UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LORENA MACHADO AMARAL

**Efeitos da inibição da sintase induzida do óxido nítrico na
fisiopatologia da pré-eclâmpsia experimental**

Ribeirão Preto-SP
2012

LORENA MACHADO AMARAL

**Efeitos da inibição da sintase induzida do óxido nítrico na
fisiopatologia da pré-eclâmpsia experimental**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Farmacologia

**Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos**

Ribeirão Preto-SP
2012

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amaral, Lorena Machado

Efeitos da inibição da sintase induzida do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia experimental. Ribeirão Preto, 2012.

68p.; Il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Óxido nítrico sintase induzida (iNOS).
2. Pré-eclâmpsia.
3. Estresse Oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorena Machado Amaral

Efeitos da inibição da sintase induzida do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia experimental

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia**

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Instituição: PUC/RS

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a Mary Angela Parpinelli

Instituição: FCM - UNICAMP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Ricardo de Carvalho Cavalli

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Carlos Renato Tirapelli

Instituição: EERP - USP

Assinatura: _____

"Não é preciso agendar, entrar em fila, contar com a sorte, acordar cedo para pegar senha: a possibilidade de recomeço está disponível o tempo todo, na maior parte dos casos. Não tem mistério, ela vem embrulhada com o papel bonito de cada instante novo, essa página em branco que olha pra gente sem ter a mínima idéia do que escolheremos escrever nas suas linhas.

"O que é preciso mesmo é coragem para abrir o presente."

(Ana Jácomo)

"Não ajunteis tesouros na terra, onde a traça e a ferrugem tudo consomem, e onde os ladrões minam e roubam. Buscai, pois, em primeiro lugar, seu reino e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas."

(Mateus 6, 19; 33)

Dedico esse meu trabalho a todos aqueles que sempre acreditaram em mim, e que sempre torceram para que meus objetivos fossem alcançados: meus pais Márcia e Carlos, meu irmão Odilon, meu noivo e futuro esposo Léo e meus amigos.

Agradecimentos

Deus...

“A Ele a glória e o louvor, pois por Ele e para Ele são todas as coisas”. Agradeço ao nosso eterno Pai por estar presente em todas as etapas desse trabalho. Sem Ele, nada disso seria possível.

Família...

Apoio constante e incentivador. Sou grata imensamente à minha mãe, Márcia, ao meu pai Carlos e ao meu irmão Odilon.

Agradeço ao meu noivo e futuro esposo, Léo Moreira: “Abençoadas sejam as surpresas risonhas do caminho. As belezas que se mostram sem fazer suspense”.

Agradeço minha mais nova família, meus queridos sogro e sogra, Luiz e Tita, pelo apoio e conselhos maravilhosos.

Gostaria também de agradecer ao casal Sônia e Ivan por me “adotarem” como a filha mineira em Ribeirão Preto.

Amigos...

Meu eterno agradecimento a todos meus amigos que me deram forças e acreditaram no meu trabalho. Em especial: Dani, Karina, Pam, Ana Carol, Jacke Fer, Valzinha, Van, Flávia, Sara, Poloni, Paulo, Stêfany, Luizon, Sandra, Joice, Evandro, Lucas, Jeferson, Rafa, Élen, Carla, Rafa, Laura.

Aos meus amigos pela Fé, grupo Carisma, em especial: Gabriel, Rafa, Flávia, Camila, Dadinho, Mirian, Cassandra, Lívia e Raul. Obrigada pelo carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pelos ensinamentos, orientações e acima de tudo por ter acreditado no meu potencial como pesquisadora.

À pós-graduação da Farmacologia – FMRP. Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Farmacologia. Em especial, as minhas amigas e secretárias Soninha e Fátima, por sempre me ajudarem em tudo que precisava.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite, abdicarem dos seus afazeres diários e assim contribuírem para a conclusão desse trabalho. Muito Obrigada.

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza
são domínios em que nos é consentido ficar
crianças toda a vida.”

Albert Einstein

RESUMO

Amaral, L. M. **Efeitos da inibição da sintase induzida no óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia experimental**. 2012. 68 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia não está completamente elucidada. No entanto, o aumento do estresse oxidativo e o comprometimento da atividade da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) têm sido envolvido nesse estado crítico. O aumento do estresse oxidativo com o aumento das espécies altamente reativas, incluindo o superóxido, pode formar o peroxinitrito. Verificamos o papel da sintase induzida do óxido nítrico e do estresse oxidativo no modelo experimental de pré-eclâmpsia caracterizado pela redução de pressão de perfusão uterina (RUPP). Este foi induzido em ratas wistar. Ratas grávidas do grupo RUPP tiveram a aorta clipada no 14º dia de gestação. Após uma incisão na linha média, um clipe de prata (0.203 mm) foi colocado em torno da aorta acima da bifurcação ilíaca; cliques de prata (0.100 mm) também foram colocados em ambos os ramos das artérias ovarianas direita e esquerda, que abastecem o útero. Ratas Sham operados (ratas grávidas controles) e RUPP foram tratadas com veículo ou subcutaneamente com 1 mg / kg de N-[3 - (aminometil)-benzil] acetamidina (1400W, inibidor da iNOS), durante 5 dias. Após o tratamento, a pressão arterial média foi verificada. Para determinarmos o estresse oxidativo foram avaliadas as concentrações plasmáticas de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), níveis do 8-isoprostano plasmático, atividade vascular da NADPH oxidase e produção de superóxido com dihidroetídeo. Além disso, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para avaliar os níveis de nitrotirosina. A expressão vascular da iNOS foi verificada por western immunoblotting e concentrações de nitrito plasmático por quimiluminescência. Observamos um aumento da pressão arterial média em RUPP comparado com ratas grávidas controles e o tratamento com 1400W exerceu efeitos anti-hipertensivos. O tratamento com 1400W reduziu os níveis de 8-isoprostano, atividade vascular da NADPH oxidase e concentrações de EROs, expressão da iNOS e formação de peroxinitrito em RUPP 1400W em comparação com ratos não tratados RUPP. Nossos resultados sugerem que o 1400W atenua a hipertensão no modelo RUPP principalmente pela inibição da iNOS e formação de peroxinitrito.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, sintase induzida do óxido nítrico, estresse oxidativo, redução da pressão de perfusão uterina (RUPP).

ABSTRACT

Amaral, L. M. **Effects of inhibiting of inducible nitric oxide synthase in the pathophysiology of experimental preeclampsia.** 2012. 68 f. Tese de doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The pathophysiology of preeclampsia (PE) is not entirely known. However, increased oxidative stress possibly leading to impaired nitric oxide (NO) activity has been implicated in this critical condition. The increased NO production associated with highly reactive oxygen species (ROS), including superoxide may generate peroxynitrite. We examined the role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and oxidative stress in the reduction uterine perfusion pressure (RUPP) in preeclampsia experimental model. RUPP was induced in wistar rats. Pregnant rats in the RUPP group had their aortic artery clipped at day 14 of gestation. After a midline incision, a silver clip (0.203 mm) was placed around the aorta above the iliac bifurcation; silver clips (0.100 mm) were also placed on branches of both the right and left ovarian arteries that supply the uterus. Sham-operated (pregnant control rats) and RUPP rats were treated with subcutaneous vehicle or 1 mg/kg of iNOS inhibitor (1400W) for 5 days. After the treatment the mean arterial pressure (MAP) was monitored. To evaluated oxidative stress we measured thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) and 8-isoprostane levels in plasma, aortic NADPH oxidase activity, and production of superoxide with dihydroethidine. Furthermore, the immunohistochemical analysis assessed nitrotyrosine levels. The vascular iNOS expression was determined by western immunoblotting and nitrite concentrations in plasma were measured by chemiluminescence. We found increased MAP in RUPP compared with pregnant control rats and 1400W treatment exerted antihypertensive effects. Treatment with 1400W decreased RUPP-induced higher systemic 8-isoprostane levels and vascular NADPH oxidase activity and attenuated ROS concentrations, iNOS expression and peroxynitrite formation in RUPP 1400W rats compared with untreated RUPP rats. Our results suggest that treatment with 1400W attenuates the development of hypertension in RUPP mainly due to inhibition of iNOS and decreased peroxynitrite formation.

