

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Jéssica Antonini Troiano

Papel das espécies reativas de oxigênio na hiporreatividade de aortas à
fenilefrina observada no final da prenhez de Ratas Espontaneamente
Hipertensas (SHR)

ARAÇATUBA

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Jéssica Antonini Troiano

Papel das espécies reativas de oxigênio na hiporreatividade de aortas à fenilefrina observada no final da prenhez de Ratas Espontaneamente Hipertensas (SHR)

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T845p Troiano, Jéssica Antonini.
Papel das espécies reativas de oxigênio na hiporreatividade de aortas à fenilefrina observada no final da prenhez de Ratas Espontaneamente Hipertensas (SHR) / Jéssica Antonini Troiano. - Araçatuba, 2015
91 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Aorta 2. Endotélio 3. Prenhez 4 Hipertensão 5. Espécies de oxigênio reativas I. Título.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 08.03.1991, Dracena- SP.

Filiação: Marlei Antonini do Vale Troiano
Décio Aparecido Troiano

2009/2012: Curso de Graduação em Farmácia – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

2013/2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlei e Délcio, por sempre serem a minha base e o meu conforto, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem, e aos meus irmãos, Andressa e Dener, por serem os meus melhores amigos e torcerem por mim mais do que ninguém. Amo vocês eternamente, minha família!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, que são a minha força maior, sou eternamente grata por todas as bênçãos alcançadas.

A professora Cristina Antoniali Silva, minha orientadora, e muitas vezes mais do que isso, minha amiga, minha mãe. Agradeço imensamente pela orientação, incentivo, dedicação, paciência e principalmente pela amizade.

Ao grupo de pesquisa da professora Cristina: Simone Potje, Murilo Graton, Luiz Natali, Priscila Vieira, Priscila Cavalari, Lígia Perassa, Daniela Souza, Daniela Navarro, Matheus Pagan, Carlyle Marinho.

A professora Tereza Cristina da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) por ceder o laboratório para realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Aos professores da banca examinadora, Angelina Zanesco e Carlos Renato Tirapelli, pela participação e contribuição neste trabalho.

Aos professores do departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, Sandra, Bedran, Ana Cláudia, Rita, Antônio, João e Dóris pela ajuda, colaboração e aprendizado durante esta jornada.

Aos funcionários da FOA-UNESP, Grisalda, Arnaldo, Camilo, João, Eliseide pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Claudia, Ana Paula, Maria Claudia, Denise, Luzia e Cláudio.

As funcionárias da seção de pós-graduação, Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por concessão da bolsa de mestrado.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro à pesquisa (proc. no. 2012/20398-6).

A UNESP (Universidade Estadual Paulista) pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

Aos meus pais, Marlei e Délcio, e irmãos, Andressa e Dener, por terem sempre estado ao meu lado me apoiando e incentivando, e juntos fazerem o meu sonho se tornar realidade.

A minha família Antonini e Troiano, por todo apoio e suporte que me deram.

Ao meu namorado, Oscar Junior, por sempre caminhar ao meu lado, e mesmo na distância se fazer tão presente.

As minhas amigas desde a infância: Lais, Thais, Talita, Dayane e Aymêe pela amizade e pela convivência de todos esses anos. Obrigada pelas boas vibrações e pela torcida.

A minha amiga de apartamento Fernanda, por tornar sempre os meus dias mais alegres, pela amizade, pelo carinho e pela convivência prazerosa.

Aos amigos e colegas do Departamento de Ciências Básicas: Simone, Murilo, Daniela, Daniele, Luiz, Matheus, Carlyle, Carluci, Victor, Flávia, Fernanda, Ingrid, Camila, Ariana, Lígia, Larissa, Noelle, Samuel, Wagner, Ângela, Ricardo, Sara, Renato, Amanda, Fernando, Thais e Nathalia.

Em especial, aos meus irmãos de coração, Simone e Murilo, por terem se tornado muito mais que meus amigos de bancada, por fazerem parte de todos os momentos do meu mestrado, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelas festas e pelo amparo. A minha caminhada com vocês ao meu lado com certeza foi muito mais leve e divertida, amo vocês!

Agradeço as demais pessoas que se fizeram importante durante esta minha caminhada.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade.”

Albert Einstein

TROIANO, J. A. **Papel das espécies reativas de oxigênio na hiporreatividade à fenilefrina observada no final da prenhez de ratas espontaneamente hipertensas (SHR)**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

Estudos têm mostrado que em ratas prenhas normotensas ou hipertensas (SHR) há uma diminuição significativa da pressão arterial nos períodos finais da prenhez diretamente associada à redução da atividade simpática perivascular de leitos mesentéricos de ratas normotensas ou hipertensas (SHR). Essas alterações têm sido atribuídas a uma importante participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio com destaque ao óxido nítrico (NO). Estudos recentes do nosso laboratório sugerem que o aumento da síntese de NO pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ao final da prenhez ocorre por uma via menos dependente de cálcio, associada a fosforilação da eNOS em resíduos de Serina 1177, através da via PI3K/Akt/eNOS. Por outro lado, ratas hipertensas não prenhas apresentam uma disfunção endotelial e vascular ocasionada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo o complexo enzimático NAD(P)H oxidase, uma importante fonte de ERO. A produção de ERO modula a biodisponibilidade de NO. Assim, uma diminuição das ERO durante a prenhez poderia contribuir para a redução da PA e modulação da reatividade vascular, dependente do endotélio, aos agonistas vasoconstritores. Nossa hipótese é que em SHR prenhas, a redução da produção de ERO na aorta contribuiria para o aumento da biodisponibilidade do NO e para a hiporreatividade de aortas à fenilefrina (PE). Para isso, o estresse oxidativo sistêmico e da aorta (TBARS) foram avaliados em ratas Wistar e SHR, prenhas (P) e não prenhas (NP). Analisamos o efeito hipotensor da Apocinina (30 mg/kg) e do Tempol (30 mg/kg). Anéis intactos de aorta torácica de P e NP foram estimulados com PE antes e após incubação (30 min) com Apocinina (100 µmol/L) ou Tempol (0,1 nmol/L). O efeito de Apocinina e do Tempol foi avaliado nas concentrações citosólicas de NO ([NO]), medidas pela intensidade de fluorescência do DAF-2DA (10 µmol/L), de ERO ([ERO]), medida pelo DHE (2,5 µmol/L) e Ca²⁺, medida pelo FLUO 3-AM (5 µmol/L), em células endoteliais isoladas de aorta (CEA). Analisamos

a expressão proteica da eNOS, NOX4 e SOD-1 em aortas de ratas P e NP, pelos ensaios de Western Blotting. Nossos resultados demonstraram menor estresse oxidativo em aorta, menor [ERO] em células endoteliais e menor expressão da NOX4 em aorta de SHR P. Aumento da expressão da eNOS em aorta e na [NO] em CEA de SHR P também foram observados. A Apocinina reduziu a resposta vasoconstritora à PE em aorta intacta de SHR NP, mas não alterou a resposta contrátil à PE em aortas de SHR P. Na presença de Tempol, as respostas contráteis à PE não foram alteradas em aortas de SHR P e NP. Os resultados sugerem que a produção de ERO está diminuída em aortas de SHR P. Em conclusão, a diminuição do estresse oxidativo e da expressão de NOX4 em aorta, e da [ERO] em AEC, contribuem para a maior biodisponibilidade de NO e hiporreatividade à PE em aorta de SHR P.

Palavras-chave: Aorta. Endotélio. Prenhez. Hipertensão. Espécies de oxigênio reativas.

TROIANO, J. A. **Role of reactive oxygen species in hyporeactivity to phenylephrine observed in late pregnancy spontaneously hypertensive rats (SHR)**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Studies have shown that in normotensive or hypertensive pregnant rats (SHR) there is a significant decrease in blood pressure in late pregnancy directly associated with the reduction in sympathetic perivascular activity of mesenteric beds of normotensive or hypertensive rats (SHR). These changes have been attributed to an important role of endothelium-derived relaxing factors especially to nitric oxide (NO). Recent studies in our laboratory suggest that increased synthesis of NO by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in late pregnancy is of a less calcium-dependent pathway associated with phosphorylation of eNOS on serine 1177 through via PI3K/Akt/eNOS. On the other hand, do not exhibit a pregnant hypertensive rats and the vascular endothelial dysfunction caused by increased production of reactive oxygen species (ROS), the NAD(P)H oxidase enzyme complex, a major source of ROS. The ROS modulate the bioavailability of NO. Thus, a reduction of ROS during pregnancy could contribute to the reduction in blood pressure and modulation of vascular reactivity endothelium-dependent, to vasoconstrictor agonists. Our hypothesis is that in pregnant spontaneous hypertensive rats (SHR), the reduction of ROS production in the aorta contribute to increase the bioavailability of NO and hyporeactivity to aortae phenylephrine (PE). For this reason, systemic oxidative stress and aorta (TBARS) were valued in Wistar and SHR rats, pregnant (P) and non-pregnant (NP). We analyzed the hypotensive effect of Apocynin (30 mg/kg) and Tempol (30 mg/kg). Intact rings of thoracic aorta of P and NP were stimulated with PE before and after incubation (30 min) with apocynin (100 µmol/L) or Tempol (0,1 nmol/L). The effect of Apocynin and Tempol was evaluated in the cytosolic concentration of NO ([NO]) as measured by fluorescence intensity of DAF-2DA (10 µmol/L), ROS ([ROS]), as measured by DHE (2,5 µmol/L) and Ca²⁺, as measured by FLUO-3 AM (5 µmol/L) in isolated aortic endothelial cells (AEC). We have analyzed the protein expression of eNOS, NOX4 and SOD-1 in aortas of P and NP rats by Western blotting assays. Our

results demonstrated a lower oxidative stress in the aorta, a lower [ERO] in endothelial cells and reduced expression of NOX4 in the aorta of SHR P. Increased eNOS expression in the aorta and in the [NO] in AEC SHR P were also observed. Apocynin reduced the vasoconstrictor response to PE in intact aorta of SHR NP, but did not alter the contractile response to PE in aortas of SHR P. In the presence of Tempol, the contractile responses to PE have not changed in aortas of SHR P and NP. The results suggest that the production of ROS is lower in SHR aorta P. In conclusion, the decrease in oxidative stress and NOX4 expression in the aorta, and [ROS] in AEC, contribute to greater bioavailability and the hyporeactivity PE in the aorta of SHR P.

Keywords: Aorta. Endothelium. Pregnancy, animal. Hypertension. Reactive oxygen species.

ABREVIATURAS

β – beta

Δ PAM – variação da pressão arterial média

% – porcentagem

[Ca²⁺] – concentração intracelular de íon cálcio

[ERO] – concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio

[NO] – concentração intracelular de óxido nítrico

°C – graus Celsius

μ – micro

μ g – micrograma

μ L – microlitro

μ mol/L – micromol por litro

A23187 – ionóforo de cálcio

ACh – acetilcolina, clorato de acetilcolina

Akt – proteína tirosina quinase A

Apocinina – 4-hidróxi-3-metóxiacetofenona

Ca²⁺ – íon cálcio

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CAT – catalase

cm – centímetro

CMLV – célula do músculo liso vascular

cNOS - óxido nítrico sintase constituível (do inglês, *constitutive nitric oxide synthase*)

CO₂ – dióxido de carbono

COX – ciclooxigenase

DAF 2-DA – 4,5- diaminofluoresceína

DHE – dihidroetidina

EC₂₀ – concentração necessária para 20 % do efeito máximo

EC₅₀ – concentração necessária para 50 % do efeito máximo

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

E_{max} – efeito máximo

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial ou isoforma III (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*)

EPM – erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio

FC – frequência cardíaca

FLUO 3-AM - 4-(6-acetoximetóxi-2,7-dicloro-3-oxo-9-xantenil)-4'-metil-2,2'(etilenodióxi)-diani -lino-N,N,N',N'-ácido tetra-acético teraquis (acetóximetil) éster

g – grama

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

GPx – glutathione peroxidase

h – hora

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HEPES – ácido N-(2-hidróxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

IF – intensidade de fluorescência

iNOS – óxido nítrico sintase induzível ou isoforma II (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*)

KCl – cloreto de potássio

Kg – quilograma

KH₂PO₄ – fosfato de potássio monohidratado

L – litro

L-NAME – L-N^G-nitroarginina metil éster

L-NNA – L-Nitro-L-arginina

m/v – massa por volume

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MgSO₄: sulfato de magnésio

mL – mililitro

mm – milímetro

mmHg – milímetros de mercúrio

mmol/L – milimol por litro

mN – miliNewton

mol/L – mol por litro

mtNOS – óxido nítrico sintase mitocondrial ou isoforma IV (do inglês, *mitochondrial nitric oxide synthase*)

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato monossódico

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

nmol/L – nanomol por litro

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal ou isoforma I (do inglês, *neuronal nitric oxide synthase*)

NO – óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

NOS – óxido nítrico sintase (do inglês, *nitric oxide synthase*)

NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica

NP – ratas não prenhas

NP-40 – nonidet P-40

O₂⁻ – ânion superóxido

O₂ – oxigênio molecular

ONOO⁻ - peroxinitrito

P – ratas prenhas

PA – pressão arterial

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

pD₂ – logaritmo negativo da EC₅₀

PE – fenilefrina, cloridrato de L- fenilefrina

PGI₂ – prostaciclina

pH – potencial hidrogeniônico

PI3K – fosfatidilinositol-3-OH quinase

RIPA – tampão para ensaio de radioimunoprecipitação

rpm – rotações por minutos

SHR – rato espontaneamente hipertenso (do inglês, *spontaneously hypertensive rats*)

SOD – superóxido dismutase

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive species*)

TBS-T – tampão tris-salina acrescido de Tween 20

Tempol – 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil

v/v – volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Pressão Arterial Média (PAM), B) Frequência Cardíaca (FC), C) Pressão Arterial Sistólica (PAS) e D) Pressão Arterial Diastólica (PAD) de ratas Wistar e SHR não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). Os valores representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n= 7) dos diferentes grupos. *p<0,05 ratas não prenhas versus ratas prenhas, Wistar ou SHR; #p<0,05 SHR não prenha versus demais grupos, ANOVA.

50

Figura 2 - Variação da Pressão Arterial Média (Δ PAM, em mmHg) em ratas Wistar e SHR não prenhas (NP, barras brancas) e prenhas (P, barras pretas) após a administração *in bolus* de A) Apocinina (30mg/kg) e B) Tempol 30mg/kg. As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. *p<0,05 SHR não prenha versus SHR prenha; #p<0,05 SHR prenha versus demais grupos, ANOVA.

51

Figura 3 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, em nmol/mg proteína) em eritrócitos de ratas Wistar e SHR não prenhas (NP, barras brancas) e prenhas (P, barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em hemolisados (n=5) dos diferentes grupos. *p<0,05 ratas não prenhas versus prenhas, Wistar ou SHR; †p<0,05 SHR não prenhas versus ratas Wistar não prenhas; #p<0,05 SHR prenhas versus ratas Wistar prenhas, ANOVA.

52

Figura 4 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, em nmol/mg proteína) em aortas de ratas Wistar e SHR não prenhas (NP, barras brancas) e prenhas (P, barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=7) dos diferentes grupos. *p<0.05 não prenhas versus prenhas, Wistar ou SHR, ANOVA.

53

Figura 5 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas intactos de ratas não prenhas (NP, símbolos abertos) e prenhas (P, símbolos fechados) Wistar (A) e SHR (B). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. *p<0,05 valores de Emax em P *versus* NP, Wistar e SHR; &p<0.05 valores de pD₂ em ratas Wistar P *versus* ratas Wistar NP, Teste t de Student.

55

Figura 6 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas intactos de ratas não prenhas (NP, símbolos abertos) e prenhas (P, símbolos fechados) Wistar (A) e SHR (B) em ausência ou em presença de Apocinina (+ Apocinina, 100 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. *p<0,05 valores de Emax de ratas P *versus* ratas NP em ambos os grupos; #p<0,05 valores de Emax de NP + Apocinina *versus* NP em ambos os grupos; +p<0,05 valores de Emax em ratas Wistar P + Apocinina *versus* ratas Wistar P; &p<0,05 valores de pD₂ em ratas Wistar NP *versus* outros grupos, ANOVA.

57

Figura 7 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas intactos de ratas não prenhas (NP, símbolos abertos) e prenhas (P, símbolos fechados) Wistar (A) e SHR (B) na ausência ou em presença de Tempol (+ Tempol, 0,1nmol/L). Os valores representam a média \pm EPM dos valores obtidos nos diferentes experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. *p<0.05 valores de Emax em ratas P *versus* ratas NP; &p<0,05 valores de pD₂ em ratas Wistar NP *versus* P, ANOVA.

59

Figura 8 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2/DA (10 μ mol/L) que quantifica a concentração de óxido nítrico (NO) em células endoteliais de aorta (CEA, n=5-6) de ratas Wistar (A) e SHR (B), não prenhas (barras brancas) e não prenhas (barras pretas) em condições

basais e após incubação com PE (fenilefrina, 100 nmol/L), Apocinina (100 µmol/L) ou Tempol (0,1 nmol/L). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos CEA dos diferentes grupos. *p<0,05 concentração nas CEA de ratas P *versus* NP, Wistar ou SHR; &p<0,05 concentração nas CEA incubadas com PE, Apocinina ou Tempol *versus* concentração basal de ratas NP; #p<0,05 concentração nas CEA estimuladas com Apocinina *versus* concentração basal de ratas P, ANOVA.

61

Figura 9 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DHE (2,5 µmol/L) que quantifica a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células endoteliais de aorta (CEA, n=5-6) de ratas Wistar (A) e SHR (B), não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas) em condições basais e após incubação com PE (fenilefrina, 100 nmol/L), Apocinina (100 µmol/L) ou Tempol (0,1 nmol/L). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em CEA dos diferentes grupos. *p<0,05 concentração nas CEA de ratas P *versus* NP, Wistar ou SHR; &p<0,05 concentração nas CEA de ratas NP incubadas com Apocinina ou Tempol *versus* basal; #p<0,05 concentração nas CEA de ratas P incubadas com Apocinina *versus* basal, ANOVA

63

Figura 10 - Intensidade de fluorescência emitida pelo FLUO 3-AM (5 µmol/L) que quantifica a concentração de cálcio (Ca²⁺) em células endoteliais de aorta (CEA, n=5-6) de ratas Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e não prenhas (barras pretas) em condições basais e após incubação com PE (fenilefrina, 100 nmol/L), Apocinina (100 µmol/L) ou Tempol (0,1 nmol/L). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em CEA dos diferentes grupos, ANOVA.

