

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Avaliação do papel do H₂S em modelo experimental de
pré-eclâmpsia**

JOSÉ SÉRGIO POSSOMATO VIEIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Bióciências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, como requisito para
obtenção do título de Doutor em
Farmacologia e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan
Candido Dias Junior

Botucatu-SP
2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Avaliação do papel do H₂S em modelo experimental de
pré-eclâmpsia**

Doutorando: José Sérgio Possomato Vieira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Tese apresentada ao Instituto de Bociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia

Botucatu-SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vieira, José Sérgio Possomato.

Avaliação do papel do H₂S em modelo experimental de pré-eclâmpsia / José Sérgio Possomato Vieira. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior
Capes: 21000000

1. Hipertensão induzida pela gravidez. 2. Sulfeto de hidrogênio. 3. NG-Nitroarginina Metil Éster. 4. Acetato de desoxicorticosterona. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: DOCA; L-NAME; hipertensão gestacional; ratas; sulfeto de hidrogênio.

José Sérgio Possomato Vieira

Avaliação do papel do H₂S em modelo experimental de pré-eclâmpsia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior
Professor Assistente Doutor do Departamento de Farmacologia do Instituto de
Biotecnologia de Botucatu

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior
Departamento de Farmacologia
Instituto de Biotecnologia de Botucatu/UNESP

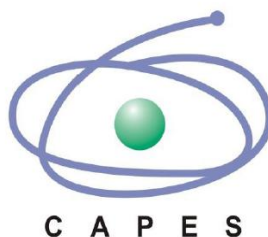
Prof. Dra. Cristina Antoniali Silva
Departamento de Ciências Básicas
Faculdade de Odontologia/UNESP

Prof. Dra. Soraia Katia Pereira Costa
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas/USP

Prof. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Departamento de Imunologia
Instituto de Biotecnologia de Botucatu/UNESP

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Departamento de Farmacologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Financiamento



(Bolsa CAPES- doutorado: Período de vigência 03/2014 – 03/2018)

*(Bolsa CAPES Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE.
Processo: BEX 8193/14-2 - Período de Vigência 03/2015 – 02/2016)*



Proc. 16/18782-3

(Auxílio regular à pesquisa: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior)

Proc. 12/21305-1

(Auxílio regular à pesquisa: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior)

Dedicatória

À Deus

Dono de toda ciência e sabedoria

“Onde você estava quando lancei os alicerces da terra? Responda-me se é que você sabe tanto.”

Jó 38:4

Agradecimentos especiais

Aos meus pais

Obrigado por tudo! Não caberiam nessas linhas o quanto sou grato a vocês. Obrigado por me apoiarem sempre, por cuidarem de mim e por serem o lugar seguro para onde eu posso sempre retornar. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Segundo o dicionário, a palavra mentor significa “1. Guia e conselheiro de outrem | 2. Pessoa que inspira outras.” Obrigado por ser mais do que um orientador, mas grande mentor e amigo. Obrigado por sempre exigir o melhor de mim e acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidei de mim mesmo.

Agradecimientos

À minha família, por todo o apoio.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Farmacologia: Victor, Regina, Gaby, Jomar, João, Thalita, Bila, Gabriel, Tamiris, Frederik, Mariam, Maria Luiza e Jéssica que me aguentaram durante esses quatro anos e se tornaram parte importante do meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas do Departamento de Farmacologia, em especial aos queridos Mayara, André, Rodrigo, Alan, Naiara, Bia, Christiane e Katiussia. É sempre muito bom estar com vocês.

À minha querida amiga Luciana. Lu, estar com você é sempre leve e divertido. Obrigado por ser a pessoa com quem sempre posso contar.

À Gabriela Zochio (Gabys) pela ajuda na discussão dos dados de reatividade, pelos experimentos noturnos malucos e pelos nossos papos sempre tão criativos.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia. Muito obrigado pelos inúmeros momentos de descontração e convivência.

A Profa. Dr. Valéria Cristina Sandrim, por todas as discussões valiosas, sejam elas a respeito de ciência ou não.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, por tanto contribuírem com minha formação científica.

Ao Dr. Hélio Kushima, pela valiosa ajuda em vários experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Cris, Janete, Luís e Paulo, por toda ajuda e prontidão sempre.

Um agradecimento especial ao Dr. Raouf A. Khalil e ao Dr. Marc Q. Mazzuca, por terem impactado fortemente o meu pensar científico.

À banca examinadora, pela prontidão e disponibilidade em contribuir com minha formação acadêmica

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

**“Quem olha para fora sonha,
quem olha para dentro desperta”**
Carl Jung

Prefácio

A tese intitulada: “Avaliação do papel do H₂S em modelo experimental de pré-eclâmpsia” encontra-se dividida em cinco partes.

Inicialmente a tese traz uma breve introdução a respeito das principais alterações vasculares da gestação e das desordens hipertensivas gestacionais. São rapidamente abordados alguns fatores de predisposição que conduzem ao processo de má formação placentária e posterior disfunção endotelial característicos da hipertensão gestacional. Posteriormente a tese descreve os principais efeitos do mediador gasoso sulfeto de hidrogênio (H₂S) no sistema vascular e sua participação na fisiopatologia das desordens hipertensivas gestacionais.

O segundo capítulo apresenta o artigo intitulado “*Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats*” publicado na revista *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* em que descrevemos os efeitos do tratamento com hidrossulfeto de sódio (NaHS), um doador exógeno de H₂S, em um modelo experimental de hipertensão gestacional, induzida pelo inibidor da óxido nítrico (NO) sintase (NOS), N ω -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME).

O capítulo três apresenta o manuscrito “*Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-mediated relaxation, underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of hydrogen sulfide donor in hypertensive pregnancy*”, submetido a publicação para a revista *Nitric Oxide*. Nesse manuscrito, relatamos os aumentos da produção de NO placentário e a ocorrência de relaxamento não dependente de NO na aorta torácica, após o tratamento com NaHS em ratas prenhes hipertensas.

A quarta parte apresenta uma breve discussão dos achados nos dois artigos apresentados previamente e a última parte da tese apresenta algumas considerações finais e conclusões a respeito do objeto de estudo descrito na tese.

Ainda, durante a execução deste curso de doutoramento, outras atividades foram desenvolvidas com o objetivo de enriquecer a formação acadêmica e estas são apresentadas a seguir:

Disciplinas cursadas

Disciplinas	Ano	Período Letivo	Créditos	Carga Horária	Freq	Conceito
Análise de Vesículas Extracelulares Contendo miRNAs e Proteínas	2014	1º semestre	2	30	100	A
Neurotoxicidade por Exposição a Metais Pesados e Pesticidas	2014	1º semestre	4	60	100	A
Tópicos Especiais em Farmacologia: Análise da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial e modulação autonômica vascular	2014	1º semestre	1	15	100	A
Farmacologia do Endotélio Vascular	2014	2º semestre	6	90	100	A
Prática de Ensino de Farmacologia	2014	2º semestre	4	60	85	A
Pré-eclâmpsia: da bancada ao leito	2014	2º semestre	4	60	100	A
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	2014	2º semestre	3	45	80	B
Créditos aproveitados do mestrado			26	390		
Total geral de créditos em disciplinas			50	750		
Total de Créditos em atividades complementares			121	1815		
Total geral de créditos			171	2565		

Artigos publicados

1. Gonçalves-Rizzi VH, **Possomato-Vieira JS**, Nascimento RA, Caldeira-Dias M, Dias-Junior CA. Maternal hypertension and feto-placental growth restriction is reversed by sildenafil: Evidence of independent effects of circulating nitric oxide levels. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jan 17.
2. Zhu ML, Zhao JP, Cui N, Gonçalves-Rizzi VH, **Possomato-Vieira JS**, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Cardiac myeloperoxidase activity is elevated in hypertensive pregnant rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2017 Dec;37(6):904-909.

3. Christou H, Hudalla H, Michael Z, Filatava EJ, Li J, Zhu M, **Possomato-Vieira JS**, Dias-Junior C, Kourembanas S, Khalil RA. Impaired Pulmonary Arterial Vasoconstriction and Nitric Oxide-Mediated Relaxation Underlie Severe Pulmonary Hypertension in the Sugen-Hypoxia Rat Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018 Feb;364(2):258-274.
4. Dias-Junior CA, Chen J, Cui N, Chiang CL, Zhu M, Ren Z, **Possomato-Vieira JS**, Khalil RA. Angiogenic imbalance and diminished matrix metalloproteinase-2 and -9 underlie regional decreases in uteroplacental vascularization and fetoplacental growth in hypertensive pregnancy. *Biochem Pharmacol.* 2017 Dec15;146:101-116.
5. **Possomato-Vieira JS**, Gonçalves-Rizzi VH, Graça TU, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016 Dec;389(12):1325-1332.
6. **Possomato-Vieira JS**, Khalil RA. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv Pharmacol.* 2016;77:361-431.
7. Zhu M, Ren Z, **Possomato-Vieira JS**, Khalil RA. Restoring placental growth factor-soluble fms-like tyrosine kinase-1 balance reverses vascular hyper-reactivity and hypertension in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016 Sep1; 311(3):R505-21.
8. Gonçalves-Rizzi VH, **Possomato-Vieira JS**, Sales Graça TU, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor. *Nitric Oxide.* 2016 Jul ; 57:71-78.
9. Chaguri JL, Godinho AF, Horta DF, Gonçalves-Rizzi VH, **Possomato-Vieira JS**, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016 Mar; 42:63-8.
10. Gonçalves-Rizzi VH, Nascimento RA, **Possomato-Vieira JS**, Dias-Junior CA. Sodium Nitrite Prevents both Reductions in Circulating Nitric Oxide and Hypertension in 7-Day Lead-Treated Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016 Mar;118(3):225-30.
11. Rocha TL, Dias-Junior CA, **Possomato-Vieira JS**, Gonçalves-Rizzi VH, Nogueira FR, de Souza KM, Braz LG, Braz MG. Sevoflurane Induces DNA Damage Whereas Isoflurane Leads to Higher Antioxidative Status in Anesthetized Rats. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:264971.
12. Nascimento RA, Mendes G, **Possomato-Vieira JS**, Gonçalves-Rizzi VH, Kushima H, Delella FK, Dias-Junior CA. Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Jun; 116(6):508-15.

Artigos submetidos para publicação

1. **Possomato-Vieira JS**, Chimini JS, Santos da Silva ML, Dias-Junior CA. Increases in placental nitric oxide, but not a non nitric oxide-mediated relaxation underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of hydrogen sulfide donor in hypertensive pregnancy. Submetido à revista *Nitric Oxide*. Manuscript number: NOX_2017_233.
2. **Possomato-Vieira JS**, Gonçalves-Rizzi VH, Nascimento RA, Wandekin RR, Caldeira-Dias M, Chimini JS, Santos da Silva ML, Dias-Junior CA. Clinical and experimental evidences of hydrogen sulfide involvement in lead-induced hypertension. Submetido à revista *BioMed Res Int*. Manuscript number: 4627391.

Estágio de pesquisa no exterior

1. Brigham and Women's Hospital. Harvard Medical School – Boston, USA. Supervisor: Dr. Raouf A. Khalil. Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE CAPES. Processo: *BEX 8193/14-2*. Período: 03/2015 – 02/2016.

Participação em eventos científicos

1. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics – Ribeirão Preto, Brasil (2017).
2. IV Simpósio em Biologia Vascular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil (2017).
3. Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC (UNESP/Botucatu), 2017.
4. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and 21th Latin American Congress of Pharmacology – Foz do Iguaçu, Brasil (2016).
5. Experimental Biology (2015) – Boston, EUA.
6. V Simpósio de Farmacologia da UNESP - SIMFAR (UNESP/Botucatu), 2015.
7. XIII Workshop da Pós Graduação (UNESP/Botucatu), 2014.

Resumos em eventos científicos

1. Caldeira-Dias, M.; **Possomato-Vieira, J.S.**; Cavalli, R. C. ; Sandrim, V. C. Trans-resveratrol ameliorates nitric oxide production in endothelial cells incubated with plasma from nonresponsive preeclamptic patients. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto.

2. Nascimento, R.A; **Possomato-Vieira, J.S.** ; Gonçalves-Rizzi, VH ; Dias-Junior, C.A. Doxycycline reduces blood pressure and reestablishes the antioxidant capacity without changes in feto-placental restriction in hypertensive pregnant rats. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto.
3. **Possomato-Vieira, J.S.**; Chimini, J. S.; Santos-Silva, ML ; Gonçalves-Rizzi, VH ; Dias-Junior, C.A. . Hydrogen sulfide (H₂S) attenuates hypertension in pregnancy and blunts fetal growth restriction through an increase in placental efficiency in hypertensive pregnant rats. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto.
4. Santos-Silva, M.L.; **Possomato-Vieira, J.S.**; CHIMINI, J. S.; Dias-Junior, C.A. . Hydrogen Sulfide (H₂S) Donor Presents Antihypertensive and Antioxidant Effects and Attenuates Fetal Growth Restriction in Hypertensive Pregnant Rats. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto.
5. **Possomato-Vieira, J.S.**; Gonçalves-Rizzi, V. H.; Nascimento, R.A ; Silva, K.P ; Caldeira-Dias, M. ; Sandrim, V. C. ; Dias-Junior, C.A. . Hydrogen Sulfide (H₂S) Donor Reduces Systolic Blood Pressure and Stimulates Nitric Oxide Production in rats with L-NAME-Induced Hypertension in Pregnancy. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2016, Foz do Iguaçu.
6. Silva, K.P; Caldeira-Dias, M.; **Possomato-Vieira, J.S.** ; Gonçalves-Rizzi, V. H.; Sandrim, V. C.; Dias-Junior, C.A. ; Pupo, A.S . Preeclampsia prevents plasticity in alpha1-adrenoceptors from rat abdominal aortae: Contribution to the pathophysiology. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and 21th Latin American Congress of Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu.
7. Gonçalves-Rizzi, V. H; **Possomato-Vieira, J. S.**; Nascimento, R.A; Silva, K. P; Caldeira-Dias, M.; Sandrim, V. C. ; Dias-Junior, C.A. . Placental-fetal interface is affected positively by sodium nitrite and sildenafil and concomitantly shows reductions in hypertension-in-pregnancy. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and 21th Latin American Congress of Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu.
8. H Christou; H. J. Hudalla; Z. Michael; X Liang; J Li; M Zhu; **Possomato-Vieira, J.S.**; C Dias-Junior; RA Khalil . Impaired pulmonary vasoconstriction and NO-mediated relaxation pathways in the Sugen-hypoxia model of severe pulmonary hypertension. 9th International Conference on Neonatal and Childhood Pulmonary Vascular Disease, 2016, San Francisco.
9. Mazzuca, M. Q.; Ren, Z.; Lin, C.; **Possomato-Vieira, J.S.**; Zhu, M. ; Khalil, R.A. . Placental Growth Factor (PlGF) Reduces Blood Pressure and Improves Endothelin Type B Receptor (ETBR)-Mediated Microvascular Dilation in Hypertensive Pregnant Rats. American Heart Association's Council on Hypertension, 2015, Nova Iorque. Hypertension, 2015. v. 66.
10. **Possomato-Vieira, J. S.**; Gonçalves-Rizzi, V. H; Silva, K.P ; Nascimento, R. A; Mendes, G ; Pupo, A.S ; Dias-Junior, CA. . Hydrogen Sulfide (H₂S) Donor Attenuates

Systolic Blood Pressure and Enhances Placentas Weights in Preeclampsia. *Experimental Biology*, 2015, Boston. *The FASEB Journal*, 2015. v. 29.

11. Gonçalves-Rizzi, V. H.; **Possomato-Vieira, J. S.**; Mendes, G; Nascimento, R.A; Silva, K. P; Pupo, A. S.; Dias-Junior, C. A. . Sodium Nitrite Reduces Systolic Blood Pressure in Preeclampsia. *Experimental Biology*, 2015, Boston. *The FASEB Journal*. v. 29. p. 4-4.

Comunicação oral em evento científico

1. Hydrogen sulfide (H₂S) attenuates hypertension in pregnancy and blunts fetal growth restriction through an increase in placental efficiency in hypertensive pregnant rats. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto

Aulas/palestra/cursos ministrados

Aulas na pós-graduação

1. Princípios da Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo. Especialização em Assistência Farmacêutica: do diagnóstico ao tratamento, Universidade do Sagrado Coração, Bauru (2014).

Aulas na graduação

1. Estágio docência na disciplina de Fundamento da Farmacologia. Curso: Física Médica. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. 1º semestre/2016. Supervisão: Prof. Dr. Érick José Ramo da Silva.
2. Estágio docência na disciplina de Farmacologia Endócrina. Curso: Biomedicina. Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. 2º semestre/2016. Supervisão: Prof. Dr. Érick José Ramo da Silva.

Palestras

1. Fitoterápicos: um desafio científico. IX Jornada Farmacêutica da Universidade do Sagrado Coração. Universidade do Sagrado Coração, Bauru (2014).
2. Somos o que comemos? A problemática da obesidade do ponto de vista farmacológico. X Jornada Farmacêutica da Universidade do Sagrado Coração. Universidade do Sagrado Coração, Bauru (2016).
3. A problemática da obesidade do ponto de vista fisiológico. Semana Acadêmica, Cultural e Científica - Curso Biomedicina da Faculdade Sudoeste Paulista. Faculdade Sudoeste Paulista, Itapetininga (2017).

4. Existe vida após a graduação? Perspectivas na área acadêmica e em pesquisa. Semana Acadêmica, Cultural e Científica - Curso Biomedicina da Faculdade Sudoeste Paulista. Faculdade Sudoeste Paulista, Itapetininga (2017).

Lista de abreviaturas e siglas

3-MST – 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase

$[Ca^{2+}]_i$ – concentração de cálcio intracelular

AA – ácido araquidônico

ACh – acetilcolina

ADAM-10 – metaloproteinase 10

ADMA – dimetil arginina assimétrica

Ang II – angiotensina II

AT₁-AA – anticorpo agonista do receptor do tipo I da angiotensina II

AT₁R – receptor do tipo 1 de angiotensina II

cAMP – adenosina monofosfato cíclica

CBS – cistationina-β-sintase

cGMP – guanosina monofosfato cíclica

CO – monóxido de carbono

COX – ciclooxigenase

CSE – cistationina-γ-líase

CYP450 – citocromo 450

dNK – *natural killer* decidual

DOCA – acetato de desoxicorticosterona

EDCF – fator de contração derivado do endotélio

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF – fator de relaxamento derivado do endotélio

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EET – ácido epoxieicosatrienóico

ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ET-1 – endotelina-1

ET_A-AA - anticorpo agonista do receptor do tipo A de endotelina

ET_AR – receptor do tipo A de endotelina

ET_BR – receptor do tipo B de endotelina

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂S – sulfeto de hidrogênio

HIF – fator induzido pela hipóxia

HTN-Preg – hipertensão gestacional

HUVEC – célula endotelial da veia umbilical humana

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IP – receptor de prostaciclina

IUGR – restrição do crescimento intra-uterino

L-NAME - N ω -nitro-L-arginina-metil éster

L-NMMA - N ω -monometil-L-arginina

MDA – malondialdeído

MHC – complexo de histocompatibilidade

miRNA – micro RNA

MPO – mieloperoxidase

NaHS – hidrossulfeto de sódio

NK – *natural killer*

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

Norm-Preg – prenhez normal

NOS – óxido nítrico sintase

O₂•⁻ - ânion superóxido

OH• - íon hidroxila

PAG – DL-propargilglicina

PDE – fosfodiesterase

PE – pré-eclâmpsia

PGI₂ – prostaciclina

PHE – fenilefrina

PKC – proteína quinase C

PIGF – fator de crescimento placentário

ROCK – Rho-quinase

ROS – espécie reativa de oxigênio

RUPP – redução da pressão de perfusão uterina

SBP – pressão arterial sistólica

SDS – duodecil sulfato de sódio

sEng – endoglina solúvel

sFlt-1 – fms-like tirosina quinase-1 solúvel

siRNA – RNA de silenciamento

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

SR – retículo sarcoplasmático

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEAC – capacidade antioxidante equivalente do Trolox

TGF-β – fator de transformação do crescimento

TMB – tetrametilbenzidina

TNF-α – fator de necrose tumoral

TP – receptor de tromboxano

TXA₂ – tromboxano A₂

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – receptor de fator de crescimento do endotélio vascular

Lista de figuras

Figura 1. Fatores de predisposição, fatores bioativos intermediários e disfunção endotelial em pré-eclâmpsia. **43**

Figura 2. Fatores bioativos circulantes causam disfunção endotelial e hipertensão gestacional. **45**

Figura 3. Efeitos mediados pelo H₂S em vasos e em placenta na hipertensão gestacional e PE. **53**

Sumário

Sumário

Resumo	31
Abstract	34
1 Introdução	37
1.1 ADAPTAÇÕES VASCULARES DA GESTAÇÃO	37
1.2 O PAPEL CHAVE DA PLACENTA NA FISIOPATOLOGIA DA PE	40
1.3 A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA HIPERTENSÃO GESTACIONAL	43
1.4 EFEITOS VASCULARES DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H ₂ S)	47
1.5 O SULFETO DE HIDROGÊNIO (H ₂ S) NA PE E HIPERTENSÃO GESTACIONAL	50
2 Capítulo I: “Sodium Hydrosulfide Prevents Hypertension And Increases in Vascular Endothelial Growth Factor and Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 in Hypertensive Pregnant Rats”	56
3 Capítulo II: “Increases in Placental Nitric Oxide, but not Nitric Oxide-Mediated Relaxation, Underlie the Improvement in Placental Efficiency and Antihypertensive Effects of Hydrogen Sulfide Donor in Hypertensive Pregnancy”	65
4 Discussão	99
5 Conclusões e Considerações Finais	111
Referências	114

Resumo

Resumo

Durante a gestação, diversas adaptações fisiológicas ocorrem para suportar o feto em desenvolvimento. Em algumas mulheres, falhas nesses mecanismos podem causar desordens hipertensivas da gestação. A pré-eclâmpsia (PE) é uma desordem hipertensiva da gestação caracterizada por um *de novo* aumento na pressão arterial (> 140x90 mmHg), após a 20ª semana gestacional. É normalmente acompanhada de proteinúria e acomete 5-7% das gestantes. Atualmente é amplamente aceito que a fisiopatologia da PE envolve dois diferentes estágios: o primeiro, relacionado à má placentação e consequente isquemia/hipóxia placentária e liberação de fatores bioativos, e o segundo, relacionado à promoção de danos às células endoteliais. A disfunção endotelial é caracterizada por um aumento na liberação de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina, e concomitante redução na liberação de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO). Recentes estudos apontam para a importância do sulfeto de hidrogênio (H₂S), uma molécula que apresenta diversas semelhanças com o NO, como a natureza gasosa e a produção por enzimas de localização endotelial. No sistema cardiovascular, o H₂S exerce várias funções, como modulação da angiogênese e efeitos vasodilatadores, entretanto, poucos trabalhos avaliaram seu papel na hipertensão gestacional. Para a realização dos trabalhos, ratas Wistar prenhes foram utilizadas. Inicialmente a hipertensão gestacional foi induzida com o uso do inibidor da NO sintase (NOS), N ω -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), e as ratas prenhes hipertensas foram tratadas com hidrossulfeto de sódio (NaHS), um doador exógeno de H₂S. Nós mostramos que o NaHS exerce efeito anti-hipertensivo e melhora os parâmetros materno-fetais. O tratamento com NaHS ainda previne o aumento nos níveis de fms-like tirosina quinase-1 solúvel (sFlt-1) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que em excesso pode trazer danos à gestação. Esses efeitos benéficos parecem não ter relação com diminuições do estresse oxidativo, todavia, de forma interessante, nós mostramos que os níveis plasmáticos de NO aumentam em ratas prenhes hipertensas, após o tratamento com NaHS. Como o H₂S parece interagir com a via do NO e nosso modelo inicial induz a hipertensão por meio da inibição da formação de NO, utilizamos um diferente modelo experimental para melhor esclarecer nossos achados. Nesse segundo modelo experimental, a hipertensão gestacional foi induzida pela injeção de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e consumo de solução salina 0,9%. O tratamento com NaHS também reduziu a pressão arterial em ratas prenhes hipertensas nesse modelo e melhorou o peso dos filhotes, o que foi seguido por um restabelecimento da eficiência placentária. Um aumento nos níveis de NO

placentário parece contribuir para os efeitos do NaHS e pode parcialmente contribuir para o restabelecimento da eficiência placentária. Nós observamos um aumento do estresse oxidativo nas placentas de ratas prenhes hipertensas tratadas com NaHS e sugerimos que ele pode estar relacionado à aumentada atividade metabólica desse tecido. Não foram observadas diferenças nos níveis circulantes do fator sFlt-1 e o tratamento com NaHS diminuiu os níveis do fator de crescimento placentário (PlGF) e isso parece relacionar-se com a atividade pró-angiogênica do NaHS que pode inibir o característico aumento nos níveis de PlGF durante a gestação. Além disso, o tratamento com NaHS reverte a hiperreatividade à fenilefrina (PHE), observada em ratas prenhes hipertensas, e promove um relaxamento não mediado por NO na aorta torácica. Nossos achados sugerem que o NaHS parece atuar na região uteroplacentária, melhorando o suprimento nutricional para os filhotes. Isso pode decorrer da modulação na produção de fatores angiogênicos. Além do mais, os efeitos do NaHS podem estar relacionados ao aumento da biodisponibilidade do NO, o que parece não estar ligado à diminuição do estresse oxidativo, e podem ser dependentes de vias alternativas de formação de NO ou ativação da NOS. Por fim, ações diretas sobre a vasculatura também parecem contribuir para os efeitos benéficos observados com o tratamento com NaHS.

