

**Katiussia Pinho da Silva**

**ADRENOCEPTORES- $\alpha_1$  ENVOLVIDOS NA CONTRAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE PRÉ-ECLÂMPسيا EM RATAS.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
– Campus Botucatu para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas (Farmacologia)

**Orientador: Prof. Dr André Sampaio Pupo**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FARMACOLOGIA)

**Katiussia Pinho da Silva**

**ADRENOCEPTORES- $\alpha_1$  ENVOLVIDOS NA CONTRAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE PRÉ-ECLÂMPsia EM RATAS.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –  
Campus Botucatu para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas (Farmacologia)

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Katiussia Pinho da.

Adrenoceptores- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal em modelo experimental de pré-eclâmpsia em ratas / Katiussia Pinho da Silva. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo  
Capes: 21005001

1. Pré-eclâmpsia. 2. Aorta abdominal. 3. Receptores adrenérgicos. 4. Farmacologia molecular.

Palavras-chave: Adrenoceptores- $\alpha_1$ ; Aorta abdominal; Pré-eclâmpsia.

**Katiussia Pinho da Silva**

**ADRENOCEPTORES- $\alpha_1$  ENVOLVIDOS NA CONTRAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE PRÉ-ECLÂMPسيا EM RATAS.**

**Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

---

Profº Drº André Sampaio Pupo  
Orientador / Presidente

---

Profª Drª Luciana Venturini Rossoni  
1º Titular

---

Profª Drª Valéria Cristina Sandrim  
2º Titular

*“Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia”*

*Guimarães Rosa*

## *Dedicatória*

*“À Deus, a ele toda honra e glória”*

*À meu saudoso papai (Cícero Alves da Silva), por seu exemplo de vida!  
À minha dedicada e amada Mamãe (Maria de Lourdes Pinho da Silva), por  
abdicar sua vida em favor aos meus estudos.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Aos Mestres,*

*Profº Drº André Sampaio Pupo, pelo brilhantismo em fazer ciência e pela oportunidade de aprendizagem.*

*Profº Drº Carlos Alan Cândido Júnior, por fazer de seu laboratório minha segunda casa de experimento, por sua gentileza e incentivo.*

*Profª Drª Valéria Cristina Sandrím, por sua preocupação com a implantação do modelo experimental de pré-eclâmpsia.*

## *Agradecimentos*

*Ao meu amigo, que virou namorado, que se tornou meu noivo, que se tornará meu marido, e que sempre foi meu companheiro de boas risadas, de segredos secretos e de viagens animadas, **Anaximandro Braga Brito**, por sua dedicação e amor.*

*À minha irmã **Kássia Pinho** e meu cunhado **Cacionor Pereira** por todo o acolhimento e companheirismo durante minha estadia em sua casa.*

*À **Lorena Machado Amaral** (University of Mississippi Medical Center) e ao **José Sérgio Possomato Vieira** (Laboratório de Farmacologia Cardiovascular) por todas as dúvidas sanadas e pelas valiosas dicas durante o desenvolvimento do protocolo experimental RUPP, sem suas preciosas contribuições, certamente seria muito mais difícil!*

*À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Patrícia Fidelis**, pelos ensinamentos sobre canulação de carótida e análise de registro de pressão arterial.*

*Aos companheiros de laboratórios, **Luiz Ricardo de Almeida Kiguti**, por todas discussões científicas, orientações e momentos de implicâncias saudáveis; **André Muller**, por sua paciência, pelas proveitosas discussões científicas e ajudas necessárias em momentos que tinha vontade de desistir; **Carlos Alberto S. Ribeiro**, pelo convívio agradável. As minhas queridinhas ICs, **Bia e Cris**, por me permitirem treinar a arte de ensinar.*

*Ao meu querido e amado corredor da farmacologia, que inclui os ilustres Laboratório de Farmacologia Vascular e Farmacologia Cardiovascular, **Mayara, Lílian, Zé, Victor e Regina**, pelas conversas proveitosas, animadas e que sempre terminavam em estratégias de como ganhar o Nobel (rs!).*

*Aos amigos do Programa em Pós-graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia), **Paula, Lorena, Carol, Rodrigo, Larissa**, pelo riso fácil, pelas ajudas necessárias e pelo companheirismo diário!*

*Aos queridos amigos do Maranhão, que assim como eu, deixaram seu lar, sua família, seus amigos e fizeram de Botucatu seu novo lar, **Valbert, Nayrana, Bruna, Clárisa, Fabrício, Ivo e Flávio**, pelos momentos no qual eu me sentia mais próxima de meus laços fraternos maranhenses.*



*À banca examinadora, por dispor de seu tempo para analisar e discutir meus resultados.*

*Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Janete, Cris, Paulão e Luís, pela disponibilidade em colaborar com o andamento do projeto.*

*À Capes, pela ajuda financeira.*

## RESUMO

A Pré-eclâmpsia (PE) é uma desordem hipertensiva gestacional, cuja fisiopatologia tem sido atribuída a forte resposta inflamatória, disfunção endotelial, agregação plaquetária e aumento da resistência vascular. Estudos com PE relatam inadequado aumento na ação de vários vasoconstritores, incluindo endotelina, adenosina, angiotensina II, e noradrenalina ocasionando aumento da pressão arterial. De fato, o sistema nervoso autônomo simpático através do neurotransmissor noradrenalina regula a pressão arterial mediante a ativação dos adrenocetores- $\alpha_1$  (ARs- $\alpha_1$ ). No presente estudo, foi investigado através do uso de agonistas e antagonistas seletivos os subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal de ratas prenhes submetidas à um modelo experimental de PE por redução da pressão de perfusão uterina (RUPP), e esses receptores foram comparados com aqueles envolvidos na contração da artéria de ratas virgens. Os resultados indicam que as contrações da artéria aorta abdominal de ratas virgens em resposta à noradrenalina resultam da ativação de AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$ , mas que na artéria da fêmea há uma maior contribuição de AR- $\alpha_{1A}$  do que na respectiva artéria de machos. Além disso, a prenhez induziu plasticidade nos subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da artéria aorta abdominal, uma vez que houve menor participação de AR- $\alpha_{1A}$  nas contrações de ratas prenhes do que aquela observada na artéria de ratas virgens. Por outro lado, na artéria aorta abdominal de fêmeas submetidas à RUPP agonistas e antagonistas seletivos mostraram comportamento complexo que, apesar de indicar o envolvimento de AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$ , indica algum tipo de interação próxima entre esses subtipos. O presente estudo mostra que tanto a prenhez quanto a cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina induz plasticidade nos ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da artéria aorta abdominal ressaltando a necessidade de que o estudo de drogas potencialmente úteis no tratamento de uma determinada patologia seja feito em modelos experimentais que mimetizem a situação terapêutica. Portanto, será importante investigar a capacidade de diferentes antagonistas de ARs- $\alpha_1$  reduzirem a pressão arterial elevada das ratas submetidas à esse modelo experimental de pré-eclâmpsia.

**Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia; Adrenoceptores- $\alpha_1$ ; Aorta abdominal

## ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a gestational hypertensive disorder, for which the physiopathology has been attributed to an intense inflammatory response, endothelial dysfunction, platelet aggregation and increased vascular resistance. Previous studies reported that in PE there is an inadequate increase in the action of several vasoconstrictors, including endothelin, adenosine, angiotensin II and noradrenaline. In fact, the sympathetic nervous system by releasing the neurotransmitter noradrenaline regulates the arterial pressure through activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors ( $\alpha_1$ -ARs). The present study investigated the  $\alpha_1$ -ARs subtypes involved in the contractions of the abdominal aortae from pregnant rats submitted to an experimental model of PE, the reduced in uterine perfusion pressure (RUPP), compared these receptors with those involved in the contractions of abdominal aortae from non-pregnant (virgin) and pregnant female rats. The results indicate that there are both  $\alpha_{1A}$ -ARs and  $\alpha_{1D}$ -ARs in abdominal aortae from non pregnant females, but that the  $\alpha_{1A}$ -ARs is more important in the contraction of the female than in the contraction of the respective artery from male rats. Pregnancy induces plasticity in the  $\alpha_1$ -ARs of the abdominal aortae, since there was a less significant participation of  $\alpha_{1A}$ -AR in the contraction of abdominal aortae from pregnant rats than in the artery of virgin females. In the other hand, selective agonists and antagonists presented complex behaviours in the abdominal aorta from pregnant females submitted to the RUPP model, indicating that there must be a close interaction between  $\alpha_{1A}$ -AR e  $\alpha_{1D}$ -AR in the contraction of this artery. The present study shows that either pregnancy or RUPP model induces plasticity in the  $\alpha_1$ -ARs of the abdominal aortae highlighting the need that the study of potentially useful drugs to treat a certain disease must be performed in experimental models that mimic the therapeutic condition. It will be important to investigate the ability of  $\alpha_1$ -ARs antagonists to reduce the arterial pressure of rats submitted to this experimental model of PE.

**Keywords:** Preeclampsia,  $\alpha_1$ -Adrenoceptors, Abdominal Aortae

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Ilustração das subfamílias dos ARs:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , conforme seu acoplamento a proteína G e seus respectivos subtipos.----- **18**
- Figura 2:** Ilustração do AR- $\alpha_{1A}$ , demonstrando os aminoácidos (aa) que o constitui, sendo em vermelhos os aa comuns entre os subtipos, além do compartimento extracelular com a região amino-terminal e o compartimento intracelular com a região carboxil-terminal. Cada compartimento contém alças hidrofílicas de conexão entre as hélices.----- **19**
- Figura 3:** Ilustração do AR- $\alpha_{1B}$ , demonstrando os aminoácidos (aa) que o constitui, sendo em vermelhos os aa comuns entre os subtipos, além do compartimento extracelular com a região amino-terminal e o compartimento intracelular com a região carboxil-terminal. Cada compartimento contém alças hidrofílicas de conexão entre as hélices.----- **20**
- Figura 4:** Ilustração do AR- $\alpha_{1D}$ , demonstrando os aminoácidos (aa) que o constitui, sendo em vermelhos os aa comuns entre os subtipos, além do compartimento extracelular com a região amino-terminal e o compartimento intracelular com a região carboxil-terminal. Cada compartimento contém alças hidrofílicas de conexão entre as hélices.----- **20**
- Figura 5:** Via de sinalização canônica da noradrenalina ou adrenalina. Em 1 é demonstrado a ligação do agonista ao AR- $\alpha_1$ , em seguida ocorre troca de GDP por GTP, levando a dissociação do trímero ( $\alpha\beta\gamma$ ) que compõem a proteína  $G_q$  (2;3). Em 3 demonstra-se a subunidade  $\alpha_q$  ativando a fosfolipase C do tipo  $\beta$  com subsequente hidrólise do fosfolípido de membrana, fosfatidil inositol bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) (4) em dois segundos mensageiros: o inositol (1,4,5)-trisfosfato ([Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] ou IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG) (5). O IP<sub>3</sub>, por ser hidrossolúvel, difunde-se pelo citoplasma e liga-se aos receptores presente organelas intracelulares que estocam Ca<sup>2+</sup> aumentando as concentrações citosólicas livres deste cátion (5,6), em sequência, o Ca<sup>2+</sup> intracelular liga-se a calmodulina causando modificações em diversas atividades de enzimas-alvos (6') e juntamente com o DAG, ativa a proteína quinase C (PKC) que é responsável pela fosforilação de diversas proteínas-alvos.----- **22**
- Figura 6:** Fotografia do esfregaço vaginal de rata que contém células na fase estral e espermatozoides (setas).----- **30**
- Figura 7:** Ilustração da região abdominal demonstrando os rins, veia cava abdominal, artéria aorta abdominal (região inferior) e bifurcação ilíaca. ----- **31**
- Figura 8:** Sequência fotográfica das etapas do procedimento cirúrgico de redução da pressão de perfusão uterina (RUPP). O modelo consiste em laparotomia no 14º dia de gestação (1) seguida pelo isolamento dos cornos uterinos (2); Em 3 é demonstrado a retirada da gordura em torno das artérias uterinas seguido pelo isolamento (4) e clipagem da artéria ovariana (5); Em 6 é demonstrada a retirada da gordura em torno da artéria aorta abdominal, seguida pelo isolamento (7) e clipagem (8) da artéria aorta abdominal. Em 9 e 10 são demonstradas as suturas interna e externa, respectivamente. ----- **32**
- Figura 9:** Representação esquemática da cronologia das metodologias aplicadas nos grupos: SHAM e RUPP. O estudo é iniciado com o acasalamento seguido pela confirmação da prenhez. A seguir, no 14º dia de gestação foi realizado ou não o procedimento cirúrgico de redução da pressão de perfusão uterina, conforme descrito por Li et al., 2012. No 18º dia de gestação foi avaliada a pressão arterial média, seguida dos estudos de contração in vitro.----- **35**
- Figura 10:** Gráfico de dispersão do número de fetos viáveis (A) e número de fetos reabsorvidos (B) nos grupos experimentais SHAM (n=12) e RUPP (n=11). As barras horizontais representam a média  $\pm$  epm. Os grupos foram comparados utilizando o Teste t-Student não pareado.----- **38**

- Figura 11:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina em aorta abdominal de ratos controle, na ausência (○) e presença (■) do coquetel (cocaína 3μM, corticosterona 10μM, propranolol 0.1μM e ioimbina 0.1μM). Símbolos e barras representam o erro ± epm de 4 ratas/grupo. ----- 39
- Figura 12:** Registros representativos das curvas concentração-resposta cumulativas à noradrenalina na aorta abdominal dos animais dos grupos experimentais machos (A) e fêmeas: CONTROLE (B) NPPC (C), RUPP (D), SHAM (E).----- 40
- Figura 13:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina nas aortas abdominais dos grupos experimentais: CONTROLE (●); NPPC (◆); SHAM(■); RUPP (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 4-7 ratas/grupo. 41
- Figura 14:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos (A) e fêmeas (B) na ausência e presença do antagonista competitivo não seletivo do ARs-α<sub>1</sub> Prazosin. Em C é mostrado o gráfico de Schild (C) do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos (●) e fêmeas (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 4 ratos(as)/grupo. ----- 42
- Figura 15:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratos machos (A) e fêmeas (B) obtidas na ausência e presença do antagonista competitivo seletivo dos ARs-α<sub>1D</sub> BMY 7378. Em C é mostrado o gráfico de Schild do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de machos (●) e fêmeas (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 4-5 ratos (as)/grupo. ----- 43
- Figura 16:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratos machos (A,D) e fêmeas (B,E) obtidas na ausência e presença dos antagonistas RS 100329 (A,B) e L 765,314 (D,E). Em C são mostradas as contrações máximas (E<sub>máx</sub>) da noradrenalina na ausência (0 nM) e presença do antagonista seletivo ARs-α<sub>1A</sub> RS 100329 (1nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM). Símbolos representam a média ± epm de 7-3 ratos (as)/grupo. ----- 45
- Figura 17:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 nos grupos experimentais machos (●) e fêmeas (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 3 ratos/grupo. ----- 46
- Figura 18:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 na aorta abdominal de ratos machos (A) e fêmeas (B) obtidas na ausência e presença dos antagonistas 10 nM BMY 7378 (■) e 10 nM RS 100329 (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 3 ratos (as)/grupo. ----- 46
- Figura 19:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista não seletivo ARs-α<sub>1</sub> Prazosin. À direita (D) está representado o gráfico de Schild do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas NPPC(●), SHAM (■), RUPP (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 4 ratas/grupo. - 49
- Figura 20:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na indução de contração da aorta abdominal de ratas fêmeas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista seletivo ARs-α<sub>1D</sub> BMY 7378. À direita (D) está representado o gráfico de Schild do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas NPPC(●), SHAM (■), RUPP (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 4 ratas/grupo. ----- 50
- Figura 21:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratas fêmeas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista seletivo ARs-α<sub>1A</sub> RS 100329. Em D são mostradas as contrações máximas (E<sub>máx</sub>) da noradrenalina na ausência (0 nM) e presença do antagonista seletivo ARs-α<sub>1A</sub> RS 100329 (1nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM). Símbolos representam a média ± epm de 3-4 ratas/grupo. ----- 51
- Figura 22:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 na indução de contração da aorta abdominal de ratas NPPC(●), SHAM (■), RUPP (▲ ). Símbolos representam a média ± epm de 4-3 ratas/grupo.----- 53

**Figura 23:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 na indução de contração da aorta abdominal de ratas NPPC (A), SHAM (B) e RUPP (C) obtidas na ausência (●) e presença dos antagonistas BMY 7378 (■) e RS 100329 (▲). Símbolos representam a média ± epm de 4-3 ratas/grupo. ----- **53**

**Figura 24:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na indução de contração da aorta abdominal de ratas fêmeas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$  L 765,314. À direita (D) está representado o gráfico de *Schild* do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas NPPC(●), SHAM (■), RUPP (▲). S Símbolos representam a média ± epm de 3-4 ratas/grupo. ----- **54**

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Contração máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ , em % ao segundo choque com fenilefrina 10  $\mu$ M), potência ( $pD_2$ ) da noradrenalina na indução de contração da aorta abdominal de ratas dos diferentes grupos. ----- 41
- Tabela 2:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista Prazosin contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos e fêmeas. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e inclinações do gráfico de Schild como média e intervalo de confiança de 95% (IC). ----- 43
- Tabela 3:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista BMY 7378 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos e fêmeas. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e inclinações do gráfico de Schild como média e intervalo de confiança de 95% (IC). ----- 44
- Tabela 4:** Resposta máxima à noradrenalina (NA), na presença de concentrações crescentes do RS 100329 (antagonista de ARs- $\alpha_{1A}$ ) dos grupos experimentais machos e fêmeas. ----- 45
- Tabela 5:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista Prazosin contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas prenhes e não prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e slope de Schild como média e intervalo de confiança de 95% (IC). ----- 49
- Tabela 6:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista BMY 7378 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas prenhes e não prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e slope de Schild como média e intervalo de confiança de 95% (IC). ----- 50
- Tabela 7:** Resposta máxima à noradrenalina (NA), na presença de concentrações crescentes do RS 100329 (antagonista de ARs- $\alpha_{1A}$ ). ----- 52
- Tabela 8:** Estimativas de potências ( $pA_2$ ) do antagonista L 765,314 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas prenhes e não prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina. Valores de  $pA_2$  são expressos com média  $\pm$  epm e slope de Schild como média e intervalo de confiança de 95% (IC). ----- 55



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
<i>Pré-eclâmpsia</i>	15
<i>Adrenoceptores (ARs)</i>	17
<i>Características dos subtipos ARs-<math>\alpha_1</math></i>	18
<i>ARs-<math>\alpha_1</math> e Pressão Arterial</i>	24
OBJETIVOS	28
<i>Objetivo Geral</i>	28
<i>Objetivo Específicos</i>	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
<i>Animais</i>	29
<i>Acompanhamento do ciclo reprodutivo das ratas e acasalamento</i>	29
<i>Cirurgia de Redução da Pressão de Perfusão Uterina (RUPP)</i>	30
<i>Avaliação da pressão arterial média</i>	33
<i>Estudos de Contração da Aorta Abdominal in vitro</i>	33
<i>Avaliação da afinidade dos antagonistas competitivos</i>	34
<i>Desenho experimental</i>	35
<i>Drogas e Reagentes</i>	36
ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
RESULTADOS	37
<i>Padronização do Modelo Experimental de Pré-Eclâmpsia em Ratas.</i>	37
<i>Hipertensão arterial induzida pela Redução da Pressão de Perfusão Uterina (RUPP)</i>	37
<i>Estudos de contração in vitro</i>	38
<i>Caracterização farmacológica dos subtipos de ARs-<math>\alpha_1</math> funcionais em aorta abdominal de ratos machos e fêmeas.</i>	42
<i>Investigação dos subtipos de ARs-<math>\alpha_1</math> funcionais na artéria aorta abdominal de ratas não prenhes (NPPC) e prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) e ratas prenhes sem sofrerem a redução da pressão de perfusão uterina (SHAM).</i>	48
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

## INTRODUÇÃO

### *Pré-eclâmpsia*

A Pré-eclâmpsia (PE) é uma desordem gestacional multisistêmica, cujo diagnóstico baseia-se em hipertensão arterial (Pressão Arterial (PA)  $\geq 140 \times 90$  mmHg) e ocasionalmente proteinúria ( $\geq 300$  mg / 24 hs) à partir da 20<sup>a</sup> ou 30<sup>a</sup> semana de gestação (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000; Roberts et al., 2012). Na ausência de proteinúria, o diagnóstico baseia-se em hipertensão arterial e evidências de doenças sistêmicas, tais como: trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal, edema pulmonar, distúrbios visuais ou cerebrais e restrição de crescimento fetal (Lowe et al., 2015). A PE atinge 5% a 8% da população mundial (ACOG Committee on Obstetric Practice., 2002), sendo uma importante causa de morbidade materna e perinatal, uma vez que cerca de 76.000 mortes maternas e 500.000 mortes perinatais por ano são relacionadas a esta patologia (Duley L., 2009). Dados do Sistema Único de Saúde (SUS) apontam que no Brasil cerca de três gestantes morrem por dia vítima das complicações causadas pela PE (Brasil. Ministério da Saúde.DATASUS [Internet], 2008).

A fisiopatologia da PE tem sido relacionada a rigorosa resposta inflamatória (Szarka et al., 2010; Regal et al., 2015; van Rijn et al., 2016), disfunção endotelial (Sandrim et al., 2008; Kao et al., 2016), agregação plaquetária (Doğana et al., 2015; Tannetta et al., 2015) e aumento da resistência vascular (LaMarca et al., 2009; George e Granger, 2011; Lamarca et al., 2012). No entanto, mesmo com esta pluralidade de sistemas envolvidos, a fisiopatologia da PE ainda não está completamente elucidada.