Keywords: preeclampsia, inducible nitric oxide synthase, oxidative stress, reduction uterine perfusion pressure (RUPP).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

ANOVA – análise de variância

EPM - Erro padrão da média

PE - Pré-eclâmpsia

HAG – Hipertensão arterial gestacional

RUPP - Redução da pressão de perfusão uterina

SHAM - Rata grávida controle

1400W - N-[3 - (aminometil)-benzil] acetamidina

NO - Óxido nítrico

NOS - Sintases do óxido nítrico

nNOS (NOS 1) - Sintase neuronal do óxido nítrico

iNOS (NOS2) - Sintase induzida do óxido nítrico

eNOS (NOS 3) - Sintase endotelial do óxido nítrico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

O_2^- - Ânion superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito

NF-κB - Fator nuclear *Kappa* B

NAD(P)H - β-nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato

PA - Pressão arterial

PAM - Pressão arterial média

HA - Hipertensão arterial

PAS – Pressão arterial sistólica

PAD- Pressão arterial diastólica

mmHg - Milímetros de mercúrio

g - Grama

mg - Miligrama

Kg - Quilograma

L - Litro

mL - Mililitro

ng – Nanograma

mmol – Milimol

mmol/L- Milimolar

μmol- Micromol

M- Molar

kDa- Quilodaltons

s.c - Subcutânea

μm - Micrômetro

TBARS - Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TBA - Ácido tiobarbitúrico

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

URL - Unidades relativas de luminescência

CA⁺² – Cálcio

HLA-G - Antígeno de histocompatibilidade

TH₄ – Tetrahidrobiopterina

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

FMN - Flavina mononucleotídeo

TNF- α – Fator de necrose tumoral

IL-6 - Interleucina 6

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

MDA - Malonildialdeído

CETEA - Comissão de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal

P50 - Cateter de polietileno

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

sFLT1 - Antagonista do fator de crescimento vascular endotelial

mA – Miliampere

2R-1C – Dois-rins, um-clipe

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Representação esquemática da fisiopatologia da pré-eclâmpsia	20
Figura 2: Biossíntese do NO	22
Figura 3: Representação esquemática do modelo de redução da pressão de perfusão uterina	32
Figura 4: Fases fotografadas durante o acompanhamento do ciclo estral das ratas	34
Figura 5: Espermatozóides.....	35
Figura 6: Tratamento com 1400W atenua a hipertensão arterial no modelo RUPP.	42
Figura 7: Tratamento com 1400W impede o aumento da produção vascular de EROs induzida no modelo RUPP.....	44
Figura 8: Tratamento com 1400W impede o aumento vascular da atividade da NAD(P)H oxidase induzido no modelo RUPP	45
Figura 9: Tratamento com 1400W e as concentrações plasmáticas de malonildialdeído (MDA) no modelo RUPP	45
Figura 10: Tratamento com 1400W impede o aumento das concentrações plasmáticas de 8-isoprostano (ng/ml) induzida no modelo RUPP.....	46
Figura 11: Tratamento com 1400W e as concentrações plasmáticas de nitrito no modelo RUPP.....	47
Figura 12: Tratamento com 1400W impede o aumento vascular da expressão da iNOS induzido no modelo RUPP	48
Figura 13: Tratamento com 1400W impede o aumento vascular dos níveis de nitrotirosina induzido no modelo RUPP	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Alterações vasculares observadas na gestação normal e na pré-eclâmpsia	18
1.2 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia	19
1.3 Papel do óxido nítrico na gestação normal e na pré-eclâmpsia	21
1.4 Regulação da iNOS, inflamação e estresse oxidativo	22
2 HIPÓTESE	27
3 OBJETIVO GERAL	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Considerações Gerais	31
4.2 Hipertensão Arterial Induzida pela redução da pressão de perfusão uterina (RUPP)	31
4.3 Tratamento dos animais	32
4.4 Grupos Experimentais	33
4.5 Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos	33
4.5.1 Avaliação da pressão arterial média	33
4.6 Acompanhamento do ciclo estral das ratas	34
4.7 Parâmetros bioquímicos e moleculares	35
4.7.1 Determinação da produção vascular de espécies reativas de oxigênio <i>in situ</i>	35
4.7.2 Determinação das concentrações plasmáticas do 8-isoprostano	36
4.7.3 Quantificação de peroxidação lipídica plasmática	36
4.7.4 Determinação atividade vascular da NAD(P)H oxidase	37
4.7.5 Determinação das concentrações de nitrito plasmático	37
4.7.6 Determinação da expressão vascular da iNOS por western immunoblotting	38
4.7.7 Determinação dos níveis vasculares de nitrotirosina por imunohistoquímica	39
4.8 Análise Estatística	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Inibidor da iNOS atenua hipertensão associada com RUPP	42
5.2 Inibidor da iNOS atenua o estresse oxidativo sistêmico e vascular associado com RUPP	43

5.3 Efeito do tratamento com 1400W sobre as concentrações plasmáticas de nitrito	47
5.4 Inibidor da iNOS reduz o aumento da expressão vascular da iNOS associado com RUPP.....	48
5.5 Inibidor da iNOS atenua o estresse nitrosativo vascular associado com RUPP ...	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	59
8 REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alterações vasculares observadas na gestação normal e na pré-eclâmpsia

A gestação está associada a ajustes fisiológicos e anatômicos que acarretam acentuadas mudanças no organismo materno, incluindo a composição dos elementos figurados e humorais do sangue circulante. São observadas diversas adaptações cardiovasculares na gestante que permitem o suprimento constante de nutrientes e metabólitos ao feto, sem comprometer as necessidades maternas. Estas alterações são resultantes de interações complexas entre hormônios, substâncias vasoativas e vários outros fatores (Pridjian e Puschett, 2002; Longo, Dola *et al.*, 2003).

Durante a gravidez, há uma elevação do volume sangüíneo total em cerca de 40 a 50%, como decorrência do aumento tanto do volume plasmático quanto da massa total de eritrócitos e leucócitos na circulação. O débito cardíaco se eleva de 30% a 50%; a frequência cardíaca também se eleva (Rovinsky e Jaffin, 1965; Hytten, 1985). A partir destas alterações hemodinâmicas, poderíamos esperar um aumento da pressão sanguínea durante a gravidez. No entanto o contrário é observado, ou seja, uma gravidez normal é caracterizada por diminuições da pressão sanguínea sistólica e diastólica até a 16^o e 20^o semana de gestação (Macgillivray, Rose *et al.*, 1969; Maynard, Epstein *et al.*, 2008). Estas alterações de pressões devem-se principalmente a diminuição significativa da resistência vascular periférica devido predominantemente a vasodilatação, a redução da resposta aos vasoconstritores e a angiogênese (Roberts e Gammill, 2005; Maynard, Epstein *et al.*, 2008).

A gravidez de algumas mulheres não é acompanhada por estas alterações hemodinâmicas que permitem a acomodação do volume corpóreo e conseqüente decréscimo da pressão sanguínea, conduzindo a quadros de doenças hipertensivas gestacionais (Rovinsky e Jaffin, 1965).

A hipertensão arterial (HA) é a principal complicação na gravidez e a maior causa de morbi-mortalidade. Ocorre em torno de 12 a 22% das gestações e é responsável por 17,6% das mortes maternas (Report of the National High Blood

Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000; Khan, Wojdyla *et al.*, 2006). Os critérios de diagnóstico são específicos e caracterizam-se por aumento de pelo menos 30 mmHg na pressão arterial sistólica (PAS) e/ou 15 mmHg na pressão arterial diastólica (PAD), em relação à média dos valores obtidos antes da 20ª semana. Quando a pressão arterial (PA) prévia for desconhecida, valores $\geq 140/90$ mmHg em duas aferições, com intervalo mínimo de 4h, em repouso, são considerados anormais. Nos casos onde a hipertensão é acompanhada por proteinúria (0,3 g/L em urina 24 horas) é caracterizado um quadro de pré-eclâmpsia (PE). Caso não haja presença de proteinúria, caracteriza-se um o quadro clínico de hipertensão arterial gestacional (HAG). A eclâmpsia é o aparecimento de convulsões numa paciente com pré-eclâmpsia (Pridjian e Puschett, 2002).

A pré-eclâmpsia é a desordem associada à gravidez mais freqüente, liderando as causas de mortalidade e morbidade materna e fetal (Mackay, Berg *et al.*, 2001; Zhang, Meikle *et al.*, 2003; Kaaja e Greer, 2005; Sibai, Dekker *et al.*, 2005; Khan, Wojdyla *et al.*, 2006). Estima-se que 3-5% das gestantes têm alterações devido a essa desordem, ocasionando em complicações maternas e fetais tais como distúrbios renais, edema cerebral, prematuridade do parto e morte (Lazdam, De La Horra *et al.*, ; Samadi, Mayberry *et al.*, 1996; Zhang, Meikle *et al.*, 2003).

1.2 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia (PE) não está totalmente elucidada, porém é amplamente aceito que a isquemia placentária é um fator primordial para desenvolvimento da PE. Durante o início do segundo trimestre da gestação (18-20ª semanas) ocorre a migração dos citotrofoblastos em direção as arteríolas uterinas espiraladas onde sofrem diferenciação em células com fenótipo endotelial (Longo, Dola *et al.*, 2003). Os trofoblastos são as células precursoras da placenta humana, cujas funções (implantação embrionária, produção de hormônios gestacionais, proteção imunológica fetal, aumento do fluxo sanguíneo vascular materno na placenta, parto, etc.) são críticas para o sucesso da gravidez (Lyall, Bulmer *et al.*, 1999).

No processo de invasão dessas células ocorre remodelamento gradual da camada endotelial destes vasos e destruição do tecido elástico-muscular das artérias e arteríolas tornando-as mais dilatadas (Lyall, Bulmer *et al.*, 1999; Redman e Sargent, 2005). Esta migração/diferenciação dos citotrofoblastos deve-se a alterações nos perfis de expressão de certas citocinas, moléculas de adesão, constituintes da matriz extracelular, metaloproteinases e o antígeno de histocompatibilidade (HLA-G) (Roberts, Taylor *et al.*, 1991). A ação citotrofoblástica combinada (vascular e intersticial) assegura suprimento sanguíneo adequado ao crescimento fetal, por aumentar o calibre das artérias maternas.

Na pré-eclâmpsia, no entanto, parece ocorrer uma inadequada invasão trofoblástica, levando à modificação incompleta das artérias espiraladas maternas e, conseqüentemente, à redução da perfusão sanguínea placentária (Roberts, Taylor *et al.*, 1991; Redman e Sargent, 2005) (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática da fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Redman e Sargent, 2005). Adaptado de Redman, *et al.*, 2005.

A demanda placentária para corrigir o suprimento sanguíneo inadequado ao feto está, entretanto, em desacordo com o fluxo sanguíneo materno necessário para irrigar seus órgãos. Nesse estágio, a síndrome torna-se sistêmica na mãe, afetando múltiplos órgãos, com presença clínica de edema generalizado (Roberts, Taylor *et al.*, 1991).

