos de origem placentária regulam a resposta inflamatória e a invasão do trofoblasto e, caso haja falha adaptativa ao ambiente modificado no início da gestação, distúrbios como pré-eclâmpsia, prematuridade, diabetes gestacional pode ocorrer (TSOCHANDARIDIS *et al.*, 2015).

Mudanças na liberação das vesículas extracelulares de origem placentária e não placentária, relativas à sua concentração plasmática, composição e bioatividade foram associadas com complicações na gravidez, como diabetes (SALOMON *et al.*, 2016) e pré-eclâmpsia (PILLAY *et al.*, 2017; SALOMON *et al.*, 2017). Assim, percebe-se que a relevância destas estruturas durante a gestação está emergindo rapidamente. Estudos com vesículas extracelulares (EVs) se iniciaram em 1956 com o Dr. Fawcett, que observou pequenas estruturas esféricas intra e extracelulares nas suas análises de microscopia eletrônica (Fawcett, 1956 *apud* XAVIER, 2018). Contudo, a participação das EVs tanto na fisiologia celular como no desenvolvimento de doenças tem sido demonstrada em vários modelos de estudo, por isto nos últimos 20 anos, pesquisas com EVs têm aumentado exponencialmente (XAVIER, 2018).

2. INTERDISCIPLINARIDADE

A saúde materno infantil é intrinsecamente envolvida com aspectos que permeiam todos os campos de formação nas áreas biológicas e de saúde. O estilo de vida, fatores genéticos, ambientais, psíquicos e sociais atuarão como influenciadores do sucesso do período gestacional. Este, sempre interpretado como especial e de grandes cuidados para com aquela que abriga e provê o desenvolvimento de um novo indivíduo.

Observa-se interdisciplinaridade deste estudo pela união dos diferentes saberes em prol de um objetivo em comum quando no desenvolvimento do estudo tomamos como ponto norteador um dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas, o ODS-03, que trata de “Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades” (UN, 2015). Para tal. Utiliza-se a ciência e as tecnologias associadas na busca de inovação para redução da morbimortalidade materna e neonatal, redução de custos associados a estes desfechos, elaboração e criação de técnicas mais acessíveis e menos invasivas para diagnóstico precoce.

Esta união é reforçada pela estruturação da equipe e parceiros deste estudo, em que estão presentes as áreas da saúde (enfermagem, medicina, psicologia, biomedicina, farmácia, biologia), além das equipes de física e química da UFAL. Um estudo que envolveu de acadêmicos à doutores na soma de seus saberes e habilidades para um melhor resultado na proteção ao binômio.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar as vesículas extracelulares (exossomos), presentes na circulação sanguínea periférica de gestantes com e sem hipertensão gestacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar, por Espectroscopia de Raman, as diferenças estruturais e de seu conteúdo, das populações de exossomos presentes no plasma sanguíneo materno.

4. MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

O presente estudo trata-se de um estudo transversal, no qual fator e efeito são observados num mesmo momento histórico (corte transversal do tempo) (FLETSCHER, FLETCHER, FLETCHER, 2014), desenhado para descrever as características de vesículas extracelulares de origem placentária presentes no sangue materno periférico. As informações são advindas do Projeto PLEXO, sigla para *Placental Exossomes*, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob o Parecer nº 3.276.544/2019.

4.2 PERÍODO E LOCAL

A coleta de dados foi realizada no período de julho a dezembro de 2019, no Ambulatório de Alto Risco, assim como no Centro Obstétrico (CO), da Maternidade Darcy Vargas de Joinville – SC. A MDV foi fundada no dia 16 de abril de 1947 e já foi responsável pelo nascimento de mais de 250 mil pessoas ao longo da sua história. Foi a primeira unidade do estado a criar um banco de leite materno, e é referência para 26 municípios do norte do estado em atendimento de gestações de alto risco e partos normais. A instituição conta com diversas especialidades e realiza em média 400 partos por mês (SES, 2019).

4.3 PARTICIPANTES DO ESTUDO E COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

4.3.1 Seleção da amostra, critérios de inclusão e exclusão

A amostra envolveu 1) gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação, em acompanhamento no Ambulatório de Alto Risco; e 2) Gestantes que foram submetidas à cesariana devido a: a) cesárea prévia, b) apresentação fetal pélvica, c) desproporção céfalo-pélvica, d) estado fetal não tranquilizador ou e) falha na progressão do trabalho de parto. Para serem incluídas no estudo as participantes foram convidadas pelos pesquisadores em momento oportuno, durante a rotina de

acompanhamento pré-natal no ambulatório ou pré cesariana no CO. No aceite de participação da pesquisa, estas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A).

As gestantes deveriam apresentar mais de 18 anos de idade como critério de inclusão e realizar acompanhamento pré-natal no PNAR; ausência de enfermidades de caráter autoimune, infeccioso ou genético que não do presente estudo (hipertensão); parto cesariana no respectivo serviço obstétrico; e assinatura do TCLE. Como critérios de exclusão foram definidos: desistir da pesquisa durante sua realização, deixar de realizar pré-natal no referido serviço, presença de tabagismo, consumo de álcool, doença autoimune (lúpus) ou inflamatória e arboviroses.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo teve início após a aprovação da instituição mediante Carta de Exequibilidade (Anexo 3) e após aprovação do CEP (sob o parecer nº 3.276.544/2019), e seguiu em seu desenvolvimento os requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012c), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos. As gestantes foram devidamente orientadas e esclarecidas quanto aos objetivos da pesquisa e informadas do direito de recusa à participação em qualquer momento desta, sem prejuízo ou penalidade de qualquer natureza, sendo mantida a integridade e privacidade das informações obtidas durante o estudo.

Todas as informações coletadas ficam sob a responsabilidade do pesquisador e estão sendo utilizadas para a elaboração de produção científica, porém a divulgação dos resultados será feita sem qualquer identificação das participantes uma vez que utilizamos numeral crescente. Todos os formulários com os dados coletados estão mantidos em sigilo absoluto e ficarão armazenados durante cinco anos e posteriormente inutilizados (picotados e encaminhados para reciclagem).

4.5 RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO

O presente estudo apresenta riscos mínimos, uma vez que a gestante estará exposta a riscos ligados a coleta de sangue (dor, infecção, hematoma) que possuem pouca chance de se concretizarem posto que a coleta será realizada dentro das instalações da MDV e realizada conforme o protocolo da instituição já padronizado para isso e por profissional habilitado. Esta pesquisa tem como benefício principal expandir a compreensão do envolvimento das tEV no desenvolvimento de patologias durante a gestação; Identificação de biomarcadores importantes em todo contexto de saúde da gestante, bom prognóstico e melhoria da saúde da população.

4.6 COLETA DE DADOS

As participantes foram convidadas pelos pesquisadores em momento oportuno, durante a rotina de acompanhamento pré-natal no Ambulatório ou pré cesariana no CO. Após assinatura do TCLE foi realizada entrevista com aplicação de questionário (Apêndice B). Os pesquisadores participantes do projeto PLEXO foram previamente treinados e avaliados quanto a uniformidade de realização de todos os métodos de coleta de dados. Os dados deste estudo compreendem: informações autorrelatadas pelas participantes por meio de entrevista e dados complementares obtidos do prontuário eletrônico no Sistema de Informação Micromed. Os dados deste estudo foram:

(1) Das gestantes atendidas no Ambulatório de Alto Risco:

- Informações autorrelatadas pelas gestantes por meio de entrevista.
- Dados complementares obtidos do prontuário eletrônico no Sistema de Informação Micromed e/ou do cartão de pré-natal da gestante.
- Sangue periférico materno coletado ao término da entrevista, pela pesquisadora principal, sendo esta enfermeira.

(2) Das gestantes que realizaram parto cesáreo:

- Informações autorrelatadas pelas puérperas por meio de entrevista, antes ou após o parto cesáreo, quando após respeitou-se as primeiras 24hs.

- Dados complementares obtidos do prontuário eletrônico no Sistema de Informação Micromed e/ou do cartão de pré-natal da gestante.
- Sangue periférico materno coletado após assinatura TCLE, pela pesquisadora principal, sendo esta enfermeira.

Como complementação do instrumento mencionado, bem como em situações de informação conflitante no momento da entrevista, dúvida do entrevistador em relação a exatidão de alguma resposta que a gestante porventura possa não recordar, o prontuário eletrônico e o cartão de pré-natal foram consultados para consolidação dos dados necessários da participante. Estas informações foram posteriormente tabuladas na base de dados do projeto, através do uso do software Excel for Windows.

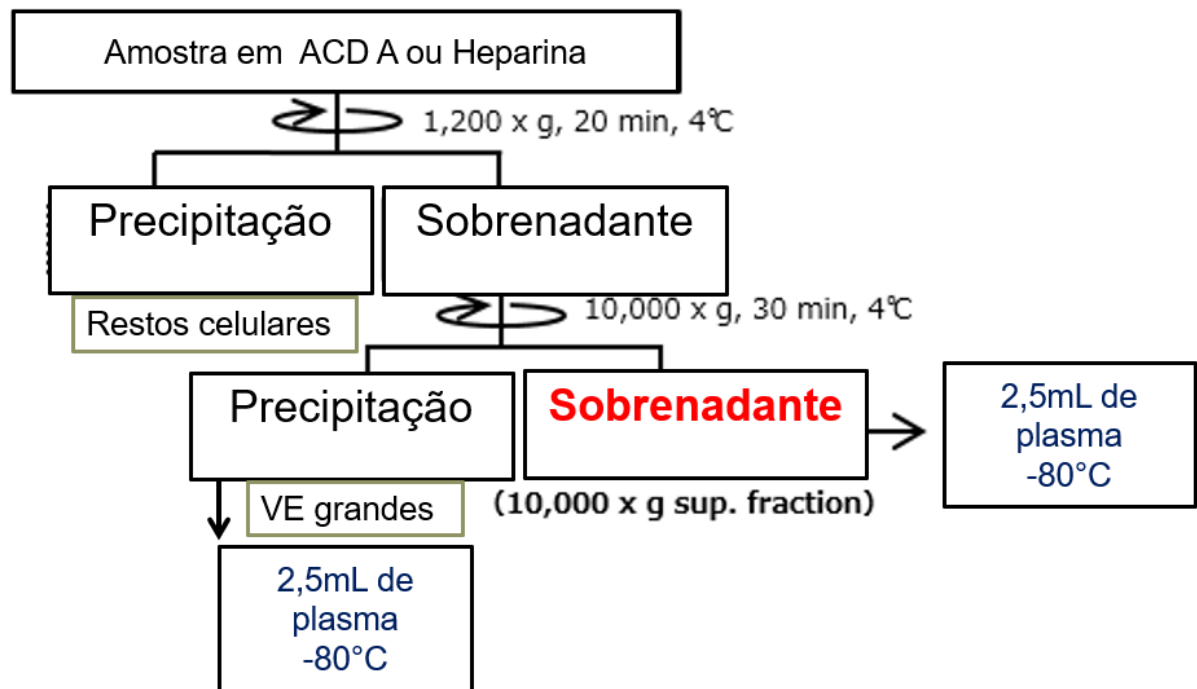
4.7 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Duas amostras de sangue periférico foram coletadas das gestantes logo após a entrevista. Naquelas com indicação de cesariana, pelos critérios supracitados, o sangue foi coletado no Centro Obstétrico. Em ambas as situações, coletou-se 8,5 mL de sangue, de acordo com Théry *et al.* (2018), em dois tubos a vácuo com conservantes distintos: um com Heparina e outro com Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose (ACD). A agulha para coleta foi de calibre 21G, com sistema Vacutainer. O sangue foi imediatamente armazenado sob refrigeração e processado em até duas horas para isolamento do plasma.

4.7.1 Preparação, armazenamento do plasma e isolamento

A primeira etapa para processamento do sangue foi o isolamento do plasma. Para tal realizamos duas centrifugações distintas: a primeira a 1200 g por 20 minutos seguida da segunda, por 30 minutos a 10 000 g, ambos a 4 °C. Um total de 5,4 mL (1,8 mL de solução de ACD, 3,6 mL de Heparina) de plasma processado foi imediatamente armazenado a -80 °C em tubos criogênicos no BIOMOL da Univille. Conforme demonstra o esquema na Figura abaixo:

Figura 2 – Esquema conceitual de preparação e armazenamento do plasma



Fonte: Adaptado de Wako Pure Chemical, Japão.

As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico de Ciências da Saúde da UFAL, sob coordenação do Dr. Alexandre Urban Borbely, devidamente acondicionadas. Os exossomos totais e os exossomos da origem trofoblástica foram então quantificados por microscopia eletrônica de varredura após conjugação com os marcadores Anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD63 humano conjugado à fluorescência (Wako™, Japão) e Anticorpo monoclonal CD9 humano conjugado à Fluoresceína-5-Isotiocianato – FITC (Invitrogen™), onde foi possível evidenciar que as amostras de plasma eram enriquecidas com vesículas extracelulares (exossomos) de 50-150nm, não contendo vesículas grandes e corpos apoptóticos (> 180nm).

Para o isolamento foi utilizado o Kit de isolamento de exossomos Mag Capture™ (Wako™, Japão), em que se utiliza esferas magnéticas e um componente fosfolipídico chamado Fosfatidilserina (PS) (método de afinidade PS). Possibilitando isolar facilmente exossomos de alta qualidade e outras VEs de meios de cultura e de fluidos corporais com alto rendimento, através de microcentrifugação normal. Isolando os exossomos e outras VEs de maneira intacta, porque essas VEs são separadas das

esferas magnéticas com um agente metálico quelante a um pH neutro. Este método consiste no uso da proteína Fosfatidilserina para capturar as vesículas extracelulares com a ajuda de um íon metálico. Ao capturar as vesículas no complexo Esfera Magnética + PS + Íon metálico, estas são isoladas e liberadas com um agente quelante (FUJIFILM). Conforme Figura abaixo:

Figura 03 - Kit de isolamento de exossomos Mag Capture™



Fonte: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan.