Palavras-chave: hipertensão gestacional, sulfeto de hidrogênio, L-NAME, DOCA, ratas

Abstract

Abstract

Throughout gestation, several physiological adaptations occur to support the growing fetus. In some women, fails in these mechanisms may cause gestational hypertensive disorders. Preeclampsia (PE) is a gestational hypertensive disorder characterized by a *de novo* increase in arterial blood pressure (> 140x90 mmHg) after the 20th gestational week. It is normally accompanied by proteinuria and affects 5-7% of pregnant women. It is currently accepted that the physiopathology of PE involves two different stages: the first one is related to a bad placentation process, consequent placental ischemia/hypoxia and release of bioactive factors; and the second stage is related to the occurrence of endothelial cell damage. Endothelial dysfunction is characterized by an increased release of vasoconstrictors substances, such as endothelin, and a concurrent reduction in the release of vasodilators substances, such as nitric oxide (NO). Recent studies point to the importance of hydrogen sulfide (H₂S), a molecule that shows several similarities with NO, such as its gaseous nature and the enzymatic production in endothelium. In cardiovascular system, H₂S exerts numerous functions, such as angiogenesis modulation and vasodilators effects, however only a few studies evaluated H₂S role in gestational hypertension. For the accomplishment of the works, pregnant Wistar rats were used. Initially, gestational hypertension was induced with the use of NO synthase (NOS) inhibitor, N ω -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) and hypertensive pregnant rats were treated with sodium hydrosulfide (NaHS), an exogenous donor of H₂S. We showed that NaHS exerts antihypertensive effects and improves feto-maternal parameters. NaHS treatment also blunted the increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and in vascular endothelial growth factor (VEGF), which in excess may lead to gestational damage. These beneficial effects seems to be unrelated to decreases in oxidative stress, however, we showed that NO plasmatic levels are increased in hypertensive pregnant rats treated with NaHS. Since H₂S seems to interact with NO-pathway, and our first experimental model induces hypertension through the inhibition of NO formation, we used a different experimental model to better clarify our findings. In this second experimental model, hypertension was induced by injection of desoxycorticosterone acetate (DOCA) and 0.9% saline solution consumption. Treatment with NaHS also reduced arterial blood pressure in hypertensive pregnant rats in this experimental model and improved fetal weight, which was followed by a reestablishment in placental efficiency. We observed an increase in placental oxidative stress in hypertensive pregnant rats treated with NaHS and we suggest that this increase may be related with an increased metabolic activity in this tissue. We did not observe differences in circulating levels

of sFlt-1 and, treatment with NaHS decreased placental growth factor (PlGF) levels, which seems to be related to the pro-angiogenic activity of NaHS that may inhibit the characteristic increases in PlGF levels during pregnancy. Also, treatment with NaHS reverts the hyperreactivity to phenylephrine (PHE) observed in hypertensive pregnant rats and exerts a non NO-mediated relaxation in thoracic aorta. Our findings suggest that NaHS seems to act in uteroplacental region, improving nutritional supply to the fetus and this may be related to the modulation of angiogenic factors. Moreover, the effects of NaHS may correlate to increases in the bioavailability of NO, which seems to not be linked with reductions in oxidative stress; and may depend on alternative pathways to NO formation or NOS activation. Finally, direct actions in vasculature may also contribute to the beneficial effects observed with NaHS treatment.

Keywords: gestational hypertension, hydrogen sulfide, L-NAME, DOCA, rats

1 Introdução

1.1 Adaptações vasculares da gestação

A gestação é um período que impõe ao organismo materno diversas adaptações para suportar o feto em crescimento. De forma significativa, a gestação promove profundas transformações na fisiologia da vasculatura uterina e em menor grau na vasculatura sistêmica (Boeldt and Bird 2017). As primeiras adaptações na vasculatura iniciam-se logo após a implantação do embrião no útero, processo que dá início à invasão trofoblástica e marca os primeiros estágios da placentação (Huppertz and Peeters 2005).

Nos estágios iniciais da gestação (6-8 semanas), começa a aumentar o volume de sangue materno que alcança valores 50% maiores do que em estágios não gravídicos. Durante esse período inicial, o débito cardíaco aumenta em 30-50% (Clark, Cotton et al. 1989). Com o aumento do volume sanguíneo e do débito cardíaco, se esperaria o aumento da pressão arterial, entretanto, essas alterações ocorrem concomitantemente a uma drástica redução da resistência vascular periférica, promovendo a manutenção da pressão arterial normal, durante a gestação (Ouzounian and Elkayam 2012).

Apesar de uma diminuição na resistência vascular periférica sistêmica participar da manutenção da pressão arterial, estima-se que, durante a gestação, as alterações dramáticas na resistência vascular ocorram na circulação uterina, uma vez que um aumento de fluxo de 30-50 vezes é observado em comparação com condições não gravídicas (Sladek, Magness et al. 1997, Bird, Zhang et al. 2003).

A diminuição na resistência vascular é primariamente atribuída a um aumento do remodelamento das artérias espiraladas, entretanto, essa redução da resistência vascular também depende de outros mecanismos de remodelamento da circulação uterina, como um aumento expressivo da angiogênese e um prolongado estado de vasodilatação (Williams, Vallance et al. 1997).

Além disso, embora muitos trabalhos tenham como foco o estudo das adaptações vasculares em vasos de resistência, deve-se considerar que um aumento de fluxo de 30-50 vezes apenas se mantém nos vasos de pequeno calibre porque os vasos de condutância também sofrem um considerável aumento de diâmetro e alterações do tônus vascular devido a uma elevada capacidade de relaxamento (Boeldt and Bird 2017).

Durante o início do segundo trimestre de gestação (18^a-20^a semanas), ocorre uma migração de citotrofoblastos em direção às artérias espiraladas. Em uma gestação saudável, os

citotrofoblastos inicialmente expressam integrinas características de células epiteliais e enquanto os citotrofoblastos invadem o miométrio materno, estes assumem um fenótipo endotelial em um processo conhecido como pseudovasculogênese (McMaster, Zhou et al. 2004).

Essa migração/diferenciação dos citotrofoblastos deve-se a alterações nos perfis de expressão de certas citocinas, moléculas de adesão, constituintes da matriz extracelular, metaloproteinases e o antígeno de histocompatibilidade (Damsky, Fitzgerald et al. 1992, Fisher and Damsky 1993, Damsky, Librach et al. 1994, Trowsdale and Moffett 2008, Wallace, Goulwara et al. 2014, Yu, Wang et al. 2015).

Mediadores do tônus vascular também exercem um papel importante nas adaptações ocorridas durante a gestação. Desde que os estudos iniciais de Furchgott e Zawadzki mostraram o papel do endotélio no relaxamento vascular (Furchgott and Zawadzki 1980) e com a posterior demonstração de que o óxido nítrico (NO) é responsável por grande parte do relaxamento vascular mediado pelas células endoteliais (Furchgott and Jothianandan 1991, Furchgott 1996), diversos estudos destacaram o papel desse mediador gasoso na participação de diversos processos fisiológicos, inclusive nas adaptações vasculares da gestação (Williams, Vallance et al. 1997, Nelson, Steinsland et al. 2000, Dotsch, Hogen et al. 2001).

O NO é um gás produzido enzimaticamente no endotélio, majoritariamente pela isoforma endotelial da NO sintase (eNOS). A eNOS, ao ser ativada, converte o aminoácido L-arginina em NO e citrulina. Após essa conversão, o NO produzido difunde-se para o músculo liso e promove o aumento intracelular do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), causando a vasodilatação (Shaamash, Elsnosy et al. 2000, Gheibi, Jeddí et al. 2018).

Estudos mostraram que a infusão do vasoconstritor noradrenalina produziu uma menor resposta contrátil sobre o fluxo sanguíneo das mãos de mulheres grávidas comparado a mulheres não-gestantes (Williams, Vallance et al. 1997). Esses estudos também mostraram que a redução do fluxo sanguíneo das mãos de gestantes, após a aplicação do inibidor da eNOS, N ω -monometil-L-arginina (L-NMMA), era maior do que em não-gestantes (Williams, Vallance et al. 1997). Isso sugere a elevação dos níveis de NO em vasos periféricos, durante a gestação saudável.

Também se observou um aumento dos níveis de nitrito, um metabólito estável do NO, em soro de gestantes saudáveis, comparado com mulheres não-gestantes (Shaamash, Elsnosy et al. 2000), além de um aumento da expressão e atividade da óxido nítrico sintase (NOS) em

artérias uterinas (Nelson, Steinsland et al. 2000) e na placenta (Dotsch, Hogen et al. 2001) com a progressão da gestação (Nelson, Steinsland et al. 2000, Dotsch, Hogen et al. 2001).

Além do mais, estudos em animais, também suportam a hipótese da participação do NO nas adaptações vasculares da gestação, demonstrando que a pressão arterial se eleva ao longo da gestação em camundongos prenhes *knockout* para eNOS (Hefler, Reyes et al. 2001). A expressão gênica da eNOS, da NOS induzível (iNOS) e da NOS neuronal (nNOS) e a expressão protéica da eNOS fosforilada estão aumentadas nos rins de ratas prenhes comparado à ratas virgens, bem como os níveis urinários de nitrito (Alexander, Miller et al. 1999). Portanto, esses mecanismos evidenciam a importância do NO nas adaptações vasculares da gestação.

Outros estudos sugerem também que as células endoteliais modulam a resposta vascular a importantes agentes vasoconstritores. Um desses agentes é a endotelina-1 (ET-1), que é considerada potente vasoconstritor e antagonista parácrino clássico do NO (Dotsch, Hogen et al. 2001). De maneira interessante, a expressão de mRNA para o gene *ET-1* eleva-se ao longo da gestação e como a atuação do NO também encontra-se exacerbada, parece haver um aumento da liberação de ET-1 para contrabalancear o excesso de sinalização do NO, mantendo o tônus vascular (Dotsch, Hogen et al. 2001).

Outros estudos mostram que, em baixas concentrações (10^{-12} – 10^{-9} M), a ET-1 induziu o relaxamento de vasos placentários (Sabry, Mondon et al. 1995). Esse relaxamento pode ocorrer pela ativação de receptores do tipo B de endotelina (ET_BR), presentes no endotélio. Esses receptores produzem o relaxamento vascular durante a gestação normal (Mazzuca, Li et al. 2014), e o relaxamento induzido por essas baixas doses de ET-1 foram abolidos após a remoção do endotélio (Sabry, Mondon et al. 1995).

Entretanto, em algumas mulheres podem ocorrer falhas nos mecanismos de adaptações vasculares durante a gestação e 5-7% das gestantes ao redor do mundo podem desenvolver um quadro clínico conhecido como pré-eclâmpsia (PE). A PE é uma desordem específica da gestação humana, caracterizada pelo aumento da pressão arterial (>140x90 mmHg) após a 20ª semana de gestação. Normalmente, ela está acompanhada de proteinúria ou edema periférico, cefaléia, distúrbios visuais ou alterações em testes laboratoriais, especificamente, baixa contagem de plaquetas e valores anormais das enzimas hepáticas (ACOG 2013).

Além disso, algumas mulheres apresentam um *de novo* aumento na pressão arterial, sem a presença de proteinúria ou outros sintomas e essas são classificadas como portadoras de hipertensão gestacional (ACOG 2013). Entretanto, apesar de representar uma das maiores

causas de mortalidade e morbidade tanto para mães, como para os bebês, a fisiopatologia da PE não está totalmente elucidada e a terapêutica disponível é extremamente limitada, contando com poucos fármacos disponíveis para aplicação clínica (Berzan, Doyle et al. 2014).

1.2 O papel chave da placenta na fisiopatologia da PE

Atualmente, é amplamente aceito que a fisiopatologia da PE envolve dois diferentes estágios (Roberts 1998): o primeiro, relacionado à placentação deficiente, acarretando isquemia/hipóxia placentária; e o segundo estágio, relacionado à disfunção endotelial generalizada, promovida por fatores ativos liberados pela placenta em decorrência da isquemia/hipóxia placentária.

Na PE, uma série de fatores, que podem ser genéticos, demográficos ou relacionados ao estilo de vida materno (Ali and Khalil 2015) conduzem a uma redução da invasão das artérias espiraladas (Lyall, Robson et al. 2013, Cotechini, Komisarenko et al. 2014, Labarrere, DiCarlo et al. 2017). Isso impede uma resposta adequada à demanda de aumento do fluxo sanguíneo, resultando em uma diminuição da perfusão da região uterina e, conseqüentemente, isquemia/hipóxia placentária.

Portanto, a remissão dos sintomas da PE, após o parto, indica que a placenta pode ser responsável pelos eventos iniciais da PE, relacionando o seu desenvolvimento anormal à redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) e conseqüente isquemia/hipóxia, como importantes eventos iniciais do desencadeamento da PE (Alexander, Kassab et al. 2001, Gilbert, Babcock et al. 2007, Intapad, Warrington et al. 2014, Rodriguez, Couve-Perez et al. 2017, Stampalija, Monasta et al. 2017).

A placenta é uma interface materno-fetal que começa a se desenvolver nos períodos iniciais da gestação. Estudos clínicos e observacionais sugerem que diversos fatores de risco podem estar relacionados à ocorrência de uma falha do processo de placentação e conseqüente desenvolvimento de desordens hipertensivas da gestação (Ali and Khalil 2015).

Fatores genéticos parecem ter grande influência no desenvolvimento da PE e estudos mostram que mulheres com PE possuem 31 de 36 genes com expressão placentária reduzida (Founds, Conley et al. 2009). Os genes *ACVR2A* no cromossomo 2q22 e o gene *STOX1* no cromossomo 10q22 foram dois dos primeiros genes identificados na susceptibilidade à PE e ambos envolvem a ocorrência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs).

O polimorfismo *STOX1* Y153H é comumente observado em famílias nas quais diversas mulheres exibem um histórico de PE e parece se relacionar à disfunção da invasão trofoblástica e restrição do crescimento intrauterino (IUGR) (van Dijk and Oudejans 2013). Além disso, camundongos fêmeas selvagens acasaladas com camundongos machos transgênicos superexpressando o gene *STOX1* humano mostram características de PE, como hipertensão arterial e proteinúria (Doridot, Passet et al. 2013).

Fatores demográficos e ambientais também podem servir como fator de risco ao surgimento das desordens hipertensivas da gestação. A taxa de ocorrência de PE parece ser maior em mulheres afro-americanas (5,2%) em comparação com mulheres asiáticas (3,5%) (Rosenberg, Garbers et al. 2005). A idade pode ser outro fator de risco importante, pois mulheres em idade avançada apresentam maior risco de desenvolver PE do que mulheres jovens (Lamminpaa, Vehvilainen-Julkunen et al. 2012, Kanagal, Rajesh et al. 2014).

O processo de invasão trofoblástica e remodelamento das artérias espiraladas, durante a gestação, depende fortemente do sistema imune materno (Lala and Chakraborty 2003, Wells 2007). A decídua, que forma a porção materna da placenta, contém um grande número de células imunes que trabalham para garantir que a invasão trofoblástica ocorra de forma apropriada, por meio da secreção de citocinas e de fatores angiogênicos (King 2000, Trundley and Moffett 2004, Williams, Bulmer et al. 2009, Williams, Searle et al. 2009).

Portanto, qualquer alteração nessas respostas imunes locais pode levar a alterações no processo de formação placentária e potencialmente contribuir para o desenvolvimento das desordens hipertensivas da gestação (Veenstra van Nieuwenhoven, Heineman et al. 2003, Redman and Sargent 2010).

Estudos sugerem que a PE é marcada pela expressão anormal de citocinas, alterações da funcionalidade de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), modificações do funcionamento de células *natural killer* (NK) e aumento de resposta imune, causando a apoptose de células trofoblásticas. Além disso, outros fatores, como a expressão anormal de integrinas (McMaster, Zhou et al. 2004, Roberts and Escudero 2012, van Dijk and Oudejans 2013), podem contribuir para o processo de diminuída invasão trofoblástica, remodelamento deficiente das artérias espiraladas e consequente má formação placentária (McMaster, Zhou et al. 2004, Roberts and Escudero 2012, van Dijk and Oudejans 2013).

Na PE, as respostas inflamatórias encontram-se elevadas e, de forma bastante interessante, a incidência de desordens hipertensivas da gestação parece ser menor em condições de supressão da atividade imunológica, como em pacientes portadoras do vírus do

HIV (Hall, Gebhardt et al. 2014). Na gestação normal, as células trofoblásticas expressam moléculas do MHC de classe I que interagem com receptores inibitórios presentes em células NK, os quais impedem que essas células ataquem o tecido fetal e placentário (Trowsdale and Moffett 2008). Entretanto, estudos mostram que na PE essas interações podem estar diminuídas, como as interações HLA-C/KIR, promovendo danos no tecido placentário e consequente isquemia/hipóxia tecidual (Hiby, Walker et al. 2004).

Existe ainda uma grande participação de células NK decíduais (dNK) no processo de desenvolvimento placentário. As células dNK são estimuladas pela interleucina (IL)-15 a liberar interferon- γ , importante agente no processo de remodelamento das artérias espiraladas (Sones, Lob et al. 2014). Contudo estudos demonstram que a expressão gênica e protéica de IL-15 encontra-se diminuída na placenta de mulheres com PE e isso pode estar associado ao surgimento de desordens hipertensivas da gestação (Agarwal, Loganath et al. 2001).

Um excesso de ativação do sistema complemento também parece estar relacionado ao surgimento das desordens hipertensivas da gestação e trabalhos mostram que os níveis dos produtos de ativação do sistema complemento Bb, C3a e C5a elevam-se em mulheres com PE (Lillegard, Johnson et al. 2013) e em modelos experimentais, em que a hipertensão gestacional foi induzida por RUPP, a inibição da ativação do sistema complemento causa uma diminuição da pressão arterial independentemente de alterações nos níveis de moléculas angiogênicas (Lillegard, Johnson et al. 2013).

Também faz parte das alterações presentes em gestantes com PE uma maior infiltração de neutrófilos no endotélio de vasos de resistência da gordura subcutânea (Leik and Walsh 2004). De forma interessante, com a depleção de neutrófilos em ratas RUPP, houve a diminuição da pressão arterial, indicando o papel da imunidade inata na fisiopatologia da hipertensão gestacional (Regal, Lillegard et al. 2015).

Conforme previamente descrito, em um primeiro estágio, fatores de predisposição podem levar ao processo de placentação deficiente e consequente isquemia/hipóxia da placenta que passa a liberar diversos fatores bioativos que atuam sobre a célula endotelial, promovendo o surgimento de disfunção endotelial generalizada na PE (Fig. 1).

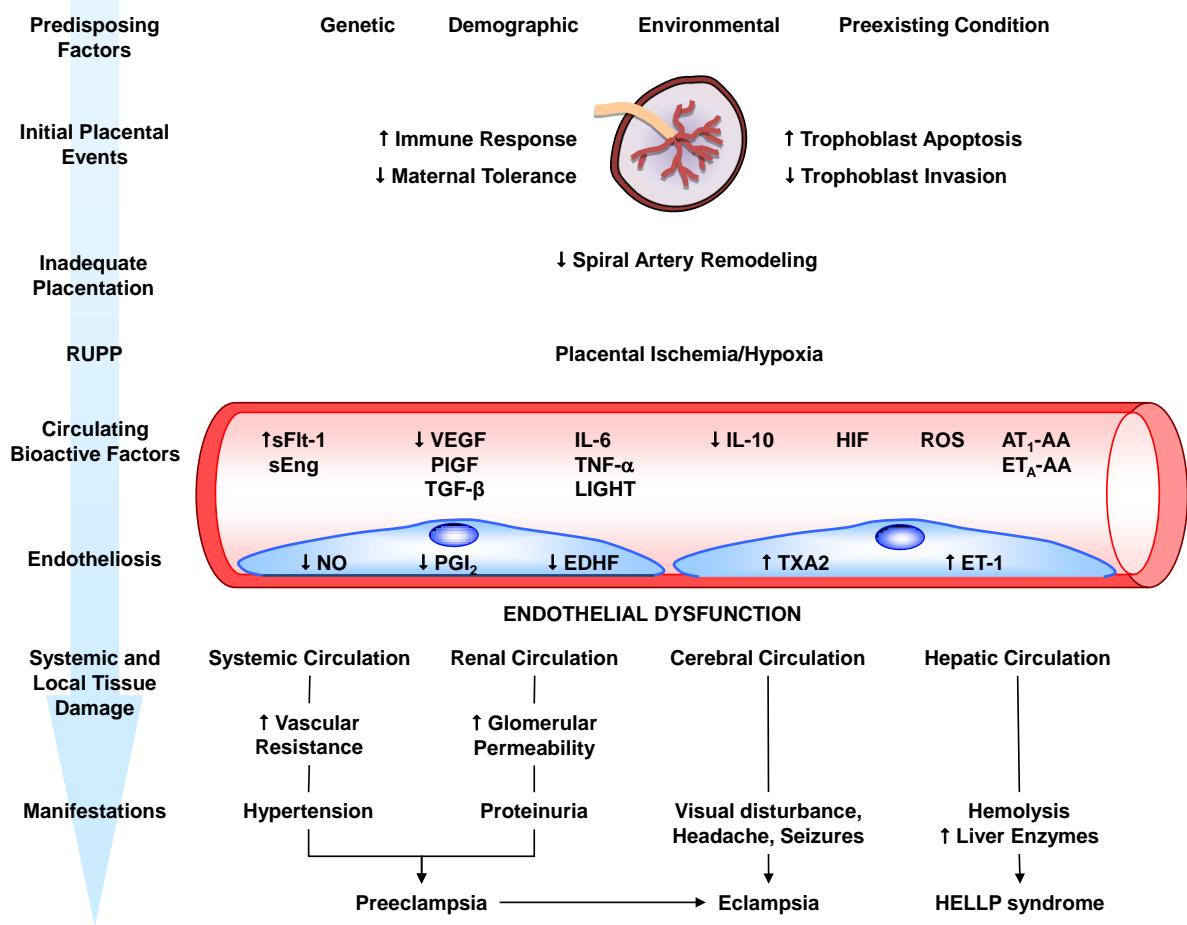


Figura 1. Fatores de predisposição, fatores bioativos intermediários e disfunção endotelial em pré-eclâmpsia. Fatores genéticos, demográficos, ambientais e outros fatores de risco causam um aumento da resposta imunológica, apoptose de células trofoblásticas e diminuição da invasão trofoblástica, gerando um processo de placentação anormal e diminuição do remodelamento das artérias espiraladas e consequente redução da pressão de perfusão uterina (RUPP). A isquemia/hipóxia placentária promove a liberação de diversos fatores bioativos circulantes que atingem o endotélio e promovem disfunção endotelial sistêmica suscitando vasoconstrição generalizada, aumento da resistência vascular periférica e hipertensão; também promovem a disfunção endotelial na circulação cerebral, causando distúrbios visuais, dores de cabeça, convulsões e posterior eclâmpsia; e na circulação hepática causando hemólise, aumento nos níveis das enzimas hepáticas e queda da contagem de plaquetas (Síndrome HELLP). AT₁-AA, anticorpo agonista do receptor do tipo I da angiotensina II; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ET-1, endotelina-1; ET_A-AA, anticorpo agonista do receptor do tipo A de endotelina; HIF, fator induzido pela hipóxia; IL, interleucina; NO, óxido nítrico; PGI₂, prostaciclina; PIGF, fator de crescimento placentário; ROS, espécies reativas de oxigênio; sEng, endoglina solúvel; sFlt-1, fms-like tirosina-quinase-1 solúvel; TGF-β, fator de transformação do crescimento; TNF-α, fator de necrose tumoral α; TXA₂, tromboxano A₂; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular. *Possomato-Vieira and Khalil. Advances in Pharmacology, 2016.*

1.3 A disfunção endotelial na hipertensão gestacional

A hipótese proposta inicialmente por Roberts em 1998 declara que a PE desenvolve-se em dois diferentes estágios: o primeiro é o processo de má formação placentária e consequente isquemia/hipóxia tecidual e o segundo é o dano às células endoteliais, promovido pelos fatores bioativos liberados pela placenta (Shah and Khalil 2015), sendo que a hipótese

da ação de fatores bioativos circulantes sobre as células endoteliais pôde ser confirmada por meio da incubação de plasma/soro de mulheres com PE em células endoteliais. Após a realização desse procedimento, verificaram-se alterações por meio de análise de expressão gênica e diversos outros tipos de ensaios funcionais (Donker, Asgeirsdottir et al. 2005, Mackenzie, Sandrim et al. 2012, Wang, Ahmad et al. 2013, Luizon, Caldeira-Dias et al. 2016, Sandrim, Dias et al. 2016, Virtanen, Toimela et al. 2016, Rocha-Penha, Caldeira-Dias et al. 2017).

Posteriormente, inúmeros trabalhos passaram a identificar diferentes fatores ativos que podem contribuir para o dano endotelial durante a hipertensão gestacional, como a endoglina solúvel (sEng) (Venkatesha, Toporsian et al. 2006, Maynard, Epstein et al. 2008, Jardim, Rios et al. 2015), fator de necrose tumoral (TNF- α) (Alexander, Cockrell et al. 2002, Cindrova-Davies, Sanders et al. 2011, Sanchez-Aranguren, Prada et al. 2014), fator induzido pela hipóxia (HIF) (Tal 2012, Akhilesh, Mahalingam et al. 2013), anticorpo agonista do receptor do tipo I da angiotensina II (AT₁-AA) (Bai, Wang et al. 2013, Siddiqui, Irani et al. 2013, Yang, Li et al. 2015) e anticorpo agonista do receptor do tipo A de endotelina (ET_A-AA) (Velloso, Pimentel et al. 2016) (Fig. 2).

Um dos mais importantes fatores circulantes na PE foi inicialmente descrito em 1996, no trabalho de Kendall, Wang e Thomas (Kendall, Wang et al. 1996). Esses autores demonstraram a existência de uma forma solúvel do receptor de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) (VEGFR).

Posteriormente, estudos demonstraram que essa forma solúvel do VEGFR era produzida por placentas humanas e liberada na circulação materna (Clark, Smith et al. 1998). Entretanto, apenas no ano de 2003, o grupo de pesquisa do Dr. Ananth Karumanchi demonstrou que essa forma solúvel do VEGFR, o fms-like tirosina quinase-1 solúvel (sFlt-1) possuía papel importante no dano às células endoteliais e sugeria que o excesso de sFlt-1 poderia ter papel na fisiopatologia da PE (Maynard, Min et al. 2003).