Especificamente, a perda do controle do tônus vascular conduz à hipertensão e aumenta a permeabilidade vascular glomerular, provocando a proteinúria, e a expressão endotelial alterada de fatores da coagulação (Steeegers, Von Dadelszen *et al.*, 2010)

A redução da perfusão placentária e hipóxia, de certa forma, estariam relacionadas à liberação de fatores na circulação materna ocasionando disfunção endotelial sistêmica (Davis, Newton *et al.*, ; Noris, Perico *et al.*, 2005; Sandrim, Palei *et al.*, 2008).

Na pré-eclâmpsia há evidências de um desequilíbrio entre agentes vasodilatadores e vasoconstritores. Dessa forma, as concentrações de mediadores como o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, podem estar alterados em doenças hipertensivas gestacionais.

1.3 Papel do óxido nítrico na gestação normal e na pré-eclâmpsia

Na gravidez normal ocorrem importantes alterações na hemodinâmica cardiovascular materna. Essas modificações incluem o aumento do volume sanguíneo através da vasodilatação sistêmica relacionada à formação do NO (Noris, Todeschini *et al.*, 2004).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por uma reação catalisada pelas sintases do óxido nítrico (NOS). O NO é uma molécula sinalizadora que desempenha um papel importante na homeostase cardiovascular (Moncada e Higgs, 1993).

Foram descritas três isoformas da NOS: duas são constitutivamente expressas, as isoformas neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III); e uma terceira isoforma foi denominada induzível (iNOS ou NOS II). Para a produção de NO pelas NOS são necessários os seguintes co-fatores: NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida), O₂, TH₄ (tetrahidrobiopterina), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e Ca⁺² (essencial para a atividade das formas constitutivas) (Bredt, Hwang *et al.*, 1991; Stevens-Truss, Beckingham *et al.*, 1997).

Os substratos L-arginina e o oxigênio geram a citrulina e o NO, tendo como doador de elétrons o NADPH. Estes elétrons são transmitidos via FAD e FMN ao ferro do heme em presença da BH₄. O domínio oxigenase N-terminal contém os sítios de ligação do heme, da BH₄ e da L-arginina. Este domínio é acoplado ao domínio redutase, o qual contém os sítios de ligação para a FAD, FMN e NADPH (Alderton, Cooper *et al.*, 2001)(Figura 2).

Figura 2: Biossíntese do NO (Calabrese, Mancuso *et al.*, 2007). Adaptado de Calabrese, Mancuso *et al.* 2007.

As três isoformas são capazes de catalisar a reação de formação do NO. As isoformas constitutivas produzem uma quantidade de NO que está relacionada aos numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular, enquanto a induzida pode produzir NO em níveis tóxicos, que dispara outros sinais, mais relacionados aos efeitos deletérios ou danosos no sistema vascular (Kuo e Schroeder, 1995; Loscalzo e Welch, 1995).

1.4 Regulação da iNOS, inflamação e estresse oxidativo

Diferentemente da nNOS e da eNOS, a iNOS é regulada em nível transcricional e sua ativação é independente da concentração intracelular do Ca²⁺ (Griffith e Stuehr, 1995; Ghosh e Salerno, 2003). Os mecanismos principais que regulam a expressão da iNOS envolve a modulação da atividade do promotor da

enzima, a estabilidade do RNA mensageiro e a estabilidade da proteína. No entanto, mecanismos de regulação relacionados à disponibilidade de substrato para produção de NO e vinculados a atividade da iNOS tem sido investigados (Pautz, Art *et al.*, 2010).

A iNOS é induzida em vários tipos celulares, sendo que os estímulos e condições de indução são específicas de cada célula e espécie. Por exemplo, a iNOS é induzida principalmente nos macrófagos e nas células musculares lisas após a estimulação por agentes pró-inflamatórios como endotoxinas, a interleucina 1 β , o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e o interferon γ . Portanto, a iNOS é induzida na presença de um processo inflamatório (Kleinert, Pautz *et al.*, 2004; Pautz, Art *et al.*, 2010).

O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa no soro e plasma de grávidas com pré-eclâmpsia pode aumentar a expressão vascular da iNOS, proporcionando, por exemplo, uma modificação na regulação do tônus vascular, ocasionando na disfunção endotelial existente nessa doença gestacional (Sankaralingam, Arenas *et al.*, 2006).

Além da inflamação, durante a pré-eclâmpsia é observado um aumento do estresse oxidativo, com elevação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o anion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), que pode combinar com o NO para formar o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$). Este está relacionado principalmente com os efeitos deletérios do NO, uma vez que, reage com resíduos de tirosina das proteínas, com a formação de 3-nitrotirosina. Essa formação de $ONOO^{\cdot -}$ pode ser favorecida, além da inflamação, pelas altas concentrações de NO, como consequência da expressão aumentada da iNOS (Sankaralingam, Arenas *et al.*, 2006). Entretanto, nenhum estudo anterior analisou se a regulação da expressão de iNOS contribui para as alterações vasculares encontradas nesta condição.

O aumento da atividade e expressão da iNOS vascular tem sido descrito na hipertensão (Chou, Yen *et al.*, 1998; Hong, Loh *et al.*, 2000) e o uso dos inibidores farmacológicos seletivos da iNOS causaram reduções significativas da pressão arterial e da disfunção endotelial no modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e em ratos Wistar velhos (Chou, Yen *et al.*, 1998; Hong, Loh *et al.*, 2000; Tian, Yan *et al.*, 2010).

As EROs são capazes de ativar o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e outras vias de sinalização celular. O NF- κ B é um dos fatores transcricionais mais importantes na regulação da expressão da iNOS, sendo que o gene da iNOS possui em sua região promotora uma seqüência de pares de bases (TATA *box*) que é reconhecida como sítio de ligação para o NF- κ B (Kleinert, Pautz *et al.*, 2004). Os mecanismos através dos quais o NF- κ B participa destes processos não estão completamente elucidados. Entretanto, o uso de um inibidor do NF- κ B em modelos experimentais reduziu a pressão arterial e disfunção endotelial em função da diminuição da expressão da iNOS vascular e do estresse oxidativo (Hong, Loh *et al.*, 2000).

O fato da regulação da iNOS ser em nível transcricional, alguns variantes genéticos (polimorfismos) dessa isoforma foram associados com aumento da expressão da iNOS e maior susceptibilidade à doenças cardiovasculares.

Em estudos anteriores com uma população hipertensa, foi observado que um polimorfismo da região promotora da iNOS estava associado com a hipertensão e a uma maior taxa transcricional (Fu, Zhao *et al.*, 2009). Além disso, em mulheres com pré-eclâmpsia foi observado que outro polimorfismo no gene da iNOS foi associado com maior susceptibilidade a doença que pode ser explicada pelo possível aumento da expressão e atividade da iNOS (Amaral, Palei *et al.*, 2011).

Esse aumento da iNOS e a conseqüente formação do ONOO⁻ pode contribuir para vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica. De fato, isto tem sido demonstrado claramente em modelos animais de hipertensão arterial. Entretanto, esta hipótese não foi ainda demonstrada em modelos animais de pré-eclâmpsia.

Devido à dificuldade de investigar possíveis mecanismos associados com a patogênese da pré-eclâmpsia, diversos modelos animais de indução da hipertensão na gravidez têm sido propostos. Entretanto, dentre os modelos de pré-eclâmpsia em animais, a redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) de maneira crônica tem se mostrado um modelo promissor (Podjarny, Losonczy *et al.*, 2004). Alexander *et al.* (Alexander, Kassab *et al.*, 2001) demonstrou que ratas grávidas, mas não ratas virgens, que sofreram a cirurgia RUPP apresentaram aumentos na pressão arterial média de 20-25 mmHg e diminuições de aproximadamente 23% no fluxo renal e 40% na taxa de filtração glomerular, além de aumento na excreção de proteínas na urina e restrição de crescimento intrauterino dos fetos. Ademais, há vários trabalhos

mostrando que o modelo RUPP em ratas grávidas apresenta varias adaptações cardiovasculares que compartilham robustas similaridades com as adaptações sofridas por mulheres com pré-eclampsia. Por exemplo, Sholook *et al.* (Sholook, Gilbert *et al.*, 2007) observaram que a pressão arterial e a resistência periférica total estão aumentadas, enquanto o débito cardíaco e os fluxos uterino e placentário estão diminuídos em ratas RUPP comparadas com as ratas Sham. Sedeek *et al.* (Sedeek, Gilbert *et al.*, 2008) verificaram um aumento no estresse oxidativo (8-isoprostano, MDA e superóxido) em ratas RUPP e que o tempol, uma droga antioxidante, foram capaz de atenuar a hipertensão arterial desses animais. E ainda Alexander *et al.* (Alexander, Rinewalt *et al.*, 2001) mostraram que o modelo RUPP em ratas aumenta a expressão renal cortical e medular de preproendotelina e que a administração de um antagonista seletivo para o receptor ET_A atenua consideravelmente a hipertensão nesses animais.

Contudo, é possível supor que alterações na atividade e expressão da iNOS e o aumento do estresse oxidativo possam ter um papel importante na patogênese da pré-eclâmpsia. Assim, pensamos em avaliar os efeitos da inibição da iNOS nas alterações funcionais, bioquímicas e moleculares no modelo experimental denominado RUPP em ratas grávidas, que mimetiza a pré-eclâmpsia em humanos.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Com base no exposto acima, é possível supor que o aumento da expressão vascular da iNOS e do estresse oxidativo e nitrosativo vascular possam ter um papel importante na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Assim, a hipótese do presente estudo é a de que o inibidor seletivo da iNOS, 1400W, exerça efeito anti-hipertensivo no modelo experimental de pré-eclâmpsia.