4.7.2 Caracterização

4.7.2.1 Espectroscopia de Raman

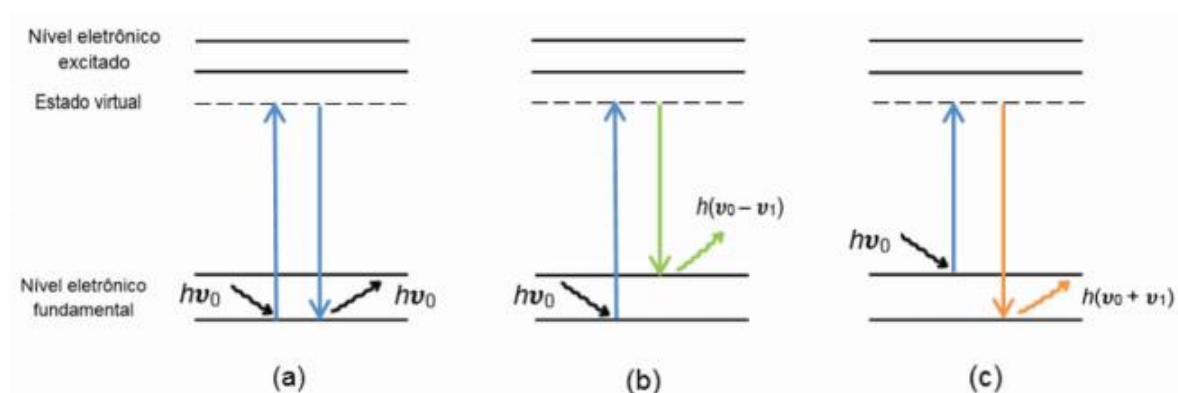
Para caracterização das amostras foi utilizada Espectroscopia de Raman que é uma das principais ferramentas de aplicação em análises de tecidos naturais usando técnicas espectroscópicas. Relativamente simples, reproduzível, não destrutivas ao tecido, e requer pequenas quantidades de material (microgramas a nanogramas) com um mínimo de preparação de amostra. Consegue fornecer informações em nível molecular, permitindo a investigação de grupos funcionais, tipos de ligação e conformações moleculares. As bandas espectrais em espectros vibracionais são específicas da molécula e fornecem informações diretas sobre a composição bioquímica, uma "impressão digital", se qualquer agente tóxico provocar alterações bioquímicas na célula, isso aparecerá nos espectros. A diferença de frequência entre a luz incidente e espalhada é denominado mudança Raman, que é única para moléculas individuais e é medida pelo detector (MOVASAGHIA; REHMANB; REHMAN,2007).

As técnicas espectroscópicas são constantemente utilizadas na identificação, caracterização e elucidação de estruturas de moléculas e compostos, assim como no

monitoramento e controle de reações químicas. Elas fundamentam-se na propriedade que átomos e moléculas possuem de absorver ou emitir energia em uma determinada região do espectro eletromagnético (SANTOS, *et al*, 2019).

Quando um fóton de luz interage com uma molécula, pode induzir uma breve transição para outro estado de energia e esse aumento temporário de energia é liberado quando a molécula volta ao estado original, constituindo o fenômeno de espalhamento Rayleigh (ou elástico). Como a energia de um fóton é proporcional à sua frequência e desde que não ocorra transferência da energia para a molécula, o espalhamento de Rayleigh não fornece informação sobre moléculas em investigação (SALA, 2008). Contudo, o espalhamento pode ocorrer de modo inelástico, quando a molécula libera uma quantidade diferente de energia daquela do fóton incidente, que é o espalhamento de Raman. Devido ao movimento nuclear, a energia pode ser transferida de ou para o fóton incidente. Há dois tipos de espalhamento de Raman: Stokes e anti-Stokes. No primeiro, a energia pode ser transferida para a molécula a partir do fóton incidente por movimento nuclear. No segundo caso, a energia é transferida para o fóton porque, devido à distribuição de energia térmica, essas moléculas estão inicialmente em um estado de energia maior (SALA, 2008; FARIA, *et al*, 1997). Estas definições estão na Figura a seguir:

Figura 04 – Espalhamento de Raman



Fonte: SANTOS, *et al*, 2019. (a) espalhamento elástico (Rayleigh), (b) espalhamento inelástico (região Stokes) e (c) espalhamento inelástico (região anti Stokes).

Na microscopia de Raman ou espectroscopia micro-Raman, o espectrômetro Raman está acoplado a um microscópio óptico. Assim, o feixe de excitação é direcionado ao microscópio, que permite que a amostra seja examinada com base

nas ampliações permitidas pela ótica do microscópio, propiciando que áreas específicas de até 1 μm de diâmetro sejam analisadas. Os feixes refletidos e espalhados, elástica e inelasticamente, são coletados através da objetiva do microscópio e direcionados ao espectrômetro, no qual o espalhamento Rayleigh é separado por filtros holográficos (MAZALI, 2009).

4.7.2.2 Medições espectrais de Raman e Análise

Os espectros Raman das amostras de soro foram obtidos em espectrômetro XploRA (Horiba) acoplado a um microscópio Olympus. As amostras foram excitadas por um laser de 532 nm que foi focalizado através de uma objetiva de 10 $\times$. A mesma lente objetiva foi utilizada para coletar a luz espalhada Raman após interação com a amostra, em uma geometria de retroespalhamento. A fim de minimizar o aquecimento induzido por laser das amostras, uma irradiação de baixa potência foi usada (~ 5 mW) durante um curto tempo de exposição (exposição a laser de 3 segundos para 5 acumulações). A grade de difração utilizada tinha 1200 linhas / mm, o que rendeu uma resolução espectral de 1,5 cm^{-1} .

As frequências de pico foram calibradas com wafer de silício, tendo como referência a banda vibracional de 520 cm^{-1} . Foram coletados os espectros Raman de 35 amostras de soro, sendo 20 saudáveis (Controle) e 15 de gestantes hipertensas puras. Para cada amostra, pelo menos 5 espectros Raman foram obtidos na região da impressão digital de 600–1800 cm^{-1} . Todos os dados foram coletados nas mesmas condições. A fim de comparar as alterações de espectro relacionadas, todos os espectros foram ajustados ao fundo, suavizados e normalizados pela área.

Os espectros pré-processados foram analisados estatisticamente usando Análise de Componentes Principais (PCA). Essa técnica multivariada extrai as informações importantes dos dados e identifica padrões que revelam as principais características do conjunto analisado, transformando os dados originais em um conjunto de novas variáveis ortogonais denominadas componentes principais (PCs), de forma que as variâncias espectrais sejam maximizadas. Cada PC é uma combinação linear das n variáveis independentes de deslocamento Raman. O primeiro PC é responsável pela maior variação; o segundo PC é ortogonal ao primeiro, com cada PC sucessivo sendo ortogonal a todos os precedentes e sendo responsável

por uma proporção decrescente da variância. Normalmente, a maior parte da variação está contida nos três primeiros componentes principais (PC1, PC2 e PC3). Para investigar as causas espectrais subjacentes da variação descrita pelos PCs, os gráficos de carregamento dos PCs são usados (ABDI; WILLIAMS, 2010).

5. RESULTADOS

PLASMA ENRIQUECIDO COM EXOSSOMOS COMO FONTE DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE HIPERTENSÃO GESTACIONAL

(ENRICHED PLASMA WITH EXOSOMES AS A SOURCE OF POSSIBLE
HYPERTENSIVE PREGNANCY BIOMARKERS)

Rodrigo Barbano Weingrill¹, Sandra Luft Paladino², Eduardo Manoel Pereira³, Jean Carl Silva⁴, Alexandre Urban Borbely⁵

¹Professor do Departamento de Medicina e do Instituto de Pesquisa de Biogênese (TG – CORE), da Universidade do Havaí em Manoa, Honolulu, Hawaí, EUA.

²Mestranda em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville, Santa Catarina, Brasil.

³Professor do Departamento de Farmácia e Acadêmico de Psicologia da Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville, Santa Catarina, Brasil.

⁴Professor do Departamento de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville Santa Catarina, Brasil.

⁵Professor do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Alagoas, Maceió, Brasil.

Trabalho desenvolvido na Maternidade Darcy Vargas, Ambulatório de Gestação de Alto Risco, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Endereço: Rua Miguel Couto, 44, Anita Garibaldi, Joinville/SC CEP 89202-190.

Dados para correspondência:

Sandra Luft Paladino

Rua Ituporanga, nº204, apto 204, Bom Retiro, Joinville/SC, CEP 89222-430

Telefone: (47) 3804 0514 / (47) 98836 5867

Email: Sandra_luft2012@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Isolar e caracterizar as microvesículas extracelulares (presentes no plasma sanguíneo materno) de pacientes que passaram por gestações com e sem hipertensão. **Método:** Trata-se de um estudo transversal para descrever as características de vesículas extracelulares de origem placentária presentes no sangue materno periférico, realizada no período de julho a dezembro de 2019, no ambulatório de alto risco e centro obstétrico de uma maternidade pública de SC. Após entrevista foram coletadas duas amostras de sangue periférico de cada gestante, realizado isolamento e as amostras foram então avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman. **Resultados:** A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as amostras de plasma eram enriquecidas com vesículas extracelulares (exossomos) de 50-150nm, não contendo vesículas grandes e corpos apoptóticos ($> 180\text{nm}$). A espectroscopia Raman mostrou diferenças na análise de componentes principais (PCA), com 62% de variações no PC1. A maioria das diferenças foi encontrada nos aminoácidos, com aumento de metionina e triptofano e níveis mais baixos de tirosina, arginina e leucina. Além disso, foram encontrados aumento nas moléculas da estrutura do DNA, alterações no ácido mirístico, amida I e amida II, carotenoides e fosfolipídios. **Conclusão:** Os níveis mais elevados de fosfolipídios e compostos estruturais de RNA podem sugerir que o enriquecimento do plasma com exossomos pode fornecer uma melhor visualização da carga do exossomo durante o início da gestação, além de apresentar possíveis novos biomarcadores metabólicos para distúrbios gestacionais hipertensivos. Considerando isso, o uso de plasma enriquecido com exossomo como fonte de biomarcadores de gestação pode fornecer uma visão precoce da comunicação placentária na interface materno-fetal, com potencial para se tornar uma ferramenta poderosa para diagnóstico diferencial e prognóstico no final da gravidez.

Palavras-chave: gestação, Hipertensão Induzida pela Gravidez, microvesículas.

ABSTRACT

Objective: To isolate and characterize the extracellular microvesicles (present in maternal blood plasma) from patients who have had pregnancies with and without hypertension. **Method:** This is a cross-sectional study to describe the characteristics of extracellular vesicles of placental origin present in peripheral maternal blood, carried out from July to December 2019, in the high-risk ambulatory and obstetric center of a public maternity in SC. After the interview, two samples of peripheral blood were collected from each pregnant woman, isolation was performed and the samples were then evaluated by scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **Results:** The scanning electron microscopy analysis showed that the plasma samples were enriched with 50-150nm extracellular vesicles (exosomes), without large vesicles and apoptotic bodies ($> 180\text{nm}$). Raman spectroscopy showed differences in principal component analysis (PCA), with 62% of variations in PC1. Most of the differences were found in amino acids, with increased methionine and tryptophan and lower levels of tyrosine, arginine and leucine. In addition, an increase in DNA structure molecules, changes in myristic acid, amide I and amide II, carotenoids and phospholipids were found. **Conclusion:** Higher levels of phospholipids and structural RNA compounds may suggest that plasma enrichment with exosomes may provide a better view of the exosome load during early pregnancy, in addition to presenting possible new metabolic biomarkers for hypertensive gestational disorders. Considering this, the use of exosome-enriched plasma as a source of pregnancy biomarkers can provide an early view of placental communication at the maternal-fetal interface, with the potential to become a powerful tool for differential diagnosis and prognosis in late pregnancy.

Keywords: pregnancy, Pregnancy-Induced Hypertension, microvesicles.

INTRODUÇÃO

A gestação, o parto e nascimento são momentos de maior impacto na vida de indivíduos e famílias, pois apesar de não configurar doença, tal momento requer cuidados e atenção de uma equipe multidisciplinar, garantindo o resultado esperado por eles e/ou o mínimo possível de desfechos ruins. A placenta, por sua vez, exerce um dos papéis mais importantes neste processo, especialmente por transportar gases e nutrientes da mãe ao feto. Quando do seu comprometimento, em qualquer fase da gestação, surgem as comorbidades que caracterizam a gestação como de alto risco, em que existe um risco direto ao desenvolvimento fetal e à condição materna.

As desordens gestacionais estão entre as principais causas de mortalidade materna em diversos países, em que a gestação se desenvolve sob uma placentação superficial devido a invasão debilitada do sinciotrofoblasto no estroma uterino, remodelando as artérias espiraladas uterinas de modo insuficiente, comprometendo o aporte de oxigênio e nutrientes, e o desfecho gestacional, causando uma desordem inflamatória e hipertensiva sistêmica na gestante. Estima-se que a pré eclâmpsia complica de 2 a 8% das gestações em todo o mundo.

A possibilidade de isolamento e caracterização das microvesículas de origem trofoblástica, na corrente sanguínea materna durante a gestação, é uma ferramenta que permite o estudo da atividade das células trofoblásticas durante o processo de placentação. Como resultado, as diferenças encontradas na produção das microvesículas em gestantes normais e patológicas poderiam elucidar possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento normal e anormal da placenta, assim como, mecanismos de comunicação celular na interface materno-fetal. As vesículas extracelulares, no contexto das novas técnicas, são algumas das microestruturas promissoras a respeito de seus papéis biológicos.

A liberação destas estruturas para a circulação materna ocorre especialmente na primeira metade da gestação. O papel das vesículas extracelulares é sugerido como importante para a comunicação materno-fetal tanto em gestações normais quanto em patológicas, estando também associado aos aspectos imunológicos da gestação. Estes fatores elevam seu potencial como biomarcadores precoces de risco gestacional, por isso o objetivo deste estudo é isolar e caracterizar as microvesículas

extracelulares (presentes no plasma sanguíneo materno) de pacientes que passaram por gestações com e sem hipertensão.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de um estudo transversal, no qual fator e efeito são observados num mesmo momento histórico (corte transversal do tempo) (FLETSCHER, 2014), desenhado para descrever as características de vesículas extracelulares de origem placentária presentes no sangue materno periférico. Foi realizado no período de julho a dezembro de 2019, no Ambulatório de Alto Risco, assim como no Centro Obstétrico (CO), da Maternidade Darcy Vargas de Joinville – SC.

A amostra envolveu 1) gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação, em acompanhamento no Ambulatório de Alto Risco; e 2) Grupo Controle: Gestantes que foram submetidas à cesariana devido a: a) cesárea prévia, b) apresentação fetal pélvica, c) desproporção céfalo-pélvica, d) estado fetal não tranquilizador ou e) falha na progressão do trabalho de parto. Para serem incluídas no estudo, as participantes foram convidadas pelos pesquisadores em momento oportuno, durante a rotina de acompanhamento pré-natal no ambulatório ou pré cesariana no CO. No aceite de participação da pesquisa, estas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Como critérios de inclusão as gestantes deveriam apresentar mais de 18 anos de idade; realizar acompanhamento pré-natal no PNAR; ausência de enfermidades de caráter autoimune, infeccioso ou genético que não do presente estudo (hipertensão); parto cesariana no respectivo serviço obstétrico; e assinatura do TCLE. Como critérios de exclusão foram definidos: desistir da pesquisa durante sua realização, deixar de realizar pré-natal no referido serviço, presença de tabagismo, consumo de álcool.

O presente estudo teve início após a aprovação da instituição mediante Carta de Exequibilidade e após aprovação do CEP (sob o parecer nº 3.276.544/2019), e seguiu em seu desenvolvimento os requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012c), que regulamenta a

pesquisa envolvendo seres humanos. Após assinatura do TCLE foi realizada entrevista com aplicação de questionário. Os dados deste estudo compreendem: informações autorrelatadas pelas participantes por meio de entrevista e dados complementares obtidos do prontuário eletrônico.