A classificação da PE é baseada em sinais clínicos e laboratoriais, sendo caracterizada como: precoce em razão de sinais pró- e anti-angiogênicos que antecedem os sinais clínicos (Lambert-Messerlian et al., 2009) e tardia quando há interação de produtos da placenta com o endotélio vascular induzindo lesões endoteliais sistêmicas, aumento da resposta inflamatória materna e liberação de agentes vasopressores (Cowans et al., 2010)

É interessante notar que, fisiologicamente durante a gravidez há elevação do volume sanguíneo total, ocasionando acréscimo de cerca de 30% a 50% do débito cardíaco e, conseqüentemente, aumento da frequência cardíaca (Hytten, 1985). Entretanto, mesmo com estas alterações hemodinâmicas, a gravidez normal é caracterizada por diminuições da pressão arterial média (PAM) (Morris et al., 2015), decorrente de redução significativa da resistência vascular periférica devido tanto ao intenso processo angiogênico quanto à redução da resposta aos agentes vasoconstritores (Bardin et al., 2015). No entanto, há estudos relatando que durante a PE há inadequado aumento da sensibilidade a vários vasoconstritores, como endotelina (Celik et al., 2013; Verdonk et al., 2015), adenosina (Yoneyama et al., 2002; Espinoza et al., 2011; Iriyama et al., 2015), angiotensina II (Novak et al., 1997; Herse et al., 2007; Pulgar et al., 2014) e noradrenalina (Bottalico et al., 2004; Na et al., 2013; Lampinen et al., 2014) ocasionando aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente aumento da PA.

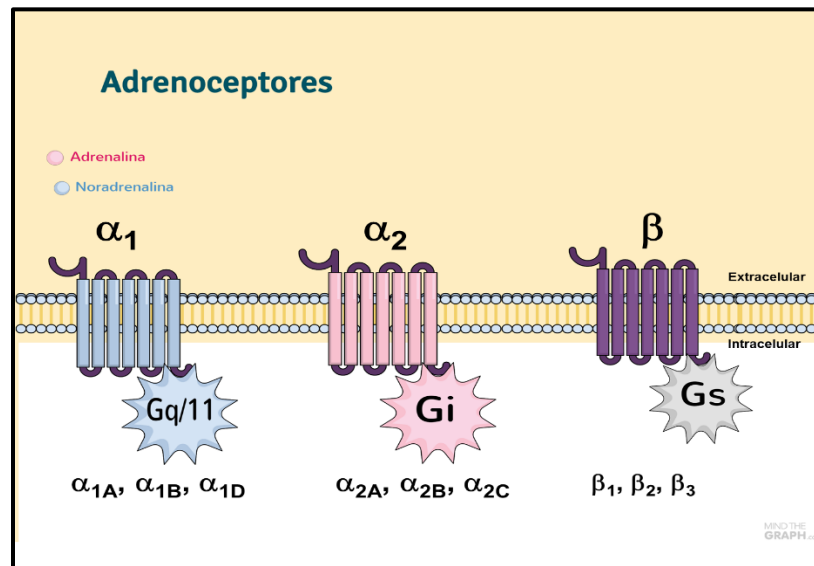
De fato, a hiperatividade do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS), o qual tem como principal neurotransmissor a noradrenalina, ocorre em diversas desordens hipertensivas gestacionais e sua importância na instalação dessas doenças vem sendo relatada durante anos e por diversos grupos de pesquisas (Schobel et al., 1996; Khatun et al., 1998; Maeda, 2014).

Diante dessa exacerbada atividade do SNAS, as principais abordagens farmacológicas empregadas são os anti-hipertensivos, dentre os quais estão a hidralazina, a nifedipina, a  $\alpha$ -metildopa e o labetalol. A hidralazina é um potente vasodilatador, cujo mecanismo permanece pouco compreendido, mas parece envolver a liberação intracelular de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) induzida pelo 2º mensageiro inositol (1,4,5)-trisfosfato ([Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] ou IP<sub>3</sub>) (Gurney e Allam, 1995; Ellershaw e Gurney, 2001; Dulce et al., 2013), a nifedipina, age bloqueando canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes do tipo L, impedindo que ocorra o influxo  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula de músculo liso vascular e reduzindo a contração induzida por vasoconstritores (Schümann et al., 1975). A  $\alpha$ -metildopa é um análogo da L-dopa que é convertido em  $\alpha$ -metildopamina e subseqüentemente em  $\alpha$ -metilnoradrenalina por ação da dopamina  $\beta$ -hidroxilase na terminação nervosa adrenérgica; após sua síntese em vesículas dos neurônios

adrenérgicos, a  $\alpha$ -metilnoradrenalina substitui estequiometricamente a noradrenalina, atuando como um falso neurotransmissor, pois tem eficácia desprezível nos adrenoceptores adrenoceptores (ARs)- $\alpha_1$  (pós-sinápticos) sendo incapaz de promover vasoconstrição. Por outro lado, a  $\alpha$ -metilnoradrenalina comporta-se como um agonista de ARs- $\alpha_2$  (pré-sinápticos) diminuindo a liberação da noradrenalina, ocasionando diminuição da PA (Schäfers et al., 1999). O labetalol, é um fármaco formado a partir de uma mistura racêmica de quatro compostos isômeros; dois desses isômeros – o (S,S)- e (R,S)- são inativos, o terceiro (S,R) é um potente antagonista de ARs- $\alpha_1$ , e o último (R,R) é um potente antagonista de ARs- $\beta$  ( $\beta_1=\beta_2$ ), por causa desta combinação ocorre redução da resistência vascular sistêmica e do débito cardíaco (Quyyumi et al., 1985; Neal e Benowitz, 2001). Diante disso, nota-se que ARs são uns dos principais alvos farmacológicos para o tratamento anti-hipertensivo na PE.

### **Adrenoceptores (ARs)**

Os ARs são receptores com sete domínios transmembranares (7TM ou GPCR), membros da classe da *Rodopsina* da superfamília dos receptores acoplados proteínas G (Fredriksson et al., 2003), e são os alvos através dos quais o neurotransmissor autonômico e central noradrenalina e o hormônio adrenalina regulam diferentes funções fisiológicas. Em razão de sua ampla distribuição no organismo, os ARs regulam diversas funções incluindo o controle do tônus da musculatura lisa vascular e não-vascular, o inotropismo e cronotropismo cardíaco, e uma variedade de atividades metabólicas e de neurônios do SNC. Devido as suas extensas funções no organismo, os ARs são alvos de diversas terapias farmacológicas para o tratamento de condições como asma brônquica, choque séptico, depressão do humor, glaucoma, angina pectoris, hipertrofia cardíaca e hipertensão arterial. Segundo suas propriedades estruturais, farmacológicas e acoplamento a proteína G, os ARs são divididos em três subfamílias, denominadas  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ),  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ),  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) (Zhong e Minneman, 1999) (Figura 1).

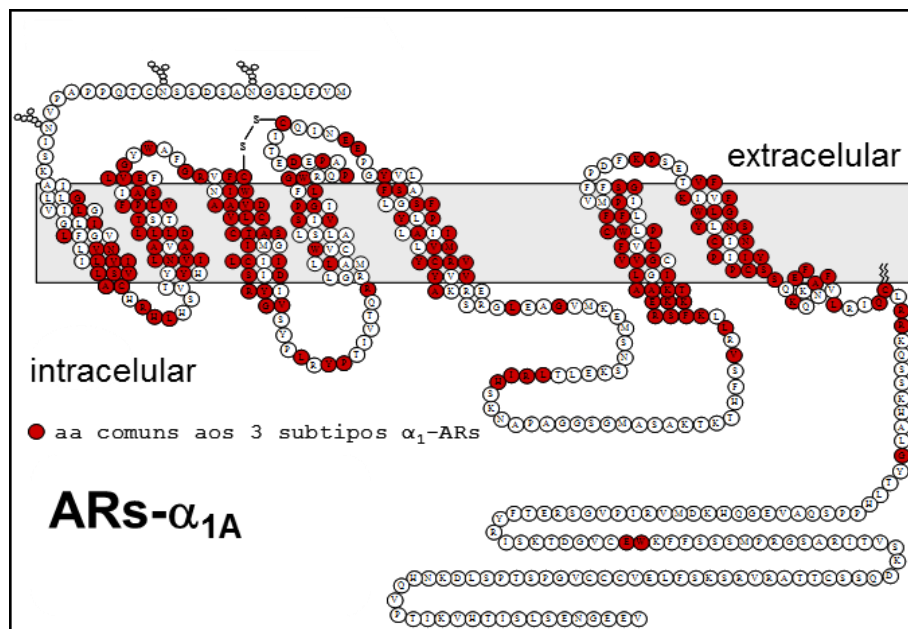


**Figura 1:** Ilustração das subfamílias dos ARs:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , conforme seu acoplamento a proteína G e seus respectivos subtipos.

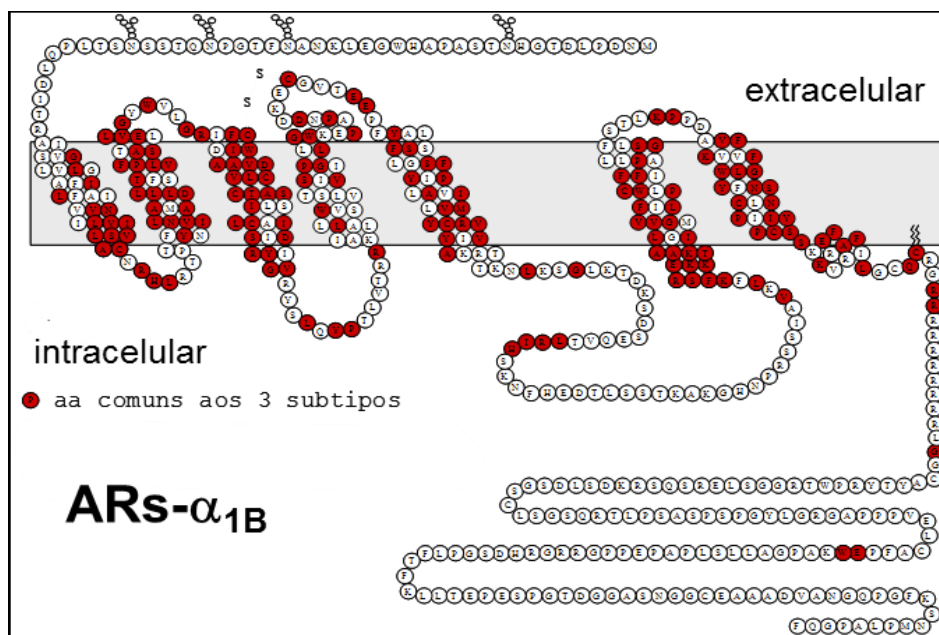
### **Características dos subtipos ARs- $\alpha_1$**

Os três subtipos de ARs- $\alpha_1$  acoplam-se preferencialmente à proteína  $G_{q/11}$  e são formados por uma cadeia polipeptídica única que apresenta sete grandes domínios hidrofóbicos em forma de sete hélices transmembranares interligadas por alças hidrofílicas que se estendem para os meios intracelular e extracelular (Wheatley et al., 2007; Deupi and Standfuss, 2011). De acordo com essa conformação, a porção amino-terminal que contém sítios consensuais de N-glicosilação é localizada no meio extracelular e tem sequências de aminoácidos e tamanhos variados entre os subtipos, sendo consideravelmente maior no ARs- $\alpha_{1D}$  ( $\cong$  90 aminoácidos) em relação ao ARs- $\alpha_{1A}$  ( $\cong$  25 aminoácidos) e ARs- $\alpha_{1B}$  ( $\cong$  42 aminoácidos); é interessante notar que a diferença na sequência de aminoácidos na porção N-terminal extracelular do ARs- $\alpha_{1D}$  parece ser importante para a inserção apropriada do receptor na membrana plasmática (Pupo et al., 2003; Hague et al., 2004) (Figuras 2, 3 e 4). A região carboxi-terminal dos ARs- $\alpha_1$  está localizada no compartimento intracelular e contém sítios consensuais para a fosforilação de serina/treonina quinases levando à dessensibilização do receptor (Akinaga et

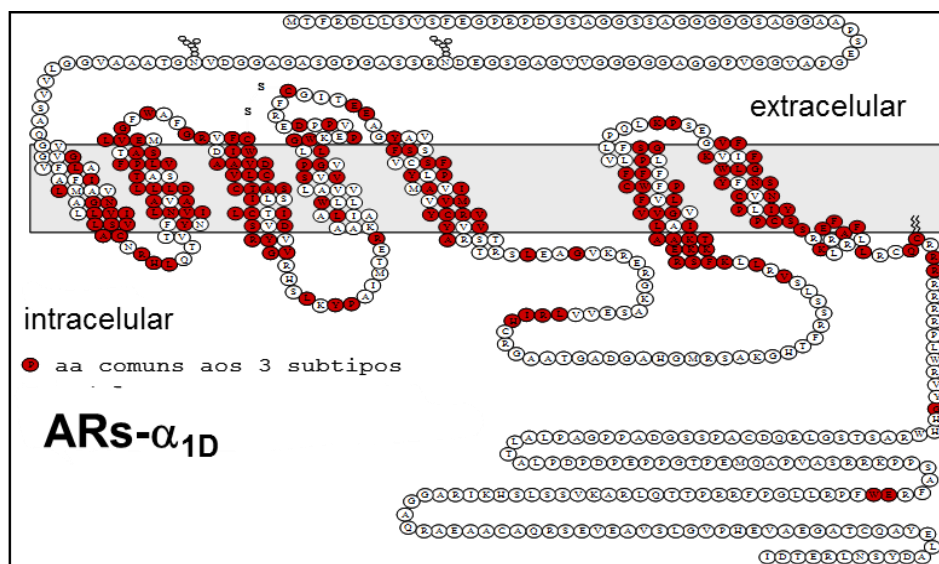
al., 2013; O-Uchi et al., 2013). Em humanos, os ARs- $\alpha_{1a}$ , ARs- $\alpha_{1b}$ , ARs- $\alpha_{1d}$  são codificados por genes diferentes localizados nos cromossomos 8, 5, 20, respectivamente (Hieble et al., 1995).



**Figura 2:** Ilustração do AR- $\alpha_{1A}$ , demonstrando os aminoácidos (aa) que o constitui, sendo em vermelhos os aa comuns entre os subtipos, além do compartimento extracelular com a região amino-terminal e o compartimento intracelular com a região carboxil-terminal. Cada compartimento contém alças hidrofílicas de conexão entre as hélices.



**Figura 3:** Ilustração do AR- $\alpha_{1B}$ , demonstrando os aminoácidos (aa) que o constitui, sendo em vermelhos os aa comuns entre os subtipos, além do compartimento extracelular com a região amino-terminal e o compartimento intracelular com a região carboxil-terminal. Cada compartimento contém alças hidrofílicas de conexão entre as hélices.

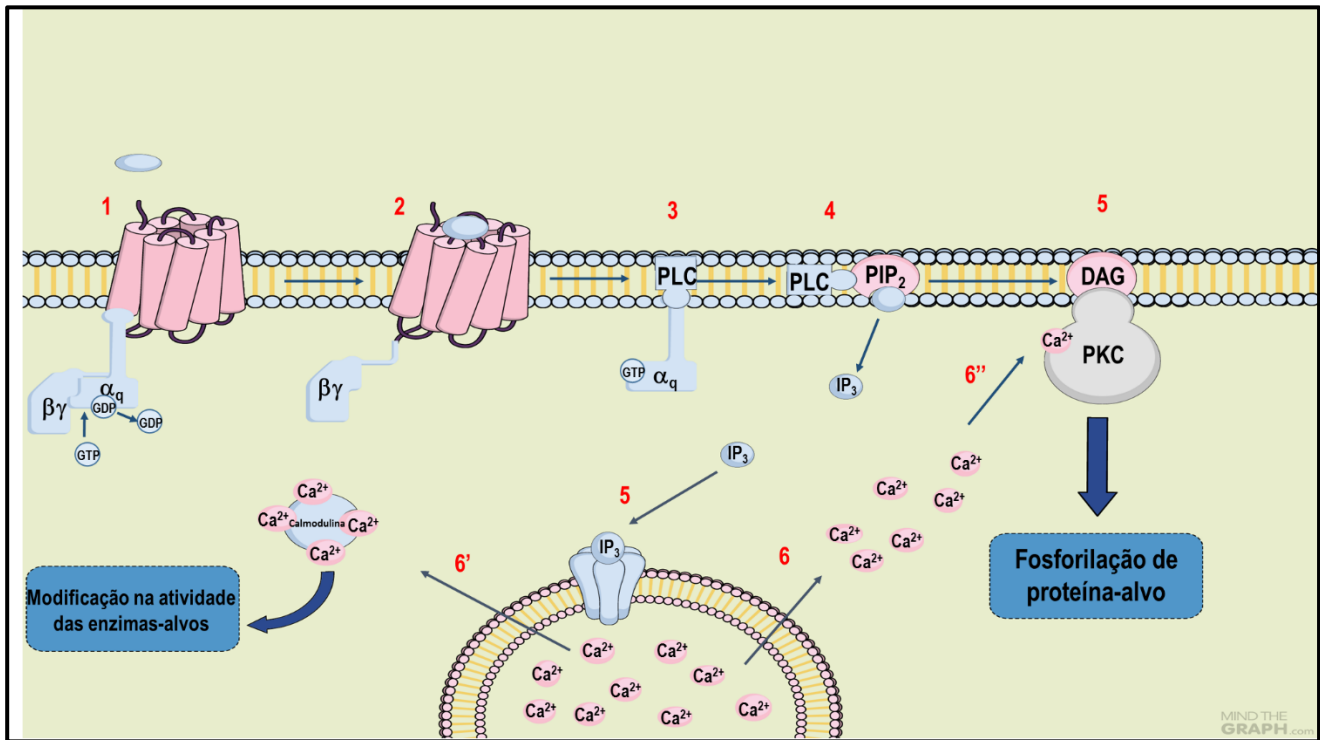


**Figura 4:** Ilustração do AR- $\alpha_{1D}$ , demonstrando os aminoácidos (aa) que o constitui, sendo em vermelhos os aa comuns entre os subtipos, além do compartimento extracelular com a região amino-terminal e o compartimento intracelular com a região carboxil-terminal. Cada compartimento contém alças hidrofílicas de conexão entre as hélices.

Apesar dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  possuírem diferenças consideráveis tanto na sequência como na quantidade de aminoácidos, todavia apresentam semelhança quanto ao sítio de ligação das catecolaminas e alta conservação em suas terceiras alças intracelulares, que é a principal região responsável pela ativação da proteína  $G_{q/11}$  (Weis e Kobilka, 2008; Campbell et al., 2014).

Os ARs- $\alpha_1$  são acoplados a uma variedade de sistemas de segundo mensageiros e entre as principais vias de sinalização encontra-se a via  $G_{q/11}$  que ao ser ativada leva à ativação da fosfolipase C do tipo  $\beta$  (PLC) e a subsequente hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidil inositol bisfosfato ( $PIP_2$ ), gerando dois segundos mensageiros:  $IP_3$  e o diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  se difunde pelo citoplasma e se liga a seus receptores presentes em organelas intracelulares que estocam  $Ca^{2+}$  aumentando as concentrações citosólicas livres deste cátion levando a contração em diversos tecidos vasculares e não vasculares (Wu et al., 1992; Nojimoto et al., 2009; Westcott et al., 2012). O DAG juntamente com o cálcio ativa a proteína quinase C (PKC) responsável pela fosforilação de proteínas alvo causando diversas respostas biológicas celulares como: proliferação celular, apoptose e metabolismo de glicogênio (Cotecchia, 2010; Akinaga et al., 2013) (Figura 5).





**Figura 5:** Via de sinalização canônica da noradrenalina ou adrenalina. Em 1 é demonstrado a ligação do agonista ao AR- $\alpha_1$ , em seguida ocorre troca de GDP por GTP, levando a dissociação do trímero ( $\alpha\beta\gamma$ ) que compõem a proteína  $G_q$  (2;3). Em 3 demonstra-se a subunidade  $\alpha_q$  ativando a fosfolipase C do tipo  $\beta$  com subsequente hidrólise do fosfolipídio de membrana, fosfatidil inositol bisfosfato ( $PIP_2$ ) (4) em dois segundos mensageiros: o inositol (1,4,5)-trisfosfato ( $[Ins(1,4,5)P_3]$  ou  $IP_3$ ) e o diacilglicerol (DAG) (5). O  $IP_3$ , por ser hidrossolúvel, difunde-se pelo citoplasma e liga-se aos receptores presentes em organelas intracelulares que estocam  $Ca^{2+}$  aumentando as concentrações citosólicas livres deste cátion (5,6), em sequência, o  $Ca^{2+}$  intracelular liga-se a calmodulina causando modificações em diversas atividades de enzimas-alvos (6') e juntamente com o DAG, ativa a proteína quinase C (PKC) que é responsável pela fosforilação de diversas proteínas-alvos.

Além da ativação da proteína  $G_{q/11}$ , os três ARs- $\alpha_1$  ativam outras vias de sinalização que incluem a fosfolipase  $A_2$ , fosfolipase D, liberação de ácido araquidônico, estimulação da produção de AMPc, ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e inibição de sinalização reguladas pelas RhoA/ROCK (Nishio et al., 1996; Kleine-Brueggeney et al., 2014; O'Connell et al., 2014; Yu et al., 2014). Além disso, os ARs- $\alpha_1$  interagem de forma subtipo específica com outras proteínas intracelulares como a sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) através do domínio PDZ da enzima (Pupo e Minneman, 2002) e a região globular do receptor para

fator de complemento C1q (gC1qR) através de um grupamento de aminoácidos carregados positivamente localizados no início da cauda C-terminal de ARs- $\alpha_{1B}$  e ARs- $\alpha_{1D}$ , mas não de ARs- $\alpha_{1A}$  (Pupo e Minneman, 2003).