OBJETIVOS

3 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da inibição da iNOS nas alterações funcionais, bioquímicas e moleculares no modelo de hipertensão em ratas grávidas (RUPP).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.1- Verificar os efeitos da inibição da iNOS, com uso do 1400W, sobre a pressão sanguínea no modelo RUPP;
- 3.1.2- Verificar se há aumento do estresse oxidativo nos aortas e plasma de animais submetidos à RUPP;
- 3.1.3- Avaliar a expressão protéica da iNOS e níveis de nitrotirosina na aorta de ratas submetidas ao modelo de RUPP.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Gerais

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, número protocolar 159/2010.

Animais: Foram utilizados ratas e ratos Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Na proporção 3:1 permaneceram em gaiolas em biotério com temperatura controlada (23°C), com ciclos de 12:12 horas claro-escuro e com livre acesso a ração e água.

4.2 Hipertensão Arterial Induzida pela redução da pressão de perfusão uterina (RUPP)

O RUPP (Reduced Uterine Perfusion Pressure) é um modelo animal bem estabelecido para simular pré-eclampsia em ratas Spragle-Dawle grávidas (Eder Dj, 1987; Alexander, Kassab *et al.*, 2001; Anderson, Lopez *et al.*, 2005). Porém, no nosso estudo utilizamos ratas Wistar. Todo o procedimento com os animais foi realizado conforme previamente descrito por Alexander *et al.* (Alexander, Kassab *et al.*, 2001). O início da gestação foi contabilizado quando se observou ao microscópio óptico espermatozóides no líquido vaginal. No 14º dia de gestação, as ratas foram selecionadas aleatoriamente para o grupo RUPP e para o grupo Sham. Primeiramente, as ratas com 14 dias de gestação do grupo RUPP foram anestesiadas com isoflurana 2% e, após uma incisão mediana, um clipe de prata com 0.203 mm foi colocado na aorta abdominal inferior acima da bifurcação ilíaca, de modo que a pressão de perfusão uterina fosse reduzida em aproximadamente 40%. Para evitar aumento do fluxo sanguíneo para o útero via artérias ovarianas, um clipe de prata com 0.100 mm foi colocado no ramo direito e outro no ramo esquerdo da artéria ovariana. As ratas cuja clipagem das artérias resultassem em reabsorção

total dos fetos foram excluídas e novas ratas foram submetidas à cirurgia. No grupo Sham, as ratas com 14 dias de gestação, após anestesia, incisura e isolamento das artérias abdominal e ovarianas, tiveram sua cavidade abdominal fechada.

Figura 3: Representação esquemática do modelo de redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) (Alexander, Kassab *et al.*, 2001). Adaptado de Alexander, Kassab *et. al.* 2001.

4.3 Tratamento dos animais

A fim de avaliar a atividade e expressão da iNOS no modelo RUPP, foi administrado um inibidor específico de iNOS (1400W), N-[3-(Aminometil) benzil] acetamidina, na dose 1mg/kg, subcutaneamente, a partir do 14º dia de gestação (1º

dia de cirurgia) por 5 dias. No 19º dia de gestação, realizamos a eutanásia e foram coletados as aortas e o sangue das ratas para a realização das análises bioquímica e molecular.

4.4 Grupos Experimentais

Sham: ratas grávidas que foram submetidas a uma cirurgia fictícia e receberam salina;

RUPP: ratas grávidas que foram submetidas a cirurgia, redução da perfusão uterina, e receberam salina;

Sham 1400W: ratas grávidas que foram submetidos a uma cirurgia fictícia e receberam 1400W (1mg/kg);

RUPP 1400W: ratas grávidas foram submetidas a cirurgia, redução da perfusão uterina, e receberam 1400W (1mg/kg).

4.5 Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos

4.5.1 Avaliação da pressão arterial média

A pressão arterial média foi verificada de maneira invasiva. As variações na pressão foram capturadas por um programa específico de aquisição de dados.

Vinte quatro horas (18º dia de gestação) antes da avaliação da pressão arterial média de maneira invasiva, um cateter de polietileno (P50) foi inserido na artéria carótida dos animais, previamente anestesiados por via inalatória com isoflurano 2%, e posteriormente exteriorizado pelo dorso. No 19º dia o cateter foi conectado a um transdutor de pressão (MP150CE; Biopac Systems Inc.CA,USA), e os sinais foram amplificados usando programa específico conectado ao computador (Acknowledge 3.2, for Windows). Após um período de 30 min de estabilização, a pressão arterial média das ratas foi verificada por aproximadamente 10 min.

4.6 Acompanhamento do ciclo estral das ratas

A partir do 60º dia de vida, as ratas foram monitoradas diariamente quanto à fase do ciclo estral. Para isso, um pequeno volume de solução salina 0,9% era colocado e em seguida removido do canal vaginal por meio de pipeta Pasteur. O material coletado era analisado ao microscópio para identificação dos tipos celulares do epitélio vaginal e determinação da fase do ciclo estral (estro, diestro, metaestro, proestro; figura 4). O acasalamento, 3 ratas na presença de 1 macho, foi realizado no final da fase proestro e início da estro.

Figura 4: Fases fotografadas durante o acompanhamento do ciclo estral das ratas

O estro vaginal (figura 4) ocorre após a ovulação e coincide com a formação do corpo lúteo. A função do corpo lúteo desaparece rapidamente na ausência de estímulos associados com o acasalamento e o corpo lúteo regride. Nessa fase ocorre o predomínio de células epiteliais queratinizadas.

Novos folículos começam a se desenvolver durante o diestro (figura 4). Nessa fase ocorre predomínio de leucócitos, células queratinizadas e nucleadas.

O proestro (figura 4) coincide com o desenvolvimento máximo folicular; o estro comportamental e o acasalamento ocorrem no final dessa fase. Ocorre predomínio de células nucleadas.

O primeiro dia de gestação foi confirmado com a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (figura 5).

Figura 5: Espermatóides

Após ser detectado espermatóides no esfregaço vaginal, foi iniciado a contagem dos dias de gestação, sendo este considerado o primeiro dia. Os animais foram colocados em gaiolas separadamente até o 14º dia de gestação. Nesse dia, foi feita a cirurgia RUPP e iniciado o tratamento com 1400W.

4.7 Parâmetros bioquímicos e moleculares

4.7.1 Determinação da produção vascular de espécies reativas de oxigênio *in situ*

As concentrações vasculares de EROs foram analisadas *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ (Hao, Nishimura *et al.*, 2006; Viel, Benkirane *et al.*, 2008). Essa sonda reage com o O_2^- presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroxietídeo e de etídeo, produtos que emitem fluorescência vermelha no local. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato, a 4 μm de espessura, e incubados com DHE por 30 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em PFA 4%. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num

aumento de 400x. A quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.7.2 Determinação das concentrações plasmáticas do 8-isoprostano

O 8-isoprostano é um biomarcador que reflete diretamente a formação de radicais livres. Assim, para confirmar o estresse oxidativo, as concentrações plasmáticas do 8-isoprostano foram medidas por ensaio de ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) de acordo com informações do fabricante.

4.7.3 Quantificação de peroxidação lipídica plasmática

A peroxidação lipídica foi o parâmetro utilizado para avaliar o estresse oxidativo no plasma. Basicamente, o ácido tiobarbitúrico reage com aldeídos formados na lipoperoxidação, como malonildialdeído (MDA), formando espécies facilmente quantificadas por espectrofotometria ou fluorimetria. Para isso, 10 µL de plasma foram misturados com soluções de ácido sulfúrico 0,04 mol/L e ácido fosfotungstístico 10%v/v, para separar os lipídeos de substâncias solúveis interferentes. Após duas centrifugações consecutivas, a 1600g, o sedimento foi re-suspendido em água destilada, e 500 µL do ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%v/v. Os tubos foram agitados e colocados em banho de aquecimento a 95 °C, por uma hora. Esses foram novamente centrifugados, após acréscimo de 2,5 mL de n-butanol, e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca. Os produtos formados a partir dessa reação foram quantificados em espectrofluorímetro (λ excitação: 515 nm e λ emissão: 553 nm; Gemini EM, Molecular Devices, USA), utilizando a seguinte fórmula: $f \times 25/F$ (onde f representa a absorbância da amostra, e F a do padrão). Como padrão foi utilizado 5 µL de tetrametoxipropano 1 µmol/L.

4.7.4 Determinação atividade vascular da NAD(P)H oxidase

Para a determinação da atividade da enzima NAD(P)H oxidase, utilizou-se a técnica de luminescência com a sonda Lucigenina. Em resumo, anéis de aorta provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais foram transferidos para frascos de luminescência contendo 1 mL de tampão krebs-HEPES, pH 7,2 e 5 $\mu\text{mol/l}$ de lucigenina. Após avaliação dos valores da linha de base, o substrato enzimático β -NADPH (100 $\mu\text{mmol/L}$) foi adicionado à solução e as contagens de luminescência foram medidas continuamente durante 15 minutos em luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany) a 37 °C. Os valores da linha de base obtidos na ausência de β -NADPH foram descontados dos valores obtidos na presença de β -NADPH. Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos anéis de aorta e expressos em unidades relativas de luminescência (URL)/mg/minuto, como descrito previamente (Janiszewski, Souza *et al.*, 2002). Esse ensaio foi padronizado em nosso laboratório utilizando anéis de aorta de animais 2R-1C (hipertensão renovascular) previamente incubados com PEG-SOD (200 U/ml - um análogo da SOD permeável à membrana), DPI (10 $\mu\text{mol/L}$ - inibidor de flavoproteínas), apocinina (1mmol/L – inibidor não seletivo de NAD(P)H oxidase), alopurinol (10 $\mu\text{mol/L}$ – inibidor de xantina oxidase) ou rotenona (10 $\mu\text{mol/L}$ – inibidor da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial) para excluir a formação de superóxido vascular proveniente de outras fontes (Montenegro, Amaral *et al.*, 2011).

