

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**Dalise Zancheta dos Santos**

O Wortmannin reverte a hiporreatividade de aortas à fenilefrina associada à fase final da prenhez de ratas espontaneamente hipertensas (SHR)

**ARAÇATUBA**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**Dalise Zancheta dos Santos**

O Wortmannin reverte a hiporreatividade de aortas à fenilefrina associada à fase 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Antoniali Silva

**ARAÇATUBA**

**2014**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237w Santos, Dalise Zancheta dos.  
O Wortmannin reverte a hiporreatividade de aortas à fenilefrina associada à fase final da prenhez de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) / Dalise Zancheta dos Santos. - Araçatuba, 2014  
100 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

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

1. Aorta 2. Fenilefrina 3. Prenhez 4. Ratos endogâmicos SHR I. Título.

CDD 612

## DADOS CURRICULARES

**Nascimento:** 21.11.1984, Araçatuba- SP.

**Filiação:** Maria Marlene Zancheta  
Jaime Bianchi dos Santos

**2004/2007:** Curso de Graduação em Fisioterapia – Faculdades Adamantinenses Integradas - Adamantina/SP.

**2009/2010:** Curso de Especialização em Fisioterapia em Pediatria e Neonatologia – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP - São José do Rio Preto/SP.

**2012/2014:** 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 esta dissertação à minha querida e saudosa avó, Ida Klaiber Zancheta, mulher digna e trabalhadora, nosso esteio de família que hoje se encontra junto ao Pai. A você vó, meu eterno agradecimento por todo afeto e dedicação, por todas as palavras de sabedoria e por todo amor incondicional. Se hoje não temos mais sua doce presença em nosso lar, o amor que sempre nos transmitiu faz com que permaneça para sempre em nossos corações. Mesmo com a saudade latente sei que com o tempo esta dor se aquieta e se transforma em silêncio que espera pelos braços da vida um dia lhe reencontrar. Somos gratos ao Pai por cada dia que vivemos ao seu lado.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, nosso criador, que abençoou-me com a família e com a saúde que tenho e com as oportunidades que me foram dadas, a Ele toda honra e toda glória, hoje e sempre. Que meu trabalho possa ajudar e servir seus filhos.

À minha amada família, minha base e porto seguro, de onde tiro meus melhores exemplos, de onde me foram transmitidos valores morais e respeito àquilo que vem de Deus. Especialmente à minha amada mãe Maria Marlene Zancheta, que reluz o mais puro amor em seus atos e ao meu avô Adolfo Zancheta, homem de simplicidade e sabedoria inigualável, meu melhor e mais especial professor.

Aos meus tão amados Onivaldo Zancheta, Florentina Santos Zancheta, Aldo Zancheta e Maria Regina da Silva Zancheta por me sustentarem em carinho e afeto durante toda minha infância, agora e sempre. Ariadne Zancheta e Vitor César Zancheta por sempre terem sido muito mais que primos, irmãos.

Ao meu namorado, Igor da Silva Corte, por ter aceitado privar-se muitas vezes de minha companhia pelos estudos, por seu amor e paciência nos meus momentos de dúvidas, inquietações e desânimos. Pelo apoio, confiança e valorização do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem e ânimo para transpor os dias de cansaço, mas sobretudo pelo seu amor e dedicação. Amo-te!

À professora Cristina Antoniali Silva pela orientação, pelos importantes ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho, pela paciência e auxílio nas dificuldades e principalmente por sua sensibilidade.

Aos amigos Gean Domingos, Thais Costa, Gabrielle Almeida, Thamine Landim, Felipe Munhoz, Antonio Hernandez, Priscila Cavalari, Vitor Balera, Taís Danilucci, Lígia Perassa, Pâmela Martins, Tamires Goulart pelos bons momentos de descontração, pela amizade e pela parceria e contribuição na realização deste trabalho.

À professora Sandra Helena Penha de Oliveira e aos demais professores do Departamento de Ciências Básicas, Mário Jéfferson Quirino Louzada, João Carlos Callera, Dóris Hisako, João César Bedran de Castro, Ana Claudia Nakamune, Rita Cássia Menegatti Dornelles e Wilson Garcia por contribuírem com meu aprendizado.

Aos amigos e colegas do Departamento de Ciências Básicas, Rita, Camila, Leandro, Monique, Mayumi, Murilo, Simone, Jéssica, Keny, Ariana, Ângela, Max Sander, Ronaldo, Larissa, Renato, Sara, Samuel, Wagner, Caril, Aline e Rafael pela convivência agradável durante o mestrado.

Aos meus eternos professores: Leandra Navarro Benatti, Maria Solange Magnani, Marcos Brito, Bruno Gonçalves Dias Moreno, Paulo Rocha, Patrícia Braz, Antonio José Docusse Filho, Adriana Bassan, Juliana Nascimento, Érica Mastelini, Lilian Goraieb, Marcelo Barbosa, Alexandre Troncoso, Stella Corrêa e Paulo Corrêa.

À professora Tereza Cristina da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) e ao professor Maurício L. Nogueira, Débora A. P. C. Zuccari e Alessandra Vidotto da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) por cederem seus laboratórios para realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Aos professores da banca examinadora Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo e Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior, por terem aceitado o convite e pela contribuição na melhoria deste trabalho.

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

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

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

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado (proc. no. 2012/05746-8) pelo auxílio financeiro à pesquisa (proc. no. 2012/20398-6) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro;

À UNESP (Universidade Estadual Paulista) e todos docentes e discentes do departamento de ciências básicas pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado;

Agradeço profundamente a todas as pessoas que entraram na minha vida e me inspiraram, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade. Muito Obrigada!



“O homem culto é apenas mais culto; nem sempre é mais inteligente que o homem simples.”

Hermann Hesse

Zancheta, D. **O Wortmannin reverte a hiporreatividade de aortas à fenilefrina associada à fase final da prenhez de ratas espontaneamente hipertensas (SHR).** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

## RESUMO

Ratas prenhas normotensas ou hipertensas (SHR) apresentam redução da pressão arterial nos períodos finais da prenhez, associada à redução da atividade simpática perivascular de leitos mesentéricos e redução de respostas vasoconstritoras a alguns agonistas vasoconstritores. O endotélio vascular modula a resposta contrátil estimulada por vasoconstritores e, na prenhez, uma maior modulação do óxido nítrico (NO) sobre a reatividade vascular de aortas tem sido atribuída à maior atividade da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS). No entanto, nenhuma alteração da reatividade de aortas à Acetilcolina, ou a o A23187, foi observada em aortas de ratas prenhas. Foi sugerido que a participação de uma via de sinalização independente de ativação de receptores e menos dependente de cálcio, estaria envolvida na modulação endotelial sobre a vasoconstrição durante a prenhez. A expressão da eNOS fosforilada está aumentada em aorta de ratas prenhas. A eNOS pode ser fosforilada em resíduos de serina e treonina pela via PI3K/AKT. No entanto, a participação da via PI3K/AKT/eNOS na hiporreatividade de aortas de ratas prenhas à fenilefrina ainda não foi demonstrada. O objetivo deste estudo foi avaliar se o Wortmannin, um inibidor da via PI3K/AKT, poderia reverter a hiporreatividade de aortas à fenilefrina associada à prenhez e alterar as concentrações citosólicas de óxido nítrico (NO), cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células endoteliais isoladas de aortas de ratas Wistar e SHR prenhas. Inicialmente, avaliamos as possíveis alterações nos parâmetros cardiovasculares e na sensibilidade barorreflexa associadas à prenhez de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) por estudos *in vivo*. O efeito do Wortmannin foi avaliado na reatividade de aortas isoladas à fenilefrina por estudos funcionais e nas concentrações citosólicas de NO,  $Ca^{2+}$  e ERO em células endoteliais frescas isoladas de aortas de ratas Wistar e SHR, não prenhas (em estro) e prenhas (19-

20º dia de prenhez), por citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que a PAM, PAS e PAD estão reduzidos em ratas prenhas Wistar e SHR se comparados a ratas não prenhas da mesma linhagem. No entanto, enquanto a FC está aumentada em ratas prenhas Wistar, em SHR prenhas a FC está reduzida se comparada à FC de SHR não prenhas. Nossos resultados sugerem também que há redução da sensibilidade barorreflexa em ratas prenhas, Wistar e SHR. Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que a menor reatividade de anéis de aortas com endotélio à fenilefrina associada ao final da prenhez de ratas Wistar e SHR foi revertida na presença de Wortmannin. Nossos resultados mostraram que as concentrações basais de NO,  $Ca^{2+}$  estão reduzidas e de ERO estão aumentadas em células endoteliais de aortas (CEA) de SHR não prenhas se comparadas as CEA de ratas Wistar não prenhas. Em CEA de ratas Wistar e SHR prenhas, as concentrações basais de NO estão aumentadas em relação às ratas Wistar e SHR não prenhas, respectivamente. Observamos uma redução da concentração basal de ERO em CEA de SHR prenhas em relação às SHR não prenhas. Um aumento da intensidade de fluorescência (IF) à sonda DAF-2DA e FLUO-3AM foi observado em CEA de ratas Wistar não prenhas quando estimuladas por ACh e Phe. Em CEA de SHR não prenhas, a estimulação com ACh e Phe promoveu aumento da IF à sonda FLUO-3AM, mas não à DAF-2DA. A estimulação com Phe, mas não com ACh, aumentou a IF à sonda DHE em CEA de SHR não prenhas. Estes resultados sugerem que a ACh e Phe levam ao aumento de concentração de NO associado ao aumento de  $Ca^{2+}$  em CEA de ratas Wistar, mas não em CEA de SHR não prenhas, provavelmente devido a disfunção endotelial descrita em SHR. Porém em CEA de SHR prenhas, observamos que a estimulação com ACh e Phe aumentaram a IF à sonda DAF-2DA sugerindo aumento da concentração de NO. O aumento da IF à DAF-2DA foi associado ao aumento da IF à sonda FLUO-3AM estimulados por ACh em CEA de ratas Wistar e SHR prenhas, mas o aumento na IF à DAF-2DA observado com estímulo de Phe não pode ser associado ao aumento da IF à FLUO-3AM. O aumento de NO em CEA de SHR prenhas, estimulado pela Phe e independente do aumento de  $Ca^{2+}$  foi inibido na presença de Wortmannin. Além disto, a IF à sonda DHE em CEA de SHR prenhas foi reduzida em comparação a observada em CEA de SHR não prenhas estimuladas ou não com Phe,

sugerindo uma redução do estresse oxidativo associado à prenhez em SHR. Nossos resultados sugerem que a menor reatividade de aortas de SHR prenhas estaria associada ao aumento da concentração de NO em CEA o qual modularia a contração vascular estimulada pela Phe. Nas CEA de SHR prenhas, a Phe leva ao aumento da concentração de NO por uma via sensível ao Wortmannin. Em conclusão, a via PI3/AKT/eNOS está envolvida na hiporreatividade aórtica à fenilefrina associada ao final da prenhez de ratas espontaneamente hipertensas.

**Palavras-chave:** Wortmannin, aorta, fenilefrina, prenhez, SHR.

Zancheta, D. **The wortmannin reverses the aortas of hyporeactivity to phenylephrine associated with late pregnancy in spontaneously hypertensive rats (SHR)**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

## ABSTRACT

Normotensive or hypertensive pregnant rats (SHR) show a significant reduction in blood pressure in the final period of pregnancy, associated with reduced activity of perivascular sympathetic mesenteric beds and reduced vasoconstrictor responses to some vasoconstrictor agonists. The vascular endothelium modulates contractile response stimulated by vasoconstrictors and in pregnancy, an additional modulation of nitric oxide (NO) on vascular reactivity of aortas has been attributed to increased activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). However, no change in the aortas of reactivity to acetylcholine or A23187 was observed in aortas of pregnant rats. The involvement of a signaling pathway independent of receptor activation and less dependent calcium was suggested. This pathway is involved in the modulation of endothelial vasoconstriction during pregnancy. The expression of phosphorylated eNOS is increased in the aorta of pregnant rats and this enzyme can be phosphorylated on serine and threonine residues of the PI3K/Akt pathway. However, the participation of the PI3K/AKT/eNOS pathway in hyporeactivity in the aortas of pregnant rats to phenylephrine has not been demonstrated. The aim of this study was evaluate if the PI3K/AKT pathway inhibitor (Wortmannin) could reverse the hyporeactivity of aortas to phenylephrine associated with the end of pregnancy and change the cytosolic concentrations of nitric oxide (NO), calcium ( $Ca^{2+}$ ) and reactive oxygen species (ROS) in isolated endothelial cells from aortas of pregnant Wistar rats and SHR. Initially, we evaluated the possible changes in cardiovascular parameters and baroreflex sensitivity associated with pregnancy in spontaneously hypertensive rats (SHR) by in vivo studies. The effect of

Wortmannin was evaluated in the isolated aortas reactivity to phenylephrine and by functional studies through cytosolic concentrations of NO, Ca<sup>2+</sup> and ROS in not pregnant (estrus) and pregnant (19-20th day of pregnancy) isolated endothelial fresh cells from aortas of Wistar and SHR by means of flow cytometry. Our results showed that the mean arterial pressure, systolic and diastolic blood pressure are reduced in pregnant Wistar and SHR compared to non-pregnant rats of the same strain. However, while the heart rate is increased in pregnant female Wistar rats, in pregnant SHR the heart rate is reduced compared to non-pregnant SHR. Our results also suggest that occurs a reduction of baroreflex sensitivity in pregnant rats, Wistar and SHR. The results obtained in our study showed the lower reactivity of aorta rings with endothelium to phenylephrine associated with the end of pregnancy in Wistar rats and SHR was reversed in the presence of Wortmannin. Our results showed that the basal concentrations of NO and Ca<sup>2+</sup> are reduced and concentration of ROS are increased in the aortas endothelial cells (AEC) in not pregnant SHR compared the AEC of not pregnant Wistar rats. In AEC of pregnant Wistar and SHR, the basal NO concentrations are increased in relation to not pregnant Wistar and SHR, respectively. We observed a reduction in the basal concentration of ROS in AEC of pregnant SHR compared to non-pregnant SHR. An increase of fluorescence intensity (FI) to DAF-2DA and FLUO-3AM was observed in AEC of not pregnant Wistar when stimulated by ACh and Phe. In AEC of not pregnant SHR, the stimulation with ACh and Phe promoted an increase of FI to FLUO-3AM but not to DAF-2DA. Stimulation with Phe increased the FI of the DHE in AEC from non-pregnant SHR but this effect was not reproduced with the stimulation with ACh. These results suggest that ACh and Phe promote the increase of NO concentration associated with increased Ca<sup>2+</sup> concentration in AEC of Wistar rats, but not in non-pregnant SHR probably due to endothelial dysfunction in SHR. But in pregnant SHR AEC, we observed that stimulation with ACh and Phe increased the FI of DAF-2DA suggesting increased NO concentration. The increase in FI of the DAF-2DA was associated with an increase of FI of Fluo-3AM stimulated by ACh in AEC of pregnant Wistar and SHR, but the increase in fluorescence intensity of the probe DAF-2DA observed with Phe stimulus can't be associated with an increase of fluorescence intensity of Fluo-3AM. The increase of NO in pregnant SHR AEC

stimulated by Phe and independent of  $Ca^{2+}$  increased was inhibited in the presence of Wortmannin. In addition, the FI of the DHE in pregnant SHR AEC was reduced compared to the observed in AEC stimulated or not with Phe in not pregnant SHR, suggesting a reduction of oxidative stress associated with pregnancy in SHR. Our results suggest that the lower reactivity of aortas of pregnant SHR would be associated with increased NO levels in AEC which modulate vascular contraction stimulated by Phe. In AEC of pregnant SHR, Phe leads to increase NO concentration by a pathway sensitive to wortmannin. In conclusion, the PI3/AKT/eNOS pathway is involved in aortic hyporeactivity to phenylephrine associated with the end of pregnancy in spontaneously hypertensive rats.

**Keywords:** Wortmannin, aorta, phenylephrine, pregnancy, SHR.

## ABREVIATURAS

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

$\Delta$  – variação

%  $\Delta$  – porcentagem de variação

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

2R1C – Ratos hipertensos devido o clampeamento de uma de suas artérias renais

$[\text{Ca}^{2+}]$  - concentração de cálcio

$[\text{NO}]$  - concentração de óxido nítrico

$[\text{ERO}]$  – concentração de espécies reativas de oxigênio

$\mu\text{M}$  - micromol

ACh – acetilcolina

AKT - proteína tirosina quinase A

$\text{AT}_2\text{R}$  - receptores para angiotensina tipo 2

BK – bradicinina

bpm – batimentos por minuto

$\text{Ca}^{2+}$  – cálcio

$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  – complexo cálcio-calmodulina

$\text{CaCl}_2$  – cloreto de cálcio

CEA – células endoteliais de aorta

cNOS - óxido nítrico sintase constitutiva

$\text{CO}_2$  - gás carbônico

DAF-2/DA - 4,5- diaminofluoresceína – sonda específica para NO

DC – débito cardíaco

DHE – diidroetidina – sonda específica para ERO

DMSO – Dimethylsulfoxide

$\text{CE}_{20}$  - concentração efetiva que produz 20% do efeito máximo



CE<sub>50</sub> – concentração efetiva que produz 50% do efeito máximo

EDRFs – fatores relaxantes derivados do endotélio

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

E<sub>max</sub> – efeito máximo

eNOS ou isoforma III – óxido nítrico sintase endotelial

EO – estresse oxidativo

EPM - erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio

FC – frequência cardíaca

FLUO 3-AM – sonda específica para cálcio

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

GTP – guanosina trifosfato

HEPES - ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

Hz – hertz

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

IF – intensidade de fluorescência

K<sup>+</sup> – potássio

KCl – cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato monopotássico

LY-294002 – inibidor da fosfatidilinositol-3-OH Kinase

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

mmHg - milímetros de mercúrio

mg/Kg – miligramas por quilograma

MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio

mN – milinewton

ms/mmHg – milissegundos por milímetro de mercúrio

n – tamanho da amostra

NaCl – cloreto de sódio

NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato monossódico

nM - nanomol

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NPS – nitroprussiato de sódio

$O_2^-$  – ânion superóxido

$O_2$  – oxigênio molecular

p – nível de significância

PA – pressão arterial

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

pD2 -  $-\log$  da  $CE_{50}$

PE10 – cânula de polietileno espessura 10

PE50 - cânula de polietileno espessura 50

pH - potencial hidrogeniônico

Phe – fenilefrina (agonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos)

PI3K - fosfatidilinositol-3-OH Kinase

PI3K/AKT/eNOS – via de fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial

PP1- inibidor de fosfatase 1

RP – resistência periférica

RVP – resistência vascular periférica

RVPT - resistência vascular periférica total

SBR - Sensibilidade barorreceptora reflexa

Ser<sub>1177</sub> - resíduo de serina 1177

SHR – do inglês, spontaneously hypertensive rats (ratas espontaneamente hipertensas)

SHR-NP - ratas espontaneamente hipertensas não prenhas

SHR-P - ratas espontaneamente hipertensas prenhas

SOD – superóxido dismutase

Thr<sub>495</sub> – resíduo de threonina 495

VE - ventrículo esquerdo

WORT - Wortmannin

WST – rata Wistar (normotensa)

W-NP - ratas normotensas Wistar não prenhas

W-P - ratas normotensas Wistar prenhas

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Medida direta de (A) pressão arterial média (mmHg), (B) da frequência cardíaca (bpm), (C) pressão arterial sistólica (mmHg) e (D) pressão arterial diastólica (mmHg), de ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $^{\alpha}p < 0,05$  W-NP vs W-P;  $^{\beta}p < 0,05$  SHR-NP vs SHR-P, em A, B, C, D. 51
- Figura 2.** Sensibilidade barorreceptora reflexa (SBR – ms/mmHg) de W-NP, W-P, SHR-NP e SHR-P, n=8. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos.  $^{\dagger}p < 0,05$  SHR-NP x W-NP;  $^{\alpha}p < 0,05$  W-P x W-NP;  $^{\beta}p < 0,05$  SHR-P x SHR-NP. 52
- Figura 3.** Porcentagem de variação (%  $\Delta$ ) da PAM (A) e da FC (B) após administração de Phe (8 $\mu$ g/Kg) em ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $^{\dagger}p < 0,05$  SHR-NP em relação aos outros grupos;  $^{\alpha}p < 0,05$  W-P vs W-NP;  $^{\beta}p < 0,05$  SHR-P vs SHR-NP, em A e B. 54
- Figura 4.** Porcentagem de variação (%  $\Delta$ ) da PAM (A) e da FC (B) após administração de ACh (10 $\mu$ g/Kg) em ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $^{\dagger}p < 0,05$  SHR-NP em relação aos outros grupos;  $^{\alpha}p < 0,05$  W-P vs W-NP;  $^{\beta}p < 0,05$  SHR-P vs SHR-NP, em A e B. 56
- Figura 5.** Porcentagem de variação (%  $\Delta$ ) da PAM (A) e da FC (B) após administração de NPS 35  $\mu$ g/Kg em ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $^{\alpha}p < 0,05$  W-P vs W-NP;  $^{\beta}p < 0,05$  SHR-P vs SHR-NP, em A e B. 58
- Figura 6.** Curvas de efeito-concentração para Phe (em mN, A e B) e acetilcolina (em % de relaxamento, C e D) em anéis isolados de aorta de ratas não-prenhas (NP) ou de ratas prenhas (P), n = 7, Wistar e SHR. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $^{\ast}p < 0,05$  pD2 W-P vs W-NP,  $^{\alpha}p < 0,05$  Emax W-P vs W-NP;  $^{\beta}p < 0,05$  Emax SHR-P vs SHR-NP;  $^{\#}p < 0,05$  Emax SHR-P vs SHR-NP. 60

**Figura 7.** Curva concentração-efeito para Phe em anéis de aorta de (A) Wistar e (B) SHR, não-prenhas (NP), prenhas (P), na ausência ou presença de veículo ou de Wortmannin (Wort). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados (n=7). \* $p < 0,05$  EMax P (Phe) vs P (Phe, na presença de WORT);  $^{\beta} p < 0,05$  EMax P (Phe) vs P (Phe, na presença de Wort);  $^{\alpha} p < 0,05$   $pD_2$  P (Phe) vs P (Phe, na presença de Wort).