Em razão das diversas vias de sinalizações potencialmente disparadas pela ativação dos ARs- $\alpha_1$ , é fácil compreender a importância desses receptores tanto na regulação de funções fisiológicas como possíveis alvos terapêuticos para diversas patologias.

A capacidade de diferentes ligantes de ARs- $\alpha_1$  promoverem contrações (agonistas de ARs- $\alpha_1$ ) ou inibi-las (antagonistas de ARs- $\alpha_1$ ) mostrando diferentes potências e eficácias em diversos vasos sanguíneos fundamenta o uso desses ligantes como ferramentas farmacológicas para caracterizar funcionalmente os diferentes subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos numa dada função (Bishop, 2008). Assim, o subtipo AR- $\alpha_{1A}$  caracteriza-se por apresentar afinidades cerca de 30-100 vezes maiores pelos antagonistas silodosina (Goi et al., 2013), 5-metilurapidil (Abdulla et al., 2011) e RS 100329 (Williams et al., 1999; Martinez-Salas et al., 2007) do que os dois outros subtipos. Já o agonista seletivo A 61603 é cerca de 100-300 vezes mais potente que a noradrenalina em diversos tecidos cujo subtipo envolvido é o AR- $\alpha_{1A}$  (Knepper et al., 1995). Por outro lado, o AR- $\alpha_{1L}$  (um suposto estado conformacional do AR- $\alpha_{1A}$ ) é caracterizado por baixa afinidade ao prazosin, 5-metilurapidil, RS-17053, BMY 7378 e alta afinidade ( $\cong$  300 vezes) à silodosina e tamsulosina (Morishima et al., 2008; Muramatsu et al., 2008).

Risperidona, AH11110A e ciclazosina foram descritos como antagonistas seletivos para AR- $\alpha_{1B}$  (Sagratini et al., 2007), porém suas seletividades têm sido severamente questionadas em diversos trabalhos na literatura (Eltze et al., 2001; Nourian et al., 2008). De forma interessante, a conotoxina  $\rho$ -TIA comporta-se como um antagonista competitivo irreversível de AR- $\alpha_{1B}$ , mas como modulador alostérico negativo de AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  (Chen et al., 2004; Kamikihara et al., 2005; Lima et al., 2005). Mais recentemente, o composto L765,314 tem sido utilizado com antagonista seletivo de AR- $\alpha_{1B}$ , apesar de sua baixa seletividade relativa (Patane et al., 1998; Ribeiro e Pupo, 2015).

O AR- $\alpha_{1D}$  por sua vez exibe afinidade cerca 30 vezes maior ao composto BMY 7378 que os demais subtipos (Goetz et al., 1995), da mesma forma que seu análogo estrutural bupiriona, o qual frequentemente se comporta como agonista parcial neste subtipo de receptor (Kamikihara et al., 2005, 2007). Mais recentemente, estudos de nosso laboratório mostraram que os antidepressivos tricíclicos são potentes antagonistas de AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$ , mas não de AR- $\alpha_{1B}$  (Nojimoto et al., 2010) indicando que essas drogas são convenientes na identificação do subtipo de AR- $\alpha_1$  funcional que controla certos efeitos das catecolaminas endógenas (Ribeiro e Pupo, 2015).

Como descrito acima, há relativamente poucos ligantes que se comportam como antagonistas ou agonistas seletivos nos subtipos de AR- $\alpha_1$ ; além disso, a seletividade destes ligantes é geralmente baixa exigindo o uso combinado de drogas na busca da identificação do subtipo de receptor envolvido numa determinada função fisiológica.

### **ARs- $\alpha_1$ e Pressão Arterial**

O SNAS controla o tônus da musculatura lisa vascular e, portanto, regula a pressão arterial através da ativação dos ARs- $\alpha_1$ . Estudos utilizando A-61603 (agonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ), RS 100329 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ), cloroetilclonidina (antagonista ARs- $\alpha_{1B}$  e ARs- $\alpha_{1D}$ ) e BMY 7378 (antagonista seletivo de ARs- $\alpha_{1D}$ ) tem demonstrado que a manutenção da pressão sanguínea em ratos não sedados é mediada principalmente pelo subtipo AR- $\alpha_{1A}$  (Piascik et al., 1990; Villalobos-Molina, 2004; Martinez-Salas et al., 2007).

No entanto, participação dos ARs- $\alpha_{1D}$  foi observada em ratos *pithed*<sup>1</sup> utilizando fenilefrina (agonista não seletivo dos subtipos de AR- $\alpha_1$ ) e BMY 7378 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ ), onde os resultados mostraram que as contrações induzidas pela fenilefrina foram antagonizadas por baixas doses do antagonista BMY 7378, sugerindo-se a participação funcional do AR- $\alpha_{1D}$  na fisiologia da regulação da resistência vascular periférica

---

<sup>1</sup> *Pithed*- modelo animal experimental que exclue o mecanismo central de controle da pressão arterial (Centurion et al., 2009)

(Zhou e Vargas, 1996). Além disso, estudos utilizando camundongos *knockouts*<sup>2</sup> para o subtipo AR- $\alpha_{1D}$  demonstram que o antagonista seletivo para os subtipos AR- $\alpha_{1B}$  e AR- $\alpha_{1D}$  cloroetilclonidina diminui a resposta vasoconstritora induzida pelo agonista seletivo AR- $\alpha_{1A}$  A-61603, e isto indica que as respostas pressóricas no leito mesentérico pode ser mediada também pelo subtipo AR- $\alpha_{1B}$  (Martínez-Salas et al., 2011); porém o AR- $\alpha_{1B}$  parece ter menor importância funcional no controle da PA quando comparado aos outros subtipos (Villamil-Hernández et al., 2013). Além do mais, estudos com camundongos *knockout* para o subtipo AR- $\alpha_{1D}$  têm sugerido que a presença do AR- $\alpha_{1D}$  é importante para o funcionamento do AR- $\alpha_{1A}$ , pois o efeito pressórico do agonista seletivo de AR- $\alpha_{1A}$  A-61603 é  $\cong$  60% menor em camundongos *knockout* AR- $\alpha_{1D}$  do que camundongos selvagens (Martínez-Salas et al., 2011).

Dados de expressão gênica demonstram que todos os subtipos de AR- $\alpha_1$  são expressos em vasos de condutância e resistência, porém em proporções diferentes dependendo do leito vascular. Há predominância de transcritos codificando AR- $\alpha_{1d}$  em vasos de condutância (Faber et al., 2001) e transcritos de AR- $\alpha_{1a}$  em vasos de resistência (Salomonsson et al., 2001). Tal informação é consistente com a visão de que o AR- $\alpha_{1a}$  tem papel mais importante na regulação da resistência vascular periférica em resposta à ativação simpática do que os outros dois subtipos.

Há muito poucos estudos em humanos que buscam identificar os subtipos de AR- $\alpha_1$  envolvidos na contração dos diversos leitos vasculares. Tal pobreza de informações é compreensível, dada a dificuldade de obtenção de tecidos humanos e a seletividade limitada dos ligantes de AR- $\alpha_1$ , fazendo com que estudos esclarecedores demandem uma grande quantidade de amostras biológicas humanas para que os efeitos de múltiplos ligantes possam ser testados. No entanto, pelo menos a expressão de RNAm codificando os três subtipos (AR- $\alpha_{1a}$ , AR- $\alpha_{1b}$ , AR- $\alpha_{1d}$ ) já foi demonstrada em várias artérias humanas e de forma semelhante ao observado em modelos animais, RNAm codificando o subtipo AR- $\alpha_{1a}$  é o mais abundante (Rudner et al., 1999).

---

<sup>2</sup> *Knockouts*- modelo animal geneticamente modificado por inativação gênica.

Com base nas informações acima, á despeito de que os três subtipos AR- $\alpha_{1A}$ , AR- $\alpha_{1B}$  e AR- $\alpha_{1D}$  estejam potencialmente envolvidos no controle da pressão arterial, o subtipo AR- $\alpha_{1A}$  parece ser o mais importante dado seu papel no controle do tônus da musculatura lisa de vasos de pequeno calibre.

Mudanças na expressão de ARs no sistema cardiovascular podem ter papel na fisiopatologia da hipertensão arterial uma vez que, a reatividade dos ARs- $\alpha_1$  está aumentada na artéria mesentérica de ratos hipertensos *DOCA-Salt*<sup>3</sup> (Perry e Webb, 1988), no entanto, em modelo experimental de hipertensão induzido por *L-NAME* há supregulação de ARs- $\alpha_2$  (Kanagy, 1997). Entretanto, Pérez-Rivera *et al.*, (2013) utilizando artéria mesentérica de animais *DOCA-Salt*, na presença dos antagonistas prazosin (antagonista não-seletivo ARs- $\alpha_1$ ), rauwolscina (antagonista não-seletivo ARs- $\alpha_2$ ) e ioimbina (antagonista não-seletivo ARs- $\alpha_2$ ) demonstraram que as contrações induzidas pela noradrenalina foram inibidas apenas na presença de prazosin, sugerindo que a noradrenalina ativa uma população única de ARs- $\alpha_1$ . Estudo utilizando artérias de pacientes hipertensos e de ratos espontaneamente hipertenso (SHR) evidencia que a contração mediada pelos vasoconstritores serotonina, endotelina e noradrenalina foram aumentadas durante a hipertensão e esta resposta pressórica pode estar associada a *up*-regulação de receptores de serotonina (5-HT<sub>2A</sub>), endotelina (ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>) e ARs- $\alpha$  (Li et al., 2007).

Interessantemente, tem sido proposto que a atividade constitutiva dos ARs- $\alpha_{1D}$  é aumentada em artérias de condutância e de resistência num modelo animal de hipertensão espontânea, sugerindo que este subtipo pode ter um papel na manutenção da patologia (Gisbert et al., 2002).

Sun et al., (2013) demonstraram que o tratamento crônico de ratos espontaneamente hipertensos com o anti-hipertensivo formononetina diminui a potência vasoconstritora da fenilefrina (agonista não seletivo ARs- $\alpha_1$ ) e a expressão do transcrito de ARs- $\alpha_{1a}$ , e propuseram como explicação para esse achado a infraregulação dos ARs- $\alpha_1$ ; mais ainda, a regulação da expressão desses receptores pela formononetina parece depender da inibição da liberação de Ca<sup>2+</sup> dos seus estoques intracelulares (Sun et al., 2011).

---

<sup>3</sup> *Doca-Salt*: é um modelo experimental de hipertensão induzida pela administração de um mineralocorticoide sintético (*DOCA*-deoxycorticosterone acetate) com cloreto de sódio na dieta seguida por uma uninefrectomia (Iyer et al., 2010)

Diversos modelos experimentais de PE em animais têm sido propostos na tentativa de simular esta condição gravídica que acomete humanos. A maior parte desses modelos tem se baseado nas hipotéticas causas da PE resultando em modelos experimentais que incluem: disfunção da óxido nítrico sintase (Huang et al., 1993, 1995; Ramesa et al., 2010), alteração no sistema renina-angiotensina (Zhou et al., 2008; Jin et al., 2013), angiogênese prejudicada (Maynard et al., 2003; Szalai et al., 2014, 2015), resposta imune materna exarcebada (Qian et al., 2015; Song e Zhong, 2015) e hipóxia placentária (Alexander, 2003; Perez-Sepulveda et al., 2015). Dentre estes, é sabido que a hipóxia placentária inicia uma sequência de eventos que culminam em disfunção vascular e consequente aumento de PA, características amplamente aceitas na patogênese da PE (Gilbert et al., 2009; Spradley et al., 2016). Diante disto, Crews et al., (2000) desenvolveram o modelo experimental de redução da pressão de perfusão intrauterina em ratas (reduced uterine perfusion pressure, RUPP) que simula uma variedade de características fisiopatológicas da PE, incluindo: hipertensão arterial, proteinúria, aumento da resistência vascular, prejuízo na função e fluxo renal, aumento de auto-anticorpo AT<sub>1</sub>, aumento de s-FLT1 (antagonista de receptores VEGF) no plasma e na placenta, aumento de citocinas inflamatórias no soro, além de diminuição no número, tamanho e peso dos filhotes (para revisão ver Li et al., 2012).

Existe apenas uma escassa literatura sobre o envolvimento dos ARs- $\alpha_1$  na PE e os poucos resultados apresentados sugerem aumento de expressão dos ARs- $\alpha_1$ , como indicado pelo estudo utilizando vasos de condutância em que demonstram um aumento de expressão dos transcritos dos ARs- $\alpha_{1a}$ , ARs- $\alpha_{1b}$  e ARs- $\alpha_{1d}$  na primeira e segunda semana de gestação de ratas hipertensas (Bracho-Valdés et al., 2009). No entanto, a caracterização farmacológica e bioquímica apresentada neste estudo é incompleta, permanecendo ainda desconhecidos quais subtipos de ARs- $\alpha_1$  participam da manutenção dessa afecção gravídica.

## OBJETIVOS

### ***Objetivo Geral***

O objetivo da presente dissertação foi estabelecer no laboratório o modelo experimental de pré-eclâmpsia em ratas e identificar os subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal dessas ratas.

### ***Objetivos Específicos***

- Caracterizar farmacologicamente os subtipos funcionais de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração *in vitro* da artéria aorta abdominal de ratas não prenhes e comparar com aqueles envolvidos na contração de artérias de ratos machos.
- Caracterizar farmacologicamente os subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração *in vitro* da aorta abdominal de ratas prenhes.
- Caracterizar farmacologicamente subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração *in vitro* da artéria aorta abdominal de ratas com pré-eclâmpsia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

Ratas Wistar com idade de 90-120 dias foram pareadas por idade em quatro grupos experimentais denominados:

- CONTROLE: ratas não prenhes, não submetidas a procedimento cirúrgico.
- NPPC: ratas não prenhes, submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina (ver abaixo).
- RUPP: ratas prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina (ver abaixo).
- SHAM: ratas prenhes submetidas ao procedimento cirúrgico, porém sem sofrerem a redução da pressão de perfusão uterina.

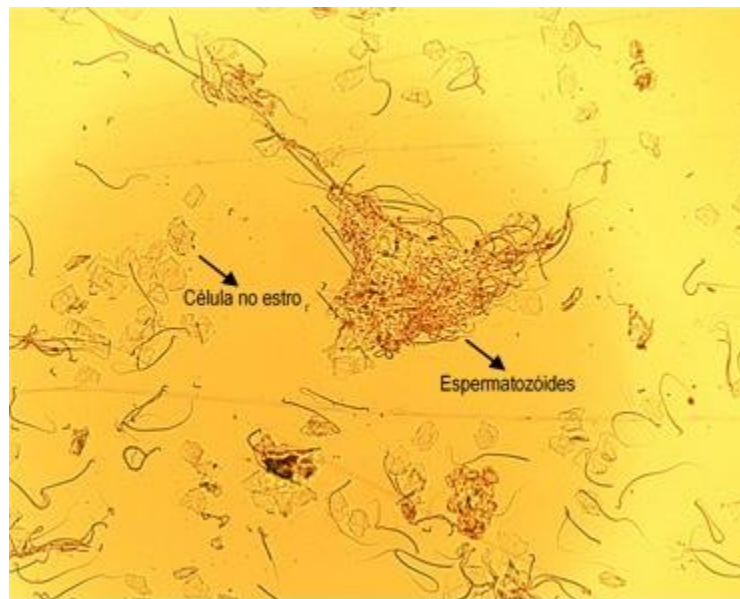
Para comparação, foram também utilizados ratos Wistar com idade de 90-120 dias para a caracterização farmacológica dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da artéria aorta abdominal. Os ratos que compõem os grupos experimentais foram obtidos do Biotério Central da UNESP/Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia sob condições controladas (temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro 12/12h) com livre acesso à ração e água. Os procedimentos experimentais foram aprovados no comitê de ética local para o uso de animais de experimentação da UNESP – Campus de Botucatu (Protocolo 674).

### ***Acompanhamento do ciclo reprodutivo das ratas e acasalamento***

A partir do 90º dia de idade foi acompanhado o ciclo estral das ratas através da obtenção de esfregaços vaginais. Para isso, um bastonete de algodão emergido em solução salina 0,9% foi inserido no canal vaginal para coleta da secreção vaginal, o qual a seguir foi analisado em microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x para observação da proporção dos tipos celulares existentes e 40x para identificação dos tipos celulares. À partir das características celulares encontradas, as ratas que encontravam-se em proestro ou final de estro foram selecionadas para acasalamento (Young et al., 1941; Schwartz, 1964). No dia seguinte ao acasalamento, outro



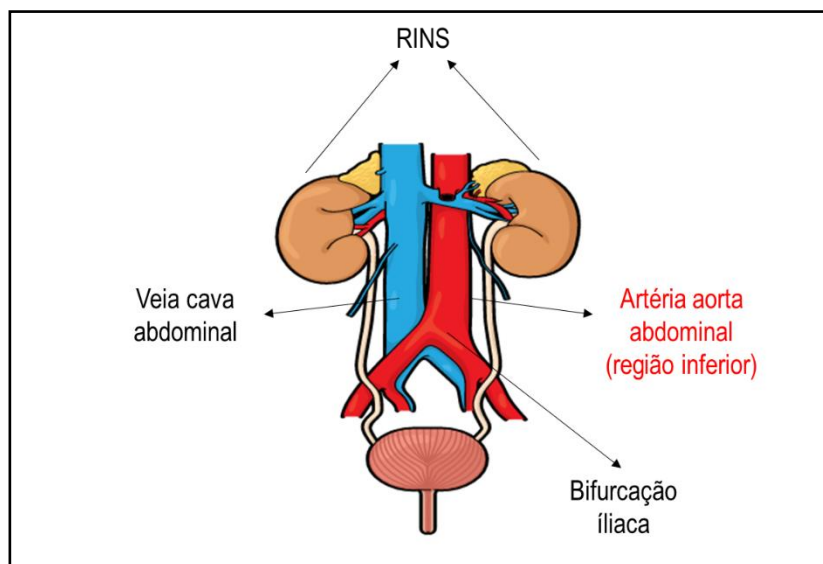
esfregaço vaginal foi coletado e considerada como prenhes em seu primeiro dia da gestação aquelas ratas das quais os respectivos esfregaços continham espermatozoides e células características da fase estral (Figura 6).



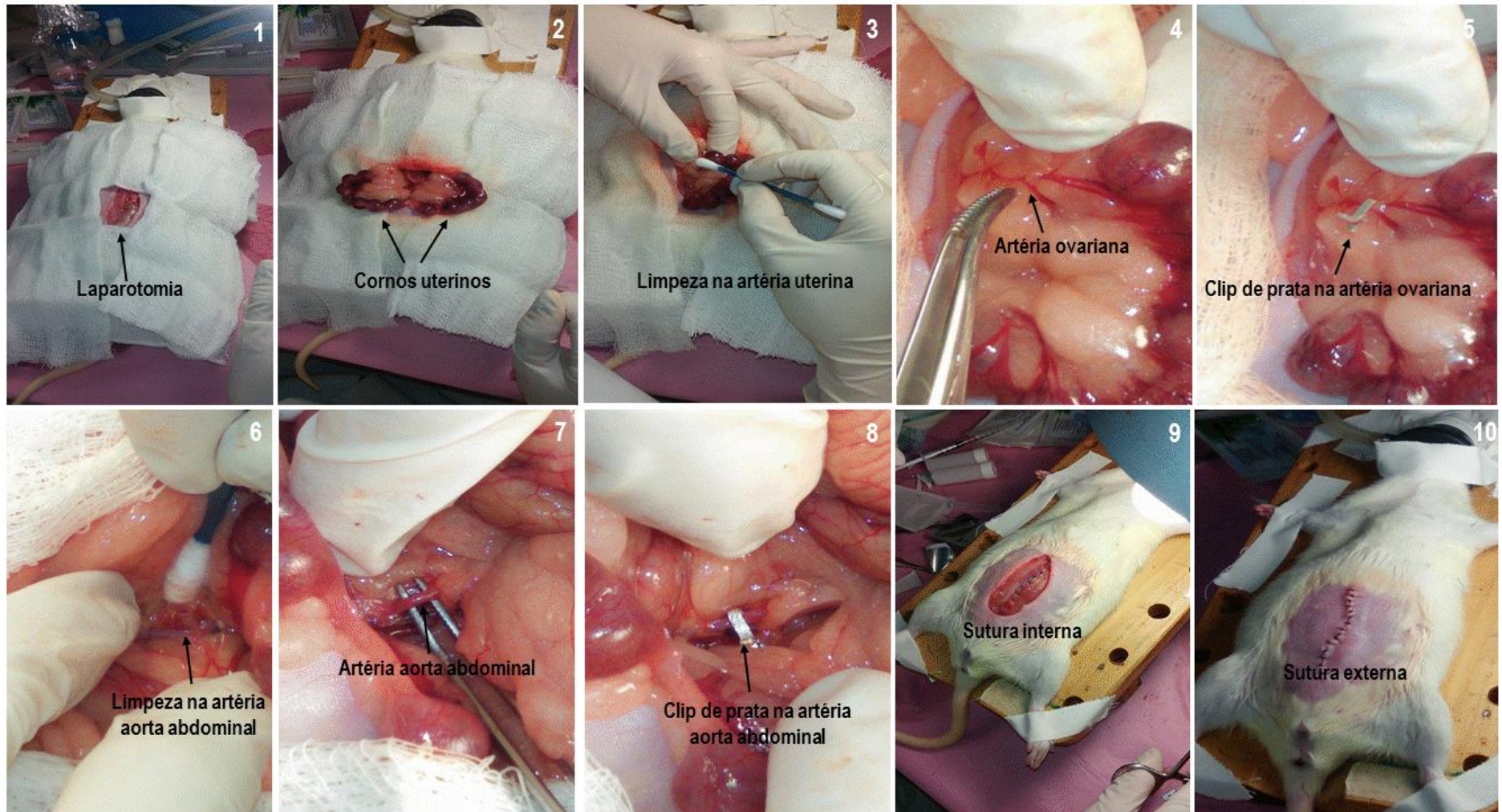
**Figura 6:** Fotografia do esfregaço vaginal de rata que contém células na fase estral e espermatozoides (setas).