4.7.5 Determinação das concentrações de nitrito plasmático

As concentrações de espécies relacionadas ao NO em líquidos foram medidas, sempre em triplicata, pelo método da quimiluminescência (Pelletier, Kleinbongard *et al.*, 2006), que é um dos métodos mais simples, sensíveis e precisos disponíveis para medir NO. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), o qual permite medir NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol.

Resumidamente, a medida das concentrações de produtos da oxidação de NO (nitritos) em amostras líquidas requer que estes produtos da oxidação do NO sejam reduzidos a NO (gás). As quantidades de NO produzidas são medidas após reação do NO com ozônio numa câmara do analisador de NO. Nesta câmara, a reação do NO com ozônio cria moléculas de NO₂ que, no seu estado excitado, emitem luz proporcionalmente às quantidades de NO liberadas pela amostra. O analisador contém um detector de luz que transforma o sinal luminoso em sinal elétrico, que é finalmente convertido em sinal analógico e registrado.

Para a análise de nitrito plasmático, o sangue foi coletado em tubos com heparina e centrifugado por 1 minuto a 5000g. A seguir o plasma (sobrenadante) foi imediatamente congelado em gelo seco e mantido em freezer -80°C para ser quantificado.

As amostras de plasma (100 µL) foram injetados em frasco contendo uma solução redutora (5 mL de ácido acético glacial, 2 mL de H₂O, 50 mg de iodeto de potássio e um pequeno cristal de I₂) que converte os nitritos em NO gás. O frasco é conectado a um fluxo contínuo do gás inerte (Hélio) que passa através da solução, “carregando” consigo o NO liberado em direção ao analisador de NO. Este quantifica o NO liberado, que tem correspondência estequiométrica com a quantidade de nitritos presentes na amostra.

4.7.6 Determinação da expressão vascular da iNOS por western immunoblotting

Os extratos de aorta foram preparados no tampão RIPA. Cem microgramas de extrato protéico foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% PAGE, 15 mA, 300 volts, durante 3 horas a 4°C.

Após a eletroforese, o gel foi retirado e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Madison, WI, USA). O sistema de transferência foi montado de seguinte forma: colocamos 5 papéis de filtro umedecidos com tampão de transferência e passamos um bastão de vidro para remoção de possíveis bolhas. Sobre os papéis colocamos delicadamente a membrana de nitrocelulose e removemos as bolhas com suave passagem do bastão de vidro. Em seguida,

colocamos o gel sobre o sistema já montado. Este foi colocado no aparelho de transferência por 30 min, 10 volts.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite 5% por 60 minutos, e incubada overnight, a 4°C, com anticorpo primário anti-iNOS na diluição 1:1000 (Millipore, Temecula, CA, USA). Depois de lavadas com TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário na diluição 1:2000 (Millipore Temecula, CA, USA), conjugado à peroxidase e revelada com um kit para quimioluminescência ECL (GE Healthcare). β -actina foi utilizada como normalizador do ensaio (diluição 1:10.000, MAB1501; Millipore, Temecula, CA, USA). A quantificação das bandas no gel foi realizada utilizando o programa ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.7.7 Determinação dos níveis vasculares de nitrotirosina por imunohistoquímica

Esse método foi utilizado para determinar a expressão e localização da nitrotirosina diretamente nos tecidos.

As aortas torácicas foram fixadas em 4% de paraformaldeído tamponizado com fosfato, pH 7,4, e embutidos em blocos de parafina. Cortes de 5 mm de espessura foram incubadas durante a noite a 4 ° C com o anticorpo primário anti-nitrotirosina (1:50; Millipore) e o anticorpo secundário (1:200; Millipore) foi adicionado para as secções durante 1 h à temperatura ambiente, tal como foi previamente descrito (Prado e Rossi, 2006). O antígeno foi visualizado com uma técnica marcada com peroxidase estreptavidina biotina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories Inc.) com diaminobenzidina substrato (DAB). As secções foram então contrastadas com hematoxilina e examinadas utilizando microscopia de luz (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra) e a imagem foi captada na X400. A intensidade imunorreatividade foi medida utilizando o programa ImageJ.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nesse estudo foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias ou de uma via, seguido de teste Tukey (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA). Foram considerados estatisticamente diferentes valores com $P < 0,05$. Os gráficos foram representados com média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Inibidor da iNOS atenua hipertensão associada com RUPP

A isquemia placentária, após a inserção dos cliques, provocada pela redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) de maneira crônica proporciona o aumento da pressão arterial nos animais submetidos à cirurgia. Além disso, esse modelo tem sido utilizado com frequência para o estudo da pré-eclâmpsia, principalmente pelas robustas similaridades com a doença clínica.

Para verificarmos se a iNOS desempenha um papel na hipertensão induzida pelo RUPP, administramos subcutaneamente nos animais o inibidor da iNOS, 1400W. Na figura 6, observa-se que há aumento da pressão arterial média (PAM) em animais RUPP em relação ao grupo Sham. O tratamento com 1400W na dose de 1mg/kg, por cinco dias, atenuou o aumento da PAM em aproximadamente 50% ($P < 0.05$, Figura 6).

Figura 6: Tratamento com 1400W atenua a hipertensão arterial no modelo RUPP. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n=10-12$ /grupo) * e #* $P < 0.05$ versus Sham e RUPP, respectivamente.

5.2 Inibidor da iNOS atenua o estresse oxidativo sistêmico e vascular associado com RUPP

Na figura 7 observa-se que há um aumento da produção de O_2^- na camada média da aorta dos animais RUPP em relação ao Sham, observado pela intensidade de fluorescência vermelha produzida na reação do DHE com o O_2^- ($P<0.05$; Figura 7A e 7B). O tratamento com 1400W reduziu significativamente a produção de O_2^- em relação ao RUPP Salina ($P<0.05$).

Pelo fato da NAD(P)H oxidase ser conhecida como a principal enzima produtora de O_2^- , optamos por investigar a sua atividade. Observou-se um aumento na atividade dessa enzima em RUPP em comparação aos animais Sham ($P<0.05$; Figura 8). Esse aumento de atividade coincide com o aumento nos níveis de EROs vascular. Ao administrarmos 1400W, a atividade da enzima foi reduzida significativamente em relação RUPP ($P<0.05$).

Analizamos o estresse oxidativo plasmático inicialmente através da peroxidação lipídica. Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 9). Em seguida, na figura 10 observa-se que há um aumento das concentrações de 8-isoprostano no grupo RUPP em relação ao Sham ($P<0.05$; Figura 10). O tratamento com 1400W reduziu significativamente essas concentrações em relação RUPP ($P<0.05$).

A

B

Figure 7: Tratamento com 1400W impede o aumento vascular da produção EROs induzida no modelo RUPP. (A) Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DHE. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com O_2^- . Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=7-10/grupo) * e #* $P < 0.05$ *p versus* Sham e RUPP, respectivamente.

Figura 8: Tratamento com 1400W impede o aumento da atividade da NAD(P)H oxidase induzido no modelo RUPP. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n= 6-8 / grupo) * e #*P<0.05 *versus* Sham e RUPP, respectivamente.

Figure 9: Tratamento com 1400W e as concentrações plasmáticas de malonildialdeído (MDA) no modelo RUPP. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=8-10/grupo).

Figure 10: Tratamento com 1400W impede o aumento das concentrações plasmáticas de 8-isoprostano (ng/ml) induzida no modelo RUPP. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=5-7/grupo) * e #*P<0.05 versus Sham e RUPP, respectivamente.

5.3 Efeito do tratamento com 1400W sobre as concentrações plasmáticas de nitrito

As concentrações plasmáticas de nitrito não foram diferentes significativamente nos diferentes grupos ($P>0.05$; Figura 11).

Figura 11: Tratamento com 1400W e as concentrações plasmáticas de nitrito no modelo RUPP. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n= 6-8$ / grupo).

5.4 Inibidor da iNOS reduz o aumento da expressão vascular da iNOS associado com RUPP

Na figura 12, observamos um aumento vascular da expressão da iNOS no grupo RUPP em relação ao Sham ($P < 0.05$; Figura 12). Enquanto, o tratamento com 1400W reduziu a expressão da iNOS em relação ao RUPP ($P < 0.05$).

Figura 12: Tratamento com 1400W impede o aumento vascular da expressão da iNOS induzido no modelo RUPP. (A) A membrana representativa da expressão da iNOS por western immunoblotting. (B) O gráfico de barras evidencia os dados densitométricos da expressão da iNOS. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5-7$ / grupo) * e # $P < 0.05$ versus Sham e RUPP, respectivamente.

5.5 Inibidor da iNOS atenua o estresse nitrosativo vascular associado com RUPP

A nitrotirosina é o principal produto da reação do ONOO^- com proteínas. Assim, os níveis de nitrotirosina evidenciam a formação de peroxinitrito.