Duas amostras de sangue periférico foram coletadas das gestantes logo após a entrevista. Coletou-se 8,5 mL de sangue, de acordo com Théry *et al* (2018), em dois tubos a vácuo com conservantes distintos: um com Heparina e outro com Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose (ACD). A agulha para coleta foi de calibre 21G, com sistema Vacutainer. O sangue foi imediatamente armazenado sob refrigeração e processado em até duas horas para isolamento do plasma. A primeira etapa para processamento do sangue foi o isolamento do plasma, sendo realizadas duas centrifugações distintas: a primeira a 1200 g por 20 minutos, seguida da segunda, por 30 minutos, a 10 000 g, ambos a 4 °C. Um total de 5,4 mL (1,8 mL de solução de ACD, 3,6 mL de Heparina) de plasma processado foi imediatamente armazenado a -80 °C em tubos criogênicos.

As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico de Ciências da Saúde da UFAL. Para o isolamento foi utilizado o Kit de isolamento de exossomos Mag Capture™ (Wako™, Japão), em que se utilizam esferas magnéticas e um componente fosfolipídico chamado Fosfatidilserina (PS) (método de afinidade PS), possibilitando isolar facilmente exossomos de alta qualidade e outras VEs de meios de cultura e de fluidos corporais com alto rendimento, através de microcentrifugação normal. Além de isolar os exossomos e outras VEs de maneira intacta, porque essas VEs são separadas das esferas magnéticas com um agente metálico quelante a um pH neutro. Ao capturar as vesículas no complexo Esfera Magnética + PS + Íon metálico, estas são isoladas e liberadas com um agente quelante (FUJIFILM).

Para caracterização das amostras foi utilizada Espectroscopia de Raman, que é uma das principais ferramentas de aplicação em análises de tecidos naturais usando técnicas espectroscópicas. Os espectros Raman das amostras de soro foram obtidos em espectrômetro XploRA (Horiba) acoplado a um microscópio Olympus. As amostras foram excitadas por um laser de 532 nm que foi focalizado através de uma objetiva de 10 ×. A mesma lente objetiva foi utilizada para coletar a luz espalhada Raman após

interação com a amostra, em uma geometria de retroespalhamento. A fim de minimizar o aquecimento induzido por laser das amostras, uma irradiação de baixa potência foi usada (~ 5 mW) durante um curto tempo de exposição (exposição a laser de 3 segundos para 5 acumulações). A grade de difração utilizada tinha 1200 linhas / mm, o que rendeu uma resolução espectral de $1,5 \text{ cm}^{-1}$. (MOVASAGHA; REHMANB; REHMAN, 2007).

As frequências de pico foram calibradas com wafer de silício, tendo como referência a banda vibracional de 520 cm^{-1} . Para cada amostra, pelo menos 5 espectros Raman foram obtidos na região da impressão digital de $600\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$. Todos os dados foram coletados nas mesmas condições. A fim de comparar as alterações de espectro relacionadas, todos os espectros foram ajustados ao fundo, suavizados e normalizados pela área.

Os espectros pré-processados foram analisados estatisticamente usando Análise de Componentes Principais (PCA). Essa técnica multivariada extrai as informações importantes dos dados e identifica padrões que revelam as principais características do conjunto analisado, transformando os dados originais em um conjunto de novas variáveis ortogonais denominadas componentes principais (PCs), de forma que as variâncias espectrais sejam maximizadas. Normalmente, a maior parte da variação está contida nos três primeiros componentes principais (PC1, PC2 e PC3). Para investigar as causas espectrais subjacentes da variação descrita pelos PCs, os gráficos de carregamento dos PCs são usados (ABDI; WILLIAMS, 2010).

RESULTADOS

Do total de participantes inclusas ($n=122$), 37 eram hipertensas, maioria (71,4%) encontrava-se na faixa etária acima dos 35 anos de idade, com ensino médio completo (40,5%). Foram encaminhadas para isolamento e processamento dos testes 35 amostras, estas referem-se ao Grupo Controle (20 participantes com outras condições, além de cesariana por iteratividade, desproporção céfalo-pélvica, entre outras) e ao Grupo Hipertensas (15 participantes, que no momento da entrevista não apresentavam outras comorbidades, além da hipertensão).

As participantes do grupo controle apresentaram idade média de 28,4 anos, predominantemente de cor de pele branca ou parda, com ensino médio completo, união estável como estado civil, com renda familiar entre 1 e 3 salários mínimos. Em relação a gestação mais da metade relatou não praticar atividade física regular, todas estavam no segundo trimestre gestacional, em sua maioria vivenciavam a primeira gestação, seguidas por terceira gestação. Grande parte relatou não possuir histórico familiar de HAS gestacional. Como desfecho gestacional predominante, esteve a cesariana com média de Idade Gestacional de 38,3 semanas.

Para as do Grupo Hipertensas, a idade média de 29,8 anos, predominantemente de cor de pele branca, com ensino médio completo, união estável como estado civil, com renda familiar entre 1 e 3 salários mínimos. Em relação a gestação, o surgimento da HAS esteve na IG média de 25 semanas, mais da metade relatou não praticar atividade física regular, a grande maioria estava no terceiro trimestre gestacional, em sua maioria vivenciavam a segunda gestação. Mais da metade relatou não possuir histórico familiar de HAS gestacional, e apenas cinco delas possuíam histórico de HAS em gestação anterior. Como desfecho gestacional predominante esteve a cesariana com média de Idade Gestacional de 36 semanas, conforme apresentado na Tabela a seguir:

Tabela 1. Características das gestantes com amostra avaliada

	Controle (n=11)	Hipertensas (n=13)	
Idade (média $\pm$ desvio padrão)	28,4 $\pm$ 7,5 anos	29,8 $\pm$ 4,9 anos	p = 0,58*
Cor da pele			
Branca	5	9	
Negra	1	0	p = 0,40**
Parda	5	3	p = 0,37**
Amarela	0	1	p = 1,00**
Nível de ensino			
Sem Instrução	0	0	
Alfabetizada	0	0	p = 1,00**
Fundamental incompleto	0	1	p = 1,00**
Fundamental completo	0	0	p = 1,00**
Médio incompleto	3	4	p = 1,00**
Médio completo	5	7	p = 1,00**
Superior incompleto	0	0	p = 1,00**
Superior completo	3	1	p = 1,00**

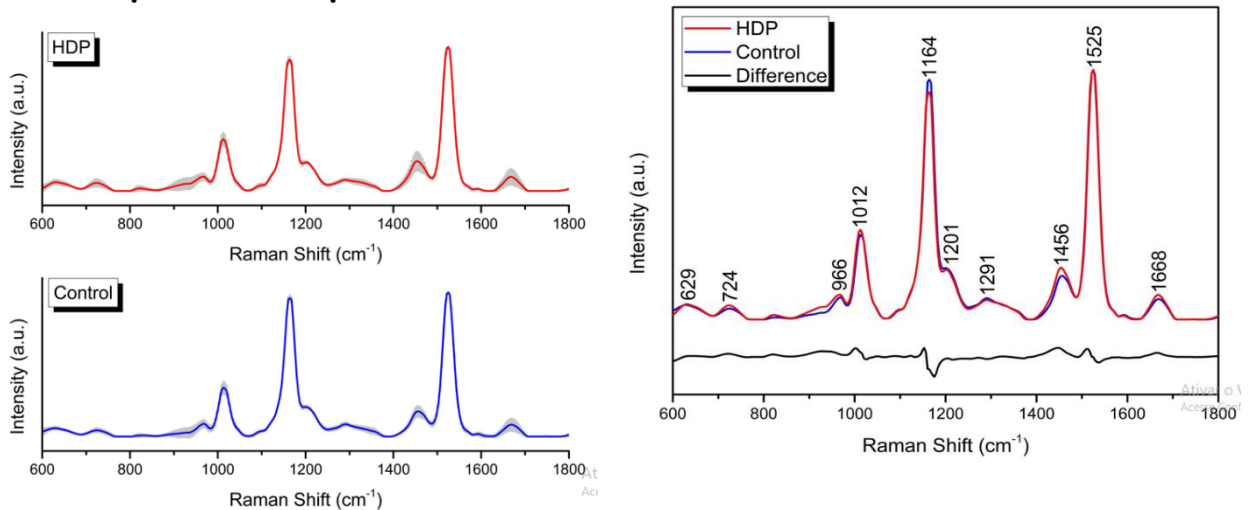
Estado civil			
Solteira	3	3	
Casada	3	4	p = 1,00**
União estável	4	6	p = 1,00**
Divorciada	1	0	p = 1,00**
Renda familiar (média ± desvio padrão)	2.847 ± 2.123 reais	2.936 ± 1.610 reais	p = 0,47*
Idade gestacional de início de hipertensão (média ± desvio padrão)	Não se aplica	25 semanas ± 6,2 dias	Não se aplica
Atividade física			
Sim	5	5	
Não	6	8	p = 1,00**
Trimestre da Gestação			
Segundo	11	4	
Terceiro	0	9	p = 0,0006**
Número de gestações			
1	5	2	
2	2	9	p = 0,04**
3	3	1	p = 1,00**
4	1	1	p = 1,00**
HAS Gestacional anterior			
Sim	1	5	
Não	0	8	p = 0,42**
História familiar de HAS gestacional			
Sim	4	6	
Não	7	7	p = 0,69**
Desfecho			
Parto normal	2	1	
Parto cesariano	5	11	p = 0,52**
Não informado	4	1	
Idade gestacional (média ± desvio padrão)	38,3 ± 0,9 semanas	36,0 ± 1,7 semanas	p = 0,60***

Legenda: *Teste T de Student. ** Teste de Fisher. *** Teste de Mann-Whitney

Ao incidir laser (Raman) sobre as amostras obteve-se o espectro dos componentes químicos presentes em cada uma, exibindo um espectro característico para cada amostra, o que permitiu conhecer os compostos presentes nas amostras de cada grupo. Conforme mostra a Figura abaixo (painel esquerdo), é possível

observar as bandas relativas ao Grupo de Hipertensas na cor vermelha e logo abaixo o grupo controle representado pela cor azul. A sobreposição dos espectros (painel direito) de cada grupo permite perceber quais compostos foram responsáveis pelas diferenças espectrais observadas.

Figura 5 – Espectroscopia de Raman
Espectroscopia Raman



Legenda: Espectroscopia dos grupos analisados, Hipertensas (em vermelho) e Controle (em azul).

As atribuições das bandas Raman utilizadas na interpretação das características espectrais foram realizadas com base na literatura publicada (CHEN *et al*, 2014; BASAR *et al*, 2012; SAHU *et al*, 2013; SAHU *et al*, 2015;)

- 629 cm^{-1} : Acetil coenzima A; Glicerol.
- 724 cm^{-1} : Adenina (modo de respiração em anel de bases de DNA / RNA); Acetil coenzima A.
- 966 cm^{-1} : Hidroxiapatite; vibração de alongamento de PO_4^{3-} de hidroxiapatita.
- 1012 cm^{-1} : Fenilalanina.
- 1164 cm^{-1} : Tirosina (colágeno tipo I).
- 1201 cm^{-1} : Ácidos nucleicos e fosfatos; Amida III devido ao alongamento C – N e flexão N – H; Estrutura eletrônica de nucleotídeos; Aminoácidos (prolina e tirosina).
- 1291 cm^{-1} : Citosina.
- 1456 cm^{-1} : curvatura CH_2 de proteínas.

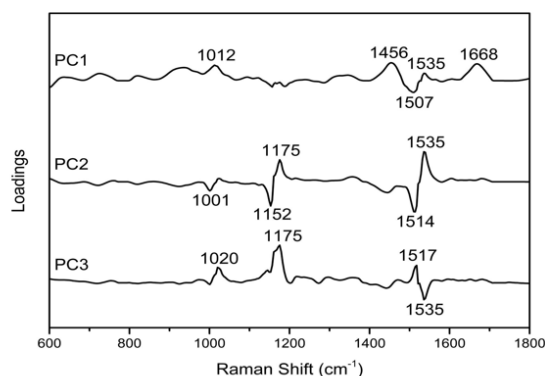
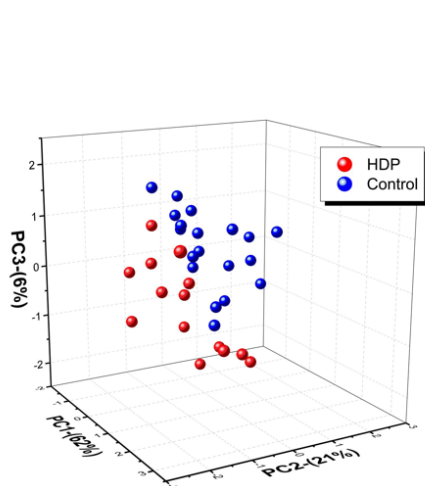
- 1525 cm^{-1} : Vibrações no plano do conjugado $-\text{C} = \text{C}-$.
- 1668 cm^{-1} : banda Amida I (proteína, lipídios); estrutura β -turn; $\text{C} = \text{C}$ trecho.

A análise de componentes principais (PCA) revelou que os espectros que apresentaram variância mais significativa (62%) entre os grupos foram de PC1, e os componentes principais de PC2 e PC3 não atingiram variância relevante (Figura 6). Demais contribuições estão apresentadas na Tabela 1.

- 1012 cm^{-1} : Fenilalanina.
- 1456 cm^{-1} : curvatura CH_2 de proteínas.
- 1668 cm^{-1} : banda Amida I (proteína, lipídios); estrutura β -turn; $\text{C} = \text{C}$ trecho.

Figura 6 – Principais Componentes

Principal component analysis (PCA) de 600 a 1800 cm^{-1}



Maiores contribuintes para PC1 em 1012, 1456, 1507, 1535 e 1668 cm^{-1} - **62% da variação entre os dois grupos**

Maiores contribuintes para PC2 em 1001, 1152, 1175, 1514 e 1535 cm^{-1} - **21% da variação entre os dois grupos**

Maiores contribuintes para PC3 em 1020, 1175, 1517 e 1535 cm^{-1} - **6% da variação entre os grupos**

Fonte: Laboratório de Biologia Celular UFAL (parceiro).

Podemos observar na Tabela abaixo, da atribuição dos picos de Raman, que em relação as participantes controle (sem hipertensão), as hipertensas possuem alterações estatisticamente significativas para estas moléculas acima mencionadas na Espectroscopia de Raman. Considerando que as atribuições são as mudanças espaciais nas moléculas, e as contribuições são os sítios onde houve alteração das ligações químicas entre elas, com os achados deste estudo é possível compreender

em quais sítios houve alterações das ligações químicas, e que possuem relação intrínseca com o bom desenvolvimento da gestação. Dos principais achados, tem-se maior significância nos picos de metionina, ácido mirístico, tirosina, carotenoides.