### ***Cirurgia de Redução da Pressão de Perfusão Uterina (RUPP)***

O procedimento experimental para redução da pressão de perfusão uterina foi realizado de acordo com Alexander et al., (2001). No 14º dia de gestação, as ratas foram anestesiadas com isoflurano 2% e após laparotomia, um clipe de prata com 0.203 mm de diâmetro foi inserido na região inferior da aorta abdominal acima da bifurcação ilíaca (Figura 7). Para evitar aumento do fluxo sanguíneo para o útero através das artérias ovarianas, um clipe de prata com 0.100 mm de diâmetro foi colocado no ramo direito e outro no ramo esquerdo da artéria ovariana conforme ilustrado na Figura 8. Em todos os procedimentos, os cliques de prata foram esterilizados em autoclave à 121°C durante 20 min.



**Figura 7:** Ilustração da região abdominal demonstrando os rins, veia cava abdominal, artéria aorta abdominal (região inferior) e bifurcação íliaca.



**Figura 8:** Sequência fotográfica das etapas do procedimento cirúrgico de redução da pressão de perfusão uterina (RUPP). O modelo consiste em laparotomia no 14º dia de gestação (1) seguida pelo isolamento dos cornos uterinos (2); Em 3 é demonstrado a retirada da gordura em torno das artérias uterinas seguido pelo isolamento (4) e clipagem da artéria ovariana (5); Em 6 é demonstrada a retirada da gordura em torno da artéria aorta abdominal, seguida pelo isolamento (7) e clipagem (8) da artéria aorta abdominal. Em 9 e 10 são demonstradas as suturas interna e externa, respectivamente.

As ratas cujas “clipagens” das artérias resultaram em reabsorção total dos fetos foram excluídas. No grupo SHAM, as ratas no 14º dia de gestação, após anestesia, incisura e isolamento das artérias ovarianas e aorta abdominal, tiveram sua cavidade abdominal fechada. No grupo NPPC, as ratas que sofreram o procedimento de cirúrgico de redução de perfusão uterina, permaneciam com os clips de prata durante 5 dias. Em todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico receberam 100 mg/kg de cetoprofeno via intraperitoneal.

### ***Avaliação da pressão arterial média***

No 18º dia gestacional, as ratas foram anestesiadas com isoflurano 2% e um cateter de polietileno (P10 conectado a uma P50) foi inserido na artéria carótida esquerda. Em seguida, o cateter foi exteriorizado pelo dorso das ratas e ao final do procedimento cirúrgico foi administrado 100 mg/Kg de cetoprofeno via intraperitoneal. No 19º dia gestacional, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão modelo TSD 104A (Biopac Systems Inc. CA, USA) conectado a um sistema de aquisição de dados modelo MP150CE (Biopac Systems Inc. CA, USA) para monitoramento da pressão arterial. Este procedimento foi realizado em todos grupos experimentais.

### ***Estudos de Contração da Aorta Abdominal in vitro***

Ratos machos e fêmeas dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação em guilhotina. Em seguida, a aorta abdominal (região inferior; Figura 7) foi removida, limpa e uma haste de metal foi inserida na luz do vaso para a remoção do endotélio. Logo após, foi cortada em anéis com aproximadamente 2-4mm de comprimento para a realização de registro digital de tensão isométrica.

Os tecidos isolados foram mantidos em cubas de vidros de 10 ml contendo de solução nutritiva Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl, 118; KCL, 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.2; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2.5; glicose, 11.7; pH 7.4). Todos os tecidos foram mantidos a 37°C e a solução foi aerada com mistura

carbogênica contendo 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. A aorta abdominal foi distendida a uma tensão de 14.7 mN e deixadas estabilizar por 60 minutos, com trocas periódicas de solução nutritiva a cada 15 minutos e reajuste de tensão para 14.7 mN. Em seguida, 02 “choques” com fenilefrina (10 μM) com intervalo de 60 minutos foram realizados para determinar a viabilidade do tecido.

Após os choques com fenilefrina (10 μM), uma curva concentração-resposta com agonista (noradrenalina ou A-61603) foi construída pela adição cumulativa da droga ao banho e foi considerada como curva “controle”.

Todas as curvas concentração-resposta ao agonista (noradrenalina ou A-61603) foram realizadas na presença de coquetel contendo cocaína (3μM), corticosterona (10 μM), propranolol (0.1 μM) e ioimbina (0,1μM) para o bloqueio dos processos de captação neuronal, extraneuronal, β<sub>1</sub> e β<sub>2</sub>-ARs e α<sub>2</sub>-ARs, respectivamente. A tensão máxima desenvolvida (E<sub>máx</sub>, em porcentagem ao segundo choque de fenilefrina) e a potência dos agonistas (pD<sub>2</sub>, o -logEC<sub>50</sub>) foram determinados por análise de regressão não linear, através do software GraphPad PRISM (Versão 6.00, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

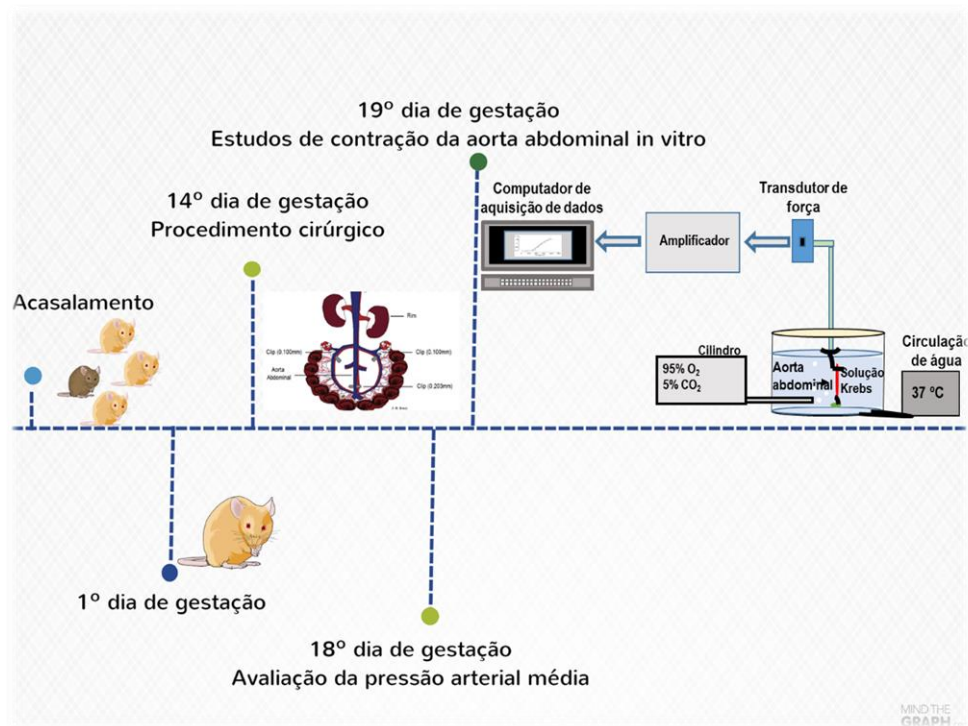
#### *Avaliação da afinidade dos antagonistas competitivos*

Após estabilização dos tecidos, uma curva concentração-resposta ao agonista (noradrenalina ou A-61603) foi obtida na ausência de antagonistas e selecionada como curva controle. Após repetidas trocas de solução para lavagem do tecido, o antagonista competitivo de AR-α<sub>1</sub> prazosin (seletivo-α<sub>1</sub>; 1 a 10 nM), RS 100329 (seletivo-α<sub>1A</sub>; 1 a 30 nM), L 765,314 (seletivo-α<sub>1B</sub>; 0.01 a 1 μM), BMY 7378 (seletivo-α<sub>1D</sub>; 1 a 10 nM) foi incubado por 45 minutos e uma nova curva concentração-resposta ao agonista foi obtida, ainda na presença do antagonista. Ao final deste processo, um choque com 10 μM de carbacol (agonista muscarínico) foi realizado para verificar o processo de remoção do endotélio. Os deslocamentos paralelos à direita causados pelas diferentes concentrações do antagonista foram quantificados como *concentration-ratio* (CR, razão da concentração equiefetiva a 50% na presença e na ausência do antagonista) e representados em gráficos de *Schild* com o Log (CR-1) no eixo da ordenada e as concentrações do antagonista no eixo da abscissa (Arunlaskshana e Schild,

1959). Os dados foram analisados por regressão linear e o valor médio da inclinação com intervalo de 95% de confiança foram determinados. Caso a inclinação da reta não tenha diferido da unidade teórica, o intercepto no eixo da abcissa foi assumido como estimativa da constante de dissociação em equilíbrio ( $pK_B$ ) do antagonista pelo receptor. Nos casos onde a inclinação da regressão de *Schild* diferiu estatisticamente da unidade, as estimativas da potência do antagonista ( $pA_2$ ) foram calculadas à partir do efeito da menor concentração efetiva do antagonista com a fórmula:  $pA_2 = \text{Log} (CR-1) - \text{Log}[B]$ , onde  $[B]$  é a concentração molar do antagonista.

### Desenho experimental

Para facilitar o entendimento sobre a ordem cronológica dos procedimentos realizados no grupos experimentais SHAM e RUPP, é demonstrado a seguir o desenho experimental do presente trabalho (Figura 9).



**Figura 9:** Representação esquemática da cronologia das metodologias aplicadas nos grupos: SHAM e RUPP. O estudo é iniciado com o acasalamento seguido pela confirmação da prenhez. A seguir, no 14º dia de gestação foi realizado ou não o procedimento cirúrgico de redução da pressão de perfusão uterina, conforme descrito por Li et al., 2012. No 18º dia de gestação foi avaliada a pressão arterial média, seguida dos estudos de contração in vitro.

## **Drogas e Reagentes**

Prazosin (Prazosin hydrochloride), propranolol ((±)-propranolol hydrochloride), loimbina (Yoimbine), BMY 7378; RS 100329, Tocris Bioscience (Bristol, UK); Corticosterone, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Noradrenalina ((L)-(-)-Norepinephrine bitartrate salt monohydrate), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Cocaína (cocainum hydrochloricum puriss); L 765,314 hydrate, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); A-61603 hydrobromide, Tocris Bioscience (Bristol, UK).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise dos valores de pressão sanguínea foram feitas análises de variância (ANOVA) seguida de Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Os valores de potência do agonista ( $pD_2$ ), antagonista ( $pK_b/pA_2$ ) e tensão máxima serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (epm) e a inclinação da regressão de *Schild* como média com intervalo de confiança 95% (IC95).

Todos os dados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad PRISM (Versão 6.00, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Os valores apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de  $n$  experimentos, as diferenças entre os valores médios foram analisados através do teste *t-Student* não pareado, ou ANOVA seguido de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Diferenças significativas serão consideradas quando o valor de  $p < 0.05$ .

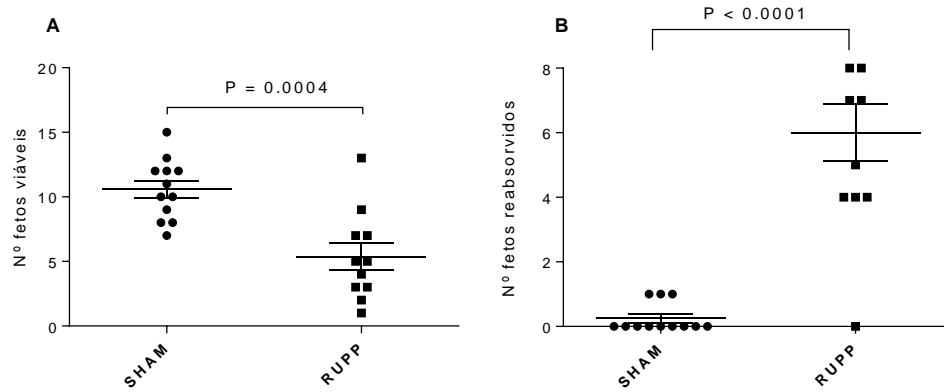
## RESULTADOS

### ***Padronização do Modelo Experimental de Pré-Eclâmpsia em Ratas.***

#### *Hipertensão arterial induzida pela Redução da Pressão de Perfusão Uterina (RUPP)*

O modelo de isquemia placentária provocada pela redução crônica da pressão de perfusão uterina (RUPP) proporciona o aumento da pressão arterial em ratas prenhes submetidas à cirurgia. A pressão arterial média (PAM) de ratas CONTROLE (não prenhes) foi  $110 \pm 1.4$  mmHg (n=18), enquanto a PAM de ratas SHAM (prenhes não submetidas ao procedimento cirúrgico) foi  $96 \pm 2$  mmHg (n=21) e a das submetidas ao RUPP foi  $120 \pm 1$  mmHg (n=20). Portanto, a prenhez reduz a PAM ( $p < 0.05$ ) e a RUPP eleva a PAM ( $p < 0.05$ ). De forma interessante, a redução da pressão de perfusão uterina em animais não prenhes (NPPC) não alterou a PAM ( $108 \pm 3$  mmHg, n=20). A figura 10 mostra um gráfico de dispersão (*scatter dot plot*) com o número de fetos viáveis (A) e o número de fetos reabsorvidos (B) nos grupos SHAM e RUPP. Esses resultados mostram que no grupo experimental RUPP ocorreu um aumento de reabsorção fetal e conseqüentemente uma diminuição da quantidade de fetos viáveis em comparação com o grupo SHAM. Em conjunto estes dados demonstram que houve efetividade do procedimento cirúrgico.

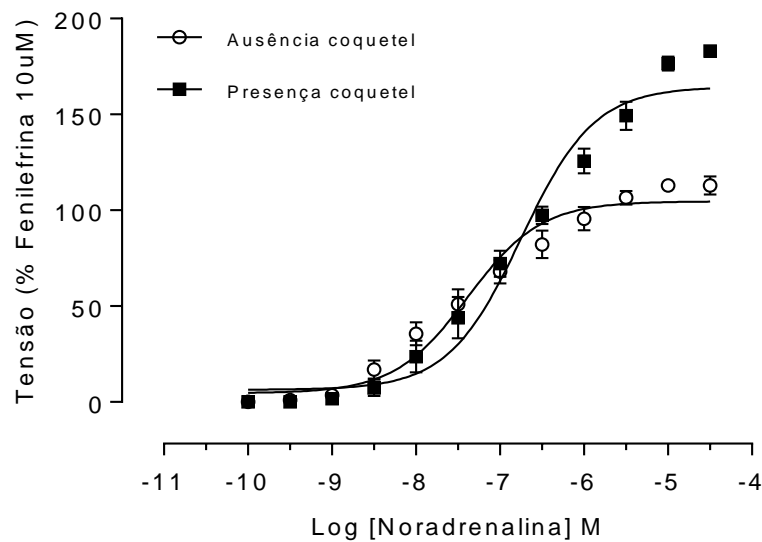




**Figura 10:** Gráfico de dispersão do número de fetos viáveis (A) e número de fetos reabsorvidos (B) nos grupos experimentais SHAM (n=12) e RUPP (n=11). As barras horizontais representam a média  $\pm$  epm. Os grupos foram comparados utilizando o Teste *t-Student* não pareado.

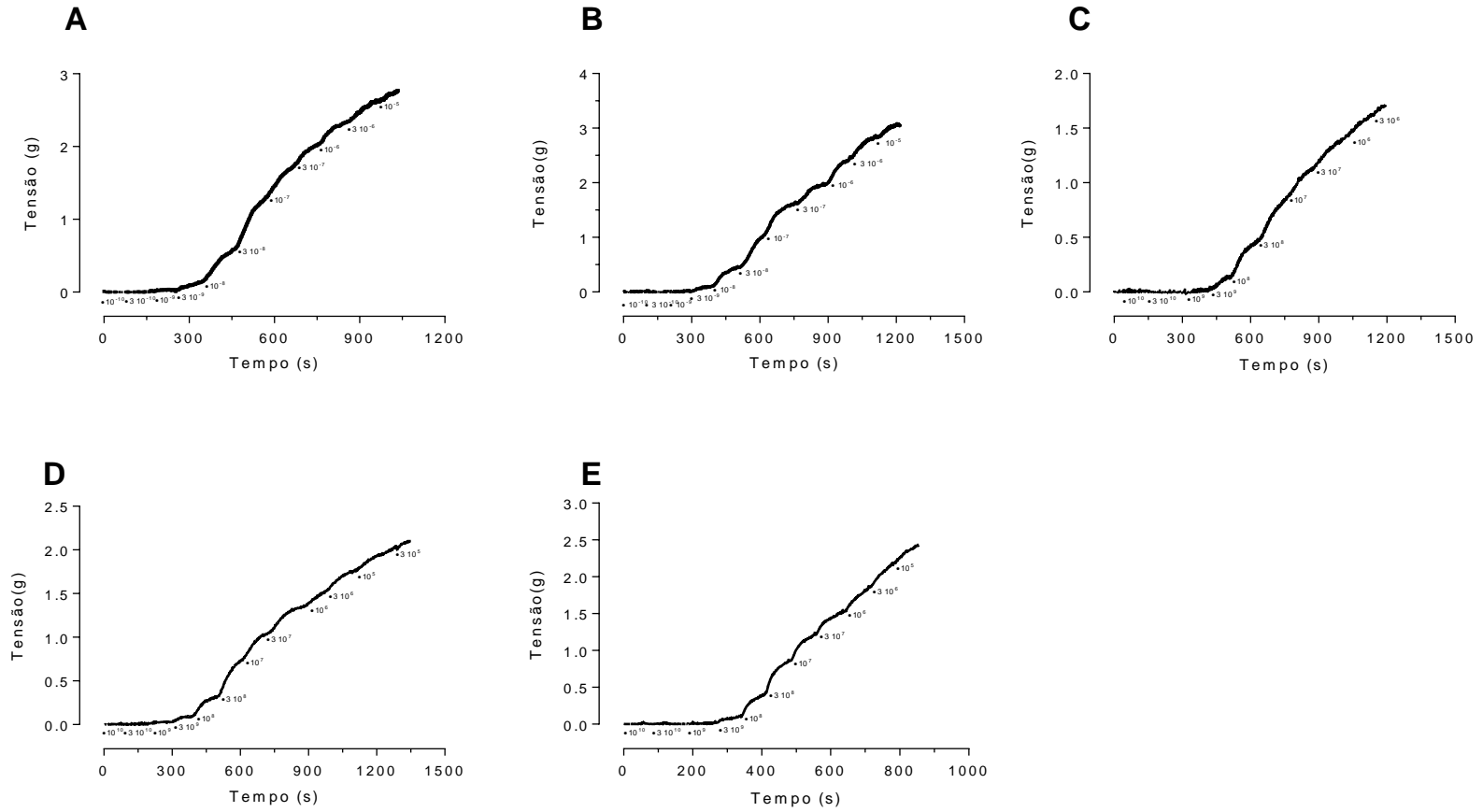
### *Estudos de contração in vitro*

Para padronizar a metodologia de contração *in vitro* utilizada na presente dissertação, foram construídas curvas concentração-resposta para noradrenalina na aorta abdominal de ratas fêmeas CONTROLE na ausência e presença do coquetel de inibidores da captação neuronal e extraneuronal /antagonistas  $\alpha_2$  e  $\beta$ -adrenoceptores. Na ausência de coquetel, a noradrenalina apresentou  $pD_2 = 7.4 \pm 0.1$  com  $E_{m\acute{a}x} = 104.7 \pm 2.9$  em relação ao segundo choque de fenilefrina  $10 \mu M$ , enquanto que, o  $pD_2$  na presença do coquetel foi  $6.8 \pm 0.1$  com  $E_{m\acute{a}x} = 164.4 \pm 5.1$  em relação ao segundo choque de fenilefrina  $10 \mu M$  (Figura 11). Assim, a incubação do coquetel reduziu em aproximadamente 3 vezes a potência da noradrenalina, mas aumentou consideravelmente seu efeito máximo ( $p < 0.05$ ).