Foi inicialmente mostrado que a expressão gênica e protéica de sFlt-1 está elevada na placenta de pacientes com PE e que os níveis plasmáticos do sFlt-1 também encontram-se elevados nessas pacientes. Esses estudos mostraram ainda que o aumento nos níveis de sFlt-1 plasmáticos eram seguidos de reduções nos níveis circulantes de VEGF e que a formação do tubo endotelial, em um ensaio de angiogênese, era inibida pelo plasma de mulheres pré-eclâmplicas (com altos níveis circulantes de sFlt-1) e revertida por um aumento nos níveis de VEGF (Maynard, Min et al. 2003).

De forma interessante, a co-incubação do plasma de mulheres com PE com anticorpos específicos para o sFlt-1 restaurou a formação do tubo endotelial, evidenciando a ação desse fator circulante sobre as células endoteliais (Ahmad and Ahmed 2004). Além disso, os estudos iniciais de Maynard e colaboradores mostraram que o sFlt-1 abole as respostas vasodilatadoras mediadas por VEGF e pelo fator de crescimento placentário (PlGF, do inglês *Placental Growth Factor*) em microvasos renais de ratos e que a infusão de sFlt-1 em ratas prenhes induz a hipertensão e a endoteliose glomerular, semelhante ao observado em mulheres com PE (Maynard, Min et al. 2003).

Diversos estudos posteriores mostram que os níveis de sFlt-1 encontram-se elevados em mulheres com PE (Maynard, Min et al. 2003, Eleuterio, Palei et al. 2014, Bian, Shixia et al. 2015, Garamvolgyi, Prohaszka et al. 2015, March, Geahchan et al. 2015, Tuzcu, Ascioglu et al. 2015) e em diversos modelos experimentais de hipertensão gestacional (Gilbert, Babcock et al. 2007, Ramesar, Mackraj et al. 2011, Gillis, Williams et al. 2015, Murphy and Cockrell 2015, Goncalves-Rizzi, Possomato-Vieira et al. 2016, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016, Zhu, Ren et al. 2016).

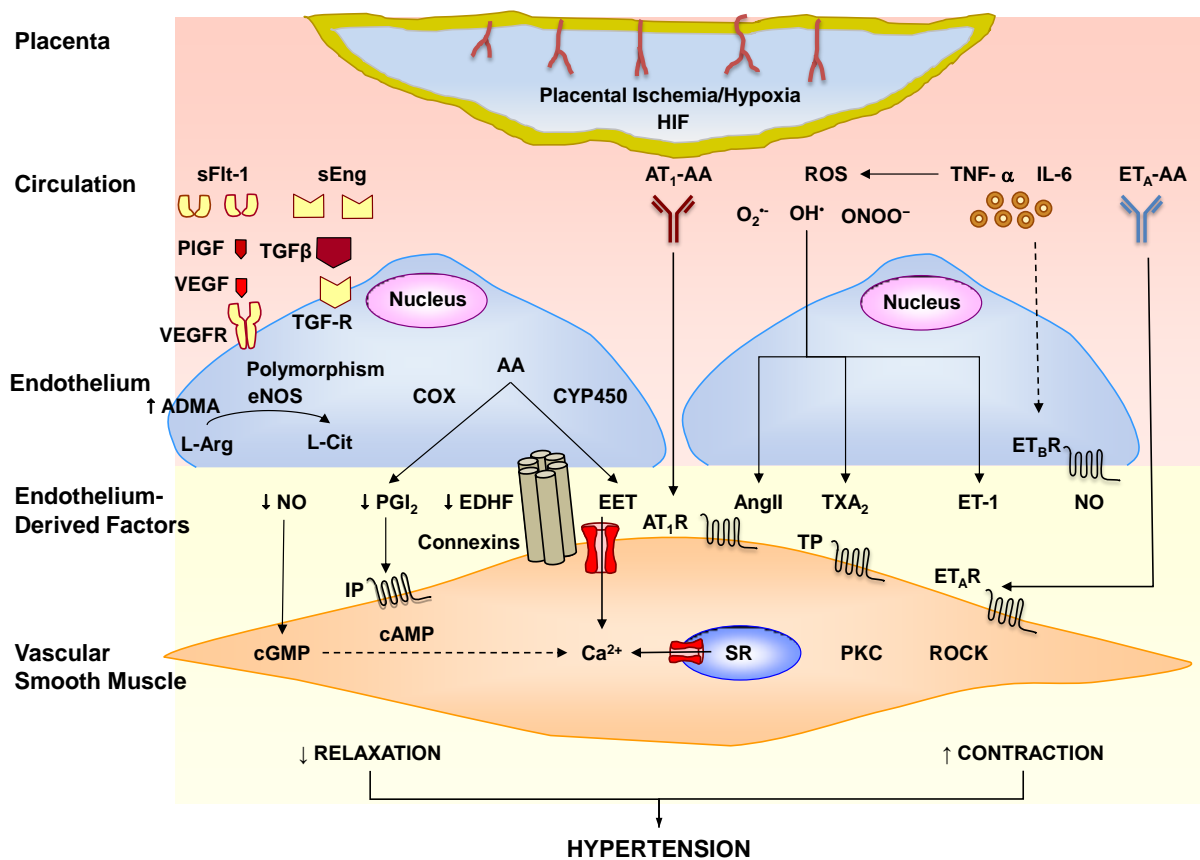


Figura 2. Fatores bioativos circulantes causam disfunção endotelial e hipertensão gestacional. A isquemia/hipóxia placentária causa um aumento nos níveis de HIF-1 e a liberação de fatores bioativos como o

sFlt-1, sEng, AT₁-AA, ROS, TNF- α , IL-6, and ET_A-AA. O sFlt-1 liga-se ao VEGF e PlGF e impede seus efeitos angiogênicos mediados pela ligação desses fatores ao VEGFR. sEng liga-se ao TGF- β e impede os efeitos angiogênicos mediados pela ativação do receptor TGF. O sFlt-1 e a sEng também podem levar à disfunção endotelial, diminuindo a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio como o NO, PGI₂, EDHF e EET. Polimorfismos da eNOS e níveis elevados de ADMA também diminuem a produção de NO. AT₁-AA age nos receptores AT₁R e contribui para a contração do músculo liso vascular. Citocinas como o TNF- α e a IL-6 podem aumentar a produção de ROS, que diminuem a biodisponibilidade de NO e estimula a liberação de substâncias vasoconstritoras como Ang II, ET-1 e TXA₂, as quais aumentam o [Ca²⁺]_i, PKC e ROCK estimulando mecanismos de contração muscular. Receptores ET_BR estimulam a liberação de NO e a expressão diminuída desses receptores na hipertensão gestacional diminui o relaxamento mediado por ET_BR. ET_A-AA estimulam os ET_AR e aumentam a contração vascular na hipertensão gestacional. O relaxamento vascular reduzido e um aumento na contração participam do surgimento de hipertensão na PE. Setas contínuas indicam estímulo. Setas pontilhadas indicam inibição. [Ca²⁺]_i, concentração de cálcio intracelular; AA, ácido araquidônico; ADMA, dimetil arginina assimétrica; Ang II, angiotensina II; AT₁-AA, anticorpo agonista do receptor do tipo I da angiotensina II; AT₁R, receptor do tipo 1 de angiotensina II; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; cGMP, guanosina monofosfato cíclica; COX, ciclooxigenase; CYP450, citocromo 450; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; EET, ácido epoxieicosatrienóico; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; ET-1, endotelina-1; ET_AR, receptor do tipo A de endotelina; ET_A-AA, anticorpo agonista do receptor do tipo A de endotelina; ET_BR, receptor do tipo B de endotelina; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; HIF, fator induzido pela hipóxia; IL-6, interleucina-6; IP, receptor de prostaciclina; NO, óxido nítrico; O₂⁻, ânion superóxido; OH⁻, íon hidroxila; PGI₂, prostaciclina; PKC, proteína quinase C; PlGF, fator de crescimento placentário; ROCK, Rho-quinase; ROS, espécies reativas de oxigênio; sEng, endoglina solúvel; sFlt-1, fms-like tirosina quinase-1 solúvel; SR, retículo sarcoplasmático; TGF- β , fator de transformação do crescimento β ; TGF-R, receptor de fator de transformação do crescimento; TNF- α , fator de necrose tumoral α ; TP, receptor de tromboxano; TXA₂, tromboxano A₂; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; VEGFR, receptor do fator de crescimento do endotélio vascular. *Possomato-Vieira and Khalil. Advances in Pharmacology, 2017.*

A disfunção endotelial é caracterizada por uma diminuição na liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) e um aumento na liberação de fatores de contração derivados do endotélio (EDCFs). O NO é um importante EDRF e estudos mostram que os níveis de NO encontram-se diminuídos em mulheres com PE (Sandrim, Palei et al. 2008, Ehsanipoor, Fortson et al. 2013, Eleuterio, Palei et al. 2013, Pimentel, Pereira et al. 2013, Wang, Yang et al. 2015) e em modelos animais experimentais de hipertensão gestacional (Mazzuca, Li et al. 2014, Amaral, Cornelius et al. 2015). Além disso, um aumento no estresse oxidativo (Tsukimori, Fukushima et al. 2005, Peracoli, Bannwart et al. 2011, Amaral, Pinheiro et al. 2013), que diminuí a biodisponibilidade de NO ou mesmo elevados níveis de dimetil arginina assimétrica (ADMA) (Bian, Shixia et al. 2015), um inibidor reversível da NOS, foram observados durante a hipertensão gestacional e podem contribuir para a disfunção endotelial, observada nessas desordens hipertensivas (Bian, Shixia et al. 2015).

Como esperado, a inibição da NOS utilizando o inibidor N ω -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) em ratas prenhes promove aumento da pressão arterial, diminuição do peso placentário e do número de filhotes viáveis, além de aumentar os níveis circulantes de sFlt-1

(Ramesar, Mackraj et al. 2011, Kemse, Kale et al. 2014, Goncalves-Rizzi, Possomato-Vieira et al. 2016).

Apesar de diversos trabalhos focarem no papel do NO e suas interações com diversas substâncias de interesse em hipertensão gestacional, uma nova molécula tem despontado na literatura, o sulfeto de hidrogênio (H₂S). O H₂S apresenta diversas similaridades com o NO, afinal trata-se de uma molécula gasosa, com produção enzimática, produzida no endotélio e possui capacidade para modular efeitos no sistema cardiovascular (Altaany, Yang et al. 2013, Coletta, Modis et al. 2015, Kuo, Kim et al. 2016, Saha, Chakraborty et al. 2016, Kanagy, Szabo et al. 2017, Tao, Wang et al. 2017, Zhang, Chen et al. 2017).

1.4 Efeitos vasculares do sulfeto de hidrogênio (H₂S)

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é um gás de odor pútrido e classicamente descrito como um gás tóxico. Em 1996, o trabalho de Abe & Kimura descreveu a produção endógena do H₂S (Abe and Kimura 1996) e este passou a integrar o rol de transmissores gasosos, juntamente com o NO e o monóxido de carbono (CO) (Abe and Kimura 1996).

O H₂S pode ser produzido por vias enzimáticas e não-enzimáticas, sendo que as vias enzimáticas são responsáveis pela maior produção de H₂S no organismo (Cirino, Vellecco et al. 2017). As principais vias enzimáticas produtoras do H₂S são a cistationina- γ -líase (CSE), a cistationina- β -sintase (CBS) e a 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) (Abe and Kimura 1996, Hosoki, Matsuki et al. 1997, Cirino, Vellecco et al. 2017, Kanagy, Szabo et al. 2017), sendo estas endogenamente expressas em células endoteliais (Altaany, Yang et al. 2013, Coletta, Modis et al. 2015, Kuo, Kim et al. 2016, Saha, Chakraborty et al. 2016, Tao, Wang et al. 2017, Zhang, Chen et al. 2017). Os níveis de H₂S livre no organismo são muito baixos (Whitfield, Kreimier et al. 2008), porém o H₂S pode ser estocado como sulfato de enxofre e liberado sob condições alcalinas ou estocado juntamente a grupamentos ferrosos (normalmente ligados a enzimas mitocondriais) e liberado sob condições ácidas (Toohey 2011, Shen, Peter et al. 2012). Todas essas fontes parecem ser responsáveis pelos efeitos biológicos do H₂S.

Estudos mostram que o H₂S participa de diversos processos biológicos, como por exemplo, a angiogênese (Chen, Feng et al. 2017, Szabo 2017). O H₂S estimula a proliferação, migração e organização de células endoteliais em estruturas tubulares (semelhantes a vasos sanguíneos) em uma série de estudos de angiogênese *in vitro* (Cai, Wang et al. 2007,

Papapetropoulos, Pyriochou et al. 2009, Pupo, Pla et al. 2011, Bir, Kolluru et al. 2012, Coletta, Papapetropoulos et al. 2012, Altaany, Yang et al. 2013, Tao, Liu et al. 2013, Wang, Ahmad et al. 2013, Jang, Oh et al. 2014).

Foi também demonstrado que a superexpressão de CSE aumenta a proliferação endotelial e promove a formação de estruturas vasculares *in vitro* (Coletta, Papapetropoulos et al. 2012, Altaany, Yang et al. 2013), enquanto que a inibição da produção de H₂S (seja por inibidores farmacológicos ou pelo silenciamento da expressão da CSE, CBS ou 3-MST) reduz a proliferação, migração e a formação de estruturas tubulares em células endoteliais (Papapetropoulos, Pyriochou et al. 2009, Coletta, Papapetropoulos et al. 2012, Altaany, Yang et al. 2013, Coletta, Modis et al. 2015, Saha, Chakraborty et al. 2016). Estudos que avaliaram a angiogênese *in vivo* demonstraram ainda que a angiogênese induzida pelo H₂S parece ser eNOS dependente, visto que as respostas angiogênicas do H₂S estão reduzidas em camundongos *knockout* para eNOS (Bir, Kolluru et al. 2012, Coletta, Papapetropoulos et al. 2012).

Pesquisas sugerem que o H₂S pode promover suas ações angiogênicas via canais K_{ATP}, uma vez que a abertura desses canais “imita” a resposta do H₂S e os bloqueadores desses canais reduzem as resposta angiogênicas do H₂S (Cai, Wang et al. 2007, Papapetropoulos, Pyriochou et al. 2009, Altaany, Yang et al. 2013, Umaru, Pyriochou et al. 2015). Além disso, o uso de doadores exógenos do H₂S promove a fosforilação da Akt, p38 e ERK1/2 e estimulam a migração e proliferação de células endoteliais, ao passo que a inibição farmacológica da PI3K/Akt e MAPK bloqueia-as (Cai, Wang et al. 2007, Papapetropoulos, Pyriochou et al. 2009, Altaany, Yang et al. 2013, Jang, Oh et al. 2014).

A inibição ou silenciamento da CSE/CBS diminui a angiogênese estimulada pelo VEGF em células endoteliais (Papapetropoulos, Pyriochou et al. 2009, Pupo, Pla et al. 2011, Coletta, Papapetropoulos et al. 2012, Saha, Chakraborty et al. 2016) e estudos demonstraram que doadores exógenos de H₂S aumentam a expressam de VEGF (Wang, Cai et al. 2010, Bir, Kolluru et al. 2012, Kondo, Bhushan et al. 2013, Holwerda, Burke et al. 2014, Jang, Oh et al. 2014).

O VEGFR2, ao ser estimulado, promove a angiogênese. Ele possui pontes dissulfeto entre os resíduos Cys1045 e Cys1024 que inibem a atividade tirosina quinase desse receptor (Tao, Liu et al. 2013). Foi demonstrado que o H₂S é necessário para promover uma redução dessas pontes dissulfeto e ativar o resíduo tirosina quinase do VEGFR2 (Tao, Liu et al. 2013). É necessário destacar que o silenciamento da CBS, em células endoteliais, diminuiu a

sinalização do VEGF, devido a reduções da expressão do VEGFR2 (Saha, Chakraborty et al. 2016). Juntos, esses resultados sugerem a participação do H₂S nos processos angiogênicos mediados pelo VEGF.

Foi também descrito que o H₂S é capaz de exercer efeitos diretos sobre a vasculatura, com resposta predominantemente vasodilatadora (d'Emmanuele di Villa Bianca, Sorrentino et al. 2011, Aydinoglu, Dalkir et al. 2017, Ertuna, Loot et al. 2017, Sheibani, Lechuga et al. 2017), mas alguns estudos demonstram ações vasoconstritoras do H₂S (Lim, Liu et al. 2008, d'Emmanuele di Villa Bianca, Sorrentino et al. 2011, Li, Ping et al. 2015). Embora essas diferenças de respostas pareçam ser relacionadas principalmente ao leito vascular estudado, a concentração do doador de H₂S utilizado e ao fato de o vaso encontrar-se pré-contraído ou relaxado, esses estudos claramente demonstram a importância do H₂S no controle do tônus vascular.

Em doses de até 100 µM, o H₂S levou a contração da artéria mesentérica de ratos, enquanto maiores concentrações levaram à vasodilatação (d'Emmanuele di Villa Bianca, Sorrentino et al. 2011). Observações de contração induzida pelo H₂S foram também observadas na aorta de camundongos (Tang, Yang et al. 2013), artéria gástrica de ratos (Kubo, Kajiwara et al. 2007) e em artérias basilares de ratos (Li, Ping et al. 2015).

Ainda que os mecanismos pelos quais o H₂S leva à vasodilatação não estejam totalmente elucidados, foi descrito que suas ações vasodilatadoras podem estar relacionadas à inibição de atividade da fosfodiesterase (PDE) do tipo 5 e consequente aumento da disponibilidade de cGMP, no músculo liso vascular (Bucci, Papapetropoulos et al. 2010), à fosforilação do resíduo eNOS^{Ser1177}, promovendo maior liberação de NO (Coletta, Papapetropoulos et al. 2012), à sulfidração da eNOS no resíduo Cys443 e consequente estabilização da eNOS na sua forma dimérica ativa (Altaany, Ju et al. 2014) e à regulação do estado redox da sGC para a forma ferrosa-responsiva ao NO (Zhou, Martin et al. 2016).

Ainda, diversos estudos demonstraram a importância dos canais de K_{ATP} para as respostas vasodilatadoras do H₂S em diferentes espécies (Siebert, Cantre et al. 2008, Liang, Adebisi et al. 2011, Mustafa, Sikka et al. 2011, Liu, Liu et al. 2012, Baragatti, Ciofini et al. 2013, Tang, Yang et al. 2013).

De forma importante, a sinalização exercida pelo H₂S no sistema vascular possui impacto direto no controle da pressão arterial, visto que a deleção global da CSE (Yang, Wu et al. 2008) ou a inibição farmacológica das enzimas produtoras do H₂S resulta em aumento da pressão arterial (Zhao, Ndisang et al. 2003, Roy, Khan et al. 2012, Wang, Ahmad et al.

2013), acompanhada de perda do relaxamento endotélio-dependente (Yang, Wu et al. 2008). Ademais, a utilização de doadores exógenos de H₂S promove diminuição da pressão arterial em diferentes modelos de experimentação animal (Zhao, Zhang et al. 2001, Yan, Du et al. 2004, Shi, Chen et al. 2007, Li, Whiteman et al. 2008, Lu, Liu et al. 2010, Ahmad, Sattar et al. 2012, Holwerda, Burke et al. 2014, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016).

1.5 O sulfeto de hidrogênio (H₂S) na PE e hipertensão gestacional

O trabalho inicial desenvolvido por Holwerda e colaboradores mostrou uma redução na expressão de mRNA para CBS em placenta de mulheres com PE, sem alterações da expressão protéica ou mesmo da expressão gênica e protéica da CSE (Holwerda, Bos et al. 2012). Posteriores análises imunohistoquímicas revelaram a existência de CSE em vasos da região uteroplacentária e diminuição, na imunoreatividade, de CSE em pacientes com PE (Cindrova-Davies, Herrera et al. 2013).

Esses estudos também demonstraram o envolvimento de micro RNAs (miRNAs - pequenas porções de RNA não-codificantes) na via de produção do H₂S (Cindrova-Davies, Sanders et al. 2011). Observou-se que os níveis do miRNA-21, que regula negativamente a expressão de CSE, encontram-se elevados em placentas de mulheres com PE e fluxo placentário anormal (Cindrova-Davies, Herrera et al. 2013) e que culturas de placentas submetidas à ciclos de hipóxia/re-oxigenação apresentam reduções nos níveis de mRNA para CSE e aumento da expressão de miRNA-21 (Cindrova-Davies, Herrera et al. 2013).

Destaca-se que o trabalho de Cindrova-Davies e seus colaboradores demonstrou os efeitos vasculares do H₂S na região uteroplacentária. Observou-se que a perfusão de placentas normais com um doador de H₂S, após a pré-contracção com um análogo do tromboxano, resultou em um relaxamento dose-dependente e que os efeitos vasodilatadores do doador de H₂S foram parcialmente bloqueados, após a aplicação de glibenclamida ou L-NAME. Isso indicou que os efeitos vasculares mediados pelo H₂S, na região uteroplacentária, dependem de canais K_{ATP} e da biodisponibilidade de NO (Cindrova-Davies, Herrera et al. 2013).

Um importante estudo foi posteriormente publicado pelo grupo de pesquisa do Dr. Asif Ahmed (Wang, Ahmad et al. 2013). Trata-se de *“Dysregulation of Hydrogen Sulfide Producing Enzyme Cystathionine-γ-lyase Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia”*, cujos resultados mostraram que: (1) os níveis plasmáticos de H₂S e a expressão gênica de CSE placentário encontram-se reduzidas em

pacientes com PE; (2) o cultivo de tecido placentário juntamente com o inibidor farmacológico da CSE, DL-Propargilglicina (PAG) não altera os níveis de sFlt-1 e sEng, entretanto, diminui em aproximadamente três vezes os níveis de PlGF; (3) o silenciamento da expressão de CSE promove um aumento na liberação de sFlt-1 e sEng em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), enquanto que a superexpressão de CSE diminui a liberação desses dois fatores anti-angiogênicos; (4) a co-incubação do plasma de mulheres pré-eclâmpicas com um doador de H₂S restaura a formação do tubo endotelial em um ensaio de angiogênese; (5) a aplicação de PAG leva a uma diminuição dos níveis plasmáticos de H₂S, aumento na pressão arterial, vascularização anormal da placenta, diminuição do peso fetal e aumento nos níveis circulantes de sFlt-1 e sEng em camundongos prenhes; e (5) a utilização do doador de H₂S, GYY4137, após a inibição da CSE pelo PAG, reverte o aumento da pressão arterial, da vascularização anormal da placenta e da diminuição do peso fetal e diminui os níveis circulantes de sFlt-1 e sEng.

Alguns trabalhos dedicaram-se a investigar a modulação do H₂S sobre a produção dos fatores pró e anti-angiogênicos. A metaloproteinase 10 (ADAM-10) é uma desintegrina que pode estar envolvida no processo proteolítico de Flt-1 para sFlt-1. A expressão de pró-ADAM-10 e de ADAM-10 ativa encontram-se elevadas em placenta de mulheres com PE e estão inversamente correlacionadas com a expressão de CBS e CSE em tecido placentário (Hu, Wang et al. 2015).

O uso de doadores exógenos de H₂S diminui a expressão de pró-ADAM-10 e de ADAM-10 ativa em cultura de tecido placentário e, conseqüentemente, a liberação de sFlt-1, sugerindo que a modulação do H₂S sobre a ADAM-10 pode estar envolvida nos mecanismos fisiopatológicos da PE (Hu, Wang et al. 2015).

Além disso, o silenciamento da CBS e CSE inibiu a formação de VEGF mediada pelo hidrossulfeto de sódio (NaHS), um doador exógeno de H₂S, e pelo precursor L-cisteína em células trofoblásticas e em cultura de tecido placentário (Hu, Wang et al. 2016). O uso de NaHS e L-cisteína aumentou a expressão de VEGF em placentas de gestantes saudáveis. Esse aumento foi seguido de uma diminuição dos miRNAs-200c, -20a e -20b, que regulam negativamente a expressão de VEGF (Hu, Wang et al. 2016).

De forma interessante, a expressão de CBS e CSE está diminuída em placenta de PE, enquanto que a expressão dos miRNAs-200c, -20a e -20b encontra-se elevada, sugerindo que falhas na sinalização do H₂S podem promover aumento na expressão desses miRNAs não-codificantes para VEGF (Hu, Wang et al. 2016). Além do mais, foi demonstrado que os níveis

diminuídos de expressão de CBS e CSE, em placentas de mulheres com PE, correlacionam-se com níveis aumentados do miRNA-133b, o qual regula negativamente a expressão de sFlt-1. Ademais, o tratamento de culturas de tecido placentário com NaHS e L-cisteína diminuiu a expressão gênica de sFlt-1 e aumentou a expressão do miRNA-133b (Hu, Guo et al. 2017).

Finalmente, estudos experimentais em modelos animais de hipertensão gestacional mostraram que o tratamento de ratas prenhes hipertensas com NaHS diminui a pressão arterial (Holwerda, Burke et al. 2014, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016) e as lesões renais típicas da hipertensão gestacional (Holwerda, Burke et al. 2014). O tratamento com NaHS levou à diminuição dos níveis plasmáticos de sFlt-1 (Holwerda, Burke et al. 2014, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016), aumento dos níveis de VEGF circulante e aumento da expressão renal de VEGF (Holwerda, Burke et al. 2014), embora os efeitos anti-hipertensivos e uteroplacentários do NaHS tenham sido descritos mesmo após a diminuição dos níveis circulantes de VEGF, promovida pelo uso desse doador (Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016) (Fig. 3).