62

**Figura 8.** Intensidade de fluorescência (IF- unidades arbitrárias) à sonda DAF – 2DA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em células endoteliais da aorta de ratas não prenhas Wistar (W-NP, A) e SHR (SHR-NP, C) e prenhas Wistar (W-P, B) e SHR (SHR-P, D) em condições basais (Basal), estimuladas com acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe) e estimuladas com fenilefrina após incubação com Wortmannin (WORT 10nM + Phe). As barras representam a média  $\pm$  SEM dos resultados (n = 5). \* $p < 0,05$  Basal vs ACh;  $^{\#} p < 0,05$  Basal vs Phe;  $^{\alpha} p < 0,05$  Basal vs WORT + Phe;  $^{\beta} p < 0,05$  Phe vs WORT + Phe.

64

**Figura 9.** Intensidade de fluorescência (IF- unidades arbitrárias) à sonda FLUO 3-AM (5  $\mu\text{mol/L}$ ) em células endoteliais da aorta de ratas não prenhas Wistar (W-NP, A) e SHR (SHR-NP, C) e prenhas Wistar (W-P, B) e SHR (SHR-P, D) em condições basais (Basal), estimuladas com acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe) e estimuladas com fenilefrina após incubação com Wortmannin (WORT 10nM + Phe). As barras representam a média  $\pm$  SEM dos resultados (n = 5). \* $p < 0,05$  Basal vs ACh;  $^{\#} p < 0,05$  Basal vs Phe;  $^{\alpha} p < 0,05$  Basal vs WORT + Phe;  $^{\beta} p < 0,05$  Phe vs WORT + Phe.

66

**Figura 10.** Intensidade de fluorescência (IF- unidades arbitrárias) à sonda FLUO 3-AM (5  $\mu\text{mol/L}$ ) em células endoteliais da aorta de ratas não prenhas Wistar (W-NP, A) e SHR (SHR-NP, C) e prenhas Wistar (W-P, B) e SHR (SHR-P, D) em condições basais (Basal), estimuladas com acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe) e estimuladas com fenilefrina após incubação com Wortmannin (WORT 10nM + Phe). As barras representam a média  $\pm$  SEM dos resultados (n = 5). \* $p < 0,05$  Basal vs ACh;  $^{\#} p < 0,05$  Basal vs Phe;  $^{\alpha} p < 0,05$  Basal vs WORT + Phe;  $^{\beta} p < 0,05$  Phe vs WORT + Phe.

68

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 A HIPOTENSÃO NA GRAVIDEZ/PRENHEZ	27
1.2 ATIVIDADE DA eNOS FOSFORILADA	32
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 ANIMAIS	40
3.2 DROGAS E SONDAS UTILIZADAS	40
3.3 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	41
3.3.1 MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)	41
3.3.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORRECEPTORA	42
3.3.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PRESSORA À Phe E VASODILATADORAS À ACh E NPS	43
3.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	43
3.4.1 REATIVIDADE VASCULAR	43
3.4.1.1. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AORTAS À Phe E ACh.	44
3.4.1.2 EFEITO DO WORTMANNIN NA REATIVIDADE DE AORTAS À ACh E À Phe.	44
3.4.2 CITOMETRIA DE FLUXO	45
3.4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NO ( $[NO]_c$ ) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ESTIMULADAS OU NÃO COM ACh E Phe, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE WORT .	46
3.4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO ( $[Ca^{2+}]_c$ ) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ESTIMULADAS OU NÃO COM ACh E Phe, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE WORT.	46
3.4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ( $[ERO]$ ) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS	46

ESTIMULADAS OU NÃO COM ACh E Phe, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE WORT .

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS	50
4.1 A PRENHEZ REDUZ A PAM EM RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS, AUMENTA A FC EM RATAS NORMOTENSAS, MAS REDUZ A FC EM RATAS HIPERTENSAS	50
4.2 A PRENHEZ REDUZ A SENSIBILIDADE BARORRECEPTORA REFLEXA (SBR) EM RATAS NORMOTENSAS, MAS REVERTE A BAIXA SBR EM RATAS HIPERTENSAS.	51
4.3 UM MAIOR EFEITO PRESSOR À Phe É OBSERVADO EM RATAS PRENHAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS DO QUE EM RATAS NÃO PRENHAS.	52
4.4 MAIORES EFEITOS HIPOTENSORES À ACh SÃO OBSERVADOS EM RATAS PRENHAS DO QUE EM RATAS NÃO PRENHAS.	55
4.5 A PRENHEZ ALTERA O EFEITO HIPOTENSOR AO NPS	57
4.6 A PRENHEZ REDUZ A REATIVIDADE À Phe E À ACh EM SHR.	59
4.7 WORTMANNIN (10 nM) REVERTE A HIPOREATIVIDADE DE AORTAS DE RATAS PRENHAS À Phe.	61
4.8 A PRENHEZ AUMENTA A CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO ([NO]) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTAS (CEA) DE RATAS WISTAR E SHR	63
4.9 A PRENHEZ REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO ([Ca <sup>2+</sup> ]) BASAL E ESTIMULADA POR Phe EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTAS (CEA) DE RATAS WISTAR E SHR, MAS NÃO ALTERA A [Ca <sup>2+</sup> ] ESTIMULADA POR ACh.	65

4.10 A PRENHEZ REDUZ A CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ([ERO]) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTAS (CEA) DE RATAS WISTAR E SHR	67
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	88



# ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

Os dados do último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), divulgado em 06 de maio de 2014, mostraram que no Brasil houve uma redução de 43% na proporção de mortes de mulheres vítimas de complicações durante a gravidez ou no parto entre 1990 e 2013, em linha com a redução da mortalidade materna no mundo. Neste período, a taxa de mortalidade caiu de 120 mães por 100 mil nascidos vivos, em 1990, para 69 mães por 100 mil nascidos vivos em 2013 — últimos dados disponíveis. Em artigo publicado no dia 24 de fevereiro de 2012, no jornal "Folha de São Paulo" foi relatado que o Brasil não irá cumprir a meta estabelecida pela ONU (Organização Mundial da Saúde) em 2000, que estabelece a meta de 35 mortes maternas por 100 mil nascidos vivos para 2015, e que o país poderia se atrasar em 25 anos para cumprir esta meta. De acordo com o Ministério da Saúde (2000), *apud* VETTORE *et al.* (2011), em 1997 a razão de morte materna no país, óbitos declarados e notificados ao Ministério da Saúde, foi de 51,6 óbitos a cada 100.000 nascidos vivos. Em estudo realizado com 1.947 pacientes grávidas atendidas no Sistema Único de Saúde (SUS) do Rio de Janeiro entre os anos de 2007 e 2008, foram diagnosticadas 187 gestantes com hipertensão arterial representando aproximadamente 10% da população estudada (VETTORE *et al.*, 2011). Atualmente, com o índice brasileiro de 69 mortes por 100 mil nascidos vivos, a maior causa de morte das mães ainda é o aumento da PA durante a gravidez.

A gravidez pressupõe o crescimento de um ser geneticamente diferente dentro do útero da progenitora, uma vez que herdou metade dos genes do advindos do progenitor. A rejeição do feto não ocorre devido ao desenvolvimento de mecanismos imunológicos que o protegem durante toda a gestação. Porém, em alguns casos pode ocorrer falha em alguns desses mecanismos protetores e uma resposta imunológica da gestante pode agredir as paredes dos vasos sanguíneos, causando vasoconstrição e consequente aumento da PA (STEENGERS *et al.*, 2010). As síndromes hipertensivas são as principais causas de morte materna tanto em países desenvolvidos e em desenvolvimento e compromete cerca de 5% a 10% de todas as gestações (CAETANO *et al.*, 2004). Entre os problemas mais comuns encontrados em pacientes grávidas com crise

hipertensiva estão a pré-eclâmpsia e a eclâmpsia. A hipertensão arterial específica da gravidez recebe o nome de pré-eclâmpsia e, em geral, instala-se a partir da 20<sup>a</sup> semana, especialmente no 3<sup>o</sup> trimestre, principalmente em pacientes hipertensas crônicas, primigestas e diabéticas. A pré-eclâmpsia, além de apresentar início e progressão imprevisíveis é incurável, exceto pela interrupção da gravidez. Caracterizada por aumento da pressão arterial (PA) e proteinúria com patogênese ainda não esclarecida e o seu diagnóstico específico depende do reconhecimento e acompanhamento criterioso dos sinais e sintomas. A pré-eclâmpsia pode evoluir para eclâmpsia, uma forma grave da doença, que é caracterizada clinicamente por fortes convulsões provocadas por um quadro clínico de pressão arterial, edema e proteinúria muito elevados e apresenta risco de morte eminente para mãe e feto (STEENGERS *et al.*, 2010).

Diferentes estudos têm investigado os mecanismos envolvidos nestas alterações, uma vez que, normalmente, ao final da gestação ou da prenhez em animais, é observada redução de pressão arterial. Os mecanismos fisiológicos envolvidos na hipotensão associada ao final da gravidez/prenhez ainda não estão totalmente esclarecidos. Com o conhecimento destes mecanismos, poderemos identificar alvos potenciais para a terapêutica farmacológica e clínica direcionada ao tratamento da hipertensão na gravidez.

### **1.1 A HIPOTENSÃO NA GRAVIDEZ/PRENHEZ**

Em diferentes espécies de mamíferos, a gestação é responsável por promover no organismo importantes alterações hemodinâmicas. Nos períodos finais da gestação é observado um aumento significativo de 60% no volume sanguíneo, em média, e de 40% no débito cardíaco (DC) (BARRON *et al.*, 1984). Entre as alterações relacionadas ao sistema circulatório, as associadas à circulação uterina destacam-se, pois, o fluxo sanguíneo uterino aumenta cerca de 4 vezes em ratas prenhas quando comparadas a ratas virgens (MOOR & BRUCE, 1976). Na circulação uteroplacentária, as artérias uterinas sofrem um processo de dilatação fisiológica ocasionando uma redução da resistência vascular (BROSENS, 1964; LYALL *et al.*, 1995). Mesmo a frente destas

alterações de volume, DC e fluxo sanguíneo placentário, ocorre a diminuição significativa da PA nos períodos finais da prenhez (PAGE & OGEN; 1947; COELHO *et al.*, 1997) de ratas, normotensas ou hipertensas.

A pressão sanguínea resulta da interação da força com que o coração bombeia o sangue e a resistência para a passagem deste fluxo bombeado ou resistência vascular periférica (RVP) (CRIMI *et al.*, 2007). Com isso, a PA é resultante do fluxo sanguíneo pela RVP e a interação fisiológica desse mecanismo deve gerar uma perfusão tecidual adequada (BRODY, 1986; CRIMI *et al.*, 2007). Considerando a circulação como um todo, o fluxo total de sangue que deixa o ventrículo esquerdo é chamado de débito cardíaco (DC), que depende, essencialmente, da: frequência cardíaca (FC), contratilidade do miocárdio, pré-carga e pós-carga do ventrículo esquerdo. Por outro lado, a resistência vascular periférica total (RVPT) se refere a pós-carga ou a resistência à passagem do fluxo sanguíneo vindo do ventrículo esquerdo. A RVPT depende, além da viscosidade do sangue e do comprimento dos vasos, do tônus vascular que altera o raio (ou calibre) dos vasos e que é mantido por diferentes substâncias (AALKJAER *et al.*, 2011). Uma das principais substâncias vasodilatadoras que participa do controle contínuo do tônus vascular é o óxido nítrico (NO) (MONCADA *et al.*, 1988, 1991).

Possíveis alterações nos processos fisiológicos que determinam a redução da resistência vascular periférica ao final da prenhez, estariam associadas a complicações gestacionais como a hipertensão na gravidez. A teoria chamada de "lesão endotelial" sugere que devido a uma disfunção endotelial, haveria aumento da resistência vascular periférica culminando então em picos de hipertensão arterial (MORRIS *et al.*, 1996; LYALL & GREER, 1995; WULFF *et al.*, 2003; KAUFMANN *et al.*, 2003; SVEDAS *et al.*, 2003). A fisiopatologia da disfunção endotelial é complexa e envolve múltiplos mecanismos. O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento de disfunção endotelial, redução no relaxamento vascular, espessamento da túnica média e estreitamento do lúmen vascular. É resultado do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou de uma diminuição da remoção destas espécies pelo sistema antioxidante (GEISZT, 2006). Além de ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de disfunção endotelial por seus efeitos

diretos sobre a membrana das células, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pode interferir em vários passos da cascata de eventos que leva ao relaxamento do MLV mediado pelo NO (HAMILTON *et al.*, 2001). A disfunção endotelial muito estudada em modelos experimentais de hipertensão arterial apresenta maior dificuldade para estudo em modelos experimentais de hipertensão associada à prenhez uma vez que, interessantemente, em ratas espontaneamente hipertensas (SHR), ao final de uma prenhez é observada uma queda significativa na PA. Estes efeitos, aparentemente contraditórios, levaram aos estudos sobre os mecanismos envolvidos na hipotensão arterial associada ao final da prenhez tanto em ratas normotensas quanto em ratas hipertensas.

Vários estudos demonstraram que o final da gravidez/prenhez estaria associado a um aumento significativo da atividade da enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) o qual poderia ser associado ao aumento da ação vasodilatadora do NO em diferentes vasos sanguíneos (COELHO *et al.*, 1997; BALLEJO *et al.*, 2002; SULLIVAN *et al.*, 2006)

No entanto, outros estudos demonstraram que o aumento da atividade da eNOS não estava diretamente associado com o aumento do efeito vasodilatador dependente do endotélio. No estudo realizado por COELHO *et al.* (1997) foi demonstrado que a redução da PA observada ao final da prenhez de ratas normotensas e SHR não estava associada a um possível aumento do efeito vasodilatador em leitos mesentéricos isolados, mas sim a uma significativa redução da atividade simpática perivascular. Resultados prévios obtidos por nosso grupo (BALLEJO *et al.*, 2002) mostraram que as respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio estimuladas por acetilcolina ou por A23187 (ionóforo que cálcio) em aortas de ratas prenhas, e por acetilcolina, bradicinina, nitroprussiato de sódio, forskolin, HOE 244, isoproterenol, adenosina e capsaicina em leitos mesentéricos isolados de ratas prenhas (COELHO *et al.*, 1997), não estavam alteradas quando comparadas às respostas observadas em ratas em estro. Estes resultados sugeriram que a reatividade do músculo liso vascular a estímulos vasodilatadores, independentemente de seus mecanismos, não está alterada e que, provavelmente, não contribuiriam para a hipotensão observada ao final da prenhez/gravidez.

No entanto, o aumento dos níveis de PA promovido por infusão *in vivo* de angiotensina, arginina-vasopressina e noradrenalina, e também as respostas vasoconstritoras de diferentes vasos sanguíneos de ratas prenhas a estes agentes estavam significativamente diminuídas quando comparadas às observadas em ratas não prenhas (PALLER, 1984; UMANS *et al.*, 1990; MOLNÁR & HERTELENDY, 1992; NATHAN *et al.*, 1995). Na maioria dos estudos realizados com leitos mesentéricos *in situ* ou isolados de ratas normotensas ou SHR no final da prenhez também foram observadas respostas vasoconstritoras diminuídas frente à estimulação por fenilefrina, vasopressina, endotelina e serotonina, apesar de alguns estudos não encontrarem alterações na reatividade destas preparações à angiotensina ou noradrenalina (MASSICOTTE *et al.*, 1987; CHU & BEILIN, 1993a, 1993b; RALEVIC & BURNSTOCK, 1996; COELHO *et al.*, 1997; BALLEJO *et al.* 2002). Outros estudos demonstraram uma diminuição significativa na reatividade vascular aos agonistas adrenérgicos, noradrenalina e fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas superiores ou de pequeno calibre (entre 165-250  $\mu\text{m}$ ) (CRANDALL *et al.*, 1990; PARENT *et al.*, 1990; DAVIDGE & MC LAUGHLIN, 1992), de artéria caudal (DOGTEROM & DE JONG, 1974), aorta torácica (ST LOUIS & SICOTTE, 1995; ALOAMAKA *et al.*, 1993) e artérias uterinas de ratas prenhas (NI *et al.*, 1997). Estes estudos demonstraram que a prenhez estaria associada a respostas pressoras e vasoconstritoras reduzidas em ratas normotensas ou hipertensas, apesar de algumas controvérsias quanto às alterações destas respostas em relação à noradrenalina e angiotensina II (CHU & BEILIN, 1993b; COELHO *et al.*, 1997). Estudos prévios conduzidos em aorta de ratas Wistar ao final da prenhez demonstraram menor reatividade à fenilefrina e vasopressina, mas não à serotonina, sugerindo que na prenhez a hiporreatividade vascular não deveria ser, a princípio, generalizada a todos os agentes vasoconstritores (ANTONIALI, 2001, tese de doutorado).

A hiporreatividade vascular a agentes contráteis associada a gestação/prenhez pode ocorrer por mecanismos endócrinos ou vasculares (WEINER & THOMPSON, 1997; ANUMBA *et al.*, 1999). Entre os mecanismos vasculares, tem sido atribuída uma importante participação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDFRs) com destaque ao óxido nítrico (NO) (SELIGMAN

*et al.*, 1994; DORUP *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstram que a remoção mecânica do endotélio vascular ou a administração de inibidores da eNOS, aumenta a reatividade a agonistas vasoconstritores (MORRIS *et al.*, 1996). Em aortas de ratas Wistar prenhas, mostramos que a hiporreatividade à fenilefrina depende da presença do endotélio e da atividade da eNOS (BALLEJO *et al.*, 2002). Neste estudo, mostramos também que a N-Nitro-L-arginine (L-NNA), inibidor não seletivo da eNOS, induziu aumento da contração, concentração-dependente, de anéis de aorta estimulados com a concentração efetiva 20 (CE20) de fenilefrina, que estava significativamente reduzida em aortas de ratas prenhas, sugerindo um possível aumento da atividade da eNOS nestes vasos. Entretanto, a atividade específica da eNOS medida em homogenatos de artérias mesentéricas e de aortas foi similar entre os tecidos de ratas prenhas e não prenhas em estro (BALLEJO *et al.*, 2002). Apesar de aparentemente contraditórios, os resultados indicavam que no final da prenhez, a hiporreatividade de diferentes vasos a agonistas vasoconstritores estaria relacionada a um aumento na produção de NO, basal ou induzido diretamente ou indiretamente por agonistas vasoconstritores e este aumento da produção de NO seria dado por mecanismos diferentes dos envolvidos na resposta vasodilatadora à acetilcolina ou do A23187.

Resultados consistentes têm sugerido que além da via clássica de ativação eNOS, que ocorre a partir da formação do complexo cálcio/calmodulina ( $Ca^{2+}/CaM$ ) e é dependente do aumento intracelular de cálcio (SCHMIDT *et al.*, 1992; BUCKLEY *et al.*, 1995), a síntese de NO, em células endoteliais, pode ocorrer por uma via menos dependente de cálcio (FLEMING *et al.*, 2012). A produção de NO em células endoteliais, estimulada pelo aumento da tensão de cisalhamento ou "*shear stress*", ocorreria por uma via associada a menores aumentos nas concentrações intracelulares de cálcio (MULSCH *et al.*, 1989; FLEMING *et al.*, 2012).

SULLIVAN *et al.* (2006) elegantemente demonstraram que o aumento da atividade da eNOS medida em células endoteliais de artérias uterinas (em cultura) de ovelhas prenhas, ocorreria devido a alterações significativas na sensibilidade ao cálcio e na atividade de diferentes proteínas quinases envolvidas na regulação da atividade da eNOS. Uma via de fosforilação, sensível

ao Wortmannin (inibidor da PI3K-AKT) e dependente da atividade da AKT estaria relacionada ao aumento da produção de NO em células endoteliais na gravidez/prenhez.

## 1.2 ATIVIDADE DA eNOS FOSFORILADA

Em 1980, FURCHGOTT & ZAWADZKI descobriram que os mensageiros químicos responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos são derivados do endotélio, camada que reveste o interior do vaso sanguíneo. Eles nomearam essa molécula como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, do inglês endothelium-derived relaxing factor) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Mais tarde, Furchgott (FURCHGOTT, 1988) sugeriu, que o EDRF e o NO eram a mesma molécula. Logo depois, foi comprovado que o EDRF em questão era o NO (MONCADA *et al.*, 1988).