TABELA 2 – Atribuições e Contribuições dos Picos de Raman

Atribuição dos Picos Raman (Raman peak assignments)

Sinal Raman [cm ⁻¹]	Possíveis atribuições	Contribuições	Intensidade das bandas dos Controles (Mean + SEM)	Intensidade das bandas de DHEG (Mean+SEM)	P
629	C-C bending	Ácido ascórbico Ácido úrico	0.0584 ± 0.0014	0.0649 ± 0.0028	0,4062 - ns
724	C-S stretching N+(CH ₃) ₃ stretching CH bending Ring breathing	Metionina Esfingomielina Acetil-CoA e CoA Adenina Hipoxantina	0.0440 ± 0.0015	0.0617 ± 0.0038	0,0001 - ***
966	Phosphate stretching =CH out of plane trans deformation C-C twisting C-C stretching	Hidroxiapatita de cálcio Ácidos graxos monoinsaturados Citrate de sódio DNA backbone e RNA ribose-fosfato	0.0884 ± 0.0028	0.1148 ± 0.0073	0,001 - ***
1001	C-N C-CH and C-C=O bending Ring breathing	L-Lisina D-(+)-glucose Fenilalanina	0.2023 ± 0.0031	0.2588 ± 0.0100	< 0,0001 - ***
1012	C-O stretching Strong Van der Waals force interactions	Ribose Tryptofano	0.3398 ± 0.0043	0.3908 ± 0.0148	0,0002 - ***
1020	C=O stretching	D-(+)-lactose monohydrate D-(+)-Galactosamine N-Acetyl-D-glucosamine	0.3151 ± 0.0042	0.3386 ± 0.0136	0,6762 - ns
1152	C-C stretching C-N stretching	Carotenóides Proteínas	0.6541 ± 0.0043	0.6869 ± 0.0056	< 0,0001 - ***
1164	Ring breathing mode NH ₃ rocking	L-Tirosina L-Arginina	0.9600 ± 0.0022	0.9103 ± 0.0046	< 0,0001 - ***
1175	Undefined vibration CH bending C-C stretching	Citosina e Guanina Tirosina e Leucina Ácido mirístico	0.6090 ± 0.0041	0.5849 ± 0.0061	< 0,0001 - ***
1201	CH stretching C-N stretching	Tirosina	0.2058 ± 0.0011	0.1957 ± 0.0023	0,0002 - ***
1291	CH bending	Citosina Amida III (alfa hélix)	0.0857 ± 0.0015	0.0828 ± 0.0031	0,0084 - **
1456	CH ₂ stretching and CH ₃ assymmetric deformation C-C bending	Triptroselinina Proteínas e fosfolípidos L-arginina Desoxirribose Lactato	0.1752 ± 0.0039	0.2401 ± 0.0169	0,0004 - ***
1507	C-C assymmetric stretching NH bending	Ácido Mirístico Vitamina B12	0.3679 ± 0.0051	0.3757 ± 0.0104	0,0185 - *
1514	C=C stretching	Carotenóides D-(+)-Galactosamine	0.7247 ± 0.0057	0.7377 ± 0.0106	0,0177 - *
1517	C-C stretching	L-Glutamato Carotenoides (beta caroteno)	0.8957 ± 0.0050	0.9004 ± 0.0088	0,1208 - ns
1525	C=C stretching In plane vibrations of conjugated - C=C-	Carotenóides	0.9994 ± 0.0004	0.9948 ± 0.0032	0,0819 - ns
1535	C=C stretching	Carotenóides (beta caroteno)	0.6844 ± 0.0057	0.6745 ± 0.0085	0,1077 - ns
1668	C=C stretching C=O stretching	Amida I (folha beta) Lysozyme Colesterolis Cholesteryl palmitate	0.0815 ± 0.0043	0.1486 ± 0.0230	0,0236 - *

Fonte: Laboratório de Biologia Celular UFAL (parceiro).

DISCUSSÃO

Em relação aos picos de Raman encontrados para cada grupo podemos observar que em relação as participantes do grupo controle (sem hipertensão), as hipertensas possuem alterações estatisticamente significativas para alguns componentes moleculares, como mostrado na Tabela 2 dos achados deste estudo é possível compreender em quais sítios houve alterações das ligações químicas, e que possuem relação intrínseca com o bom desenvolvimento da gestação. Dos principais achados, tem-se maior significância nos picos de metionina, ácido mirístico, tirosina, carotenoides.

A homocisteína, um aminoácido produzido a partir da metionina hepática, é metabolizada nas vias de desmetilação e de transulfuração, sendo que seus valores plasmáticos e urinários refletem a síntese celular. A hiper-homocisteinemia tem sido associada a maior risco de eventos aterotrombóticos, e a literatura sugere associação causal, independente de outros fatores de risco para doença arterial. A diminuição da homocisteína plasmática para valores normais é seguida de redução significativa na incidência de doença aterotrombótica (NEVES *et al*, 2004).

A agressão ao endotélio parece ser um dos mecanismos pelos quais a homocisteína leva à lesão vascular. O grau de lesão endotelial provocada pela hiper-homocisteinemia era semelhante ao observado em associação com outros fatores de risco, como na hipercolesterolemia e na hipertensão arterial sistêmica. Um dos principais mecanismos de disfunção endotelial induzida pela hiper-homocisteinemia estaria relacionado à diminuição da biodisponibilidade do fator de relaxamento do endotélio, o óxido nítrico, sintetizado a partir de L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico-sintase. O óxido nítrico é um potente vasodilatador endógeno, que inibe a agregação plaquetária, a migração de leucócitos e a proliferação e migração da célula muscular lisa e restringe a ativação e expressão de moléculas de adesão e a produção de ânions superóxido (Venâncio *et al*, 2010). No desenvolvimento placentário, especialmente em fase inicial, a presença do óxido nítrico é essencial e, associado à prostaciclina, favorece a remodelação e a vasodilatação necessária à artéria uterina espiralada (FREITAS *et al*, 2017).

A hiper-homocisteinemia exerce um papel importante na disfunção endotelial através de mecanismos oxidativos e inflamatórios. Estudos *in vitro* em células

expostas à homocisteína demonstraram um aumento da atividade dos fatores de coagulação XII e V, redução da ativação da proteína C, inibição do ativador de plasminogênio tecidual, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e prostaciclina, estimulação da agregação plaquetária, aumento da atividade do fator de von Willebrand, inibição da expressão da trombosmodulina, indução da expressão do fator tecidual e supressão da expressão do heparan-sulfato na parede vascular. Todas essas alterações gerariam um ambiente trombogênico vascular, com a ativação da cascata de coagulação e modificação do tônus vascular (Venâncio, et al, 2010). É possível que alterações significativas do conteúdo exossômico de homocisteína também ofereçam um ambiente pró-trombótico na gestante, favorecendo o surgimento de complicações desta natureza.

A concentração menor de carotenoides (1535 cm^{-1}) está associada a doenças ou perda da homeostasia, como alterações pré-neoplásicas e câncer. Os carotenoides possuem efeito destacável na resposta imune e na comunicação intracelular, bem como apresentam efeitos benéficos contra doenças relacionadas ao envelhecimento. Além disso, há indícios de que os carotenoides, em associação com outros componentes apresentam efeito protetor contra algumas doenças crônicas (hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia). O estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio também tem sido considerado parte importante na etiologia das doenças crônicas. Acredita-se que a oxidação de LDL tenha um papel na patogênese da aterosclerose e doença cardiovascular. De acordo com essa hipótese, macrófagos dentro da parede do vaso arterial fagocitam a LDL oxidada e iniciam o processo da formação da placa. O aumento de espécies reativas de oxigênio inativa a produção de óxido nítrico, o qual acelera o fenômeno patológico chamada disfunção endotelial (GOMES, 2007). A relação entre o nível de carotenoides e desencadeamento de hipertensão gestacional são muito pouco escritas. Assim a partir do resultado de que há diferença estatisticamente significativa para estes compostos entre gestante com hipertensão e sem hipertensão pode-se abrir uma nova oportunidade para concentração de esforços voltados para melhor elucidação desta relação.

No estudo de Palan *et al.* (2001), foram comparados os níveis de quatro carotenoides (alfa-caroteno, betacaroteno, licopeno e cantaxantina) no tecido placentário, soro materno, sangue do cordão umbilical de gestantes normais ($n = 22$)

e que entraram em pré-eclâmpsia ($n = 19$). Foi observado que os níveis de beta caroteno, licopeno e cantaxantina nas placentas das que tiveram pré-eclâmpsia estava significativamente menor que das controles ($p = 0,32, 0,009$ e $0,013$, respectivamente em relação aos controles. Níveis séricos de betacaroteno e de licopeno estavam significativamente diminuídos nas gestantes com pré-eclâmpsia ($p = 0,004$ e $0,008$, respectivamente). Não foram encontradas diferenças para esses parâmetros no sangue do cordão umbilical. Assim, níveis baixos de carotenoides no tecido placentário e no soro materno das gestantes com pré-eclâmpsia podem estar envolvidos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Azar *et al.* (2011) verificaram em um estudo longitudinal menor nível sérico de alfa e beta caroteno em gestantes com diabetes tipo 1 que desenvolveram pré-eclâmpsia em relação às que não evoluíram para pré-eclâmpsia. O beta-caroteno possui atividade pró-vitamina A (STROBEL, 2017), assim, é possível que o beta caroteno reduzido no terceiro trimestre deva-se a maior atividade antioxidante ligada a maior estresse oxidativo ou maior conversão de beta caroteno em vitamina A para compensar níveis baixos desta. Assim, notam-se alterações de carotenoides em diferentes pontos de controle de sinalização homeostática, sendo este o primeiro estudo a apontar que essas alterações também possam dar-se ao nível de exossomos placentários.

A tirosina possui relação inversa com pressão arterial. Em geral, a hipertensão se relaciona com níveis menores de tirosina, enquanto a administração de tirosina tem efeito hipotensor. Tirosina e leucina estão reduzidas em quadros de pré-eclâmpsia. A presença de moléculas inibidoras de tirosina quinase pode estar diretamente relacionado à inibição da sinalização via tirosina quinase e dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF). A sinalização VEGF é importante para o adequado funcionamento endotelial e a síntese de óxido nítrico – sua inibição prejudica a vasodilatação. Outros efeitos da inibição de VEGF incluem a indução da morte de células endoteliais e a rarefação dos vasos de resistência (SOUZA, 2015). Portanto, é possível que a falta de ativação de receptores tirosina quinase possa trazer prejuízo suficiente para impedir o remodelamento das artérias uterinas espiraladas, que necessitam de tal remodelação para estabelecer um fluxo sanguíneo adequado ao desenvolvimento e progressão da gestação. Quando do não remodelamento, o fluxo de sangue necessário para uma adequada irrigação placentária requer maior pressão

arterial ocasionando assim lesão endotelial e processo inflamatório, o que predispõe a hipertensão (ALPOIM, 2013).

Conforme estudo desenvolvido por Speziali, *et al* (2018) um total de 47 proteínas intracelulares e 32 secretadas foram desreguladas após tratamentos com diferentes concentrações de ácido mirístico em cultivo de células hepáticas. A análise de enriquecimento funcional revelou que ácido mirístico modula a formação de gotículas de lipídeos e a organização do citoesqueleto, induz estresse no retículo endoplasmático, mudanças no exossomo e classificação de miRNA extracelular em cultivo de células hepáticas.

O ácido mirístico está relacionado com HDL e colesterol total, também pode aumentar estresse de retículo endoplasmático e a liberação de exossomos. O ácido mirístico ancora lípidos em membranas citoplasmáticas. O ácido mirístico pode modificar proteínas *co* ou pós-translação, em processo chamado de *myristoylation* e tem papel fundamental em interações proteína-proteína, sinalização celular e *targeting* de membrana. Dadas as funções cruciais do ácido mirístico anteriores é plausível que as alterações deste nos exossomos resultem em múltiplas perturbações de sinalização intracelular que favoreçam o desenvolvimento da hipertensão na gestação, embora as relações de causa e efeito ainda sejam desconhecidas (RAMPERSAUD *et al*, 2020).

Estreitando algumas hipóteses chama-se atenção para o ácido palmítico (que também é um ácido graxo saturado) no estudo de Rampersaud *et al* (2020) observou-se que níveis sanguíneos altos deste composto em mulheres obesas induz uma resposta inflamatória em células trofoblásticas extravilosas o que dificulta sua capacidade de migrar em direção as células da musculatura lisa, o que por conseguinte pode prejudicar o remodelamento da artéria uterina espiralada. Conforme este estudo níveis elevados de ácido palmítico em situações fisiopatológicas como obesidade podem prejudicar o desenvolvimento precoce da placenta e predispor à disfunção placentária, e induzir a expressão de vários mediadores vasoativos e inflamatórios em células trofoblásticas extravilosas incluindo endotelina, interleucina (IL) -6, IL-8 e fator inibidor do plasminogênio 1(PAI1).

Conforme descreve FEBRASGO (2017), por meio de dados epidemiológicos, é possível reconhecer mulheres com maior possibilidade de desenvolver a doença

(hipertensão) e traçar uma estratégia de seguimento pré-natal diferenciado. E um destes fatores mencionados é a idade, e observa-se que um número expressivo de gestantes (71%) do estudo se encontra acima dos 35 anos de idade, o que de fato evidencia a necessidade do cuidado especializado.

No presente estudo, considerando gestantes controle e hipertensas, foram observadas diferenças significativas apenas para o número de gestações e o trimestre da gestação, de modo que estar na segunda gestação e no segundo trimestre foram fatores significativamente ligados ao desenvolvimento de hipertensão em relação aos controles. Conforme trazido por múltiplas diretrizes, a hipertensão gestacional é a que surge após vinte semanas de gestação (BRAUNTHAL e BRATEANU, 2019). Ainda, conforme Li, Binongo e Kancherla (2019), a nuliparidade também está significativamente associada com a hipertensão gestacional, tornando compreensíveis as diferenças encontradas.

No estudo de Sousa *et al.* (2019), que abrangeu 114 gestantes, a idade mais elevada, antecedentes familiares de hipertensão, hipertensão prévia, gestações tardias, diabetes e obesidade foram associados com hipertensão arterial gestacional. Gestação após os 35 anos de idade corroboram com informações do Ministério da Saúde, que apontam esta idade como fator de risco materno (BRASIL, 2015). Costa *et al.* (2016) e Sousa *et al.* (2019) encontraram mais gestantes com cor de pele branca, porém Andrade *et al.* (2013) não, ilustrando que essa característica pode estar relacionada aos perfis das gestantes e do local onde o estudo é realizado. Demais características apresentadas na tabela de dados sociodemográficos não diferiram entre gestantes hipertensas e controles.