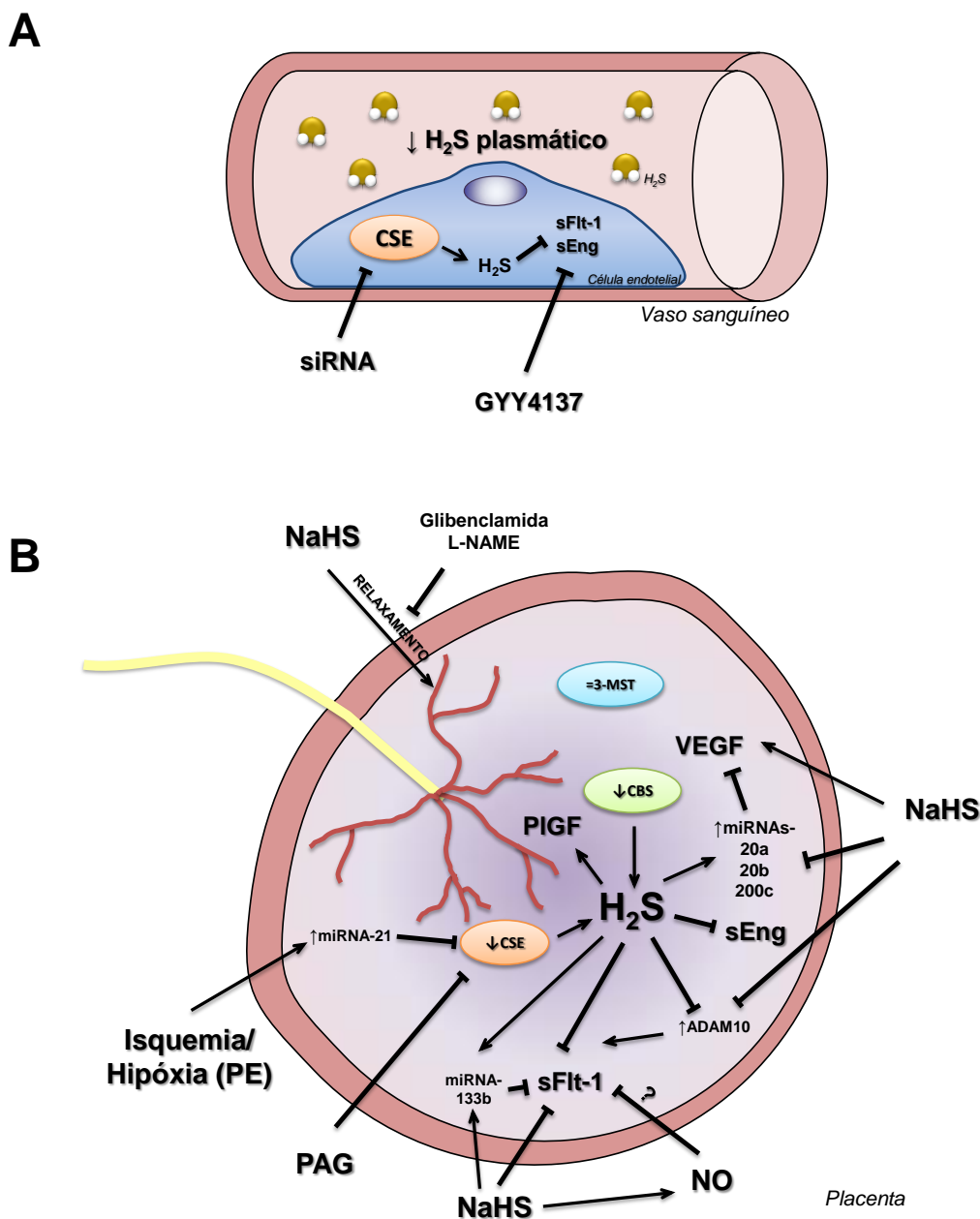


Figura 3. Efeitos mediados pelo H₂S em vasos (A) e em placenta (B) na hipertensão gestacional e PE. (A) Os níveis plasmáticos de H₂S encontram-se diminuídos na circulação de mulheres com PE e o H₂S endógeno ou o doador exógeno GYY4137 inibem a formação de sFIt-1 e sEng em células endoteliais. (B) O H₂S estimula a produção de PIGF e inibe a formação de sFIt-1 e sEng. O doador exógeno NaHS estimula a produção de VEGF. A expressão de 3-MST não se altera na hipertensão gestacional e PE, entretanto, a expressão de CBS e CSE encontra-se reduzida. O H₂S modula a expressão de diversos miRNAs que controlam a expressão de substâncias pró- e anti-angiogênicas. O H₂S inibe a expressão de ADAM-10 que, por sua vez, promove a proteólise de FIt-1 em sFIt-1. A diminuição nos níveis de H₂S causam aumento na expressão de ADAM-10. O H₂S também promove o relaxamento dos vasos uteroplacentários e este relaxamento é abolido por glibenclamida e L-NAME. O tratamento com NaHS também aumenta os níveis circulantes de NO e este aumento pode contribuir com a diminuição da expressão de sFIt-1. Setas contínuas indicam estímulo. Setas com pontas de barra indicam inibição. 3-MST, 3- mercaptopiruvato sulfurtransferase; ADAM-10, metaloproteinase-10; CBS, cistationina- β -sintase; CSE, cistationina- γ -líase; L-NAME, N ω -nitro-L-arginina-metil éster; ; miRNA, micro RNA; NaHS, hidrossulfeto de sódio; PAG, DL-propargilglicina; PE, pré-eclâmpsia; PIGF, fator de crescimento placentário; sEng, endogлина solúvel; sFIt-1, fms-like tirosina quinase-1 solúvel; siRNA, RNA de silenciamento; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular.

Desta maneira, os trabalhos realizados durante esse curso de doutoramento, tiveram como objetivo avaliar o efeito anti-hipertensivo do H₂S e avançar nos mecanismos pelos quais esse gás exerce suas funções. Também avaliamos como esse gás interage com os níveis circulantes de fatores anti-angiogênicos e pró-angiogênicos de interesse na hipertensão gestacional, bem como, investigamos os efeitos feto-placentários do tratamento com o doador de H₂S na hipertensão gestacional

Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats

Jose Sergio Possomato-Vieira¹ · Victor Hugo Gonçalves-Rizzi¹ ·
Tamiris Uracs Sales Graça¹ · Regina Aparecida Nascimento¹ · Carlos A. Dias-Junior¹

Received: 19 March 2016 / Accepted: 29 August 2016 / Published online: 12 September 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Sodium hydrosulfide (NaHS) has presented antihypertensive and antioxidant effects and may reduce circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1). We examined whether NaHS prevents maternal and fetal detrimental changes in a model of hypertension in pregnancy induced by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Forty pregnant rats were divided into four groups ($n = 10$ per group): Norm-Preg, Preg + NaHS, HTN-Preg, or HTN-Preg + NaHS. Systolic blood pressure (SBP), number of viable fetuses, litter size, pups, and placenta weights were recorded. Circulating plasma sFlt-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), myeloperoxidase (MPO), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) levels, and biochemical determinants of nitric oxide (NO) formation were assessed. SBP values were elevated in the HTN-Preg group on gestational days 16, 18, and 20. However, HTN-Preg + NaHS group presented lower SBP values on days 18 and 20. Lower number of viable fetuses and litter size were found only in HTN-Preg group compared to other. Reductions in placental weight were found in HTN-Preg and HTN-Preg + NaHS groups. Increases in fetal weight were found only in Preg + NaHS group. Increases in circulating sFlt-1 and VEGF levels were observed only in HTN-Preg group compared to other. Higher MPO and lower TEAC plasma levels were found in HTN-Preg + NaHS and HTN-Preg groups. NO was diminished in HTN-Preg animals, and NaHS treatment increased NO levels only in hypertensive pregnant animals. Treatment with NaHS prevents hypertension in pregnancy and concomitantly reduces circulating plasma sFlt-1

and VEGF levels; this correlates with improved litter size with more viable fetuses and increase in NO levels. However, these beneficial effects presented no relation with oxidative stress.

Keywords Hydrogen sulfide donor · N(G)-nitro-L-arginine methyl ester · Preeclampsia · Rats

Introduction

Preeclampsia affects ~5–8 % of pregnancies in the USA and eight million worldwide (Uzan et al. 2011). Currently, preeclampsia is a major cause of fetal morbidity and mortality and causes 15–20 % of maternal deaths (Chang et al. 2003). Importantly, there is no “cure” for preeclampsia except for preterm delivery of the baby and placenta, leaving a major health risk for both babies and mothers (Uzan et al. 2011; Palei et al. 2013). Preeclampsia is manifested as maternal hypertension after 20 weeks of gestation (Noris et al. 2005), and the mechanisms involved are not clearly understood. In this concern, elevated levels of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), the soluble form of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor, has been considered a key factor to the hypertension and multisystem organ injury during preeclampsia (Levine et al. 2004; Di Marco et al. 2009).

It has been reported that dysregulation of hydrogen sulfide (H_2S) producing enzymes contributes to maternal hypertension and impaired placental vascularization in preeclampsia. Moreover, inhibition of H_2S production in mice leads to hypertension, abnormal vascularization of the placenta, and reduced fetal weight (Wang et al. 2013). Recently, Holwerda et al. (2014) reported that H_2S donor (sodium hydrosulfide (NaHS)) may reduce circulating sFlt-1, which, in turn, may decrease maternal blood pressure and may play an important

✉ Carlos A. Dias-Junior
carlosjunior@ibb.unesp.br

¹ Department of Pharmacology, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubiao Junior S/N, 18.618-970, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

role in the pathogenesis of hypertension in pregnancy. In addition, H₂S donors have presented proangiogenic (Papapetropoulos et al. 2009; Wang et al. 2010), antioxidative stress (Kabil et al. 2014), antiinflammatory (Sodha et al. 2009), and antihypertensive effects (Ahmad et al. 2012); thus, targeting H₂S may help to clarify the physiopathology of preeclampsia.

Several lines of evidence support the concept that there may be reduction of endogenous nitric oxide (NO) production during hypertension in pregnancy (Eleuterio et al. 2013; Pimentel et al. 2013; Possomato-Vieira and Khalil 2016; Wang et al. 2015) and that chronic NO synthase blockade from mid to late gestation in rats results in many pathological changes similar to those found in women with preeclampsia (Agunanne et al. 2010; Ramesar et al. 2011; Gillis et al. 2015; Morris et al. 2016). Thus, in this study, pregnant rats were treated chronically with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) from mid to late gestation in order to block NO synthesis. Therefore, we hypothesized that NaHS attenuates the deleterious (maternal and fetal) changes in a rat model of hypertension in pregnancy and these beneficial effects are associated to the reductions in circulating sFlt-1. In order to investigate mechanisms involved in this phenomenon, we measured circulating sFlt-1 and VEGF and biochemical determinants of oxidative stress and NO formation.

Materials and methods

Animals and experimental protocol

Wistar rats (200–250 g) were housed in cages at 22 ± 2 °C on a 12-h light/dark cycle and given free access to water and rat chow. Each female rat was separately mated overnight. Day 0 of pregnancy was defined as the day when spermatozoa were found in a vaginal smear.

On day 14 of pregnancy, each pregnant rat mother was first placed into a single cage and randomized to one of the four treatment groups (**n* = 10 per group, total of 40 rats): Norm-Preg, Preg + NaHS, HTN-Preg, and HTN-Preg + NaHS. Pregnant rats received daily intraperitoneal (i.p.) injections of 0.9 % saline solution in Norm-Preg group or i.p. injections of NaHS (Sigma, St. Louis, MO, no. 161527) 50 μmol/kg/twice daily for 7 days (Holwerda et al. 2014) in Preg + NaHS group, or i.p. injections of L-NAME (Sigma, St. Louis, MO, no. 5751; 60 mg/kg/daily) (Yang et al. 2011) in HTN-Preg group, or i.p. injections of L-NAME (60 mg/kg/daily) (Yang et al. 2011) and i.p. injections of NaHS (50 μM/kg/twice daily for 7 days) (Holwerda et al. 2014) in HTN-Preg + NaHS group. This NaHS treatment (50 μmol/kg = 0.30 mg/kg) was chosen based on previous study (Holwerda et al. 2014). So, the rats received the first NaHS injection 3 h before and 1 h after the systolic blood

pressure measurements. Rats were euthanized on gestation day 21 under overdose of isoflurane followed by exsanguination. Blood samples were collected in lyophilized ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Vacuntainer Becton-Dickinson, Oxford, UK) for plasma separation. Plasma was stored at –80 °C until use for biochemical analysis.

All procedures for animal experimentation were approved by the Ethics Committee, Biosciences Institute of Botucatu, State University of Sao Paulo (protocol no. 619/2014).

Blood pressure measurements

Systolic blood pressure (mmHg) was measured on gestational days 14, 16, 18, and 20, using tail-cuff plethysmography (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalog no. EFF 306). Briefly, all pregnant rats were first acclimated in a quiet room, conditioned, and restrained for 5–10 min in a warm box (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalog no. EFF-307) to the measurements for 3 days before the pregnancy day 14 (these data were discarded), and then, the baseline systolic blood pressure was determined as the average of the cuff inflation–deflation (three to six) cycles by a trained operator on pregnancy day 14 (Gonçalves-Rizzi et al. 2016).

Effects on placenta and fetuses

On gestational day 21, after euthanasia, animals were placed in supine position and cesarean section was performed. The number of viable fetuses, litter size, fetal weight, and placental weight were recorded. Viable fetuses were determined as those which showed no macroscopical sign of malformation and could apparently have a normal outcome with the progression of the pregnancy, as previously reported (Ma et al. 2010).

Determination of sFlt-1 and VEGF

Commercial enzyme immunoassay (ELISA) kits for sFlt-1 (no. MVR100) and VEGF (no. RRV00) both of *R&D Systems Inc.* (Minneapolis, MN) were used to determine plasma levels. Assays were performed according to the manufacturer's instructions. Plasmatic levels of sFlt-1 and VEGF were expressed in pg/mL.

Determination of myeloperoxidase activity

Circulating plasma levels of myeloperoxidase (MPO) reflect the inflammatory response, as according to the method previously proposed by Suzuki et al. (1983). Briefly, 30 μL of centrifuged plasma samples received 100 μL of tetramethyl benzidine (TMB) and 0.04 % H₂O₂. Posteriorly, microplate was incubated for 10 min at 37 °C, protected from light. The reaction was stopped with 100 μL H₂SO₄ (2 N), and the absorbance at 450 nm with correction to 630 nm was read with

the spectrophotometer (Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT). The results were expressed in $\Delta A_{630}/\text{min/mL}$.

Measurements of plasma antioxidant capacity

The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was performed as previously described by Erel (2004). Briefly, a standard curve was established using 100 μg of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, St. Louis, MO, no. 238813) in 1 mL of sodium acetate buffer (0.4 M, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) + glacial acetic acid (0.4 M). Firstly, 20 μL of plasma samples were added to 200 μL of sodium acetate buffer + glacial acetic acid, and the absorbance at 660 nm was read with the spectrophotometer (Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT). Secondly, 20 μL of sodium acetate buffer (0.03 M) and glacial acetic acid (0.03 M) + H_2O_2 + 2,2-azino-bis(3-ethylbenz-thiazolin-6 sulfonic acid (ABTS, Sigma A 1888) was added to the samples and incubated for 5 min. Finally, a second reading was performed at 660 nm. The second reading values were subtracted from the first reading values, and the antioxidant activity was expressed as mmol of Trolox equivalent/L.

Measurement of plasma nitrite + nitrate concentrations

The plasma nitrite + nitrate (NOx) concentrations were determined in duplicate using the Griess reaction, as previously described (Dias-Junior et al. 2010). Briefly, 40 mL of plasma was incubated with the same volume of nitrate reductase buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7.5, containing 1 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and 2 U of nitrate reductase/mL) in individual wells of a 96-well plate. Samples were allowed to incubate overnight at 37 °C in the dark; 8 mL of freshly prepared Griess reagent (1 % sulfanilamide, 0.1 % naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5 % phosphoric acid) was added to each well, and the plate was incubated, for 15 additional minutes, at room temperature. A standard nitrate curve was obtained by incubating sodium nitrate (0.2–200 μM) with the same reductase buffer. The NOx levels in plasma were expressed in $\mu\text{mol/L}$.

Statistical analysis

Using commercially available statistical software (GraphPad Prism® 6.0 for Windows, San Diego, CA), a Shapiro–Wilk test was applied to verify normality of data distribution. Systolic blood pressure measurements were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA) with time and treatment defined as main effects, followed by Tukey's test for multiple comparisons among groups or by a Dunnett's test to compare measurements on pregnancy days 16, 18, and 20. Paired *t* tests were used to compare fetal and placental changes or sFlt-1, VEGF, TEAC, MPO, and NO levels.

Statistical significance was considered at $P < 0.05$. All values are expressed as mean \pm SEM.

Results

There were no significant differences in the systolic blood pressure values (118 to 127 \pm 4 mmHg) among the four groups on day 14 ($P > 0.05$, Fig. 1). Systolic blood pressure values were elevated in the HTN-Preg group on days 16, 18, and 20 (145 \pm 5, 149 \pm 3, and 140 \pm 4 mmHg, respectively, $P < 0.05$, Fig. 1). However, HTN-Preg + NaHS group presented a trend of low values on day 16 (132 \pm 5 mmHg), and lower systolic blood pressure values were significantly observed on days 18 and 20 (129 \pm 4 and 126 \pm 3 mmHg) compared with HTN-Preg group ($P < 0.05$, Fig. 1).

Lower number of viable fetuses was found only in HTN-Preg group (7 \pm 0.7, $P < 0.05$, Fig. 2) compared with Norm-Preg, Preg + NaHS, and HTN-Preg + NaHS groups (11 \pm 1.0, 12 \pm 0.7, and 11 \pm 1.0, respectively, Fig. 2). Also, the number of pups (litter size) was significantly lower in HTN-Preg group (9.2 \pm 0.7) compared with Norm-Preg, Preg + NaHS, or HTN-Preg + NaHS groups (13 \pm 1, 13 \pm 1, or 12 \pm 1, respectively). Surprisingly, the fetal weight was significantly higher only in Preg + NaHS group (3.5 \pm 0.11 g, $P < 0.05$, Fig. 2) compared with Norm-Preg, HTN-Preg, and HTN-Preg + NaHS groups (2.9 \pm 0.1, 3.1 \pm 0.03, and 3.2 \pm 0.06 g, respectively, Fig. 2). Lower placental weights were found in both groups which received L-NAME without (HTN-Preg group, 0.53 \pm 0.01 g, $P < 0.05$, Fig. 2) or with NaHS (HTN-Preg + NaHS group, 0.55 \pm 0.01 g, $P < 0.05$, Fig. 2). Both Norm-Preg and Preg + NaHS presented higher placental weight (0.63 \pm 0.01 and 0.63 \pm 0.01 g, respectively, $P < 0.05$) compared with HTN-Preg and HTN-Preg + NaHS groups (Fig. 2).

NaHS blunted increases in circulating plasma sFlt-1 and VEGF levels induced by L-NAME (both $P < 0.05$, Fig. 3). Increased circulating sFlt-1 plasma levels were observed only in HTN-Preg group compared with Norm-Preg, Preg + NaHS, and HTN-Preg + NaHS (368.2 \pm 54.17, 162.2 \pm 4.37, 138.8 \pm 6.57, and 174.3 \pm 14.37 pg/mL, respectively, $P < 0.05$, Fig. 3). Higher circulating plasma VEGF levels were found only in HTN-Preg group compared with Norm-Preg, Preg + NaHS, and HTN-Preg + NaHS (77.69 \pm 4.61, 58.41 \pm 6.14, 61.45 \pm 3.62, and 60.74 \pm 2.48 pg/mL, respectively, $P < 0.05$, Fig. 3).

Both HTN-Preg and HTN-Preg + NaHS presented decreases in antioxidant capacity (0.042 \pm 0.016 and 0.039 \pm 0.017, respectively) compared with Norm-Preg and Preg + NaHS groups (0.11 \pm 0.013 and 0.12 \pm 0.011, respectively, $P < 0.05$, Fig. 4). Also, HTN-Preg and HTN-Preg + NaHS presented increases in myeloperoxidase levels (2.06 \pm 0.10 and 2.32 \pm 0.12, respectively) compared with

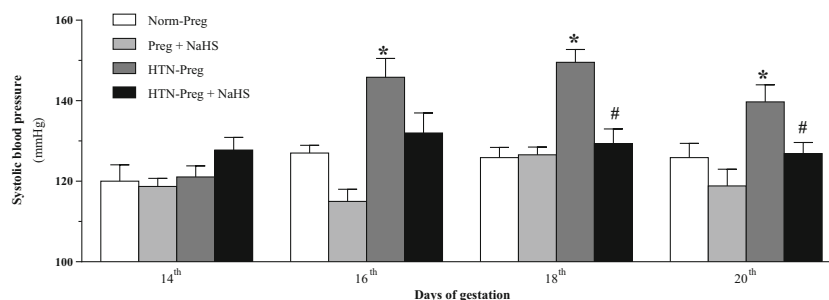


Fig. 1 Systolic blood pressure measured with tail-cuff plethysmography on days 14, 16, 18, and 20 of gestation among the four groups: normal pregnancy (*Norm-Preg*), pregnancy + NaHS (*Preg + NaHS*), pregnant rats treated with L-NAME (*HTN-Preg*), and pregnant rats treated with L-

NAME and NaHS (*HTN-Preg + NaHS*). Values represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, HTN-Preg versus Norm-Preg and Preg + NaHS. # $P < 0.05$ HTN-Preg + NaHS vs. HTN-Preg

Norm-Preg and Preg + NaHS groups (1.12 ± 0.20 and 1.35 ± 0.15 , respectively, $P < 0.05$, Fig. 4).

We evaluated NO bioavailability by measuring plasma nitrite and nitrate concentrations. We found a diminished NO bioavailability in HTN-Preg group ($45.45 \pm 5.76 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$) compared to Norm-Preg group ($73.34 \pm 6.61 \mu\text{mol/L}$). Treatment with NaHS did not alter NOx production in normotensive pregnant rats (Preg + NaHS group, $63.50 \pm 15.33 \mu\text{mol/L}$) versus Norm-Preg group. However, NaHS promotes an increase in NOx production in hypertensive animals (HTN-Preg + NaHS group, $134.10 \pm 14.52 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$, Fig. 4).

Discussion

This study shows that treatment with NaHS prevents hypertension in pregnancy and concomitantly reduces circulating plasma sFlt-1 and VEGF levels, with a correlation in improvement of the litter size with more viable fetuses. However, these beneficial effects presented no relation with oxidative stress. Also, reductions in placental weights induced by L-NAME were not affected by NaHS.

In our hands, following treatment with L-NAME, we observed reductions in placenta weights without changes in fetal weights in hypertensive pregnant groups without (HTN-Preg) or with NaHS (HTN-Preg + NaHS). However, in normal pregnant rats treated with NaHS, we observed an increase in fetal weight without changes in placental weight (Preg + NaHS group). This may be due to the fact that the more rapid growth of the fetus during later gestation places significant demands on placental transport function. The relative lag in placental weight versus fetal weight suggests that there may be a compensatory mechanism such as enhanced placental transport capacity to meet the demands of the growing fetus. In fact, the lack of changes in placental weight may result from placental maturational processes during late gestation rather than increased placental size, and this phenomenon has been shown in other studies (Mayr et al. 2005; Ma et al. 2010;

Kaya et al. 2011; Ramesar et al. 2011; Yang et al. 2011; Baijnath et al. 2014; Motta et al. 2015; Shi et al. 2015).

Importantly, this study demonstrates that NaHS prevents hypertension in pregnancy and concomitantly reduces circulating plasma sFlt-1 and VEGF levels, which correlates with improved litter size with more viable fetuses. Supporting our results, a previous study suggested that NaHS may be involved in reducing sFlt-1, which, in turn, may decrease maternal blood pressure during hypertension in pregnancy induced by overexpression of sFlt-1, and that “in vitro” NaHS was proangiogenic in an endothelial tube assay and attenuated the antiangiogenic effects of sFlt-1 (Holwerda et al. 2014). Those authors proposed that the reductions in circulating sFlt-1 were due to upregulation of VEGF induced by NaHS (Holwerda et al. 2014). We observed an increase in plasmatic VEGF in hypertensive animals that was blunted following treatment with NaHS. The diminished bioavailability of NO caused by L-NAME may induce a consistent vasoconstricted state in our hypertensive pregnant animals, and considering that VEGF normally acts as a vasodilator, its increase may represent an unsuccessful vascular rescue response. H₂S donor may promote improvement of blood flow by a non-NO-mediated relaxation (Tang et al. 2013; Dunn et al. 2016), and this relaxation may counterbalance the vasoconstrictive state in hypertensive animals treated with NaHS, consequently normalizing the VEGF levels. This is supported by previous results showing that maternal plasma VEGF concentrations increased before the clinical onset of preeclampsia and were further elevated during the vasoconstricted state observed in preeclampsia (Bosio et al. 2001). We suggest that NaHS could affect circulating sFlt-1 and VEGF levels, since NaHS prevented both elevations of circulating sFlt-1 and VEGF, which were associated with antihypertensive effects and prevention of detrimental fetal changes.