65

Figura 11 - Autorradiografias típicas das bancas e quantificação da expressão proteica da enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) / β-actina em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhas

(barras brancas) e prenhas (barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos. *p<0,05 entre ratas não prenhas *versus* prenhas, Wistar ou SHR; †p<0,05 entre SHR não prenhas *versus* Wistar não prenhas; #p<0,05 entre SHR prenhas *versus* Wistar prenhas, ANOVA.

67

Figura 12 - Autorradiografias típicas das bandas e quantificação da expressão proteica da NOX4/ β -actina em homogenatos de aorta de Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos. *p<0,05 entre SHR não prenhas *versus* SHR prenhas; †p<0,05 entre SHR não prenhas *versus* os demais grupos, ANOVA.

68

Figura 13 - Autorradiografias típicas das bandas e quantificação da expressão proteica enzima SOD-1(superóxido dismutase)/ β -actina em homogenatos de aorta de Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). Os dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos, ANOVA.

69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 HIPÓTESE	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais	37
4.2 Drogas, sondas e anticorpos	37
4.3 Medida direta da pressão arterial	39
4.4 Ensaio bioquímico	40
4.5 Reatividade vascular	41
4.6 Citometria de fluxo	42
4.7 Western blotting	44
4.8 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	48
5.1 Redução dos valores de PAM, PAS, PAD e aumento dos valores de FC são observadas em ratas Wistar e SHR prenhas	49
5.2 Menor efeito hipotensor à Apocinina, mas não ao Tempol, é observado em SHR prenhas	50
5.3 Maior estresse oxidativo sistêmico e menor estresse oxidativo vascular são observados em ratas prenhas	52
5.4 A hiporreatividade de aortas à PE é observada ao final da prenhez de ratas normotensas e hipertensas	53
5.5 A Apocinina não reduz a reatividade vascular em aortas de SHR prenhas	56
5.6 O Tempol não altera a reatividade vascular de aorta de ratas Wistar e SHR prenhas e não prenhas	58
5.7 A prenhez aumenta a concentração intracelular de NO ([NO]) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratas Wistar e SHR. A [NO] em CEA de ratas prenhas é aumentada pela Apocinina, mas não pelo	

Tempol	60
5.8 A prenhez reduz a concentração de espécies reativas de oxigênio ([ERO]) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratas Wistar e SHR. A [ERO] em CEA de ratas prenhas é reduzida pela Apocinina, mas não pelo Tempol	62
5.9 A prenhez não altera a concentração de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]$) em células em células endoteliais de aorta (CEA) de ratas Wistar e SHR	64
5.10 A prenhez aumenta a expressão proteica da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) em homogenatos de aortas de ratas normotensas e hipertensas	66
5.11 A prenhez reduz a expressão proteica de NOX4 em homogenatos de aortas de SHR	67
5.12 A prenhez não altera a expressão proteica da SOD-1 em homogenatos de aortas de ratas Wistar e SHR	69
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação é necessário que ocorram adaptações hemodinâmicas que permitam que o feto se desenvolva adequadamente e que o sistema cardiovascular materno não sofra sobrecarga pelo aumento do volume sanguíneo circulante. Estas adaptações fisiológicas associadas à gestação têm sido observadas em mulheres e também em animais como, por exemplo, ratas. Ao final da prenhez em ratas há aumento de aproximadamente 60 % no volume sanguíneo e em torno de 40% no débito cardíaco (BARRON *et al.*, 1984). Associado a estes aumentos, na circulação útero-placentária, há aumento do fluxo sanguíneo uterino (LYALL *et al.*, 1995; MOOR; BRUCE, 1976) e redução da resistência vascular das artérias uterinas.

Em estudo realizado em nosso laboratório (ELIAS *et al.*, 2008) observamos que entre o 18º ao 20º dia de prenhez ocorrem os maiores índices de redução da pressão arterial sistólica (PAS, uma diferença de aproximadamente 40 mmHg) em ratas espontaneamente hipertensas (SHR), sendo que no 14º dia após o nascimento dos filhotes, os valores de PAS acima de 150 mmHg são reestabelecidos.

A diminuição dos valores de PAS é observada tanto em ratas hipertensas quanto em ratas normotensas prenhas, quando comparadas às ratas não prenhas (BALLEJO *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2007; STENNETT *et al.*, 2009, OGNIBENE *et al.*, 2012, ZANCHETA *et al.*, 2015), e são acompanhadas de respostas pressoras diminuídas à administração de fenilefrina, noradrenalina, vasopressina e angiotensina II (PALLER 1984; UMANS *et al.*, 1990; MOLNÁR; HERTELENDY, 1992; NATHAN *et al.*, 1995.), bem como de hiporreatividade à fenilefrina, endotelina, noradrenalina e vasopressina em vasos de resistência (artéria mesentérica) e condutância (aorta) (MASSICOTTE *et al.*, 1987; ALOAMAKA *et al.*, 1993a, 1993b; CHU; BEILIN *et al.*, 1993a, 1993b; RALEVIC; BURNSTOCK, 1996; COELHO *et al.*, 1997; BALLEJO *et al.*, 2002).

Interessantemente, foi mostrado por estudos funcionais que, quando o endotélio é removido, a hiporreatividade a agentes vasoconstritores é revertida e as curvas concentração-resposta para fenilefrina se igualam entre aortas de ratas prenhas e não prenhas (ALOAMAKA *et al.*, 1993a).

Dentre os fatores vasodilatadores liberados pelo endotélio, destacam-se a prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO). A PGI₂ é um vasodilatador que pertence à família de prostaglandinas, sintetizada a partir da via do ácido araquidônico que ativa enzimaticamente a ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), sendo que a COX-1 libera PGI₂. Havia sido suposto que uma maior liberação de PGI₂ pelo endotélio de ratas prenhas seria responsável pela hiporreatividade vascular a diferentes agentes vasoconstritores. No entanto, o uso de meclofenamato, inibidor da COX, não alterou a diminuída resposta contrátil à fenilefrina em aortas torácicas e em leitos mesentéricos de ratas prenhas (HARRISON; MOORE, 1989; DAVIDGE; MCLAIGHLIN, 1992). Ainda, quando a indometacina (inibidor não seletivo da COX-1 e COX-2) foi utilizada nos estudos de reatividade, a hiporreatividade à fenilefrina em anéis intactos de aorta de ratas prenhas foi mantida (ALOAMAKA *et al.*, 1993a). Nos estudos de Chu e Beilin (1993a), o pré-tratamento do leito mesentérico perfundido *in situ* com indometacina, aumentou a reatividade vascular à noradrenalina, mas, não alterou as diferenças previamente observadas entre ratas prenhas e não prenhas. Estes resultados demonstram que o vasodilator PGI₂ não seria responsável pela hiporreatividade a agentes vasoconstritores observada em vasos de ratas prenhas.

O NO é um fator relaxante derivado do endotélio que participa continuamente da regulação do tônus vascular e da manutenção do fluxo sanguíneo (UMANS; LEVI, 1995). A síntese de NO depende da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que oxida um dos nitrogênios guanidino da L-arginina e forma L-citrulina e NO (PALMER *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1988). Existem quatro isoformas da NOS, a isoforma estimulada por citocinas, NOS induzível (iNOS/NOS-2) e outras três isoformas que são constitutivas e dependentes da presença de cálcio para sua ativação: NOS neuronal (nNOS/NOS1), NOS endotelial (eNOS/NOS3) e NOS mitocondrial (mtNOS/NOS4) (MONCADA *et al.*, 1991; FÖRSTERMANN *et al.*, 1998, BROOKES, 2004).

Nas células endoteliais de vasos sanguíneos, a eNOS é a isoforma mais expressa (KNOWLES; MONCADA, 1994) e é ativada por estímulos fisiológicos ou farmacológicos (como a acetilcolina e o ionóforo de cálcio) que aumentam a concentração intracelular de cálcio. O cálcio se liga a calmodulina, ativando a eNOS na presença de cofatores essenciais para a síntese de NO. Depois do NO ser

sintetizado pelas células endoteliais, este se difunde para a célula do músculo liso vascular (CMLV) devido a sua capacidade lipofílica (IGNARRO, 1991) e se liga a molécula de ferro da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) alterando a forma e ativando esta enzima. Depois de ativada, a GCs catalisa a guanosina trifosfato (GTP) à guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (GEWALTIG; KOJDA, 2002; MURAD, 1999; NAPOLI; IGNARRO, 2003). O GMPc promove o relaxamento da musculatura lisa vascular por reduzir a liberação e aumentar o sequestro de cálcio pelo retículo endoplasmático (BREDET, 1999; KHAZAEI *et al.*, 2008). A molécula de NO pode também ativar diretamente canais de potássio das CMLV, promovendo a hiperpolarização da musculatura lisa e conseqüentemente induzindo o vasorrelaxamento (BOLOTINA *et al.*, 1994). Ainda, a enzima eNOS pode ser ativada por uma via alternativa e menos dependente de cálcio, estimulada pelo estresse de cisalhamento (ou *shear stress*), através da atividade da via fosfatidil-3-inositol-proteína quinase Akt (PI3-K/Akt) e conseqüente fosforilação da eNOS no resíduo de Serina 1177 (AYAJIKI *et al.*, 1996; CORSON *et al.*, 1996; FLEMING *et al.*, 1998).

Morris *et al.* (1996) demonstraram que tanto a remoção mecânica do endotélio vascular, como a administração de inibidores não-seletivos da NOS, aumentaram a reatividade de aortas a agonistas vasoconstritores. Khalil *et al.* (1998) observaram que ratas prenhas tratadas com L-NAME (inibidor inespecífico da NOS), apresentaram aumento nos valores de pressão sanguínea em relação a ratas prenhas não tratadas e ainda, que o efeito máximo de anéis de aorta de ratas prenhas tratadas com L-NAME à fenilefrina foi maior em comparação com os anéis de ratas prenhas não tratadas. Além disso, Ballejo *et al.* (2002) demonstraram que a administração de concentrações crescentes de L-Nitro-L-arginina (L-NNA, inibidor mais seletivo para eNOS) na cuba de banho de órgãos isolados, induziu aumento da contração de anéis de aorta pré-estimulados com a concentração efetiva 20 (EC₂₀) de fenilefrina, e que estas respostas estavam reduzidas em aorta de ratas prenhas se comparadas as aortas de ratas não prenhas, sugerindo um possível aumento na atividade da eNOS nas aortas de ratas prenhas. No entanto, nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio estimuladas por acetilcolina ou pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas de ratas prenhas não estavam alteradas quando comparadas às aortas de ratas não

preenhas. A partir destes resultados, foi sugerido que a via clássica de ativação da enzima eNOS, não estaria envolvida na modulação endotelial associada a hiporreatividade vascular à fenilefrina em ratas preenhas.

Nosso laboratório avaliou a participação da via PI3K/Akt/eNOS na modulação da reatividade de aortas de ratas preenhas à fenilefrina. Recentemente, demonstramos (ZANCHETA *et al.*, 2015) que a expressão das proteínas fosforiladas PI3K, Akt e eNOS^{Ser1177} está aumentada em homogenatos de aortas de ratas preenhas normotensas ou hipertensas quando comparadas com aortas de ratas não preenhas e que a concentração de NO está aumentada em células endoteliais de aortas de ratas preenhas. Observamos também que o Wortmannin (10 nmol/L), usado como droga inibidora da via PI3K/Akt reverteu a hiporreatividade a fenilefrina em aortas de ratas normotensas e hipertensas. Juntos, os resultados nos levaram a concluir que a via PI3K/Akt/eNOS está ativada em aortas de ratas preenhas e participa da modulação da reatividade à fenilefrina observada ao final da prenhez de ratas normotensas e hipertensas.

Estes resultados sugerem que a prenhez é uma condição fisiológica favorável à redução da pressão arterial em fêmeas SHR, uma vez que o aumento da produção e/ou maior biodisponibilidade de NO contribuem para menor reatividade vascular à estimulação α -adrenérgica e conseqüentemente para menor resistência vascular periférica durante este período. Ainda, que o aumento da fosforilação da eNOS pode estar relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo observado nesse período, que por sua vez ocasiona maior tensão de cisalhamento.

No entanto, em ratos espontaneamente hipertensos, a disfunção endotelial, associada à redução da atividade da eNOS (HONG *et al.*, 2001; LI; SHAH, 2002), menor disponibilidade do substrato L-arginina (VANHOUTTE, 2002) ou do cofator BH4 (CONSENTINO; LÜSCHER, 1999; HONG *et al.*, 2001), também tem sido associada a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CAI; HARRISON, 2000; DRÖGE, 2002; DUSTING *et al.*, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2006; TANIYAMA; GRIENGLING, 2003). As ERO possuem efeitos deletérios sobre a função endotelial e vascular, pois levam a uma diminuição da biodisponibilidade de NO e ao comprometimento do relaxamento das CMLV (CAI; HARRISON, 2000;

ELLIS; TRIGGLE, 2003; FORTUÑO *et al.*, 2005; HAMILTON *et al.*, 2001; TAWFIK *et al.*, 2008; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004; WOLIN, 2000).

Nas células do sistema cardiovascular, a NAD(P)H oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase) é o complexo enzimático (BABIOR, 2004) considerado como principal fonte de ERO (GEISZT, 2006). Foi caracterizado inicialmente em células de origem mesodérmica, como os fagócitos, sendo capaz de reduzir a molécula de oxigênio (O_2) em ânion superóxido (O_2^-) (BABIOR, 1999; BEDARD; KRAUSE, 2007). Este complexo contém componentes essenciais que incluem subunidades moduladoras, como a p22phox, que constituem o sítio catalítico da enzima, proteínas citoplasmáticas, consideradas subunidades organizadoras, p47phox e p40phox, que quando recebem estímulos fisiológicos ou não fisiológicos são fosforiladas levando a translocação e agregação das subunidades citosólicas a membrana, e duas subunidades ativadoras que ligam a proteína G regulatória (Rac2), p67phox e seu homólogo NoxA1 (BABIOR, 1999, 2004; DRUMMOND *et al.*, 2011). Em células não fagocíticas, o complexo NAD(P)H oxidase é constituído de diversas subunidades como NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 (CAVE *et al.*, 2006; GEISZT, 2006; LI; SHAH, 2002), sendo as subunidades NOX1, 2 e 4 expressas no endotélio e as subunidades NOX1 e 4 expressas nas CMLV (QUINN *et al.*, 2006; BEDARD; KRAUSE, 2007; SELEMIDIS *et al.*, 2008).

Além de ser um dos fatores responsáveis pela disfunção endotelial, por seus efeitos diretos sobre a membrana das células (FRIDOVICH, 1986), o O_2^- pode interferir em vários passos da cascata de eventos que leva ao relaxamento do músculo liso vascular mediado pelo NO (HAMILTON *et al.*, 2001). Quando o O_2^- reage com o NO, forma-se o peroxinitrito ($ONOO^-$) que é um potente oxidante altamente tóxico (SARAN *et al.*, 1990; SALVEMINI *et al.*, 1998). Além disso, o $ONOO^-$ é responsável pelo desacoplamento da eNOS, que também leva ao aumento na produção de O_2^- (RABELINK; LÜSCHER, 2006).

A partir da associação entre a atividade da NAD(P)H oxidase e as doenças cardiovasculares, algumas drogas inibidoras desse complexo enzimático, seletivas ou não (ALTENHÖFER *et al.*, 2014), tem sido estudadas, como por exemplo, a Apocinina. Foi sugerido que em células fagocíticas, a Apocinina é metabolizada pela

enzima mieloperoxidase em seu dímero ativo, a diapocinina (JOHNSON *et al.*, 2002), que inibe a fosforilação e a translocação de componentes citosólicos do complexo NAD(P)H oxidase para a membrana, inibindo assim sua atividade (STOLK *et al.*, 1994; XIMENES *et al.*, 2007). No entanto, em células endoteliais, a Apocinina também inibe de forma concentração-dependente a atividade da NAD(P)H oxidase, a formação de ERO e a proliferação celular (JOHNSON *et al.*, 2002). Estudos demonstram que o tratamento com Apocinina aumentou a biodisponibilidade de NO e causou a vasodilatação de artérias mamárias e veias safenas em humanos (HAMILTON *et al.*, 2002) e reduziu a pressão arterial e a produção de O_2^- em SHR machos (BAÜMER *et al.*, 2007), podendo assim, ser uma atraente ferramenta farmacológica a ser utilizada como anti-hipertensivo (WILLIAMS *et al.*, 2007).

Em condições fisiológicas, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante capaz de equilibrar os níveis de ERO. Em condições patológicas como a hipertensão, ocorre uma redução da capacidade antioxidante. Entre as enzimas que participam do sistema antioxidante, destacam-se principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e os antioxidantes não enzimáticos que incluem: glutathione reduzida, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, vitamina C e vitamina E (RAMESH *et al.*, 2012). Os antioxidantes são substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas aos substratos oxidáveis, neutralizam a oxidação desses substratos de maneira efetiva, impedindo a sua formação e interrompendo a cadeia de reações (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena contra ERO, impedindo sua formação ou sequestrando-as, para que estas não possam interagir com alvos celulares (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). Através das ações das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades de O_2^- , evitando assim a formação de outras ERO que podem comprometer a viabilidade das células e causar danos irreversíveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

A SOD é uma família de enzimas encontradas em diferentes compartimentos das células, que requerem diferentes íons metálicos como grupamentos prostéticos. A SOD-1 (Cu-Zn-SOD) está presente no citoplasma e no espaço intermembranas das mitocôndrias. A SOD-2 (Mn-SOD) requer manganês e exerce sua ação catalítica

na matriz mitocondrial. Já a SOD-3, também requer cobre e zinco como SOD-1, mas atua no espaço extracelular. A SOD possui um importante papel em proteger o NO produzido pelo endotélio vascular, uma vez que dismutando o O_2^- em H_2O_2 e O_2 , impede que o NO reaja com o O_2^- , reduzindo a formação do $ONOO^-$, uma espécie reativa de oxigênio (OMAR *et al.*, 1991; MÜGGE *et al.*, 1991; MIAN; MARTIN, 1995) e participando assim, da defesa antioxidante (SERRA *et al.*, 2003). O Tempol é um composto estável, de baixo peso molecular, que reage com o O_2^- protegendo as células dos danos causados pelas ERO, sendo por isso considerado um mimético da SOD (MITCHELL *et al.*, 1990).