Verificamos a formação de peroxinitrito via expressão da nitrotirosina pela técnica de imunohistoquímica, e observamos diferenças significativas em todos os grupos experimentais. Ocorreu aumento na formação de peroxinitrito no grupo RUPP em relação ao Sham ($P < 0.05$; Figura 13). Enquanto, o tratamento com 1400W reduziu essa formação em relação RUPP ($P < 0.05$).

Figura 13: Tratamento com 1400W impede o aumento vascular dos níveis de nitrotirosina induzido no modelo RUPP. (A) Fotografias representativas da imunohistoquímica dos níveis de nitrotirosina em aortas de todos os grupos experimentais. (B) Representação gráfica da quantificação da coloração marrom. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n= 10-12 / grupo) * e # $P < 0.05$ versus Sham e RUPP, respectivamente.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Apesar de a mortalidade materna ter diminuído no mundo, o número de internações hospitalares para o parto de gestantes com desordens hipertensivas tem aumentado (Kuklina, Ayala *et al.*, 2009). Embora a pré-eclâmpsia (PE) seja uma condição transitória, as mulheres que desenvolvem essa síndrome apresentam risco aumentado de desenvolver hipertensão, acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana no resto de suas vidas (Wilson, Watson *et al.*, 2003; Valdes, Quezada *et al.*, 2009). Trabalhos recentes mostraram também um aumento da incidência de eventos cardiovasculares em filhos de mães que tiveram PE (Tenhola, Rahiala *et al.*, 2003; Kajantie, Eriksson *et al.*, 2009). Além disso, não há um tratamento medicamentoso efetivo para a pré-eclâmpsia e a terapia adotada atualmente possui algumas limitações. Assim, nosso estudo é relevante para a compreensão da fisiopatologia de desordens hipertensivas da gestação e para a investigação de drogas que possam ser relevantes no tratamento da pré-eclâmpsia.

Nenhum outro trabalho prévio demonstrou que o tratamento com inibidor da iNOS, 1400W, exerce efeito anti-hipertensivo no modelo animal de pré-eclâmpsia RUPP. De fato, os principais resultados do presente estudo foram: (i) a expressão vascular da iNOS é aumentada no modelo de pré-eclâmpsia RUPP; (ii) o inibidor da iNOS, 1400W, impediu o aumento da expressão da iNOS, assim como o estresse oxidativo e nitrosativo associado com RUPP; (iii) o inibidor da iNOS atuou prevenindo o aumento da PAM induzido no modelo RUPP. Dessa forma, esses resultados sugerem uma contribuição da iNOS em promover o estresse oxidativo e nitrosativo, assim como a hipertensão no modelo de pré-eclâmpsia RUPP. Nossos achados podem ter importantes implicações clínicas porque sugerem que a inibição da iNOS pode ser uma estratégia relevante na gestão desse estado crítico.

O modelo de redução de pressão de perfusão uterina (RUPP) tem sido aceito como um dos modelos animais que retratam melhor o estado clínico da pré-eclâmpsia, uma vez que esse modelo em ratas grávidas apresenta várias adaptações cardiovasculares que compartilham robustas similaridades com as adaptações sofridas por mulheres com pré-eclâmpsia (George e Granger, ; Alexander, Bennett *et al.*, 2001; Granger, Alexander *et al.*, 2001; Granger, Alexander *et al.*, 2002; Granger, Lamarca *et al.*, 2006; Gilbert, Babcock *et al.*, 2007; Lamarca,

Gilbert *et al.*, 2008). Foi demonstrado que RUPP em ratas grávidas ocasionou em elevação significativa da pressão arterial média (Lamarca, Bennett *et al.*, 2005; Granger, Lamarca *et al.*, 2006).

Na tentativa de estudar as doenças hipertensivas da gestação, vários modelos experimentais de pré-eclâmpsia têm sido propostos. Nesses modelos foram identificados alguns aspectos que se assemelham a pré-eclâmpsia humana (Podjarny, Losonczy *et al.*, 2004).

Alguns dos sintomas da pré-eclâmpsia materna podem ser reproduzidos por uma isquemia no útero, embora não de forma espontânea os animais desenvolvem a doença (Alexander, Kassab *et al.*, 2001). A inibição crônica das NOS em ratas grávidas por um inibidor não seletivo, L-NAME, produz um padrão de mudança que se assemelha aos sintomas e resposta da pré-eclâmpsia (Shesely, Gilbert *et al.*, 2001). O modelo que utilizou um antagonista, sFLT1, principalmente do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) reforçou os dados clínicos destacando a importância da circulação livre de altos níveis de VEGF nas respostas maternas da gravidez. Além disso, ocorreu o desenvolvimento da hipertensão e proteinúria (Maynard, Min *et al.*, 2003).

Dentre os modelos de pré-eclâmpsia em animais, RUPP tem se mostrado um modelo promissor (Podjarny, Losonczy *et al.*, 2004). Assim, esse modelo tem sido bastante utilizado para estudos envolvendo pré-eclâmpsia. O mesmo foi aplicado em animais de diferentes espécies, como cachorros, coelhos, ratos ovelhas, porcos e primatas não humanos (Cavanagh, Rao *et al.*, 1977; Golden, Hughes *et al.*, 1980; Clark, Durnwald *et al.*, 1982). Essas diferentes espécies têm sido testadas para tentar explicar as disparidades das observações em mulheres com pré-eclâmpsia.

Alexander *et al.* (Alexander, Kassab *et al.*, 2001) demonstraram que ratas grávidas, mas não ratas virgens, que sofreram a cirurgia RUPP apresentaram aumentos na pressão arterial média de 20-25 mmHg e diminuições de aproximadamente 23% no fluxo renal e 40% na taxa de filtração glomerular, além de aumento na excreção de proteínas na urina e restrição de crescimento intrauterino dos fetos. Por exemplo, Sholook *et al.* (Sholook, Gilbert *et al.*, 2007) observaram que a pressão arterial e a resistência periférica total estão aumentadas, enquanto o débito cardíaco e o fluxo uterino e placentário estão diminuídos em ratas RUPP comparadas com as ratas Sham.

Estudos prévios demonstraram que a isquemia placentária no modelo RUPP promove estresse oxidativo e hipertensão (Sholook, Gilbert *et al.*, 2007; Li, Lamarca *et al.*, 2012). De fato, RUPP aumentou os níveis de 8- isoprostano, marcador de estresse oxidativo, e o tratamento com o antioxidante tempol atenuou a hipertensão nesse modelo (Sedeek, Gilbert *et al.*, 2008). Corroborando com esses resultados, verificamos no nosso estudo o aumento circulante de 8-isoprostano e o aumento de EROs, que foram também associados com a produção de EROs dependente do aumento vascular da NADPH oxidase no modelo RUPP. A NAD(P)H oxidase é a maior produtora de O_2^- na vasculatura (Nguyen Dinh Cat, Montezano *et al.*, ; Paravicini e Touyz, 2008; Sedeek, Hebert *et al.*, 2009), e o aumento da atividade dessa enzima no modelo estudado é consistente com uma importante contribuição do estresse oxidativo nesse modelo animal. Assim, esses resultados sugerem que a isquemia placentária promove mecanismos de aumento do estresse oxidativo que não são limitados à placenta (Sedeek, Gilbert *et al.*, 2008) e evoluem diretamente também a vasculatura.

Embora a redução do fluxo sanguíneo útero-placentário seja um dos principais fatores associado com anormalidades cardiovasculares consistente com características fisiopatológicas da pré-eclâmpsia humana (Sankaralingam, Arenas *et al.*, 2006), tem sido sugerido que alterações no metabolismo do NO possam estar relacionadas com esta condição clínica (Sandrim, Palei *et al.*, 2008). Assim, as NOS podem estar alteradas nesse quadro hipertensivo.

A biodisponibilidade sistêmica do NO pode ser avaliada pela quantificação de espécies relacionadas ao NO, uma vez que sua curta meia-vida e as suas pequenas concentrações dificultam a avaliação quantitativa da produção *in vivo* nos tecidos. Entre elas, as concentrações plasmáticas dos principais produtos da oxidação do NO (nitritos e nitratos) são mais comumente utilizadas (Yoon, Song *et al.*, 2000; Nagasaki, Metzger *et al.*, 2005). Os nitritos derivam da reação do NO com oxigênio em solução e são biologicamente ativos. Recentemente, a quantificação do nitrito tem se mostrado bem interessante, uma vez que os níveis plasmáticos deste produto sofrem pouca influência de fatores exógenos. Alguns trabalhos vêm demonstrando redução das concentrações plasmáticas de nitrito em condições patológicas, como hipertensão e em indivíduos que apresentam algum fator de risco para doenças cardiovasculares como fumo (Kleinbongard, Dejam *et al.*, 2006). Entretanto, não observamos diferenças significativas nas concentrações plasmáticas

de nitrito nos diferentes grupos experimentais no modelo estudado. Porém, é importante ressaltar que estudos prévios sugerem que 70% dos níveis de nitrito encontrados sistemicamente sejam derivados da atividade da eNOS (Kleinbongard, Dejam *et al.*, 2003), uma vez que a atividade da iNOS é controlada principalmente em nível transcricional (Kleinert, Pautz *et al.*, 2004).