Also, supporting our results showing increases in circulating sFlt-1 (Ramesar et al. 2011) and VEGF induced by L-NAME, recent evidences have emphasized that VEGF overexpression may increase sFlt-1 levels, resulting in pregnancy losses, placental vascular defects, increases in the number of

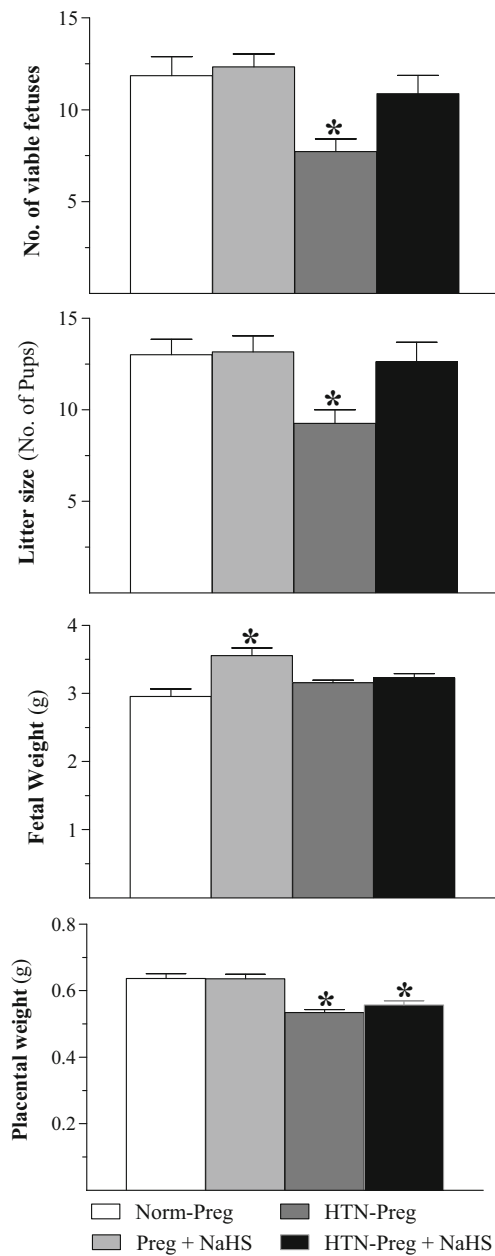


Fig. 2 Fetal and placental parameters. Normal pregnancy (*Norm-Preg*), pregnancy + NaHS (*Preg + NaHS*), pregnant rats treated with L-NAME (*HTN-Preg*), and pregnant rats treated with L-NAME and NaHS (*HTN-Preg + NaHS*). Values represent mean ± SEM. **P* < 0.05 versus Norm-Preg

resorption sites with decreases in the number of viable fetuses, and preeclampsia-like symptoms including hypertension in the mother (Fan et al. 2014). Moreover, sFlt-1 knockdown in VEGF-overexpressing animals aggravated the symptoms produced by VEGF overexpression alone (Fan et al. 2014). Therefore, these previous findings suggested that although sFlt-1 is an endogenous antagonist of VEGF, resulting in deleterious effects to the mother during preeclampsia (Thadhani et al. 2011), sFlt-1 may play an essential role in maintaining vascular integrity in the placenta by sequestering excess of

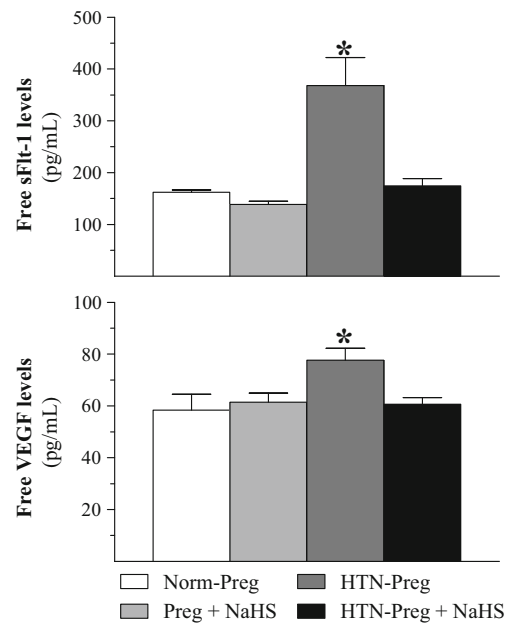


Fig. 3 Circulating free sFlt-1 and VEGF plasma levels. Normal pregnancy (*Norm-Preg*), pregnancy + NaHS (*Preg + NaHS*), pregnant rats treated with L-NAME (*HTN-Preg*), and pregnant rats treated with L-NAME and NaHS (*HTN-Preg + NaHS*). Values represent mean ± SEM. **P* < 0.05 versus Norm-Preg

maternal VEGF (Ozawa et al. 2004), potentially contributing to the pathogenesis of preeclampsia (Zhao et al. 2009). Thus, the present study suggests that there is an important regulatory relationship between increases in circulating sFlt-1 and VEGF levels, i.e., indicating that VEGF is tightly controlled at the maternal–fetal interface, at least in part through modulation by sFlt-1 (Miquerol et al. 2000).

The VEGF acts through VEGF receptor 2 and can directly stimulate the production of sFlt-1 by modulating the alternative splicing of Flt-1’s transcripts (Saito et al. 2013), driving sFlt-1 production in different cell types, including human placenta (Ahmad and Ahmed 2004). Therefore, the reductions in circulating plasma sFlt-1 and VEGF levels observed with NaHS may have prevented the concomitant damages to the mother and fetus that would otherwise be caused by VEGF signaling (Miquerol et al. 2000; Fan et al. 2014). So, these results provide potentially clinical implications for the design of therapies for preeclampsia that manipulate sFlt-1 and/or VEGF levels, being through systemic administration of VEGF or extracorporeal removal of circulating sFlt-1 (Thadhani et al. 2011). Thus, it should be weighted that minor deviations from normal VEGF and sFlt-1 levels for therapeutic purposes during preeclampsia may have serious consequences to mother and fetus (Zhao et al. 2009; Saito et al. 2013).

Previous findings have showed significant raised plasma sFlt-1 and VEGF levels in preeclampsia compared to normotensive healthy pregnancies (Zhao et al. 2009; Saito et al. 2013; Fan et al. 2014), and currently, there is a potential for

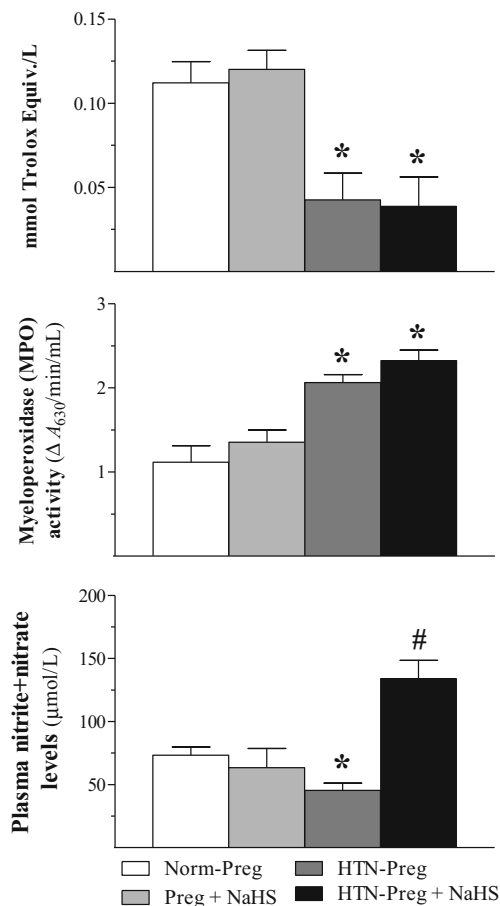


Fig. 4 Plasma antioxidant capacity, MPO activity, and nitrite + nitrate levels. Normal pregnancy (*Norm-Preg*), pregnancy + NaHS (*Preg + NaHS*), pregnant rats treated with L-NAME (*HTN-Preg*), and pregnant rats treated with L-NAME and NaHS (*HTN-Preg + NaHS*). Values represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$ versus *Norm-Preg*; # $P < 0.05$ versus *HTN-Preg*

treating symptoms in the mother through manipulation of plasma sFlt-1 levels (Thadhani et al. 2011). We then explored more mechanisms relating the source of increases in circulating sFlt-1. In this regard, sFlt-1 may be originated from circulating mononuclear cells (Rajakumar et al. 2005), releasing simultaneously proteases and reactive oxygen species that along with sFlt-1 cause vascular endothelial injury (Wallace et al. 2014). Accordingly, we found that MPO, a prooxidant enzyme abundantly expressed in neutrophil granulocytes, presented high levels in groups that received L-NAME (*HTN-Preg* and *HTN-Preg + NaHS* groups). Furthermore, exogenous H₂S donors have showed to protect against ischemia/reperfusion injury, exhibiting antiinflammatory effects (Bos et al. 2009; Sodha et al. 2009). Also, endogenous H₂S reduced oxidative stress after renal ischemia/reperfusion (Bos et al. 2013). However, our results display that NaHS failed in affecting changes in MPO and antioxidant capacity caused by L-NAME; thus, we propose that beneficial effects with NaHS observed here are not associated with modulations of

antioxidant response and oxidative stress. Therefore, the theory that sFlt-1 originates from circulating mononuclear cells causing vascular endothelial injury is not confirmed by the present study, since NaHS reduced circulating plasma sFlt-1 levels and concomitantly presented antihypertensive effects with no change in MPO levels (Rajakumar et al. 2005).

In order to expand our findings, we measured NO in our animals. In our hands, treatment with NaHS increased NO levels in hypertensive pregnant rats (*HTN-Preg + NaHS* group) but not in normotensive pregnant rats (*Preg + NaHS*). Studies on the cross talk between H₂S and NO have shown conflicting results. It has been found that H₂S inhibited eNOS activity and thus the synthesis of NO in endothelium (Kubo et al. 2007). Also, H₂S suppressed NO production by inhibition of eNOS transcription, abundance, and activity in aortic tissue (Geng et al. 2007). On the other hand, treatment with NaHS promoted an increase in NO production in endothelial cells (Predmore et al. 2011; Altaany et al. 2013), and knockdown of cystathionine γ -lyase (CSE), the producing enzyme of H₂S, diminished NO production, while overexpression of CSE increased NO production in endothelial cells (Altaany et al. 2013). Moreover, H₂S increased eNOS phosphorylation (Predmore et al. 2011; Altaany et al. 2013). Studies suggest an important role of NO in maintaining healthy pregnancy (Nelson et al. 2000; Shaamash et al. 2000; Dötsch et al. 2001); thus, the increases in NO may be partially responsible for improvements followed by treatment with NaHS. The inhibition of NOS promoted by L-NAME suggests that the increased levels of NO observed in animals from *HTN-Preg + NaHS* group may occur in a NOS-independently pathway. For instance, we strongly recommend that future researches focus on the cross talk between H₂S and NO in healthy and hypertensive pregnancies, as this is a unique physiological condition that may trigger different responses compared to a non-pregnant situation.

Importantly, some limitations should be taken into account. Firstly, as a unique condition in rats, there is a second circulatory system via the amniotic vessels in addition to blood supply from the uterine artery; thus, L-NAME-induced changes on microcirculatory and/or cellular levels could have influenced placenta weight, litter size, and viable fetuses. Since parameters of cellular function were not evaluated in this study, more investigations are needed to clarify functions of the utero-placental unit in preeclampsia-like syndrome. Furthermore, we failed to detect any significant differences in fetal weights with L-NAME, since intrauterine growth retardation may be a feature of preeclampsia. Secondly, as clinical studies in obstetric patients always remain a delicate ethical issue, animal models serve to answer specific questions regarding the pathophysiology of preeclampsia. Moreover, comparability of data from clinical studies and experimental models always remains speculative (Podjarny et al. 2004; McCarthy et al. 2011). Thirdly, proteinuria was not assessed

in this study. Although protein excretion has been figured for years as an essential parameter for the diagnosis of preeclampsia, it is no longer mandatory for diagnostic purposes. Importantly, proteinuric and non-proteinuric preeclampsias are now considered in two separate categories (Mol et al. 2016). In addition, experimental studies using L-NAME have shown conflicting results, either elevated (Souza et al. 2012) or unchanged proteinuria (Ramesar et al. 2010) in pregnant rats. In fact, it has been reported that there is a gradual increase in proteinuria throughout pregnancy in rats as a result of selective glomerular filtration and non-selective reabsorption in the proximal tubule, i.e., urinary protein concentrations in pregnant rats are not reliable to detect significant differences (Alexander et al. 1999). Lastly, further studies are necessary to address the potential therapeutic of H₂S donor analogs during preeclampsia (Yang and Wang 2015).

Treatment with NaHS prevents hypertension in pregnancy induced by L-NAME and concomitantly reduces circulating plasma sFlt-1 and VEGF levels; this correlates with improving in the litter size with more viable fetuses, suggesting that although high circulating sFlt-1 may cause damage to the mother, the excess of maternal VEGF can be deleterious to the fetuses. Also, NaHS treatment induces increases in NO that may be partially responsible for the effects of NaHS on hypertensive pregnancy. However, these beneficial effects with NaHS presented no relation with oxidative stress.

Acknowledgments This study was supported by funding from the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP, Brazil). The following are gratefully acknowledged: Valeria Cristina Sandrim and Helio Kushima for their co-operation and advice with technician issues.

References

- Agunanne EE, Uddin MN, Horvat D, Puschett JB (2010) Contribution of angiogenic factors in a rat model of pre-eclampsia. *Am J Nephrol* 32:332–339
- Ahmad S, Ahmed A (2004) Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 95:884–891
- Ahmad FDU, Sattar MA, Rathore HA, et al. (2012) Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) reduces blood pressure and prevents the progression of diabetic nephropathy in spontaneously hypertensive rats. *Ren Fail* 34:203–210
- Alexander BT, Miller MT, Kassab S, et al. (1999) Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension* 33(1):435–439
- Altaany Z, Yang G, Wang R (2013) Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J Cell Mol Med* 17:879–888
- Baijnath S, Soobryan N, Mackraj I, et al. (2014) The optimization of a chronic nitric oxide synthase (NOS) inhibition model of preeclampsia by evaluating physiological changes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 182:71–75
- Bos EM, Leuvenink HGD, Snijder PM, et al. (2009) Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 20:1901–1905
- Bos EM, Wang R, Snijder PM, et al. (2013) Cystathionine γ -lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 24:759–770
- Bosio PM, Wheeler T, Anthony F, et al. (2001) Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol* 184:146–152
- Chang J, Elam-Evans LD, Berg CJ, et al. (2003) Pregnancy-related mortality surveillance-United States, 1991–1999. *MMWR Surveill Summ* 52:1–8
- Di Marco GS, Reuter S, Hillebrand U, et al. (2009) The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 20:2235–2245
- Dias-Junior CA, Neto-Neves EM, Montenegro MF, et al. (2010) Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase inhibition combined with sildenafil during acute pulmonary embolism. *Nitric Oxide* 23:284–288
- Dötsch J, Hogen N, Nyúl Z, et al. (2001) Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97:163–167
- Dunn WR, Alexander SP, Ralevic V, et al. (2016) Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. *Pharmacol Ther* 158:101–113
- Eleuterio NM, Palei AC, Rangel-Machado JS, et al. (2013) Relationship between adiponectin and nitrite in healthy and preeclampsia pregnancies. *Clin Chim Acta* 423:112–115
- Erel O (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37:277–285
- Fan X, Rai A, Kambham N, et al. (2014) Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *J Clin Invest* 124:4941–4952
- Geng B, Cui Y, Zhao J, et al. (2007) Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1608–R1618
- Gillis EE, Williams JM, Garrett MR, et al. (2015) The Dalt salt-sensitive rat is a spontaneous model of superimposed preeclampsia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309:62–70
- Gonçalves-Rizzi VH, Nascimento RA, Possomato-Vieira JS, Dias-Junior CA (2016) Sodium nitrite prevents both reductions in circulating nitric oxide and hypertension in 7-day lead-treated rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 118:225–230
- Holwerda KM, Burke SD, Faas MM, et al. (2014) Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 25:717–725
- Kabil O, Motl N, Banerjee R (2014) H₂S and its role in redox signaling. *Biochim Biophys Acta* 1844:1355–1366
- Kaya A, Boztosun A, Seckin H, et al. (2011) The evaluation of hypoxia-inducible factor 1 in N-nitro-L-arginine methyl ester preeclampsia model of pregnant rats. *J Investig Med* 59:1268–1272
- Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, et al. (2007) Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* 232:138–146
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350:672–683
- Ma RQ, Sun MN, Yang Z (2010) Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestational stage on fetoplacental outcomes in a mouse model. *Chin Med J* 123:707–712
- Mayr AJ, Lederer W, Wolf HJ, et al. (2005) Morphologic changes of the uteroplacental unit in preeclampsia-like syndrome in rats. *Hypertens Pregnancy* 24:29–37
- McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK (2011) Animal models of preeclampsia; uses and limitations. *Placenta* 32:413–419

- Miquero L, Langille BL, Nagy A (2000) Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 127:3941–3946
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratnam S, et al. (2016) Pre-eclampsia. *Lancet* 387:999–1011
- Morris R, Spencer SK, Kyle PB, et al. (2016) Hypertension in an animal model of HELLP syndrome is associated with activation of endothelin 1. *Reprod Sci* 23:42–50
- Motta C, Grosso C, Zanuzzi C, et al. (2015) Effect of sildenafil on pre-eclampsia-like mouse model induced by L-name. *Reprod Domest Anim* 50:611–616
- Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, et al. (2000) Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* 87:406–411
- Noris M, Perico N, Remuzzi G (2005) Mechanisms of disease: pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 1:98–114
- Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, et al. (2004) Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest* 113:516–527
- Palei AC, Spradley FT, Warrington JP, et al. (2013) Pathophysiology of hypertension in pre-eclampsia: a lesson in integrative physiology. *Acta Physiol (Oxf)* 208:224–233
- Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, et al. (2009) Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21972–21977
- Pimentel AM, Pereira NR, Costa CA, Mann GE, et al. (2013) L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertens Res* 36:783–788
- Podjamy E, Losonczy G, Baylis C (2004) Animal models of preeclampsia. *Semin Nephrol* 24:596–606
- Possomato-Vieira JS, Khalil RA (2016) Mechanisms of endothelial dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Adv Pharmacol* 77:361–431
- Predmore BL, Julian D, Cardounel AJ (2011) Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism. *Front Physiol* 2
- Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, et al. (2005) Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta* 26:563–573
- Ramesar SV, Mackraj I, Gathiram P, Moodley J (2010) Sildenafil citrate improves fetal outcomes in pregnant, L-NAME treated, Sprague-Dawley. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 149:22–26
- Ramesar SV, Mackraj I, Gathiram P, Moodley J (2011) Sildenafil citrate decreases sFlt-1 and sEng in pregnant l-NAME treated Sprague-Dawley rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 157:136–140
- Saito T, Takeda N, Amiya E, et al. (2013) VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett* 587:2179–2185
- Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhlof AM, et al. (2000) Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 68:207–214
- Shi X, Chen P, Liu H, et al. (2015) Decitabine improves the clinical manifestations of rats with L-NAME-induced pre-eclampsia: a potential approach to studying pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy* 21:1–10
- Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. (2009) Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138:977–984
- Souza CO, Peraçoli MT, Weel IC, et al. (2012) Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of silibinin on experimental preeclampsia induced by L-NAME in rats. *Life Sci* 91:159–165
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, et al. (1983) Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochem* 132:345–352
- Tang G, Yang G, Jiang B, et al. (2013) H2S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxid Redox Signal* 19:1634–1646
- Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, et al. (2011) Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation* 124:940–950
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, et al. (2011) Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 07:467–474
- Wallace K, Cornelius DC, Scott J, et al. (2014) CD4+ T cells are important mediators of oxidative stress that cause hypertension in response to placental ischemia. *Hypertension* 64:1151–1158
- Wang MJ, Cai WJ, Li N, et al. (2010) The hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Antioxid Redox Signal* 12:1065–1077
- Wang K, Ahmad S, Cai M, et al. (2013) Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation* 127:2514–2522
- Wang L, Yang T, Ding Y, et al. (2015) Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia. *Endocrine* 48:299–308
- Yang G, Wang R (2015) H2S and blood vessels: an overview. *Handb Exp Pharmacol* 230:85–110
- Yang X, Guo L, Sun X, Chen X, Tong X (2011) Protective effects of hydrogen-rich saline in preeclampsia rat model. *Placenta* 32:681–686
- Zhao S, Gu X, Groome LJ, Wang Y (2009) Decreased nephrin and GLEPP-1, but increased VEGF, Flt-1, and nitrotyrosine, expressions in kidney tissue sections from women with preeclampsia. *Reprod Sci* 16:970–979

**Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-mediated relaxation,
underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of
hydrogen sulfide donor in hypertensive pregnancy**

**Jose Sergio Possomato-Vieira¹, Jessica Sabbatine Chimini¹, Maria Luiza Santos da
Silva¹ and Carlos A. Dias-Junior¹**

1 Department of Pharmacology, Biosciences Institute of Botucatu,
São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

Author for correspondence:

Dias-Junior, Carlos Alan,
Department of Pharmacology,
Biosciences Institute of Botucatu,
São Paulo State University, Distrito de Rubiao Junior, S/N,
18.618-970 Botucatu, SP, Brazil,
e-mail: carlosjunior@ibb.unesp.br

**Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-mediated relaxation
underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of
hydrogen sulfide donor in hypertensive pregnancy**

**José Sérgio Possomato-Vieira¹, Jessica Sabbatine Chimini¹, Maria Luiza Santos da
Silva¹ and Carlos A. Dias-Junior¹**

Highlights

H₂S donor improves fetal growth restriction in hypertensive pregnant rats

H₂S donor restores placental efficiency in hypertensive pregnant rats

H₂S donor increases placental NO bioavailability

H₂S donor reverses hyperreactivity to phenylephrine in hypertensive pregnant rats

H₂S donor elicits a non NO-mediated relaxation in hypertensive pregnant rats

Abstract

Dysregulation of producing enzymes of hydrogen sulfide (H₂S) has been related with hypertensive pregnancy and H₂S donor, sodium hydrosulfide (NaHS) exerts antihypertensive effects, modulates angiogenic factors production and acts as an antioxidant. Moreover, reduction in nitric oxide (NO) bioavailability is related with hypertensive pregnancy and H₂S may interact with NO to modulate NO production. We aimed to investigate the antihypertensive effects in hypertension in pregnancy and also effects in fetoplacental parameters exerted by NaHS. Female Wistar rats (200-250 g) were mated and desoxycorticosterone acetate injections followed by replacement of water by 0.9% saline solution were used to induce hypertensive pregnancy. Rats were divided into four groups: normal pregnant (Norm-Preg), pregnant+NaHS (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and HTN-Preg+NaHS. Systolic blood pressure was increased in HTN-Preg and this increase was blunted in HTN-Preg+NaHS. Fetal and placental weights were decreased in HTN-Preg animals, while fetal growth restriction was improved in HTN-Preg+NaHS. Placental weight was lower in HTN-Preg+NaHS than in HTN-Preg; however, placental efficiency was reestablished in HTN-Preg+NaHS rats. We observed that a partial contribution of placental nitric oxide (NO), but not changes in antiangiogenic/proangiogenic balance may mediate the increases in placental efficiency in HTN-Preg+NaHS. HTN-Preg presented thoracic aorta hyperreactivity to phenylephrine while treatment with NaHS blunted this hyperreactivity, which seems not to be related with increases in endothelial NO-pathway. Moreover, treatment with NaHS in HTN-Preg rats promoted a relaxation that is non-NO mediated and vascular effects of NaHS treatment may also underlie the beneficial effects in systolic blood pressure and fetoplacental parameters in our study.

Keywords: hypertensive pregnant rats, hydrogen sulfide, nitric oxide, vascular reactivity.

1. Introduction

Pregnancy-related hypertensive disorders are a major cause of fetal and maternal morbidity and mortality [1, 2]. Preeclampsia is a hypertensive disorder of pregnancy manifested as maternal hypertension after 20 weeks of gestation and often proteinuria [3]; also, preeclampsia may impose growth restriction to the fetus and a 4-fold increased risk for perinatal death [4]. It is now widely accepted that preeclampsia development involves two different stages. First, a poor placentation process leads to reduction in uterine perfusion, then ischemic/hypoxic placenta releases several bioactive factors, such as the antiangiogenic factor soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) [5, 6], that target endothelial cells causing systemic endothelial dysfunction [7]. Importantly, there is no “cure” for preeclampsia except for preterm delivery of the baby and placenta, leaving a major health risk for both babies and mothers [8, 9].

Better understanding the mechanisms involved in hypertensive-pregnancy related disorders would help to propose new therapies. It has been recently demonstrated that the gaseous molecule hydrogen sulfide (H_2S) has several physiological effects [10] and there are evidences that H_2S exerts a vasoprotective effect in hypertension and atherosclerosis [11, 12] and attenuates vascular dysfunction [13]. Moreover, it has been shown that dysregulation of the producing enzymes of hydrogen sulfide (H_2S) contributes to maternal hypertension and impaired placental vascularization in preeclampsia [14]. Also, the inhibition of cystathionine- γ -lyase (CSE), one of the producing enzymes of H_2S , reduces the release of proangiogenic factor placental growth factor (PlGF) in human placental explants [14] and transfection of small-interfering RNA to silence human CSE in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) increases the release of sFlt-1 [14]. Also, previous studies from our and other groups have shown that sodium hydrosulfide (NaHS), a H_2S donor, decreases

maternal blood pressure and may play an important protective role in the pathogenesis of hypertensive pregnancy [15, 16]. In addition, H₂S exogenous donors may exert proangiogenic [17, 18], antioxidant [19, 20] and antiinflammatory [21] effects; thus, targeting H₂S may help to clarify the physiopathology of preeclampsia.

Reductions in endogenous nitric oxide (NO) bioavailability in hypertensive pregnancy is supported by several studies [15, 22-25] and interactions between H₂S and NO have been described before [26-28]. Indeed, a previous study from our group suggest H₂S and NO interaction in hypertension-in-pregnancy [15], thus, we aimed to investigate the antihypertensive effects in hypertension in pregnancy and also effects in fetoplacental parameters exerted by NaHS; moreover, we hypothesized that this beneficial effects could be related with increased NO bioavailability, modulation of antiangiogenic/proangiogenic balance and also changes in vasculature promoted by NaHS treatment.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and experimental protocols

Wistar rats (200-250 g) were housed in cages at 22 ± 2°C on a 12-hr light/dark cycle and given free access to water and rat chow. Each female rat was separately mated overnight and day one of pregnancy was defined as the day when spermatozoa were found in a vaginal smear. Hypertensive pregnancy was induced by weekly injections of desoxycorticosterone acetate (DOCA - Sigma, St. Louis, MO, #D7000), as previously described [29-32]. Briefly, pregnant rats were injected initially with 12.5 mg of DOCA intraperitoneally (i.p.) in a depot form, followed by 6.5 mg on a weekly basis and water was replaced with 0.9% saline solution. Pregnant rats were allocated in a single cage and randomized to one of the four treatment groups: Normal pregnant (Norm-Preg, n =

8); pregnant rats which received weekly injections of DOCA (HTN-Preg, n = 8); pregnant rats receiving i.p. injections of sodium hydrosulfide (NaHS) (Sigma, St. Louis, MO, no. 161527) (50 $\mu\text{mol/kg}$ /twice daily) for 7 days (pregnancy day 12-19) [15, 16] (Preg+NaHS, n = 8); pregnant rats with DOCA-induced hypertension receiving i.p. injections of NaHS (50 $\mu\text{mol/kg}$ /twice daily) for 7 days (HTN-Preg+NaHS, n = 8). Rats received the first NaHS injection 3 h before and 1 h after the systolic blood pressure measurements. Animals were killed on gestation day 19 under overdose of isoflurane followed by exsanguination. Blood samples were collected in lyophilized ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Vacuntainer Becton Dickinson, Oxford, UK) for plasma separation. Plasma was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use for biochemical analysis. All procedures for animal experimentation were approved by the Ethics Committee, Biosciences Institute of Botucatu, São Paulo State University (protocol no. 619/2014), which is complied with international guidelines of the European Community for the use of experimental animals.