A partir destas informações, consideramos importante avaliar se possíveis alterações na produção de ERO, assim como, em mecanismos antioxidantes, poderiam ser associadas a maior biodisponibilidade de óxido nítrico e modulação endotelial da contratilidade vascular em ratas hipertensas prenhas.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Considerando que:

- a hiporreatividade de aortas de SHR prenhas à fenilefrina está associada a uma maior biodisponibilidade de NO produzido via PI3K/Akt/eNOS^{Ser1177};
- um aumento da produção ERO é observado em vasos de SHR não prenhas;
- as ERO podem reduzir a biodisponibilidade de NO;

Formulamos a hipótese que em vasos de SHR prenhas, haveria menor produção de ERO e/ou maior atividade antioxidante enzimática. Propomos que a menor disponibilidade de ERO, contribuiria para maior biodisponibilidade de NO em aortas de SHR penhas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) na hiporreatividade de aortas à fenilefrina (PE) observada no final da prenhez de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e comparar esses resultados com ratas normotensas Wistar.

3.2 Objetivos específicos

a) Verificar se a prenhez altera os parâmetros cardiovasculares, como pressão arterial média, frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica em SHR.

b) Verificar se a prenhez altera os efeitos hipotensores da Apocinina (um inibidor não seletivo da NAD(P)H oxidase) e do Tempol (mimético da SOD) em SHR.

c) Verificar se a prenhez altera o nível sistêmico e vascular de peroxidação lipídica, indicativo de estresse oxidativo, em SHR.

d) Verificar se as ERO participam da modulação da prenhez na hiporreatividade de aortas de SHR à PE.

e) Verificar se a prenhez altera as concentrações basais de NO, ERO e Ca^{2+} em células endoteliais de aortas de SHR e avaliar o efeito da Apocinina e do Tempol sobre estas concentrações nestas células.

f) Verificar se a prenhez altera a expressão proteica total da eNOS, NOX4, SOD-1 em homogenatos de aortas de SHR.

MATERIAS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, CEUA-FOA/UNESP (protocolo nº 00658-2013).

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR, aproximadamente 180-190 g) e ratas Wistar (aproximadamente 220-230 g), como controle normotenso, com idade de 12 semanas. As SHR foram provenientes de uma linhagem mantida pelo biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP e as ratas Wistar foram fornecidas pelo biotério central da mesma faculdade. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 – 24 °C) com ciclo de luz (12 h/luz e 12 h/escuro). A técnica indireta de verificação da pressão arterial (pletismografia de cauda) foi realizada para verificação da pressão arterial sistólica (PAS) utilizando-se um pletismógrafo para medidas em ratos (PowerLab, ADInstruments, Malbourne, Austrália). As ratas foram consideradas hipertensas quando o valor de PAS foi maior ou igual a 150 mmHg. Ambas as linhagens foram divididas em dois grupos: ratas não prenhas (NP) e ratas prenhas (P). As ratas não prenhas foram utilizadas na fase estro do ciclo estral e as ratas prenhas, no período final da prenhez (entre o 18º ao 20º dia). Para acasalamento, foram colocados na mesma caixa, um rato para três ratas das respectivas linhagens. O dia zero de prenhez foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal matinal. Somente foram utilizadas ratas prenhas com mais de três filhotes, pois de acordo com Ahokas e Sibai (1990) a hipotensão é observada durante a prenhez em ratas com mais de três filhotes.

4.2 Drogas, sondas e anticorpos

Foram utilizadas diferentes drogas nos experimentos, as quais foram descritas abaixo:

- 4-hidróxi-3-metóxiacetofenona 98% - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Apocinina;
- 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Tempol;
- Cloridrato de L- Fenilefrina - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Fenilefrina (PE);
- Clorato de Acetilcolina - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Acetilcolina (ACh);

Utilizamos as seguintes sondas:

- 4-(6-acetoximetóxi-2,7-dicloro-3-oxo-9-xantenil)-4'-metil-2,2'(etilenodióxi)-diani -lino-N,N,N',N'-ácido tetra-acético teraquis (acetóximetil) éster: (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA): FLUO 3-AM;
- 4,5- diaminofluoresceína (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA): DAF-2/DA;
- Dihidroetidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA): DHE;

Avaliamos a expressão proteica de algumas proteínas utilizando os seguintes anticorpos:

- anticorpo para eNOS (sc 654) - Santa Cruz (Aachen, NW, Alemanha);
- anticorpo para NOX4 (sc 30141) - Santa Cruz (Aachen, NW, Alemanha);
- anticorpo para SOD-1 (sc 11407) - Santa Cruz (Aachen, NW, Alemanha);
- anticorpo para β -actina (SAB A5441) - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Para os experimentos *in vivo*, medida direta da pressão arterial (PA), as drogas Apocinina e Tempol foram diluídas em solução fisiológica (0,9 % ou 0,15 mol/L NaCl). Para o estudo *in vitro*, reatividade vascular, as drogas foram diluídas em solução de Krebs, para os experimentos de citometria de fluxo, as drogas foram diluídas em solução de Hanks. Todas as soluções de drogas foram acondicionadas

em frascos e protegidas da luz. Após a diluição, as soluções das drogas foram divididas em alíquotas e congeladas a -20 °C até a utilização.

4.3 Medida direta de pressão arterial

a) Cirurgia para implantação das cânulas

As ratas foram anestesiadas com quetamina (45 mg/kg) associada a xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Durante a anestesia, uma cânula de polietileno (PE₁₀ conectado a PE₅₀) preenchida com salina heparinizada (10:1 v/v) foi implantada no interior da aorta abdominal, através da artéria femoral, para o registro da pressão arterial e outra na veia femoral, para administração de drogas ou veículo. Estas cânulas foram passadas por baixo da pele e exteriorizadas na região do dorso do animal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo ração padrão e água *ad libitum* por um período de até 24 horas, no máximo, antes de realizarmos os experimentos.

b) Registro da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

No dia do experimento, a PAM, PAS, PAD e a FC foram continuamente registradas nas ratas não anestesiadas utilizando um transdutor de pressão (ADInstruments, Melbourne, VIC, Austrália) ligado à cânula intra-arterial e um amplificador (ADInstruments, Melbourne, VIC, Austrália). A PAM, antes e após a administração das drogas, foi calculada utilizando-se o software PowerLab, Chart5 (ADInstruments, Melbourne, VIC, Austrália), no qual a variação da pressão arterial foi obtida.

c) Protocolo experimental

Após um período de 30 minutos para estabilização da pressão arterial, injeções *in bolus* de 30 mg/kg de Apocinina ou 30 mg/kg de Tempol foram realizadas e seus efeitos registrados por um período de 30 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM dos valores de PAM e FC obtidos. A partir dos resultados obtidos, a variação da PAM (Δ PAM) foi calculada pela diferença dos valores de PAM antes e após a administração das drogas.

4.4 Ensaio bioquímicos

a) Coleta e armazenagem do segmento aórtico

Para a realização da coleta, as ratas foram pré-anestesiadas em uma câmara saturada com halotano e logo após mortas por decapitação. Segmentos de aorta torácica das ratas (15 mm) foram isolados, dissecados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, acondicionados em microtubos de polietileno e armazenados em freezer -80 °C até o momento do ensaio.

b) Preparo do homogenato de aorta

No momento das determinações, as aortas foram maceradas com nitrogênio líquido, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (30 mmol/L) com KCl (120 mmol/L), pH 7,4, com auxílio de um sonicador (VibraCellSonics, Newtown, CT, EUA), por 3 vezes de 3 segundos. O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm, 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado para as determinações das proteínas e da peroxidação lipídica (TBARS).

c) Preparo do hemolisado

Após sedação e decapitação das ratas, o sangue foi coletado, transferido para tubos heparinizados e centrifugado a 1,000 x g por 15 min, na temperatura de 4°C. O plasma foi separado e armazenado em freezer -80 °C. As hemácias foram

lavadas 3 vezes com solução fisiológica (1:1 v/v) e posteriormente misturadas com solução contendo 4 mmol/L de MgSO₄ e 1 mmol/L de ácido acético (1:10 hemácias/solução, m/v). O hemolisado permaneceu armazenado em freezer (-80°C) até o momento das quantificações de proteínas (método de Lowry) e peroxidação lipídica (TBARS).

d) Peroxidação lipídica (TBARS)

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi avaliada segundo o método de Buege e Aust (1978) que consiste em adicionar ácido tricloroacético 10 % (m/v) à amostra do hemolisado, para promover acidificação e precipitação das proteínas. Após centrifugação (1,000 x g, 3 min), o sobrenadante foi coletado e a ele adicionado ácido tiobarbitúrico 0,67 % (m/v). Após incubação por 15 minutos a 100 °C em banho-maria, a reação foi resfriada e a absorbância foi medida em 535 nm, utilizando espectrofotômetro Hitachi U-1100 (Tóquio, JHS, Japão). Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína, considerando o coeficiente de extinção molar apropriado ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

e) Proteínas totais

As proteínas nas amostras do homogenato de aorta e hemolisado e foram quantificadas através do método de Lowry *et al.* (1951) utilizando a albumina bovina 0,1 % (m/v) como padrão. As absorbâncias foram determinadas em 660 nm, em leitora de placa Power Wave 340-Biotek (Biotek, Vermont, NE, EUA) e os resultados expressos em mg/mL.

4.5 Reatividade vascular

As ratas foram pré-anestesiadas em uma câmara saturada com halotano e logo após mortas por decapitação. Em seguida, a aorta torácica foi removida, dissecada e cortada em anéis de 2 mm. Os anéis foram então posicionados entre

dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (DMT, ADInstruments, Melbourne, VIC, Austrália) para medir a tensão no vaso. Ficaram mantidos em uma cuba contendo solução de Krebs com a seguinte composição (mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5; CaCl₂ 1,6; com pH 7,4 e suprimento gasoso de 95% O₂ e 5% CO₂ a 37°C. Os anéis permaneceram em repouso por 30 minutos sob tensão basal (30 mN) constante para estabilização. Após a estabilização, os anéis foram estimulados com KCl. A integridade do endotélio foi qualitativamente verificada pelo grau de relaxamento (maior ou igual a 80% de relaxamento) causado por acetilcolina (ACh 1 µmol/L) após pré-contração com PE (100 nmol/L). Após estes procedimentos, os experimentos foram realizados conforme o protocolo descritos abaixo.

a) Comparação do efeito da Apocinina e do Tempol sobre a contração estimulada com PE em aortas, com endotélio de ratas prenhas e não prenhas

Anéis de aorta com endotélio foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de PE (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L). Outros anéis foram incubados por 30 minutos, com Apocinina (100 µmol/L) ou Tempol (0,1 nmol/L) e após o tempo de incubação, curvas concentração-efeito para PE foram realizadas, agora com a presença das drogas. As curvas para PE obtidas na ausência ou na presença de Apocinina e Tempol foram comparadas entre os anéis de aorta de ratas prenhas e não prenhas, normotensas e hipertensas.

4.6 Citometria de fluxo

a) Isolamento de células endoteliais de aorta de ratas

As aortas torácicas das ratas (segmentos de 15 mm) foram isoladas, dissecadas, cortadas longitudinalmente e mantidas em solução de Hanks completa modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4).

A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana. A suspensão de células obtida foi centrifugada (1000 rpm por 5 minutos) em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* suspenso em solução de Hanks e posteriormente, 250 µL desta suspensão foram colocados em tubos de poliestireno. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em temperatura de 37° C até o momento do experimento.

No citômetro de fluxo, foi feita a leitura de 2500 eventos (células) de cada aorta utilizada. O número de experimentos realizados (n) se refere ao número de aortas utilizadas para cada grupo estudado. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (ATTUNE Acoustic Focusing Cytometer®, Applied Biosystem, Waltham, MT, EUA) utilizando sondas específicas para Ca²⁺ (FLUO 3-AM), NO (DAF-2/DA) e ERO (DHE) conforme os seguintes protocolos experimentais.

b) Quantificação da concentração citosólica de Óxido Nítrico ([NO])

Para quantificação de [NO], a suspensão de células endoteliais sem qualquer estímulo prévio, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente 4,5- diaminofluoreceína (DAF-2/DA – 10 µmol/L) e excitadas com laser azul, em 488 nm com emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada na ausência (basal) ou na presença de PE (100 nmol/L), Apocinina (100 µmol/L) ou Tempol (0,1 nmol/L). Os valores obtidos foram expressos pelo aumento da IF comparado com o basal.

c) Quantificação da concentração de Espécies Reativas de Oxigênio ([ERO])

Para quantificação de [ERO], a suspensão de células endoteliais sem qualquer estímulo prévio, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente Dihidroetidina (DHE 2,5 µmol/L), excitada com laser azul em 488 nm, com emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada em ausência (basal) ou presença de PE (100 nmol/L),

Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Tempol (0,1 nmol/L). Os valores foram expressos pelo aumento da IF comparado com o basal.

d) Quantificação da concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]$)

Para quantificação da concentração citosólica de cálcio nas células endoteliais ($[\text{Ca}^{2+}]$) de aortas das ratas, a suspensão de células, sem qualquer estímulo prévio, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente FLUO 3-AM (5 $\mu\text{mol/L}$), excitada com laser azul em 488 nm com emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada antes (basal) e após a estimulação com PE (100 nmol/L), Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Tempol (0,1 nmol/L). Os valores foram expressos pelo aumento da intensidade de fluorescência (IF) comparado com o basal.

A mediana da IF foi calculada em todas as amostras usando o software Attune Cytometric Software (Applied Biosystem, Waltham, MT, EUA) e posteriormente comparada entre os grupos.

4.7 Western blotting

a) Avaliação da expressão proteica de Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS), NOX4 e SOD-1 em aortas de ratas prenhas e não prenhas

Segmentos torácicos de aorta foram removidos das ratas, dissecados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C . Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados separadamente em tampão RIPA (Tris-base 65,2 mmol/L , NaCl 154 mmol/L , NP-40 1 %, deoxicolato de sódio 0,25 % e EDTA 0,8 mmol/L , suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) utilizando-se para isso um sonicador (Sonics Vibra Cell, Newtown, CT, EUA). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (4°C , 4000 rpm por 15 minutos)

para a separação do sobrenadante. A dosagem de proteína do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*,1951), utilizando albumina bovina como padrão. Cem microgramas (100 µg) de proteína total foram misturadas com tampão de Laemmli contendo mercaptoetanol e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (para anticorpo eNOS) ou 10% (para NOX4 e SOD-1) e depois transferidas para a membrana de nitrocelulose. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão tris-salina com Tween 20 (TBS-T), por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: eNOS (1:2500), NOX4 (1:1000) e SOD-1(1:1000). A incubação foi feita durante a noite, à 4°C. Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas por quinze minutos, 3 vezes, com tampão TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (1:10000), por uma hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) e expostas a um filme radiográfico para a detecção das bandas. A expressão de β -actina (1:8000) foi utilizada para normalização dos resultados. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o programa Scion (National Institutes of Health, Frederick, MD, EUA). Os resultados foram expressos em Unidades arbitrárias/ β -actina comparados entre os grupos.

4.8 Análise estatística

a) Medida direta da PA

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média) dos valores obtidos. A variação da PAM (Δ PAM) foi calculada através da diferença da PAM basal e da PAM após infusão da droga.

Os resultados foram comparados entre os grupos pelo teste estatístico de multivariância (Two-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

b) Concentração de TBARS

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism (3.0, GraphPad Software Corporation, La Jolla, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm EPM, analisados quanto à distribuição e posteriormente submetidos à análise de variância (Two-way ANOVA).

c) Reatividade vascular

Foram analisados os parâmetros farmacológicos de eficácia (Efeito Máximo, Emax) e potência (pD_2 : $-\log EC_{50}$). Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os gráficos foram feitos pelo programa GraphPad Prism. As determinações da EC_{50} (concentração que produz 50 % da resposta máxima) foi realizada utilizando-se o método de regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o mesmo programa. A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância (Two-way ANOVA) ou Test t de Student, sendo adotado nível de significância de 5 % ($p < 0,05$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

d) Citometria de fluxo

Foram analisados os traçados citofluorográficos (histograma) gerados pelo software Attune Cytometric após a leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os resultados foram apresentados como a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva para as sondas fluorescentes DAF-2/DA, FLUO 3-AM e DHE. Os resultados foram comparados entre os grupos, e foi utilizado o teste estatístico de multivariância (Two-way ANOVA) e pós-teste Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

e) Western blotting

Os valores de densitometria óptica das bandas foram obtidos pelo programa Scion. Os valores referentes as bandas das proteínas alvo foram normalizados pelos valores das bandas de β -actina. Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foram realizados 5 experimentos diferentes para cada grupo. Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos (Two-way ANOVA, pós-teste Tukey). Diferenças entre os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Redução dos valores de PAM, PAS e PAD e aumento dos valores de FC são observados em ratas Wistar e SHR prenhas

Como podemos observar na Figura 1A, a PAM de SHR prenhas ($112,8 \pm 2,1$ mmHg, $n=7$) está reduzida quando comparada com SHR não prenhas ($156,7 \pm 2,3$ mmHg, $n=7$), bem como ratas Wistar prenhas ($90,6 \pm 1,1$ mmHg, $n=7$) apresentam valores reduzidos de PAM quando comparados com ratas da mesma linhagem não prenhas ($105,0 \pm 2,5$ mmHg, $n=7$).