CONSIDERAÇÕES

Em conjunto, apesar dos estudos anteriores não apontarem para tirosina, metionina, ácido mirístico e carotenoides ao nível exossômico, estes estudos apontam para potenciais biomarcadores que possam estar alterados muito precocemente na gestação e iniciarem as modificações de sinalização intracelular (à nível bioquímico), que possam resultar mais tardiamente na hipertensão gestacional (alteração morfológica). Assim, uma vez que as gestantes hipertensas possuem elevação do nível sanguíneo de exossomos placentários o desvendar dos sinalizadores

exossômicos poderá constituir recurso altamente valioso tanto para diagnóstico e prevenção, como para compreensão da gênese da hipertensão gestacional, daí representada a grande relevância deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDI, Hervé; WILLIAMS, Lynne. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433-459, 2010.
- ALPOIM, Patrícia Nessler, *et al.* Pré-eclâmpsia: o que há de anômalo na placentação? **Femina**. Março/Abril 2013. vol 41. nº 2.
- AZAR, Madona. **Serum Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Women With Type 1 Diabetes and Preeclampsia: a longitudinal study.** A longitudinal study. 2011. *Diabetes Care* 2011 Jun; 34(6): 1258-1264. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc10-2145>. Disponível em: <https://care.diabetesjournals.org/content/34/6/1258>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- BASAR, Günay *et al.* Investigation of preeclampsia using Raman spectroscopy. **Journal of Spectroscopy**, v. 27, n. 4, p. 239-252, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde Conselho Nacional de Saúde. **Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012.** Disponível em: Acesso em: 25 fev. 2021. Brasília - DF, 2012c.
- BRAUNTHAL, Stephanie; BRATEANU, Andrei. **Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment.** 2019. SAGE Open Med. 2019; DOI: 2050312119843700.. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458675/>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- CHEN, Si-Jin *et al.* Study of the molecular variation in pre-eclampsia placenta based on micro-Raman spectroscopy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 290, n. 5, p. 943-946, 2014.
- FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; FLETCHER, G. S. **Epidemiologia clínica.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 296p.
- FREITAS, Fernando; *et al.* **Rotinas em Obstetrícia.** 7.ed. Editora Artmed. Porto Alegre – RS, 2017.
- GOMES, Fabio da Silva. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de cancer. **Rev. Nutr.**, Campinas, 20(5):537-548, set./out., 2007.
- LI, Chaohua; BINONGO, Jose N.; KANCHERLA, Vijaya. **Effect of Parity on Pregnancy-Associated Hypertension Among Asian American Women in the United States.** 2019. *Maternal and Child Health Journal* volume 23, pages1098–1107. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10995-019-02746-z>. Acesso em: 15 abr. 2021.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**. 42: 5, 493 — 541. DOI: 10.1080/05704920701551530.

MONTEIRO, Anna Louise Stellfeld; SOARES, Mariana Collodetto; MACIEL, Pamela Camara; NASCIMENTO, Denis José. **AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE GESTANTES HIPERTENSAS CRÔNICAS DA MATERNIDADE HC-UFPR**. 2017. REVISTA MÉDICA DA UFPR. 4(1): 17-22. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/revmedicaufpr/article/view/52233>. Acesso em: 15 abr. 2021.

NEVES, Lindalva Batista; MACEDO, Danielle Mazziere; LOPES, Antônio Carlos. Homocisteína. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 5, p. 311-20, 2004.

PALAN, Prabhudas R.; MIKHAIL, Magdy S.; ROMNEY, Seymour L. **Placental and Serum Levels of Carotenoids in Preeclampsia**. 2001. From the Department of Obstetrics and Gynecology, Bronx-Lebanon Hospital Center and Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/11816238_Placental_and_Serum_Levels_of_Carotenoids_in_Preeclampsia. Acesso em: 20 abr. 2021.

RAMPERSAUD, Amanda M.; DUNK Caroline; LYE, Stephen J.; RENAUD, Stephen J. Palmitic acid induces inflammation in placental trophoblasts and impairs their migration toward smooth muscle cells through plasminogen activator inhibitor-1. **Mol Hum Reprod**. 2020 Nov 1;26(11):850-865. DOI: 10.1093/molehr/gaaa061. PMID: 32898274; PMCID: PMC7648931.

SAHU, Aditi *et al.* Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers. **Analyst**, v. 138, n. 14, p. 4161-4174, 2013.

SAHU, Aditi *et al.* Recurrence prediction in oral cancers: a serum Raman spectroscopy study. **Analyst**, v. 140, n. 7, p. 2294-2301, 2015.

SAHU, Aditi *et al.* Oral cancer screening: serum Raman spectroscopic approach. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 11, p. 115006, 2015.

SPEZIALI, Giulia; *et al.* Myristic acid induces proteomic and secretomic changes associated with steatosis, cytoskeleton remodeling, endoplasmic reticulum stress, protein turnover and exosome release in HepG2 cells. **J Proteomics**. 2018 Jun 15;181:118-130. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.04.008. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29654920.

SOUZA, Vinicius Barbosa; *et al.* Hipertensão Arterial no Paciente com Câncer. **Arq Bras Cardiol**, 104 (3):246-252, 2015.

SOUSA Marilda Gonçalves de, *et al.* **Epidemiologia da hipertensão arterial em gestantes**. Einstein (São Paulo). 2020; 18:eAO4682. Disponível em: http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4682

THÉRY, Clotilde; *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular

Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**. vol. 7,1 1535750. 23 Nov. 2018.

VENÂNCIO, Luciene de Souza; BURINI, Roberto Carlos; YOSHIDA, Winston Bonetti. Tratamento dietético da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. **J Vasc Bras**, Vol. 9, N° 1, 2010.

ZUGAIB, Marcelo. **Obstetrícia**. 3.ed3 Editora Manole. Barueri – SP, 2016.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo demonstram que é possível obter amostras enriquecidas com exossomos presentes na corrente sanguínea de gestantes, utilizando método acessível (barato e simples) como a centrifugação de soro materno, para obtenção de plasma enriquecido com exossomos, livre de células apoptóticas (isolamento), e por meio da espectroscopia de Raman (método recente e barato de se realizar) compreender as diferenças estruturais e de seu conteúdo e das populações destes que estão presentes no plasma sanguíneo de gestantes com e sem hipertensão (caracterizar), e através destes elucidar a relação da presença destes exossomos em maior quantidade nas primeiras semanas de gestação com os desfechos gestacionais relacionados, especialmente relacionados a hipertensão.

Com os resultados obtidos é possível (apesar dos estudos anteriores não apontarem para tirosina, metionina, ácido mirístico e carotenoides ao nível exossômico) indicar potenciais biomarcadores que possam estar alterados muito precocemente na gestação e iniciarem as modificações de sinalização intracelular que possam resultar mais tardiamente na hipertensão gestacional (alteração morfológica). Assim, uma vez que as gestantes hipertensas possuem elevação do nível sanguíneo de exossomos placentários o desvendar dos sinalizadores exossômicos poderá constituir recurso altamente valioso tanto para diagnóstico e prevenção, como para compreensão da gênese da hipertensão gestacional, já que em nosso estudo encontramos redução significativa de aminoácidos essenciais e elevação de colesterol (especialmente LDL), achados estes que contribuirão para o desenvolvimento de mais estudos na comunicação da interface materno-fetal.

Apontamos como facilidades deste estudo a prontidão em participar, por parte de todas as gestantes abordadas e a abertura da instituição (Maternidade Darcy Vargas) para realização de pesquisas comprometidas com a saúde e o bem-estar da população, e também à qualidade das parcerias estabelecidas em seu desenvolvimento com entidades locais e nacionais, que agregaram não apenas conhecimento, mas investimento e tecnologia de ponta à realização deste estudo no decorrer do curso de mestrado. Não podemos deixar de mencionar que fragilidades foram encontradas em sua execução, especialmente no tangente em relação aos

registros em prontuários, que devido ao perfil do serviço são direcionados a especificidades, limitando alguns pontos de discussão do estudo. O atual cenário de restrições em decorrência da pandemia por Covid-19 não pode ser menosprezado neste enredo uma vez que o estudo foi pautado em questões logísticas delicadas. O somatório destas facilidades e fragilidades traduz-se num estudo com potencialidade para novas pesquisas neste âmbito e melhoria nos desfechos gestacionais das futuras gestantes.

REFERÊNCIAS

- ABDI, Hervé; WILLIAMS, Lynne. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433-459, 2010.
- ACOG. American College of Obstetricians and Gynecologists. **Gestational Hypertension and Preeclampsia**. Practice Bulletin N°. 202. January 2019 - Volume 133 - Issue 1.
- ALPOIM, Patrícia Nessralla, *et al.* Pré-eclâmpsia: o que há de anômalo na placentação? **Femina**. Março/Abril 2013. vol 41. nº 2.
- ANDRE, F; *et al.* Malignant effusions and immunogenetic tumor-derived exosomes. **The Lancet**, v. 360, n. 9329, p. 295-305, 2002.
- ANDRE, F; *et al.* Exosomes as potent cell-free peptidebased vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2126-2136, 2004.
- AZAR, Madona. **Serum Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Women With Type 1 Diabetes and Preeclampsia**: a longitudinal study. A longitudinal study. 2011. *Diabetes Care* 2011 Jun; 34(6): 1258-1264. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc10-2145>. Disponível em: <https://care.diabetesjournals.org/content/34/6/1258>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- BASAR, Günay *et al.* Investigation of preeclampsia using Raman spectroscopy. **Journal of Spectroscopy**, v. 27, n. 4, p. 239-252, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Gestação de Alto Risco: Manual Técnico**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 5ª edição. Brasília – DF, 2012a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Atenção ao pré-natal de baixo risco: Manual Técnico**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica, nº 32. Brasília - DF, 2012b.
- BRASIL. Ministério da Saúde Conselho Nacional de Saúde. **Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012**. Disponível em: Acesso em: 25 fev. 2021. Brasília - DF, 2012c.
- BRAUNTHAL, Stephanie; BRATEANU, Andrei. **Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment**. 2019. SAGE Open Med. 2019; DOI: 2050312119843700.. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458675/>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- BENIRSCHKE, K; KAUFMANN, P; BAERGEN, RN. **Pathology of the human placenta**. New York, Springer-Verlag, 2006.
- BOYD, JD; HAMILTON, WJ. **The Human Placenta**. Heffer, Cambridge, 1970.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. PRAMS Questionnaires. Division of Reproductive Health, National Center for Chronic Disease Prevention and Health

Promotion. May 2, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/prams/questionnaire.htm>. Acesso em: 16 abr. 2020.

CLARK, JW. Biological response modifiers. *Cancer Chemother Biol. Response Modif.*, v. 18, p. 223-238, 1999.

CHAOUAT, Gérard. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Seminars in Immunopathology*, 29(2), 95–113. 2007.

CHEN Y., LI G., LIU M.L. Microvesicles as emerging biomarkers and therapeutic targets in cardiometabolic diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 16(1):50–62. 2018.

CHEN, Si-Jin *et al.* Study of the molecular variation in pre-eclampsia placenta based on micro-Raman spectroscopy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 290, n. 5, p. 943-946, 2014.

CORVINUS FM, *et al.* Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol*; 50(4):316-21. 2003.

ELLIOT, MG; Crespi, BJ. Phylogenetic evidence for early hemochorial placentation in eutheria. *Placenta*, v. 30, n. 11, p. 949-967, 2009.

ENDERS, AC. Cytodifferentiation of trophoblast in the anchoring villi and trophoblastic shell in the first half of gestation in the macaque. *Microsc. Res. Tech.*, v. 38, p. 3-20, 1997.

ENDERS, AC. Transition from lacunar to villous stage of implantation in the macaque, including establishment of the trophoblastic shell. *Acta Anat. (Basel)*, v. 152, p. 151-169, 1995.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma Demonstração sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. *Química Nova*, v. 20, 319, 1997.

FEBRASGO. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. **Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos**. Série Orientações e Recomendações FEBRASGO. n. 8. São Paulo: 2017.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; FLETCHER, G. S. Epidemiologia clínica. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 296p.

FREITAS, Fernando; *et al.* **Rotinas em Obstetrícia**. 7.ed. Editora Artmed. Porto Alegre – RS, 2017.

GERRETSEN, G; HUISJES, HJ; ELEMA, JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to preeclampsia and fetal growth retardation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, v. 88, n. 9, p. 876-81, 1981.

GILL, M. Placental Syncytiotrophoblast-Derived Extracellular Vesicles Carry Active NEP (Neprilysin) and Are Increased in Preeclampsia. *Hypertension*, 73, 1112–1119. 2019

GOLDSTEIN, DP; BERKOWITZ, RS. Gestational trophoblastic neoplasms. Clinical principles of diagnosis and management. **Major Probl. Obstet. Gynecol.**, v. 14, p. 1-301, 1982.

GOMES, Fabio da Silva. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de cancer. **Rev. Nutr.**, Campinas, 20(5):537-548, set./out., 2007.

JIN, J.; MENON, R. Placental exosomes: a Proxy to understand pregnancy complications. **American Journal of Reproduction and Immunology**, v. 79, n. 5, p. e12788, 2018.

KAMMERER, U; *et al.* Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. **Am. J. Pathol.**, v.157, n.1, p. 159-169, 2000.

KAUFMANN, P; CASTELUCCI, M. Extravillous trophoblast in the human placenta. A review. **Trophoblast Res.**, v. 10, p. 21-25, 1997.

KEMP, B; *et al.* Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with celular phenotype: a comparison of intra and extrauterine implantation sites. **Histochem. Cell Biol.**, v. 117, p. 401-414, 2002.

KOMAKI, M. *et al.* Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, p. 219, 2017.

KOSANKE, G; KADYROV, M; KORR, H; KAUFMANN, P. Maternal anemia results in increased proliferation in human placental vili. **Trophoblast. Res.**, v. 11, p. 339-357, 1998.

LASKARIN, G; *et al.* Antigem-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v58, n.3, p. 255-267, 2007.

LEE, MJ; PARK, DH; KANG, JH. Exosomes as the source of biomarkers of metabolic diseases. **Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 21, n.3, p.119-125, 2016.

LEITE, Mirlane Gondim, *et al.* Sentimentos advindos da maternidade: revelações de um grupo de gestantes. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 19, n. 1, p. 115-124, jan/mar. 2014.

LOREGGER, T; POLLHEIMER, J; KNOFLER, M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast a review. **Placenta**, v. 24, suppl A, p. 104-110, 2003.

MARTE, Ana Paula Marte; SANTOS, Raul Dias. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, vol.14(4): 252-257, 2007.

MAZALI, Italo; *et al.* Estudo por espectroscopia micro-raman dos mecanismos de separação de fase em vidros fosfatos de metais de transição. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 7, 1956-1960, 2009.

MERCHANT, Michael L; *et al.* Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. Nature reviews. **Nephrology** vol. 13,12: 731-749. 2017.

MITCHELL, D. M.; PEIRIS, H. N.; KOBAYASHI, M. *et al.* Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. **Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 213, supl. 4, p. S173-S181, 2015.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MOR, G; ABRAHAMS, VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.1, p.119, 2003.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**. 42: 5, 493 — 541. DOI: 10.1080/05704920701551530.

NEVES, Lindalva Batista; MACEDO, Danielle Mazziero; LOPES, Antônio Carlos. Homocisteína. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 5, p. 311-20, 2004.

MORGAN, T.K. Cell- and size-specific analysis of placental extracellular vesicles in maternal plasma and pre-eclampsia. **Transl Res.**, v. 201, p. 40-48, 2018.

MOURA, Marta David Rocha de; *et al.* Hipertensão Arterial na Gestação - importância do seguimento materno no desfecho neonatal. **Com. Ciências Saúde** - 22 Sup 1: S113-S120, 2011.

NIEVES, A. D.; RIVERA, N. H. Placenta-derived exosomes as biomarkers and mediators of immunoregulation during pregnancy. **[IN]Genios**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2016.