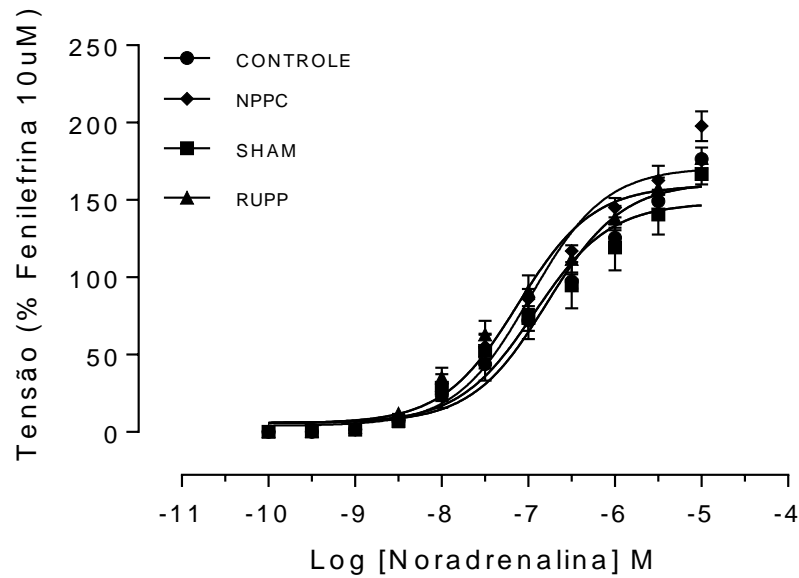


**Figura 11:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina em aorta abdominal de ratos controle, na ausência (○) e presença (■) do coquetel (cocaina 3 $\mu$ M, corticosterona 10 $\mu$ M, propranolol 0.1 $\mu$ M e ioimbina 0.1 $\mu$ M). Símbolos e barras representam o erro  $\pm$  epm de 4 ratas/grupo.

A noradrenalina contrai de maneira sustentada e concentração-dependente os segmentos da aorta abdominal de todos os grupos experimentais (Figura 12). As potências ( $pD_2$ ) e contrações máximas ( $E_{m\acute{a}x}$ ) não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 13, Tabela 1).



**Figura 12:** Registros representativos das curvas concentração-resposta cumulativas à noradrenalina na aorta abdominal dos animais dos grupos experimentais machos (A) e fêmeas: CONTROLE (B) NPPC (C), RUPP (D), SHAM (E).



**Figura 13:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina nas aortas abdominais dos grupos experimentais: CONTROLE (●); NPPC (◆); SHAM(■); RUPP (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 4-7 ratas/grupo.

**Tabela 1:** Contração máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ , em % ao segundo choque com fenilefrina 10  $\mu$ M), potência ( $pD_2$ ) da noradrenalina na indução de contração da aorta abdominal de ratas dos diferentes grupos.

	Controle (n= 4)	NPPC (n=5)	SHAM (n= 7)	RUPP (n= 7)
$E_{m\acute{a}x}$ (%)	161.4 $\pm$ 5.2	171 $\pm$ 4.7	148.2 $\pm$ 6.8	159.6 $\pm$ 4.5
$pD_2$	6.8 $\pm$ 0.07	7.0 $\pm$ 0.06	6.9 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.06

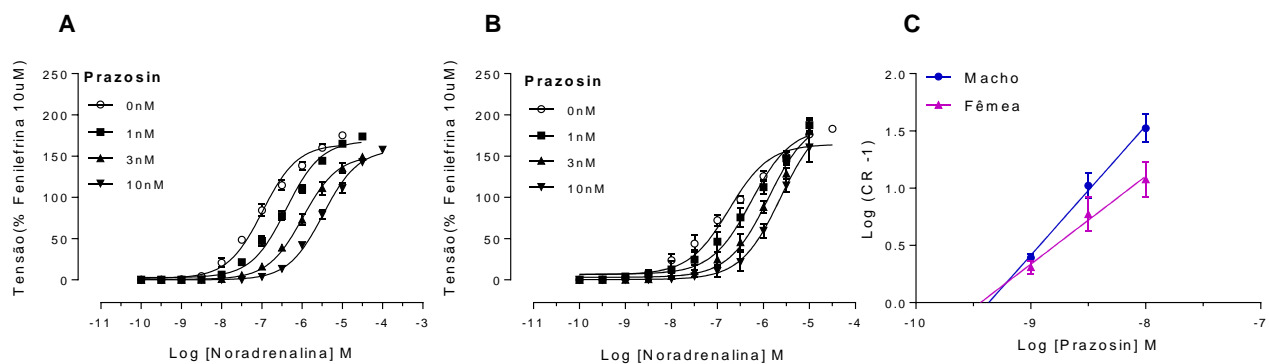
Dados representam média  $\pm$  epm de 4-7 ratas por grupo.

### Caracterização farmacológica dos subtipos de ARs- $\alpha_1$ funcionais em aorta abdominal de ratos machos e fêmeas.

Em razão da escassa literatura sobre os ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal de ratas e com propósito de prospecção de possíveis diferenças sexuais na distribuição dos ARs- $\alpha_1$ , a presente dissertação também caracterizou os receptores envolvidos na contração da artéria de machos.

Para investigar os subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal de machos e fêmeas, foram empregados os agonistas noradrenalina, A-61603 (agonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ) e os antagonistas prazosin (antagonista não-seletivo ARs- $\alpha_1$ ), RS 100329 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ), L 765,314 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$ ), BMY 7378 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ ).

A noradrenalina produziu contrações concentração-dependentes nas aortas abdominais de machos e fêmeas com valor de  $pD_2$ :  $6.97 \pm 0.20$  ( $n=16$ ) e  $7.18 \pm 0.15$  ( $n=19$ ), respectivamente. O prazosin antagonizou de maneira competitiva as contrações induzidas pela noradrenalina, uma vez que os deslocamentos à direita nas curvas concentração-resposta foram proporcionais aos incrementos de concentração de prazosin, resultando em valores de  $pK_B$  para o prazosin consistentes com o envolvimento de ARs- $\alpha_1$ , mas sem a participação de ARs- $\alpha_2$  (Figura 14; Tabela 2).

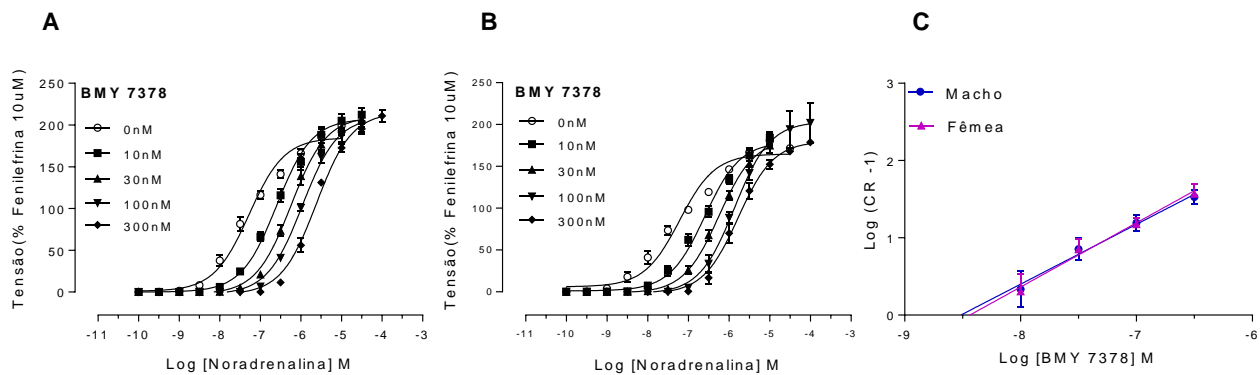


**Figura 14:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos (A) e fêmeas (B) na ausência e presença do antagonista competitivo não seletivo do ARs- $\alpha_1$  Prazosin. Em C é mostrado o gráfico de Schild do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos (●) e fêmeas (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 4 ratos(as)/grupo.

**Tabela 2:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista Prazosin contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos e fêmeas. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e inclinações do gráfico de *Schild* como média e intervalo de confiança de 95% (IC).

Antagonista	Noradrenalina			
	Machos (n=4)		Fêmeas (n=4)	
	$pK_B$	Slope 95% (IC)	$pK_B$	Slope 95% (IC)
Prazosin	$9.48 \pm 0.05$	$1.1 \pm 0.13$ (0.83-1.4)	$9.22 \pm 0.07$	$0.76 \pm 0.17$ (0.38-1.1)

O BYM 7378 apresentou alta afinidade na inibição das contrações induzidas pela noradrenalina tanto em aortas de machos quanto de fêmeas (Figura 15, Tabela 3), indicando que a noradrenalina nas condições empregadas ativou ARs- $\alpha_{1D}$ .



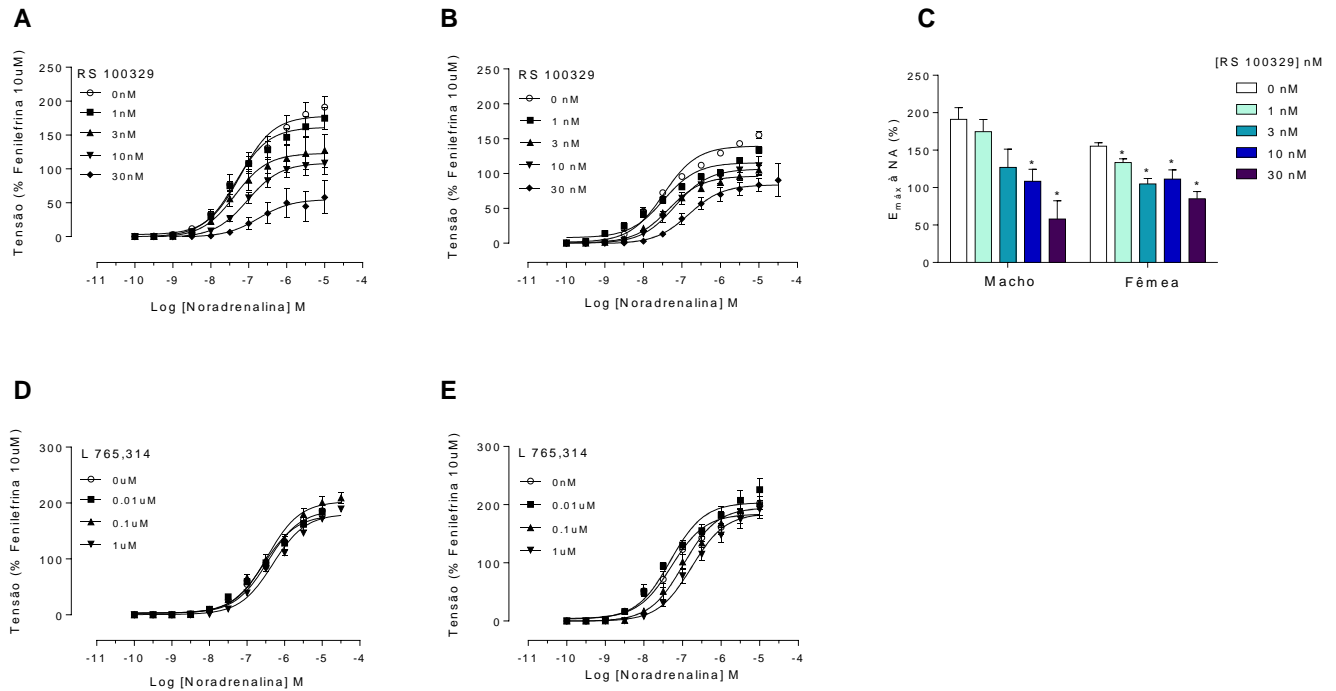
**Figura 15:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratos machos (A) e fêmeas (B) obtidas na ausência e presença do antagonista competitivo seletivo dos ARs- $\alpha_{1D}$  BYM 7378. Em C é mostrado o gráfico de *Schild* do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de machos (●) e fêmeas (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 4-5 ratos (as)/grupo.

**Tabela 3:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista BMY 7378 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratos machos e fêmeas. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e inclinações do gráfico de *Schild* como média e intervalo de confiança de 95% (IC).

Antagonista	Noradrenalina			
	Machos (n=4)		Fêmeas (n=5)	
	$pK_B$	Slope 95% (IC)	$pK_B$	Slope 95% (IC)
BMY 7378	8.25 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.12 (0.51-1.10)	8.22 $\pm$ 0.07	0.83 $\pm$ 0.15 (0.50-1.16)

Por outro lado, o antagonista seletivo de ARs- $\alpha_{1A}$  RS 100329 também antagonizou as contrações induzidas pela noradrenalina através da redução da contração máxima (antagonismo intransponível) em aortas abdominais de machos (n=4) e fêmeas (n=7) (Figura 16; Tabela 4). Tal comportamento indica que há participação de ARs- $\alpha_{1A}$  nas contrações induzidas pela noradrenalina na aorta abdominal de machos e fêmeas.

Para investigar a participação dos ARs- $\alpha_{1B}$ , foi determinado o efeito do antagonista seletivo de ARs- $\alpha_{1B}$ , o L 765,314 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aortas abdominais de machos e fêmeas. Na aorta abdominal do macho (n=4), o L 765,314 não antagonizou as contrações mediadas pela noradrenalina; entretanto, em artérias de fêmeas (n=3) o L 765,314 foi capaz de antagonizar as contrações induzidas pela noradrenalina apenas quando testado na concentração de 1  $\mu$ M estimando uma baixa potência ( $pA_2$ ) de 6.33 $\pm$ 0.3 (Figura 16). Tais resultados indicam que ARs- $\alpha_{1B}$  não participam das contrações induzidas pela noradrenalina em aortas abdominais de machos ou fêmeas.



**Figura 16:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratos machos (A,D) e fêmeas (B,E) obtidas na ausência e presença dos antagonistas RS 100329 (A,B) e L 765,314 (D,E). Em C são mostradas as contrações máximas ( $E_{m\acute{a}x}$ ) da noradrenalina na ausência (0 nM) e presença do antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$  RS 100329 (1nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 3-7 ratos (as)/grupo.

**Tabela 4:** Resposta máxima à noradrenalina (NA), na presença de concentrações crescentes do RS 100329 (antagonista de ARs- $\alpha_{1A}$ ) dos grupos experimentais machos e fêmeas.

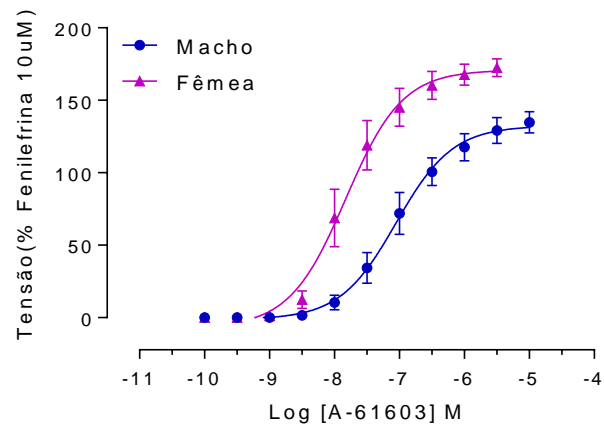
	$E_{m\acute{a}x}$ à NA				
	RS100239 (nM)				
	0	1	3	10	30
MACHOS	178.1 $\pm$ 7.1	161.4 $\pm$ 5.3	123.0 $\pm$ 7.2	108.6 $\pm$ 4.8*	54.94 $\pm$ 8.4*
FÊMEAS	139.5 $\pm$ 2.4	115.5 $\pm$ 2.9*	96.34 $\pm$ 2.2*	106.5 $\pm$ 4.4*	83.83 $\pm$ 4.1*

Os valores são expressos como média  $\pm$  epm. \* estatisticamente diferente de seu respectivo controle.

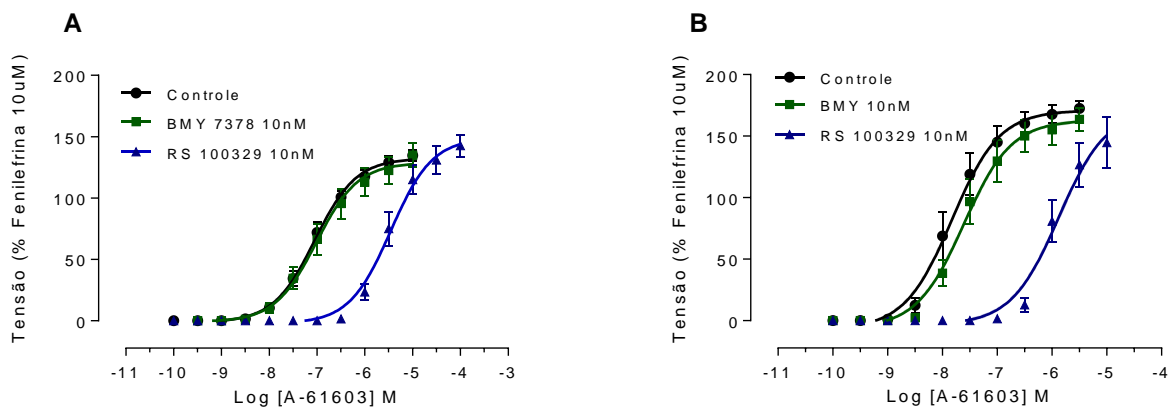
Para checar adicionalmente a presença de ARs- $\alpha_{1A}$  na aorta abdominal de machos e fêmeas, foi utilizado o A-61603, um agonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ . O A-61603 foi aproximadamente seis vezes mais potente em aortas abdominais de fêmeas (7.8 $\pm$ 0.08) do que de machos (7.05 $\pm$ 0.04). No entanto, ambos valores são consistentes com o envolvimento dos ARs- $\alpha_{1A}$ . Além disso, é notável que a contração máxima produzida pelo A-61603 foi maior em artérias de fêmeas do que de machos ( $E_{m\acute{a}x}$  fêmea = 172.5 $\pm$ 6.0;  $E_{m\acute{a}x}$  macho = 134.8 $\pm$ 4.2,  $p < 0.05$ ; Figura 17). Adicionalmente, foram utilizados o antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$  RS 100329 (10nM) e antagonista



seletivo ARs- $\alpha_{1D}$  BMY 7378 (10nM) contra as contrações mediadas pelo agonista A-61603. As contrações induzidas pelo A-61603 foram antagonizadas com alta potência pelo antagonista RS 100329 ( $pA_2$  machos=  $9.9 \pm 0.08$  /  $n=3$ ;  $pA_2$  fêmeas=  $9.48 \pm 0.04$  /  $n=3$ ) e, surpreendentemente, não houve perda de resposta máxima, corroborando o envolvimento dos ARs- $\alpha_{1A}$ . Entretanto, o BMY 7378 não antagonizou as contrações mediadas pelo A-61603 em nenhum grupo experimental (Figura 18).



**Figura 17:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 nos grupos experimentais machos (●) e fêmeas (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 3 ratos/grupo.



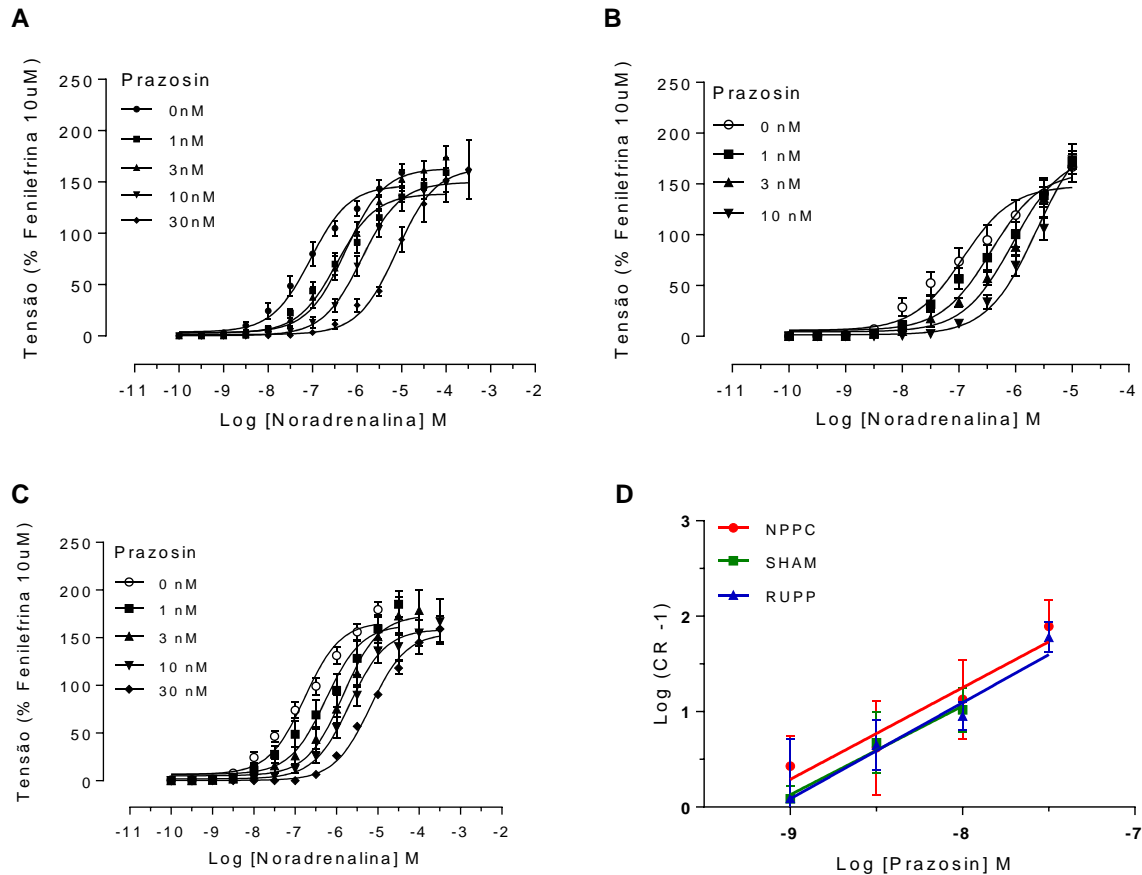
**Figura 18:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 na aorta abdominal de ratos machos (A) e fêmeas (B) obtidas na ausência (●) e presença dos antagonistas 10 nM BMY 7378 (■) e 10 nM RS 100329 (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 3 ratos (as)/grupo.