O NO participa da regulação do sistema cardiovascular (ANDREW & MAYER, 1999) e além da manutenção do tônus vascular, inibe a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos ao endotélio, a migração e proliferação de células lisas musculares (ALBRECHT *et al.*, 2003). O NO é sintetizado pela enzima NO sintase (NOS) que pode ser do tipo constitutiva (cNOS), dividida em NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), ou induzível (iNOS) (MONCADA *et al.*, 1991). A atividade enzimática da nNOS e eNOS (isoformas I e III, respectivamente), dependente, ou não, da ligação do cálcio ( $Ca^{2+}$ ) com a calmodulina (proteína de baixo peso molecular, que funciona como co-fator para ativar a eNOS). A eNOS, presente no endotélio vascular (MICHEL & VANHOUTTE, 2010; REES *et al.*, 1989), pode ser ativada pela acetilcolina (ACh), bradicinina, estresse de cisalhamento (*shear stress*), agregação plaquetária, entre outros fatores (MONCADA *et al.*, 1991). A partir do aumento da concentração de cálcio no interior da célula endotelial, haverá a formação do complexo cálcio-calmodulina que irá ligar-se a eNOS, ativando-a. Depois de ativada, há a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino do substrato, o aminoácido L-arginina, levando à geração de NO e citrulina (FLEMING & BUSSE, 1999). Esse efeito ocorre durante a ativação da conhecida via clássica de ativação da eNOS, porém a eNOS também pode ser ativada por fosforilação.



O NO formado pode agir como primeiro mensageiro que atuará na diminuição da concentração citoplasmática de cálcio no músculo liso vascular (MLV) e promover relaxamento muscular levando a vasodilatação (GEWALTIG & KOJDA; 2002; IGNARRO *et al.*, 1987; UMANS & LEVI, 1995).

Depois de ter sido produzido pelas células endoteliais, devido a sua capacidade lipofílica, o NO difunde-se até a célula do MVL e promove uma série de eventos, que resultam na diminuição da concentração de cálcio citosólico ( $[Ca^{2+}]$ ) (BLATTER & WIER 1994). Um desses eventos se deve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Quando o NO interage com ferro do grupo heme da enzima GCs, presente no citoplasma, altera a forma desta enzima tornando-a ativa. Depois de ativada, esta enzima catalisa a guanosina trifosfato (GTP) à guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (GEWALTIG & KOJDA, 2002; CRIMI *et al.*, 2007). A GMPc promove o relaxamento da MLV por meio da redução na liberação e aumento no sequestro de cálcio pelo retículo endoplasmático (BREDT, 1999; KHAZAEI *et al.*, 2008), conseqüentemente levando ao aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos e do fluxo sanguíneo com redução da PA (MONCADA & HIGGS, 1993).

A produção de NO através da fosforilação da eNOS foi inicialmente descrita por diferentes autores (AYAJIKI *et al.*, 1996; CORSON *et al.*, 1996; FLEMING *et al.*, 1998). O estudo de AYAJIKI *et al.* (1996) mostrou que o Erbstatin A, usado como inibidor da enzima tirosina-quinase, reduziu a produção de NO estimulada por *shear stress*. A eNOS seria um substrato da proteína quinase AKT, também conhecida como proteína quinase B, a qual é responsável por fosforilar os resíduos de serina (Ser 1179 ou 1177) da eNOS. O processo de fosforilação da eNOS reduz a dependência do aumento das concentrações intracelulares de cálcio para ativação da eNOS e produção de NO. A ativação da AKT está associada a PI3K (fosfatidilinositol-3-OH Kinase). Estudos realizados por FULTON & STALLONE (2002) e LÓPEZ *et al.* (2011) mostraram que a proteína quinase AKT pode fosforilar diretamente a eNOS em serina 1179 que conduz ao aumento na produção de NO nas células endoteliais. Um dado muito interessante mostra também que a fosforilação da eNOS estimulada por *shear stress* é dependente de PI3K em atividade, a qual é responsável pela fosforilação e ativação da eNOS em concentrações basais de cálcio intracelular. De acordo

com FLEMING & BUSSE (1999) na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e na presença de antagonistas da calmodulina, o *shear stress* ainda estimula e mantém a produção de NO endotelial, evidenciando a insensibilidade à diminuição de  $\text{Ca}^{2+}$  e mostrando a sensibilidade aos inibidores da tirosina quinase e inibidores de PI3K, uma vez que estes inibidores diminuem a produção de NO.

JIMÉNEZ *et al.* (2010) mostraram que a incubação de anéis de aortas de ratos Wistar com um inibidor da PI3K (LY-294002) reduziu fortemente o efeito vasodilatador do PPAR- $\beta$ , dependente do endotélio. Estes resultados sugeriram que esses agentes podem ativar a eNOS pela via independente de cálcio, sendo também sensíveis a ativação da via PI3K. No mesmo estudo, quando analisadas células endoteliais de veia umbilical humana, o aumento na produção de NO e a fosforilação da eNOS foram diminuídas quando inibida a via PI3K-AKT.

Apesar de ter sido inicialmente determinado que apenas resíduos de Serina estariam relacionados a fosforilação da eNOS, resíduos de treonina também participam dos mecanismos associados a fosforilação da eNOS. A fosforilação dos resíduos de Serina 1177 pela AKT/PK-B, PKA AMPK, aumenta a atividade específica da eNOS e a produção de NO é maior mesmo na ausência de um aumento significativo e mantido da  $[\text{Ca}^{2+}]$  (DIMMELER, *et al.*, 1999 e McCABE, *et al.*, 2000). Os resíduos de treonina 495 estariam constitutivamente fosforilados em células endoteliais não estimuladas (condições basais), e após a estimulação com bradicinina, estes resíduos de treonina seriam rapidamente defosforilados (FLEMING *et al.*, 2001) por uma via  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) dependente e sensível a calyculina A, inibidor de fosfatase 1 (PP1). A defosforilação dos resíduos de treonina 495 induzida pela bradicinina, aumenta a associação da eNOS com a calmodulina, e a mutação da treonina 495 por alanina, aumenta a ligação da calmodulina a eNOS mesmo na ausência da estimulação celular. Tem sido proposto então que a defosforilação da eNOS nos resíduos de treonina 495 seria importante por facilitar a associação da eNOS com a calmodulina e conseqüentemente ativação, enquanto que a fosforilação da eNOS nos resíduos de serina 1177, levaria ao aumento da sensibilidade ao cálcio, e ativação da eNOS em condições basais, ou em condições não associadas a aumentos significativos da concentração de cálcio intracelular.

Em estudos prévios conduzidos por nosso grupo, conseguimos medir a atividade específica da eNOS, por conversão de arginina marcada em citrulina, na presença de calmodulina, em concentrações de 0,1 mM de cálcio, 15 vezes menor do que a sugerida como concentração ideal (1,5 mM) para medida da atividade da NOSe (ANTONIALI, 2001). Nestas condições, maior atividade da eNOS foi observada em homogenatos de aortas de ratas prenhas do que de ratas em estro.

Até o presente momento não encontramos na literatura estudos que correlacionassem a hiporeatividade de aortas a fenilefrina, observada ao final da prenhez de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR), com a possível fosforilação da eNOS. Nossa hipótese é que a contração de aortas estimulada por fenilefrina ative a via PI3K/AKT, aumentando a atividade da eNOS e a modulação do endotélio vascular em aortas de ratas normotensas e hipertensas ao final da prenhez. Como a disfunção endotelial é um dos fatores associados a manutenção da hipertensão em SHR, ao testarmos nossa hipótese em aortas de SHR prenhas, provavelmente observaremos uma possível reversão da disfunção endotelial.

# ***OBJETIVOS***

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi avaliar se o Wortmannin, um inibidor da PI3K-AKT, poderia alterar a hiporreatividade de anéis de aortas a fenilefrina e as concentrações citosólicas de óxido nítrico (NO), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e espécies reativas de oxigênio (ERO) em células endoteliais de aortas de ratas normotensas Wistar (WST) e espontaneamente hipertensas (SHR).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Verificar se a prenhez altera a parâmetros cardiovasculares (pressão arterial média e frequência cardíaca ) de ratas WST e SHR;
- 2) Verificar se as alterações nos parâmetros cardiovasculares poderiam ser associadas a possíveis alterações na sensibilidade barorreflexa de ratas WST e SHR ao final da prenhez;
- 3) Verificar se a prenhez altera as respostas pressoras à Fenilefrina e hipotensoras a Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS);
- 4) Verificar a prenhez altera a contração concentração-dependente induzida por Phe e relaxamento concentração-dependente induzido por ACh em aortas intactas de ratas normotensas e hipertensas;
- 5) Verificar se o Wortmannin, inibidor PI3K-Akt-eNOS, altera a reatividade de aortas intactas de ratas WST e SHR prenhas à Phe;
- 6) Quantificar a concentração citosólica de NO, basal e estimulado por ACh e Phe em células endoteliais de aortas de ratas WST e SHR prenhas e avaliar o efeito do Wortmannin nestas concentrações após estímulo com Phe;

6) Quantificar a concentração citosólica  $\text{Ca}^{2+}$ , basal e estimulada por ACh e Phe em células endoteliais de aortas de ratas WST e SHR prenhas, o efeito do Wortmannin nestas concentrações após estímulo com Phe;

7) Quantificar a concentração citosólica de ERO, basal e estimulada por ACh e Phe em células endoteliais de aortas de ratas WST e SHR prenhas, o efeito do Wortmannin nestas concentrações após estímulo com Phe;

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (CEEA-FOA/UNESP), protocolo no. 1495/2012.

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas de 10 a 12 semanas, normotensas Wistar (WST), com PAS < 150 mmHg e espontaneamente hipertensas (SHR), com PAS ≥ 150 mmHg, verificada por pletismografia de cauda (PowerLab, ADInstruments, Melbourne, Austrália). As SHR foram provenientes de uma linhagem mantida pelo biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP. Nesta idade, as ratas SHR apresentavam peso corporal 200± 10g e as ratas WST, que foram fornecidas pelo biotério central da mesma faculdade, tinham peso corporal de 215 ± 5,8g. As ratas receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidas em condições controladas de temperatura (22-24°C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro). As ratas foram divididas em 4 grupos: ratas Wistar não prenhas (W – NP), prenhas (W – P), SHR não prenhas (SHR – NP) e prenhas (SHR – P). Para o acasalamento foram utilizados ratos das respectivas linhagens SHR (PAS ≥ 150 mmHg) ou WST (PAS ~ 110 mmHg). O dia zero de prenhez foi determinado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. As ratas não prenhas foram utilizadas na fase estro do ciclo estral e as ratas prenhas, no período final de prenhez, entre o 19<sup>o</sup>-20<sup>o</sup> dia.

#### 3.2 DROGAS E SONDAS UTILIZADAS

Utilizamos diferentes drogas e sondas nos experimentos realizados:

- Cloridrato de L-Fenilefrina - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): fenilefrina (Phe);
- Clorato de Acetilcolina- SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): acetilcolina (ACh);



- Nitroferricianeto (III) de Sódio - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): Nitroprussiato de Sódio (NPS);
- Wortmannin - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): WORT;
- DimethylSulfoxide - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): DMSO (veículo);
- 4,5-diaminofluoreceína - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): DAF-2DA;
- Dihidroetidina - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): DHE;
- Fluo 3-AM - SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA): FLUO.

Para os experimentos *in vivo* as drogas Phe, ACh e NPS foram diluídas em solução fisiológica (0,9% ou 0,15 M NaCl).

As soluções de WORT e das sondas DAF, FLUO e DHE foram primeiramente diluídas em DMSO, conforme orientado pelo fabricante. Todas as soluções foram divididas em alíquotas, protegidas da luz e congeladas a -20°C até a utilização. No dia dos experimentos, as drogas utilizadas foram diluídas em solução de Krebs para os experimentos de reatividade vascular e em solução de Hanks para os experimentos de citometria de fluxo.

### **3.3 EXPERIMENTOS *IN VIVO***

#### **3.3.1 MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)**

##### **A) Cirurgia para a implantação das cânulas**

As ratas foram anestesiadas com associação de quetamina (45 mg/Kg) e xilasina (5 mg/Kg) por via intraperitoneal. Durante a anestesia uma cânula de polietileno (PE10 conectada a PE50) preenchida com salina heparinizada foi implantada no interior da aorta abdominal, através da artéria femoral. Para a administração das drogas, também foi canulada a veia femoral. Estas cânulas foram exteriorizadas na região do dorso do animal. Após a cirurgia, as ratas foram mantidas em gaiolas individuais recebendo ração padrão e água *ad libitum* por um período de 24 horas, antes de iniciarmos os experimentos.

## B) Aquisição dos registros

Utilizamos um transdutor de pressão ligado à cânula intra-arterial, acoplado a um amplificador (ADInstruments, Melbourne, Australia). Os valores dos resultados obtidos com os registros foram calculados utilizando o software Labchart 7 (ADInstruments, Melbourne, Australia). A pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram continuamente registradas, nas ratas não anestesiadas, por período de 30 minutos de estabilização.

### 3.3.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORRECEPTORA

A sensibilidade dos barorreceptores foi determinada a partir de flutuações espontâneas na PAS, PAM e FC utilizando o método de séries temporais, validado para ratos (STAUSS *et al.*, 2006), conhecido como método da sequência. A partir dos registros de PAS, PAM e FC pelo Labchart 7, pudemos obter a série batida por batida. Selecionamos uma região estável do traçado e convertimos em pontos de dados a cada 100 ms usando spline cúbico de interpolação (10 Hz) e pelo próprio Labchart esses dados puderam ser convertidos em valores numéricos. A média da PAS, PAM e FC foram calculadas, para então serem usadas para análise pelo software de computador Cardio Series (Cardio Series v1.2, Brasil) - <http://sites.google.com/site/cardioseries>. As séries interpoladas foram divididas em conjuntos sequenciais de 512 pontos de dados (51,2 s), sobrepostos em 50%, os quais foram testados para a estacionaridade. É importante lembrar que a análise de variabilidade cardiovascular por meio de análise espectral requer uma série de dados estacionária, isto é, média e covariância estável ao longo do tempo (BERNTSON *et al.*, 1997; PORTA *et al.*, 2004). A estacionariedade dos dados pode ser verificada por meio de testes de estacionaridade, ou seja, melhor reprodutibilidade dos resultados entre os usuários e laboratórios (MAGAGNIN *et al.*, 2011; PORTA *et al.*, 2004), bem como através de inspeção visual dos dados da série (DIAS *et al.*, 2010; VAN DE BORNE *et al.*, 1997), onde os trechos de

série com maior estabilidade foram escolhidos, descartando trechos iniciais e finais.

### **3.3.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PRESSORA À Phe E VASODILATADORAS À ACh E NPS**

Após o período de estabilização, os parâmetros cardiovasculares foram registrados em condições basais e após a administração das drogas: Phe (8µg/kg), ACh (10µg/kg) e NPS (35µg/kg). Calculamos a variação ( $\Delta$ ) entre os parâmetros basais de PAM e FC e o efeito agudo causado pela infusão da dose de cada droga utilizada.

## **3.4 EXPERIMENTOS *IN VITRO***

### **3.4.1 REATIVIDADE VASCULAR**

As ratas foram pré-anestesiadas em uma câmara saturada com Halotano (Tanohalo® - Cristália) e logo após, mortas por decapitação. Em seguida, a aorta torácica foi removida, dissecada e cortada em anéis de 2mm. Os anéis foram posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável e conectado a um transdutor de força isométrica para medir a tensão no vaso (DMT – Adinstruments, Melbourne, Australia). Foram mantidos em cuba contendo solução de Krebs com a seguinte composição (mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; glicose 5,5; CaCl<sub>2</sub> 1,6; com pH 7,4 e suprimento gasoso de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Os anéis permaneceram por 60 minutos em tensão basal constante de 30 mN para estabilização. Após a estabilização, a presença do endotélio foi testada: os anéis foram estimulados com Phe (100 nM) e a integridade do endotélio foi qualitativamente verificada pelo grau de relaxamento causado por ACh (1 µM). O endotélio foi considerado presente quando a estimulação com ACh causava 80% de relaxamento. Após estes procedimentos, os experimentos foram realizados conforme os protocolos descritos abaixo.

#### **3.4.1.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE AORTAS À Phe E ACh.**

Anéis de aorta com endotélio, das ratas dos diferentes grupos, foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de Phe (1nM a 10  $\mu$ M). Outros anéis de aortas com endotélio foram inicialmente pré-contraídos com a concentração-efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) de Phe e durante a contração mantida, foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de ACh (1nM a 10  $\mu$ M).

As curvas concentração-efeito para Phe e ACh foram analisadas e os valores de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e de  $pD_2$  (-log da  $CE_{50}$ ) foram calculados. O  $E_{max}$  foi expresso em força de contração (milinewton, mN) para as curvas de Phe e em porcentagem (%) de relaxamento em relação à resposta contrátil estimulada por Phe, para as curvas de ACh. Os valores de  $pD_2$  foram obtidos a partir da curva de regressão não-linear, com auxílio do programa GraphPad Prism 3.0.

Os valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos resultados obtidos e comparados entre os grupos.

#### **3.4.1.2 EFEITO DO WORTMANNIN NA REATIVIDADE DE AORTAS À ACh E À Phe.**

Anéis de aortas com endotélio pré-contraídos com a  $CE_{50}$  de Phe, foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de ACh (1nM a 10  $\mu$ M). Em seguida, as aortas foram lavadas até o tônus basal e depois incubadas por 30 minutos com WORT 100 nM. Após o tempo de incubação, novas curvas concentração-efeito para ACh (1nM a 10  $\mu$ M) foram realizadas na presença do inibidor. As curvas para ACh obtidas na ausência ou na presença de WORT foram comparadas entre os anéis de ratas prenhas e em estro, normotensas e hipertensas.

Da mesma forma, anéis de aorta com endotélio foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de Phe (1nM a 10  $\mu$ M). Em seguida, as

aortas foram lavadas até o tônus basal e incubadas por 30 minutos com Wortmannin (WORT). Inicialmente, usamos a mesma concentração de WORT usada no estudo de LÓPEZ *et al.*, (2011), 100 nM. No entanto, em nossos experimentos iniciais, observamos, diferentemente do demonstrado nos estudos da literatura, que na presença de 100 nM de WORT, ocorria uma redução importante da reatividade de aortas estimuladas com Phe, não permitindo a quantificação da resposta contrátil. Com isso testamos outras concentrações de Wortmannin. Assim, a concentração de 10 nM foi determinada como a concentração ótima para os experimentos. Como queríamos fazer uma correlação direta entre os estudos de reatividade vascular e de citometria de fluxo, repetimos os experimentos de reatividade vascular à Phe na presença do WORT na concentração de 10 nM (os quais serão mostrados neste estudo).

### 3.4.2 CITOMETRIA DE FLUXO

As ratas WST e SHR, em estro ou prenhas, foram pré-anestesiadas em uma câmara saturada com Halotano (Tanohalo® - Cristália) e logo após mortos por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (15 mm) foram isolados, dissecados dos tecidos adjacentes, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa (CaCl<sub>2</sub> 1,6 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 1,0 mmol/L; NaCl 120,0mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pelete* foi resuspendido em 6000 µL de solução de Hanks. Partes desta suspensão foram colocadas em tubos de poliestireno para citometria de fluxo, para a obtenção de 3x10<sup>6</sup> contagens ou eventos (células endoteliais). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™ - APPLIEDBD Biosciences, USA) e do software BD CellQuest™ Pro Software Analysis®, APPLIEDBD Biosciences, USA) gentilmente disponibilizado para uso pelo Prof. Dr. Maurício L. Nogueira do Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

#### **3.4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NO ( $[NO]_c$ ) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ESTIMULADAS OU NÃO COM ACh E Phe, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE WORT.**

Para a quantificação da  $[NO]$  nas células endoteliais, a suspensão de células endoteliais sem qualquer estímulo foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). As células foram incubadas com a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoreceína - DAF- 2/DA ( $10 \mu\text{mol/L}$  – 20 min) e excitadas com laser azul, em 488nm com emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada, em ausência (basal) ou presença de estimulação com Phe (100 nM) e ACh ( $1 \mu\text{M}$ ). A estimulação com Phe também foi avaliada na presença do bloqueador WORT (10 nM).

#### **3.4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO ( $[Ca^{2+}]_c$ ) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ESTIMULADAS OU NÃO COM ACh E Phe, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE WORT.**

Para a quantificação da  $[Ca^{2+}]$  as células endoteliais foram submetidas à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). As células foram incubadas com a sonda fluorescente Fluo 3-AM ( $5 \mu\text{mol/L}$  – 20 min) e excitadas com laser azul, em 488nm com emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada, na ausência (basal) ou presença de estimulação com Phe (100 nM) e ACh ( $1 \mu\text{M}$ ). A estimulação com Phe também foi avaliada na presença de WORT (10 nM).

#### **3.4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ( $[ERO]$ ) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ESTIMULADAS OU NÃO COM ACh E Phe, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE WORT .**

Para a quantificação da  $[ERO]$ , as células endoteliais foram submetidas a leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). As células foram

incubadas com a sonda fluorescente Dihidroetidina - DHE (2,5 µmol/L – 20 min) e excitadas com laser azul, em 488nm com emissão de 585/42 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada, na ausência (basal) ou presença de estimulação com Phe (100 nM) e ACh (1µM). A estimulação com Phe também foi avaliada na presença do bloqueador WORT (10 nM).