A FC de SHR prenhas ($410,0 \pm 4,3$ bpm, $n=7$) está aumentada em relação aos valores das SHR não prenhas ($387,1 \pm 3,0$ bpm, $n=7$). Ratas Wistar prenhas ($420,0 \pm 3,7$ bpm, $n=7$) apresentam também um aumento da FC quando comparadas com ratas Wistar não prenhas ($393,6 \pm 3,7$ bpm, $n=7$), como pode ser observado na figura abaixo (Figura 1B).

Ao verificarmos a PAS e a PAD de SHR prenhas (PAS: $125,9 \pm 3,6$ mmHg; PAD: $96,3 \pm 3,2$ mmHg, $n=7$) observamos que esses valores foram significativamente menores aos encontrados nas SHR não prenhas (PAS: $170,6 \pm 2,8$ mmHg; PAD: $135,7 \pm 3,2$ mmHg, $n=7$). Uma redução desses parâmetros também foi encontrada em ratas Wistar prenhas (PAS: $106,4 \pm 1,7$ mmHg; PAD: $79,8 \pm 1,8$ mmHg, $n=7$) quando comparados com ratas Wistar não prenhas (PAS: $120,4 \pm 2,6$ mmHg; PAD: $98,7 \pm 1,6$ mmHg, $n=7$) (Figura 1C e D).

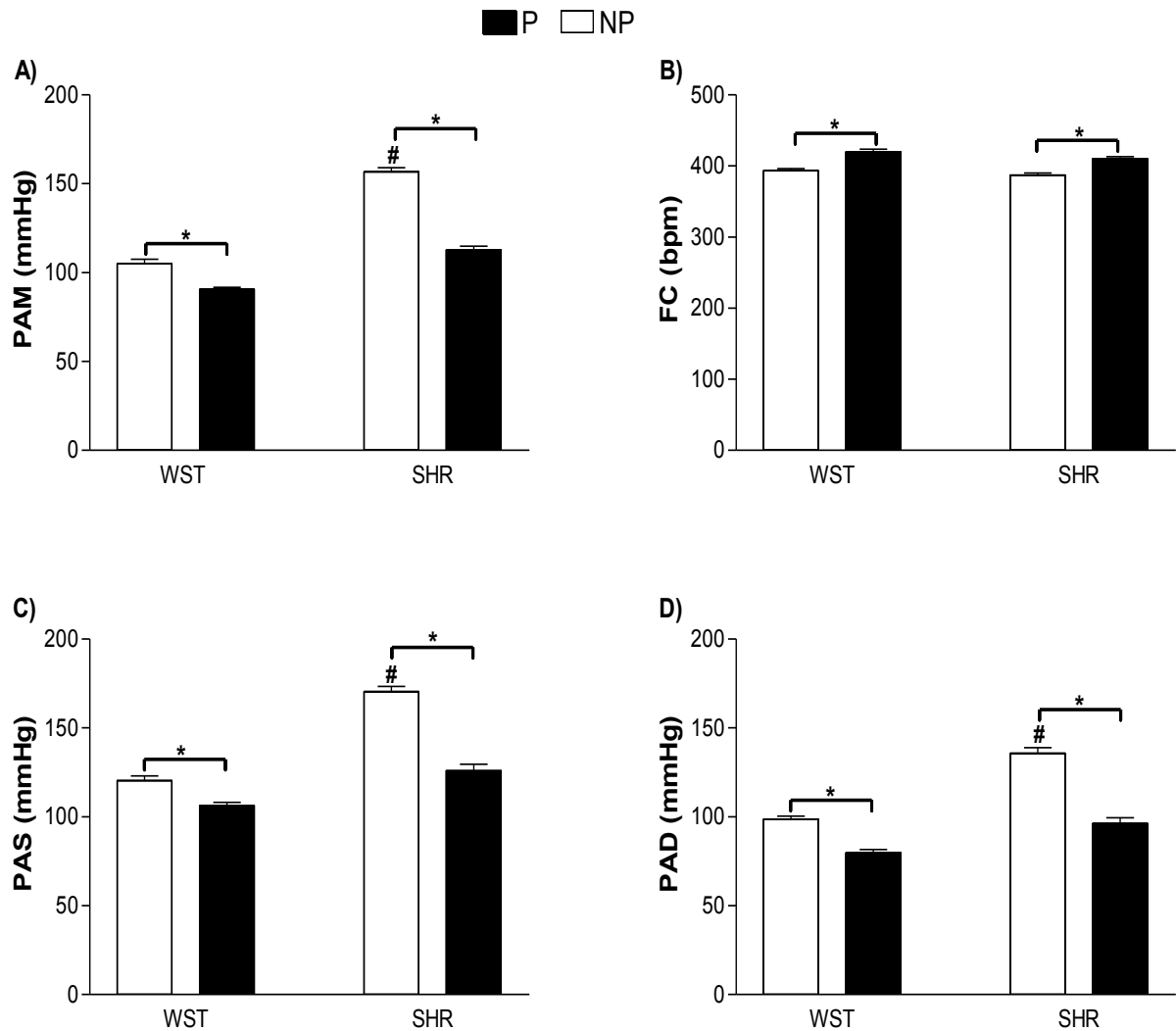


Figura 1 - A) Pressão Arterial Média (PAM), B) Frequência Cardíaca (FC), C) Pressão Arterial Sistólica (PAS) e D) Pressão Arterial Diastólica (PAD) de ratas Wistar e SHR não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). Os valores representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=7$) dos diferentes grupos. * $p<0,05$ ratas não prenhas *versus* ratas prenhas, Wistar ou SHR; # $p<0,05$ SHR não prenha *versus* demais grupos, ANOVA.

5.2 Menor efeito hipotensor à Apocinina, mas não ao Tempol, é observado em SHR prenhas

Após o registro por 30 minutos da PAM e da FC, foi realizada a administração intravenosa das drogas. Quando a Apocinina (30 mg/kg) foi administrada, um efeito hipotensor (Δ PAM - mmHg) foi observado em todos os grupos, mas com magnitude

inferior em SHR prenhas (Wistar NP: $-11,8 \pm 0,6$; Wistar P: $-12,45 \pm 0,7$; NP SHR: $-12,9 \pm 0,4$; SHR P: $-8,8 \pm 0,3$; $n = 5$, Δ PAM - mmHg, Figura 2A).

O Tempol (30 mg/kg) produziu um efeito hipotensor (Δ PAM - mmHg) de mesma magnitude em todos os grupos (Wistar NP: $-7,2 \pm 0,6$; Wistar P: $-8,5 \pm 0,8$; SHR NP: $-8,4 \pm 0,7$; SHR P: $-9,49 \pm 0,5$; $n = 5$, Δ PAM - mmHg, Figura 2B).

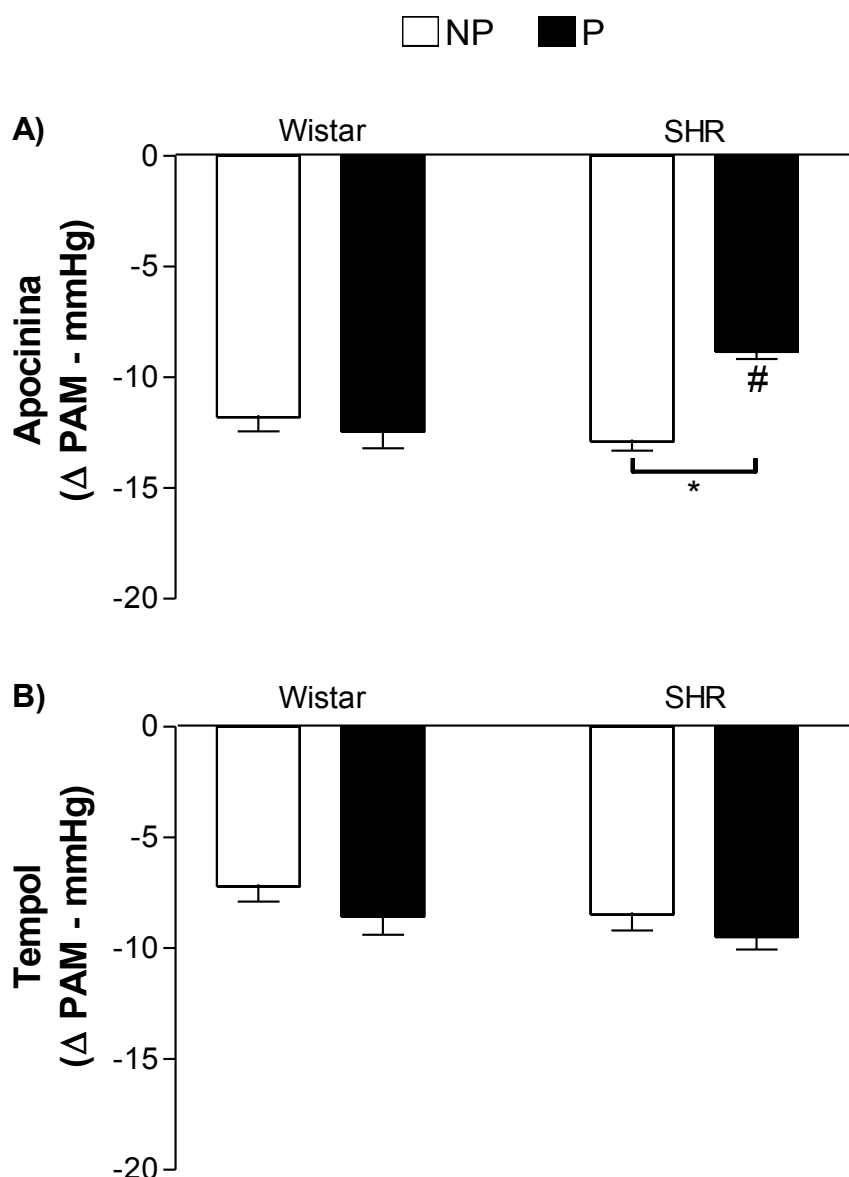


Figura 2 - Variação da Pressão Arterial Média (Δ PAM, em mmHg) em ratas Wistar e SHR não prenhas (NP, barras brancas) e prenhas (P, barras pretas) após a administração *in bolus* de A) Apocinina (30mg/kg) e B) Tempol 30mg/kg. As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n = 5$) dos diferentes grupos. * $p < 0,05$ SHR não prenha versus SHR prenha; # $p < 0,05$ SHR prenha versus demais grupos, ANOVA.

5.3 Maior estresse oxidativo sistêmico e menor estresse oxidativo vascular são observados em ratas prenhas

O estresse oxidativo sistêmico pode ser avaliado através da peroxidação lipídica ou dano oxidativo dos lipídios nos eritrócitos, pelo método que determina a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O estresse oxidativo determinado em eritrócitos de SHR não prenhas e prenhas foi maior que o determinado em eritrócitos de ratas Wistar não prenhas e prenhas. Um aumento de 24.13% foi observado no grupo de ratas Wistar prenhas (61.9 ± 2.7 nmol/mg proteína, n=5) quando comparado ao grupo de ratas Wistar não prenhas (47.0 ± 2.0 nmol/mg proteína, n=5). Um aumento de 11.55% foi observado entre os grupos SHR prenhas (79.3 ± 2.6 nmol/mg proteína, n=5) e SHR não prenhas (70.1 ± 2.2 nmol/mg proteína, n=5) (Figura 3).

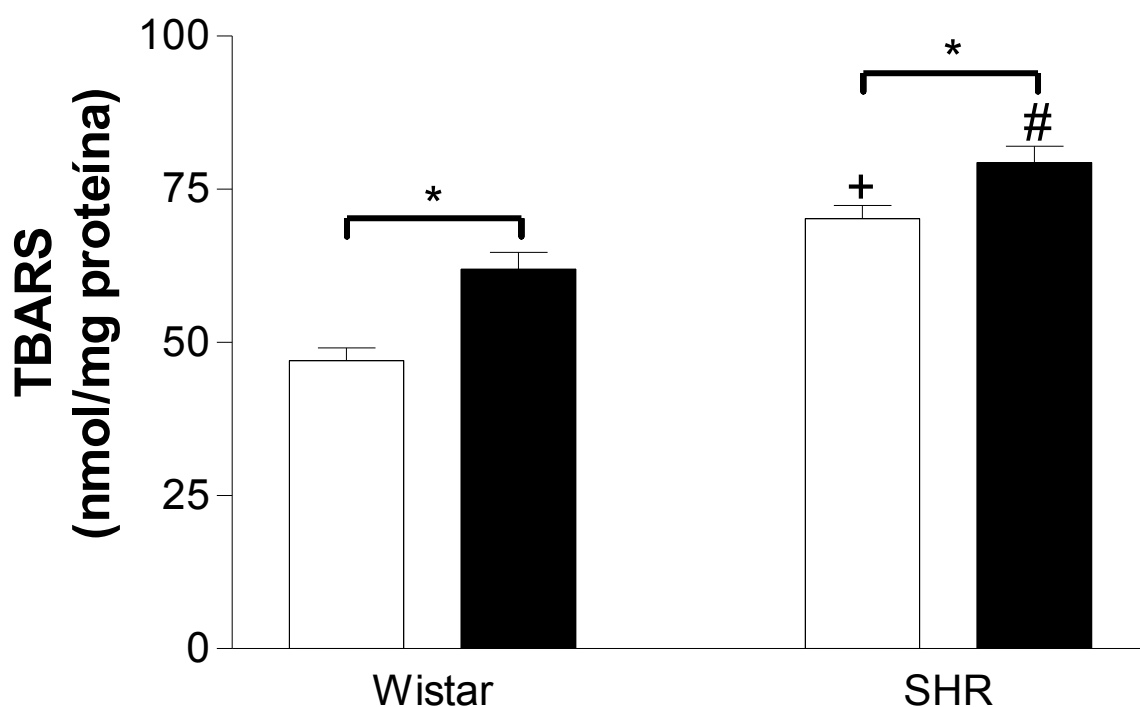


Figura 3 -Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, em nmol/mg proteína) em eritrócitos de ratas Wistar e SHR não prenhas (NP, barras brancas) e prenhas (P, barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em hemolisados (n=5) dos diferentes grupos. * $p < 0,05$ ratas não prenhas *versus* prenhas, Wistar ou SHR; * $p < 0,05$ SHR não prenhas *versus* ratas Wistar não prenhas; # $p < 0,05$ SHR prenhas *versus* ratas Wistar prenhas, ANOVA.

Quando a quantificação de peroxidação lipídica foi realizada em homogenatos de aortas, verificamos uma diminuição dos valores de TBARS nas ratas prenhas, tanto normotensas quanto hipertensas (Wistar 179.2 ± 9.5 nmol/mg proteína, n=7; SHR 180.5 ± 6.7 nmol/mg proteína, n=7) em relação as ratas não prenhas, normotensas e hipertensas (Wistar 256.1 ± 20.6 nmol/mg proteína, n=7; SHR 250.7 ± 14.0 nmol/mg proteína, n=7) (Figura 4).

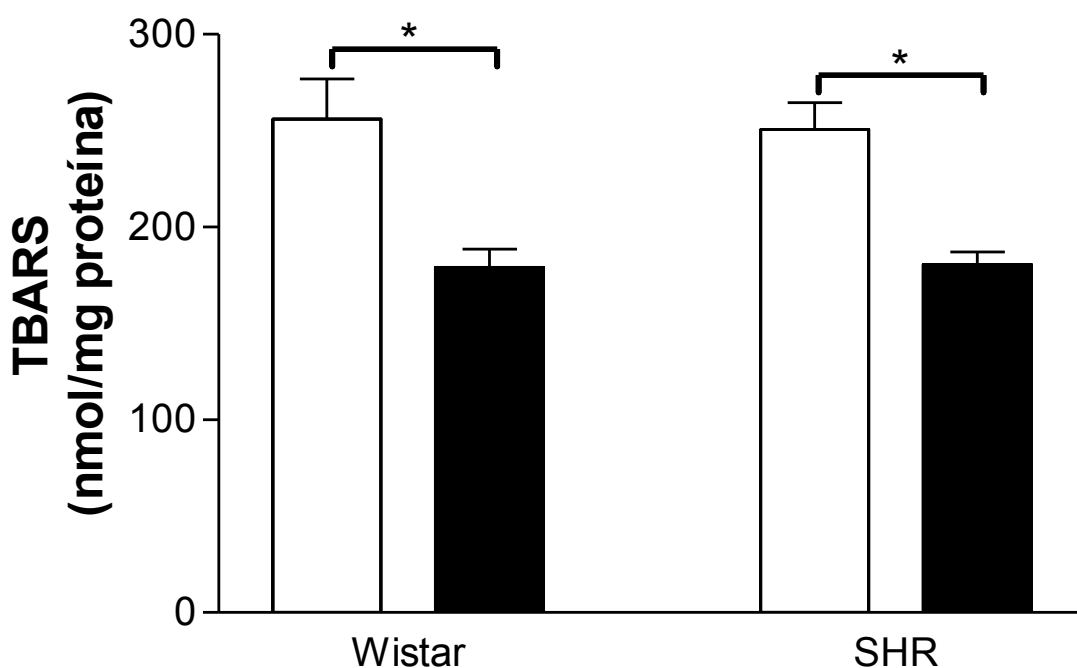


Figura 4 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, em nmol/mg proteína) em aortas de ratas Wistar e SHR não prenhas (NP, barras brancas) e prenhas (P, barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=7) dos diferentes grupos. *p<0.05 não prenhas *versus* prenhas, Wistar ou SHR, ANOVA.

5.4 A hiporreatividade de aortas à PE é observada ao final da prenhez de ratas normotensas e hipertensas

Avaliando as curvas contração-efeito à PE em aortas, observamos que o efeito contrátil máximo da droga (E_{max}) está diminuído em aortas de ratas Wistar prenhas (21.3 ± 1.8 , n=5) quando comparado a aortas de ratas Wistar não prenhas (29.5 ± 1.5 , n=5). O mesmo acontece com a potência (pD_2) da PE, que está

diminuída em aorta de ratas Wistar prenhas (6.9 ± 0.07 , $n=5$) quando comparado a aortas de ratas Wistar não prenhas (7.2 ± 0.08 , $n=5$) (Figura 5A).