O BRIEN, JM; *et al.* The management of placenta percreta: conservative and operative strategies. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 175, n. 6, p. 1632-1638, 1996.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Recomendações da OMS para a Prevenção e tratamento da pré-eclâmpsia e da eclâmpsia**. 2018. ISBN 978 92 4 854833 8.

OPAS. Organização Panamericana da Saúde Brasil. **Folha informativa - Mortalidade materna**. Brasília – DF. Agosto de 2018.

PILLAY, P. *et al.*, Placenta-derived exosomes: potential biomarkers of preeclampsia. **Int. Nanomedicine**, v. 12, p. 8009–8023, 2017.

PAN, BT; *et al.* Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **J. Cell Biol.** v. 101. p. 942-948, 1985.

PEREIRA, Lúcia de Fátima de Sousa. **Potencialidades terapêuticas das microvesículas**. Orientadora Professora Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2013.

PIJNENBORG, R; Anthony, J; DAVEY, DA. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol.**, v. 98, p. 648-655, 1991.

RAGHUPATHY, R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 37, n. 6, p. 478- 484, 1997.

RAMPERSAUD, Amanda M.; DUNK Caroline; LYE, Stephen J.; RENAUD, Stephen J. Palmitic acid induces inflammation in placental trophoblasts and impairs their migration toward smooth muscle cells through plasminogen activator inhibitor-1. **Mol Hum**

Reprod. 2020 Nov 1;26(11):850-865. DOI: 10.1093/molehr/gaaa061. PMID: 32898274; PMCID: PMC7648931.

RED-HORSE, K; *et al.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 744-754, 2004.

SADLER, Thomas W. Langman. **Embriologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SAHU, Aditi *et al.* Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers. **Analyst**, v. 138, n. 14, p. 4161-4174, 2013.

SAHU, Aditi *et al.* Recurrence prediction in oral cancers: a serum Raman spectroscopy study. **Analyst**, v. 140, n. 7, p. 2294-2301, 2015.

SAHU, Aditi *et al.* Oral cancer screening: serum Raman spectroscopic approach. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 11, p. 115006, 2015.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. Editora Unesp: São Paulo. 2008.

SALOMON, C; *et al.* A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. **PLoS One**, v. 9, 2014.

SALOMON, C.; *et al.* Gestational diabetes mellitus is associated with changes in the concentration and bioactivity of placenta-derived exosomes in maternal circulation across gestation. **Diabetes**, v. 65, p. 598-609, 2016.

SALOMON, C.; *et al.* Placental exosomes as early biomarkers of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 9, p. 3182-3194, 2017.

SANTOS, Adriele R.; *et al.* Aplicação da espectroscopia raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. **Quim. Nova**, Vol. 42, No. 5, 489-496, 2019.

SARKER, K. S. R.; *et al.* Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 204, p. 1-19.

SES. Secretaria de Estado da Saúde. Maternidade Darcy Vargas comemora 72 anos nesta terça-feira. Disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/noticias-geral/todas-as-noticias/1641-noticias-2019/10605-maternidade-darcy-vargas-de-joinville-completa-72-anos-neste-terca-feira>. Acesso em: 07 de novembro de 2020.

SHAO, Huilin; *et al.* "New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles." **Chemical reviews** vol. 118,4: 1917-1950. 2018

SHELLER-MILLER S, *et al.* Cre-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 2019.

SHIMADA, S; *et al.* Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 56, n.2, p. 193-200, 2006.

SILVA, Bruna Gonçalves Cordeiro da, *et al.* Mortalidade materna no Brasil no período de 2001 a 2012: tendência temporal e diferenças regionais. **Rev. bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 484-493, Sept. 2016.

SOARES, Cássia Elena. **Classificação de risco Gestacional na Atenção básica. Oficina de fortalecimento do pré-natal.** Módulo II. 2015. Disponível em: <http://www.saude.sc.gov.br/index.php/documentos/atencao-basica/rede-cegonha/eventos-2/oficina-de-fortalecimento-do-pre-natal/modulo-ii/9306-1-dra-cassia-elena-soares/file>. Acesso em: 06 jul. 2020.

SOUZA, Vinicius Barbosa; *et al.* Hipertensão Arterial no Paciente com Câncer. **Arq Bras Cardiol**, 104 (3):246-252, 2015.

SOUSA Marilda Gonçalves de, *et al.* **Epidemiologia da hipertensão arterial em gestantes.** Einstein (São Paulo). 2020; 18:eAO4682. Disponível em: http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4682

SPEZIALI, Giulia; *et al.* Myristic acid induces proteomic and secretomic changes associated with steatosis, cytoskeleton remodeling, endoplasmic reticulum stress, protein turnover and exosome release in HepG2 cells. **J Proteomics**. 2018 Jun 15;181:118-130. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.04.008. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29654920.

SUN, Yan-Zi; *et al.* Extracellular Vesicles: A New Perspective in Tumor Therapy. **BioMed research international**. vol. 2018 2687954. 23 Apr. 2018.

TEDNER, S. G.; ÖRTQVIST, A. K.; ALMQVIST, C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. **Clin. Exp. Allergy**. 42, 1430–1447, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03997>. Acesso em: 25 fev. 2021.

THÉRY, Clotilde; *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**. vol. 7,1 1535750. 23 Nov. 2018.

TONG, M, CHAMLEY, L W. Placental extracellular vesicles and feto-maternal communication. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. vol. 5,3 a023028.

TSOCHANDARIDIS, L. N.; *et al.* Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. **BioMed Research International**, v. 201, p. 1-8, 2015. DOI: 10.1155/2015/294954.

UN General Assembly, United Nations. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**, 21 October 2015, A/RES/70/1.

VARGIS, Elizabeth *et al.* Detecting biochemical changes in the rodent cervix during pregnancy using Raman spectroscopy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 8, p. 1814-1824, 2012.

VENÂNCIO, Luciene de Souza; BURINI, Roberto Carlos; YOSHIDA, Winston Bonetti. Tratamento dietético da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. **J Vasc Bras**, Vol. 9, N° 1, 2010.

VIDAL, M; MANGEAT, P; HOEKSTRA, D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. **J. Cell Sci.**, v. 110, p. 1867- 1877, 1997.

VO, T; HARDY, DB. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. **J. Cell Commun. Signal.**, v. 6, n. 3, p. 139- 153, 2012.

ZUGAIB, Marcelo. **Obstetrícia**. 3.ed3 Editora Manole. Barueri – SP, 2016.

XAVIER, Vanessa. **Validação e caracterização de vesículas Extracelulares liberadas por células de Adenocarcinoma mamário 4t1 após interação com macrófagos RAW 264.7**. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental). Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, 2018.

XU, G; *et al*. Reconstitution of smad3 restores TGF-beta response of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 upregulating in human choriocarcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, p. 383-390, 2003.

WHO. World Health Organization. **WHO recommendation on antenatal care contact schedules**. Luxembourg. 2016.

WITWER, Kenneth W.; THÉRY, Clotilde. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2019, Vol. 8.

WOLF, P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. **British Journal of Haematology**, 13(3), 269–288. 1967.

YÁÑEZ-MÓ, María *et al*. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles** vol. 4 27066. 14 May. 2015.

YANG, C.; SONG, G.; LIM, W. Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. **Reproduction**, v. 158, p. 189-196, 2019.

YAGEL, S; *et al*. Basement membrane invasion by first trimester human trophoblast: requirement of brached complex-type Asn-linked oligosaccharides. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 8, p. 305-317, 1990.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Critérios para encaminhamento para serviços Ambulatoriais de Gestação de Alto Risco

REDE CEGONHA – SANTA CATARINA

Critérios para encaminhamento para serviços Ambulatoriais de Gestação de Alto Risco

CLASSIFICAÇÃO DE RISCO GESTACIONAL

RISCO.....10 ou + Pontos	ALTO
RISCO..... 5 a 9 Pontos	MÉDIO
RISCO..... até 4 Pontos	BAIXO

1 – IDADE: (-) de 15 anos..... 1 De 15 a 34 anos..... 0 (+) de 35 anos..... 1	5. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL: Baixo Peso(IMC<18, 5kg/m2) e/ou ganho de peso inadequado e/ou anemia..... 1 Peso Adequado (IMC 18, 5-24, 9kg/m2).....0 Sobrepeso(25-29, 9kg/m2)..... 1 Obesidade (IMC>30kg/m2). 5	7- PATOLOGIAS DE RISCO ATUAL: OBST. + GINEC. Ameaça de Aborto 5 Anom. do trato Genitourinario.....5 Placenta Prévia.....10 Câncer Materno.....10 Doença Hemolítica.....10 Esterilidade Tratada.....5 Isoimunização.....10 Neoplasias Ginecológicas..... 10 Mal Formações Congénitas.....10 Crescimento Uterino Retardado.....10 Polihidramnio/Oligoidramnio.....10 Citologia Cervical Anormal(Nich-II-III)10 Doença Hipertensiva da Gestação 10 Diabetes Gestacional..... 10 Gemelar.....10 Incomp. Istmo Cervical.....10
2 – SITUAÇÃO FAMILIAR Situação Familiar Instável Não..... 0 Sim1 Aceitação de GRAVIDEZ: Aceita..... 0 Não Aceita..... 1	6 – ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS: Abortos até 25 Abortos espontâneos + 2. 10 Natimorto5 Prematuro5 Óbito Fetal5 Eclampsia.....10 Placenta Prévia.....5 Descol. Prem. de Placenta.....5 Incompetência Istmo Cervical10 Restrição de Cresc. Intrauterino5 Malformação Fetal5 Último Parto (-) de 12 meses..... 2 + 1 Filho Prematuro10 Pre eclampsia5	MÉDICAS + CIRURG. Cardiopatias..... 10 Varizes acentuadas..... 5 Pneumopatia Grave.....10 Diabetes Mellitus.....10 Doenças Auto-imunes(Colagenose)10 Doença Psiquiátrica.....5 Doença Renal Grave.....10 Epilepsia e Doença Neurológica.....10 Hemopatias.....10 Hipertensão Arterial.....10 Infecção Urinária de repetição (pielonefrite ou infecções 3x ou +)10 Infecções Grave.....10 AIDS/HIV10 Sífilis.....10 Tuberculose.....10 Toxoplasmose.....10 Dep. de Drogas.....10 Alcoolismo.....10 Trombofilia10 Endocrinopatias.....10 Alterações da Tireóide10
3 – ESCOLARIDADE: Sabe Ler e Escrever: Sim..... 0 Não..... 1		
4 – HÁBITOS: Tabagista: Sim..... 2 Não..... 0		
*Fatores sócio econômicos não são critérios isoladamente para encaminhamento ao Pré Natal de Alto Risco (PNAR). Merecem atendimento diferenciado na Atenção Básica. PNAR: Deve conter obrigatoriamente itens dos quadros 5 e/ou 6 e/ou 7 da classificação acima (somando 10 ou mais pontos). Médio Risco: Somatório de 5 a 9 pontos deve receber atendimento de Pré Natal na Atenção Básica pelo médico intercalado com o enfermeiro. Baixo Risco: Somatório de até 4 pontos deve receber atendimento intercalado de Pré Natal na Atenção Básica pelo enfermeiro e pelo médico. Seguir fluxograma de pré natal.		

ANEXO B – Termo de Exequibilidade MDV

DECLARAÇÃO DE EXEQUIBILIDADE DE PROJETO DE PESQUISA

Declaramos para os devidos fins que à análise do projeto intitulado “REATIVAÇÃO DO LABORATÓRIO DE CULTIVO CELULAR E CRIAÇÃO DE LINHA DE PESQUISA: COMUNICAÇÃO CELULAR NA INTERFACE MATERNO FETAL DURANTE A GESTAÇÃO” de responsabilidade dos pesquisadores Rodrigo Barbano Weingrill, Jean Carl Silva e outros. Observamos que há condições de execução do projeto no ambiente da Maternidade Darcy Vargas onde será realizada a coleta de material para posterior análise em Laboratório da Univille e coleta de dados de prontuário

Saliente-se que o(s) investigador (es) ficam informados que:

- a) A apresentação de aprovação do projeto através Parecer Consubstanciado de Comitê de Ética em Pesquisa credenciado ao CONEP, se aplicável, é condição para o início do processo de pesquisa nesta Instituição;
- b) A execução da pesquisa deverá respeitar os limites definidos pelo projeto aprovado;
- c) Que qualquer alteração do processo de pesquisa, bem como a extensão do seu prazo de execução deverá ser formalmente comunicado a este Departamento;
- d) Este Departamento poderá, a qualquer momento, solicitar informações complementares acerca do processo de pesquisa ou de sua execução.
- e) Que todo o processo de coleta de material e coleta de dados será realizado pelos pesquisadores, limitando-se a Instituição a facilitar o acesso dos pesquisadores aos registros disponíveis em seu ambiente.

Este Departamento fica à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários pelo fone (47) 3461-5763.

Joinville, 23 de janeiro de 2017.

Dr. Francelino Cesar Pabis
Cardiologista, Psiquiatra
Especialista em cardiologia fetal e pediátrica
Mestre em Ciências da Saúde
Eco Lab, Hospital Dona Helena
3433-5846 / 3451-3393

Pesquisador (a) Responsável

PARECER DA DIREÇÃO:
[X] Execução autorizada
[] Execução não autorizada

MATERNIDADE DARCY VARGAS

Dr. Fernando Marques Pereira
Mat: 2449/0-6-01 - Gerente

Direção da MDV

ANEXO C – Parecer CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comunicação Celular via Exossomos na Interface Materno-Fetal

Pesquisador: Rodrigo Barbano Weingrill

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08891619.0.3002.5013

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Patrocinador Principal: FUNDACAO EDUCACIONAL DA REGIAO DE JOINVILLE - UNIVILLE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.345.149

Apresentação do Projeto:

"Alterações funcionais na interface materno-fetal, assim como alterações no potencial proliferativo, invasivo e imunorregulador das células trofoblásticas, estão correlacionadas com patologias de relevante significado clínico, como a pré-eclâmpsia. A qual acrescenta agravantes de morbidade e mortalidade materna, que apesar do grande conhecimento clínico, ainda carecem de biomarcadores específicos ou mesmo tratamento adequado. Diversos fatores parecem estar envolvidos na fina regulação da atividade trofoblástica, mas pouco se sabe sobre quais podem estar desregulados ou quais possuem maior ação nas patologias gestacionais. Desta forma, o objetivo deste projeto é isolar, caracterizar e quantificar a produção de microvesículas extracelulares (exossomos) de origem trofoblástica, presentes na corrente sanguínea materna em gestações normais e patológicas. Amostras sanguíneas serão coletadas após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, no primeiro, segundo e terceiro trimestre de gestação. Após o parto, fragmentos da placenta das pacientes incluídas nos grupos de estudo serão fixados em paraformaldeído/metanol e incluídos em parafina ou criopreservados para análise histológica e imunohistoquímica (Syncytin-1/2, CD63, CD81, CD9). O isolamento das microvesículas se dará por ultracentrifugação (100.000g) e separação por gradiente de densidade, enquanto sua caracterização será determinada por microscopia de raman (Syncytin-1/2, PLAP, ICAM) e citometria de fluxo (Syncytin-1/2, CD63, CD81, CD9), pela determinação dos marcadores celulares específicos para microvesículas de origem placentária. Os resultados de cada grupo serão

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.345.149

comparados estatisticamente entre si, para determinação de diferenças na detecção de microvesículas de origem trofoblástica na corrente sanguínea materna durante a gestação. Em um segundo momento, será avaliado o conteúdo genômico, proteico e a atividade biológica das microvesículas isoladas. Por fim, o presente projeto

tem a intenção buscar por informações que possibilitem a determinação de componentes celulares de origem trofoblástica presentes na circulação sanguínea materna e que possam ser utilizados como biomarcadores de uma gestação normal ou patológica."