Foram analisados os traçados citofluorográficos (*dotplots*) gerados pelo o software BD CellQuest™ Pro Software Analysis®, APPLIED BD Biosciences, USA, após a leitura das amostras pelo citômetro a partir da determinação prévia do grupo celular de interesse de acordo com o tamanho e granulosidade específicas. Os histogramas obtidos descreveram os fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram expressos como a média ± EPM (erro padrão da média) dos valores obtidos. Em relação à análise barorreflexa e variação de PAM ou FC, os resultados foram calculadas aplicando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{PAM depois da droga} - \text{PAM antes da droga}}{\text{PAM antes da droga}} \times 100$$

Calculamos a % Δ da PAM ou FC individual e depois calculamos a média de cada grupo (n=6). Análise de variância (ANOVA) two-way foi utilizada para comparação dos resultados entre as ratas normotensas e hipertensas, em estro ou prenhas. Foi aplicado o pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os valores de Emax e pD<sub>2</sub> foram comparados entre as preparações de aortas de ratas WST e SHR, não prenhas (em estro) e prenhas. Análises de variância two-way (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni foram utilizadas para

comparação dos resultados entre os grupos. As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos nos experimentos de citometria 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-3AM e DHE. Os resultados foram comparados entre os grupos, utilizando teste de multivariância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



# ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

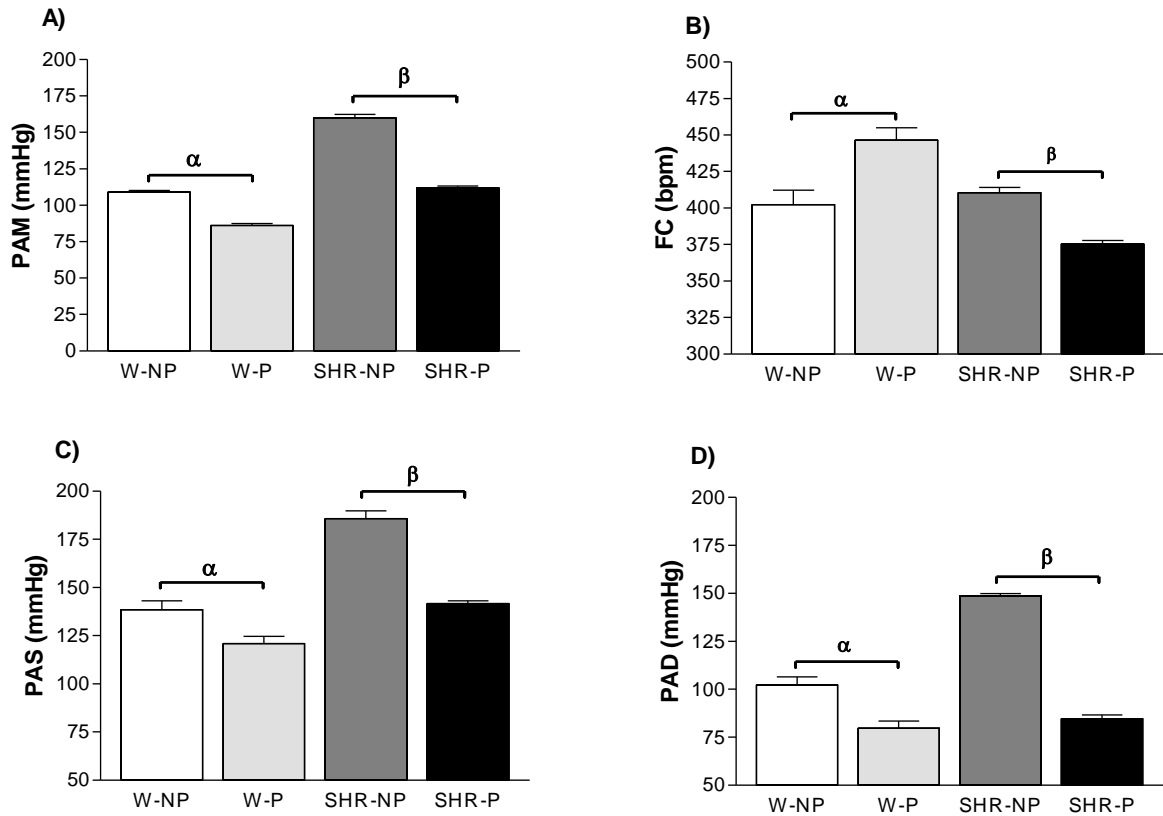
### 4.1 A PRENHEZ REDUZ A PAM EM RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS, AUMENTA A FC EM RATAS NORMOTENSAS, MAS REDUZ A FC EM RATAS HIPERTENSAS

Na Figura 1, observamos os resultados obtidos com a avaliação da PAM em A, FC em B, PAS em C e PAD em D dos grupos estudados.

Observamos que a PAM foi 30% menor nas SHR-P ( $111,8 \pm 1,3$  mmHg) e 21% menor nas W-P ( $86,1 \pm 1,3$  mmHg) em relação às SHR-NP ( $160,1 \pm 2,3$  mmHg) ou W-NP ( $108,9 \pm 1,6$  mmHg), respectivamente.

Menores valores de PAS foram observados nas W-P em relação às W-NP ( $120,9 \pm 3,6$  vs  $138,4 \pm 4,7$  mmHg, respectivamente). Nas SHR-P, a queda dos valores de PAS em relação às SHR-NP, foi mais pronunciada ( $141,6 \pm 1,4$  vs  $185,8 \pm 4,0$  mmHg) quando comparamos com a queda das W-P em relação às W-NP. As SHR-NP foram as que apresentaram maiores pressões sistólicas em relação aos outros grupos. Também observamos redução dos valores de PAD em ratas prenhas. Essa redução foi mais evidente nas SHR-P em relação às SHR-NP ( $84,7 \pm 1,9$  vs  $148,7 \pm 1,2$  mmHg, respectivamente), quando comparada à redução observada nas WST-P em relação às W-NP ( $79,6 \pm 3,7$  vs  $92,2 \pm 4,2$  mmHg, respectivamente).

Simultaneamente, verificamos a FC das ratas WST e SHR em estro ou ao 19º - 20º dia de prenhez. Observamos que a FC das W-P ( $446,4 \pm 0,6$  bpm) foi significativamente maior em relação às W - NP ( $402,4 \pm 0,8$  bpm). Este efeito não foi observado nos grupos de SHR, onde a FC das SHR-P ( $375,2 \pm 1,5$  bpm) foi significativamente menor do que a FC das SHR-NP ( $388,6 \pm 3,6$  bpm).

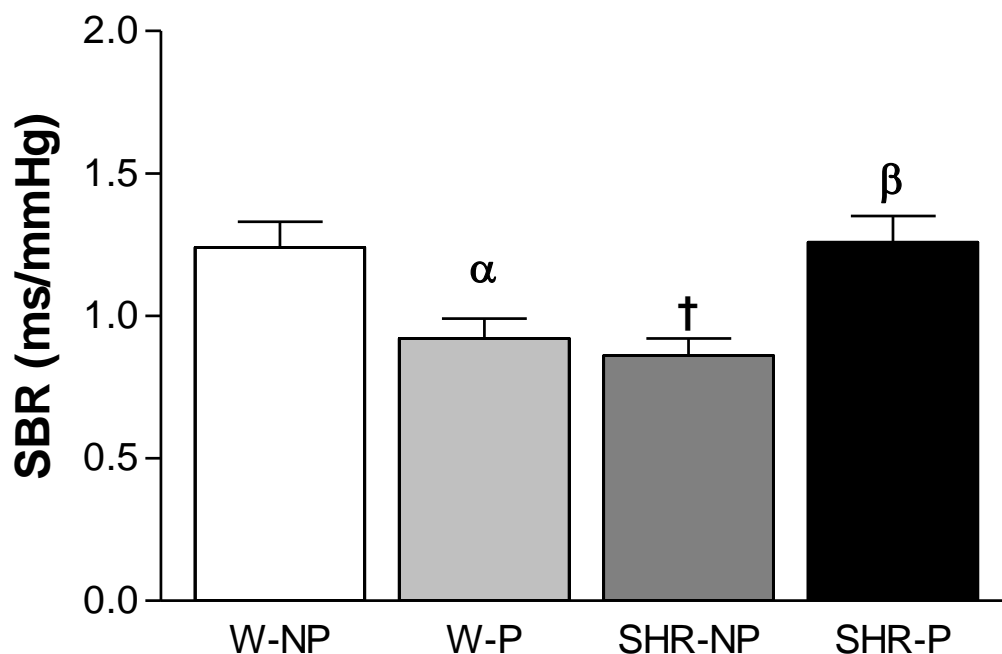


**Figura 1.** Medida direta de (A) pressão arterial média (mmHg), (B) da frequência cardíaca (bpm), (C) pressão arterial sistólica (mmHg) e (D) pressão arterial diastólica (mmHg), de ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $^{\alpha}p < 0,05$  W-NP vs W-P;  $^{\beta}p < 0,05$  SHR-NP vs SHR-P, em A, B, C, D.

#### 4.2 A PRENHEZ REDUZ A SENSIBILIDADE BARORRECEPTORA REFLEXA (SBR) EM RATAS NORMOTENSAS, MAS REVERTE A BAIXA SBR EM RATAS HIPERTENSAS.

A partir dos mesmos registros obtidos com a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, utilizando o método da sequência, avaliamos a SBR, dada em milissegundos por milímetros de mercúrio (ms/mmHg), na hemodinâmica cardiovascular de W-NP ( $1,24 \pm 0,09$  ms/mmHg) e W-P ( $1,01 \pm 0,07$  ms/mmHg), SHR-NP ( $0,86 \pm 0,06$  ms/mmHg) e SHR-P ( $1,26 \pm 0,09$  ms/mmHg), como foi representado pela figura 2, abaixo. Observamos inicialmente, que a SBR é

menor em SHR-NP do que em W-NP. Na prenhez de ratas Wistar, há uma redução da SBR, mas interessantemente, em SHR, a prenhez reverte a reduzida SBR, aumentando para valores próximos aos observados em W-NP.



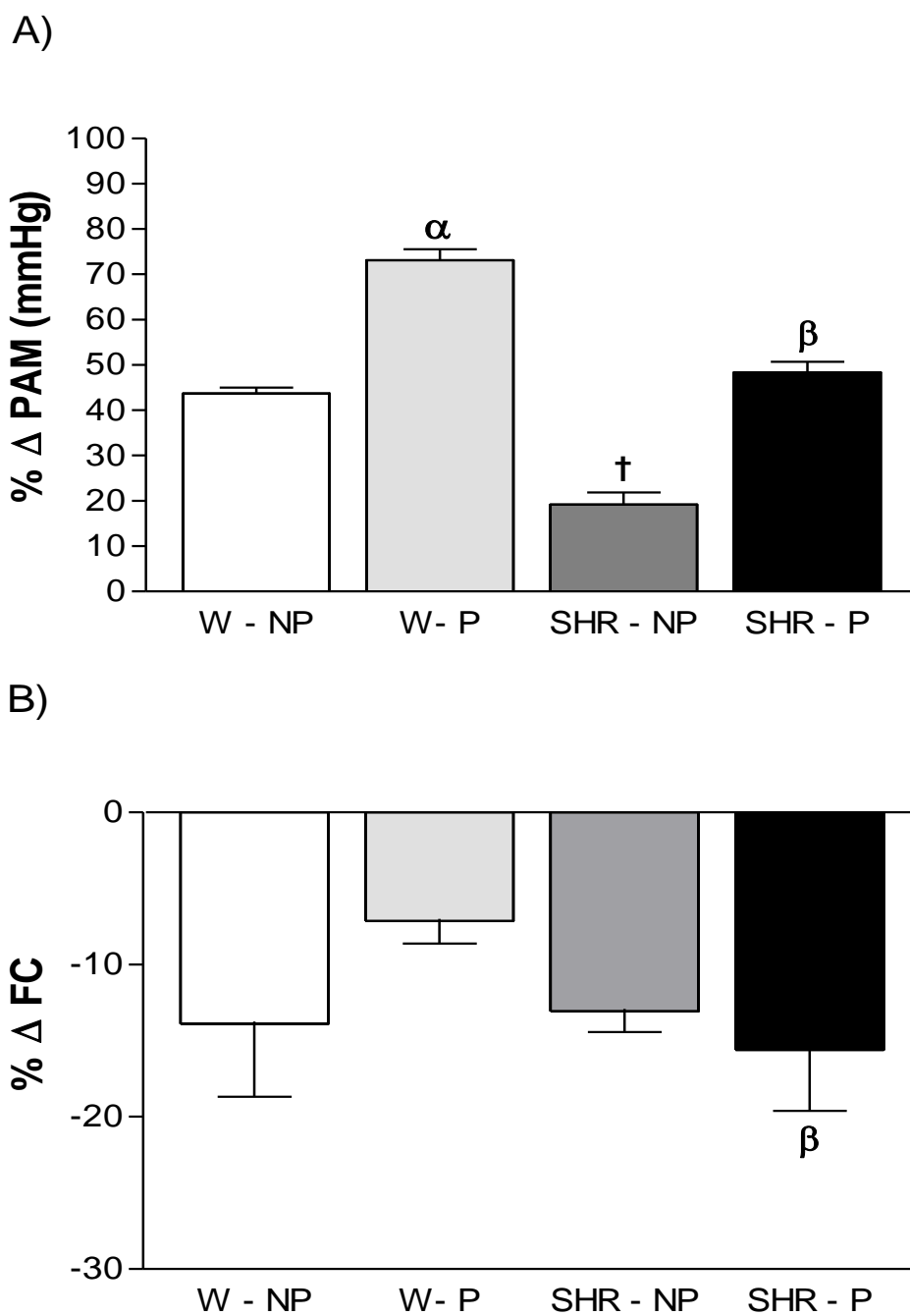
**Figura 2.** Sensibilidade barorreceptora reflexa (SBR – ms/mmHg) de W–NP, W-P, SHR- NP e SHR-P, n=8. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos. †p<0.05 SHR–NP x W–NP; α p<0,05 W-P x W- NP; β p<0,05 SHR-P x SHR–NP.

#### **4.3 UM MAIOR EFEITO PRESSOR À Phe É OBSERVADO EM RATAS PRENHAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS DO QUE EM RATAS NÃO PRENHAS.**

Após registro basal, administramos uma dose de Phe (8µg/Kg) e obtivemos um efeito agudo pressor que foi expresso em porcentagem de variação da PAM (% Δ PAM). A figura 3A mostra maiores respostas pressoras à Phe em ratas prenhas em relação às não prenhas. As W-P apresentaram maior resposta pressora em relação às W–NP (73,1 ± 2,3 vs 43,6±1,3, respectivamente). As SHR–NP (19,1 ± 2,6) apresentaram menor resposta pressora em relação a todos os outros grupos, mas em SHR–P a resposta

pressora à Phe foi maior que em SHR-NP ( $48,3 \pm 2,3$  vs  $19,1 \pm 2,6$ , respectivamente).

Verificamos ainda a porcentagem de variação da FC ( $\% \Delta$  FC, figura 3B) das ratas após a administração de Phe, que mostra o efeito bradicárdico reflexo, concomitante ao aumento da PAM. As W-NP apresentaram queda de frequência cardíaca de  $13,8 \pm 4,8$  que não foi diferente da observada nas W-P, nas quais esta queda foi de  $7,1 \pm 1,4$ , apesar da resposta pressora à Phe ter sido maior em W-P (Fig 3A). Entretanto, nas SHR-P, a queda foi de  $16,6 \pm 1,2$  maior do que observada nas SHR-NP ( $12,0 \pm 1,3$ ), conforme vemos na figura 3B.



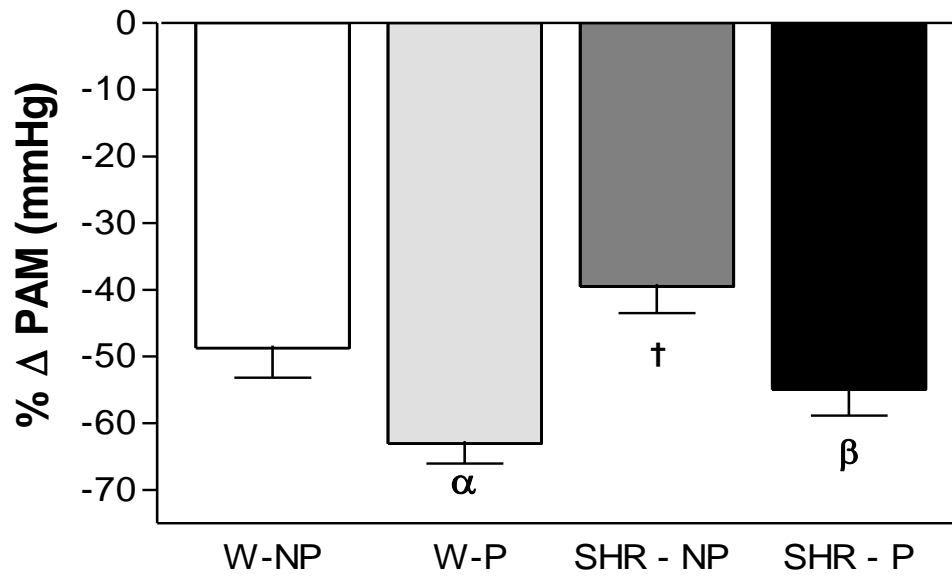
**Figura 3.** Porcentagem de variação (%  $\Delta$ ) da PAM (A) e da FC (B) após administração de Phe ( $8\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) em ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP,  $n = 8$ ) e ratas prenhas (W-P e SHR-P,  $n = 8$ ). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $\dagger p < 0,05$  SHR-NP em relação aos outros grupos;  $\alpha p < 0,05$  W-P vs W-NP;  $\beta p < 0,05$  SHR-P vs SHR-NP, em A e B.

#### **4.4 MAIORES EFEITOS HIPOTENSORES À ACh SÃO OBSERVADOS EM RATAS PRENHAS DO QUE EM RATAS NÃO PRENHAS.**

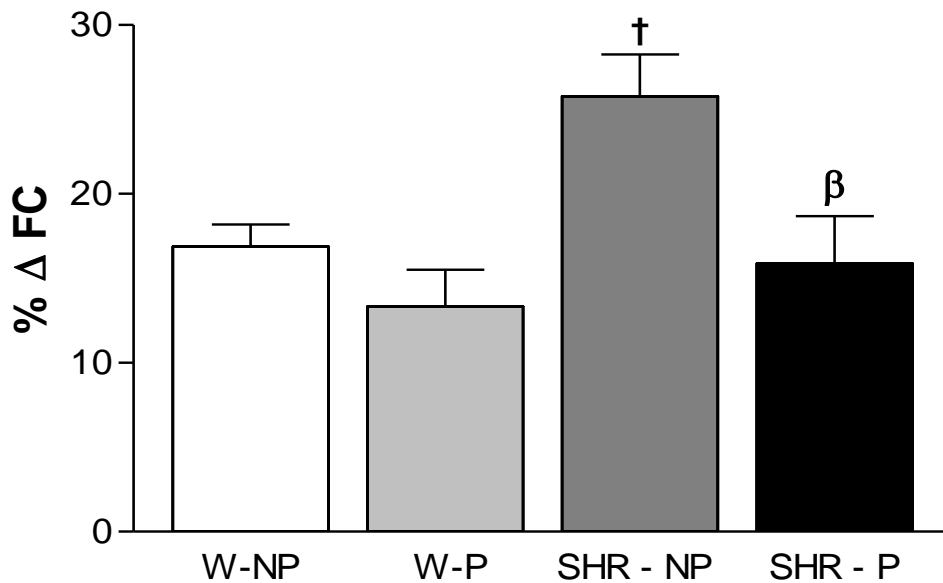
Após estabilização do registro em valores basais de PAM e FC, administramos uma dose de ACh (10 µg/Kg) e obtivemos um efeito agudo hipotensor expresso em porcentagem de variação (% Δ PAM, figura 4). As SHR-NP apresentaram menor resposta hipotensora à ACh que as W-NP. W-P apresentaram maior resposta hipotensora em relação às W-NP ( $-63,0 \pm 2,9$  vs  $48,7 \pm 4,4$ ). As SHR-P também apresentaram maior resposta hipotensora em relação às SHR-NP ( $-54,8 \pm 3,9$  vs  $-39,4 \pm 3,9$ ), como podemos observar na figura 4A. Não houve diferença no efeito hipotensor à ACh entre as ratas prenhas, normotensas e hipertensas.

A figura 4B mostra a porcentagem de variação da FC (% Δ FC) nas ratas após à administração de ACh, concomitante ao vale da curva da PAM. Observamos que as W-P apresentaram um aumento da FC de  $13,3 \pm 2,1$  que não foi diferente do observado nas W-NP, onde o aumento foi de  $16,9 \pm 1,2$ . Nas SHR-NP, o aumento foi mais pronunciado ( $25,8 \pm 2,4$ ) em relação aos outros grupos. Nas SHR-P esse aumento foi de  $15,9 \pm 2,7$ , menor do que o observado nas SHR-NP.