Avaliando as curvas contração-efeito induzidas por PE em aortas de SHR, observamos que o E_{max} está diminuído em aortas de ratas prenhas (21.2 ± 2.7 , $n=5$) quando comparado a aortas de ratas não prenhas (30.8 ± 1.6 , $n=5$). Não observamos diferenças entre dos valores de potência da PE entre aorta de SHR prenhas ($pD_2: 7.2 \pm 0.12$, $n=5$) e aortas de SHR não prenhas ($pD_2: 7.3 \pm 0.04$, $n=5$) (Figura 5B).

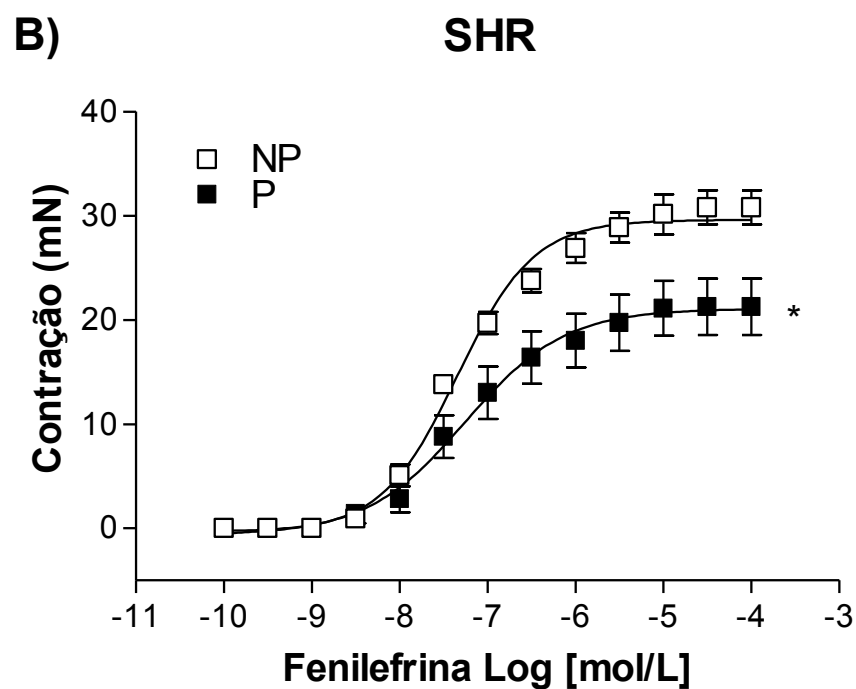
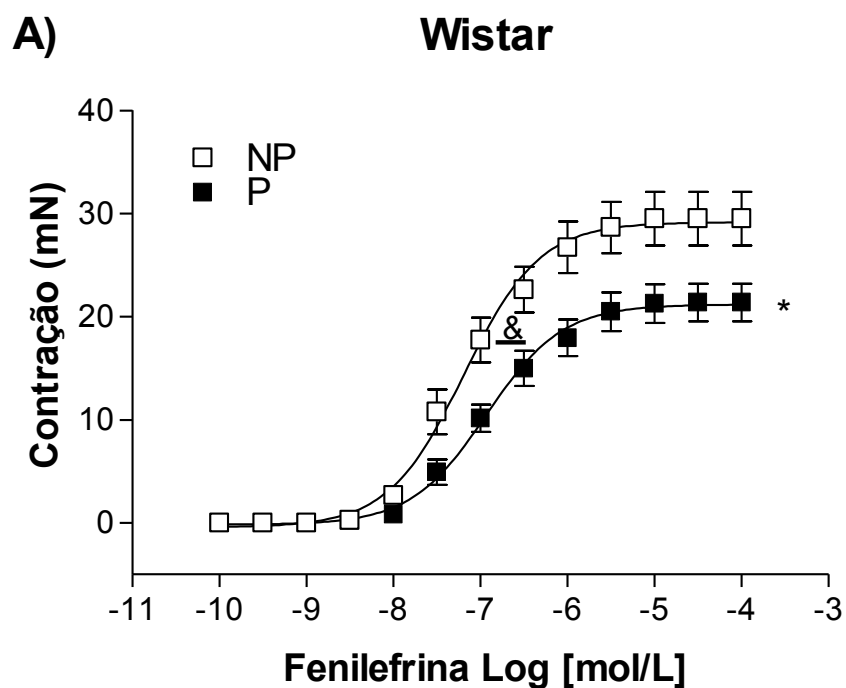


Figura 5 -Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas intactos de ratas não prenhas (NP, símbolos abertos) e prenhas (P, símbolos fechados) Wistar (A) e SHR (B). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. *p<0,05 valores de Emax em P *versus* NP, Wistar e SHR; &p<0.05 valores de pD2 em ratas Wistar P *versus* ratas Wistar NP, Teste t de Student.

5.5 A Apocinina não reduz a reatividade vascular em aorta de SHR prenhas

Avaliamos o efeito da Apocinina na contração de aorta induzida pela PE, comparando as curvas concentração-efeito à PE na presença e ausência de Apocinina. Quando os anéis de aorta foram pré-incubados com Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) houve uma diminuição do Emax das curvas tanto nos anéis de ratas Wistar prenhas (12.1 ± 2.1 , $n=5$) e como nos anéis de ratas Wistar não prenhas (19.05 ± 2.7 , $n=4$), quando comparado aos seus respectivos controles, mas a potência da PE não foi alterada pela presença de Apocinina (Figura 6A) em ambos os grupos.

A redução na reatividade de aorta à PE pela Apocinina, também foi observada em anéis de aortas de SHR não prenhas (21.1 ± 2.9 , $n=5$) em relação ao controle SHR não prenha (Emax: 30.8 ± 1.6 , $n=5$). Interessantemente, não houve alteração no Emax das curvas para PE de anéis de SHR prenhas incubados com Apocinina (Emax: 21.3 ± 2.8 , $n=5$) em relação a anéis de SHR prenhas na ausência de Apocinina (Emax: 21.2 ± 2.7 , $n=5$). A potência à PE não foi alterada entre os grupos (Figura 6B).

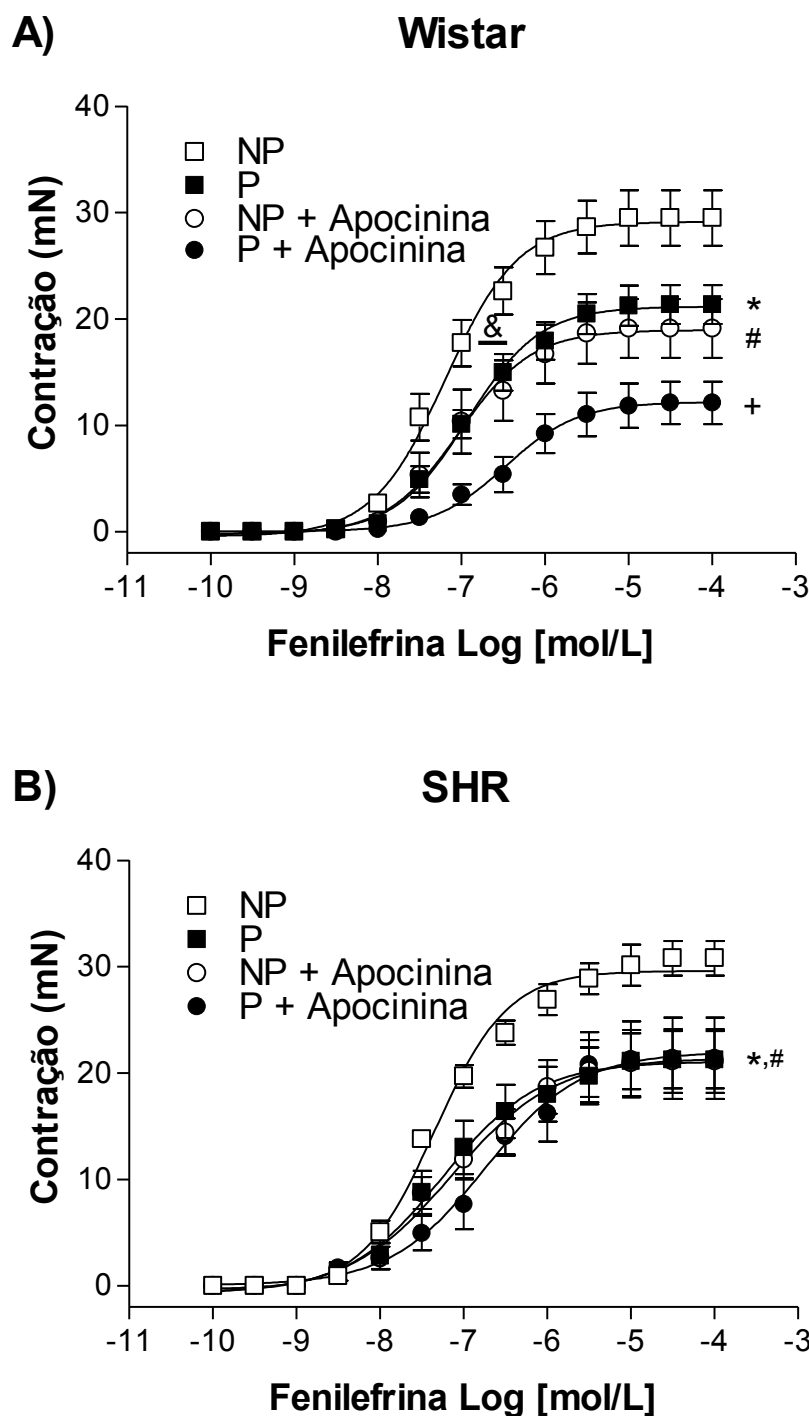


Figura 6 -Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas intactos de ratas não prenhas (NP, símbolos abertos) e prenhas (P, símbolos fechados) Wistar (A) e SHR (B) em ausência ou em presença de Apocinina (+ Apocinina, 100 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. * p <0,05 valores de E_{max} de ratas P *versus* ratas NP em ambos os grupos; # p <0,05 valores de E_{max} de NP + Apocinina *versus* NP em ambos os grupos; + p <0,05 valores de E_{max} em ratas Wistar P + Apocinina *versus* ratas Wistar P; & p <0,05 valores de pD_2 em ratas Wistar NP *versus* outros grupos, ANOVA.

5.6 O Tempol não altera a reatividade vascular de aortas de ratas Wistar e SHR prenhas e não prenhas

Avaliamos o efeito do Tempol sobre a contração de aortas de ratas prenhas e não prenhas à PE (Figura 7). Tanto em anéis de prenhas como não prenhas, Wistar (NP: $29,8 \pm 2,6$, n=5; P: $21,0 \pm 4,0$, n=5) e SHR (NP: $29,7 \pm 2,6$, n=5; P: $23,9 \pm 2,5$, n=5) o Emax induzido pela PE não foi alterado pelo Tempol.

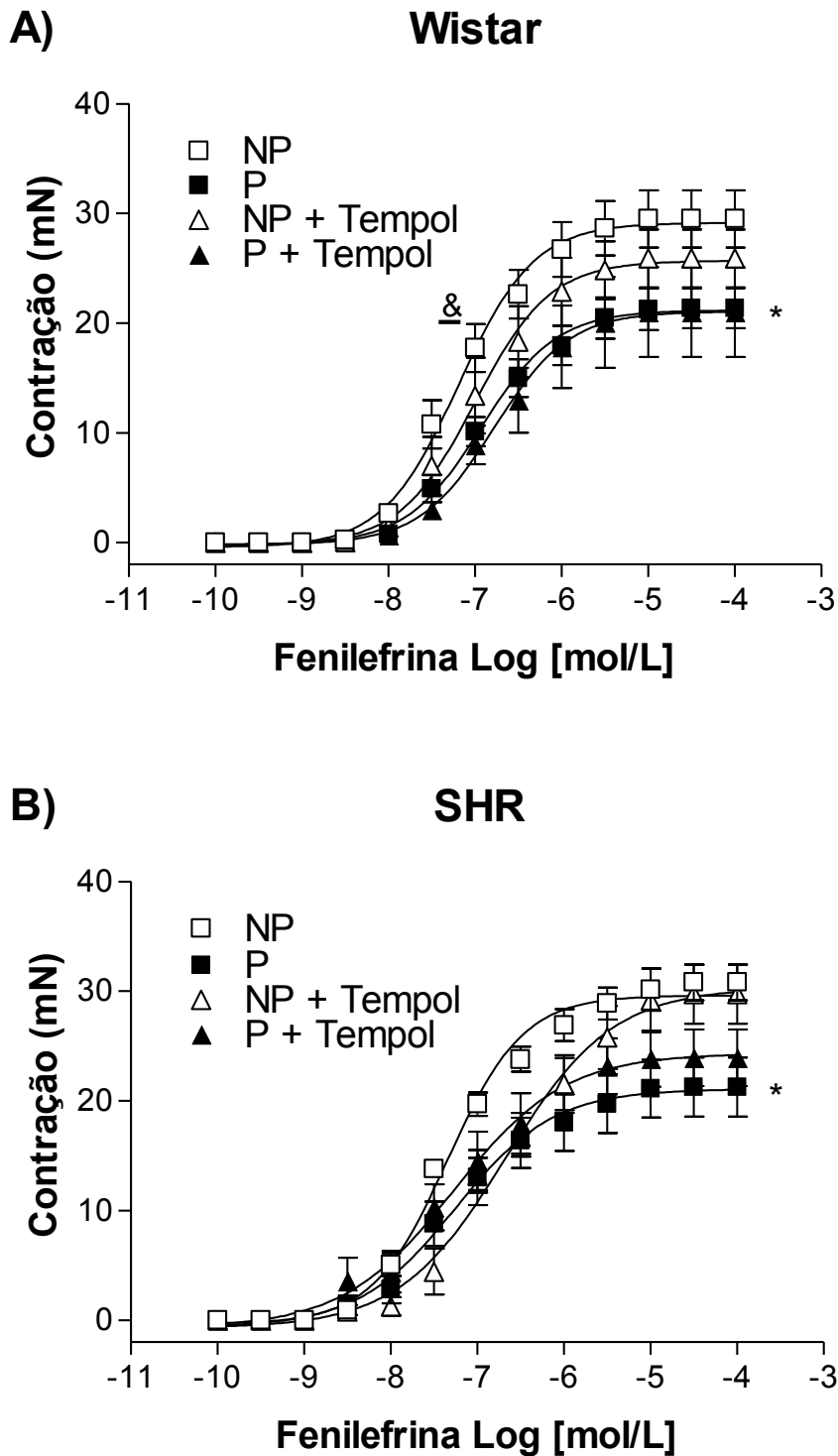


Figura 7 -Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aortas intactos de ratas não prenhas (NP, símbolos abertos) e prenhas (P, símbolos fechados) Wistar (A) e SHR (B) em ausência ou em presença de Tempol (+ Tempol, 0,1 nmol/L). Os valores representam a média \pm EPM dos valores obtidos nos diferentes experimentos realizados (n= 5) dos diferentes grupos. * $p < 0.05$ valores de E_{max} em ratas P *versus* ratas NP; & $p < 0,05$ valores de pD_2 em ratas Wistar NP *versus* P, ANOVA.

5.7 A prenhez aumenta a concentração intracelular de NO ([NO]) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratas Wistar e SHR. A [NO] em CEA de ratas prenhas é aumentada pela Apocinina, mas não pelo Tempol.

A [NO] foi quantificada pela intensidade de fluorescência, expressa por unidades arbitrárias (U), emitida pela sonda DAF 2-DA. As [NO] basais em CEA das ratas prenhas Wistar ($8749,2 \pm 98,1$ U) e SHR ($8328,0 \pm 157,3$ U) foram maiores do que nas CEA das ratas Wistar ($8068,3 \pm 118,1$ U) e SHR ($7028,4 \pm 293,0$ U) não prenhas (Figura 8A e B).

As CEA de ratas Wistar prenhas ($8650,6 \pm 119,1$ U) e não prenhas ($8249,3 \pm 183,1$ U) estimuladas com PE não apresentaram diferenças significativas na [NO] entre si e em relação a concentração basal (Figura 8A). Entretanto, CEA de SHR prenhas (Figura 8B) estimuladas com PE apresentaram maiores [NO] ($8589,8 \pm 196,2$ U) do que CEA de SHR não prenhas ($7809,5 \pm 192,6$ U), sendo que nestas, a [NO] estava aumentada em relação a concentração basal.

Quando incubamos com Apocinina ($100 \mu\text{mol/L}$), houve um aumento de [NO] em CEA de ratas Wistar não prenhas ($8519,5 \pm 135,1$ U), ratas Wistar prenhas ($9076,0 \pm 83,3$ U), SHR não prenhas ($8266,1 \pm 101,2$ U) e SHR prenhas ($8723,6 \pm 168,1$ U) em relação as respectivas concentrações basais (Figura 8A e B).

Quando incubamos as CEA com o Tempol ($0,1 \text{ nmol/L}$) não foi observada alteração na [NO] de ratas Wistar não prenhas ($8518,5 \pm 201,5$ U) e de ratas Wistar prenhas ($8707,0 \pm 130,8$ U) e SHR prenhas ($8582,0 \pm 202,6$ U), mas em CEA de SHR não prenha, o Tempol aumentou a [NO] (Figura 8A e B) em relação a concentração basal ($8127,0 \pm 213,4$ U).