Os comportamentos mostrados pelos agonistas e antagonistas seletivos investigados apontam que na aorta abdominal de ratos machos e fêmeas coexiste uma população heterogênea de ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$ , mas que não há ARs- $\alpha_{1B}$  funcionais nestas artérias.

***Investigação dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  funcionais na artéria aorta abdominal de ratas não prenhes (NPPC) e prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) e ratas prenhes sem sofrerem a redução da pressão de perfusão uterina (SHAM).***

A identidade dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal de ratas prenhes (RUPP) e não prenhes (NPPC) que foram submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina e ratas prenhes que não foram submetidas à redução da pressão de perfusão uterina (SHAM) foi investigada através da utilização dos antagonistas prazosin (antagonista não-seletivo ARs- $\alpha_1$ ), RS 100329 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ), L 765,314 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$ ), BMY 7378 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ ).

O prazosin deslocou à direita com alta afinidade as curvas concentração-resposta de noradrenalina em aortas abdominais de NPPC, SHAM e RUPP ( $pK_B \approx 9.2$ ) e os deslocamentos foram proporcionais aos incrementos de concentração do antagonista, resultando em uma inclinação da reta no gráfico de *Schild* que não diferiu da unidade teórica (Figura 19; Tabela 5). Tais resultados indicam que nas condições empregadas, a noradrenalina ativou os ARs- $\alpha_1$  para contrair as aortas abdominais dessas ratas, sem envolvimento de ARs- $\alpha_2$ .

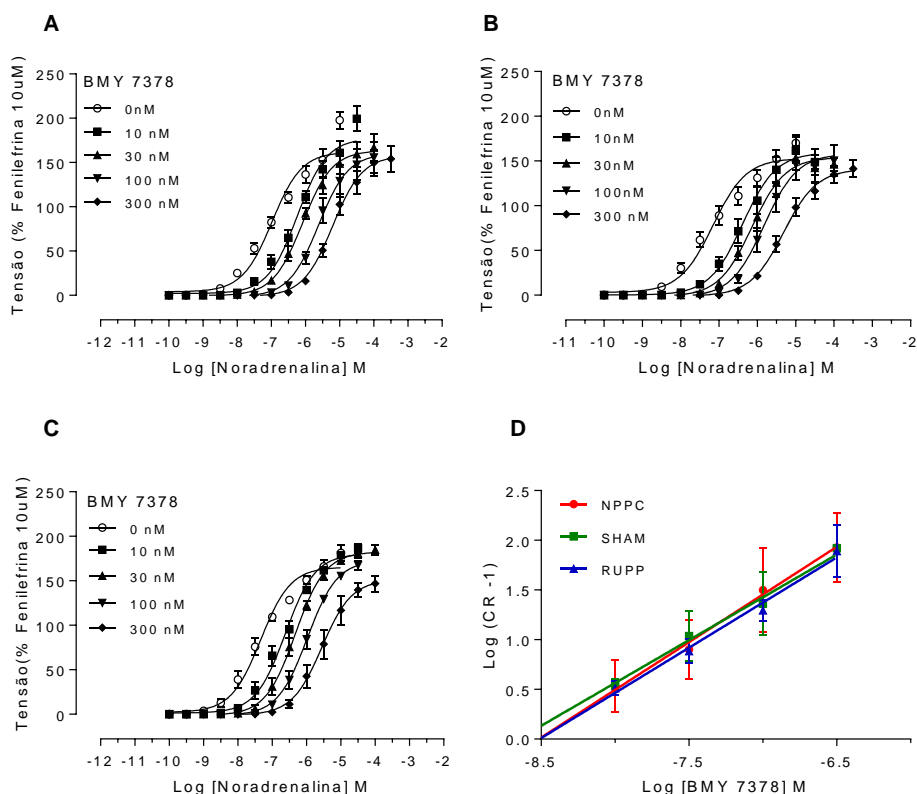


**Figura 19:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista não seletivo ARs- $\alpha_1$  Prazosin. À direita (D) está representado o gráfico de *Schild* do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas NPPC (●), SHAM (■), RUPP (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 5-7 ratas/grupo.

**Tabela 5:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista Prazosin contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas prenhes e não prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e slope de *Schild* como média e intervalo de confiança de 95% (IC).

Antagonista	Noradrenalina					
	NPPC (n=5)		SHAM (n=7)		RUPP (n=5)	
	$pK_B$	Slope 95% (IC)	$pK_B$	Slope 95% (IC)	$pK_B$	Slope 95% (IC)
Prazosin	$9.3 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.2$ (0.8-1.4)	$9.2 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.2$ (0.5-1.3)	$9.2 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$ (0.9-1.4)

O BMY 7378 antagonizou com alta afinidade as contrações induzidas pela noradrenalina, indicando que há envolvimento de ARs- $\alpha_{1D}$  nas aortas abdominais de ratas NPPC, SHAM e RUPP (Figura 20; Tabela 6).

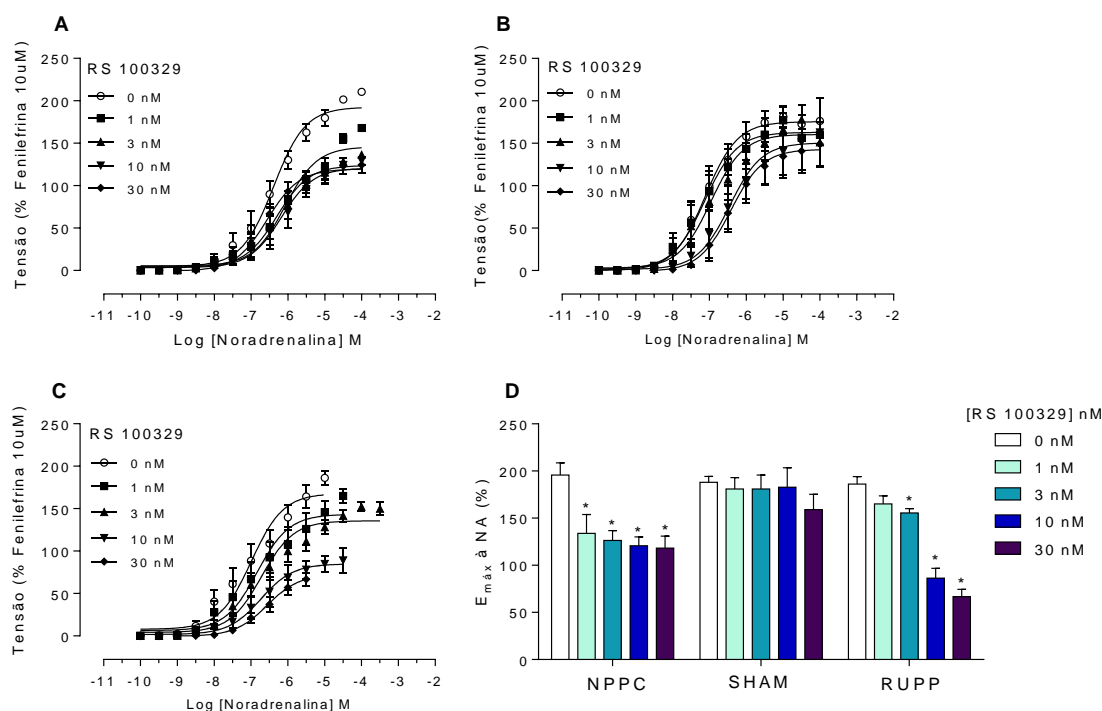


**Figura 20:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na indução de contração da aorta abdominal de ratas fêmeas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$  BMY 7378. À direita (D) está representado o gráfico de *Schild* do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas NPPC (●), SHAM (■), RUPP (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 4-7 ratas/grupo.

**Tabela 6:** Estimativas de afinidades ( $pK_B$ ) do antagonista BMY 7378 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas prenhes e não prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina. Valores de  $pK_B$  são expressos com média  $\pm$  epm e slope de *Schild* como média e intervalo de confiança de 95% (IC).

Antagonista	Noradrenalina					
	NPPC (n=6)		SHAM (n=7)		RUPP (n=4)	
	$pK_B$	Slope 95% (IC)	$pK_B$	Slope 95% (IC)	$pK_B$	Slope 95% (IC)
BMY 7378	$8.5 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$ (0.7-1.2)	$8.5 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$ (0.6-1.1)	$8.4 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$ (0.7- 1.0)

No entanto, o RS 100329 reduziu as contrações máximas induzidas pela noradrenalina na aorta abdominal de ratas dos grupos NPPC e RUPP, sugerindo que a noradrenalina ativou ARs- $\alpha_{1A}$ , comportamento típico de um antagonismo complexo. É interessante notar que, este comportamento intratransponível não foi observado em ratas do grupo SHAM (Figura 21; Tabela 7) e, o  $pA_2$  calculado com a menor concentração do antagonista foi de  $8.4 \pm 0.1$ , valor não consistente com a ativação de AR- $\alpha_{1A}$ .



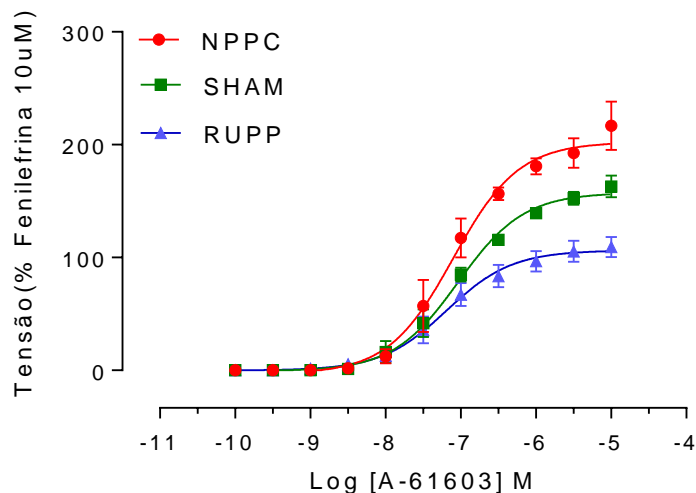
**Figura 21:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na aorta abdominal de ratas fêmeas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$  RS 100329. Em D são mostradas as contrações máximas ( $E_{máx}$ ) da noradrenalina na ausência (0 nM) e presença do antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$  RS 100329 (1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 3-4 ratas/grupo.

**Tabela 7:** Resposta máxima à noradrenalina (NA), na presença de concentrações crescentes do RS 100329 (antagonista de ARs- $\alpha_{1A}$ ).

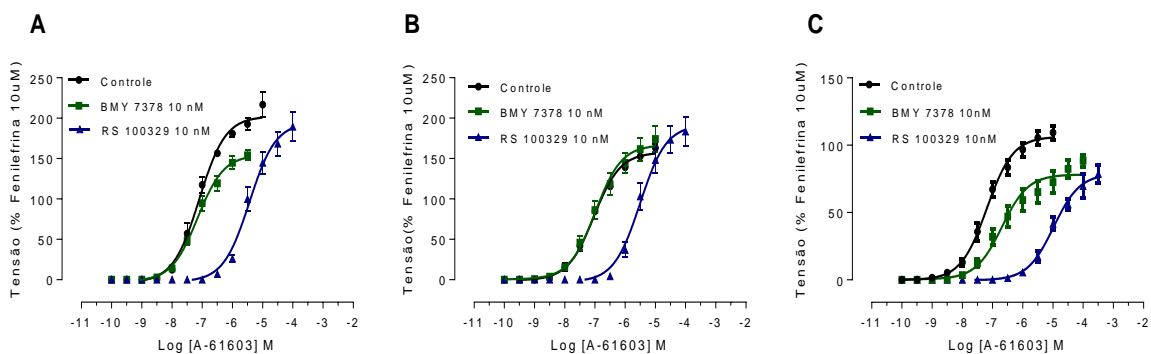
	E <sub>máx</sub> à NA				
	RS100239 (nM)				
	0	1	3	10	30
NPPC	192.5 ± 6.7	145.8 ± 6.7*	123.9 ± 7.2*	120.8 ± 7.1*	119.6 ± 4.2*
SHAM	175.5 ± 6.7	162.9 ± 7.6	160.5 ± 8.6	150.6 ± 9.5	142.9 ± 7.2
RUPP	167.8 ± 8.4	143.3 ± 6.4	135.7 ± 4.4*	84.9 ± 5.4*	72.5 ± 5.6*

Os valores são expressos como média ± epm. \* estatisticamente diferente de seu respectivo controle.

Para checar adicionalmente a existência de ARs- $\alpha_{1A}$  funcionais na aorta abdominal de ratas NPPC, SHAM e RUPP, foi utilizado o agonista seletivo de ARs- $\alpha_{1A}$ , o A-61603. Não houve diferença de potências para o A-61603 uma vez que os valores de pD<sub>2</sub> foram 7.09 ± 0.05 (NPPC), 7.03 ± 0.03 (SHAM) e 7.1 ± 0.08 (RUPP). No entanto, houve notável diferença de resposta máxima entre os grupos experimentais NPPC, SHAM e RUPP (E<sub>máx</sub> NPPC = 202±4.4, E<sub>máx</sub> SHAM= 157±2.2, E<sub>máx</sub> RUPP= 106±2.4, p<0.05) (Figura 22). Além disso, foram investigados os efeitos do RS 100329 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ) e BMY 7378 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ ) nas contrações induzidas pelo A-61603. Interessantemente, o RS 100329 antagonizou com potência subnanomolar (valores de pA<sub>2</sub> NPPC= 9.7±0.1; SHAM= 9.3±0.1) as contrações induzidas pelo A-61603 sem afetar sua resposta máxima, suportando o envolvimento dos ARs- $\alpha_{1A}$ . Inesperadamente, no grupo RUPP os antagonistas BMY 7378 e RS 100329 antagonizaram as contrações induzidas pelo A-61603 mostrando comportamento intransponível, através da redução de resposta máxima (n=3; p < 0.05), comportamento semelhante foi obtido no grupo NPPC na presença do BMY 7378 (n=3; p < 0.05) (Figura 23).



**Figura 22:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 na indução de contração da aorta abdominal de ratos NPPC (●), SHAM (■), RUPP (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 4-3 ratos/grupo.

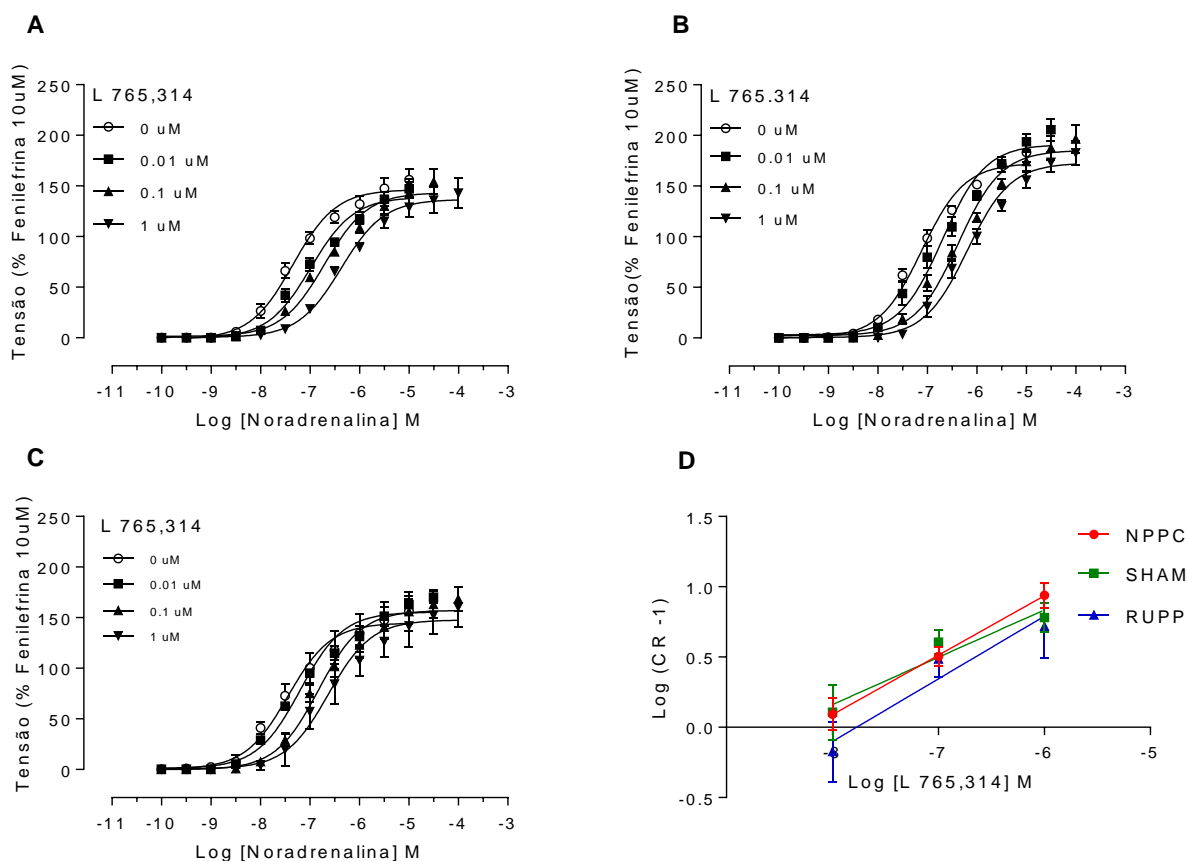


**Figura 23:** Curvas concentração-resposta ao A-61603 na indução de contração da aorta abdominal de ratos NPPC (A), SHAM (B) e RUPP (C) obtidas na ausência (●) e presença dos antagonistas BMY 7378 (■) e RS 100329 (▲). Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 4-3 ratos/grupo.

Para verificar a participação dos ARs- $\alpha_{1B}$  nas contrações induzidas pela noradrenalina, foi utilizado o L 765,314. O antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$  L 765,314 antagonizou de maneira concentração-dependente as contrações induzidas pela noradrenalina, entretanto, não foram linearmente relacionadas, ou seja, com o aumento de 10 vezes na concentração de L 765,314 não



resultou em redução de 10 vezes a potência da noradrenalina; tal falta de proporcionalidade é caracterizada pela inclinação da reta de regressão no gráfico de Schild menor que a unidade teórica prevista para o antagonismo competitivo simples. Porém, o  $pA_2$  calculado a partir dos deslocamentos à direita produzidos por altas concentrações de L 765,314 (maiores que  $0.1 \mu\text{M}$ ) em todos os grupos experimentais ( $pA_2 \approx 7.5$ ) indica que ARs- $\alpha_{1B}$  não participam das contrações induzidas pela noradrenalina (Figura 24; Tabela 8).



**Figura 24:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina na indução de contração da aorta abdominal de ratas fêmeas: NPPC (A), SHAM (B), RUPP (C) obtidas na ausência e presença do antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$  L 765,314. À direita (D) está representado o gráfico de *Schild* do antagonismo das contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas NPPC (●), SHAM (■), RUPP (▲). S Símbolos representam a média  $\pm$  epm de 3-4 ratas/grupo.

**Tabela 8:** Estimativas de potências ( $pA_2$ ) do antagonista L 765,314 contra as contrações induzidas pela noradrenalina em aorta abdominal de ratas prenhes e não prenhes submetidas à cirurgia de redução da pressão de perfusão uterina. Valores de  $pA_2$  são expressos com média  $\pm$  epm e slope de Schild como média e intervalo de confiança de 95% (IC).

Antagonista	Noradrenalina					
	NPPC (n=4)		SHAM (n=4)		RUPP (n=3)	
	$pA_2$	Slope 95% (IC)	$pA_2$	Slope 95% (IC)	$pA_2$	Slope 95% (IC)
L 765,314	$7.5 \pm 0.1$	$0,4 \pm 0,06$ (0,3 - 0,6)	$7.5 \pm 0.1$	$0,3 \pm 0,1$ (0,1 - 0,5)	$7.5 \pm 0.1$	$0,4 \pm 0,1$ (0,1 - 0,7)

Assim, os comportamentos apresentados pelos agonistas e antagonistas utilizados distinguem uma população heterogênea formada pelos subtipos ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$  na aorta abdominal de ratas NPPC, SHAM e RUPP, sem evidências da participação dos ARs- $\alpha_{1B}$ .

## DISCUSSÃO

A presente dissertação teve como objetivo caracterizar através do uso de ferramentas farmacológicas seletivas os subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração *in vitro* da artéria aorta abdominal de ratas submetidas a um modelo experimental de pré-eclâmpsia pela redução da pressão de perfusão uterina.

A redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) em ratas prenhas tem sido descrito como um dos modelos experimentais que melhor representa o estado clínico da pré-eclâmpsia em humanos por compartilhar algumas características das adaptações apresentadas por mulheres com pré-eclâmpsia, dentre elas especialmente a hipertensão arterial (Roberts et al., 2012; George e Granger; Gilbert, *et al.*, 2007; Lamarca, *et al.*, 2008). No trabalho original de Alexander et al., (2001) que descreve este modelo experimental de pré-eclâmpsia, ratas prenhas que sofreram a cirurgia RUPP tiveram um aumento na PAM de cerca de 20-25 mmHg em relação às ratas SHAM, além disso, não houve diferença significativa na PAM de ratas virgens quando comparadas as ratas virgens clipadas (denominada em nossa dissertação como NPPC). De fato, foi observado no presente estudo um aumento significativo da PAM de ratas prenhas submetidas a cirurgia RUPP em relação às ratas SHAM e não houve diferença significativa na PAM das ratas do grupo NPPC em relação ao grupo CONTROLE (ratas virgens sem procedimento cirúrgico). Além disso, houve um aumento significativo de reabsorção fetal e, conseqüentemente, uma diminuição na quantidade de fetos no grupo RUPP em relação ao grupo SHAM; tais resultados estão de acordo com os descritos na literatura utilizando ratas RUPP sugerindo que a redução do fluxo placentário pela cirurgia de redução de pressão de perfusão intrauterina ocasiona diminuição na disponibilidade de oxigênio para o feto e conseqüentemente aumento de reabsorção fetal (Reho et al., 2011).