A)



B)



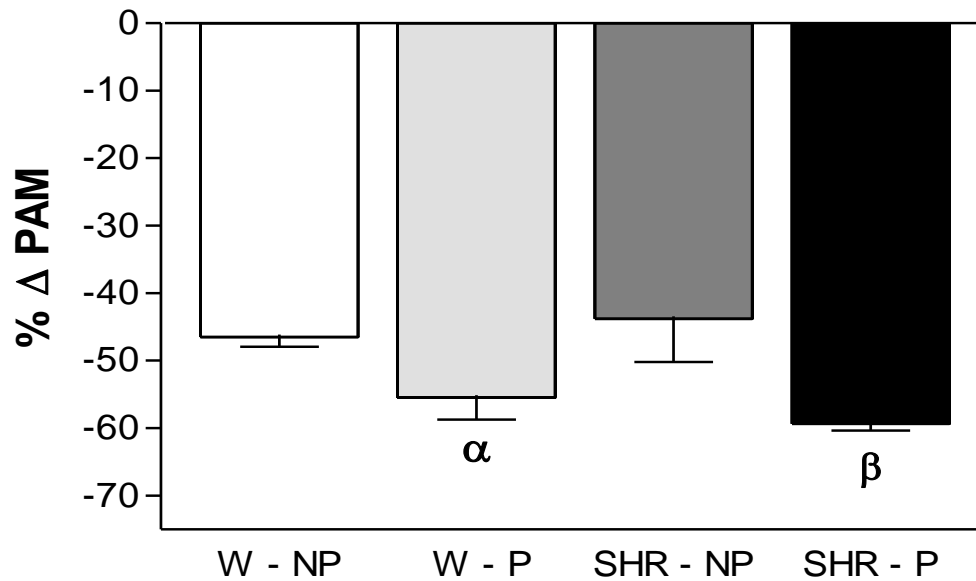
**Figura 4.** Porcentagem de variação (%  $\Delta$ ) da PAM (A) e da FC (B) após administração de ACh (10 $\mu$ g/Kg) em ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados.  $\dagger p < 0,05$  SHR-NP em relação aos outros grupos;  $\alpha p < 0,05$  W-P vs W-NP;  $\beta p < 0,05$  SHR-P vs SHR-NP, em A e B.



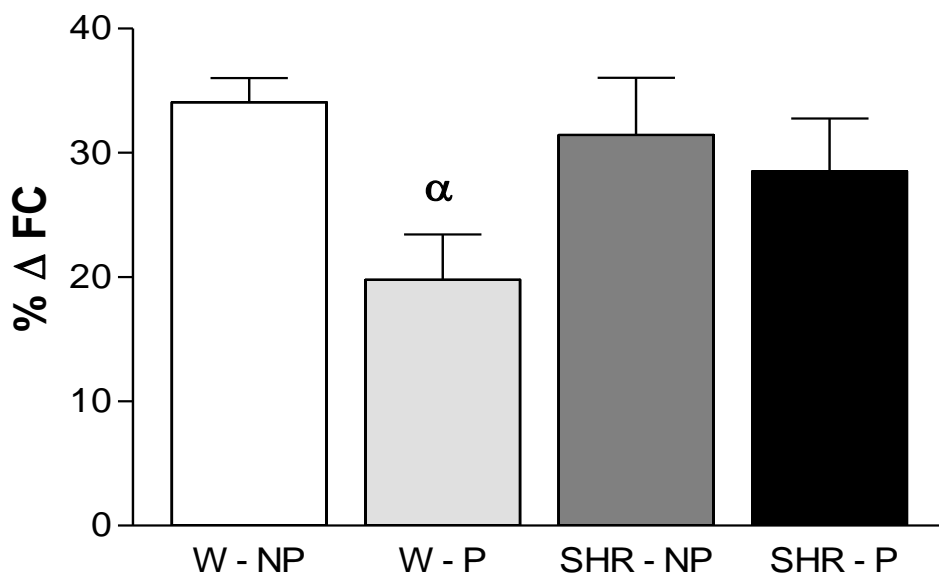
#### 4.5 A PRENHEZ ALTERA O EFEITO HIPOTENSOR AO NPS

Após estabilização da PAM, administramos uma dose de NPS 35 µg/Kg e obtivemos um efeito hipotensor expresso em porcentagem de variação da PAM (%  $\Delta$  PAM). A Figura 5A mostra que as W-P apresentaram maior resposta hipotensora em relação às W-NP (-55,4 $\pm$ 3,2 vs -46,45 $\pm$ 1,4). As SHR-P também apresentaram maior resposta hipotensora em relação às SHR-NP (-59,3 $\pm$ 1,0 vs -43,8 $\pm$ 6,3). Verificamos a variação da FC, em porcentagem (%  $\Delta$  FC), após a administração de NPS, concomitante ao vale da curva da PAM. Observamos que o grupo W-P apresentou menor aumento da FC em relação às W-NP (19,8 $\pm$ 3,6 vs 34,0 $\pm$ 1,9), porém essa diferença não foi vista entre as SHR-NP e SHR-P (31,4 $\pm$ 4,6 vs 28,5 $\pm$ 4,2), respectivamente.

A)



B)



**Figura 5.** Porcentagem de variação (% Δ) da PAM (A) e da FC (B) após administração de NPS 35 μg/Kg em ratas não-prenhas (W-NP e SHR-NP, n = 8) e ratas prenhas (W-P e SHR-P, n = 8). As barras representam a média ± EPM dos resultados. <sup>α</sup>p<0,05 W-P vs W-NP; <sup>β</sup>p<0,05 SHR-P vs SHR-NP, em A e B.

#### 4.6 A PRENHEZ REDUZ A REATIVIDADE À Phe E À ACh EM SHR.

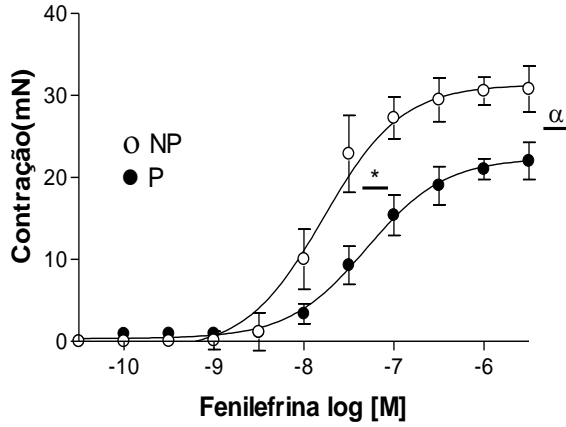
A estimulação com Phe promoveu contração concentração-dependente em aortas intactas de ratas normotensas e hipertensas, não prenhas ou prenhas. A reatividade de aortas de ratas prenhas WST ou SHR à Phe foi menor em relação à reatividade de aortas das ratas não prenhas (Fig 6 A,B).

Houve redução da potência (pD<sub>2</sub>) ( $7,79 \pm 0,03$  vs  $7,30 \pm 0,04$ , M) e do efeito contrátil máximo (E<sub>max</sub>) para Phe ( $30,8 \pm 2,8$  vs  $22,6 \pm 1,2$ , mN) em aortas de W-P, quando comparados com as aortas W-NP (Fig. 6A). Em aortas de SHR-P (Fig. 6B), o E<sub>max</sub> ( $26,0 \pm 1,4$  mN) da curva concentração-resposta para Phe foi reduzido quando comparado com o E<sub>max</sub> obtido em aortas de SHR-NP ( $33,0 \pm 1,6$ ) para Phe.

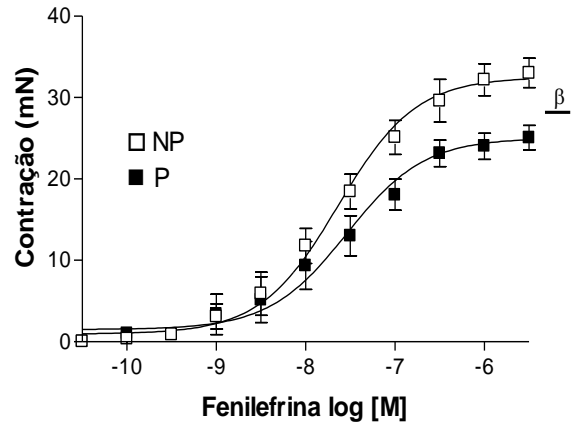
A ACh promoveu relaxamento concentração-dependente em aortas anéis de ratas normotensas e hipertensas, não prenhas e prenhas em anéis de aortas intactos. Não houve diferenças nas curvas de concentração-efeito para ACh entre W- NP e W-P (Fig. 6C). Valores E<sub>max</sub> foram reduzidos em aortas de SHR-P ( $70,5 \pm 6,0\%$ ) do que em aortas SHR-NP ( $89,3 \pm 4,3\%$ ) (Figura 6D).

v

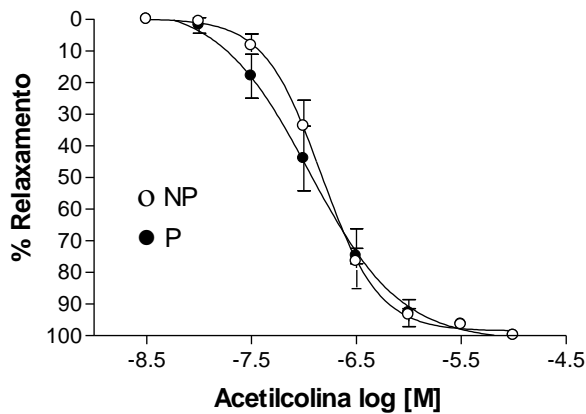
A) Wistar



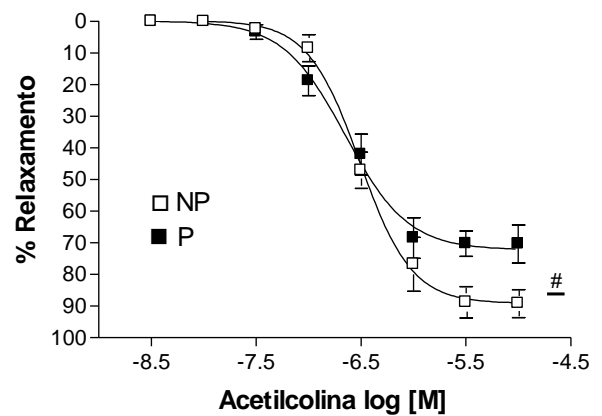
B) SHR



C) Wistar



D) SHR



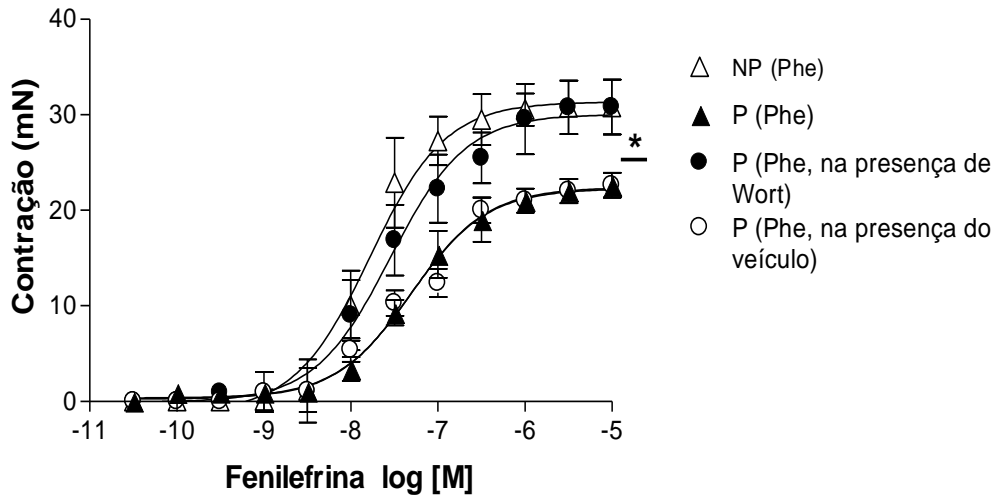
**Figura 6.** Curvas de efeito-concentração para Phe (em mN, A e B) e acetilcolina (em % de relaxamento, C e D) em anéis isolados de aorta de ratas não-prenhas (NP) ou de ratas prenhas (P),  $n = 7$ , Wistar e SHR. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados. \* $p < 0,05$  pD2 W-P vs W-NP,  $^{\alpha}p < 0,05$  Emax W-P vs W-NP;  $^{\beta}p < 0,05$  Emax SHR-P vs SHR-NP;  $^{\#}p < 0,05$  Emax SHR-P vs SHR-NP.

#### **4.7 WORTMANNIN (10 nM) REVERTE A HIPOREATIVIDADE DE AORTAS DE RATAS PRENHAS À Phe.**

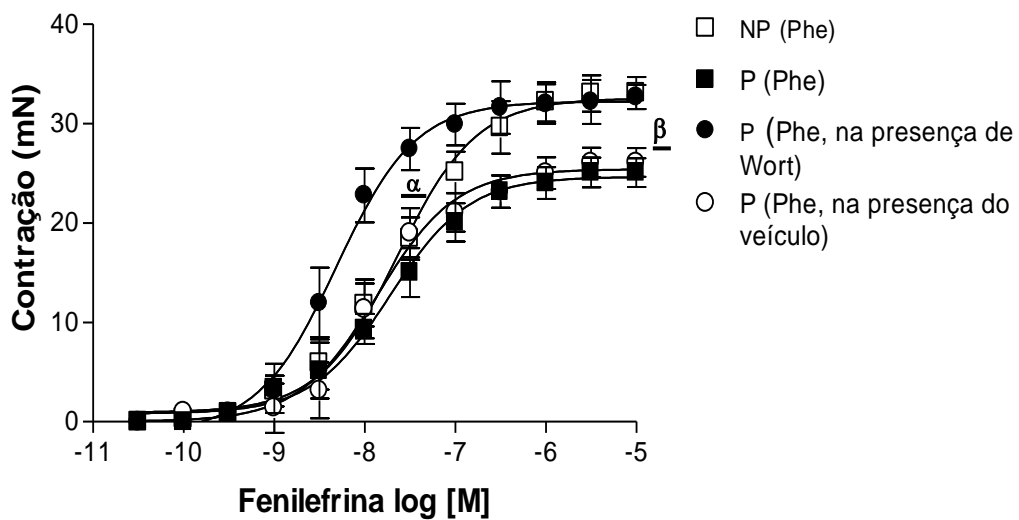
Vários estudos têm utilizado concentrações diferentes de Wortmannin nos estudos de reatividade vascular. Inicialmente, utilizamos a concentração de 100 nM como LOPEZ *et al.* (2010). No entanto, observamos que nesta concentração houve redução da contração à Phe (resultados não mostrados). Avaliando outros estudos, observamos que foram utilizadas concentrações mais baixas de Wortmannin (BLOMMAART *et al.*, 1997). Ao incubarmos as preparações com a concentração de 10 nM de WORT por 30 min, observamos que houve um aumento na reatividade à Phe em anéis de aorta de ratas prenhas WST e SHR.

Na presença de WORT (10 nM), as curvas concentração-efeito para Phe foram deslocadas para a esquerda em anéis de aorta de W-P (Fig. 9A) e SHR-P (Fig. 9B). Os valores de Emax das curvas concentração-efeito para Phe foram maiores ( $22,6 \pm 1,2$  vs  $30,8 \pm 2,8$ ) em aortas intactas de W-P incubadas com WORT (Fig. 9A). Em aortas de SHR-P (Fig. 9B), a incubação com WORT aumentou a pD2 ( $7,71 \pm 0,12$  vs  $8,35 \pm 0,39$ ) e Emax ( $25,1 \pm 1,43$  vs  $32,6 \pm 1,20$ ) da curva concentração-efeito para Phe.

**A) Wistar**



**B) SHR**

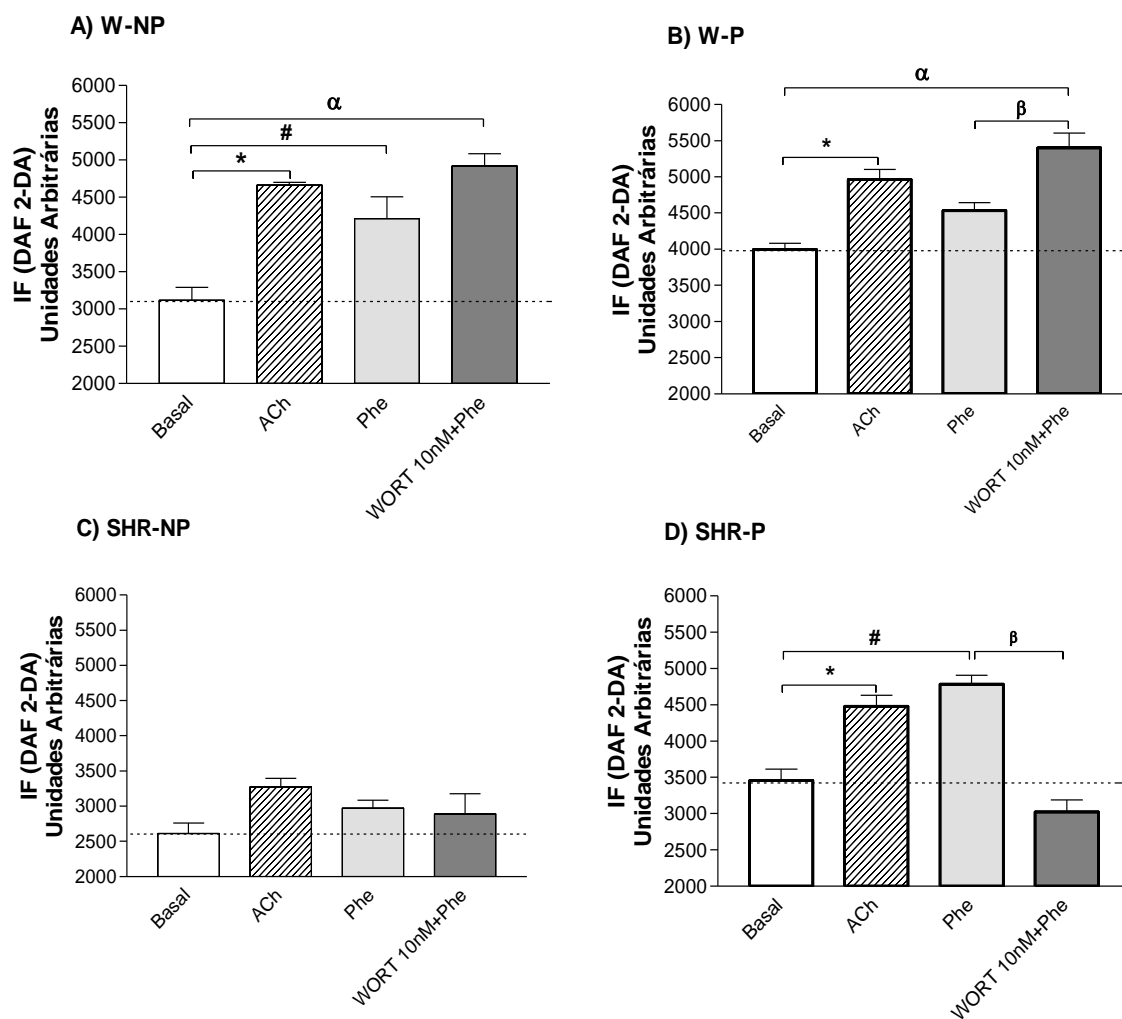


**Figure 7.** Curva concentração-efeito para Phe em anéis de aorta de (A) Wistar e (B) SHR, não-prenhas (NP), prenhas (P), na ausência ou presença de veículo ou de Wortmannin (Wort). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados (n=7). \* $p < 0,05$  EMax P (Phe) vs P (Phe, na presença de WORT);  $^{\beta} p < 0,05$  EMax P (Phe) vs P (Phe, na presença de Wort);  $^{\alpha} p < 0,05$   $pD_2$  P (Phe) vs P (Phe, na presença de Wort).

#### **4.8 A PREENHEZ AUMENTA A CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO ([NO]) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTAS (CEA) DE RATAS WISTAR E SHR**

A [NO] (Figura 8) em CEA de ratas WST e SHR não prenhas e prenhas foi quantificada pela intensidade de fluorescência (IF, unidades arbitrárias) emitida pela sonda DAF 2-DA. Inicialmente, avaliamos os valores basais de IF à sonda DAF-2DA. Em CEA de W-P ( $3988,2 \pm 82,5$ ) os valores basais observados foram maiores em comparação aos valores observados em CEA de W-NP ( $3117,8 \pm 175,5$ ). Em CEA de W-NP (figura 8A), a IF de DAF-2DA emitida pelas células estimuladas com acetilcolina ( $4662,8 \pm 137,8$ ), Phe ( $4212,8 \pm 292,4$ ) e Phe na presença de WORT 10nM (WORT + Phe:  $4918,8 \pm 166,5$ ) foi maior em relação aos valores basais ( $3117,8 \pm 175,5$ ). Maior IF à DAF-2DA foi observada em CEA de W-P (Fig. 8B) estimulados com ACh ( $4962,8 \pm 137,8$ ), ou com Phe na presença de Wortmannin (WORT 10nM + Phe,  $5403,0 \pm 203,1$ ), quando comparados aos valores basais ( $3988, 2 \pm 82,5$ ).

Os valores basais de IF à DAF-2DA foi menor em CEA de SHR-NP ( $2610,4 \pm 151,7$ , Fig. 8C), quando comparados com os valores basais observados em CEA de W-NP ( $3617,8 \pm 175,5$ , Fig. 8A) ou SHR-P ( $3459, 0 \pm 156,0$ , Fig. 8D). Ach, Phe e WORT 10nM + Phe não alteraram a IF à DAF-2DA em CEA de SHR-NP (Fig. 8C). No entanto, em CEA de SHR-P (Fig. 8D), acetilcolina ( $4479,0 \pm 152,0$ ) e Phe ( $4784,0 \pm 124,0$ ) aumentaram a IF. Na presença de WORT+Phe, a IF de CEA foi reduzida ( $3025,0 \pm 167,0$ ), quando comparada ao valor obtidos com a estimulação por Phe ( $4784,0 \pm 124,0$ ).