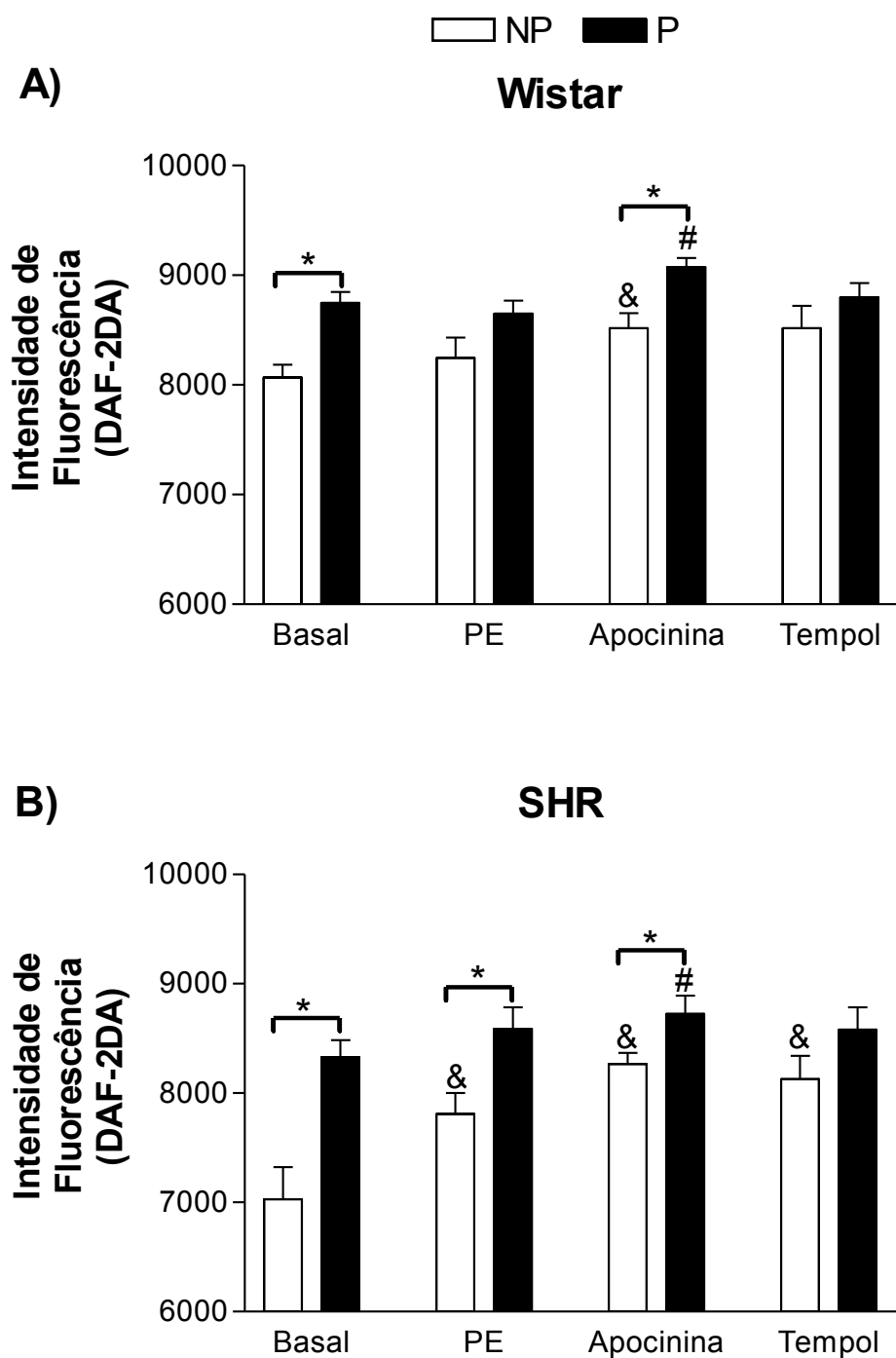


Figura 8 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2/DA (10 $\mu\text{mol/L}$) que quantifica a concentração de óxido nítrico (NO) em células endoteliais de aorta (CEA, $n=5-6$) de ratas Wistar (A) e SHR (B), não prenhas (barras brancas) e não prenhas (barras pretas) em condições basais e após incubação com PE (fenilefrina, 100 nmol/L), Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Tempol (0,1 nmol/L). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos CEA dos diferentes grupos. * $p < 0,05$ concentração nas CEA de ratas P *versus* NP, Wistar ou SHR; & $p < 0,05$ concentração nas CEA incubadas com PE, Apocinina ou Tempol *versus* concentração basal de ratas NP; # $p < 0,05$ concentração nas CEA estimuladas com Apocinina *versus* concentração basal de ratas P, ANOVA.

5.8 A prenhez reduz a concentração de espécies reativas de oxigênio ([ERO]) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratas Wistar e SHR. A [ERO] em CEA de ratas prenhas é reduzida pela Apocinina, mas não pelo Tempol

A [ERO] em CEA de ratas Wistar e SHR não prenhas e prenhas foi quantificada pela intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE. Os valores basais obtidos em CEA de SHR não prenha ($9295,4 \pm 112,3$ U) foram maiores do que de ratas Wistar não prenha ($8837,6 \pm 128,5$ U). Os valores obtidos em CEA de ratas não prenhas foram maiores do que os observados em CEA de ratas Wistar prenhas ($8012,4 \pm 78,3$ U) e SHR prenhas ($8642,0 \pm 104,7$ U) respectivamente (Figura 9A e B).

A intensidade de fluorescência da sonda DHE, após estimulação com PE, não foi alterada em CEA de ratas Wistar e SHR não prenhas (Wistar: $9021,3 \pm 143,3$ U; SHR: $8856,0 \pm 234,0$ U) e prenhas (Wistar: $7979,1 \pm 229,8$ U; SHR: $8612,7 \pm 100,8$ U) em relação aos valores de intensidade de fluorescência basais.

Quando as CEA foram incubadas com Apocinina ($100 \mu\text{mol/L}$), uma diminuição da intensidade de fluorescência foi observada em ratas não prenhas e prenhas, Wistar (NP: $8439,5 \pm 104,2$ U; P: $7718,1 \pm 104,0$ U) e SHR (NP: $8805,2 \pm 122,6$ U; P: $8061,2 \pm 59,8$ U), quando comparados com os valores de intensidade de fluorescência basais.

As CEA incubadas com Tempol ($0,1 \text{ nmol/L}$) de ratas Wistar apresentaram uma redução da intensidade de fluorescência ao DHE em relação ao basal apenas no grupo de ratas Wistar não prenhas ($8000,4 \pm 204,3$ U). No entanto em CEA de ratas Wistar prenhas (Wistar: $7706,4 \pm 147,0$ U), de SHR não prenhas ($8925,2 \pm 126,3$ U) e de SHR prenhas ($8554,4 \pm 227,4$ U) não houve alteração da intensidade de fluorescência em relação aos valores basais.

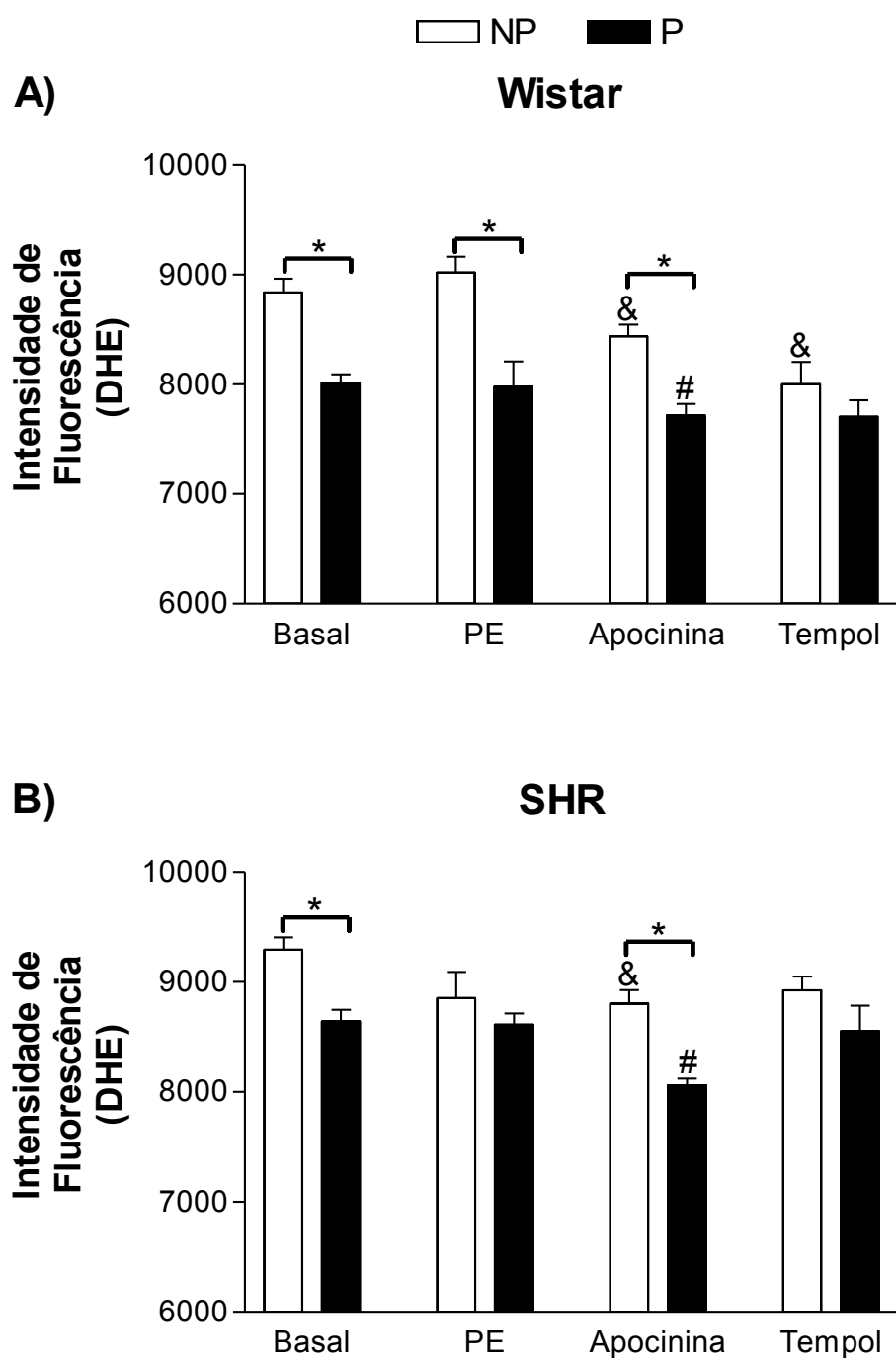


Figura 9 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DHE (2,5 $\mu\text{mol/L}$) que quantifica a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células endoteliais de aorta (CEA, $n=5-6$) de ratas Wistar (A) e SHR (B), não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas) em condições basais e após incubação com PE (fenilefrina, 100 nmol/L), Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Tempol (0,1 nmol/L). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em CEA dos diferentes grupos. * $p < 0,05$ concentração nas CEA de ratas P *versus* NP, Wistar ou SHR; & $p < 0,05$ concentração nas CEA de ratas NP incubadas com Apocinina ou Tempol *versus* basal; # $p < 0,05$ concentração nas CEA de ratas P incubadas com Apocinina *versus* basal, ANOVA.

5.9 A prenhez não altera a concentração de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratas Wistar e SHR

A intensidade de fluorescência (IF) basal ao FLUO 3-AM foi semelhante entre as CEA de ratas Wistar não prenhas ($8191,6 \pm 181,4$ U) e prenhas ($8497,8 \pm 163,7$ U). A pré-incubação das CEA de ratas Wistar não prenhas e prenhas com PE (NP: $8310,1 \pm 148,3$ U; P: $8432,6 \pm 175,3$ U), Apocinina (NP: $8662,5 \pm 126,1$ U; P: $8695,3 \pm 191,0$ U) ou Tempol ($8467,0 \pm 157,5$ U), não alterou a IF ao FLUO 3-AM em relação a IF basal ou entre os grupos (Figura 10A).

Não observamos também diferenças na IF basal ao FLUO 3-AM entre as CEA de SHR não prenhas ($7749,6 \pm 276,9$ U) e prenhas ($7688,0 \pm 369,0$ U). A IF ao FLUO 3-AM não foi diferente entre as CEA de SHR não prenhas e prenhas após incubação com PE (NP: $7964,4 \pm 281,2$ U; P: $8123,8 \pm 182,6$ U), Apocinina (NP: $8363,5 \pm 187,1$ U; P: $8435,2 \pm 247,7$ U) e Tempol (NP: $8383,0 \pm 186,4$ U; $8675,4 \pm 75,9$ U) (Figura 10 B).

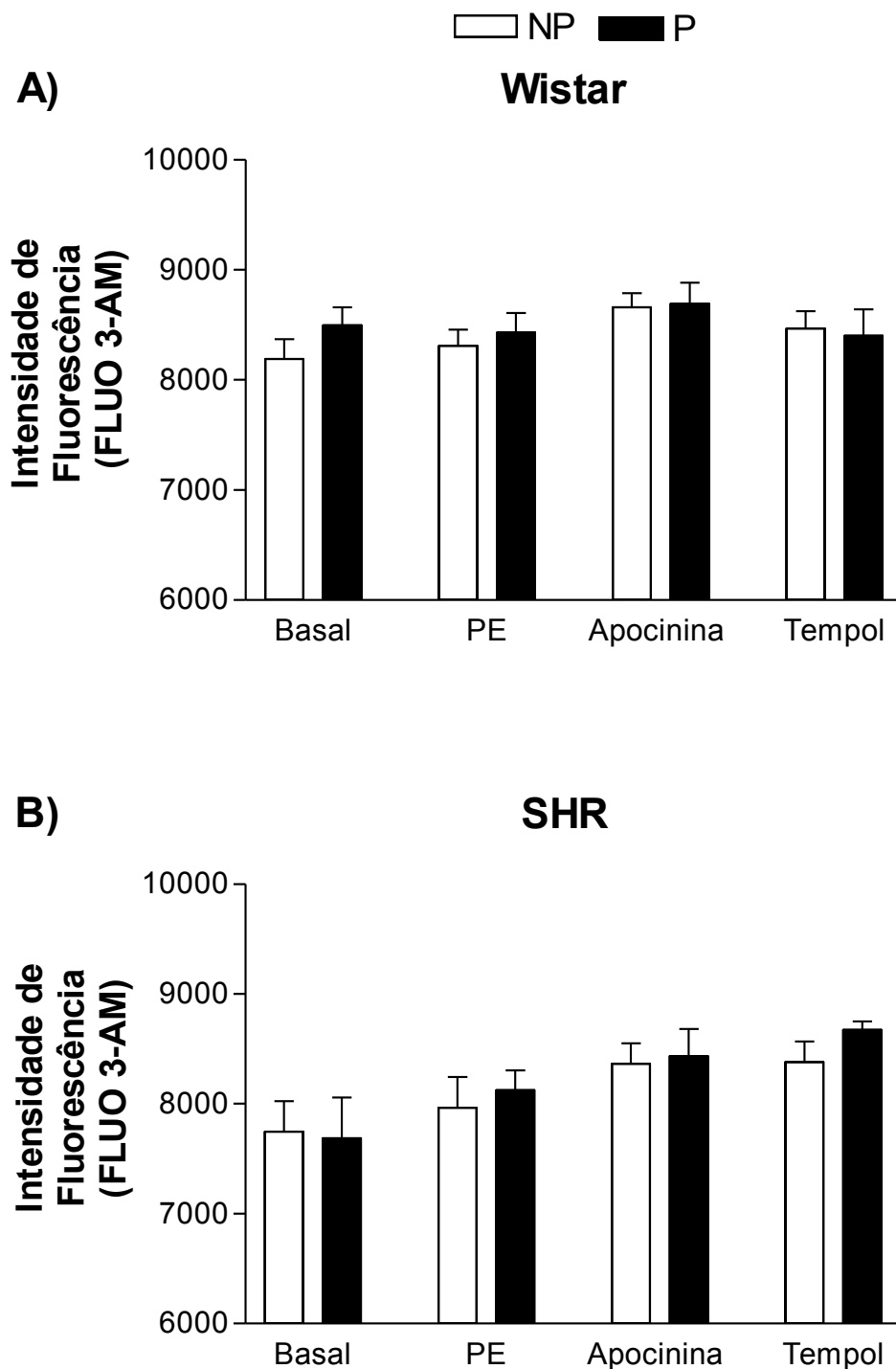


Figura 10 - Intensidade de fluorescência emitida pelo FLUO 3-AM (5 $\mu\text{mol/L}$) que quantifica a concentração de cálcio (Ca^{2+}) em células endoteliais de aorta (CEA, $n=5-6$) de ratas Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e não prenhas (barras pretas) em condições basais e após incubação com PE (fenilefrina, 100 nmol/L), Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Tempol (0,1 nmol/L). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em CEA dos diferentes grupos, ANOVA.

5.10 A prenhez aumenta a expressão proteica da eNOS (Óxido Nítrico Sintase endotelial) em homogenatos de aortas de ratas normotensas e hipertensas

A expressão da eNOS total é menor em aortas de SHR do que em aortas de ratas Wistar, não prenhas ou prenhas. Observamos maior expressão da eNOS total em homogenatos de aortas de ratas Wistar prenhas ($2,75 \pm 0,35$, $n=5$) do que de ratas Wistar não prenhas ($1,80 \pm 0,14$, $n=5$). Em aortas de SHR, observamos também maior expressão da eNOS em SHR prenhas ($1,78 \pm 0,03$, $n=5$) do que em aortas de SHR não prenhas ($1,28 \pm 0,09$, $n=5$) (Figura 11).