Após o estabelecimento do modelo RUPP em nosso laboratório, foram padronizadas as contrações *in vitro* da aorta abdominal de ratas em resposta à noradrenalina. Os resultados obtidos em aortas abdominais de fêmeas na ausência e presença do coquetel (cocaína 3 $\mu$ M, corticosterona 10 $\mu$ M, propranolol 0.1 $\mu$ M e ioimbina 0.1 $\mu$ M), indicam que há ARs- $\alpha_2$  e  $\beta$  funcionais neste tecido, uma vez que houve perda de potência da noradrenalina (supostamente causada pela ioimbina) e aumento da resposta máxima (supostamente causado pelo propranolol). De fato, é sabido que a ativação de ARs- $\alpha_2$  em várias artérias e especialmente veias leva à contração do músculo liso, bem como a ativação de ARs- $\beta$  leva ao seu relaxamento (para revisão ver Guimarães e Moura, 2001).

Uma vez padronizado o perfil de contração da aorta abdominal de ratas em resposta à noradrenalina, foram caracterizados os subtipos ARs- $\alpha_1$  envolvidos nesta contração e, para comparação, essa caracterização também foi feita na aorta abdominal de machos.

O prazosin, antagonista não-seletivo ARs- $\alpha_1$ , antagonizou de maneira concentração-dependente as contrações à noradrenalina exibindo afinidades consistentes com a ativação de ARs- $\alpha_1$  em aortas de machos e fêmeas (CONTROLE). Da mesma forma, o BMY 7378, antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ , também se comportou como um antagonista competitivo clássico, isto é, deslocou as curvas concentração-resposta da noradrenalina à direita sem reduzir sua contração máxima, e apresentou afinidade no antagonismo destas contrações indicando a participação de ARs- $\alpha_{1D}$  (Goetz et al., 1995; Yamamoto e Koike, 2001; Kamikihara et al., 2005; Kiguti LRA; Tese de Doutorado, 2014).

Diferente do comportamento apresentado pelo BMY 7378, o antagonista seletivo de ARs- $\alpha_{1A}$  RS 100329 reduziu a contração máxima induzida pela noradrenalina em aortas abdominais de machos e fêmeas. Tal comportamento antagonista intransponível é característico de ligantes que apresentam lentas constantes de dissociação (Koff), como é o caso do RS 100329 (Pediani et al.,

2000). No entanto, é notável que o RS 100329 foi mais potente em as aortas abdominais de fêmeas do que de machos, uma vez que todas as concentrações testadas (1 a 30 nM) diminuíram a eficácia da noradrenalina na artéria da fêmea, enquanto apenas as concentrações 10 nM e 30 nM reduziram a contração induzida pela noradrenalina na artéria do macho. Isto pode indicar que o ARs- $\alpha_{1A}$  tem um papel mais importante na contração da aorta abdominal da fêmea do que do macho. Não obstante, a participação de ARs- $\alpha_{1A}$  na contração da aorta abdominal de ratos não foi observada por Asbún-Bojalil et al., (2002), que propuseram que a baixa potência apresentada pelo antagonista 5-metilurapidil (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ;  $pA_2 = 7.64$ ) e alta potência apresentada pelo BMY 7378 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ ;  $pA_2 = 8.44$ ) seriam indicativos de que apenas ARs- $\alpha_{1D}$  participam das contrações induzidas pela fenilefrina. Uma possível explicação para essa diferença é que a noradrenalina (utilizada na presente dissertação), é um agonista de alta eficácia nos três subtipos de ARs- $\alpha_1$ , sendo capaz de ativar uma população heterogênea de ARs- $\alpha_1$ , enquanto que a fenilefrina apresenta eficácias intrínsecas particulares para cada um dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  nativos e recombinantes (Minneman et al., 1994; Lima V; Dissertação de Mestrado, 2008)

A maior potência e eficácia relativa apresentada pelo A-61603 (agonista seletivo de ARs- $\alpha_{1A}$ ) na aorta abdominal de fêmeas também é indicativo de que este subtipo de receptor tem um papel mais importante na contração da artéria da fêmea do que do macho. Além disso, as contrações induzidas pelo agonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$  A-61603 em aortas abdominais de machos e fêmeas foram antagonizadas com alta potência pelo RS 100329, mas não pelo BMY 7378, dando suporte à ideia de que há uma população heterogênea composta de ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$  envolvida na contração da aorta abdominal de machos e fêmeas. É interessante notar que há uma importante diferença na distribuição de subtipos de ARs- $\alpha_1$  ao longo da artéria aorta, uma vez que a presente dissertação identificou ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$  na aorta abdominal, enquanto que apenas o ARs- $\alpha_{1D}$  tem sido

proposto estar envolvido na contração da aorta torácica de diversas espécies, incluindo camundongos (Yamamoto e Koike, 2001), ratos (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Moraes P. L.; Dissertação de Mestrado, 2000; Asbún-Bojalil et al., 2002; Muller A.; Dissertação de Mestrado, 2005); e coelhos (Satoh et al., 1999). A distribuição heterogênea dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  ao longo de vasos sanguíneos já foi descrita por Villalobos-Molina e Ibarra (1996) na artéria mesentérica e artéria carótida de ratos; por Smith et al., (1997) em artérias de resistência cutânea de coelhos e por Kamikihara et al., (2005) na artéria caudal de ratos; Entretanto, na aorta abdominal de fêmeas e machos esta distribuição heterogênea não havia sido relatada até o momento.

A presente dissertação não encontrou evidências da participação de ARs- $\alpha_{1B}$  na contração da aorta abdominal de machos ou fêmeas, uma vez que o L 765,314 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$ ) antagonizou apenas com baixa potência a contração da artéria de fêmeas em resposta à noradrenalina e foi inefetivo quando testado até 1  $\mu$ M na artéria de machos. No entanto, é importante mencionar a grande dificuldade na identificação de efeitos mediados pelos ARs- $\alpha_{1B}$  em razão da existência de apenas um ligante seletivo (L 765,314), fazendo com que a caracterização deste receptor seja principalmente baseada em critérios de exclusão; em outras palavras, se determinado efeito foi antagonizado com baixa potência/afinidade pelos antagonistas seletivos de ARs- $\alpha_{1A}$  ou ARs- $\alpha_{1D}$ , isto é “evidência” da participação de ARs- $\alpha_{1B}$ . Mesmo assim, a baixa potência determinada para o L 765,314 na aorta abdominal de fêmeas ( $pA_2 \approx 6.3$ ) indica que estes receptores não participam da contração desta artéria (Patane et al., 1998).

Em conjunto, esses dados sugerem que coexiste uma população de ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$  funcionais na aorta abdominal de machos e fêmeas e que, em artérias de fêmeas há uma contribuição maior do subtipo ARs- $\alpha_{1A}$ .

Uma vez caracterizados os subtipos de ARs- $\alpha_1$  funcionais que participam da contração da aorta abdominal de fêmeas (virgens, não prenhes), a presente dissertação investigou se a prenhez induz plasticidade nos subtipos de ARs- $\alpha_1$  funcionais e se há mudanças dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  na pré-eclâmpsia experimental.

As contrações induzidas pela noradrenalina na aorta abdominal de ratas NPPC, SHAM e RUPP não resultam da ativação de ARs- $\alpha_2$ , uma vez que o prazosin apresentou alta afinidade na inibição das contrações das artérias dessas ratas. Mais ainda, o BMY 7378 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1D}$ ) também antagonizou com alta afinidade as contrações induzidas pela noradrenalina nas aortas abdominais de ratas NPPC, SHAM e RUPP indicando que há importante envolvimento de ARs- $\alpha_{1D}$ .

Num outro modelo de hipertensão gestacional em ratas induzido pela “clipagem” da região superior da aorta abdominal, foi proposto que os ARs- $\alpha_{1D}$  heterodimerizam com receptores AT1 da angiotensina II e que tal heterodimerização pode ser relevante na hipertensão gestacional que se instalou (González-Hernández et al., 2010). No entanto, o estudo de González-Hernández et al., (2010) não faz nenhuma análise funcional dos ARs- $\alpha_{1D}$  ou receptores AT1 presentes nos vasos dessas ratas. Além disso, até mesmo as evidências de que estes receptores formam heterodímeros são frágeis, uma vez que elas são fundamentadas no uso de anticorpos cuja especificidade é questionável (Jensen et al., 2009).

Os comportamentos exibidos pelo RS 100329 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1A}$ ) variou significativamente nas aortas abdominais de ratas RUPP, NPPC e SHAM. O RS 100329 reduziu com alta potência as contrações máximas induzidas pela noradrenalina nas aortas abdominais de fêmeas NPPC e RUPP indicando que há importante envolvimento de ARs- $\alpha_{1A}$ . Por outro lado, o RS 100329 só antagonizou as contrações induzidas pela noradrenalina na aorta abdominal de fêmeas

SHAM em concentrações acima de 10 nM e foi incapaz de reduzir a contração máxima. Tais resultados indicam que a participação de ARs- $\alpha_{1A}$  na contração da artéria de fêmeas SHAM é menor do que nas artérias de fêmeas NPPC e RUPP. No entanto, tal conclusão é complicada pelos efeitos encontrados com o agonista seletivo de ARs- $\alpha_{1A}$ , o A-61603, o qual foi mais eficaz nas aortas abdominais de fêmeas SHAM do que nas artérias das RUPP. Mais ainda, as contrações induzidas pelo A-61603 na aorta abdominal de ratas RUPP foram antagonizadas com alta potência tanto pelo RS 100329 quanto pelo BMY 7378, sugerindo que há algum tipo interação próxima entre os ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$ , que não ocorre nas artérias de fêmeas SHAM ou NPPC. De fato, as contrações induzidas pelo A-61603 foram reduzidas na musculatura lisa do leito mesentérico de camundongos *knockout* para ARs- $\alpha_{1D}$ , quando comparadas àquelas induzidas pelo A-61603 no leito mesentérico de camundongos wild-type, sugerindo aos autores que os ARs- $\alpha_{1D}$  modulam a contração do leito mesentérico induzida pela ativação de ARs- $\alpha_{1A}$  (Martinez-Salas et al., 2011). Não obstante, os resultados da presente dissertação indicam que a prenhez induz plasticidade nos subtipos de ARs- $\alpha_1$  da artéria aorta abdominal e que a hipertensão causada pela redução da pressão de perfusão uterina impede a plasticidade.

Já com relação ao envolvimento de ARs- $\alpha_{1B}$  na contração das aortas abdominais de fêmeas NPPC, SHAM e RUPP, a presente dissertação não encontrou evidências para tal. Apesar do L 765,314 (antagonista seletivo ARs- $\alpha_{1B}$ ) ter sido consideravelmente mais potente na inibição das contrações das artérias de fêmeas NPPC, SHAM e RUPP ( $pA_2 \approx 7.5$ ) do que nas artérias de fêmeas controle ou machos, a potência estimada não é consistente com o envolvimento de ARs- $\alpha_{1B}$  (Patane et al., 1998).

Os dados da presente dissertação indicam que tanto a prenhez quanto a redução da pressão de perfusão uterina nas ratas prenhes altera a expressão dos subtipos de ARs- $\alpha_1$



funcionais na aorta abdominal de ratas. Embora seja um dado novo na literatura, a ideia de plasticidade dos ARs induzida por perturbações hormonais não é nova, uma vez que Pupo, (1998) e Campos et al., (2003) observaram que a castração induz o aparecimento de ARs- $\alpha_{1B}$  funcionais no ducto deferente de rato e Banie et al., (2008) observaram redução de expressão ARs- $\alpha_{1A}$  em células do músculo liso de uretra de ratas após a exposição ao estrógeno. Por outro lado, também é sabido que a simpatectomia cirúrgica ou química induz plasticidade de ARs no músculo liso vascular e não vascular. Por exemplo, Cleary et al., (2004) demonstraram que a simpatectomia por 6-hidroxidopamina aumenta a participação do ARs- $\alpha_{1D}$  na contração do ducto deferente de rato à noradrenalina enquanto que 30 dias após a simpatectomia cirúrgica há aumento na participação de ARs- $\alpha_{1B}$  na contração deste mesmo órgão (Pupo, 1997). Já no músculo liso vascular, a simpatectomia química por reserpina aumenta a expressão e função dos ARs- $\alpha_{1D}$  na artéria caudal do rato (Kamikihara et al., 2007).

Os resultados da presente dissertação demonstram que os ARs- $\alpha_1$  estão sujeitos à plasticidade ressaltando a necessidade de que o estudo de drogas potencialmente úteis no tratamento de uma determinada patologia seja feito em modelos experimentais que mimetizem a situação terapêutica. Portanto, será importante investigar a capacidade de diferentes antagonistas de ARs- $\alpha_1$  reduzirem a pressão arterial elevada das ratas submetidas à esse modelo experimental de pré-eclâmpsia.

## CONCLUSÕES

- Coexiste uma população de ARs- $\alpha_{1A}$  e - $\alpha_{1D}$  funcionais na aorta abdominal de machos e fêmeas; No entanto, há uma contribuição funcional maior dos ARs- $\alpha_{1A}$  na contração da artéria de fêmeas do que de machos.
- A prenhez altera a participação dos subtipos de ARs- $\alpha_1$  envolvidos na contração da aorta abdominal de ratas, uma vez que o papel dos ARs- $\alpha_{1A}$  foi menor que aquele observado em ratas virgens.
- No modelo experimental de pré-eclâmpsia RUPP, agonistas e antagonistas seletivos de ARs- $\alpha_1$  exibiram comportamento farmacológico complexo, não observado na artéria de ratas virgens clipadas (NPPC), indicando algum tipo de interação próxima entre ARs- $\alpha_{1A}$  e ARs- $\alpha_{1D}$  que merece ser mais profundamente investigado.

## REFERÊNCIAS

- Abdulla, M.H., Sattar, M. a, Johns, E.J., Abdullah, N. a, and Khan, M.A.H. (2011). Evidence for the role of  $\alpha$ 1A-adrenoceptor subtype in the control of renal haemodynamics in fructose-fed Sprague-Dawley rat. *Eur. J. Nutr.* 50: 689–97.
- ACOG Committee on Obstetric Practice. (2002). ACOG practice bulletin. 1. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Am. Coll. Obstet. Gynecol.* 77: 67–75.
- Akinaga, Lima, Kiguti, Hebelers-Barbosa, Alcántara-Hernández, García-Sáinz, et al. (2013). Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of  $\alpha$ 1A-adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. *Mol. Pharmacol.* 83: 870–881.
- Alexander, B.T. (2003). Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* 41: 457–462.
- Alexander, B.T., Kassab, S.E., Miller, M.T., Abram, S.R., Reckelhoff, J.F., Bennett, W. a, et al. (2001). Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 37: 1191–1195.
- Arunlaskhana, O., and Schild, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* 14: 48–58.
- Asbún-Bojalil, J., Castillo, E.F., Escalante, B. a, and Castillo, C. (2002). Does segmental difference in alpha 1-adrenoceptor subtype explain contractile difference in rat abdominal and thoracic aortae? *Vascul. Pharmacol.* 38: 169–75.
- Bai, Y., Edelmann, M., and Sanderson, M.J. (2009). The contribution of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors to agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling of airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 297: L347–L361.
- Banie, L., Guiting, L., Ning, H., Wang, G., Luelow, T.F., and Lin, C. (2008). Effects of Estrogen, Raloxifene and Levormeloxifene on Alpha1A-Adrenergic Receptor Expression. *Journall Urol.* 180: 2241–2246.
- Bardin, N., Murthi, P., and Alfaidy, N. (2015). Normal and Pathological Placental Angiogenesis. *2015*: 2–4.
- Bishop, M.J. (2008). Recent advances in the discovery of alpha-1 adrenoceptor agonists. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 11: 495–511.
- Bottalico, B., Larsson, I., Brodzki, J., Hernandez-Andrade, E., Casslen, B., Marsal, K., et al. (2004). Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 25: 518–529.

Bracho-Valdés, I., Godínez-Hernández, D., Arroyo-Vicelis, B., Bobadilla-Lugo, R. a., and López-Sánchez, P. (2009). Increased alpha-1 Adrenoceptor Expression in Pregnant Rats with Subrenal Aortic Coarctation. *Hypertens. Pregnancy* 28: 402–416.

Brasil. Ministério da Saúde.DATASUS [Internet] (2008). Estatísticas vitais, mortalidade e nascidos vivos: óbito maternos.

Campbell, A.P., MacDougall, I.J. a, Griffith, R., and Finch, A.M. (2014). An aspartate in the second extracellular loop of the  $\alpha$ 1B adrenoceptor regulates agonist binding. *Eur. J. Pharmacol.* 733: 90–96.

Campos, M., Moraes, P.L., and Pupo, A.S. (2003). Effects of castration and of testosterone replacement on alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 471: 149–155.

Celik, H., Avci, B., and Işık, Y. (2013). Vascular endothelial growth factor and endothelin-1 levels in normal pregnant women and pregnant women with pre-eclampsia. *J Obs. Gynaecol* 33: 355–358.

Centurion, D., Cobos-puc, L.E., and Ramirez-rosas, M.B. (2009). Pithed rat model for searching vasoactive drugs of the sympathetic and. *Model. Neuropharmacol.* 91–97.

Chen, Z., Rogge, G., Hague, C., Alewood, D., Colless, B., Lewis, R.J., et al. (2004). Subtype-selective Noncompetitive or Competitive Inhibition of Human alpha-1 Adrenergic Receptors by  $\alpha$ 1-TIA. *J. Biol. Chem.* 279: 35326–35333.

Cleary, L., Slattery, J., Bexis, S., and Docherty, J.R. (2004). Sympathectomy reveals alpha 1A and alpha 1D- adrenoceptors components to contractions to noradrenaline in rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 153: 745–52.

Cotecchia, S. (2010). The  $\alpha$ 1 -adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J. Recept. Signal Transduct.* 30: 410–419.

Cowans, N.J., Stamatopoulou, A., Matwejew, E., Kaisenberg, C.S. von, and Spencer, K. (2010). First-trimester placental growth factor as a marker for hypertensive disorders and SGA. *Prenat. Diagn.* 30: 565–570.

Crews, J.K., Herrington, J.N., Granger, J.P., and Khalil, R. a (2000). Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension* 35: 367–372.

Deupi, X., and Standfuss, J. (2011). Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21: 541–551.

Doğana, K., Guraslana, H., Senturka, Mehmet Baki Helvacioğlua, C., İdila, S., and Ekina, M. (2015). Can Platelet Count and Platelet Indices Predict the Risk and the Prognosis of Preeclampsia? *Hypertens. Pregnancy* 34: 434–442.

Dulce, R.A., Yiginer, O., Gonzalez, D.R., Goss, G., Feng, N., Zheng, M., et al. (2013). Hydralazine and Organic Nitrates Restore Impaired Excitation-Contraction Coupling by Reducing Calcium Leak Associated with Nitroso-Redox Imbalance. *J Biol Chem* 288: 6522–6533.

Duley L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.* 33: 129–206.

Ellershaw, D.C., and Gurney, A.M. (2001). Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 134: 621–631.

Eltze, M., König, H., Ullrich, B., and Grebe, T. (2001). Failure of AH11110A to functionally discriminate between alpha(1)-adrenoceptor subtypes A, B and D or between alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 415: 265–276.

Espinoza, J., Espinoza, A.F., and Power, G.G. (2011). High fetal plasma adenosine concentration: A role for the fetus in preeclampsia? *na.* 205: 485.e24–485.e27.

Faber, J.E., Yang, N., and Xin, X. (2001). Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 441–52.

Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63: 1256–72.

George, E.M., and Granger, J.P. (2011). Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia. *Am. J. Hypertens.* 24: 964–969.

Gilbert, J.S., Gilbert, S.A.B., Arany, M., and Granger, J.P. (2009). Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension* 53: 399–403.

Gisbert, R., Ziani, K., Miquel, R., Noguera, M.A., Ivorra, M.D., Anselmi, E., et al. (2002). Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol.* 135: 206–216.

Goetz, A.S., King, H.K., Ward, S.D.C., True, T.A., Rimele, T.J., and Saussy, D.L. (1995). BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha-1 adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 272: 5–6.

Goi, Y., Tomiyama, Y., Nomiya, M., Sagawa, K., Aikawa, K., and Yamaguchi, O. (2013). Effects of silodosin, a selective  $\alpha$ 1A-adrenoceptor antagonist, on bladder blood flow and bladder function in a rat model of atherosclerosis induced chronic bladder ischemia without bladder outlet obstruction. *J. Urol.* 190: 1116–22.

González-Hernández, M. de L., Godínez-Hernández, D Bobadilla-Lugo, R.A., and López-Sánchez, P. (2010). Angiotensin-II type 1 receptor (AT1R) and alpha-1D adrenoceptor form a heterodimer during pregnancy-induced hypertension. *Auton. Autacoid Pharmacol.* 30: 167–175.