2.2 Blood pressure measurements

Systolic blood pressure (mmHg) was measured using tail-cuff plethysmography (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalog #EFF 306) on gestational days 12, 14, 16, and 18. Briefly, conscious rats were first acclimated in a quiet room, conditioned and restrained for 5-10 minutes in a warm box (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalog #EFF- 307) to the measurements for 3 days before the pregnancy day 12 (these data were discarded). Systolic blood pressure was determined as the average of the cuff inflation–deflation (three to six) cycles by a trained operator [15, 25, 33].

2.3 Fetal and placental parameters

On gestational day 19, after euthanasia, dams were placed in a supine position and a cesarean section was performed. The numbers of viable fetuses, placental and fetal weight were recorded. Placental efficiency was calculated as a ratio between fetal weight and placental weight, as previously demonstrated [34, 35]. Viable fetuses were determined as those which showed no macroscopical sign of malformation and could apparently have a normal outcome with the progression of the pregnancy, as previously reported [15, 36].

2.4 Determination of plasmatic and placental nitrite/nitrate (total NO_x)

Plasma and placental total NO_x concentrations were determined using Griess reagents followed by reduction of nitrous species with vanadium chloride III [37]. Placental tissue was homogenized in cold Krebs solution and the homogenates were centrifuged at 15000g at 4°C for 15 minutes. Supernatant was removed and used in Griess reaction. Briefly, before addition of Griess reagents, samples were incubated with 100µL of saturated solution of vanadium chloride III for three hours at 37°C with agitation. After incubation, 50 µL of 1% sulfanilamide solution in 5% phosphoric acid was added and plate incubated for 10 minutes protected from light. Then, 50 µL of 0.1% N-(1-Naphthyl)- ethylenediamine dihydrochloride solution were added followed by 10-minute incubation in dark. Absorbance at 535nm was read in spectrophotometer (Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT) and NO_x concentration was calculated using a standard curve of sodium nitrite (1.56-100 µM). The NO_x levels in plasma were expressed in µmol/L and in placental tissue results were expressed in µmol/100mg tissue.

2.5 Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined in placenta through the formation of malondialdehyde (MDA). MDA reacts with 2-thiobarbituric acid (TBA) and produce a colorimetric reaction that is measured by spectrophotometer at wavelength of 532nm [38]. In test tubes, a reaction mixture containing 100 μ L of distilled water, 50 μ L of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μ L of samples, 375 μ L of acetic acid 20% and 375 μ L of TBA 0.8% were incubated in water-bath at 95°C for one hour and subsequently centrifugated at 15000g for 10 minutes. Standard curve was prepared in a similar manner, replacing samples with 25 μ L of known concentrations of MDA. Plasmatic TBA reactive species (TBARS) were calculated against a standard curve of MDA (20-320 nmol). Results were expressed as MDA levels/100mg tissue.

2.6 Determination of H₂S in plasma

Plasma obtained from experimental animals was used to the determination of H₂S as previously [14, 39, 40]. In brief, 75 μ L of plasma was mixed with 250 μ L of zinc acetate 1% (wt/vol) and 12.5 μ L of NaOH 10% (w/v) and incubated for 30 minutes at 37°C. To the mixture, 150 μ L of 20 mmol/L of *N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfate in HCl 7.2M and 150 μ L of 30 mmol/L of FeCl₃ in HCl 1.2M were added. After 10 minutes of incubation at 37°C, 250 μ L of 10% trichloroacetic acid was added and the reaction mixture was centrifugated at 12000g for 15 minutes. The absorbance of the resulting supernatant (200 μ L) was measured at 670 nm with a spectrophotometer (Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT, USA) in a 96-well plate. The concentration of H₂S in the solution was calculated against a calibration curve of NaHS (100 - 3.13 μ M).

2.7 Determination of sFlt-1 and PlGF

Commercial enzyme immunoassay (ELISA) kits for sFlt-1 (RayBiotech Inc., Norcross, GA, #ELM-VEGFR1) and PIGF (Elabscience Inc., Houston, TX, #E-EL-R0742) were used to determine plasmatic levels. Assays were performed according to the manufacturer's instructions. Plasmatic levels of sFlt-1 and PIGF were expressed in pg/mL.

2.8 Vascular reactivity

Thoracic aortas were dissected in 3-4 mm segments. The rings were mounted into a 10 mL organ chamber containing Krebs-Henseleit solution (NaCl 130; KCl 4.7; CaCl₂ 1.6; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 15; glucose 11.1; in mmol/L) and suspended between two wire hooks; one hook was fixed to a stationary support, and the other hook connected to an isometric force transducer. The Krebs–Henseleit solution was kept at pH 7.4 and 37°C and bubbled continuously with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Arterial rings were stretched under 1.5g basal tension and were allowed to equilibrate for 45 min. Changes in aorta tension were recorded using FORT10 isometric force transducers (WPI, USA) connected to Transbridge 4M Transducer Amplifier (WPI, USA) connected to a PC based MP100 System and analysed off-line using AcqKnowledge version 3.5.7 software (Biopac Systems Inc., U.S.A.).

A control contraction to 96 mM of KCl was elicited after tissue equilibration. Once KCl maximum contraction was reached, tissue was rinsed with Krebs three times, 15 minutes each. Aorta rings were stimulated with increasing concentrations of phenylephrine (PHE, 10⁻¹⁰ to 10⁻⁴M). In order to investigate endothelial function, vascular tissues were pre-contracted with PHE (10⁻⁶M), increasing concentrations of acetylcholine (ACh, 10⁻⁹ to 10⁻⁵M) were added to the bath. Participation of endothelium-dependant NO in aortic rings relaxation was evaluated in concentration-

response curves to ACh obtained in the presence of N ω -nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME, 3x10⁻⁴M), added in the last 30-min stabilization period [41, 42]. Concentration-contraction curves were constructed, and the maximal response to PHE was measured. Concentration-effect curves to ACh, with or without L-NAME, were expressed as the % relaxation to PHE contraction. Non-linear regression (variable slope) of the obtained concentration-effect curves revealed the R_{max} (maximal response) and the pEC₅₀ (negative logarithm of the concentration that evoked 50% of the maximal response).

2.9 Data analysis and statistics

The results are expressed as means \pm SEM. Comparisons between groups were assessed by two-way analysis of variance (GraphPad Prism[®]6.0 – San Diego, CA) or one-way ANOVA followed by Tukey test. For vascular reactivity experiments, individual concentration-contraction or concentration-relaxation curves were constructed; sigmoidal curves were fitted to the data using the least square method, and the pEC₅₀ values were measured using GraphPad Prism[®]6.0 Software. The comparisons among R_{max} and pEC₅₀ values were determined by ANOVA followed by Tukey test. A probability value P < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 NaHS blunts increases in systolic blood pressure, improves fetal weight and reestablishes placental efficiency in hypertensive pregnant animals

In order to understand the effect of H₂S in hypertensive pregnant rats, we performed experiments with H₂S donor in hypertensive pregnant rats. No significant differences were observed in systolic blood pressure on days 12 and 14 (132 \pm 5-143 \pm 6

mmHg, Fig.1). Systolic blood pressure values were elevated in HTN-Preg group (153 ± 3 mmHg) compared with Norm-Preg (132 ± 2 mmHg, $P = 0.0048$) and Preg+NaHS groups (131 ± 8 mmHg) ($P = 0.085$, Fig. 1) and treatment with NaHS was not able to blunt increases in blood pressure (143 ± 2 mmHg in HTN-Preg+NaHS group, Fig. 1) on gestational day 16. However, on gestational day 18, HTN-Preg systolic blood pressure (155 ± 5 mmHg) was greater than Norm-Preg (132 ± 2 mmHg, $P = 0.0001$), Preg+NaHS (130 ± 2 mmHg, $P = 0.0001$) and treatment with NaHS in blunted increases in systolic blood pressure (130 ± 2 mmHg in HTN-Preg+NaHS group, $P = 0.0001$, Fig. 1).

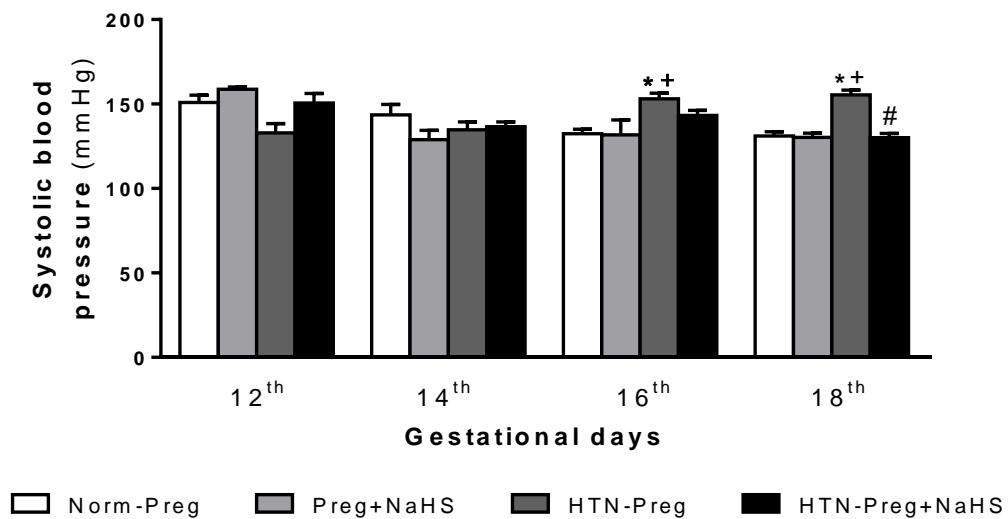


Figure 1 – Systolic blood pressure measured with tail-cuff plethysmography on gestational days 12, 14, 16 and 18 among the four groups. Normal pregnant (Norm-preg), pregnant + sodium hydrosulfide (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and hypertensive pregnant+sodium hydrosulfide (HTN-Preg+NaHS). Data represents mean \pm SEM. * $P < 0.05$ versus Norm-Preg; + $P < 0.05$ versus Preg+NaHS; # $P < 0.05$ versus HTN-Preg.

Number of viable fetuses was not different among the four experimental groups (12.4 ± 0.7 , 10.6 ± 1.4 , 13.5 ± 0.6 and 10.9 ± 0.7 in Norm-Preg, Preg+NaHS, HTN-Preg and

HTN-Preg+NaHS groups, respectively, Fig. 2A). Fetal weight in Norm-Preg group was 3.66 ± 0.13 g and this value was decreased in Preg+NaHS (3.18 ± 0.12 , $P = 0.0038$, Fig. 2B), HTN-Preg (1.72 ± 0.03 , $P = 0.0001$, Fig. 2B) and HTN-Preg+NaHS (2.33 ± 0.06 , $P = 0.0001$, Fig. 2B), however, treatment of hypertensive pregnant animals with NaHS improved fetal growth restriction and significant differences were found between HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS groups ($P = 0.0001$, Fig. 2B). Placental weight was increased in Preg+NaHS group (0.59 ± 0.02 g) compared with all the other groups ($P < 0.05$, Fig. 2B). Placental weight was 0.42 ± 0.01 g in Norm-Preg group and values were lower in HTN-Preg group (0.38 ± 0.01 g, $P = 0.0349$, Fig. 2C) and even lower in HTN-Preg+NaHS (0.31 ± 0.01 g, $P = 0.0001$, Fig. 2C). Moreover, a statistically significant decrease was observed between HTN-Preg+NaHS and HTN-Preg placental weight ($P = 0.0009$). Placental efficiency was taken as a ratio between fetal weight and placental weight and values decreased in Preg+NaHS and HTN-Preg group (5.0 ± 0.2 and 5.3 ± 0.2 , respectively) compared with Norm-Preg group (9.4 ± 0.4 , Fig. 2D) while placental efficiency was restored in HTN-Preg+NaHS group (7.6 ± 0.2 in HTN-Preg+NaHS, $P = 0.0001$, Fig. 2D).

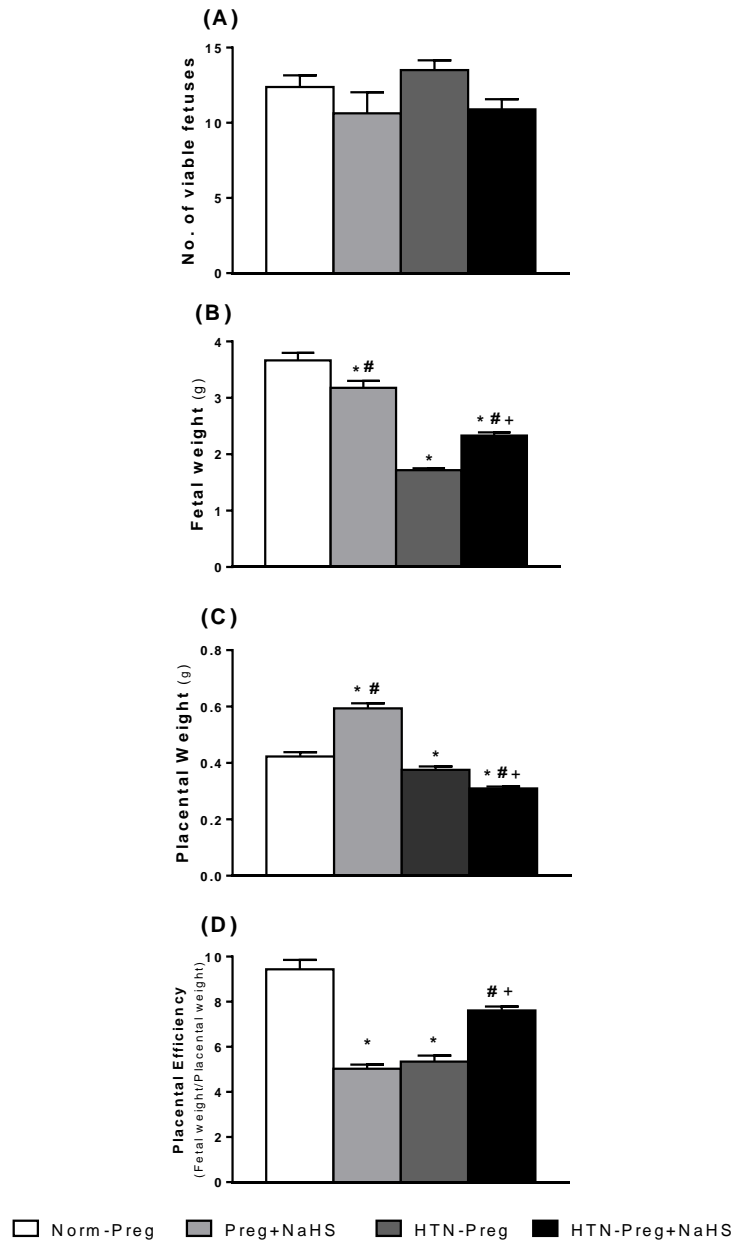


Figure 2 – Feto-placental parameters recorded on pregnancy day 19 among the four groups. Nomal pregnant (Norm-preg), pregnant + sodium hydrosulfide (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and hypertensive pregnant+sodium hydrosulfide (HTN-Preg+NaHS). **(A)** Number of viable fetuses. **(B)** Fetal weight. **(C)** Placental weight. **(D)** Placental efficiency. Data represents mean±SEM. *P < 0.05 versus Norm-Preg; # P < 0.05 versus HTN-Preg; +P < 0.05 versus Preg+NaHS.

3.2 NaHS increases placental total NOx and MDA levels in normotensive and hypertensive pregnant rats

H₂S and NO must crosstalk and H₂S may regulate NO production. Total NOx concentration was increased in placental tissue from rats of Preg+NaHS and HTN-Preg+NaHS groups (28.54±1.33 and 22.31±3.97 µg/100 mg tissue, respectively) compared with Norm-Preg group (11.32±1.89 µg/100 mg tissue, P = 0.0005 and P = 0.0216, respectively, Fig. 3A), also total NOx levels in HTN-Preg (15.31±1.46 µmol/100 mg tissue) was significantly lower from Preg+NaHS group (P = 0.0038, Fig. 3A).

As MDA is a metabolite of lipid peroxidation [43], increased MDA levels indicate higher levels of oxidative stress. We then determined MDA placental levels in our experimental animals. Placental MDA was elevated in Preg+NaHS and HTN-Preg+NaHS groups (11.64±0.59 and 15.44±1.82 nmol/100mg tissue) compared with Norm-Preg (5.16±0.34 nmol/100 mg tissue, P = 0.0087 and P = 0.0001, respectively, Fig. 3B). Also, MDA levels were significant higher in HTN-Preg+NaHS versus HTN-Preg group (8.00±0.05 nmol/100 mg tissue, P = 0.001, Fig. 3B).

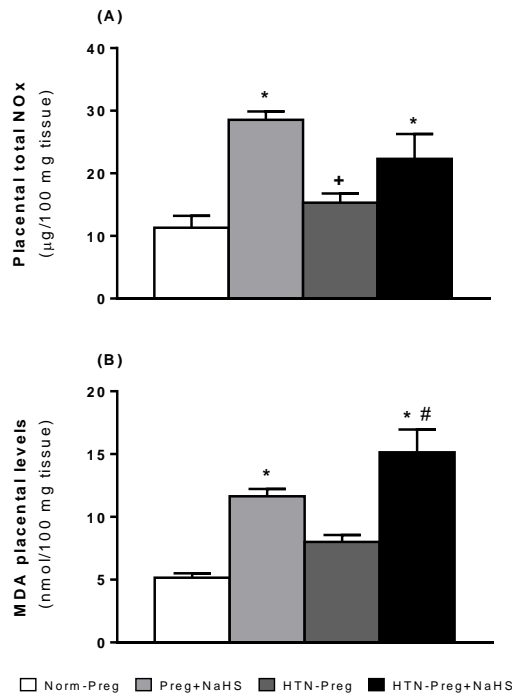


Figure 3 –Placental total NOx and MDA levels among the four groups. Normal pregnant (Norm-preg), pregnant + sodium hydrosulfide (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and hypertensive pregnant+sodium hydrosulfide (HTN-Preg+NaHS). **(A)** Placental total NOx. **(B)** MDA placental levels. Data represents mean±SEM. *P < 0.05 versus Norm-Preg; +P < 0.05 versus Preg+NaHS; #P < 0.05 versus HTN-Preg.

3.3 Beneficial effects of NaHS in hypertensive pregnant rats seems to not relate with antiangiogenic/proangiogenic balance

Beneficial effects of NaHS in fetoplacental parameters are thought to be related with improved angiogenesis. Plasmatic H₂S levels were increased in Preg+NaHS (66.09±7.30 µM) and HTN-Preg (63.77±5.36 µM) groups when compared to Norm-Preg (38.87±4.07 µM, P = 0.0038 and P = 0.0227, respectively, Fig. 4A). However, treatment of hypertensive pregnant animals with NaHS (HTN-Preg+NaHS group) did not change H₂S plasmatic levels (48.72±6.30 µM) compared to Norm-Preg rats (Fig. 4A).

sFlt-1 levels did not differ among the experimental groups (515.50±24.75, 461.60±57.80, 406.50±48.46 and 453.70±30.08 pg/mL in Norm-Preg, Preg+NaHS, HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS, respectively, Fig. 4B) and PlGF was decreased in Preg+NaHS (41.46±7.15 pg/mL), HTN-Preg (43.02±9.13 pg/mL) and HTN-Preg+NaHS (49.03±11.24 pg/mL) versus Norm-Preg (82.51±5.00 pg/mL, P < 0.05, Fig. 4C).

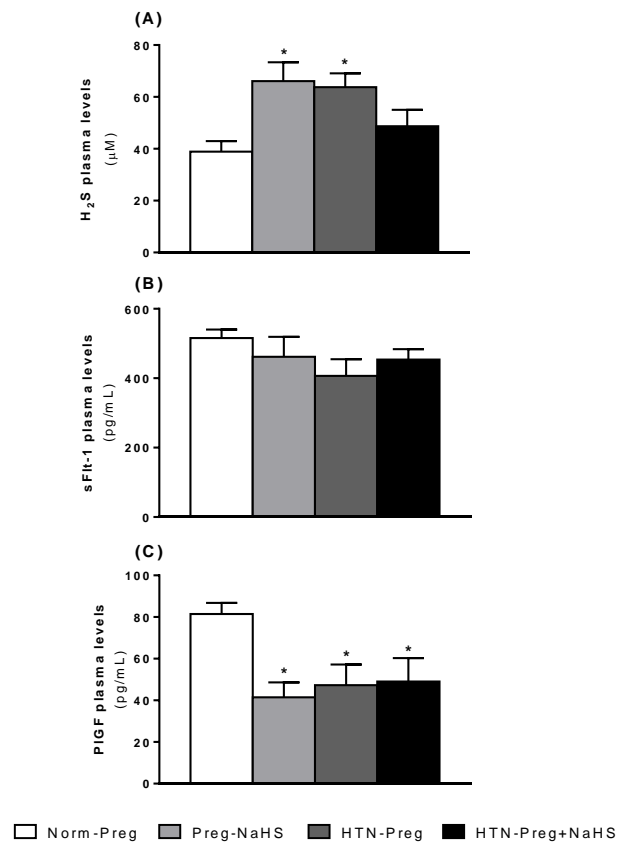


Figure 4 – Plasmatic levels of H₂S, anti- and pro-angiogenic factors among the four groups. Nomal pregnant (Norm-preg), pregnant + sodium hydrosulfide (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and hypertensive pregnant+sodium hydrosulfide (HTN-Preg+NaHS). Data represents mean±SEM. (A) H₂S plasmatic levels. (B) sFlt-1 plasmatic levels. (C) PlGF plasmatic levels. *P < 0.05 versus Norm-Preg.

3.4 Hypertensive pregnant rat aortas are hyperreactive to PHE and NaHS elicits an ACh-induced non-NO mediated relaxation

Vascular reactivity experiments were performed to assess direct vascular responses among the four different animal groups. KCl-induced contraction in endothelium intact thoracic aorta was not different among the four groups (1.17 ± 0.19 , 1.25 ± 0.16 , 1.18 ± 0.22 and 1.40 ± 0.14 g in Norm-Preg, Preg+NaHS, HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS, respectively, Fig. 5A, Table 1). E_{\max} to PHE was not different among groups (Fig. 4B, Table 1). However, pEC_{50} to PHE was increased in HTN-Preg compared with the other experimental groups ($P < 0.05$, Fig. 5B, Table 1). No differences were reached in maximum ACh-induced relaxation among the groups (Fig. 5C, Table 1). However, Preg+NaHS presented greater pEC_{50} values compared to HTN-Preg group ($P = 0.0296$, Fig. 5C, Table 1). Blockade of nitric oxide synthase (NOS) using L-NAME caused a decrease in relaxation in Norm-Preg, Preg+NaHS and HTN-Preg, however, a significant relaxation was observed in HTN-Preg+NaHS versus HTN-Preg group ($P = 0.0468$, Fig. 5D, Table 1).

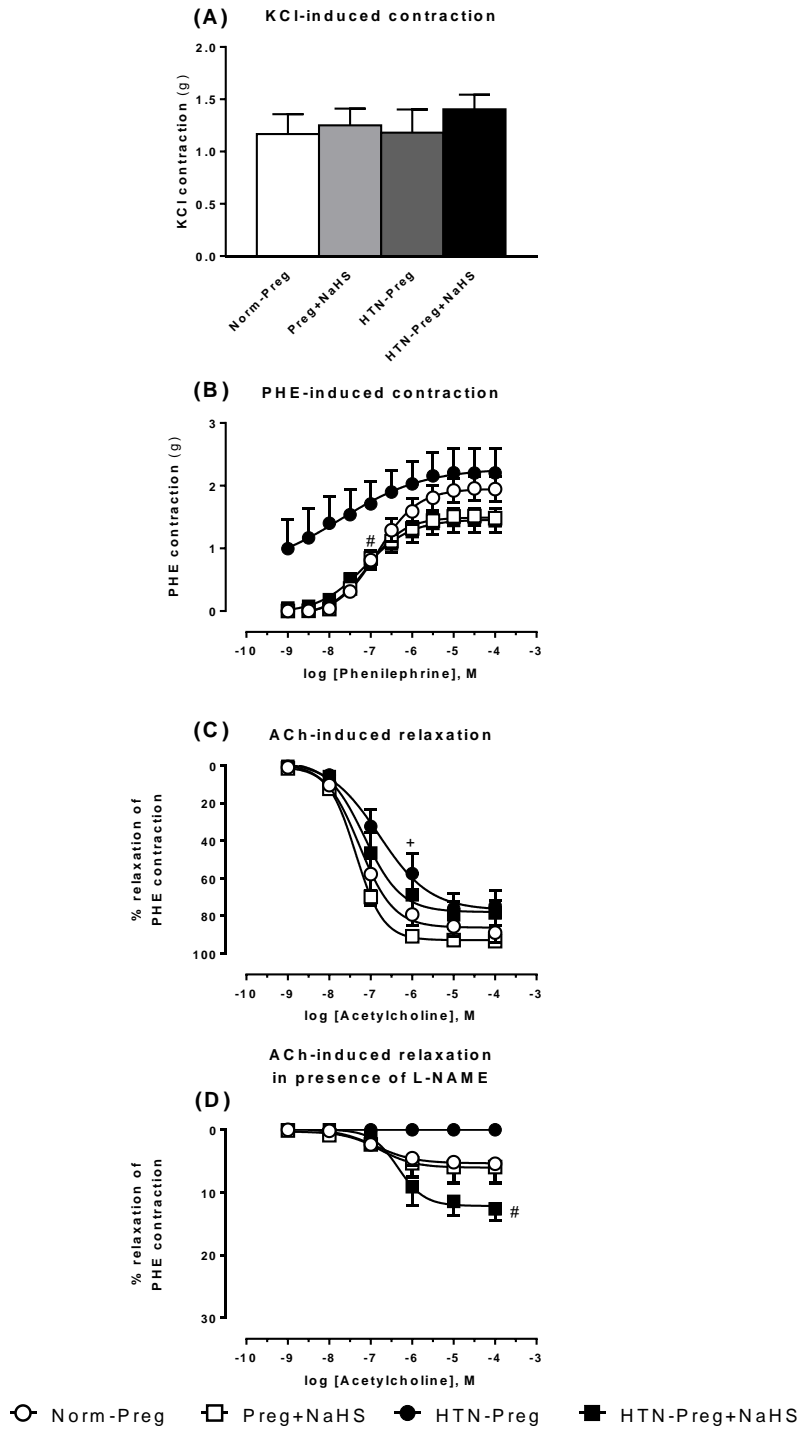


Figure 5 – Vascular reactivity of thoracic aorta rings with endothelium from animals of four different groups. Normal pregnant (Norm-preg), pregnant + sodium hydrosulfide (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and hypertensive pregnant+sodium

hydrosulfide (HTN-Preg+NaHS). (A) KCl-induced contraction. (B) PHE-induced contraction. (C) ACh-induced relaxation. (D) ACh-induced relaxation in presence of L-NAME. Data represent mean±SEM. # P < 0.05 versus HTN-Preg. + P < 0.05 versus Preg+NaHS.