Enquanto estudos prévios têm relatado que citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela regulação da iNOS na pré-eclâmpsia (Greer, Lyall *et al.*, 1994; Redman e Sargent, 2005; Sankaralingam, Arenas *et al.*, 2006), este é o primeiro estudo a apresentar o aumento da expressão da iNOS na vasculatura no modelo RUPP. É interessante notar que estudos anteriores evidenciaram maiores níveis de citocinas inflamatórias, como por exemplo, o TNF- α , no modelo RUPP, e a infusão dessa citocina em ratas grávidas proporcionou o aumento da pressão arterial (Lamarca, Bennett *et al.*, 2005; Lamarca, Cockrell *et al.*, 2005; Lamarca, Ryan *et al.*, 2007). No entanto, embora o TNF- α aumente a expressão da iNOS em diferentes tipos celulares (Kleinert, Schwarz *et al.*, 2003), os efeitos de inibidores da iNOS nunca foram examinados em modelos animais de pré-eclâmpsia. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o 1400W exerceu relevantes efeitos anti-hipertensivos que foram associados com a regulação da expressão da iNOS.

Considerando que o 1400W é um inibidor altamente seletivo da iNOS (Garvey, Oplinger *et al.*, 1997), este também pode reduzir a expressão da iNOS, como retratado aqui e em outros estudos (El-Mas, Fan *et al.*, 2008; Kan, Hsu *et al.*, 2008; Tian, Yan *et al.*, 2010). Esse importante efeito do 1400W pode explicar a atenuação do aumento dos níveis de nitrotirosina induzido no modelo RUPP, o qual, pode refletir na formação ONOO^- . Consistentemente com essa sugestão, é bem estabelecido que níveis aumentados de EROs reagem com quantidades aumentadas de NO produzidas pela iNOS para formação do peroxinitrito, um potente agente oxidante que pode contribuir para a patologia de diversas doenças cardiovasculares (Loscalzo e Welch, 1995; Pacher, Beckman *et al.*, 2007), incluindo a pré-eclâmpsia (Sankaralingam, Arenas *et al.*, 2006; Matsubara, Matsubara *et al.*, 2010).

Utilizamos o inibidor altamente seletivo da iNOS, 1400W, neste estudo. Embora essa droga iniba diretamente a iNOS (Garvey, Oplinger *et al.*, 1997), outros estudos evidenciaram que a mesma diminui a expressão da iNOS (El-Mas, Fan *et*

et al., 2008; Kan, Hsu *et al.*, 2008). Embora nenhum estudo prévio tenha examinado os efeitos de inibidores da iNOS em modelos de pré-eclâmpsia, a regulação da iNOS tem sido estudada em modelos animais e clínicos de hipertensão (Chou, Yen *et al.*, 1998; Hong, Loh *et al.*, 2000; Smith, Santhanam *et al.*, 2011). Em paralelo com nossos resultados, a aminoguanidina, droga inibidora da iNOS, diminuiu a expressão da iNOS, além de reduzir níveis de nitrotirosina e O_2^- em ratos espontaneamente hipertensos em associação com a supressão do desenvolvimento da hipertensão (Hong, Loh *et al.*, 2000). Além disso, a inibição da iNOS reduziu níveis vasculares de nitrotirosina associados com o envelhecimento e a melhoria de disfunção endotelial, provavelmente como resultado da atenuação da formação de $ONOO^-$ (Hong, Loh *et al.*, 2000).

Observamos, em nossos resultados, que o tratamento com 1400W reduziu significativamente a expressão vascular da iNOS e atenuou a pressão arterial média. Além disso, verificamos também após o tratamento uma redução nos níveis de nitrotirosina, evidenciando uma diminuição da formação de peroxinitrito que é um dos principais mediadores endógenos responsáveis pelos efeitos citotóxicos no sistema cardiovascular.

Com base nos nossos achados e na informação que a regulação da iNOS acontece principalmente à nível transcricional (Kleinert, Pautz *et al.*, 2004), poderíamos pensar que mulheres com pré-eclâmpsia que tenham esse aumento da expressão iNOS seriam beneficiadas com uso de inibidores da iNOS e que aquelas mulheres que têm variantes genéticas que aumentam a expressão dessa isoforma seriam ainda mais beneficiadas, uma vez que o aumento da iNOS nos vasos gera quantidades significativas de NO que são capazes de reagir com o O_2^- para formar $ONOO^-$. Este por sua vez exerce efeitos citotóxicos no sistema cardiovascular.

Nenhum outro trabalho prévio examinou a possível associação da inibição da iNOS estudados aqui com o modelo RUPP que mimetiza pré-eclâmpsia em humanos, sendo nós os primeiros a demonstrar que o 1400W exerce um efeito benéfico nesse modelo.

A descoberta de mecanismos que são relevantes para a fisiopatologia da pré-eclâmpsia pode oferecer novos alvos terapêuticos. Nossas descobertas indicam claramente a associação da iNOS com a hipertensão no modelo estudado. Nós descobrimos que o inibidor iNOS, 1400W, atenuou a hipertensão, provavelmente

como resultado da regulação da expressão de iNOS e diminuição o stress oxidativo e nitrosativo vascular. É possível que os inibidores da iNOS possam ser clinicamente útil no tratamento da pré-eclampsia, especialmente em grupos particulares de pacientes, que podem ser geneticamente mais propensas a desenvolver essa condição clínica porque transportam variantes genéticas associadas a um aumento da expressão da iNOS (Amaral, Palei *et al.*, 2011). Estudos adicionais em pacientes são necessários para examinar essa possibilidade.

Os estudos em animais em combinação com estudos clínicos têm demonstrado uma variedade de mecanismos potenciais para o entendimento da fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O tratamento com 1400W preveniu o aumento da pressão arterial média, reduziu a produção vascular de EROs, reduziu a atividade da NAD(P)H oxidase e concentrações plasmáticas de 8-isoprostano. Além disso, reduziu a expressão vascular da iNOS e os níveis de nitrotirosina.

Nossos resultados sugerem que o 1400W atenua a hipertensão no modelo RUPP provavelmente devido a inibição da iNOS e a diminuição da formação de ONOO⁻.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Alderton, W. K., C. E. Cooper, *et al.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J, v.357, n.Pt 3, Aug 1, p.593-615. 2001.

Alexander, B. T., W. A. Bennett, *et al.* Preeclampsia: linking placental ischemia with cardiovascular-renal dysfunction. News Physiol Sci, v.16, Dec, p.282-6. 2001.

Alexander, B. T., S. E. Kassab, *et al.* Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. Hypertension, v.37, n.4, Apr, p.1191-5. 2001.

Alexander, B. T., A. N. Rinewalt, *et al.* Endothelin type a receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. Hypertension, v.37, n.2 Part 2, Feb, p.485-9. 2001.

Amaral, L. M., A. C. Palei, *et al.* Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy. J Hum Hypertens, v.26, n.9, Sep, p.547-52. 2011.

Anderson, C. M., F. Lopez, *et al.* Reduced uteroplacental perfusion alters uterine arcuate artery function in the pregnant Sprague-Dawley rat. Biol Reprod, v.72, n.3, Mar, p.762-6. 2005.

Bredt, D. S., P. M. Hwang, *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature, v.351, n.6329, Jun 27, p.714-8. 1991.

Calabrese, V., C. Mancuso, *et al.* Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. Nat Rev Neurosci, v.8, n.10, p.766-75. 2007.

Cavanagh, D., P. S. Rao, *et al.* Experimental toxemia in the pregnant primate. Am J Obstet Gynecol, v.128, n.1, May 1, p.75-85. 1977.

Chou, T. C., M. H. Yen, *et al.* Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. Hypertension, v.31, n.2, Feb, p.643-8. 1998.

Clark, K. E., M. Durnwald, *et al.* A model for studying chronic reduction in uterine blood flow in pregnant sheep. Am J Physiol, v.242, n.2, Feb, p.H297-301. 1982.

Davis, E. F., L. Newton, *et al.* Pre-eclampsia and offspring cardiovascular health: mechanistic insights from experimental studies. Clin Sci (Lond), v.123, n.2, Jul, p.53-72.

Eder Dj, M. M. A role for brain angiotensin II in experimental pregnancy-induced hypertension in laboratory rats. Clin Exp Hypertens Preg, v.B6, p.431-451. 1987.

El-Mas, M. M., M. Fan, *et al.* Endotoxemia-mediated induction of cardiac inducible nitric-oxide synthase expression accounts for the hypotensive effect of ethanol in female rats. J Pharmacol Exp Ther, v.324, n.1, Jan, p.368-75. 2008.

Fu, L., Y. Zhao, *et al.* Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population. J Hypertens, v.27, n.5, May, p.991-1000. 2009.

Garvey, E. P., J. A. Oplinger, *et al.* 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. J Biol Chem, v.272, n.8, Feb 21, p.4959-63. 1997.

George, E. M. e J. P. Granger. Linking placental ischemia and hypertension in preeclampsia: role of endothelin 1. Hypertension, v.60, n.2, Aug, p.507-11.

Ghosh, D. K. e J. C. Salerno. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. Front Biosci, v.8, Jan 1, p.d193-209. 2003.

Gilbert, J. S., S. A. Babcock, *et al.* Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. Hypertension, v.50, n.6, Dec, p.1142-7. 2007.

Golden, J. G., H. C. Hughes, *et al.* Experimental toxemia in the pregnant guinea pig (*Cavia porcellus*). Lab Anim Sci, v.30, n.2 Pt 1, Apr, p.174-9. 1980.

Granger, J. P., B. T. Alexander, *et al.* Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. Am J Hypertens, v.14, n.6 Pt 2, Jun, p.178S-185S. 2001.

_____. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. Microcirculation, v.9, n.3, Jul, p.147-60. 2002.

Granger, J. P., B. B. Lamarca, *et al.* Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. Methods Mol Med, v.122, p.383-92. 2006.

Greer, I. A., F. Lyall, *et al.* Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? Obstet Gynecol, v.84, n.6, p.937-40. 1994.