- Guimarães, S., and Moura, D. (2001). Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacol. Rev.* 53: 319–352.
- Gurney, A.M., and Allam, M. (1995). Inhibition of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of rabbit aorta by hydralazine. *Br. J. Pharmacol.* 114: 238–44.
- Hague, C., Chen, Z., Pupo, A.S., Schulte, N. a, Toews, M.L., and Minneman, K.P. (2004). The N Terminus of the Human  $\alpha$ 1D -Adrenergic Receptor Prevents Cell Surface Expression. 309: 388–397.
- Herse, F., Dechend, R., Harsem, N.K., Wallukat, G., Janke, J., Qadri, F., et al. (2007). Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension* 49: 604–611.
- Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, S.Z., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., et al. (1995). International Union of Pharmacology X. Recommendation for Nomenclature of alpha-1-adrenoceptors: Consensus Update. *Pharmacol. Rev.* 274: 267–270.
- Huang, P., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K., Moskowitz, M., and Bevan, J. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239–242.
- Huang, P.L., Dawson, T.M., Brecht, D.S., Snyder, S.H., and Fishman, M.C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273–1286.
- Hyttén, F. (1985). Blood volume changes in normal pregnancy.No Title. *Clin Haematol* 13: 601–12.
- Iriyama, T., Sun, K., Parchim, N.F., Li, J., Zhao, C., Song, A., et al. (2015). Elevated Placental Adenosine Signaling Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia. *Circulation* 131: 730–741.
- Iyer, A., Chan, V., and Brown, L. (2010). The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. *Curr. Cardiol. Rev.* 6: 291–7.
- Jensen, B.C., Swigart, P.M., and Simpson, P.C. (2009). Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 409–412.
- Jin, Z., Zhang, W., Yang, H., Wang, X., Zheng, Y., Zhang, Q., et al. (2013). Maternal treatment with agonistic autoantibodies against type-1 angiotensin II receptor in late pregnancy increases apoptosis of myocardial cells and myocardial susceptibility to ischemia-reperfusion injury in offspring rats. *PLoS One* 8: 1–8.
- Kamihara, S.Y., Lima, V., Silva, A.R.T., Bazzo, I., and Pupo, S. (2005). Differential Distribution of Functional alpha-1 Adrenergic Receptor Subtypes along the Rat Tail Artery. *Pharmacology* 314: 753–761.
- Kamihara, S.Y., Mueller, A., Lima, V., Akinaga, J., Nojimoto, F.D., Castilho, A., et al. (2007). A1-Adrenoceptors in Proximal Segments of Tail Arteries From Control and Reserpinised Rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 376: 117–126.

Kanagy, N.L. (1997). Increased vascular responsiveness to alpha 2-adrenergic stimulation during NOS inhibition-induced hypertension. *Am. J. Physiol.* 273: H2756–64.

Kao, C.K., Morton, J.S., Quon, A.L., Reyes, L.M., Lopez-jaramillo, P., and Davidge, S.T. (2016). Mechanism of vascular dysfunction due to circulating factors in women with preeclampsia. *Clin. Sci.*

Khatun, S., Kanayama, N., Sato, E., Belayet, H.M., Kobayashi, T., and Terao, T. (1998). Cultured Sympathetic Nerve. *Hypertension* 31: 1343–1349.

Kiguti, L.R.A., and Pupo, A.S. (2014). Investigação da participação de adrenoceptores alfa-1A e alfa-1D na contração da cauda do epidídimo de rato e sua modulação androgênica e estrogênica. Tese (Doutorado em Farmacologia).Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' Campus Botucatu.

Kleine-Brueggene, M., Gradinaru, I., Babaeva, E., Schwinn, D.A., and Oganessian, A. (2014). Alpha1a-Adrenoceptor Genetic Variant Induces Cardiomyoblast to Fibroblast-like Cell Transition via Distinct Signaling Pathways. *Cell Signal* 26: 1985–1997.

Knepper, S.M., Buckner, S. a, Brune, M.E., DeBernardis, J.F., Meyer, M.D., and Hancock, A. a (1995). A-61 603 , a Potent alpha1-Adrenergic Receptor Agonist, Selective for the alpha1A Receptor Subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 97–103.

LaMarca, B., Parrish, M., Ray, L.F., Murphy, S.R., Roberts, L., Glover, P., et al. (2009). Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension* 54: 905–9.

Lamarca, B., Parrish, M.R., and Wallace, K. (2012). Agonistic autoantibodies to the angiotensin II type i receptor cause pathophysiologic characteristics of preeclampsia. *Gen. Med.* 9: 139–146.

Lambert-Messerlian, G.M., Palomaki, G.E., Neveux, L.M., Chien, E., Friedman, A., Rosene-Montella, K., et al. (2009). Early onset preeclampsia and second trimester serum markers. *Prenat. Diagn.* 29: 1109–1117.

Lampinen, K.H., Rönback, M., Groop, P.-H., Nicholls, M.G., G, Y.T., and Kaaja, R.J. (2014). Increased plasma norepinephrine levels in previously pre-eclamptic women. *J. Hum. Hypertens.* 269-273.:

Li, J., Cao, Y.-X., Liu, H., and Cang-Bao, X. (2007). Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Eur. J. Pharmacol.* 557: 186–194.

Li, J., LaMarca, B., and Reckelhoff, J.F. (2012). A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 303: H1–H8.

Lima, V. (2008). Afinidade e eficácias intrínseca relativas de agonistas seletivos de adrenoceptores alfa-1. Dissertação (Mestrado em Farmacologia).Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita

Filho'.

Lima, V., Mueller, A., Kamikihara, S.Y., Raymundi, V., Alewood, D., Lewis, R.J., et al. (2005). Differential antagonism by conotoxin  $\rho$ -TIA of contractions mediated by distinct  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 508: 183–192.

Lowe, S.A., Bowyer, L., Lust, K., McMahon, L.P., Morton, M.R., North, R.A., et al. (2015). The SOMANZ guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2014. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 55: 11–6.

Maeda, K. (2014). Preeclampsia is caused by continuous sympathetic center excitation due to an enlarged pregnant uterus. *J. Perinat. Med.* 42: 233–237.

Martínez-Salas, S.G., Campos-Peralta, J.M., Pardo, J.P., Hernández-Muñoz, R., Ibarra, M., Tanoue, a., et al. (2011).  $\alpha$ 1D-Adrenoceptor regulates the vasopressor action of  $\alpha$ 1A-adrenoceptor in mesenteric vascular bed of  $\alpha$ 1D-adrenoceptor knockout mice. *Auton. Autacoid Pharmacol.* 31: 64–71.

Martínez-Salas, S.G., Campos-Peralta, J.M., Pares-Hipolito, J., Gallardo-Ortiz, I.A., Ibarra, M., and Villalobos-Molina, R. (2007).  $\alpha$ 1A -Adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Auton. Autacoid Pharmacol.* 27: 137–142.

Maynard, S., Min, J., Merchan, J., Lim, K., Li, J., and Mondal, S. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111: 649–658.

Minneman, K.P., Theroux, T.L., Hollinger, S., Han, C., and Esbenshade, T. a (1994). Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 46: 929–936.

Moraes, P.L. (2000). Estudos funcionais dos efeitos da castração cirúrgica sobre os adrenoceptores alfa 1 em aorta de rato. Dissertação (Mestrado em Farmacologia).Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho.

Morishima, S., Suzuki, F., Yoshiki, H., Md Anisuzzaman, a S., Sathi, Z.S., Tanaka, T., et al. (2008). Identification of the alpha1L-adrenoceptor in rat cerebral cortex and possible relationship between alpha1L- and alpha1A-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 153: 1485–1494.

Morris, E. a., Hale, S. a., Badger, G.J., Magness, R.R., and Bernstein, I.M. (2015). Pregnancy induces persistent changes in vascular compliance in primiparous women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212: 633.e1–633.e6.

Muller, A. (2005). Investigação dos adrenoceptores-alfa1 envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela noradrenalina no ducto deferente, baço e aorta de rato. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'.

Muramatsu, I., Morishima, S., Suzuki, F., Yoshiki, H., Anisuzzaman, a S.M., Tanaka, T., et al. (2008). Identification of alpha 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by alpha 1A-adrenoceptor gene



knockout. *Br. J. Pharmacol.* 155: 1224–34.

Na, K.H., Choi, J.H., Kim, C.H., Kim, K.S., and Kim, G.J. (2013). Altered Expression of Norepinephrine Transporter and Norepinephrine in Human Placenta cause Pre-eclampsia Through Regulated Trophoblast Invasion. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 40: 12–22.

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2000). Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183: 1–22.

Neal, L., and Benowitz, M. (2001). Antihypertensive Agents. In *Basic & Clinical Pharmacology*, pp 160–167.

Nishio, E., Nakata, H., Arimura, S., and Watanabe, Y. (1996). alpha-1-Adrenergic receptor stimulation causes arachidonic acid release through pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein and JNK activation in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 277–282.

Nojimoto, F.D., Mueller, a, Hebel-Barbosa, F., Akinaga, J., Lima, V., Kiguti, L.R.D. a, et al. (2010). The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. *Neuropharmacology* 59: 49–57.

Nourian, Z., Mulvany, M.J., Nielsen, K.B., Pickering, D.S., and Kristensen, T. (2008). The antagonistic effect of antipsychotic drugs on a HEK293 cell line stably expressing human alpha1A-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 596: 32–40.

Novak, J., Reckelhoff, J., Bumgarner, L., Cockrell, K., Kassab, S., and Granger, J.P. (1997). Reduced Sensitivity of the Renal Circulation to Angiotensin II in Pregnant Rats. *Hypertension* 30: 580–584.

O'Connell, T.D., Jensen, B.C., Baker, A.J., and Simpson, P.C. (2014). Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacol. Rev.* 66: 308–33.

O-Uchi, J., Komukai, K., Kusakari, Y., Morimoto, S., Kawai, M., Jhun, B.S., et al. (2013). Alpha1-adrenoceptor stimulation inhibits cardiac excitation-contraction coupling through tyrosine phosphorylation of beta1-adrenoceptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433: 188–93.

Patane, M. a, Scott, A.L., Broten, T.P., Chang, R.S.L., Ransom, R.W., Disalvo, J., et al. (1998). (L-765,314): A Potent and Selective  $\alpha_{1b}$  Adrenergic Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* 41: 8–11.

Pediani, J.D., Mackenzie, J.F., Heeley, R.P., Daly, C.J., and Mcgrath, J.C. (2000). Single-Cell Recombinant Pharmacology : Bovine  $\alpha_{1a}$  -Adrenoceptors in Rat-1 Fibroblasts Release Intracellular  $Ca^{2+}$ , Display Subtype-Characteristic Agonism and Antagonism , and Exhibit an Antagonist-Reversible Inverse Concentration-Response Phase 1. *293: 887–895.*

Pérez-Rivera, A.A., Hlavacova, A., Rosario-Colón, L.A., Fink, G.D., and Galligan, J.J. (2013). Differential Contributions of Alpha-1 and Alpha-2 Adrenoceptors to Vasoconstriction in Mesenteric Arteries and Veins of Normal and Hypertensive Mice. *Vascul. Pharmacol.* 46: 373–382.

Perez-Sepulveda, A., Monteiro, L.J., Dobierzewska, A., Espana-Perrot, P.P., Venegas-Araneda, P., Guzmáin-Rojas, A.M., et al. (2015). Placental aromatase is deficient in placental ischemia and preeclampsia. *PLoS One* 10: 1–14.

Perry, P., and Webb, R. (1988). Sensitivity and adrenoceptor affinity in the mesenteric artery of the deoxycorticosterone acetate hypertensive rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66: 1095–9.

Piasek, M.T., Butler, B.T., and Pruitt, T. a (1990). The role of alpha1-adrenoceptor subtypes in the regulation of arterial blood pressure. *Eur. J. Pharmacol.* 180: 381–386.

Pulgar, V.M., Yamaleyeva, L.M., Varagic, J., McGee, C.M., Bader, M., Dechend, R., et al. (2014). Increased angiotensin II contraction of the uterine artery at early gestation in a transgenic model of hypertensive pregnancy is reduced by inhibition of endocannabinoid hydrolysis. *Hypertension* 64: 619–625.

Pupo, A., and Minneman, K. (2002). Interaction of neuronal nitric oxide synthase with alpha1-adrenergic receptor subtypes in transfected HEK-293 cells. *BMC Pharmacol.* 2: 1–7.

Pupo, A.S., Jurkiewicz, N.A., Jurkiewicz, A. (1997). Functional Change of the Balance between alpha 1A and alpha 1B Adrenoceptor Populations after Transplantation of the Vas Deferens to the Intestine. *Ann. New York Acad. Sci.* 30: 193–195.

Pupo, A.S. (1998). Functional effects of castration on alpha1-adrenoceptors in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 351: 217–223.

Pupo, A.S., and Minneman, K.P. (2003). Specific interactions between gC1qR and alpha1-adrenoceptor subtypes. *J. Recept. Signal Transduct.* 23: 185–195.

Pupo, A.S., Uberti, M.A., and Minneman, K.P. (2003). N-terminal truncation of human  $\alpha$ 1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *Eur J Pharmacol* 462: 1–8.

Qian, L., Wang, H., Wu, F., Li, M., Chen, W., and Lv, L. (2015). Vitamin D 3 alters Toll-like receptor 4 signaling in monocytes of pregnant women at risk for preeclampsia. *Int J Clin Exp Med* 8: 18041–18049.

Quyyumi, A.A., Wright, C., Mockus, L., Shackell, M., Sutton, G.C., and Fox, K.M. (1985). Effects of combined alpha and beta adrenoceptor blockade in patients with angina pectoris. A double blind study comparing labetalol with placebo. *Br. Heart J.* 53: 47–52.

Ramesa, S., Mackraj, I., Gathiram, P., and Moodley, J. (2010). Sildenafil citrate improves fetal outcomes in pregnant, L-NAME treated, Sprague-Dawley rats. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* 149: 22–26.

- Regal, J.F., Lillegard, K.E., Bauer, A.J., Elmquist, B.J., Loeks-Johnson, A.C., and Gilbert, J.S. (2015). Neutrophil Depletion Attenuates Placental Ischemia-Induced Hypertension in the Rat. *PLoS One* 10: e0132063.
- Reho, J.J., Peck, J., Novak, J., and Ramirez, R.J. (2011). Hypertension Induced by Episodic Reductions in Uteroplacental Blood Flow in Gravid Rat. *Hypertens. Pregnancy* 30: 208–220.
- Ribeiro, C.A.S., and Pupo, A.S. (2015). Involvement of  $\alpha$ 1B-adrenoceptors in the anti-immobility effect of imipramine in the tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* 750: 39–42.
- Rijn, B. van, Bruinse, H., Veerbeek, J., Post, U.E., Koenen, S., Bom, J. van der, et al. (2016). Postpartum Circulating Markers of Inflammation and the Systemic Acute-Phase Response After Early-Onset Preeclampsia. *Hypertension* 67: 404–14.
- Roberts, J.M., Druzin, M., August, P. a, Gaiser, R.R., Bakris, G., Granger, J.P., et al. (2012). ACOG Guidelines: Hypertension in pregnancy.
- Rudner, X.L., Berkowitz, D.E., Booth, J. V, Funk, B.L., Cozart, K.L., D'Amico, E.B., et al. (1999). Subtype Specific Regulation of Human Vascular  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors by Vessel Bed and Age. *Circulation* 100: 2336–2343.
- Sagrati, G., Angeli, P., Buccioni, M., Gulini, U., Marucci, G., Melchiorre, C., et al. (2007). Synthesis and  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist activity of derivatives and isosters of the furan portion of (+)-cyclazosin. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 2334–235.
- Salomonsson, M., Oker, M., Kim, S., Zhang, H., Faber, J.E., and Arendshorst, W.J. (2001). Alpha1-adrenoceptor subtypes on rat afferent arterioles assessed by radioligand binding and RT-PCR. *AJP - Ren. Physiol.* 281: F172–F178.
- Sandrim, V.C., Palei, A.C.T., Metzger, I.F., Gomes, V.A., Cavalli, R.C., and Tanus-Santos, J.E. (2008). Nitric Oxide Formation Is Inversely Related to Serum Levels of Antiangiogenic Factors Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Soluble Endogline in Preeclampsia. *Hypertension* 52: 402–407.
- Satoh, M., Enomoto, K., Takayanagi, I., and Koike, K. (1999). Analysis of alpha1-adrenoceptor subtypes in rabbit aorta and arteries: regional difference and co-existence. *Eur. J. Pharmacol.* 374: 229–40.
- Schäfers, R.F., Nürnberger, J., Herrmann, B., Wenzel, R.R., Philipp, T., and Michel, M.C. (1999). Adrenoceptors mediating the cardiovascular and metabolic effects of alpha-methylnoradrenaline in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 918–925.
- Schobel, H., Fischer, T., Heusten, K., Geiger, H., and Schmieder, R. (1996). Preeclampsia - A State of Sympathetic Overactivity. *N. Engl. J. Med.* 335: 1480–1485.
- Schumann, H., Görlitz, B., and Wagner, J. (1975). Influence of papaverine, D600, and nifedipine on the effects of noradrenaline and calcium on the isolated aorta and mesenteric artery of the rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 289: 409–418.

Schwartz, N.B. (1964). Acute effects of ovariectomy on pituitary lh, uterine weight, and vaginal cornification. *Am J Physiol* 107: 1251–1259.

Smith, K.M., Macmillan, J.B., and McGrath, J.C. (1997). Investigation of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in rabbit cutaneous resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 122: 825–32.

Song, L., and Zhong, M. (2015). Association between Interleukin-10 gene polymorphisms and risk of early-onset preeclampsia. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 11659–11664.

Spradley, F.T., Tan, A.Y., Joo, W.S., Daniels, G., Kussie, P., Karumanchi, S.A., et al. (2016). Placental Growth Factor Administration Abolishes Placental Ischemia-Induced Hypertension. *Hypertension*. No prelo

Sun, T., Liu, R., and Cao, Y. (2011). Vasorelaxant and antihypertensive effects of formononetin through endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Acta Pharmacol. Sin.* 32: 1009–18.

Sun, T., Wang, J., Huang, L.H., and Cao, Y.X. (2013). Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT<sub>2A/1B</sub> receptors and alfa1-adrenoceptors in spontaneously rat arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 699: 241–249.

Szalai, G., Romero, R., Chaiworapongsa, T., Xu, Y., Wang, B., Ahn, H., et al. (2015). Full-length human placental sFlt-1-e15a isoform induces distinct maternal phenotypes of preeclampsia in mice.

Szalai, G., Xu, Y., Romero, R., Chaiworapongsa, T., Xu, Z., Jen Chiang, P., et al. (2014). In vivo experiments reveal the good, the bad and the ugly faces of sFlt-1 in Pregnancy. *PLoS One* 9: 1–18.

Szarka, A., Rigó, J., Lázár, L., Beko, G., and Molvarec, A. (2010). Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 11: 59.

Tannetta, D.S., Hunt, K., Jones, C.I., Davidson, N., Coxon, C.H., Ferguson, D., et al. (2015). Syncytiotrophoblast Extracellular Vesicles from Pre-Eclampsia Placentas Differentially Affect Platelet Function. *PLoS One* 10: e0142538.

Verdonk, K., Saleh, L., Lankhorst, S., Smilde, J.E., Ingen, M.M. van, IM, G., et al. (2015). Association studies suggest a key role for endothelin-1 in the pathogenesis of preeclampsia and the accompanying renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *Hypertension* 65: 1316–1323.

Villalobos-Molina, R. (2004). The hypotensive effect of BMY 7378 involves central 5-HT<sub>1A</sub> receptor stimulation in the adult but not in the young rat. *Arch. Med.* 35: 495–498.

Villalobos-Molina, R., and Ibarra, M. (1996).  $\alpha_1$ -Adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the  $\alpha_{1D}$  or  $\alpha_{1A}$  subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 298: 257–263.

Villamil-Hernández, M.T., Alcántara-Vázquez, O., Sánchez-López, A., and Centurión, D. (2013). Pharmacological identification of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes involved in the vasopressor responses induced by ergotamine in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 715: 262–269.

Weis, W.I., and Kobilka, B.K. (2008). Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 734–740.

Westcott, E.B., Goodwin, E.L., Segal, S.S., and Jackson, W.F. (2012). Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles. *J. Physiol.* 590: 1849–69.

Wheatley, M., Simms, J., Hawtin, S.R., Wesley, V.J., Wootten, D., Conner, M., et al. (2007). Extracellular loops and ligand binding to a subfamily of Family A G-protein-coupled receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 717–720.

Williams, T.J., Blue, D.R., Daniels, D. V, Davis, B., Elworthy, T., Gever, J.R., et al. (1999). In vitro alpha1-adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel alpha1A-adrenoceptor selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 127: 252–258.

Wu, D., Katz, a, Lee, C.H., and Simon, M.I. (1992). Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J. Biol. Chem.* 267: 25798–25802.

Yamamoto, Y., and Koike, K. (2001). Characterization of alpha1-adrenoceptor-mediated contraction in the mouse thoracic aorta. *Eur J Pharmacol* 424: 131–140.

Yoneyama, Y., Suzuki, S., Sawa, R., Yoneyama, K., Power, G.G., and Araki, T. (2002). Increased plasma adenosine concentrations and the severity of preeclampsia. *Obs. Gynecol* 100: 1266–1270.

Young, W.C., Boling, J.L., and Blandau, R. (1941). The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec* 80: 37–45.

Yu, Z.-Y., Tan, J.-C., McMahon, A.C., Iismaa, S.E., Xiao, X.-H., Kesteven, S.H., et al. (2014). RhoA/ROCK Signaling and Pleiotropic  $\alpha_{1A}$ -Adrenergic Receptor Regulation of Cardiac Contractility. *PLoS One* 9: e99024.

Zhong, H., and Minneman, K.P. (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 30: 261–276.

Zhou, C.C., Zhang, Y., Irani, R.A., Mi, T., Popek, E.J., Hicks, M.J., et al. (2008). Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat. Med.* 14: 855–862.

Zhou, L., and Vargas, H.M. (1996). Vascular  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. *Eur. J. Pharmacol.* 305: 173–176.