**Figura 8.** Intensidade de fluorescência (IF- unidades arbitrárias) à sonda DAF – 2DA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em células endoteliais da aorta de ratas não prenhas Wistar (W-NP, A) e SHR (SHR-NP, C) e prenhas Wistar (W-P, B) e SHR (SHR-P, D) em condições basais (Basal), estimuladas com acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe) e estimuladas com fenilefrina após incubação com Wortmannin (WORT 10nM + Phe). As barras representam a média  $\pm$  SEM dos resultados (n = 5). \* $p < 0,05$  Basal vs ACh; # $p < 0,05$  Basal vs Phe;  $\alpha p < 0,05$  Basal vs WORT + Phe;  $\beta p < 0,05$  Phe vs WORT + Phe.

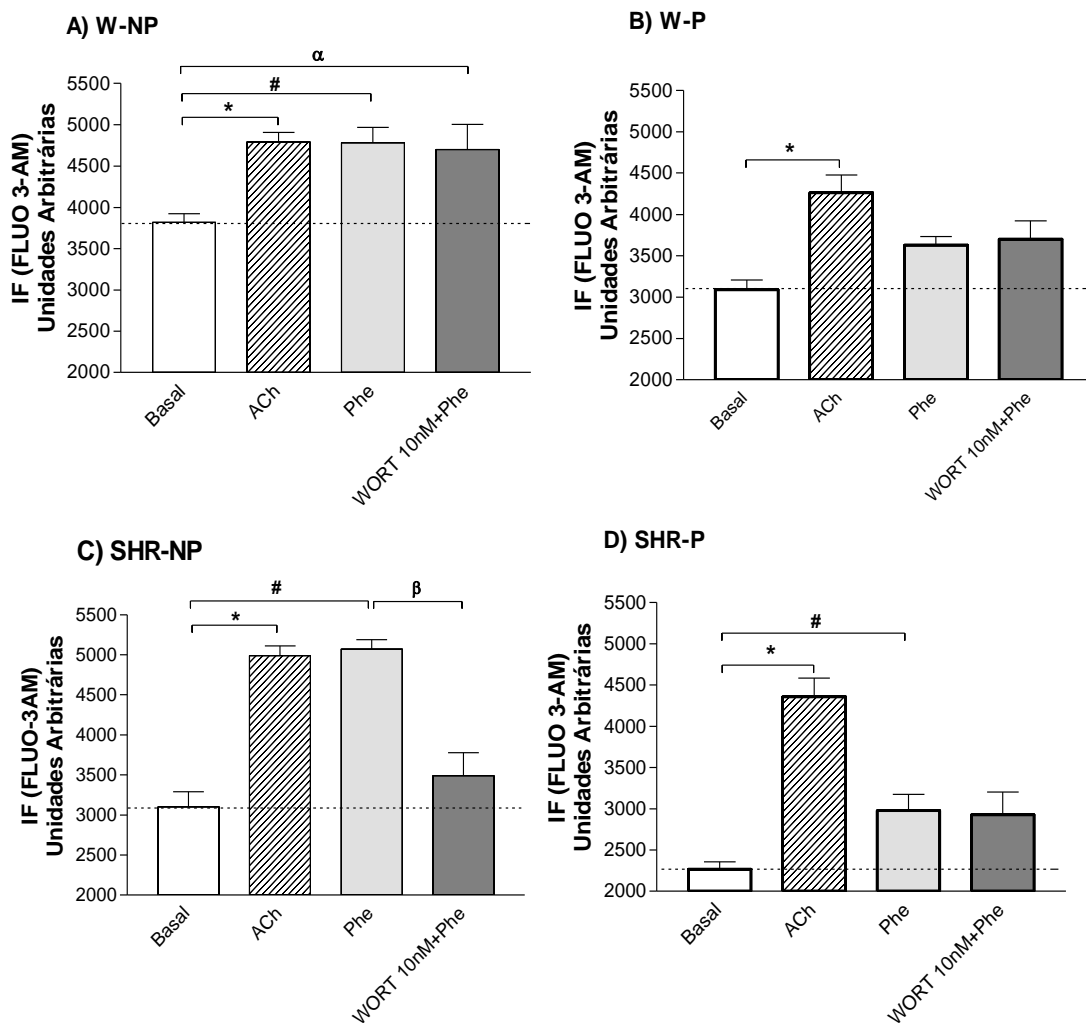


#### **4.9 A PRENHEZ REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO ( $[Ca_2^+]$ ) BASAL E ESTIMULADA POR Phe EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTAS (CEA) DE RATAS WISTAR E SHR, MAS NÃO ALTERA A $[Ca_2^+]$ ESTIMULADA POR ACh.**

Observamos que os valores basais de IF da CEA de ratas prenhas Wistar e SHR foram menores que os valores observados em CEA de ratas não prenhas (Figura 9).

Quando as CEA de W-NP (Fig. 9A) foram estimuladas com acetilcolina ( $4792,8 \pm 112,8$ ) ou Phe ( $4783,0 \pm 183,4$ ) observamos maiores valores de IF se comparadas com os valores basais ( $3817,8 \pm 105,5$ ). A incubação com Wortmannin (WORT+Phe) não alterou o aumento da IF quando as células foram estimuladas com Phe. Em CEA de W-P (Fig. 8B), foi observado um aumento da IF em CEA estimuladas com ACh ( $4262,8 \pm 215,8$ ) quando comparado aos valores basais ( $3088,8 \pm 121,0$ ), mas não observamos alteração da IF em relação ao basal quando as células foram estimuladas com Phe na ausência ou presença de Wortmannin.

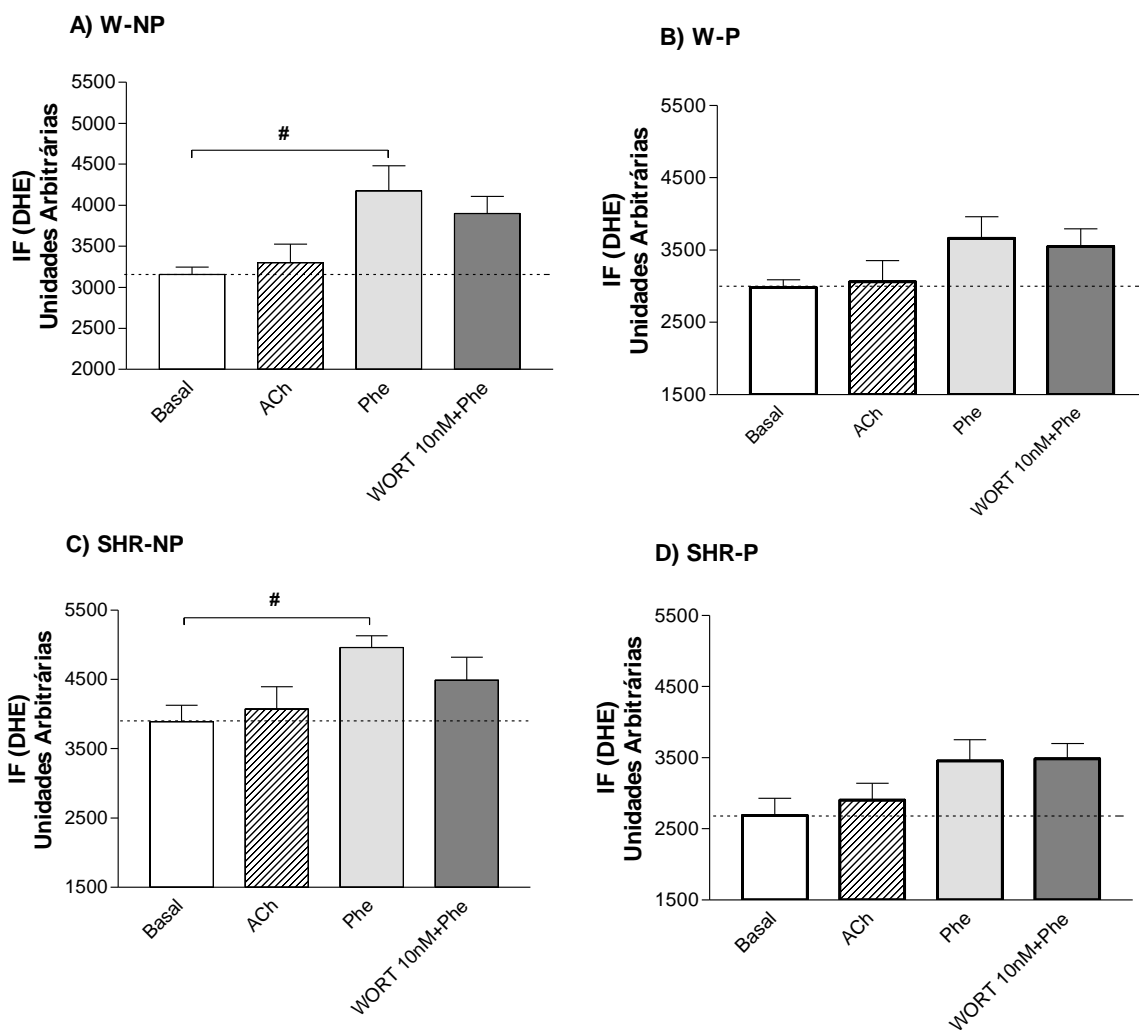
Em CEA de SHR-NP (Fig. 9C), foi observado um aumento potencializado da IF com os estímulos de acetilcolina ( $4990,0 \pm 123,4$ ) e de Phe ( $5072,8 \pm 116,2$ ) quando comparado aos valores basais ( $3102,4 \pm 188,7$ ). Na presença de wortmannin (WORT 10nM + Phe,  $3489,0 \pm 289,0$ ), a Phe não foi capaz de alterar a IF em CEA de SHR-NP. Em CEA de SHR-P, houve um aumento da IF após estímulo com ACh ( $4357,0 \pm 228,0$ ) quando comparado aos valores basais ( $2267,0 \pm 88,15$ ) (Figura 8 D), porém nenhuma alteração foi observada com a estimulação com Phe na ausência ou presença de wortmannin.



**Figura 9.** Intensidade de fluorescência (IF- unidades arbitrárias) à sonda FLUO 3-AM (5  $\mu\text{mol/L}$ ) em células endoteliais da aorta de ratas não prenhas Wistar (W-NP, A) e SHR (SHR-NP, C) e prenhas Wistar (W-P, B) e SHR (SHR-P, D) em condições basais (Basal), estimuladas com acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe) e estimuladas com fenilefrina após incubação com Wortmannin (WORT 10nM + Phe). As barras representam a média  $\pm$  SEM dos resultados (n = 5). \* $p < 0,05$  Basal vs ACh; # $p < 0,05$  Basal vs Phe;  $\alpha p < 0,05$  Basal vs WORT + Phe;  $\beta p < 0,05$  Phe vs WORT + Phe.

#### **4.10 A PRENHEZ REDUZ A CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ([ERO]) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTAS (CEA) DA RATAS WISTAR E SHR**

Considerando os valores basais, podemos observar que CEA de SHR-NP ( $3991,0 \pm 238,7$ ) apresentaram valores aumentados de IF à DHE em relação aos outros grupos (Fig. 10 A, B, C e D). A IF nas CEA de SHR-P ( $2690,0 \pm 238,1$ ; Fig. 10 C) não foi diferente da observada em CEA de W-NP ( $3256,8 \pm 90,5$ ) ou W-P ( $2984,8 \pm 105,0$ ). Observamos um aumento da IF em CEA de ratas NP de ambas as linhagens (Fig. 10 A e C) quando estas células foram estimuladas com Phe (W-NP:  $4178,0 \pm 301,4$ ; SHR-NP:  $4962,8 \pm 166,2$ ) em relação aos valores basais (W-NP:  $3156,8 \pm 90,5$ ; SHR-NP:  $3891,0 \pm 238,7$ ), porém, este efeito não foi observado nas CEA de ratas prenhas (Fig. 10 B e D). Nenhuma alteração dos valores basais de IF ao DHE foi observada quando as CEA de ratas prenhas Wistar ou SHR foram estimuladas com ACh ou Phe, na ausência ou presença de wortmannin.



**Figura 10.** Intensidade de fluorescência (IF- unidades arbitrárias) à sonda FLUO 3-AM (5  $\mu\text{mol/L}$ ) em células endoteliais da aorta de ratas não prenhas Wistar (W-NP, A) e SHR (SHR-NP, C) e prenhas Wistar (W-P, B) e SHR (SHR-P, D) em condições basais (Basal), estimuladas com acetilcolina (ACh), fenilefrina (Phe) e estimuladas com fenilefrina após incubação com Wortmannin (WORT 10nM + Phe). As barras representam a média  $\pm$  SEM dos resultados (n = 5). \* $p < 0,05$  Basal vs ACh; # $p < 0,05$  Basal vs Phe;  $^{\alpha}p < 0,05$  Basal vs WORT + Phe;  $^{\beta}p < 0,05$  Phe vs WORT + Phe.

***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

O NO produzido nas células endoteliais das ratas prenhas é determinado pela máxima capacidade da eNOS em seus níveis de expressão, de fosforilação e concentração intracelular de cálcio em resposta e estímulos químicos ou *shear stress* (FLEMING *et al.*, 1998; BALLEJO *et al.* 2002; BALLIAGAND *et al.*, 2009). Observamos em nossos ensaios *in vivo*, funcionais e de citometria de fluxo que a manutenção da PA em baixos níveis no final da prenhez, inclusive nas SHR, pode ser atribuída em grande parte à queda da resistência vascular periférica, uma vez que observamos menor reatividade de aortas de ratas normotensas e SHR prenhas à Fenilefrina.

A gravidez/prenhez engloba mudanças substanciais na função vascular a fim de acomodar o aumento dramático no volume de sangue e o fluxo sanguíneo útero-placentário que deve ser proporcionado ao feto em crescimento. Cerca de 630 mililitros de sangue fluem através da circulação materna da placenta a cada minuto durante o último mês da gravidez. Isto, mais o aumento geral do metabolismo, aumentam o débito cardíaco (DC) materno em cerca de 30% a 40% acima do normal na 27ª semana de gestação e então, por razões ainda não elucidadas, o DC diminui até um pouco acima do normal durante as últimas semanas de gestação, independente o elevado fluxo sanguíneo. Além do aumento do volume de sangue, a medula óssea materna torna-se cada vez mais ativa e produz hemácias extras. Cerca de um quarto deste volume será perdido através do sangramento durante o trabalho de parto, concedendo assim um fator de segurança considerável para a mãe (GUYTON & HALL, 2006).

O tônus vascular e, portanto, a resistência periférica, é determinado por um delicado equilíbrio de fatores constritores e dilatadores. Vários autores vêm mostrando que a redução da PAM ao final da prenhez em ratas estaria associada à redução da resposta pressora a alguns agonistas vasoconstritores, tais como noradrenalina, adrenalina e angiotensina II e a hiporreatividade de diferentes vasos a esses agentes (PAGE & OGDEN, 1947; MASSICOTTE *et al.*, 1987; CHU & BEILIN, 1993a, 1993b; ALOAMAKA *et al.*, 1993; RAVELIC E BURNSTOCK, 1996; COELHO *et al.* 1997; SPERANZZA *et al.*, 1998; BALLEJO *et al.*, 2002).

Na resposta fisiológica normal durante a prenhez, os EDHFs e NO parecem ser os grandes contribuintes para um estado de hiporreatividade do vaso a agentes contráteis e, apesar destes mecanismos ainda não serem completamente elucidados, a redução em suas biodisponibilidades parece estar envolvida em estados patológicos como insuficiência placentária, diabetes, pré-eclâmpsia e eclâmpsia (MORTON e DAVIDGE, 2013).

Nossos resultados corroboram com a literatura e mostram que apesar das alterações cardiovasculares e hemodinâmicas marcantes, tais como aumento da frequência cardíaca, do volume plasmático e do débito cardíaco, a PAM ao final prenhez de ratas normotensas e hipertensas não está elevada, como seria esperado. Como vemos na figura 1A a PAM ao final da prenhez de Wistar ou SHR está diminuída em relação às respectivas fêmeas não prenhas.

Entre os mecanismos associados a estas alterações, a hiporreatividade à agonistas vasoconstritores ao final da gravidez/prenhez estaria associada a um aumento significativo da modulação endotelial devido maior atividade da enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e aumento da biodisponibilidade de NO e da ação vasodilatadora do óxido nítrico (NO) em diferentes vasos sanguíneos, além da produção alterada de prostanóides (SULLIVAN *et al.*, 2006; BOELDT *et al.*, 2011). Notavelmente, a produção de NO pelos tecidos cardiovasculares é extraordinariamente sensível às estimulações mecânicas, e sua revogação por deleção genética de uma ou várias de suas isoformas, afetaria profundamente as respostas fisiológicas básicas. Não surpreendentemente, a isoforma mais abundantemente encontrada nos tecidos cardiovasculares e especificamente no endotélio, a eNOS, se mostrou agudamente e cronicamente regulada pela força de cisalhamento tangencial ou *shear stress*, que ocorre em situações onde há aumento do volume sanguíneo (BALLIAGAND *et al.*, 2009). Esse aumento na produção de NO pelas células endoteliais causado por *shear stress* tem sido associado a uma via “menos dependente de cálcio”, sendo fortemente relacionada à fosforilação da eNOS (FLEMING *et al.*, 1998). A produção de NO em resposta às forças de cisalhamento dependentes de fluxo, aplicadas sobre a superfície de células endoteliais é um mecanismo fundamental de regulação do tônus vascular, da

resistência periférica e perfusão tecidual. Estes colocam NO como um dos reguladores homeostáticos importante da fisiologia cardiovascular em situações de sobrecarga de volume dinâmica, inclusive durante a gravidez/prenhez (BALLIAGAND *et al.*, 2009).

Dentre os modelos animais que evidenciam uma queda da PA nos últimos dias de prenhez, as SHR vêm chamando a atenção, pois no período de 18 a 21 dias, sofrem uma brusca queda pressórica (AOI *et al.*, 1976). Nossos dados corroboram os já mostrados, onde os níveis pressóricos das SHR - P são compatíveis aos níveis das WST - NP. Interessantemente, como vemos em nossos resultados (Fig.1A), SHR - P apresentam maior porcentagem de diminuição da PAM (30%) em relação às W - P (21%), mesmo partindo de um histórico hipertensivo. Se analisarmos separadamente veremos que a prenhez foi capaz de reduzir a PAS e PAD (Fig. 1C e D), especialmente nas SHR. A PAS aumenta diretamente na proporção do aumento do débito cardíaco, este por sua vez, é resultante da interação entre volume sistólico e frequência cardíaca, já a PAD reflete a distensão das paredes dos vasos quando o músculo cardíaco está relaxado, ou seja, quanto menor a PAD, menor será a densidade capilar local (SILVERTHORN, 2010).

A figura 1D, representa a queda importante na PAD e mais pronunciada nas SHR-P. Este fenômeno tem sido atribuído em grande parte à queda da resistência vascular periférica (BALLEJO *et al.*, 2002; ST-LOUIS & BROCHU, 2007; MIZUTANI, 1997), sugerindo que, dessa forma, a disfunção endotelial prévia esteja revertida, nesse curto período de tempo (20 dias).

Além disso, a FC (figura 1B) das W-P estava aumentada em relação às W-NP, porém no caso das SHR-P, a FC estava diminuída, o que acompanhou a redução da PAS deste grupo sugerindo uma alteração no controle barorreflexo. SPIEKER *et al.*, 2000, demonstraram uma alteração altamente específica da regulação dos barorreceptores após a inibição da síntese de NO em seres humanos saudáveis, o que sugere um importante papel do NO também na regulação da frequência cardíaca reflexa. Sabemos que a sensibilidade do reflexo barorreceptor pode ser determinada a partir das variações espontâneas em PAM e FC como fizemos em nosso estudo, utilizando um método sequencial



de séries temporais (STAUSS *et al.*, 2006; BERTINIERI *et al.*, 1988), conhecido e descrito como Método da Sequência (OOSTING *et al.*, 1997; CERUTTI *et al.*, 1994; ROBBE *et al.*, 1987). Métodos como esse são atraentes porque fornecem informações sobre o controle cardiovascular sem interação farmacológica ou manipulação mecânica do barorreflexo e do sistema nervoso autônomo. Nossos dados mostram uma diminuição da sensibilidade barorreflexa na prenhez de ratas normotensas Wistar assim como foi mostrado por LUMBERS & YU (1999). Estes resultados sugerem um rearranjo autonômico durante a gravidez/prenhez normal, que pode ser interpretado como uma mudança do equilíbrio autonômico em direção vagal ou como consequência da atenuação do barorreflexo.

Experimentos que testaram o controle barorreflexo arterial proveniente atividade nervosa simpática eferente em ratas Wistar virgens e prenhas a termo, revelaram que há um deslocamento da curva de função barorreflexa para uma gama de funcionamento de mais baixa pressão, onde a excitação arterial barorreflexa simpática está atenuada, enquanto as respostas parassimpáticas são bem conservadas ou potencializadas (SPERANZZA *et al.*, 1998). Outros estudos sugerem que a descarga barorreceptora arterial leva a uma menor excitação de neurônios no tronco cerebral que por sua vez estimulariam neurônios eferentes simpáticos (WANG *et al.*, 1992; BERTINIERI *et al.*, 1988). Justamente devido a essa ineficiência do reflexo barorreceptor, haveria uma menor capacidade de o organismo manter a PA durante possíveis hemorragias e ainda maior suscetibilidade à hipotensão ortostática em mulheres gestantes, como foi visto no estudo de IELLAMO *et al.* (1996).