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

Isolar as microvesículas de origem trofoblástica presentes no sangue materno de gestantes normais e com pré-eclampsia e caracterizar e quantificar as populações de microvesículas de origem trofoblástica

Objetivo Secundário:

Criação de uma linha de pesquisa denominada: Comunicação Celular na Interface Materno-Fetal. Caracterizar a através de cortes histológicos as placentas normais e com pré-eclampsia. Imunolocalizar os marcadores celulares na membrana plasmática das microvesículas de origem placentária. Imunolocalizar as células produtoras de microvesículas no tecido placentário."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

OS riscos envolvem apenas a coleta de sangue das pacientes, podendo ocasionar dor local e infecção/inflamação; a coleta seguirá o protocolo determinado dentro do Ambulatório de Gestações de Risco da Maternidade Dacry Vargas; minimizando o potencial de concretização dos riscos; evidenciado algum risco a saúde da paciente esta será encaminhada ao setor responsável dentro do centro obstétrico; quaisquer inconformidades do protocolo de coleta de sangue são de responsabilidade dos autores do projeto os quais encaminharão as providências necessárias para a resolução dos casos, arcando com os custos globais; risco mínimo inerente a vida, ligado a perturbações de natureza física e psicológica, sendo também de responsabilidade do pesquisador proponente

Benefícios:

Criação de uma linha de pesquisa focada na elucidação dos fatores celulares envolvidos nas gestações de risco, sem necessidade de intervenção invasiva; possibilidade de identificação de biomarcadores das gestações de risco; contribuir para o desenvolvimento de protocolos de encaminhamento para as pacientes com indicação de pré-natal no ambulatório de gestação de

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.345.149

risco; desenvolver o conhecimento"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente e está em conformidade com normas preconizadas pela Conep

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados em conformidade, porém será preciso anexar, em documento a parte, uma declaração de publicização mencionado quando, como e por quanto tempo os dados serão manipulados e armazenados.

Recomendações:

- 1- Rubricar todas as páginas do TCLE e numerar páginas na forma 1/2
- 2- Informar no tcle que também foi aprovado por este comitê da UFAL com dados para contato
- 3- Incluir uma declaração de publicização em documento a parte contendo como e por quanto tempo os dados serão armazenados e como o participante terá acesso ao resultados;
- 5- Por mencionar a criação de biorepositório e seguindo a resolução 441/11, mencione também no tcle e na declaração de publicização todas as informações pertinentes (na resolução 441/11) como por exemplo que o participante pode a qualquer a momento desautorizar a manutenção de suas amostras no biorepositório entre outras informações;
- 6- Sugiro remover o termo patologia como sendo sinônimo de doença ou enfermidade, Patologia (Michaelis) -Ciência que estuda todos os aspectos da doença, com especial atenção à origem, aos sintomas e ao desenvolvimento das condições orgânicas anormais e suas consequências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A proposta já foi aprovada pelo outro comitê e está em conformidade deve-se, no entanto atentar para as recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Aprovado

Prezado (a) Pesquisador (a), lembre-se que, segundo a Res. CNS 466/12 e sua complementar 510/2016:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado, a não ser em estudo com

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.345.149

autorização de declínio;

V.Sª. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata;

O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP e, em casos pertinentes, à ANVISA;

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial;

Seus relatórios parciais e final devem ser apresentados a este CEP, inicialmente após o prazo determinado no seu cronograma e ao término do estudo. A falta de envio de, pelo menos, o relatório final da pesquisa implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

O cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja APROVADO pelo Sistema CEP/CONEP, conforme Carta Circular nº. 061/2012/CONEP/CNS/GB/MS (Brasília-DF, 04 de maio de 2012).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Carta_Resposta.pdf	17/04/2019 15:50:46	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Outros	Carta_Resposta.jpg	16/04/2019 19:24:48	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UNIVILLE_MODIFICADO_COMI TE.docx	16/04/2019 19:04:50	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Outros	RESPOSTA_PENDENCIAS.jpg	19/03/2019 18:20:34	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_Univille_MDV_Corrigido.pdf	19/03/2019	Rodrigo Barbano	Aceito

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.345.149

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Univille_MDV_Corrigido.pdf	17:55:17	Weingrill	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Univille_MDV.pdf	28/02/2019 17:48:11	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Aprovado_Edital.pdf	28/02/2019 17:29:23	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACEIO, 23 de Maio de 2019

Assinado por:
Luciana Santana
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A. C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Comunicação Celular via Exossomos na Interface Materno-Fetal

Pesquisador: Rodrigo Barbano Weingrill

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 08891619.0.0000.5366

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.476.861

Apresentação do Projeto:

Este projeto de pesquisa está vinculado ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville, será realizado por Jean Carl Silva, Alexandre Urban Borbely, Eduardo Manoel Pereira e a inclusão da pesquisadora Sandra Luft Paladino (mestranda do PPGSMA) com coordenação pelo professor Rodrigo Barbano Weingrill, tem como título Comunicação Celular via Exossomos na Interface Materno-Fetal.

A comunicação celular na interface materno-fetal tem seu início durante o processo de implantação embrionária, assim que as células do trofoblasto se diferenciam para formar a placenta, apresentando intensa atividade proliferativa e invasiva, possuindo comportamento semelhante ao de células neoplásicas, porém, com atividade controlada temporal e espacialmente ao longo da gestação. Entretanto, alterações funcionais na interface materno-fetal, assim como alterações no potencial proliferativo, invasivo e imunorregulador das células trofoblásticas, estão correlacionadas com patologias de relevante significado clínico, como a pré-eclâmpsia. Tal patologia inclui agravantes de morbidade e mortalidade materna, que apesar do grande conhecimento clínico, ainda carecem de biomarcadores específicos ou mesmo tratamento adequado, que não seja apenas paliativo e sintomático. Neste caminho, diversos fatores parecem estar envolvidos na fina regulação da atividade trofoblástica, mas pouco se sabe sobre quais podem estar desregulados ou quais possuem maior ação nas patologias gestacionais. Por outro lado, é de conhecimento científico que,

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.476.861

as microvesículas extracelulares (exossomos) de origem trofoblástica, as quais permeiam a interface embrião-endométrio e a corrente sanguínea materna, seja em gestações normais e patológicas, tem papel importante na funcionalidade da interface materno-fetal e na homeostase do sistema como um todo. Como parâmetro de investigação deste estudo, será observada a produção de microvesículas extracelulares de origem placentária em pacientes gestantes normais e pacientes gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia. Serão determinados múltiplos critérios de inclusão e exclusão, assim como incluso um termo de consentimento livre e esclarecido. Como resultado, espera-se padronizar os protocolos de isolamento, quantificação e caracterização de microvesículas celulares de origem trofoblástica na corrente sanguínea materna, além de identificar diferenças entre sua produção em gestações normais e patológicas. Mais adiante, estes resultados poderão fazer parte de um grande esforço na identificação de biomarcadores de alterações gestacionais nos primeiros estágios gestacionais, especialmente as de origem trofoblástica, sem necessidade de intervenções diagnósticas invasivas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Isolar as microvesículas de origem trofoblástica presentes no sangue materno de gestantes normais e com pré-eclâmpsia e caracterizar e quantificar as populações de microvesículas de origem trofoblástica.

Objetivos específicos:

Criação de uma linha de pesquisa denominada: Comunicação Celular na Interface Materno-Fetal. Caracterizar a através de cortes histológicos as placentas normais e com pré-eclâmpsia. Imunolocalizar os marcadores celulares na membrana plasmática das microvesículas de origem placentária. Imunolocalizar as células produtoras de microvesículas no tecido placentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador informa que os riscos aos participantes desta pesquisa estão relacionados a coleta de sangue das pacientes, podendo ocasionar dor local e infecção/inflamação; a coleta seguirá o protocolo determinado dentro do Ambulatório de Gestações de Risco da Maternidade Dacry Vargas minimizando o potencial de concretização dos riscos. Evidenciado algum risco a saúde da paciente esta será encaminhada ao setor responsável dentro do centro obstétrico; quaisquer inconformidades do protocolo de coleta de sangue são de responsabilidade dos autores do projeto, os quais encaminharão as providências necessárias para a resolução dos casos, arcando com os custos globais; Ainda, informa que existirão riscos associados a perturbações de natureza física e psicológica, sendo também de responsabilidade do

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.476.861

pesquisador proponente.

Quanto aos benefícios, o pesquisador relata que com os resultados obtidos a partir do estudo, será criada uma linha de pesquisa focada na elucidação dos fatores celulares envolvidos nas gestações de risco, sem necessidade de intervenção invasiva; possibilidade de identificação de biomarcadores das gestações de risco; contribuir para o desenvolvimento de protocolos de encaminhamento para as pacientes com indicação de pré-natal no ambulatório de gestação de risco; desenvolver o conhecimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador informa que serão incluídos na pesquisa (critério de inclusão) gestante com acompanhamento pré-natal e protocolo terapêutico no Ambulatório de Gestação de Risco da Maternidade Darcy Vargas; com idade entre 18 e 35 anos; sem distinção de raça e procedência; independente de histórico familiar prévio de alterações gestacionais; independente do número de gestações anteriores; que assine do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); com parto cesariana no respectivo serviço obstétrico. Como critério de exclusão, o pesquisador informa que não participarão da pesquisa gestantes com presença de enfermidades de caráter autoimune, infeccioso ou genético que não as de estudo no presente trabalho; que não assine o TCLE; menores de 18 anos e maiores de 36 anos; que sejam fumantes; etilistas; uso de drogas e psicotrópicos. O pesquisador informa que pretende incluir neste estudo, 300 pacientes no seu total, entre normais e patológicas, distribuídas em três grupos: Gestantes com Pré-Eclâmpsia Entrevista (100 gestantes), Gestação Normais (100 gestantes) e Gestantes com Diabetes Gestacional (100 gestantes). Serão coletadas amostras de sangue (1º, 2º e 3º trimestre de gestação) e fragmentos placentários no Ambulatório de Gestação de Alto Risco da Maternidade Darcy Vargas. A coleta das amostras respeitará os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e condizentes com as exigências impostas pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos de ambas as instituições. As amostras placentárias serão removidas e recortadas em fragmentos menores e uma pequena parte disponibilizada para o estudo, não prejudicando o diagnóstico das patologias. As amostras de tecido placentário e exossomos isolados do plasma sanguíneo serão fixadas (paraformaldeído 4%/Metanol -20°C), incluídos em parafina, criopreservados e seccionados em micrótomo para serem imunomarcados com anticorpos anticitokeratina-7, anti-vimentina, anti-HLA-G1, antibiglicam, anti-CD9, CD63, CD81 e Syncytin-1 e 2. Os exossomos do plasma sanguíneo serão isolados utilizando protocolo de centrifugação (Total Exosome Reagent –

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.476.861

Thermo Scientific, USA), seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Os exossomos isolados serão lavados em PBS e fixados para microscopia de raman e citometria de fluxo. A caracterização dos marcadores da membrana plasmática dos exossomos será determinada por protocolo de citometria de fluxo (BD LSRFortessa™ X-20, USP/SP), com base nos marcadores conhecidos e presentes em exossomos de origem placentária: CD9, CD63, CD81 e Syncytin-1 e 2. A microscopia de força atômica e a espectroscopia Raman serão realizados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), por meio do equipamento de microscopia de ponta de provas, um sistema customizado da

Nanonics Multiview 4000, único do país, composto de dois microscópios confocais Olympus (sistema 4). A microscopia de força atômica será utilizada para analisar as diferenças biofísicas entre as microvesículas. Já a espectroscopia Raman é uma técnica de diagnóstico óptico, não invasiva e não destrutiva e, assim como a microscopia de força atômica, não utiliza grande quantidade de amostra. Essas técnicas possibilitam o estudo e a descoberta de novas estruturas, além de permitir análise das características físicas em alta resolução. A espectroscopia Raman fornece resultados com informações em nível molecular, possibilitando a identificação de grupos funcionais e tipos de ligações; com especificidade molecular comparável a de impressões digitais e será utilizada para mapear a composição bioquímica das microvesículas, via análise de cluster, principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) e regressão logística. O pesquisador informa que haverá uso de fontes secundárias de dados, sendo utilizado o prontuário referente ao pré-natal realizado no ambulatório de gestação de risco da Maternidade Darcy Vargas onde constam as informações e critérios de inclusão e exclusão do grupo estudado. O pesquisador informa que serão coparticipantes do projeto o Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e a Universidade São Paulo. É mencionado que os dados oriundos da pesquisa ficarão sob posse e guarda do pesquisador e a forma de descarte.

Os custos da pesquisa são informados e a forma de financiamento é referente a carta de apresentação da aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Univille, Sandra Luft Paladino. Quanto ao cronograma, no projeto original foi informado que a seleção e triagem das gestantes será realizada entre 01 de abril de 2019 até 15 de janeiro de 2020. Em ementa ao projeto, o pesquisador solicitou a prorrogação do cronograma de execução de seleção e triagem de gestantes para coleta de amostras até 31 de julho de 2020, solicitação autorizada e aprovada por este Comitê. Nesta nova ementa proposta pelo pesquisador, é informado que a coleta de amostras se estenderá até 29/01/2021. Mediante a solicitação, este relator é favorável a prorrogação de prazo para a realização do projeto. Ainda, o pesquisador

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119, campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.476.861

informa o aporte do valor de 10 mil reais, por meio de carta-convite do PPGSMA, da pesquisadora Sandra Luft Paladino, mestrando no referido programa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos estão anexados ao processo e continuam válidos. A Folha de Rosto apresentada está preenchida corretamente, assinada pelo pesquisador responsável e pelo coordenador do curso de Medicina da Univille.

O pesquisador apresentou o TCLE, devidamente instruído.

O pesquisador não apresentou o instrumento de coleta de dados, mas informa quais dados serão coletados.

O pesquisador apresentou a carta de anuência da Maternidade Darcy Vargas, devidamente datada e assinada pelo Diretor da referida maternidade.

Recomendações:

Ao finalizar a pesquisa, o (a) pesquisador (a) responsável deve enviar ao Comitê de Ética, por meio do sistema Plataforma Brasil, o Relatório Final (modelo de documento na página do CEP no sítio da Univille Universidade).