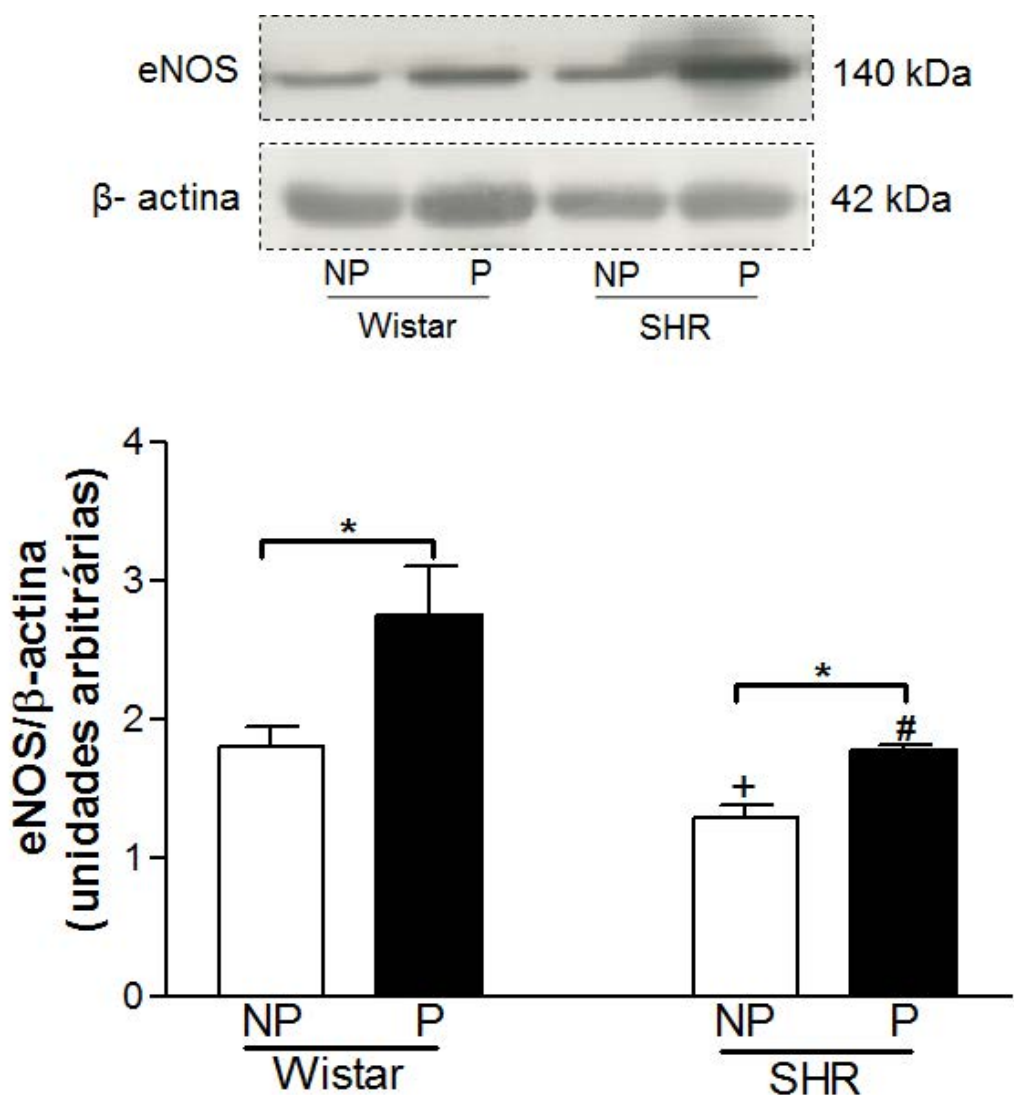


Figura 11 -Autorradiografias típicas das bancas e quantificação da expressão proteica da enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) / β-actina em homogenatos de aorta de ratas Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos. *p<0,05 entre ratas não prenhas *versus* prenhas, Wistar ou SHR; +p<0,05 entre SHR não prenhas *versus* Wistar não prenhas; #p<0,05 entre SHR prenhas *versus* Wistar prenhas, ANOVA.

5.11 A prenhez reduz a expressão proteica de NOX4 em homogenatos de aortas de SHR

A expressão da NOX4 em aortas de SHR não prenhas é maior do que em aortas de ratas Wistar não prenhas (Figura 12). Não foram observadas diferenças na

expressão de NOX4 entre homogenatos de aortas de ratas Wistar não prenhas ($1,15 \pm 0,20$, $n=5$) e ratas Wistar prenhas ($1,10 \pm 0,16$, $n=5$) (Figura 10). No entanto nossos resultados demonstraram que a expressão da NOX4 encontrou-se diminuída em homogenatos de aortas de SHR prenhas ($0,88 \pm 0,06$, $n=5$) em relação as SHR não prenhas ($1,81 \pm 0,41$, $n=5$).

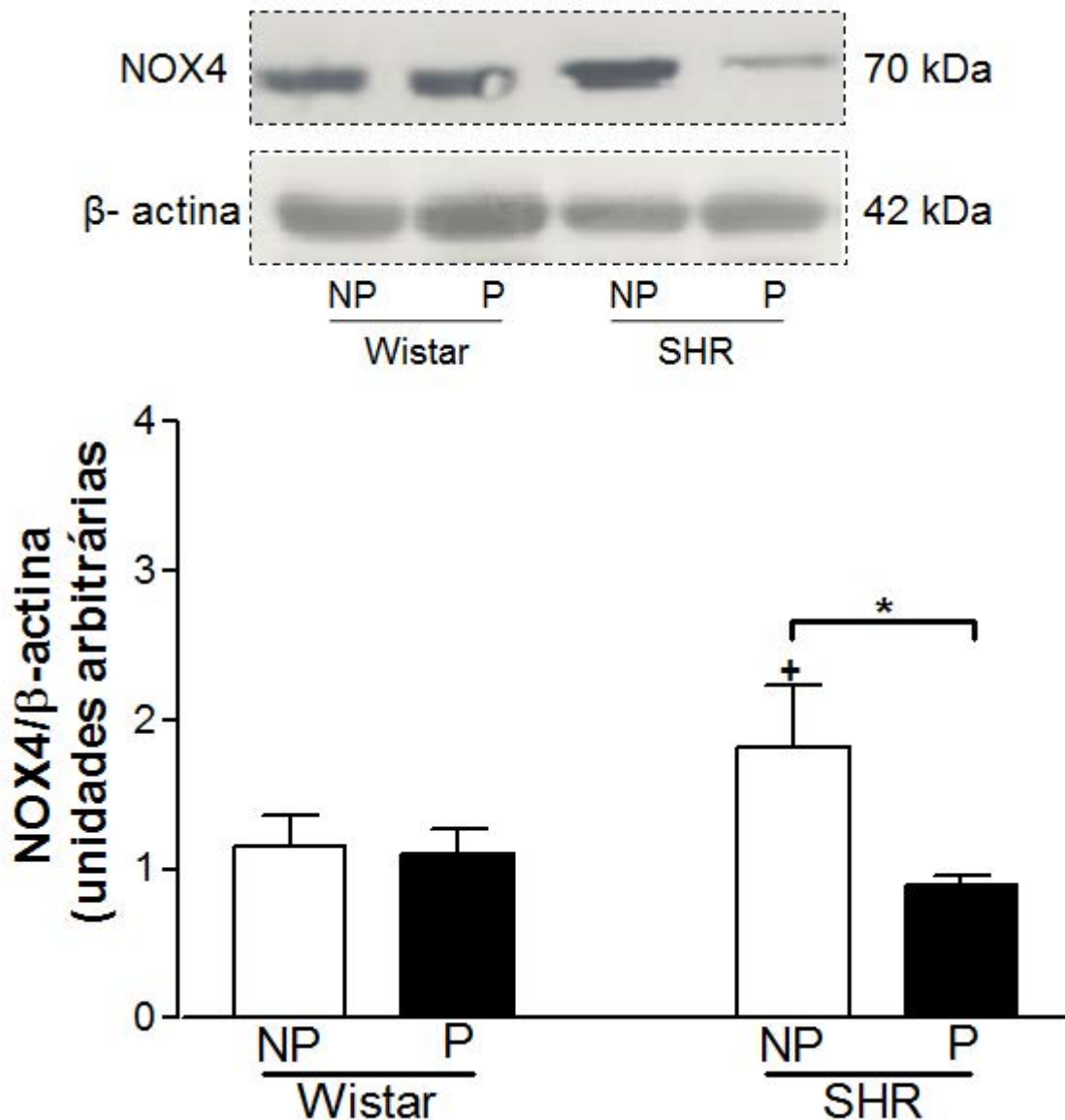


Figura 12 - Autorradiografias típicas das bandas e quantificação da expressão proteica da NOX4 / β -actina em homogenatos de aorta de Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). As barras representam a média \pm EPM dos resultados obtidos em aortas ($n=5$) dos diferentes grupos. * $p<0,05$ entre SHR não prenhas *versus* SHR prenhas; * $p<0,05$ entre SHR não prenhas *versus* os demais grupos, ANOVA.

5.12 A prenhez não altera a expressão proteica da SOD-1 (enzima superóxido dismutase) em homogenatos de aortas de ratas Wistar e SHR

A expressão da SOD-1 foi semelhante entre aortas de ratas prenhas e não-prenhas Wistar (NP: $1,27 \pm 0,15$, $n=5$; P: $1,18 \pm 0,24$, $n=5$) e SHR (NP: $1,30 \pm 0,16$, $n=5$; P: $1,30 \pm 0,11$, $n=5$) (Figura 13).

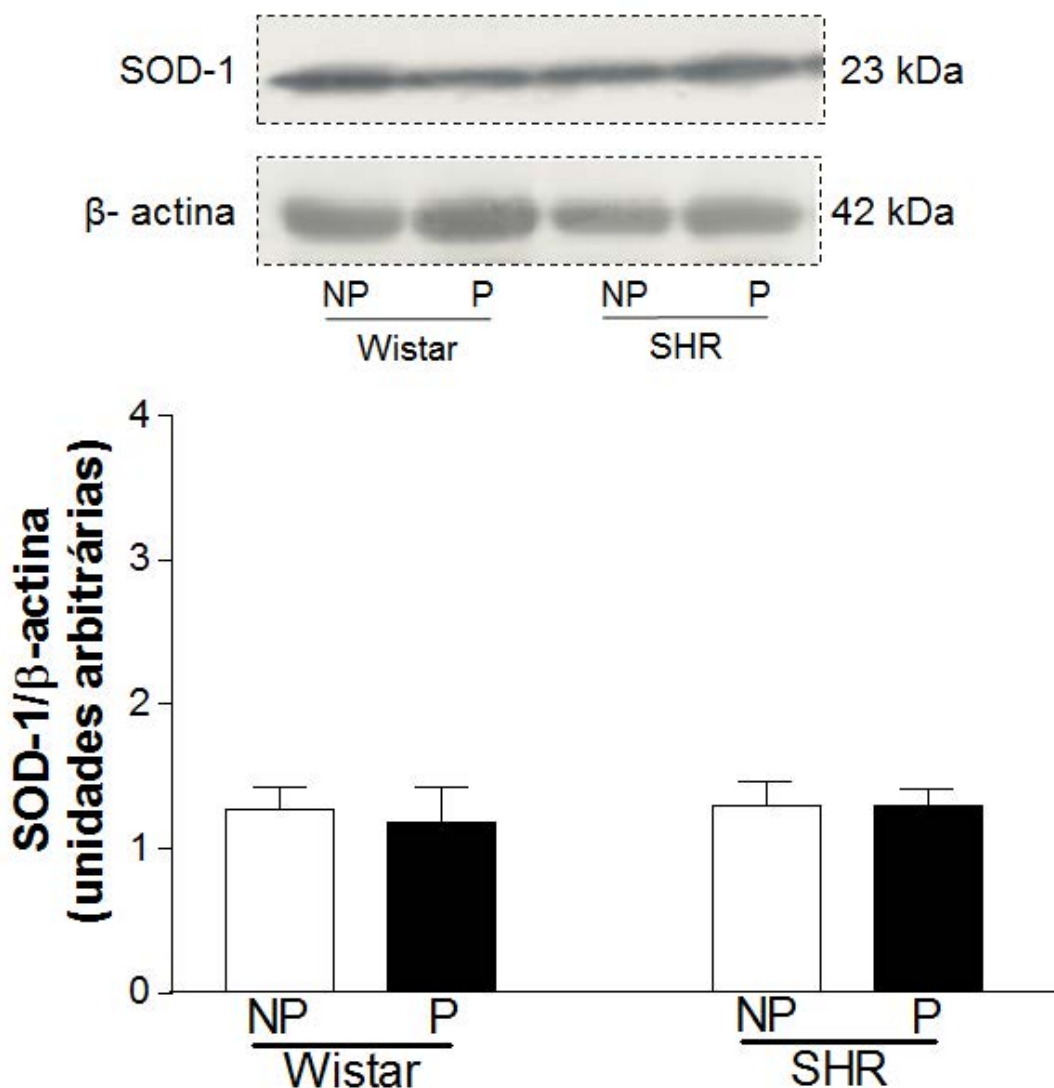


Figura 13 - Autorradiografias típicas das bandas e quantificação da expressão proteica enzima SOD-1 (superóxido dismutase) / β -actina em homogenatos de aorta de Wistar e SHR, não prenhas (barras brancas) e prenhas (barras pretas). Os dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas ($n=5$) dos diferentes grupos, ANOVA.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados de medida direta da pressão arterial corroboram dados já publicados pelo nosso laboratório (ZANCHETA *et al.*, 2015) e por outros grupos de pesquisa (SCOTT; GOECKE, 1984; BALLEJO *et al.*, 2002; OGNIBENE *et al.*, 2012), mostrando que os valores de pressão arterial média (PAM) estão reduzidos nas ratas prenhas normotensas e hipertensas em comparação com ratas não prenhas (Figura 1A). Os reduzidos valores de PAM estariam associados aos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) também reduzidos nos grupos de ratas prenhas (Figura 1C e D). A redução da pressão arterial pode ser modulada por ação de mecanismos reflexos que aumentam os valores de frequência cardíaca, como observamos em ratas prenhas em relação as não prenhas (Figura 1B).

A redução dos valores de pressão sanguínea ao final da prenhez tem sido associada ao aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) em células vasculares de ratas prenhas (GOETZ *et al.*, 1994; STENNET *et al.*, 2009). Em nosso estudo, observamos que a intensidade de fluorescência a sonda DAF-2DA foi maior em células endoteliais de Wistar e SHR prenhas em comparação a não prenhas, indicando maior concentração de NO nestas células (Figura 8A e B). Não observamos diferenças na intensidade de fluorescência a sonda FLUO 3-AM entre as células endoteliais de Wistar e SHR prenhas em relação aos seus respectivos controles não prenhas (Figura 10A e B), sugerindo que a prenhez não altera a concentração de cálcio intracelular em células endoteliais de aortas de ratas normotensas ou hipertensas.

Observamos também maior expressão da eNOS total em homogenatos de aorta (células endoteliais e do músculo liso vascular) de ratas Wistar e SHR prenhas (Figura 11) em relação aos seus respectivos controles, não prenhas. Associado a estes resultados, demonstramos recentemente que a via PI3K/Akt está mais ativa em aorta de ratas prenhas normotensas e hipertensas, contribuindo para fosforilação da eNOS em resíduos de serina 1177 e sua ativação (ZANCHETA *et al.*, 2015). Juntos nossos dados sugerem que a prenhez é uma condição fisiológica associada ao aumento da produção vascular de NO. Interessantemente, este efeito é

observado também em vasos ratas hipertensas (SHR), nas quais a disfunção vascular e endotelial, pré-existent antes da prenhez, e associada a menor produção de NO, seria revertida, a fim de aumentar a biodisponibilidade de NO nestas células. Nossos dados sugerem então que a disfunção endotelial seria revertida pela prenhez em SHR.

A disfunção endotelial e vascular pode ser associada também a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), e/ou, a reduzida capacidade antioxidante nestas células.

Para avaliarmos possíveis alterações associadas a ERO em ratas prenhas, utilizamos duas ferramentas farmacológicas, a Apocinina (um inibidor de oxidases), usado também como inibidor da produção de ERO via NAD(P)H oxidase e o Tempol, um mimético da SOD (enzima antioxidante).

Primeiramente, observamos que a Apocinina reduziu os valores de PAM em ratas prenhas e não prenhas, normotensas e hipertensas (Figura 2A), sugerindo que a produção basal (sistêmica ou vascular) de ERO pela enzima NAD(P)H oxidase, ou por outras fontes, ocorre em todos os grupos avaliados. No entanto, a resposta hipotensora à Apocinina foi reduzida em ratas prenhas hipertensas (Figura 2A) quando comparadas as respostas observadas nos outros grupos, sugerindo uma possível alteração de síntese de ERO ou da atividade da NAD(P)H oxidase em ratas hipertensas prenhas. Por outro lado, quando avaliamos o efeito do Tempol, observamos que a redução nos valores de PAM foi semelhante entre todos os grupos (Figura 2B), sugerindo que a atividade antioxidante da SOD, mimetizada pela ação do Tempol, não seria alterada pela prenhez em ratas normotensas ou hipertensas.

A partir destes resultados, resolvemos analisar o estresse oxidativo sistêmico em ratas prenhas, pela análise do estresse oxidativo em eritrócitos, seguindo metodologia previamente descrita. Observamos maior estresse oxidativo sistêmico em SHR não prenhas do que em ratas normotensas não prenhas, e observamos também que a prenhez aumenta o estresse oxidativo sistêmico em ratas normotensas e hipertensas (Figura 3). Em estudos com mulheres grávidas um aumento do estresse oxidativo tem sido relacionado como uma consequência do aumento da oxigenação e metabolização que ocorre durante este período para a

formação de novos tecidos fetais (LITTLE; GLADEN, 1999; BIONDI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005).

Por outro lado, redução do estresse oxidativo tem sido observado no sistema cardiovascular de roedores ao final da prenhez. Menor concentração de ERO, avaliada por menor intensidade de fluorescência ao DHE foi demonstrada em células de miocárdio de fêmeas prenhas de camundongos quando comparadas a não prenhas (IORGA, 2012). Diminuição do estresse oxidativo, avaliado por TBARS (peroxidação lipídica), foi observado em leitos mesentéricos arteriais de ratas Wistar e SHR prenhas quando comparadas as ratas não prenhas (OGNIBENE *et al.*, 2012). Nós observamos redução do estresse oxidativo na aorta (Figura 4) de ratas prenhas, normotensas ou hipertensas, quando comparadas a aortas de ratas não prenhas. Observamos também redução da concentração basal de ERO em células endoteliais de ratas prenhas normotensas e hipertensas quando comparados a ratas não prenhas (Figura 9A e B). Juntos nossos resultados sugerem que a disfunção vascular e endotelial, associada a maior produção de ERO em aortas de SHR não prenhas, é revertida pela prenhez.