Em SHR há um aumento do tônus simpático, que pode contribuir para a hipertensão nestes ratos (JUDY *et al.*, 1976). Evidências sugerem que o tônus simpático aumentado é resultado de uma anomalia primária dentro do sistema nervoso central, em vez de uma resposta secundária relacionada com alteração da sensibilidade barorreceptora (JUDY *et al.*, 1976). No entanto, a menor atividade de barorreceptor em SHR foi sugerida (FRIEDRICH *et al.*, 1986). Nossos resultados mostram uma menor sensibilidade barorreflexa em SHR não prenhas se comparadas às ratas Wistar não prenhas (Fig.2) corroborando os resultados descritos. Com isso, resolvemos analisar a sensibilidade barorreflexa

na prenhez de SHR. Ao observarmos os resultados das SHR-P, constatamos que o fenômeno não condiz com o que acontece com a prenhez de ratas normotensas Wistar. Nossos resultados sugerem que de alguma forma a sensibilidade barorreflexa avaliada em condições basais e fisiológicas e que está diminuída em SHR-NP, foi restabelecida na prenhez de SHR. Como pode ser observada na figura 2, a sensibilidade barorreflexa de SHR-P não foi diferente da observada em W-NP.

Em SHR-NP, a PAM estava elevada e a sensibilidade do barorreflexo era menor do que vimos nas ratas WST, mostrando que uma possível alteração na pressão sanguínea levaria uma menor alteração da frequência cardíaca nas SHR, do que seria observada em ratas Wistar, assim como foi visto por RICKSTEN & THOREN (1981) em ratos machos. Sugerimos que ao final da prenhez de SHR, os barorreceptores previamente dessensibilizados ao estímulo de estiramento causado pela hipertensão espontânea, como observado em SHR-NP, seriam novamente sensibilizados na prenhez, voltando a modular momento a momento as alterações pressóricas do sistema cardiovascular, conferindo desta forma mais um fator cardioprotetor às ratas SHR prenhas. CHAMPLEAU (1992), mostrou em seu trabalho que fatores humorais e endoteliais podem modular a sensibilidade dos barorreceptores arteriais, especialmente durante a prenhez. Porém, outros experimentos devem ser realizados a fim de identificarmos os mecanismos envolvidos nestas alterações.

A atividade barorreflexa tem sido alvo de vários estudos recentes uma vez que manipulação não farmacológica do barorreflexo pode ser utilizada como terapia em situações clínicas de hipertensão resistente, ou não sensível a medicamentos. Considerando a grande limitação do uso de medicamentos em pacientes grávidas, devido ao efeito tóxico de alguns anti-hipertensivos sobre o feto, o estudo do barorreflexo na prenhez poderia sugerir terapias alternativas as pacientes com hipertensão ou predispostas a pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Quando administramos uma dose única de Phe, observamos que as SHR-NP foram as que tiveram menor porcentagem de variação da PAM em relação aos outros grupos, provavelmente por apresentarem valores pressóricos previamente elevados (Fig. 3A), logo se espera que o efeito vasopressor neste

caso tenha menor amplitude. As prenhas tiveram maior porcentagem de variação da PAM em relação às não prenhas, porém ao avaliarmos a bradicardia reflexa (Fig. 3B) podemos observar que nas W-P, a alteração reflexa da FC não acompanha a % de variação da PAM após Phe, porém, no caso das SHR-P, à medida que a PAM aumentou, a FC cardíaca diminuiu. Se levarmos em consideração os resultados obtidos na análise barorreflexo fisiológico, podemos sugerir que esse efeito seja reflexo de uma perda de sensibilidade dos barorreceptores nas W – P em relação às W – NP, em contraste com o aumento da sensibilidade barorreflexa das SHR – P em relação às SHR – E.

Nossos dados mais uma vez nos levam a crer que a atividade barorreflexa esteja prejudicada em W-P, e que a diminuição da PAM nessa ocasião não seria em detrimento a um controle autônomo inicialmente e sim por um controle local vascular. Em relação às SHR, ocorre diminuição da PAM e a sensibilidade barorreflexa parece ser restabelecida em relação à SHR – NP. A queda e a manutenção da PAM a níveis mais baixos ao final da prenhez de SHR parece ocorrer em detrimento a uma mudança no controle barorreflexo e também pela ação de fatores endoteliais locais, os quais poderiam inclusive modular essa sensibilidade dos barorreceptores arteriais, porém, mais estudos deverão ser realizados em relação ao efeito da inibição da eNOS e a atividade barorreflexa.

COELHO *et al.*, (1997) mostraram que as respostas vasoconstritoras *in vitro* de artérias de resistência, induzida por estimulação do nervo perivascular, foram significativamente reduzidas em ratas prenhas normotensas e SHR e que o inibidor da eNOS L-Nitroarginina revertia essa redução. Neste mesmo trabalho os autores sugeriram que a redução observada nas respostas vasoconstritoras poderia ser resultado de uma diminuição da resposta aos nervos simpáticos ou de um aumento na resposta à ativação de nervos vasodilatadores. Porém, a última possibilidade parece improvável, uma vez que não foram observadas diferenças nas respostas vasodilatadoras induzidas pela ativação de nervos perivascularres na presença de guanetidina ou atropina, o que confirma que a resposta vasoconstritora induzida por ativação nervo perivascular é mediada por nervos simpáticos, uma vez que a guanetidina aboliu essas respostas.

Assim, a diminuição na resposta vasoconstritora parece estar relacionada com uma diminuição na resposta à ativação do sistema nervoso simpático, o que poderia ter resultado de alterações pré-juncionais e/ou pós-juncionais. É possível que a densidade de inervação simpática na cama mesentérica diminua durante a gravidez, principalmente em SHRs, e que com a dessensibilização do barorreflexo seja revertido o desbalanço autonômico pré-existente nos animais espontaneamente hipertensos, e que localmente a eNOS module essa ação do nervo perivascular pós-juncional, culminando na queda da PAM em maiores porcentagens do que um animal normotenso.

Ao administrarmos ACh (Fig. 4), procuramos avaliar a participação do endotélio e da via clássica cálcio/calmodulina ( $Ca^{2+}/CaM$ ) na produção de NO. Nossos dados mostram que a queda da PAM foi mais pronunciada nas prenhas, WST e SHR, porém a FC só foi significativamente maior no grupo SHR – NP em relação aos outros grupos e SHR – P em relação à SHR – NP. BRANDES *et al.*, (2000) mostraram que a ACh, além de proporcionar liberação de NO pela formação do complexo cálcio  $Ca^{2+}/CaM$ , também é capaz de aumentar a produção de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) em vasos. O NO e EDHFs derivados do endotélio tem sido descrito como potentes vasodilatadores endógenos, capazes de modular a reatividade vasoconstritora a várias substâncias e, conseqüentemente, podem desempenhar um papel na PA durante a prenhez (CHU & BEILIN, 1993). Logo, podemos sugerir que a formação desses fatores esteja de alguma forma facilitada durante a prenhez de ratas normotensas e também de hipertensas, o que não seria observado nas SHR – NP.

Ao administrarmos NPS avaliamos a sensibilidade ao oferecimento de NO de origem exógena diretamente ao músculo liso vascular (MLV) entre os grupos. O NPS estimula a ativação da guanilato ciclase solúvel, que por sua vez estimula essa enzima a converter GMP em GMPc que induz relaxamento da MLV. Observamos que *in vivo* as prenhas de ambos os grupos foram mais sensíveis ao NO exógeno e apresentaram maior queda de PAM em relação às não prenhas. A hipotensão ao NPS mais pronunciada nas SHR – P (59%) do que em W – P (55%) em relação às respectivas ratas não prenhas. Estes resultados *in*

*vivo*, poderiam ser associados ao aumento da vasodilatação ao NPS observado em leitos mesentéricos de ratas Wistar ou SHR prenhas do que em ratas não prenhas, como foi mostrado por COELHO *et al.* (1997). Estes resultados indicam que o NO contribuiria para a queda da PAM durante a prenhez, além da resposta vasoconstritora diminuída à estimulação simpática, como observado no leito arterial mesentérico de ratas WST e SHR prenhas.

Em complemento aos nossos experimentos *in vivo*, nossos ensaios de reatividade vascular corroboram os demonstrados na literatura e mostram que anéis de aortas de ratas ao final da prenhez apresentam-se menos reativos ao agonista adrenérgico (Phe), como vemos na figura 6, assim como outros trabalhos também mostraram hiporreatividade vascular a diferentes agonistas contrateis ao final da prenhez/gravidez (ALOAMAKA *et al.*, 1993; CADORETTE *et al.*, 2000, BALLEJO *et al.*, 2002). Nossos dados mostram ainda deslocamento da curva de concentração efeito da Phe à direita nas aortas de ratas Wistar e diminuição da contração máxima nas SHR prenhas.

A hiporreatividade ao final da prenhez, também está presente em diferentes leitos vasculares, em diferentes espécies animais, inclusive em vasos de resistência e não apenas nos de condutância, no caso da aorta. Em anéis de artéria mesentérica observa-se diminuição da reatividade associada ao término da gestação a vários agentes vasoconstritores, tal como: fenilefrina, noradrenalina e vasopressina, angiotensina II, endotelina e à estimulação elétrica perivascular em relação (quando perfundidos) em relação às preparações de ratas e também de cobaias não prenhas (CHU & BEILIN, 1993; RALEVIC & BURNSTOCK, 1996; COELHO *et al.*, 1997).

Já é bem estabelecido que entre os possíveis mecanismos envolvidos na hiporreatividade a agonistas vasoconstritores, o endotélio vascular, com a liberação principalmente de NO pela eNOS e de outros prostanóides vasodilatadores, desempenha um papel central nesse comportamento vascular ao final da prenhez. Como vimos em nossos resultados, a hiporreatividade à Phe em aortas de SHR-P em relação às SHR-NP é menos expressiva se compararmos a observada entre W-NP e W-P, possivelmente devido a disfunção endotelial descrita em SHR não prenhas.

Foi demonstrado que a remoção mecânica do endotélio vascular ou a inibição da eNOS reverte a hiporreatividade à Phe em aortas de ratas prenhas ALOAMAKA *et al.*, 1993<sup>a</sup>. A hiporreatividade de aortas de ratas prenhas à estimulação  $\alpha$ 1-adrenérgica seria consequente a um aumento no efeito modulador do NO derivado do endotélio sobre a contração vascular, como foi observado por ALOAMAKA *et al.*, 1993<sup>a</sup>. Avaliamos a participação da eNOS fosforilada nesta modulação. Com a utilização do Wortmannin 100nM, inibidor da via PI3K-AKT, esperávamos que a hiporreatividade à Phe em aortas de ratas prenhas fosse revertida. Em contraste ao esperado, nos nossos experimentos iniciais (resultados não mostrados), e com exceção das aortas de W-NP, observamos que a pré-incubação com Wortmannin 100nM, como foi inicialmente proposto, reduziu a reatividade de aortas de ratas W-P, SHR-NP e SHR-P à Phe. LÓPEZ *et.al.*, 2010, sugeriram que a concentração de 100nM de Wortmannin seria a melhor concentração para bloqueio da via PI3K/Akt/eNOS. Neste trabalho, os autores (LÓPEZ *et.al.*, 2010) mostraram o Wortmannin (100nM) produziu relaxamento em anéis de aortas pré contraídas com fenilefrina ou solução concentrada de K<sup>+</sup> e que este efeito poderia estar associado aos mecanismos ligados diretamente ao músculo liso. Porém, posteriormente pudemos observar em nossos ensaios de citometria de fluxo que a utilização dessa concentração de WORT, fazia com que o grupo de células de estudo fosse deslocado todo para o início do eixo X e Y dos *dotplots*, sugerindo apoptose das células endoteliais, o que explicaria este achado nos experimentos de reatividade vascular.

Após estes ensaios e embasados em outros estudos (BLOMMAART *et al.*, 1997) resolvemos testar outras concentrações de Wortmannin. Nossos resultados com a concentração de 10nM mostram reversão da hiporreatividade à Phe nas ratas prenhas em relação às não prenhas WST e SHR, sugerindo o envolvimento da via PI3K/Akt/eNOS na modulação da reatividade de aortas de ratas normotensas e hipertensas à Phe. Além disto, nesta concentração, o wortmannin não promoveu apoptose das células endoteliais.

FLEMING *et al.*, 1999, mostraram que a contração isométrica de anéis de aortas de coelhos levou a ativação da eNOS por uma via farmacologicamente

idêntica à via ativada pelo *shear stress* de forma menos dependente de  $Ca^{+2}$  e propuseram que este mecanismo seja mesmo independente do mecanismo cálcio/calmodulina ( $Ca^{+2}/CaM$ ). Em 2012, FLEMING *et.al.* mostraram que esse mecanismo menos dependente de  $Ca^{+2}$  pode ser regulado por resíduos de serina 1177 ( $Ser_{1177}$ ) que resulta em uma baixa, porém contínua produção de NO e que os resíduos de  $Ser_{1177}$  e treonina 495 ( $Thr_{495}$ ) trabalhariam de forma antagônica, sugerindo que a defosforilação de  $Thr_{495}$  precede a fosforilação de  $Ser_{1177}$  em situações de *shear stress* como seria esperado na prenhez. Logo, teoricamente, esta ativação seria gradativa e liberaria baixos, porém contínuos níveis de NO para modulação do vaso nesta “nova” condição fisiológica relacionada a prenhez.

CREWS *et al.*, 1999, verificaram os mecanismos de entrada de  $Ca^{+2}$  dentro da célula endotelial e do músculo liso vascular durante a síntese de NO ou inibição do mesmo em ratas Sprague Dawley, prenhas e não prenhas, tratadas ou não com L-NAME e constataram que os mecanismos de entrada de  $Ca^{+2}$  intracelular são inibidos durante a prenhez, mas aumentados durante a inibição da eNOS pela via clássica ( $Ca^{+2}/$  calmodulina) e que a fenilefrina poderia induzir o aumento das  $[Ca_2^+]_c$  nas células de ratas prenhas tratadas com L-NAME. Estes autores também sugeriram outros mecanismos contráteis, os quais parecem ser inibidos na prenhez normal.

Neste estudo também avaliamos o efeito vasodilatador induzido pela ACh em aortas de ratas prenhas e não prenhas WST e SHR e não observamos diferença em relação à potência (pD<sub>2</sub>) da ACh entre os grupos assim como foi visto por St. LOUIS & SICOTTE, 1992 e COELHO *et al.*, 1997, que relatam também não terem encontrado diferenças entre a sensibilidade à ACh em vasos de ratas prenhas e não prenhas WST. Por outro lado, HONDA *et al.*, 1996 descreveram resultados controversos em relação à sensibilidade à ACh e observaram que anéis de aorta torácica de ratas prenhas seriam mais sensíveis a ACh do que anéis de aorta de ratas virgens. Neste trabalho (HONDA *et al.*, 1996), foi sugerido que o aumento da resposta vasodilatadora à ACh observada em aorta de ratas prenhas não seria atribuída ao NO liberado, mas a alterações em receptores ou na via de transdução de sinal ativada pela acetilcolina.

Diferenças relativas a sensibilidade do músculo liso vascular ao NO também poderiam ser consideradas, no entanto, nenhuma alteração na resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio foi observada em aortas e leito mesentéricos de ratas prenhas, como foi visto por COELHO *et al.*, 1997. No caso das SHR não houve diferença de pD<sub>2</sub>, porém houve diferença de E<sub>max</sub>.

Juntos, estes resultados podem sugerir que a produção melhorada de NO observada em artérias sistêmicas ao final da prenhez, envolve diferentes mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora dependente do endotélio que envolvem a via clássica e outras vias celulares.

Com os nossos resultados de reatividade a Phe na presença do WORT, associados ao aumento da quantidade de eNOS fosforilada observadas em aortas de ratas prenhas, como foi demonstrado por STENNETT *et al.*, 2009, podemos sugerir o envolvimento da via PI3K/Akt/eNOS nas respostas vasoconstritoras diminuídas para Phe observadas em aortas intactas ao final da prenhez de ratas normotensas e hipertensas.

Nossos experimentos de citometria de fluxo mostram resultados interessantes que podem ser relacionados com estes achados supracitados. Avaliando apenas os valores basais podemos observar o perfil da biodisponibilidade de NO, Ca<sup>+2</sup> e ERO nas células endoteliais de aortas das ratas prenhas e não prenhas, normotensas ou espontaneamente hipertensas. Inicialmente, verificamos que a prenhez aumenta a concentração de óxido nítrico ([NO]) em células endoteliais de aortas (CEA) de ratas WST e principalmente nas SHR, levando em consideração que as SHR-NP apresentaram os menores níveis de [NO].

Em relação à [Ca<sup>+2</sup>] basal em CEA, observamos que os valores basais foram menores nos grupos de prenhas e que o estímulo com Phe aumentou significativamente a [Ca<sup>+2</sup>] apenas nas CEA de ratas em estro.

A estimulação com acetilcolina aumentou a [NO] em CEA de todos os grupos, salvo as SHR-NP. O estímulo com ACh também aumentou as [Ca<sup>+2</sup>] em CEA de todos os grupos estudados. Comparando os resultados entre CEA de



SHR-NP e SHR-P, poderíamos sugerir que nas CEA de SHR, a produção prejudicada NO de forma dependente de cálcio foi melhorada com a prenhez.

Boeldt *et al.*, 2011, discutem como ocorreria a reprogramação da biodisponibilidade de NO específica da prenhez e nossos resultados vão de encontro com as evidências apresentadas pelos autores. Apesar da inicial e rápida liberação de  $Ca^{+2}$  pelo retículo endoplasmático, o que realmente manteria a eNOS ativa seria o influxo lento de  $Ca^{+2}$ , levando em consideração que em seu estado inativo a eNOS é rodeada por cavéolas e a translocação em resposta à formação do complexo  $Ca^{+2}$ /calmodulina leva certo tempo, seguido pela dimerização da eNOS e fosforilação e de desfosforilação dos sítios necessários para a completa ativação do complexo. Nas ratas WST houve aumento da [NO], porém não houve diferença na [ $Ca^{+2}$ ], o que nos remete a teoria que vem sendo estudada por diversos autores onde a síntese de NO de prenhas ocorreria através da via de fosforilação, sendo menos dependente de grandes alterações na [ $Ca^{+2}$ ] intracelular. Este efeito não foi visto em nossos ensaios no caso das SHR-P que apresentaram aumento da [NO] e da [ $Ca^{+2}$ ] em níveis basais, mostrando que de alguma forma estes efeitos ocorreriam um em detrimento do outro. O aumento do NO estimulado por *shear stress* não tem sido associado ao aumento significativo da [ $Ca^{+2}$ ] em CEA e vem sendo fortemente associada à fosforilação da eNOS, porém por estes resultados basais obtidos nos experimentos de citometria, não poderíamos correlacionar esse efeito com a prenhez de SHR.

Nossos ensaios de citometria trazem ainda outros achados. Quando estimulamos com Phe, o aumento da [NO] não foi diferente entre as CEA de ratas WST, porém as CEA de ratas SHR-P apresentaram elevada IF à sonda DAF 2-DA quando estimulada com Phe, em relação aos outros grupos, evidenciando a produção prejudicada de NO pelas CEA das SHR-NP e que de alguma forma a prenhez reverte este prejuízo nas CEA de SHR-P, inclusive em relação às fêmeas normotensas.

O aumento na [ $Ca^{+2}$ ] partir do estímulo com Phe também foi diferente. As CEA de W-P apresentaram maior IF à sonda FLUO-3AM quando estimuladas com Phe em relação aos outros grupos. O estímulo com Phe aumentou a

produção de NO das SHR-P, porém o mesmo estímulo não foi acompanhado por aumento nas SHR-NP. O oposto ocorreu com as W-P, onde o estímulo com Phe leva a um discreto aumento da produção de NO, porém com considerável aumento da  $[Ca^{2+}]$ . Esse achado sugere que realmente ocorra uma reprogramação da biodisponibilidade de NO específica da prenhez e que essa reprogramação ocorre de forma diferente entre as ratas normotensas e espontaneamente hipertensas e que talvez as ratas normotensas dependam mais do influxo lento de  $Ca^{+2}$  para manutenção da eNOS ativa, mas que nas SHR esse mecanismo possa ser diferente.

Nossos dados sugerem que as concentrações de NO e de cálcio poderiam estar sendo aumentados através de mecanismos pós-receptores ativados por Phe, de um modo diferente entre células endoteliais de aortas de prenhas e não prenhas. Em CEA de SHR-P, a Phe induziu um aumento na produção de NO por uma via independente de cálcio, mas dependente de ativação PI3K/Akt/eNOS, pois como pudemos observar em nossos resultados, foi inibida por Wortmannin. Nossos resultados corroboram os apresentados recentemente por SILVA *et al.*, 2014. Os autores avaliaram o papel do agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico Phe sobre a atividade e sinalização eNOS em anéis de aortas com endotélio de ratos normotensos e hipertensos renais 2 rins, 1 clipe (2R1C). Os resultados obtidos por estes autores mostraram que a menor resposta contrátil induzida por Phe em aortas intactas de ratos 2R1C estaria correlacionada a fosforilação da eNOS em resíduos de Ser<sub>1177</sub>, mas não de Thr<sub>495</sub>, levando a ativação da eNOS, por um mecanismo sensível ao Wortmannin (20  $\mu$ M). Além disto, também observaram maior produção de NO em CEA de 2R1C estimuladas com Phe.