Griffith, O. W. e D. J. Stuehr. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol, v.57, p.707-36. 1995.

Hao, L., T. Nishimura, *et al.* Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.26, n.4, Apr, p.819-25. 2006.

Hong, H. J., S. H. Loh, *et al.* Suppression of the development of hypertension by the inhibitor of inducible nitric oxide synthase. Br J Pharmacol, v.131, n.3, p.631-7. 2000.

Hytten, F. Blood volume changes in normal pregnancy. Clin Haematol, v.14, n.3, p.601-12. 1985.

Janiszewski, M., H. P. Souza, *et al.* Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. Free Radic Biol Med, v.32, n.5, Mar 1, p.446-53. 2002.

Kaaja, R. J. e I. A. Greer. Manifestations of chronic disease during pregnancy. Jama, v.294, n.21, Dec 7, p.2751-7. 2005.

Kajantie, E., J. G. Eriksson, *et al.* Pre-eclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring: the Helsinki birth cohort study. Stroke, v.40, n.4, Apr, p.1176-80. 2009.

Kan, W. H., J. T. Hsu, *et al.* Selective inhibition of iNOS attenuates trauma-hemorrhage/resuscitation-induced hepatic injury. J Appl Physiol, v.105, n.4, Oct, p.1076-82. 2008.

Khan, K. S., D. Wojdyla, *et al.* WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. Lancet, v.367, n.9516, Apr 1, p.1066-74. 2006.

Kleinbongard, P., A. Dejam, *et al.* Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. Free Radic Biol Med, v.40, n.2, Jan 15, p.295-302. 2006.

_____. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. Free Radic Biol Med, v.35, n.7, Oct 1, p.790-6. 2003.

Kleinert, H., A. Pautz, *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Eur J Pharmacol, v.500, n.1-3, Oct 1, p.255-66. 2004.

Kleinert, H., P. M. Schwarz, *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Biol Chem, v.384, n.10-11, Oct-Nov, p.1343-64. 2003.

Kuklina, E. V., C. Ayala, *et al.* Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. Obstet Gynecol, v.113, n.6, Jun, p.1299-306. 2009.

Kuo, P. C. e R. A. Schroeder. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg, v.221, n.3, p.220-35. 1995.

Lamarca, B. B., W. A. Bennett, *et al.* Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor-alpha. Hypertension, v.46, n.4, Oct, p.1022-5. 2005.

Lamarca, B. B., K. Cockrell, *et al.* Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. Hypertension, v.46, n.1, Jul, p.82-6. 2005.

Lamarca, B. D., J. Gilbert, *et al.* Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. Hypertension, v.51, n.4, Apr, p.982-8. 2008.

Lamarca, B. D., M. J. Ryan, *et al.* Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. Curr Hypertens Rep, v.9, n.6, Dec, p.480-5. 2007.

Lazdam, M., A. De La Horra, *et al.* Unique blood pressure characteristics in mother and offspring after early onset preeclampsia. Hypertension, v.60, n.5, Nov, p.1338-45.

Li, J., B. Lamarca, *et al.* A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.303, n.1, Jul, p.H1-8. 2012.

Longo, S. A., C. P. Dola, *et al.* Preeclampsia and eclampsia revisited. South Med J, v.96, n.9, p.891-9. 2003.

Loscalzo, J. e G. Welch. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog Cardiovasc Dis, v.38, n.2, p.87-104. 1995.

Lyall, F., J. N. Bulmer, *et al.* Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. Am J Pathol, v.154, n.4, p.1105-14. 1999.

Macgillivray, I., G. A. Rose, *et al.* Blood pressure survey in pregnancy. Clin Sci, v.37, n.2, p.395-407. 1969.

Mackay, A. P., C. J. Berg, *et al.* Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. Obstet Gynecol, v.97, n.4, p.533-8. 2001.

Matsubara, K., Y. Matsubara, *et al.* Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. J Obstet Gynaecol Res, v.36, n.2, p.239-47. 2010.

Maynard, S., F. H. Epstein, *et al.* Preeclampsia and angiogenic imbalance. Annu Rev Med, v.59, p.61-78. 2008.

Maynard, S. E., J. Y. Min, *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest, v.111, n.5, Mar, p.649-58. 2003.

Moncada, S. e A. Higgs. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med, v.329, n.27, p.2002-12. 1993.

Montenegro, M. F., J. H. Amaral, *et al.* Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. Free Radic Biol Med, v.51, n.1, Jul 1, p.144-52. 2011.

Nagasaki, S., I. F. Metzger, *et al.* eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. Thromb Res, v.115, n.5, p.375-9. 2005.

Nguyen Dinh Cat, A., A. C. Montezano, *et al.* Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. Antioxid Redox Signal, Jun 11.

Noris, M., N. Perico, *et al.* Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. Nat Clin Pract Nephrol, v.1, n.2, p.98-114; quiz 120. 2005.

Noris, M., M. Todeschini, *et al.* L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. Hypertension, v.43, n.3, p.614-22. 2004.

Pacher, P., J. S. Beckman, *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.315-424. 2007.

Paravicini, T. M. e R. M. Touyz. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care, v.31 Supl 2, Feb, p.S170-80. 2008.

Pautz, A., J. Art, *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide, v.23, n.2, Sep 15, p.75-93. 2010.

Pelletier, M. M., P. Kleinbongard, *et al.* The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. Free Radic Biol Med, v.41, n.4, Aug 15, p.541-8. 2006.

Podjarny, E., G. Losonczy, *et al.* Animal models of preeclampsia. Semin Nephrol, v.24, n.6, p.596-606. 2004.

Prado, C. M. e M. A. Rossi. Circumferential wall tension due to hypertension plays a pivotal role in aorta remodelling. Int J Exp Pathol, v.87, n.6, Dec, p.425-36. 2006.

Pridjian, G. e J. B. Puschett. Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. Obstet Gynecol Surv, v.57, n.9, p.598-618. 2002.

Redman, C. W. e I. L. Sargent. Latest advances in understanding preeclampsia. Science, v.308, n.5728, p.1592-4. 2005.

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol, v.183, n.1, Jul, p.S1-S22. 2000.

Roberts, J. M. e H. S. Gammill. Preeclampsia: recent insights. Hypertension, v.46, n.6, p.1243-9. 2005.

Roberts, J. M., R. N. Taylor, *et al.* Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. Am J Hypertens, v.4, n.8, p.700-8. 1991.

Rovinsky, J. J. e H. Jaffin. Cardiovascular Hemodynamics in Pregnancy. I. Blood and Plasma Volumes in Multiple Pregnancy. Am J Obstet Gynecol, v.93, p.1-15. 1965.

Samadi, A. R., R. M. Mayberry, *et al.* Maternal hypertension and associated pregnancy complications among African-American and other women in the United States. Obstet Gynecol, v.87, n.4, p.557-63. 1996.

Sandrim, V. C., A. C. Palei, *et al.* Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. Hypertension, v.52, n.2, p.402-7. 2008.

Sankaralingam, S., I. A. Arenas, *et al.* Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction. Expert Rev Mol Med, v.8, n.3, p.1-20. 2006.

Sedeek, M., J. S. Gilbert, *et al.* Role of reactive oxygen species in hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats. Am J Hypertens, v.21, n.10, Oct, p.1152-6. 2008.

Sedeek, M., R. L. Hebert, *et al.* Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. Curr Opin Nephrol Hypertens, v.18, n.2, Mar, p.122-7. 2009.

Shesely, E. G., C. Gilbert, *et al.* Nitric oxide synthase gene knockout mice do not become hypertensive during pregnancy. Am J Obstet Gynecol, v.185, n.5, Nov, p.1198-203. 2001.

Sholook, M. M., J. S. Gilbert, *et al.* Systemic hemodynamic and regional blood flow changes in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.4, Oct, p.H2080-4. 2007.

Sibai, B., G. Dekker, *et al.* Pre-eclampsia. Lancet, v.365, n.9461, Feb 26-Mar 4, p.785-99. 2005.

Smith, C. J., L. Santhanam, *et al.* Upregulation of inducible nitric oxide synthase contributes to attenuated cutaneous vasodilation in essential hypertensive humans. Hypertension, v.58, n.5, Nov, p.935-42. 2011.

Steegers, E. A., P. Von Dadelszen, *et al.* Pre-eclampsia. Lancet, v.376, n.9741, p.631-44. 2010.

Stevens-Truss, R., K. Beckingham, *et al.* Calcium binding sites of calmodulin and electron transfer by neuronal nitric oxide synthase. Biochemistry, v.36, n.40, Oct 7, p.12337-45. 1997.

Tenhola, S., E. Rahiala, *et al.* Blood pressure, serum lipids, fasting insulin, and adrenal hormones in 12-year-old children born with maternal preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab, v.88, n.3, Mar, p.1217-22. 2003.

Tian, J., Z. Yan, *et al.* Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. Acta Pharmacol Sin, v.31, n.10, Oct, p.1324-8. 2010.

Valdes, G., F. Quezada, *et al.* Association of remote hypertension in pregnancy with coronary artery disease: a case-control study. Hypertension, v.53, n.4, Apr, p.733-8. 2009.

Viel, E. C., K. Benkirane, *et al.* Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.295, n.1, Jul, p.H281-8. 2008.

Wilson, B. J., M. S. Watson, *et al.* Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study. Bmj, v.326, n.7394, Apr 19, p.845. 2003.

Yoon, Y., J. Song, *et al.* Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. Clin Chem, v.46, n.10, Oct, p.1626-30. 2000.

Zhang, J., S. Meikle, *et al.* Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. Hypertens Pregnancy, v.22, n.2, p.203-12. 2003.