Segundo a Resolução 466/12, no item

XI- DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

d) Elaborar e apresentar o relatório final;

Modelo de relatório para download na página do CEP no sítio da Univille Universidade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda do projeto "Comunicação Celular via Exossomos na Interface Materno-Fetal", sob CAAE "08891619.0.0000.5366" do (a) pesquisador(a) "Rodrigo Barbano Weingrill", de acordo com a Resolução CNS 466/12 e complementares foi considerada APROVADA após análise.

Informamos que após leitura do parecer, é imprescindível a leitura do item "O Parecer do CEP" na página do Comitê no sítio da Univille, pois os procedimentos seguintes, no que se refere ao

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comitetica@univille.br

Página 05 de 07



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.476.861

enquadramento do protocolo, estão disponíveis na página. Segue o link de acesso <http://www.univille.edu.br/status-parecer/645062>

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville - Univille, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação da emenda ao projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_165402_2_E2.pdf	25/10/2020 23:18:02		Aceito
Declaração de Pesquisadores	emenda_2.pdf	06/02/2020 18:34:04	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Declaração de Pesquisadores	emenda_1.pdf	06/02/2020 18:33:54	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PRORROGACAO_2020.pdf	06/02/2020 18:20:34	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PRORROGACAO_2020.pdf	06/02/2020 18:20:08	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	17/04/2019 15:50:46	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Outros	Carta_Resposta.jpg	16/04/2019 19:24:48	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Outros	RESPOSTA_PENDENCIAS.jpg	19/03/2019 18:20:34	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Univille_MDV_Corrigido.pdf	19/03/2019 17:55:17	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	28/02/2019 18:40:51	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Univille_MDV.pdf	28/02/2019 17:48:11	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Exequibilidade_.jpg	28/02/2019 17:26:50	Rodrigo Barbano Weingrill	Aceito

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.476.861

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOINVILLE, 18 de Dezembro de 2020

Assinado por:

Marcia Luciane Lange Silveira
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa e o documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre esta colaboração. Sua participação neste estudo será de muita importância para nós, pois, permitirá o acesso aos componentes celulares de origem placentária, presentes no sangue materno, os quais regulam diferentes processos biológicos envolvidos no aparecimento de doenças gestacionais. O entendimento destes processos nos trará pistas sobre como identificar de maneira precoce possíveis alterações gestacionais através da análise do sangue materno.

- Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Comunicação Celular via Exossomos na Interface Materno-Fetal”, coordenada pelo professor doutor Rodrigo Barbano Weingrill. O objetivo deste estudo é isolar e caracterizar microvesículas de origem placentária presentes no sangue materno, que são transportadoras importantes fatores sinalizadores com papel essencial na comunicação entre a mãe e o bebê. Assim, a investigação do conteúdo das microvesículas contribui para a compreensão dos mecanismos de surgimento de transtornos relacionados a gestação.
- Como participante desta pesquisa, você contribuirá por meio da doação de sangue, no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação, sendo que, serão coletados 8,5 mL de sangue, em tubo estéril com anticoagulante, durante as coletas de rotina do Ambulatório de Gestação de Risco da Maternidade Darcy Vargas (MDV) realizadas pelo laboratório Gimenes. Cada amostra de sangue será encaminhada ao Laboratório Escola da Univille, centrifugada para separação do plasma, o qual será armazenado em freezer - 80 °C no Laboratório de Biologia Molecular da Univille. O plasma armazenado será utilizado para o isolamento, caracterização e análise morfológica das microvesículas de origem placentária. Estes procedimentos serão realizados em parceria com o Laboratório de Pesquisa das Interações Materno-Fetais e Placenta do Instituto de Ciências Biomédicas – I da Universidade de São Paulo (USP) e do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).
- Novamente, como participante desta pesquisa, você contribuirá também, por meio da doação de um cotilédone de placenta (estrutura formadora da placenta), que será coletado após o parto cesariano eletivo e liberação da equipe de obstetrícia responsável pelo parto na MDV. O material doado será dividido em partes iguais com dimensões de 3 x 1 x 1 (altura x largura x comprimento/cm), fixados no Laboratório Escola da Univille para análise morfológica e imuno-histoquímica/imunofluorescência e congelados em freezer – 80°C no Laboratório de Biologia Molecular da Univille para análise genômica e de proteínas. O material fixado será encaminhado ao Centro de Diagnóstico Anátomo Patológico de Joinville (CEDAP) onde será preparado para análise morfológica, histológica e armazenado de maneira adequada, em ambiente com umidade e temperatura controlados e devidamente registrados em banco de dados e livro de coleta de amostras. O material histológico produzido poderá ser encaminhado para análise morfológica, imuno-histoquímica, imunofluorescência e proteica, nos Laboratórios parceiros da USP e UFAL mencionados acima. Todas as amostras ficarão sob guarda do pesquisador responsável por pelo menos 5 anos, em local adequado para cada

amostra, devidamente registrada em banco de dados e livro de registro. O material coletado, tenha sido ele utilizado ou não, quando necessário, será descartado como resíduo infectante, seja plasma ou fragmentos de placenta, o qual será destinado à incineração. Todas as amostras coletadas, processadas e armazenadas formarão um biorrepositório para a execução do projeto vigente (Resolução CNS 441/11).

- A sua participação nesta pesquisa acontecerá entre o período de maio de 2019 a fevereiro de 2020.
- Com sua participação nesta pesquisa, você estará exposto a riscos ligados a coleta de sangue (dor, infecção, hematoma) que possuem pouca chance de se concretizarem posto que a coleta será realizada dentro das instalações da Maternidade Darcy Vargas e realizada conforme o protocolo da instituição já padronizado para isso. Mesmo assim, caso eles venham a ocorrer, você será prontamente conduzida a assistência imediata sob a responsabilidade do pesquisador responsável, que arcará com quaisquer custos ligados à prestação dos serviços de assistência a saúde necessários.
- Esta pesquisa tem como benefício principal expandir a compreensão do envolvimento das microvesículas placentárias no desenvolvimento de patologias durante a gestação. A partir da coleta dos dados, estes serão analisados e poderão compor artigos destinados a publicação em revistas científicas ou apresentados em congressos da área de pesquisa.
- Sua participação é voluntária e você terá a liberdade de se recusar a responder quaisquer questionamentos que lhe ocasionem constrangimento de alguma natureza. Você também poderá desistir da pesquisa a qualquer momento, sem que a recusa ou a desistência lhe acarrete qualquer prejuízo, bem como, terá livre acesso aos resultados do estudo e garantido esclarecimento antes, durante e após a pesquisa. É importante saber que não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, pois a mesma é voluntária pós assinatura. O pesquisador garante indenização por quaisquer danos causados a você, participante, no decorrer da pesquisa. Guarde este TCLE assinado por, no mínimo, cinco anos.
- Você terá garantia de acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas por meio de telefone e e-mails informados neste documento. O pesquisador responsável por esta investigação é o professor doutor Rodrigo Barbano Weingrill, que pode ser contatado pelo email: rodrigo.weingrill@univille.br ou na área de saúde da Univille na sala A-101(telefone 3461-9112, ou pessoalmente, segunda-feira e quinta-feira entre 8:00 e 12:05 horas).
- É garantido o sigilo e assegurada a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Os resultados deste estudo poderão ser apresentados por escrito ou oralmente em congressos e revistas científicas, sem que os nomes dos participantes sejam divulgados.
 - A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Univille, no endereço Rua Paulo Malschitzki, 10, Bairro Zona Industrial, Campus

Universitário, CEP 89.219-710 - Joinville/SC, telefone (47) 3461-9235, em horário comercial, de segunda a sexta, ou pelo e-mail comitetica@univille.br.

Após ser esclarecido sobre as informações da pesquisa, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine este consentimento de participação, que está impresso em duas vias, sendo que uma via ficará em posse do pesquisador responsável e está via com você, participante.

Pesquisadores participantes: Andreza Iolanda, Bruno Mattei Lopes, Eduardo Manoel Pereira, Emily Keil, Gabriella Candatten, Gustavo Figueiredo, Letícia Fernandes Lucas, Melody Trombelli Mansani, Sandra L. Paladino. _____

Prof. Dr. Rodrigo Barbano Weingrill - Pesquisador Responsável
Grupo de Pesquisa em Comunicação Celular na Interface Materno-Fetal
Depto. de Medicina e Enfermagem da Univille
Univille – Joinville/SC

Consentimento de Participação. Euconcordo voluntariamente em participar da pesquisa intitulada “Comunicação Celular via Exossomos na Interface Materno-Fetal”, conforme informações contidas neste TCLE.

Joinville, ____/____/____ .

Assinatura do participante

APÊNDICE B – Questionário – Roteiro para entrevista

ENTREVISTA

1ª PARTE (VERMELHO) – ENTREVISTA SOCIAL						
ENTREVISTADOR			DATA	/ /	SANGUE	0 – MDV 1 – GIMENES 2 – MUNICIPAL/GIMENES
NOME						DATA DE NASCIMENTO
POSTO PRÉ NATAL			CIDADE			RA AMBU
TRIMESTRE	1- 1º (1-13 SEMANAS)	2- 2º (14-26 SEMANAS)	3- 3º (27-40 SEMANAS)	4- PÓS PARTO	IDADE	
RAÇA REFERIDA	0 - BRANCA 1 - NEGRA 2 - PARDA 3 - AMARELA 4 - INDÍGENA 5 - INDEFINIDO					
ESCOLARIDADE	0 - NÃO ALFABETIZADA 1 - ALFABETIZA 2 - FUNDA. INCOM. 3 - FUNDA. COM. 4 - MÉD INC 5 - MÉD COM (CURSO TÉCNICO) 6 - SUP INC 7 - SUP COM (TECNÓLOGO)					
ESTADO CIVIL	0 - SOLTEIRA 1 - CASADA 2 - UNIÃO ESTÁVEL 3 - SEPARADA 4 - DIVORCIADA 5 - VIÚVA 6 - FAMILIAR (1º/2º GRAU - TIO, PRIMO...)					
TIPO FAMILIAR	0 - HETEROSSEXUAL 1 - MONOPARENTAL FEMININA 2 - HOMOSSEXUAL					
PROFISSÃO	0 - REMUNERADO 1 - NÃO REMUNERADO		RENDIA FAMILIAR			QTAS PESSOAS VIVEM NA CASA (0 - N INFO)
2ª PARTE (LARANJA) – ENTREVISTA POR QUE VEIO AO AMBULATÓRIO?						
PATOLOGIA	IG	DATA DE INÍCIO	PARAMETROS - DADOS/VALORES			
HIPERTENSÃO			1ª ENTREVISTA – 1 PICO PA: 2 PICOS PA: + 3 PICOS PA: (140/90) 2ª ENTREVISTA - ≥ 30 % PA: PROTEINÚRIA: SEMANA: (0 - ≤ 20 - 1 - > 20)			
OBISSIDADE			IMC (TRIAGEM):			
DIABETES			SANGUE (1º TRI): TTGO (2º/3º TRI): JEIUM - APÓS 1 H - APÓS 2 H			
			TIPO: 0 - GESTACIONAL 1 - TIPO 1 2 - TIPO 2 3 - PRÉ			
OUTROS						
3ª PARTE (AMARELO) – ENTREVISTA DE FARMACOS + PATOLOGIAS						
FARMACO (DURANTE A GESTAÇÃO)	PAROU	QTO TEMPO PAROU	QTO TEMPO USA	QTIDADE (DIA/SEMANA/MÊS)	QUAL	
ANTI-INFLAMATORIOS: AAS, IBUPROFENO, DICLOFENACO, CETOPROFENO, NAPROXENO, PIROXICAM, NIMESULIDA.						
ANALGESICOS: PARACETAMOL, DÍPIRONA						
PSICOTROPICOS: DIAZEPAM, ALPRAZOLAM, CLONAZEPAM, LORAZEPAM (ANSIOLITICOS)						
PSICOTROPICOS: AMITRIPTILINA, IMIPRAMINA, NORTRIPTILINA, FLUOXETINA, PAROXETINA, CITALOPRAM, SERTRALINA (ANTIDEPRESSIVOS)						
PSICOTROPICOS: HALOPERIDOL, OLANZAPINA, PERICIAZINA, RISPERIDONA, CLORPROMAZINA, QUETIAPINA (ANTIPSICOTICOS)						
PSICOTROPICOS: CARBAMAZEPINA, FENITOINA, FENOBARBITAL, ÁCIDO VALPROICO, LAMOTRIGINA						
CORTICOIDES: DEXAMETASONA, BETAMETASONA, PREDNISONA, METILPREDNISOLONA						
ANTIÁCIDOS						
ANTIEMÉTICO: PLASIL, DRAMIM B6, NAUSEDRON (VONAU), AMPLICTIL						
ANTICONCEPCIONAL						
VITAMINAS/SUPLEMENTO						
ÁCIDO FÓLICO						
SULFATO FERROSO						
VARFARINA						
METFORMINA						

INSULINA										
ANTI-HIPERTENSIVOS/ BETA - BLOQUEADORES										
OUTROS										
TABAGISTA										
ÁLCOOL										
DROGAS										
TTO INFERTILIDADE										
ATIVIDADE FÍSICA										
D. CELIACA	SÍFILIS	LÚPUS	INFECÇÃO URINÁRIA	HIV	ARTRITE	ANEMIA	TRABALHA A NOITE?	DISTÚRBIO DO SONO, QUAL?		
CX GINECO/MAMA, QUAL?					OUTRAS PATOLOGIAS, QUAL?					
VACINA DA FEBRE AMARELA		QTAS DOSES?	DATA	ANOS (DA ÚLTIMA DOSE)						
TRAUMA	QUEDA	CONVULSÃO	DESMAIO	ACIDENTE	OUTROS?					
4ª PARTE (VERDE) – ENTREVISTA HISTÓRICO DAS GESTAÇÕES G: P: C: A:										
	FEZ PRÉ NATAL	INFERTILIDADE	INFECÇÃO URINÁRIA	HIPERTENSÃO	DIABETES	ALEITAMENTO MATERNO	POR QUE PAROU?	ABORTO	GEMELAR	ÓBITO
1ª										
2ª										
3ª										
4ª										
5ª										
6ª										
ABORTO	0 - ≤ 13 SEMANAS 1 - ATÉ 22 SEMANAS									
ÓBITO	0 - INTRAUTERINO > 22 SEMANAS 1 - PERINATAL DURANTE O PARTO 2 - NEONATAL ATÉ 28 DIAS 3 - INFANTIL ATÉ 1 ANO									
	QUANTOS? IG? SERVIÇO DE ALTO RISCO?									
4ª PARTE (VERDE) – HISTÓRICO FAMILIAR (MÃE, PAI, IRMÃOS, AVÓS, TIOS)										
DIABETES	HIPERTENSÃO	GEMELAR	OBESIDADE	INFERTILIDADE	CÂNCER, QUAL?					
OBSERVAÇÕES:										

AUTORIZAÇÃO

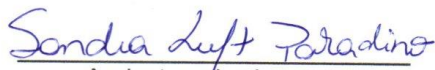
Nome do autor: Sandra Luft Paladino

RG: 6130271701 SSP/RS

Título da Dissertação: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES EM GESTANTES DE RISCO

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da
Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 21 de junho de 2021.


Assinatura do aluno