Também observamos que não houve diferença na [ERO] entre os grupos de ratas WST, porém, entre os grupos SHR, a [ERO] estava diminuída nas SHR-P em relação às SHR-NP, as quais inicialmente apresentaram maiores [ERO] em relação aos outros grupos. Este resultado mostra que o *status* oxidativo reduzido nestes animais durante a prenhez, tem papel central na modulação da reatividade e pressão arterial. Sabemos que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da hipertensão, logo a redução da PA induzida pela prenhez de SHR pode ser relacionada com a diminuição de indicadores estresse oxidativo.

Este fenômeno pode estar associado com o aumento de enzimas antioxidantes. OGNIBENE *et al.*, 2012 mostraram que em W-P há aumento da atividade da enzima catalase (CAT) e em SHR-P há um aumento da glutathione peroxidase (GPx) parecendo compensar a deficiência de SOD. Então, o aumento da [NO] e diminuição da [ERO] pode explicar em parte, nossos resultados sobre a hiporreatividade de aortas à fenilefrina e queda da PAdas ratas prenhas WST e SHR.

A hiporreatividade à fenilefrina nas W-P, parece ser causada principalmente pela maior biodisponibilidade de NO enquanto que a hiporreatividade das SHR-P, depende não apenas da maior biodisponibilidade de NO, mas também do *status* oxidativo diminuído, diferente do que é visto nas ratas não prenhas. O estímulo com Phe não foi capaz de aumentar a [ERO] nas CEA de SHR-P, mostrando mais uma vez que estas ratas teriam um novo *status* oxidativo bem diferente do que foi observado nas CEA de SHR-NP. Vimos que a [ERO] nas SHR-NP era mais elevada se comparada aos outros grupos nos diferentes ensaios e que de alguma forma, as SHR-P não apresentavam este mesmo padrão.

O estresse oxidativo é causado pela alteração no balanço entre mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes. Vários autores vêm relacionando alterações no desempenho oxidativo com a pré-eclâmpsia e outras doenças reprodutivas, atingindo tanto a mãe quanto o feto. AGARWAL *et al.* (2012), evidenciaram que níveis de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio estariam diretamente ligados ao surgimento de pré-eclâmpsia em mulheres. Uma das mais importantes vias de sinalização do organismo acontece através da ativação de proteínas kinases (MAPK) que são as mais importantes reguladoras da transcrição gênica em resposta ao estresse oxidativo. Sua cascata de sinalização é controlada pela fosforilação e defosforilação de resíduos de serina e/ou treonina. Esse processo envolve a ação de tirosinas kinases, receptores de tirosina kinases, receptores de citocinas e fatores de crescimento. Excessivas quantidades de ERO podem romper os efeitos normais destas cascatas de sinalização.

Os nossos resultados mostram que o estado oxidativo estava reduzido em CEA de SHR no final da prenhez, e que este achado pode estar envolvido na modulação da PAe da reatividade vascular aos agentes vasoconstritores. A estimulação Phe aumentou a [ERO] nas células endoteliais de ratas não prenas, mas este efeito não foi observado nas células endoteliais de aortas de ratas prenas.

***CONCLUSÃO***

## 6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, podemos concluir que o Wortmannin reverte a hiporreatividade à fenilefrina observada ao final da prenhez de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas. A maior biodisponibilidade de NO observada em SHR prenhas seria devido à reversão da disfunção endotelial uma vez que maior concentração basal de NO e menor concentração de ERO foram observadas em CEA. Ainda, em CEA, a fenilefrina leva ao aumento da concentração de NO por uma via sensível ao Wortmannin.

# ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

AALKJAER, C.; BOEDTKJER D.; MATCHKOV V. Vasomotion - what is currently thought? **Acta Physiol.**, v. 202, n. 3, p. 253-269, Jul. 2011.

AGARWAL, D.; DANGE, R.B.; VILA, J.; OTAMENDI, A.J.; FRANCIS, J. Detraining differentially preserved beneficial effects of exercise on hypertension: effects on blood pressure, cardiac function, brain inflammatory cytokines and oxidative stress. *PLoS One*. 2012;7(12):e52569.

ALBRECHT, E. W.; STEGEMAN, C.A.; HEERINGA, P.; HENNING, R.H.; VAN GOOR, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **J. Pathol.**, v. 199, n. 1, p. 8-17, Jan. 2003.

ALOAMAKA, C. P. et al. mechanism of pregnancy-induced attenuation of contraction to phenylephrine in rat aorta. **Experimental Physiology**, v. 78, n. 3, p. 403-410, 1993.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p.521-531, Aug. 1999.

ANTONIALI, 2001. Influência do óxido nítrico na reatividade de aortas isoladas de ratas ao final da gravidez. Ribeirão Preto, 2001. 74p. Tese de doutorado apresentada ao curso de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Orientadora: Salgado, Maria Cristina Oliveira.

ANUMBA, D. O. C.; ROBSON, S.C.; BOYS, R.J.; FORD, G.A. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 277, n. 2, p. H848-H854, 1999.



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

AYAJIKI, K. 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.

BALLEJO, G.; BARBOSA, T.A.; COELHO, E.B.; ANTONIALI, C.; SALGADO, M.C.O. Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. *Life Sciences*. 2002; 70: 3131-42.

BAGHER, P.; SEGAL, S. S. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. **Acta Physiol.**, v. 202, n. 3, p. 271-284, Jul. 2011.

BARRON, W. M.; STAMOUTSOS, B. A.; lindheimer, m. d. role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 4, p. 923-932, 1984.

BERNTSON, G.C.; BIGGER, J.T. Jr.; ECKBERG, D.L. GROSSMAN, P. KAUFMANN, P.G.; MALIC, M.; NAGARAIA, H.N.; PORGES, S. W.; SAUL, J.P.; STONE. P.H.; VAN DER MOLEN, M.W. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. **Psychophysiology**. v;34(6), p. 623-48. 1997.

BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U.; PEDOTTI, A.; MANCIA, G. Evaluation of baroreceptor reflex by blood pressure monitoring in unanesthetized cats. **Am. J. Heart Circ. Physiol.** v. 23, p. H377–H383, 1988.

BLATTER, L. A.; WIER, W. G. Nitric oxide decreases  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. **Cell Calcium**, v. 15, n. 2, p. 122–131, Feb. 1994.

BLOMMAART, E.F.; KRAUSE, U.; SCHELLENS, J.P.; VREELING-SINDELÁROVÁ, H.; MEIJER, A.J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. **Eur. J. Biochem.** v. 243(1-2), p.240-6, 1997.

BOELDT, D. S.; YI, F. X.; BIRD, I.M. eNOS activation and NO function: Pregnancy adaptive programming of capacitance entry responses alters nitric oxide (NO) output in vascular endothelium-new insights into eNOS regulation through adaptive cell signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 210, p. 243-258, 2011.

BRANDES, R.P.; SCHMITZ-WINNENTHAL, F.H.; FÉLÉTOU, M. GODECKE, A.; HUANG, P.L.; FLEMING, I.; BUSSE, R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** V. 15;97(17), p.9747-52. 2000.

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

BRODY, M. J. Central nervous system mechanisms of arterial pressure regulation. **Fed. Proc.**, v. 45, n. 12, p. 2700-2706, Nov. 1986.

BRODY, M. J.; O'NEILL, T. P.; PORTER, J. P. Role of central catecholaminergic systems in pathogenesis and treatment of hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 6, sup. 5, p. 5727-5741, 1984.

BROSENS, I. A study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies. **Journal of Obstetrics & Gynaecology of the British Commonwealth**, v. 71, n. 2, p. 222-230, 1964.

BUCKLEY, B. J.; MIRZA, Z.; WHORTON, A. R. Regulation of  $Ca^{2+}$ -dependent nitric-oxide synthase in bovine aortic endothelial-cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 269, n. 3, p. C757-C765, 1995.

CAETANO, M.; ORNSTEIN, M.P.; VON DADELSZEN, P.; HANNAH, M.E.; LOGAN, A.G; GRUSLIN, A.; WILLAN, A.; MAGEE, L.A. A survey of Canadian practitioners regarding the management of the hypertensive disorders of pregnancy. **Hypertension in Pregnancy**, v. 23, n. 1, p. 61-74, 2004.

CERUTTI C.; BARRES, C.; PAULTRE, C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. **Am. J. Heart Circ. Physiol.**, v. 35, p. H1993–H2000, 1994.

CHAMPLEAU, M.W. Are arterial pressure and deformation the sole determinants of baroreceptor activity? Importance of humoral and endothelial modulation in normal and disease states. **Hypertension**. V.19, p. 278-280. 1992.

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 insitu blood-perfused mesentery of pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 109, n. 2, p. 322-329, 1993a.

CHU, Z. M.; BEILIN, L. J. Nitric oxide-mediated changes in vascular reactivity in pregnancy in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1184-1188, 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, 1997.

CORSON, M. A.; JAME, N.L; LATTA, S.E.; NEREM, R.M.; BERK, B.C.; HARRISON, D.G. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in

response to fluid shear stress. **Circulation Research**, v. 79, n. 5, p. 984-991, 1996.

CRANDALL, M. E.; KEVE, T. M.; MCLAUGHLIN, M. K. Characterization of norepinephrine sensitivity in the maternal splanchnic circulation during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 162, n. 5, p. 1296-1301, 1990.

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radic. Res.**, v. 41, n. 12, p. 1364-1375, Dec. 2007.

DAVIDGE, S. T.; MCLAUGHLIN, M. K. Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric-arteries from the pregnant rat. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, n. 6, p. 1691-1698, 1992.

DIAS, D.P.; OLIVEIRA, M.; SALGADO, H.C.; FRAZAN, R. Jr. Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V. 43(10), p.969-75. 2010.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, p. 601-605, 1999.

DOGTEROM, J.; DE JONG, W. Diminished pressor response to noradrenaline of the perfused tail artery of pregnant rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 267-269, 1974.

DORUP, I.; SKAJAA, K.; SORENSEN, K. E. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 3, p. H821-H825, 1999.

ELIAS GP, SASSAKI KT, DELBEM AC, ANTONIALI C. Atenolol reduces salivary activity in pups of spontaneously hypertensive and normotensive rats treated during pregnancy and lactation. *Clin Exp Hypertens*.2008; 30 (2): 133-41.

FLEMING, I.; BAUERSACHS, J.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circulation Research*.1999; 82: 686-695.

FLEMING I, BAUERSACHS J, SCHÄFER A, SCHOLZ D, ALDERSHVILE J, BUSSE R. Isometric contraction induces the Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(3): 1123-8.

FLEMING, I.; FISSLTHALER, B, DIMMELER, S.; KEMP, B.E.;BUSSE, R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>-/calmodulin dependent endothelial nitric oxide activity. *Circulation Research*. 2012; 82: 686-695.

FULTON, C. T.; STALLONE, J.N. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium end ovarian steroids. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 5, p. H2062-H2074, 2002.

FURCHGOTT, R. F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrate: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory' factor from bovine retractor penis is inorganic nitrate and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: VANHOUTE, P. M. Mechanism of vasodilatation. New York: Raven Press, 1988. p. 401-414.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, Nov. 1980.

GEISZT, M. NADPH 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.

GOMPF, H.; LUFT, F.C.; MORANO, I. Nitric oxide synthase upregulation and the predelivery blood pressure decrease in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2002; 20(2):255-61.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiología Médica. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006

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.

IELLAMO, F.; LEGRAMANTE, J. M.; RAIMOUNDI, G.; CASTRUCCI, F.; MASSARO, M.; PERUZZI, G. Evaluation of reproducibility of spontaneous baroreflex sensitivity at rest and during laboratory tests. **J. Hypertension**. v. 4, p. 1099–1104, 1996.

IOAKIM, S.; JÖRG, W.; BJÖRN, R.; PETRA, M.; DOROTHEA, I. A.; KAI-UWE, F.; KARL, R. K. Alcohol Enhances Oxysterol-Induced Apoptosis in Human Endothelial Cells by a Calcium-Dependent Mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:439-444.

JIMENEZ, R.; SÁNCHEZ, M.; ZARZUELO, M.J.; ROMERO, M.; QUINTELA, A.M.; LÓPEZ-SEPÚLVEDA, R.; GALINDO, P.; GÓMEZ-GUZMÁN, M.; HARO, J.M.; ZARZUELO, A.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; DUARTE, J. Endothelium-Dependent Vasodilator Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta Agonists via the Phosphatidylinositol-3 Kinase-Akt Pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 554-561, 2010.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 1-7, Jul 2003.

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, 1998.

LI, Y.; ZHENG, J.; BIRD, I.M.; MAGNESS, R.R. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod*. 2004; 70(3):785-96.

LÓPEZ RM, PÉREZ T, CASTILLO C, CASTILLO EF. Effects induced by inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and nitric oxide synthase/guanylyl cyclase pathways on the isometric contraction in rat aorta: a comparative study. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011; 25(3): 313-22.

LYALL, F.; YOUNG, A.; GREER, I. A. Nitric-oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, n. 3, p. 714-718, 1995.

LUMBERS, E.R. and Yu, Z-Y. A method for determining baroreflex-mediated sympathetic and parasympathetic control of the heart in pregnant and non-pregnant sheep. **Journal of Physiology**. v. 515.2, p. 555—566. 1998.

MAGAGNIN, V.; BASSANI, T.; BARI, V.; TURIEL, M.; MAESTRI, R.; PINNA, G.D.; PORTA, A. Non-stationarities significantly distort short-term spectral, symbolic and entropy heart rate variability indices. **Physiol. Meas.** V. 32(11), p. 1775-86. 2011.

MASSICOTTE, G.; ST-LOUIS J.; PARENT, A.; SCHIFFRIN, E. L. Decreased invitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and

spontaneously hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1987; 65: 2466-2471.

MICHEL, T.; VANHOUTTE, P. M. Cellular signaling and NO production. ***Pflugers Arch.***, v. 459, n. 6, p. 807-816, May. 2010.

McCABE, T. J.; FULTON, D.; LINDA, J.; SESSA, R.W.C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-dependent" eNOS activation by phosphorylation. ***Journal of Biol Chem***, v. 275, p. 6123-6128, 2000.

MOLNAR, 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. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 166, n. 5, p. 1560-1567, May 1992.

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

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.; HIGGS, E. A. The l-arginine-nitric oxide pathway. ***N. Engl. J. Med.***, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, Dec. 1993.

MORRIS, N. H.; EATON, B. M.; DEKKER, G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. ***British Journal of Obstetrics and Gynaecology***, v. 103, n. 1, p. 4-15, 1996.



MORTON, J.S; DAVIDGE, S.T. Arterial endothelium-derived hyperpolarization: potential role in pregnancy adaptations and complications. **Journal Cardiovasc. Pharmacol.** v.61(3), p.197-203, 2013.

MULSCH, A.; BASSENGE, E.; BUSSE, R. Nitric-oxide synthesis in endothelial cytosol - evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 340, n. 6, p. 767-770, 1989.

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

NI, Y., MEYER, M. & OSOL, G. Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilation in rat uterine arteries. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 176, p. 856–864, 1997.

OOSTING, J.; STRUIJKER-BOUNDIER, H. A. J.; JANSSEN, B. J. A. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. **J. Hypertens.** v.15, p.391–399, 1997.

OGNIBERE, D.T.; MOSS M.B.; MATSUURA, C.; BRUNINI, T.M.; MOURA, R.S.; RIBEIRO, A.C.M.; RESENDE, A.C. Characterization of the L-arginine-NO-cGMP pathway in spontaneously hypertensive rat platelets: the effects of pregnancy. *Hypertens Res.* 2010; 33(9):899-904.

PAGE, E. W.; OGDEN, E. Endocrine influences upon the blood pressure of normal and hypertensive rats. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 53, n. 1, p. 150-154, 1947.

PALLER, M. S. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ang-ii, ne, and vasopressin in pregnant rats. **American Journal of Physiology**, v. 247, n. 1, p. H100-H107, 1984.

PARENT, A.; SCHIFFRIN, E. L.; STLOUIS, J. Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric-artery rings of pregnant rats. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, n. 1, p. 229-234, 1990.

PORTA, A.; MONTANO, N.; FURLAN, R.; COGLIATI, C. GUZZETTI, S.; GNECCHI-RUSCONE, T.; MALLIANI, A.; CHANG, H.S.; STARAS, K.; GILBEY, M.P. Automatic classification of interference patterns in driven event series: application to single sympathetic neuron discharge forced by mechanical ventilation. **Biol.Cybern.** v. 91(4), p. 258-73. 2004.

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. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 7, p. 1463-1470, 1996.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. v. 86, p. 3375-3378, 1989.

RICKSTEN, S.E. and THOREN, P. Reflex control of sympathetic nerve activity and heart rate from arterial baroreceptors in conscious spontaneously hypertensive rats. **Chn. Science**, v. 611, p. 69s-172s. 1981.

ROBBE, H. W. J.; MULDER, L. J. M.; RUDDEL, H.; LANGEWITZ, W. A.; VELDMAN, J. B. P.; MULDER, G. Assessment of baroreceptor reflex sensitivity by means of spectral analysis. **Hypertension**, v.10, p. 538-543, 1987.

SCHMIDT, H.H.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. Ca<sup>2+</sup> calmodulin-regulated nitric-oxide synthases. **Cell Calcium**. v. 13, p.427-434 1992.

SELIGMAN, S. P.; BUYON, J.P.; CLANCY, R.M.; YOUNG, B.K.; ABRAMSON, S.B. The role of nitric-oxide in the pathogenesis of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, n. 4, p. 944-948, 1994.

SILVA, R.B.; PERNOMIAN, L.; GRANDO, M.D.; BENDHACK, L.M. Phenylephrine activates eNOS Ser1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, V. 738, P. 192–199, 2014.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

STAUSS, H.M. Power spectral analysis in mice: What are the appropriate frequency bands? **American Journal Physiol.Regul.Integr. Comp. Physiol.** v. 292(2), p. R902-3, 2006.

STENNETT, A.K.; QIAO, X.; FALONE, A.E; KOLEDOVA, V.V.; KHALIL, R.A. Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. **American Journal Physiol Heart Circ. Physiol.** v. 296(3), p. H745-55, 2009.

STLOUIS, J. et al. Contractile effects of vanadate on aorta rings from virgin and pregnant rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, n. 1-2, p. 145-150, 1995.

SULLIVAN, J. A. et al. Pregnancy-enhanced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation in uterine artery endothelial cells shows altered sensitivity to Ca<sup>2+</sup>, U0126, and pregnancy adaptation of eNOS activation occurs at multiple levels of cell signaling. **Endocrinology**, v. 147(5), n. 2, p. 2442-2457, 2006.

SPERANZZA, G.; ERLATO, G.; ALBIERTO, A. Autonomic changes during pregnancy: assessment by spectral heart rate variability analysis. **J. Electrocardiol.**; v. 31(2), p.101-9, 1998.

STEENGERS, E.A.P.; DADELSZEN, P-v; DUVEKOT, J.J. PIJNENBORG,R. Pre-eclampsia. **The Lancet**. V. 376, I. 9741, p. 631-644, 2010.

SPIEKER, L.E.; CORTI, R.; BINGGELI, C.; LU"SCHER, T.F. Baroreceptor Dysfunction Induced by Nitric Oxide Synthase Inhibition. **Humans.Journal of the American College of Cardiology**.V. 36, p. 435-478, 2000.

SVEDAS, E.; ISLAM, K.B.; NISELL, H.; KUBLICKIENE, K.R. Vascular endothelial growth factor induced functional and morphologic signs of endothelial dysfunction in isolated arteries from normal pregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 1, p. 168-176, 2003.

UMANS, J. G.; LINDHEIMER, M. D.; BARRON, W. M. PRESSOR EFFECT OF ENDOTHELIUM-DERIVED RELAXING FACTOR INHIBITION IN CONSCIOUS VIRGIN AND GRAVID RATS. **American Journal of Physiology**, v. 259, n. 2, p. F293-F296, 1990.

VAN DE BORNE, P.; MONTANO, N.; ZIMMERMAN, B.; PAGANI, M.; SOMERS, V.K. Relationship between repeated measures of hemodynamics, muscle sympathetic nerve activity, and their spectral oscillations. **Circulation**. V. 16;96(12), p.4326-32, 1997.

VETTORE, M. V.; DIAS, M.; DOMINGUES, R.M; VETTORE, M.V; LEAL, M.C Prenatal care and management of hypertension in pregnant women in the public healthcare system in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos De Saude Publica**, v. 27, n. 5, p. 1021-1034, 2011.

WANG, W.; McCLAIN, J.M.; ZUCKER, I. H. Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. **Hypertension**, v. 19(3), p.270-7. 1992.

WEINER, C. P.; THOMPSON, L. P. Nitric oxide and pregnancy. **Seminars in Perinatology**, v. 21, n. 5, p. 367-380, 1997.

WULFF, C.; WEIGAND, M.; KREIENBERG, R.; FRASER, H.M. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. **Reproduction**, v. 126, n. 5, p. 569-577, 2003.

XIAO, D. L.; PEARCE, W. J.; ZHANG, L. B. Pregnancy enhances endothelium-dependent relaxation of ovine uterine artery: role of NO and intracellular Ca<sup>2+</sup>. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 1, p. H183-H190, 2001.