A redução do estresse oxidativo e/ou o aumento da biodisponibilidade de NO, no sistema cardiovascular de ratas prenhas tem sido correlacionado a redução dos valores de PAM e também a hiporreatividade vascular, dependente do endotélio, a diferentes vasoconstritores testados em aortas e leitos mesentéricos (ALOAMAKA *et al.*, 1993a; BALLEJO *et al.*, 2002; STENNET *et al.*, 2009; ZANCHETA *et al.*, 2015). Em nosso estudo, observamos hiporreatividade à fenilefrina (PE) em aortas intactas de ratas prenhas, normotensas e hipertensas (Figura 5A e B). A modulação endotelial da contração vascular da PE, parecer ser independente do efeito direto da PE nas CEA, uma vez que não observamos alterações das concentrações de NO, ERO e Ca^{2+} em CEA estimuladas pela PE de ratas normotensas e hipertensas prenhas (Figuras 10A e B).

Avaliamos inicialmente, se possíveis alterações na NAD(P)H oxidase estaria contribuindo para menor estresse oxidativo vascular, maior biodisponibilidade de NO medido em células endoteliais e hiporreatividade de aorta à PE de ratas prenhas. Ao utilizarmos Apocinina nos estudos funcionais, observamos redução do efeito máximo das curvas concentração-efeito para PE em aortas de ratas normotensas não

pretnhas e pretnhas (Figura 6A). Estes resultados sugerem que na presena de Apocinina, haveria um aumento da modulao endotelial sobre o efeito vasoconstritor da PE. Este resultado poderia ser associado o menores concentraoes de ERO (Figura 9A) e o maiores concentraoes de NO (Figura 8A) observadas em CEA de ratas n o pretnhas e pretnhas, medidas na presena de Apocinina em relao o concentrao basal. N o observamos alteraoes na concentrao de c ocl o pela Apocinina em CEA de ratas Wistar pretnhas e n o pretnhas (Figura 10A).

Se admitirmos que a NAD(P)H oxidase foi inibida pela Apocinina, temos que considerar que subunidades NOX vasculares e endoteliais desta enzima estariam ativas e seriam semelhantes entre aortas intactas de ratas Wistar pretnhas e n o pretnhas. Reforando esta sugest o, n o observamos alteraoes na express o basal da subunidade NOX4 entre aortas de ratas normotensas pretnhas e n o pretnhas (Figura 12).

Nossos resultados sugerem que na presena de Apocinina haveria maior modulao endotelial sobre a vasoconstric o estimulada pela PE devido a maior biodisponibilidade de NO. Como a biodisponibilidade de NO j o estava aumentada em aortas de ratas Wistar pretnhas, a diferena entre reatividade de aortas de ratas pretnhas e n o pretnhas o PE foi mantida na presena de Apocinina.

No entanto, resultados distintos foram observados nos estudos utilizando aortas ou c lulas endoteliais de SHR pretnhas e n o pretnhas, quando utilizamos Apocinina. Enquanto a Apocinina promoveu reduo da reatividade o PE em aortas de SHR n o pretnhas, em aortas de SHR pretnhas, n o observamos este efeito da Apocinina (Figura 6A e B). Este resultado, associado ao menor estresse oxidativo observado em aortas de SHR pretnhas (Figura 4) e a menor concentrao basal de ERO em c lulas endoteliais de SHR pretnhas (Figura 9B), levantou a hip otese que a atividade NAD(P)H oxidase seria menor em aortas de SHR pretnhas do que aortas SHR n o pretnhas, e assim, a Apocinina n o poderia promover efeitos inibit orios significativos que alterassem a reatividade de aortas o PE, apesar da Apocinina ter promovido reduo das concentraoes basais de ERO e aumento das concentraoes basais de NO (Figura 8B) t o em c lulas endoteliais de aortas de SHR pretnhas. Ainda, nossos resultados demonstraram que a express o da

NOX4 em aortas intactas de SHR prenhas é menor que em aortas de SHR não prenhas (Figura 12). Como na presença de Apocinina, não observamos mais diferenças na reatividade à PE entre aortas de SHR não prenhas e prenhas, sugerimos que, em aortas de SHR prenhas, a Apocinina não teria efeito inibitório significativo na geração de ERO, ou na biodisponibilidade de NO, uma vez que a atividade da NAD(P)H oxidase estaria reduzida nestes vasos, se considerarmos que menor atividade seria esperada pela menor expressão de NOX4.

Avaliamos posteriormente, se possíveis alterações na atividade da SOD também contribuiriam para a hiporreatividade de aorta de ratas prenhas à PE. Ao avaliarmos as curvas concentração-efeito para PE na presença de Tempol, não observamos alterações do efeito máximo e da potência da PE em aortas de ratas prenhas e não prenhas, normotensas ou hipertensas (Figura 7A e B). Ainda, o Tempol não promoveu alterações significativas na intensidade de fluorescência basal das sondas DAF-2DA (Figura 8A e B), DHE (Figura 9A e B) e FLUO-3AM (Figura 10A e B) em células endoteliais de aortas de ratas prenhas normotensas e hipertensas. Também, ao avaliarmos a expressão da enzima SOD-1 observamos expressão semelhante entre aortas de ratas prenhas e não prenhas, Wistar ou SHR (Figura 13). Estes resultados sugerem que a atividade da SOD em células vasculares não seria alterada pela prenhez em ratas normotensas e hipertensas. No entanto, em mulheres, ao final do terceiro trimestre de gestação, foi observado aumento das enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase em eritrócitos e em plaquetas e da atividade da SOD no meio extracelular, possivelmente como resposta ao aumento de O_2^- sistêmico associado a formação fetal (UOTILA *et al.*, 1991; TAMURA *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que a atividade antioxidante, em aortas, não é alterada pela prenhez em ratas normotensas e hipertensas.

Tomados em conjunto, os principais achados deste estudo são que o efeito hipotensor da Apocinina está reduzido em SHR prenhas, o estresse oxidativo e a expressão de NOX4 estão reduzidas em aortas intactas de SHR prenhas, e a concentração de ERO também está reduzida em células endoteliais de aortas de SHR prenhas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o processo fisiológico da prenhez reduz a produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais e a expressão de NOX4 e estresse oxidativo em aorta de SHR, contribuindo assim para a maior biodisponibilidade de NO. Juntos, estes efeitos contribuiriam para a menor reatividade de aortas intactas de SHR prenhas à PE.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AHOKAS, R. A.; SIBAI, B. M. The relationship between experimentally determined litter size and maternal blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 162, n. 3, p. 841-847, Mar. 1990.

ALOAMAKA, C. P. *et al.* Mechanism of pregnancy-induced attenuation of contraction to phenylephrine in rat aorta. **Exp. Physiol.**, v. 78, n. 3, p. 403-410, May 1993a.

ALOAMAKA, C. P.; EZIMOKHAI, M.; MORRISON, J. The role of endothelium in phenylephrine- and potassium-induced contractions of the rat aorta during pregnancy. **Res. Exp. Med.**, v. 193, n. 6, p. 407-417, 1993b.

ALTENHÖFER, S. *et al.* Evolution of NAD(P)H oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. **Antioxid. Redox Signal.**, 2014. No prelo.

AYAJIKI, K. *et al.* Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Cir. Res.**, v. 78, n. 5, p. 750-758, May 1996.

BABIOR, B. M. NAD(P)H oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 42-47, Feb. 2004.

BABIOR, B. M. NAD(P)H oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, Mar. 1999.

BALLEJO, G. *et al.* Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. **Life Sci.**, v. 70, n. 26, p. 3131-3142, May 2002.

BARRON, W. M.; STAMOUTSOS, B. A.; LINDHEIMER, M. D. Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. **J. Clin. Invest.**, v.73, n. 4, p. 923-932, Apr. 1984.

BÄUMER, A. T. *et al.* The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin improves endothelial NO/superoxide balance and lowers effectively blood pressure in spontaneously hypertensive rats: comparison to calcium channel blockade. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 29, n. 5, p. 287-299, Jul. 2007.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NAD(P)H oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v.87, n. 1, p.245-313, Jan. 2007.

BIONDI, C. *et al.* The role and modulation on the oxidative balance in pregnancy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, n. 16, p. 2075-2089, 2005.

BOLOTINA, V. M. *et al.* Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, Apr. 1994.

BRETT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic. Res.**, v. 31, n. 6, p. 577-596, Dec. 1999.

BROOKES, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion**, v. 3, n. 4, p. 187-284, Mar. 2004.

BUEGE, J. A.; AUST S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ. Res.**, v. 87, n. 10, p. 840-844, Nov. 2000.

CAVE, A. C. *et al.* NAD(P)H oxidases in cardiovascular health and disease. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 8, n. 5-6, p. 691-728, May/Jun. 2006.

CHU, Z. M.; BEILIN, L. J. Mechanisms of vasodilatation in pregnancy: studies of the role of prostaglandins and nitric-oxide in changes of vascular reactivity in the in situ blood perfused mesentery of pregnant rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, n. 2, p. 322-329, Jun. 1993a.

CHU, Z. M.; BEILIN, L. J. Nitric oxide-mediated changes in vascular reactivity in pregnancy in spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, n. 3, p. 1184-1188, Nov. 1993b.

COELHO, E. B.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C. O. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 585-588, Sep. 1997.

CONSENTINO, F.; LÜSHER, T. F. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 2, p. 274-278. Aug. 1999.

CORSON, M. A. *et al.* Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circ. Res.**, v. 79, n. 5, p. 984-991, Nov. 1996.

DAVIDGE, S. T.; MCLAUGHLIN, M. K. Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 167, n. 6, p. 1691-1698, Dec. 1992.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

DUSTING, G. J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NAD(P)H oxidase in the vascular wall. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, sup. 1, p. 97-103, Mar. 2005.

ELIAS, G. P. *et al.* Atenolol reduces salivary activity in pups of spontaneously hypertensive and normotensive rats treated during pregnancy and lactation. **Clin. Exp. Hypertens.**, n. 30, v. 2, p. 133-141, Feb. 2008.

ELLIS, A.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, n. 11, p. 1013-1028, Nov. 2003.

FLEMING, I. *et al.* Ca²⁺ independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ. Res.**, v. 82, n. 6, p. 686-695, Apr. 1998.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.**, v. 12, n. 10, p. 773-790, Jul. 1998.

FORTUÑO, A. *et al.* Oxidative stress and vascular remodelling. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 4, p. 457-462, Jul. 2005.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 247, n. 1, p. 1-11, May 1986.

GEISZT, M. NAD(P)H oxidases: new kids on the block. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, n. 2, p. 289-299, Jul. 2006.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc. Res.**, v. 55, n. 2, p. 250-260, Aug. 2002.

GOETZ, R. M. *et al.* Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 205, n. 1, p. 905-910, Nov. 1994.

GUTIERREZ, J. *et al.* Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. **Circ. Res.**, v. 99, n. 9, p. 924-932, Oct. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford Univ. Press. Inc., 2000. 851p.

HAMILTON, C. A. *et al.* NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. **Hypertension**, v. 40, n. 5, p. 755-762, Nov. 2002.

HAMILTON, C. A. *et al.* Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 37, n. 2, Pt 2, p. 529–534, Feb. 2001.

HARRISON, G. L.; MOORE, L. G. Blunted vasoreactivity in pregnant guinea pigs is not restored by meclofenamate. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 160, n. 1, p. 258-264, Jan. 1989.

HONG, H. J. *et al.* Supplementation with tetra-hydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p.1044–1048, Nov. 2001.

IGNARRO, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, n. 4, p. 485-490, Feb. 1991.

IORGA, A. Pregnancy is associated with decreased cardiac proteasome activity and oxidative stress in mice. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e48601, 2012.

JOHNSON, D. K. *et al.* Inhibition of NAD(P)H oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, n. 3, p. 191-203, 2002.

KHALIL, R. A. *et al.* Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. **Hypertension**, v. 31, n. 5, p. 1065-1069, May 1998.

KHAZAEI, M.; MOEIN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiology**, v. 15, n. 1, p.49-67, Jun. 2008.

KNOWLES, R. G.; MOCANDA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v. 298, pt. 2, p. 249-258, Mar. 1994.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Intracellular localization and preassembly of the NAD(P)H oxidase complex in cultured endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 22, p. 19952-19960, May 2002.

LITTLE, R. E.; GLADEN, B. C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reprod. Toxicol.**, v. 13, n. 5, p. 347-352, Sep./Oct. 1999.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

LYALL, F.; YOUNG, A.; GREER, I. A. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 173, n. 3, p. 714-718, Sep. 1995.

MASSICOTTE, G. *et al.* Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 65, n. 12, p. 2466-2471, Dec.1987.

MIAN, K. B.; MARTIN, W. Differential sensitivity of basal and acetylcholine-stimulated activity of nitric-oxide to destruction by superoxide anion in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 6, p. 993-1000, Jul. 1995.

MITCHELL, B. M. *et al.* Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 20, n. 12, p. 1297-1304, Dec. 2007.

MITCHELL, J. B. *et al.* Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. **Biochemistry**, v. 29, n. 11, p. 2802-2807, Mar. 1990.

MOLNÁR, M.; HERTELENDY, F. N omega-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 166, n. 5, p. 1560-1567, May 1992.

MONCADA, S.; PALMER R. M.; HIGGS E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun. 1991.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365-372, Oct. 1988.

MOOR, R. M.; BRUCE, N. W. Distribution of blood-flow to reproductive-tract of anesthetized ewes near estrus. **Acta. Endocrinol.**, v. 83, n. 4, p. 794-799, Dec. 1976.

MORRIS, N. H.; EATON, B. M.; DEKKER, G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 103, n. 1, p. 4-15, Jan. 1996.

MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 11, p. 1317-1327, Nov. 1999.

MUÜGGE, A. *et al.* Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. **Am. J. Physiol.**, v. 260, n. 2, p. C219-C225, Feb. 1991.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 97-123, Jan. 2003.

NATHAN, L.; CUEVAS, J.; CHAUDHURI, G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, n.5, p. 955-960, Mar. 1995.

OGNIBENE, D. T. *et al.* Role of renin-angiotensin system and oxidative status on the maternal cardiovascular regulation in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 25, n. 4, p. 498-506, Apr. 2012.

OMAR, H. A. *et al.* Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and –independent nitrovasodilator relaxation. **Circ. Res.**, v. 69, n. 3, p. 601-608, Sep. 1991.

PALLER, M. S. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. **Am. J. Physiol.**, v. 247, n. 1, p. H100-H107, Jul. 1984.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, n. 327, v. 6122, p. 524-526, Jun. 1987.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C.; DELEO, F. R. The expanding role of NAD(P)H oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clin. Sci.**, v. 111, n. 1, p. 1-20, Jul. 2006.

RABELINK, T. J.; LÜSCHER, T. F. Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 2, p. 267-271, Feb. 2006.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Mesenteric arterial function in the rat in pregnancy: role of sympathetic and sensory-motor perivascular nerves, endothelium, smooth muscle, nitric oxide and prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 7, p. 1463-1470, Apr. 1996.

RAMESH, T. *et al.* Effect of fermented Panax ginseng extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats. **Exp. Gerontol.**, v. 47, n. 1, p. 77-84, Jan. 2012.

ROVER JUNIOR, L. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, Jan. /Feb. 2001.

SALVEMINI, D. *et al.* Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, n.5, p. 2659-2663, Mar. 1998.

SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO with O₂⁻. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Free Radic. Res. Commun.**, v. 10, n. 4-5, p. 221-226, 1990.

SCOTT, J. N.; GOECKE, J. C. Profile of pregnancy in young spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Heart J.**, v. 25, n. 2, p. 263-266, Mar. 1984.

SELEMIDIS, S. *et al.* NAD(P)H oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacol. Ther.**, v. 120, n. 3, p. 254-291, Dec. 2008.

SERRA, V. *et al.* Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 9, p. 6824-6830, Feb. 2003.

STENNETT, A. K. *et al.* Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 296, n. 3, p. H745-H755, Mar. 2009.

STOLK, J. *et al.* Characteristics of the inhibition of NAD(P)H oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 95-102, Jul. 1994.

TAMURA, T. *et al.* Plasma extracellular superoxide dismutase activity in healthy pregnant women is not influenced by zinc supplementation. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 80, n. 2, p. 107-113, May 2001.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-1081, Dec. 2003.

TAWFIK, H. E. *et al.* Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 295, n. 4, p. H1736–H1742, Oct. 2008.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 122, n. 4, p. 339-352, Oct. 2004.

UMANS, J. G.; LEVI, R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 771-790, 1995.

UMANS, J. G.; LINDHEIMER, M. D.; BARRON, W. M. Pressor effect of endothelium-derived relaxing factor inhibition in conscious virgin and gravid rats. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 2, p. F293-F296, Aug. 1990.

UOTILA, J. *et al.* Lipid peroxidation products, selenium-dependent glutathione peroxidase and vitamin E in normal pregnancy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 42, n. 2, p. 95-100, Nov. 1991.

VANHOUTTE, P. M. Ageing and endothelial dysfunction. **Eur. Heart J. Suppl.**, v. 4, Suppl. A, p. A8-A17, Fev. 2002.

WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NAD(P)H oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 50, n. 1, p. 9-16, Jul. 2007.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 1430-1442, Jun. 2000.

XIMENES, V. F. *et al.* The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NAD(P)H oxidase inhibition. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 457, n. 2, p. 134-141, Jan. 2007.

ZANCHETA, D. *et al.* The PI3K–Akt–eNOS pathway is involved in aortic hyporeactivity to Phenylephrine associated with late pregnancy in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v.122, p. 78-86, Feb. 2015.

ZHOU, J. F. *et al.* Increase oxidative stress in women with pregnancy-induced hypertension. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 18, n. 6, p. 419-426, Dec. 2005.

ANEXOS

ANEXOS

A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FOA/UNESP).




Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Papel da glicosilação (O-GlcNAc) e das espécies reativas de oxigênio (EROs) na hiporeatividade vascular e hipotensão observada ao final da prenhez de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR)” sob responsabilidade da Pesquisadora **CRISTINA ANTONIALI SILVA** e colaboração de Jéssica Antonini Troiano e Dalize Zancheta está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-00658-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research “Role of glycosylation (O-GlcNAc) and reactive oxygen species (ROS) in vascular hyporeactivity and hypotension observed in late pregnancy of the normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR)”, process number **FOA-00658-2013**, under responsibility of **CRISTINA ANTONIALI SILVA** and with collaboration of Jéssica Antonini Troiano and Dalize Zancheta agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça
Tel (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: eervolino@foa.unesp.br