ACh elicits a vasodilatory effect that is dependent of endothelial NO. As we observed relaxation in HTN-Preg+NaHS group even in the presence of L-NAME, we sought to investigate the effect of NaHS treatment in NO production. We found that total NOx in plasma was not different among the four groups (52.97±2.20, 63.50±15.33, 67.49±4.95, 59.55±5.12 µg/mL in Norm-Preg, Preg+NaHS, HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS, respectively, Fig. 6).

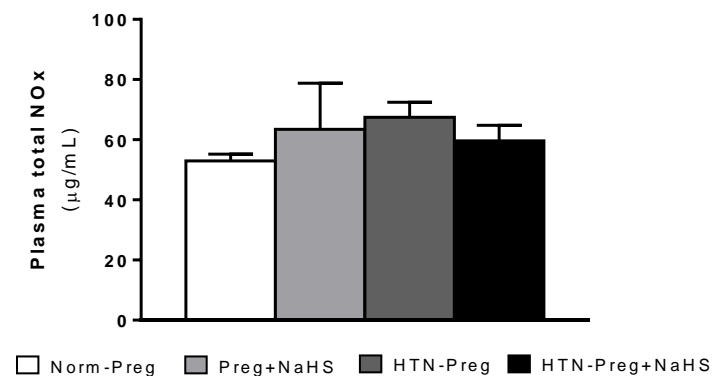


Figure 6 – Total NOx in plasma among the four groups. Nomal pregnant (Norm-preg), pregnant + sodium hydrosulfide (Preg+NaHS), hypertensive pregnant (HTN-Preg) and hypertensive pregnant+sodium hydrosulfide (HTN-Preg+NaHS). Data represents mean±SEM.

Table 1. KCl-induced contraction, PHE-induced contraction and ACh-induced relaxation in thoracic aorta of Norm-Preg, Preg+NaHS, HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS rats

Thoracic aorta				
	Norm-Preg	Preg+NaHS	HTN-Preg	HTN-Preg+NaHS
KCl R _{max} , g	1.17±0.19	1.25±0.16	1.18±0.22	1.40±0.14
PHE R _{max} , g	1.96±0.20	1.52±0.15	2.22±0.39	1.47±0.19
PHE pEC ₅₀ , -log M	6.78±0.12 [#]	7.07±0.05 [#]	7.80±0.30	7.17±0.09 [#]
ACh R _{max} , %	88.85±5.42	93.43±2.14	74.12±9.98	80.19±7.23
ACh pEC ₅₀ , -log M	7.19±0.12	7.36±0.07 [#]	6.62±0.30	6.95±0.24
ACh+L-NAME R _{max} , %	6.28±0.87	6.07±2.56	0.00±0.00	12.61±6.86 [#]

Data represents mean±SEM, *n* = 5-7. #*P* < 0.05 versus HTN-Preg.

4. Discussion

This study shows that treatment with NaHS blunted the increases in systolic blood pressure, improved fetal weight and restored placental efficiency in hypertensive pregnant rats. Our results suggest that reestablishment of placental efficiency in hypertensive pregnant rats treated with NaHS may not be related with circulating levels of sFlt-1 and PlGF, but may be partially modulated by increases in placental NO formation. This may induce greater vasodilation and decrease vascular resistance, allowing better blood supply to the growing fetuses. We also show that treatment with NaHS reduces the hyperreactivity to PHE in thoracic aorta and that this reduction may not depend on endothelial NO. Also, NaHS treatment triggers a vasorelaxation that is non-NO mediated in aortic rings.

In our hands, treatment with NaHS blunted the increases in systolic blood pressure in hypertensive pregnant animals (HTN-Preg+NaHS group). Our results are in accordance with previous results from our and other groups, in which H₂S donors presented antihypertensive effects in hypertensive pregnancy [14-16].

We did not observe any differences in number of viable fetuses among experimental groups; however, fetal weight was decreased in hypertensive animals. Fetal growth restriction is a common feature of preeclampsia and experimental models of hypertensive pregnancy [15, 25, 30, 42, 44-47]. Here we confirmed that hypertensive pregnancy caused a decrease in fetal weight while a treatment with NaHS improved fetal weight in HTN-Preg+NaHS animals. Also, placental weight was decreased in HTN-Preg and further decreased in HTN-Preg+NaHS group; however, placental efficiency, a parameter used to measure nutrient transfer capacity from the placenta to the fetus [48-50], was reestablished in HTN-Preg+NaHS group.

Decreased fetal weight was followed by an increase in placental weight in animals from Preg+NaHS group; therefore, placental efficiency was reduced in these animals. It has been shown before that H₂S may act as a pro-angiogenic [14, 17, 51-54], and increased angiogenesis could explain the increases in placental weight in Preg+NaHS group. Also, H₂S may exert direct vasoactive responses and though H₂S response is primarily vasodilation, it has been shown before that H₂S may also induce vasoconstriction [55-57]. Our results suggest that although increases in angiogenesis may happen as a result of NaHS treatment, nutrient transfer capacity from placenta to the fetus is compromised and we speculate that this may be due to increases in vasoconstriction promoted by NaHS in non-hypertensive animals, which explains the slightly reduced fetal weight in Preg+NaHS compared with Norm-Preg group.

Increases in nutrient transfer capacity from the placenta to the fetus in HTN-Preg+NaHS animals could be a consequence of increased vasodilation and diminished vascular resistance in placental tissues. Indeed, placental total NO_x were increased in placentas from both groups treated with NaHS (Preg+NaHS and HTN-Preg+NaHS groups) when compared to Norm-Preg. In recent studies, it has been proposed that H₂S may modulate NO production [58, 59] and our results regarding placental NO_x levels are in accordance with this idea. In our study, no significant differences were found between placental NO_x levels from HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS animals, however, the significant increases in HTN-Preg+NaHS versus Norm-Preg, suggests that placental NO may partially contribute to the reestablishment of placental efficiency in HTN-Preg+NaHS animals.

Since our treatment with NaHS seems to affect utero-placental region, we also evaluated oxidative stress in placenta. We found increased levels of MDA, a metabolite of lipid peroxidation [43], in normotensive (Preg+NaHS group) and hypertensive

(HTN-Preg+NaHS group) groups treated with NaHS. As placental efficiency was increased in HTN-Preg+NaHS group, we suggest that an increased metabolism of placenta may be related with increases in oxidative stress. Also, increased oxidative stress scavenges NO [60, 61] and may partially consume the placental NO and blunt the significant increase in NOx between HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS.

Placental efficiency in rats has been shown to be related with reductions in sFlt-1 and increases in PlGF levels [35]. We sought to investigate if changes in angiogenic factors would be related with increased placental efficiency in NaHS treated hypertensive rats. As expected, treatment with NaHS increased H₂S plasmatic levels in Preg+NaHS group. It has been shown before that decreased levels of H₂S are related with hypertension [14, 62-64]; however, we surprisingly found increased H₂S plasmatic levels in HTN-Preg when compared to Norm-Preg. We suggest that DOCA-induced hypertension may trigger mechanisms that increases H₂S production, as it has been shown that H₂S may exert protective effects during cardiovascular disorders [65-67]. Taken together, our data show that increases in H₂S levels in HTN-Preg rats were unsuccessful to exert protective effects.

Previous reports on literature show that H₂S may modulate sFlt-1 production [68, 69], moreover, exogenous H₂S as donated by NaHS decreases sFlt-1 production [16, 68, 69]. Though sFlt-1 is commonly increased in preeclampsia and experimental hypertensive pregnant rats [15, 16, 25, 70-72], no differences were observed in sFlt-1 plasmatic levels in HTN-Preg animals, as previously reported [73, 74]. Moreover, we observed decreased PlGF plasmatic levels in Preg+NaHS, HTN-Preg and HTN-Preg+NaHS groups. PlGF is a pro-angiogenic factor that increases during healthy pregnancies [75] and decreased levels of PlGF are related with preeclampsia [70, 75-78] and delivery of small for gestational age neonates, without preeclampsia [75].

Moreover, it has been shown before that PlGF levels are reduced in an animal model of reduced uterine perfusion pressure [79] and in DOCA-salt hypertensive pregnant rats [74], which is in accordance with our findings on HTN-Preg group.

As H₂S may act as a pro-angiogenic factor [14, 17, 51-53], direct effects of H₂S in angiogenesis may overlap the actions of PlGF and reduce its availability, partially contributing to reductions in PlGF in NaHS treated animals. In our hands, treatment of hypertensive pregnant rats with NaHS improved fetal weight, but not restored it to normal levels and did not improve placental weight. Thus, increases in PlGF levels seem not to be involved with the beneficial effects of NaHS in our study. However, it has been shown before that treatment with NaHS in hypertensive pregnant rats, increased Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in plasma [16], and though PlGF levels were not increased in our studies, increases in VEGF may also contribute to the beneficial effects observed upon the use of NaHS.

H₂S may have direct effects in vessels and it could explain the beneficial effects of NaHS observed in our study. No differences were reached in KCl-induced contraction between groups. Also, no differences in E_{max} to PHE were observed; however, aortic rings from HTN-Preg animals presented an increase in pEC₅₀. While the findings on KCl-induced contraction do not point to increased vascular Ca²⁺ influx through voltage-gated Ca²⁺ channels [42, 80], PHE may also activate Ca²⁺ influx through receptor and store-operated Ca²⁺ channels [42, 80], thus a greater influx of Ca²⁺ induced by DOCA-induced hypertension must be considered. Consistent vasoconstriction is a hallmark of hypertension and hyperreactivity to PHE may contribute to the increases in systolic blood pressure in HTN-Preg rats. Importantly, treatment with NaHS blunted the increases in pEC₅₀ in HTN-Preg+NaHS group and this may contribute to the observed decreases in systolic blood pressure.

The increased sensitivity to PHE in HTN-Preg rats may arise from fails in the release of vasodilator factors from the endothelium, as endothelial dysfunction is closely related to hypertension [81, 82]. Thus, the blunted hyperreactivity to PHE observed in HTN-Preg+NaHS could be related with reestablishment of endothelial relaxant responses. Interactions between H₂S and NO have been previously described [15, 26, 83-85], and as H₂S may potentiate NO responses [86], this interaction could explain the reestablished sensitivity to PHE in HTN-Preg+NaHS animals. To test this hypothesis, ACh-induced relaxation curves, that trigger releases of endothelial NO, have been performed. No differences were observed in pEC₅₀ and E_{max} to ACh in HTN-Preg+NaHS when compared to HTN-Preg group; however, we found that aortic rings from Preg+NaHS presented an increased pEC₅₀ when compared to HTN-Preg in concentration-response curves to ACh. This increased sensibility to ACh in Preg+NaHS aortas suggests the occurrence of interactions between H₂S and NO, however, the presence of hypertension blunted the effects of these interactions. Also, our results suggest that decreased hyperreactivity to PHE in HTN-Preg+NaHS animals is not related to an improvement in endothelial NO-dependent relaxation.

When relaxation was triggered by ACh in the presence of NOS inhibitor L-NAME, a greater relaxation was reached in aortic rings from animals of HTN-Preg+NaHS compared to HTN-Preg group. Previous studies showed that H₂S may increase expression and activity of eNOS [58, 59], thus generating excessive amounts of NO that could be responsible for the relaxation observed even in the presence of L-NAME. Also, it has been described that H₂S was responsible for NO formation under hypoxic conditions [87]. In this study, NO was generated in a NOS-independent manner, through the reduction of nitrite back to NO [87] and since our results in fetoplacental parameters suggest utero-placental hypoxia, this mechanism could be

triggered in our study. However, we did not observe any alteration in plasmatic total NO_x from animals of different groups.

This result supports our observation in vascular reactivity experiments that relaxation in HTN-Preg+NaHS group may be triggered in a NO-independent way. Since NO-independent relaxation was reached in vessels from HTN-Preg+NaHS group and not in vessels from animals treated only with NaHS, we speculate that only in presence of hypertension, which may trigger several defensive mechanisms in the organism, H₂S promote relaxation independently from NO presence and strongly recommend future studies in the field.

5. Conclusion

Taken together, our results suggest that the H₂S donor, NaHS, blunts increases in systolic blood pressure and also ameliorates fetal weight and restores placental efficiency in hypertensive pregnant rats. We suggest that effects of NaHS are not related with changes in the plasmatic levels of sFlt-1 and PlGF, but a partial contribution of placental NO may underlie these effects. Also, NaHS treatment affects vascular function preventing hyperreactivity to PHE and inducing a non NO-mediated relaxation in thoracic aorta and this may also be related with the beneficial effects of NaHS observed in our studies.

Conflict of interest

There are no known conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by fundings from the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP, Brazil – process number 2016/18782-3) and Coordenacao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES, Brazil).

REFERENCES

1. Say, L., et al., *Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis*. Lancet Glob Health, 2014. **2**(6): p. e323-33.
2. Chang, J., et al., *Pregnancy-related mortality surveillance--United States, 1991-1999*. MMWR Surveill Summ, 2003. **52**(2): p. 1-8.
3. Brennan, L.J., J.S. Morton, and S.T. Davidge, *Vascular dysfunction in preeclampsia*. Microcirculation, 2014. **21**(1): p. 4-14.
4. Podymow, T. and P. August, *New Evidence in the Management of Chronic Hypertension in Pregnancy*. Semin Nephrol, 2017. **37**(4): p. 398-403.
5. Maynard, S.E., et al., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 649-58.
6. Maynard, S.E., et al., *Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia*. Pediatr Res, 2005. **57**(5 Pt 2): p. 1R-7R.
7. Possomato-Vieira, J.S. and R.A. Khalil, *Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia*. Adv Pharmacol, 2016. **77**: p. 361-431.
8. Uzan, J., et al., *Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management*. Vasc Health Risk Manag, 2011. **7**: p. 467-74.
9. Palei, A.C., et al., *Pathophysiology of hypertension in pre-eclampsia: a lesson in integrative physiology*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **208**(3): p. 224-33.
10. Szabo, C., *A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator*. Biochem Pharmacol, 2017.
11. Ford, A., et al., *Chronic NaHS Treatment Is Vasoprotective in High-Fat-Fed ApoE(-/-) Mice*. Int J Vasc Med, 2013. **2013**: p. 915983.
12. Al-Magableh, M.R., B.K. Kemp-Harper, and J.L. Hart, *Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice*. Hypertens Res, 2015. **38**(1): p. 13-20.
13. Suzuki, K., et al., *Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. 13829-34.
14. Wang, K., et al., *Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine gamma-lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia*. Circulation, 2013. **127**(25): p. 2514-22.
15. Possomato-Vieira, J.S., et al., *Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016. **389**(12): p. 1325-1332.
16. Holwerda, K.M., et al., *Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(4): p. 717-25.
17. Papapetropoulos, A., et al., *Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21972-7.
18. Wang, M.J., et al., *The hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(9): p. 1065-77.

19. Kabil, O., N. Motl, and R. Banerjee, *H₂S and its role in redox signaling*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1844**(8): p. 1355-66.
20. Spassov, S.G., et al., *Hydrogen Sulfide Prevents Formation of Reactive Oxygen Species through PI3K/Akt Signaling and Limits Ventilator-Induced Lung Injury*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 3715037.
21. Sodha, N.R., et al., *Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(4): p. 977-84.
22. Wang, L., et al., *Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia*. Endocrine, 2015. **48**(1): p. 299-308.
23. Eleuterio, N.M., et al., *Relationship between adiponectin and nitrite in healthy and preeclampsia pregnancies*. Clin Chim Acta, 2013. **423**: p. 112-5.
24. Amaral, L.M., et al., *17-hydroxyprogesterone caproate significantly improves clinical characteristics of preeclampsia in the reduced uterine perfusion pressure rat model*. Hypertension, 2015. **65**(1): p. 225-31.
25. Goncalves-Rizzi, V.H., et al., *Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor*. Nitric Oxide, 2016. **57**: p. 71-78.
26. Hosoki, R., N. Matsuki, and H. Kimura, *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 527-31.
27. Cortese-Krott, M.M., et al., *Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(34): p. E4651-60.
28. Coletta, C., et al., *Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(23): p. 9161-6.
29. Uddin, M.N., et al., *Marinobufagenin is an upstream modulator of Gadd45a stress signaling in preeclampsia*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(1): p. 49-58.
30. Mitchell, B.M., et al., *Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension*. Am J Hypertens, 2007. **20**(12): p. 1297-304.
31. Tinsley, J.H., et al., *Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(3): p. R713-9.
32. Ianosi-Irimie, M., et al., *A rat model of preeclampsia*. Clin Exp Hypertens, 2005. **27**(8): p. 605-17.
33. Nascimento, R.A., et al., *Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015. **116**(6): p. 508-15.
34. Gilbert, J.S., et al., *Circulating and utero-placental adaptations to chronic placental ischemia in the rat*. Placenta, 2012. **33**(2): p. 100-5.
35. Gilbert, J.S., et al., *Exercise training attenuates placental ischemia-induced hypertension and angiogenic imbalance in the rat*. Hypertension, 2012. **60**(6): p. 1545-51.

36. Ma, R.Q., M.N. Sun, and Z. Yang, *Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestational stage on fetoplacental outcomes in a mouse model*. Chin Med J (Engl), 2010. **123**(6): p. 707-12.
37. Miranda, K.M., M.G. Espey, and D.A. Wink, *A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite*. Nitric Oxide, 2001. **5**(1): p. 62-71.
38. Perico, L.L., et al., *Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of Serjania marginata Casar. (Sapindaceae) in rats*. J Ethnopharmacol, 2015. **172**: p. 312-24.
39. Zhuo, Y., et al., *Cardioprotective effect of hydrogen sulfide in ischemic reperfusion experimental rats and its influence on expression of survivin gene*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(8): p. 1406-10.
40. Zhao, F., et al., *Hydrogen sulfide alleviates placental injury induced by maternal cigarette smoke exposure during pregnancy in rats*. Nitric Oxide, 2017.
41. Baptista Rde, F., et al., *Endothelial AT(1) and AT(2) pathways in aortic responses to angiotensin II after stress and ethanol consumption in rats*. Stress, 2014. **17**(6): p. 512-9.
42. Zhu, M., et al., *Restoring placental growth factor-soluble fms-like tyrosine kinase-1 balance reverses vascular hyper-reactivity and hypertension in pregnancy*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016. **311**(3): p. R505-21.
43. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. Anal Biochem, 1979. **95**(2): p. 351-8.
44. Dias-Junior, C.A., et al., *Angiogenic imbalance and diminished matrix metalloproteinase-2 and -9 underlie regional decreases in uteroplacental vascularization and fetoplacental growth in hypertensive pregnancy*. Biochem Pharmacol, 2017.
45. Nanjo, S., et al., *Levels of serum-circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with preeclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction*. J Obstet Gynaecol Res, 2017.
46. Story, L. and L.C. Chappell, *Preterm pre-eclampsia: What every neonatologist should know*. Early Hum Dev, 2017.
47. Faulkner, J.L., et al., *Vitamin D supplementation improves pathophysiology in a rat model of preeclampsia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016. **310**(4): p. R346-54.
48. Chen, S., et al., *Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction linked to reduced fetal weight in mice*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10596.
49. McLaren, A., *Genetic and Environmental Effects on Foetal and Placental Growth in Mice*. J Reprod Fertil, 1965. **9**: p. 79-98.
50. Fowden, A.L., et al., *Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 14): p. 3459-72.
51. Sonke, E., et al., *Inhibition of endogenous hydrogen sulfide production in clear-cell renal cell carcinoma cell lines and xenografts restricts their growth, survival and angiogenic potential*. Nitric Oxide, 2015. **49**: p. 26-39.
52. Szabo, C. and M.R. Hellmich, *Endogenously produced hydrogen sulfide supports tumor cell growth and proliferation*. Cell Cycle, 2013. **12**(18): p. 2915-6.

53. Szabo, C., et al., *Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(30): p. 12474-9.
54. Chen, D., et al., *Human trophoblast-derived hydrogen sulfide stimulates placental artery endothelial cell angiogenesis*. Biol Reprod, 2017.
55. Li, S., et al., *H2S induces vasoconstriction of rat cerebral arteries via cAMP/adenylyl cyclase pathway*. Toxicol Appl Pharmacol, 2015. **289**(3): p. 389-96.
56. d'Emmanuele di Villa Bianca, R., et al., *Hydrogen sulfide-induced dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(1): p. 59-64.
57. Lim, J.J., et al., *Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(5): p. C1261-70.
58. Chen, P.H., et al., *Hydrogen sulfide increases nitric oxide production and subsequent S-nitrosylation in endothelial cells*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 480387.
59. Huang, B., et al., *Laminar shear flow increases hydrogen sulfide and activates a nitric oxide producing signaling cascade in endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **464**(4): p. 1254-9.
60. Macarthur, H., T.C. Westfall, and G.H. Wilken, *Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(1): p. H183-9.
61. Kagota, S., et al., *Peroxyntirite is Involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(6): p. 677-85.
62. van Goor, H., et al., *Hydrogen sulfide in hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(2): p. 107-13.
63. Greaney, J.L., et al., *Impaired Hydrogen Sulfide-Mediated Vasodilation Contributes to Microvascular Endothelial Dysfunction in Hypertensive Adults*. Hypertension, 2017. **69**(5): p. 902-909.
64. Cacanyiova, S., et al., *The adaptive role of nitric oxide and hydrogen sulphide in vasoactive responses of thoracic aorta is triggered already in young spontaneously hypertensive rats*. J Physiol Pharmacol, 2016. **67**(4): p. 501-512.
65. Jin, S., et al., *Hydrogen sulfide ameliorated L-NAME-induced hypertensive heart disease by the Akt/eNOS/NO pathway*. Exp Biol Med (Maywood), 2017: p. 1535370217732325.
66. Cui, J., et al., *Hydrogen sulfide facilitates production of nitric oxide via the Akt/endothelial nitric oxide synthases signaling pathway to protect human umbilical vein endothelial cells from injury by angiotensin II*. Mol Med Rep, 2017.
67. Tomasova, L., et al., *Na2S, a fast-releasing H2S donor, given as suppository lowers blood pressure in rats*. Pharmacol Rep, 2017. **69**(5): p. 971-977.
68. Hu, T.X., et al., *MiR133b is involved in endogenous hydrogen sulfide suppression of sFlt-1 production in human placenta*. Placenta, 2017. **52**: p. 33-40.

69. Hu, T.X., et al., *Hydrogen Sulfide Inhibits High Glucose-Induced sFlt-1 Production via Decreasing ADAM17 Expression in 3T3-L1 Adipocytes*. *Int J Endocrinol*, 2017. **2017**: p. 9501792.
70. Molvarec, A., et al., *Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia*. *J Reprod Immunol*, 2015. **112**: p. 53-7.
71. Murphy, S.R. and K. Cockrell, *Regulation of soluble fms-like tyrosine kinase-1 production in response to placental ischemia/hypoxia: role of angiotensin II*. *Physiol Rep*, 2015. **3**(2).
72. Tuzcu, Z.B., et al., *Circulating endothelial cell number and markers of endothelial dysfunction in previously preeclamptic women*. *Am J Obstet Gynecol*, 2015. **213**(4): p. 533 e1-7.
73. Bobek, G., et al., *Placental Regulation of Inflammation and Hypoxia after TNF-alpha Infusion in Mice*. *Am J Reprod Immunol*, 2015. **74**(5): p. 407-18.
74. Agunanne, E.E., et al., *Contribution of angiogenic factors in a rat model of preeclampsia*. *Am J Nephrol*, 2010. **32**(4): p. 332-9.
75. Romero, R., et al., *A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2008. **21**(1): p. 9-23.
76. Bian, Z., C. Shixia, and T. Duan, *First-Trimester Maternal Serum Levels of sFLT1, PGF and ADMA Predict Preeclampsia*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0124684.
77. Ramma, W., et al., *The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia*. *Angiogenesis*, 2012. **15**(3): p. 333-40.
78. Tsatsaris, V., et al., *Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(11): p. 5555-63.
79. Gilbert, J.S., S.A. Babcock, and J.P. Granger, *Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression*. *Hypertension*, 2007. **50**(6): p. 1142-7.
80. Murphy, J.G., et al., *Enhanced [Ca²⁺]_i in renal arterial smooth muscle cells of pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(1): p. H393-403.
81. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017. **219**(1): p. 22-96.
82. Lockette, W., Y. Otsuka, and O. Carretero, *The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension*. *Hypertension*, 1986. **8**(6 Pt 2): p. II61-6.
83. Aydinoglu, F., et al., *The interaction of l-cysteine/H₂S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum*. *Nitric Oxide*, 2017. **70**: p. 51-58.
84. Materazzi, S., et al., *Vasodilator activity of hydrogen sulfide (H₂S) in human mesenteric arteries*. *Microvasc Res*, 2017. **109**: p. 38-44.
85. Wang, Y.F., et al., *Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats*. *Chin Med J (Engl)*, 2008. **121**(5): p. 420-3.
86. Bucci, M., et al., *Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(10): p. 1998-2004.

87. Bir, S.C., et al., *Hydrogen sulfide stimulates ischemic vascular remodeling through nitric oxide synthase and nitrite reduction activity regulating hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(5): p. e004093.

Discussão

4 Discussão

As desordens hipertensivas gestacionais, como a PE, ainda representam um importante fator de morbidade e mortalidade para mães e filhos. Embora sua fisiopatologia não esteja totalmente esclarecida, atualmente aceita-se que ela envolve dois diferentes estágios: o primeiro relaciona-se à má placentação que conduz à isquemia/hipóxia placentária e o segundo liga-se à liberação de fatores bioativos, os quais promovem danos a células endoteliais (Roberts 1998).

A disfunção endotelial, portanto, é uma característica das desordens hipertensivas da gestação, evidenciada por estudos que mostram a ocorrência da disfunção endotelial em mulheres pré-eclâmpticas (Knock and Poston 1996, Kenny, Baker et al. 2002, Brandao, Felix et al. 2014, Guimaraes, Brandao et al. 2014) e em diferentes modelos experimentais de hipertensão gestacional (Alexander, Kassab et al. 2001, Payne, Alexander et al. 2003, Mitchell, Cook et al. 2007, Mazzuca, Li et al. 2014, Amaral, Cornelius et al. 2015, Morris, Spencer et al. 2016).

A disfunção endotelial é marcada por aumentos da liberação de substâncias vasoconstritoras, como a ET-1 (Pollock and Pollock 2011, Coelho, Berillo et al. 2018), e diminuições na liberação de substâncias vasodilatadoras. Dentre essas substâncias vasodilatadoras, o NO tem sido amplamente estudado em uma série de diferentes condições fisiológicas e patológicas, o que inclui a gestação (Williams, Vallance et al. 1997, Alexander, Miller et al. 1999, Shaamash, Elsnosy et al. 2000, Hefler, Reyes et al. 2001) e a hipertensão gestacional (Sandrim, Palei et al. 2008, Ehsanipoor, Fortson et al. 2013, Eleuterio, Palei et al. 2013, Pimentel, Pereira et al. 2013, Wang, Yang et al. 2015).

Em nosso modelo experimental de hipertensão gestacional utilizado para os estudos descritos no artigo descrito no Capítulo I, observamos a importância do NO na manutenção da homeostase vascular durante a gestação, uma vez que o uso de L-NAME causou o aumento da pressão arterial sistólica, diminuição do número de filhotes viáveis, do tamanho da ninhada e do peso placentário, indicando que NO produz efeitos na circulação sistêmica e uteroplacentária.

Portanto, nossos resultados confirmam achados de estudos prévios, nos quais uso de L-NAME levou à ocorrência de características da PE em animais prenhes (Agunanne, Uddin et al. 2010, Ramesar, Mackraj et al. 2011, Gillis, Williams et al. 2015, Morris, Spencer et al. 2016). Além disso, em suporte a nossa observação, evidências anteriores relataram uma forte correlação entre os parâmetros materno-fetais e o fluxo sanguíneo uteroplacentário, sendo que

reduções nestes parâmetros podem refletir a isquemia/hipóxia induzida por L-NAME em ratas (Kaya, Boztosun et al. 2011).

Em nosso estudo, as ratas prenhes hipertensas foram tratadas com um doador de H₂S, o NaHS. O uso do doador preveniu os aumentos de pressão arterial sistólica nesses animais e corrobora com os achados de outros estudos que mostraram o efeito anti-hipertensivo do H₂S, em diferentes modelos de hipertensão (Zhao, Zhang et al. 2001, Yan, Du et al. 2004, Shi, Chen et al. 2007, Li, Whiteman et al. 2008, Yang, Wu et al. 2008, Lu, Liu et al. 2010, Huang, Shen et al. 2016) e na hipertensão gestacional (Wang, Ahmad et al. 2013, Holwerda, Burke et al. 2014).

Nós também observamos que a redução da pressão arterial foi acompanhada de melhora nos parâmetros fetais e, uma vez que evidências anteriores mostraram que os parâmetros materno-fetais correlacionam-se com o fluxo sanguíneo uteroplacentário (Kaya, Boztosun et al. 2011), melhoras produzidas pelo doador podem indicar efeitos do H₂S na circulação uteroplacentária. Portanto, podemos sugerir que a diminuição da pressão arterial pode também decorrer da consequência de uma redução da resistência vascular periférica mediada pelo H₂S na circulação uteroplacentária, afinal a redução da resistência vascular oriunda da circulação uteroplacentária é um importante mecanismo de regulação da pressão arterial durante a gestação (Sladek, Magness et al. 1997).

Curiosamente, nós observamos um aumento do peso fetal em animais normotensos tratados com doador de H₂S. Estudos prévios mostraram que, durante os estágios finais da gestação, a maturação do tecido placentário, seguido por um rápido crescimento do feto, leva à maior capacidade de transporte da placenta (Mayr, Lederer et al. 2005, Ma, Sun et al. 2010, Kaya, Boztosun et al. 2011, Bajjnath, Soobryan et al. 2014, Motta, Grosso et al. 2015, Shi, Chen et al. 2015). Portanto, é possível que o doador de H₂S sirva como um “facilitador” dos processos de transporte de nutrientes através da placenta.

Contudo, o tratamento com o doador de H₂S em ratas prenhes hipertensas não promoveu aumento do peso fetal, sugerindo que a presença de hipertensão inibe essa “facilitação” promovida pelo doador. Além disso, foi observada a diminuição do peso placentário em ratas prenhes hipertensas e essa redução não foi inibida com o uso do doador, indicando que doador não foi capaz de suplantare o efeito da inibição do NO sobre o tecido placentário.

A teoria dos dois estágios da PE proposta por Roberts (Roberts 1998) declara que fatores bioativos liberados pela placenta promovem danos às células endoteliais e posteriores

estudos demonstraram a importância do fator anti-angiogênico sFlt-1 na PE (Maynard, Min et al. 2003, Eleuterio, Palei et al. 2014, Bian, Shixia et al. 2015, Garamvolgyi, Prohaszka et al. 2015, March, Geahchan et al. 2015, Tuzcu, Asicioglu et al. 2015) e na hipertensão gestacional experimental (Gilbert, Babcock et al. 2007, Ramesar, Mackraj et al. 2011, Gillis, Williams et al. 2015, Murphy and Cockrell 2015, Goncalves-Rizzi, Possomato-Vieira et al. 2016, Zhu, Ren et al. 2016).

Em conformidade com esses achados, nós também encontramos aumento dos níveis circulantes de sFlt-1 nas ratas prenhes hipertensas. Nosso modelo experimental consistiu-se na inibição da NOS pelo L-NAME e nossos achados, referente aos níveis de sFlt-1, também confirmam achados prévios que demonstram que a redução dos níveis de NO é inversamente proporcional aos níveis de sFlt-1 (Sandrim, Palei et al. 2008, Pimentel, Pereira et al. 2013, Amaral, Cornelius et al. 2015).

O tratamento das ratas prenhes hipertensas com o doador de H₂S levou a reduções dos níveis de sFlt-1 em nosso modelo experimental. Reduções nos níveis de fatores anti-angiogênicos (Wang, Ahmad et al. 2013, Holwerda, Burke et al. 2014) ou a correção do desequilíbrio entre os níveis circulantes de fatores anti/pró-angiogênicos (Zhu, Ren et al. 2016) foram correlacionadas com melhora da pressão arterial em outros modelos animais de hipertensão gestacional. Portanto, baseado na hipótese de que os fatores bioativos liberados pela placenta originam a disfunção endotelial (Roberts 1998), as diminuições dos níveis de sFlt-1, promovidas pelo tratamento com o doador de H₂S (e conseqüente diminuição das injúrias endoteliais) do nosso modelo também podem contribuir para a diminuição da pressão arterial.

Ademais, estudos prévios mostram que a utilização de anticorpos específicos para sFlt-1 promove a redução dos níveis de sFlt-1 e restabelece a formação do túbulo endotelial em um ensaio de angiogênese (Ahmad and Ahmed 2004). Dessa maneira, a diminuição nos níveis de sFlt-1, observadas em nossos estudos, podem contribuir para uma melhora dos processos angiogênicos e conseqüente melhora da vascularização uteroplacentária, evidenciada pelo restabelecimento do número de filhotes viáveis e do tamanho da ninhada de ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S.

Durante a realização dos nossos experimentos, o trabalho de Holwerda e colaboradores, *“Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor”* foi publicado pelo *Journal of the American Society of Nephrology* (Holwerda, Burke et al. 2014). Nesse trabalho, os autores

utilizaram o doador de H₂S em um modelo experimental de hipertensão gestacional induzida pela superexpressão de sFlt-1 em ratas prenhes e mostraram, assim como em nossos achados, reduções da pressão arterial e reduções dos níveis de sFlt-1. Além disso, os autores relacionaram os efeitos benéficos do doador de H₂S com um aumento da expressão renal e dos níveis circulantes de VEGF.

Assim como Holwerda e seus colaboradores, esperávamos encontrar aumento dos níveis de VEGF após o tratamento com o doador de H₂S em nossos animais, entretanto, nossos resultados, surpreendentemente, mostraram que o tratamento com o doador de H₂S preveniu os aumentos dos níveis de VEGF, observados em ratas prenhes hipertensas.

Embora o H₂S seja um importante mediador das funções angiogênicas, ainda não é consenso se os níveis de VEGF encontram-se inalterados (Masoura, Kalogiannidis et al. 2014), diminuídos (Maynard, Min et al. 2003, Gilbert, Babcock et al. 2007, Agunanne, Uddin et al. 2010, George, Palei et al. 2013) ou aumentados (Hunter, Aitkenhead et al. 2000, Tsatsaris, Goffin et al. 2003, Celik, Avci et al. 2013) na hipertensão gestacional. De forma que nossos resultados referentes ao grupo de prenhes hipertensas apresentam suporte de achados prévios na literatura.

O VEGF pode agir como vasodilatador (Wei, Chen et al. 2007), logo, os aumentos dos níveis plasmáticos de VEGF poderiam indicar uma resposta vascular compensatória falha ao estado de vasoconstrição crônica causado pela diminuição da biodisponibilidade de NO promovida pelo L-NAME. O H₂S pode promover uma melhora do fluxo sanguíneo por induzir o relaxamento vascular não mediado por NO (Tang, Yang et al. 2013, Dunn, Alexander et al. 2016), e nós sugerimos que um relaxamento não mediado por NO, promovido pelo doador de H₂S, em ratas prenhes hipertensas, pode contribuir para a diminuição dos níveis de VEGF circulantes observados.

Estudos também mostraram que a superexpressão de VEGF pode promover aumento dos níveis de sFlt-1 (Saito, Takeda et al. 2013, Fan, Rai et al. 2014) e consequente hipertensão materna. Portanto, mesmo que o sFlt-1 possa agir como um antagonista de VEGF, resultando em efeitos danosos à mãe durante a gestação, o sFlt-1 pode exercer um papel essencial em regular o excesso de VEGF na região uteroplacentária, “sequestrando” o excesso de VEGF placentário (Ozawa, Banfi et al. 2004) e mantendo condições adequadas ao desenvolvimento do feto.

Estudos também demonstraram que o sFlt-1 pode ser derivado de células mononucleares circulantes (Rajakumar, Michael et al. 2005). Em paralelo a isso, trabalhos

demonstraram a existência de aumento do número de neutrófilos aderidos a vasos de resistência de mulheres com PE, comparado com gestantes saudáveis (Leik and Walsh 2004).

Os neutrófilos abundantemente expressam a enzima pró-oxidante mieloperoxidase (MPO), e a quantidade de MPO pode se correlacionar à quantidade de neutrófilos presentes em um sistema (Brennan, Penn et al. 2003, Klebanoff 2005, Zhu, Zhao et al. 2017). Em concordância, trabalhos demonstraram que os níveis dessa enzima encontram-se elevados em mulheres com PE (Rocha-Penha, Caldeira-Dias et al. 2017) e em modelos animais de hipertensão gestacional (Zhu, Zhao et al. 2017).

Em nossos estudos, encontramos níveis elevados de MPO em ratas prenhes hipertensas, e uma vez que os níveis de MPO correlacionam-se aos níveis de neutrófilos, esse mecanismo poderia contribuir para o aumento do sFlt-1 em ratas prenhes hipertensas. Entretanto, as diminuições dos níveis de sFlt-1 circulante, após o tratamento com o doador de H₂S não se correlacionaram à diminuições dos níveis de MPO. Portanto, nossos estudos não corroboram com a teoria de que os neutrófilos podem contribuir para o aumento do sFlt-1 circulante, pois a diminuição dos níveis de sFlt-1 e os efeitos anti-hipertensivos do tratamento com doador de H₂S ocorreram mesmo com altos níveis de MPO.

O estresse oxidativo está aumentado na hipertensão gestacional (Tsukimori, Fukushima et al. 2005, Cui, Brockman et al. 2006, Matsubara, Matsubara et al. 2010, Peracoli, Bannwart et al. 2011) e estudos relataram diminuição da produção de substâncias antioxidantes durante a hipertensão gestacional (Chambers, Fusi et al. 2001, Gilbert, Gilbert et al. 2009, Nakamura, Sekizawa et al. 2009) e redução da capacidade antioxidante total do plasma de mulheres com PE, em comparação a gestantes saudáveis (Turpin, Sakyi et al. 2015).

Nossos achados mostraram redução da capacidade antioxidante equivalente do Trolox (TEAC) em ratas prenhes hipertensas, o que indica reduções da capacidade antioxidante do plasma. Como o H₂S também mostrou efeitos antioxidantes (Bos, Leuvenink et al. 2009), nós avaliamos o TEAC, após o tratamento com o doador de H₂S, entretanto, nós não observamos aumentos da capacidade antioxidante do plasma nesses animais, o que sugere que os efeitos benéficos observados nos nossos estudos não se relacionam à modulação do estresse oxidativo.

Após a primeira submissão do artigo à revista *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, um dos questionamentos feito por um dos revisores relacionou-se aos níveis

plasmáticos de NO, visto que (1) nosso modelo era dependente da inibição da NOS e (2) o H₂S pode interagir com a via do NO.

Estudos que relatam a interação do H₂S com o NO ainda apresentam resultados conflitantes. Foi demonstrado que o H₂S levou à inibição da transcrição e atividade da eNOS. Consequentemente houve diminuição da produção de NO pelo endotélio (Geng, Cui et al. 2007, Kubo, Doe et al. 2007). Entretanto, estudos também relataram que o doador do H₂S leva ao aumento da produção de NO em células endoteliais e da fosforilação da eNOS, aumentando sua atividade (Predmore, Julian et al. 2011, Altaany, Yang et al. 2013). Além disso, a inibição da CSE causou a diminuição dos níveis de NO, enquanto que a superexpressão da CSE aumentou o nível de NO em células endoteliais (Altaany, Yang et al. 2013).

Após a realização dos experimentos que mensuraram os níveis de NO plasmático, ficamos surpresos ao notar que um aumento dos níveis desse gás ocorreu em ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S, (ou seja, após a inibição da NOS com L-NAME) e não em ratas prenhes normotensas tratadas com o doador.

Esse resultado nos indica que os níveis aumentados de NO nas ratas prenhes hipertensas, tratadas com o doador de H₂S, ocorreu de forma independente da NOS, pois esta encontrava-se inibida pelo L-NAME. Esse mecanismo parece ser desencadeado apenas durante essa inibição e consequente hipertensão. Portanto, nós sugerimos a realização de futuros estudos que investiguem a interação H₂S/NO especificamente na gestação e hipertensão gestacional, uma vez que essas condições são únicas e podem apresentar diferentes respostas comparadas com uma situação não-gravídica.

Visto que o H₂S parece interagir com a via do NO e nosso modelo inicial induz a hipertensão por meio da inibição da formação de NO, para melhor esclarecer nossos achados, nós utilizamos um diferente modelo experimental, não-baseado na inibição farmacológica da NOS. Logo, os estudos descritos no manuscrito apresentado no Capítulo II foram conduzidos em ratas prenhes hipertensas nas quais a hipertensão gestacional foi induzida pela injeção intraperitoneal de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e consumo de solução salina 0,9% (modelo DOCA+Sal) ao longo da gestação, como previamente descrito (Ianosi-Irimie, Vu et al. 2005, Mitchell, Cook et al. 2007, Tinsley, South et al. 2010, Uddin, Horvat et al. 2011).

Nossos resultados confirmaram os efeitos anti-hipertensivos do H₂S também neste modelo experimental de hipertensão gestacional e observamos que, enquanto a injeção de

DOCA e o consumo de salina levou a aumentos da pressão arterial sistólica, o uso do doador de H₂S promoveu diminuições nos níveis pressóricos.

Nós não observamos diferenças no número de filhotes viáveis, entretanto, a restrição de crescimento fetal, que é característica da PE e de modelos experimentais de hipertensão gestacional (Mitchell, Cook et al. 2007, Faulkner, Cornelius et al. 2016, Goncalves-Rizzi, Possomato-Vieira et al. 2016, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016, Zhu, Ren et al. 2016, Dias-Junior, Chen et al. 2017, Nanjo, Minami et al. 2017, Story and Chappell 2017) foi observada nos filhotes dos animais nos quais a hipertensão gestacional foi induzida pelo DOCA+Sal; e de maneira importante, a restrição do crescimento fetal foi atenuada pelo uso do doador de H₂S.

Além disso, a hipertensão levou à redução do peso placentário e essa redução foi ainda maior após o tratamento com doador de H₂S, entretanto, a eficiência placentária, que é um parâmetro utilizado para estimar a capacidade de transferência de nutrientes da placenta para o feto (McLaren 1965, Fowden, Sferruzzi-Perri et al. 2009, Chen, Sun et al. 2015), foi restabelecida para níveis normais em ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S. De forma interessante, o peso placentário foi maior em ratas normotensas tratadas com o doador de H₂S.

As ações do H₂S sobre a vasculatura ainda não estão totalmente esclarecidas e é possível que (1) o H₂S tenha exercido efeito pró-angiogênico, entretanto, a presença de hipertensão impediu que ocorresse um aumento do peso placentário em ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S, enquanto que essa elevação do peso pôde ser observada em ratas normotensas; e/ou (2) haja a indução da contração, mediada pelo H₂S, uma vez que durante a gestação normal, ocorre um aumento da liberação de substâncias vasodilatadoras e uma diminuição na liberação de substâncias vasoconstritoras. Portanto, o doador de H₂S pode levar a contração vascular em ratas prenhes normotensas (nas quais os mecanismos de relaxamento encontram-se exacerbados) e conseqüentemente redução do suprimento nutricional, diminuindo o peso dos fetos do grupo de normotensas tratadas com o doador de H₂S.

Entretanto, em ratas prenhes hipertensas (e conseqüentemente apresentando maior contração vascular) tratadas com o doador, o H₂S pode desencadear mecanismos vasodilatadores que contribuem para o restabelecimento da eficiência placentária, aumentando o suprimento nutricional do feto e conseqüentemente, melhorando a restrição do

crescimento fetal que foi observada em filhotes de ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador.

O restabelecimento da eficiência placentária pode ocorrer como consequência de uma redução da resistência vascular periférica na região uteroplacentária, e uma vez que nosso estudo anterior indicava uma interação entre o H₂S e o NO, nós formulamos a hipótese de que a melhora da eficiência placentária do grupo de prenhes hipertensas tratadas com o doador poderia decorrer de elevações nos níveis de NO placentário.

De fato, observamos um aumento nos níveis de NO placentário em ratas normotensas tratadas com o doador, o que sugere uma modulação do H₂S na produção de NO (Predmore, Julian et al. 2011, Altaany, Yang et al. 2013) na circulação placentária. Não foram alcançadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis placentários de NO de ratas prenhes hipertensas comparadas a ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S. No entanto, os níveis de NO placentário foram maiores em ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador do que em ratas prenhes do grupo controle, o que sugere que o aumento no NO placentário pode parcialmente participar do restabelecimento da eficiência placentária observada nesses animais.

Como observamos que o H₂S pode atuar sobre a região uteroplacentária, também avaliamos o estresse oxidativo da placenta. Um aumento do estresse oxidativo já foi previamente descrito durante a hipertensão gestacional (Tsukimori, Fukushima et al. 2005, Cui, Brockman et al. 2006, Matsubara, Matsubara et al. 2010, Peracoli, Bannwart et al. 2011) e uma vez que o H₂S exerce efeitos antioxidantes (Dongo, Beliczai-Marosi et al. 2017, Shefa, Yeo et al. 2017), nossa hipótese era de que o tratamento com H₂S diminuiria o estresse oxidativo. Entretanto, surpreendentemente, observamos um aumento do estresse oxidativo placentário em ambos os grupos (normotenso e hipertenso) tratados com o doador de H₂S.

De maneira importante, em ratas normotensas tratadas com o doador de H₂S, os aumentos dos níveis de estresse oxidativo não foram acompanhados de aumentos da pressão arterial. Além disso, a diminuição média do peso fetal foi de apenas $0,48 \pm 0,01$ g enquanto a variação de peso entre os filhotes de ratas prenhes do grupo controle e do grupo de prenhes hipertensas foi de $1,94 \pm 0,10$ g. Dessa forma, podemos especular que, embora os valores do peso fetal tenham diferido estatisticamente entre o grupo de prenhes do grupo controle e prenhes do grupo normotensas tratadas com o doador de H₂S, a diminuição desses valores não necessariamente representa a ocorrência de danos aos filhotes, visto que outros fatores, como

por exemplo, o peso das mães ao início da gestação, poderia contribuir para essa pequena diminuição do peso dos fetos ao final da gestação.

Desta forma, o aumento do estresse oxidativo placentário pode não estar ligado a efeitos danosos em ratas prenhes normotensas tratadas com o doador de H₂S. Todavia, deve-se considerar que o doador de H₂S utilizado em nosso estudos, o NaHS, é considerado um doador rápido do H₂S, que pode alcançar níveis elevados, alcançando níveis tóxicos, após a sua aplicação. Essa é uma limitação do nosso estudo e o uso de um doador mais lento, como o GYY4137, pode produzir resultados mais conclusivos referentes à promoção de estresse oxidativo em condições normotensas.

Quanto às ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S, nós especulamos que o aumento nos níveis de estresse oxidativo pode refletir um aumento no metabolismo placentário. Além disso, sugerimos que o aumento do estresse oxidativo pode estar relacionado à diminuição dos níveis de NO placentário, uma vez que foi previamente demonstrado que espécies reativas podem consumir o NO, diminuindo sua biodisponibilidade (Kagota, Tada et al. 2007, Macarthur, Westfall et al. 2008).

Os fatores angiogênicos parecem desempenhar importante papel durante a hipertensão gestacional. Por esse motivo, investigamos como esses fatores poderiam correlacionar-se com os efeitos observados após o tratamento com o doador de H₂S. Conforme esperado, observamos um aumento dos níveis de H₂S plasmático em ratas prenhes normotensas tratadas com o doador. Surpreendentemente, os níveis plasmáticos de H₂S também estavam elevados em ratas prenhes hipertensas e, uma vez que foi demonstrado que os níveis de H₂S estão diminuídos na hipertensão (Wang, Ahmad et al. 2013, Cacanyiova, Berenyiova et al. 2016, van Goor, van den Born et al. 2016, Greaney, Kutz et al. 2017), nós sugerimos que os aumentos dos níveis plasmáticos do H₂S desses animais representam uma resposta vascular compensatória mal sucedida.

Diferentemente do primeiro artigo, apresentado no Capítulo I desta tese, decidimos avaliar os níveis do fator pró-angiogênico PlGF, visto que, após a experiência de doutorado sanduíche no exterior, publicamos um trabalho que mostrava que a correção do desequilíbrio dos fatores sFlt-1/PlGF relaciona-se à diminuição da hipertensão e à regulação das respostas vasculares em um modelo experimental de hipertensão gestacional induzida por RUPP (Zhu, Ren et al. 2016).

Além do mais o aumento da eficiência placentária foi previamente relacionado à diminuição dos níveis de sFlt-1 e aumento dos níveis de PlGF (Gilbert, Banek et al. 2012).

Apesar de aumentos dos níveis de sFlt-1 estarem ligados à PE e hipertensão gestacional experimental (Holwerda, Burke et al. 2014, Molvarec, Czegle et al. 2015, Murphy and Cockrell 2015, Tuzcu, Asicioglu et al. 2015, Goncalves-Rizzi, Possomato-Vieira et al. 2016, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016), nós não observamos diferenças dos níveis circulantes de sFlt-1 em nenhum dos grupos experimentais, entretanto, resultados semelhantes foram previamente descritos (Agunanne, Uddin et al. 2010, Bobek, Surmon et al. 2015).

Os níveis de PlGF elevam-se durante a gestação saudável (Romero, Nien et al. 2008) e encontram-se diminuídos na PE (Tsatsaris, Goffin et al. 2003, Romero, Nien et al. 2008, Ramma, Buhimschi et al. 2012, Bian, Shixia et al. 2015, Molvarec, Czegle et al. 2015). Além disso, a diminuição dos níveis de PlGF foram observadas em modelos experimentais de hipertensão gestacional induzidas por RUPP (Gilbert, Babcock et al. 2007) e por DOCA+Sal (Agunanne, Uddin et al. 2010), o que confirma os achados do grupo de prenhes hipertensas em nosso trabalho.

Curiosamente, os níveis de PlGF estavam diminuídos em ambos os grupos (normotensas e hipertensas) de ratas prenhes tratadas com o doador de H₂S e nós sugerimos que, como o H₂S apresenta efeitos angiogênicos *per se* (Papapetropoulos, Pyriochou et al. 2009, Szabo, Coletta et al. 2013, Szabo and Hellmich 2013, Wang, Ahmad et al. 2013, Sonke, Verrydt et al. 2015), o efeito pró-angiogênico direto do H₂S pode estar relacionado com a não-elevação dos níveis de PlGF.

Nós também investigamos os efeitos vasculares do tratamento com o doador de H₂S e, inicialmente, observamos uma hiperreatividade à PHE em ratas prenhes hipertensas. Uma vasoconstrição constante é uma característica da hipertensão e essa hiperreatividade à PHE pode contribuir para os aumentos de pressão arterial, observados nas ratas prenhes hipertensas.

De forma importante, nós demonstramos que o tratamento com H₂S impediu a hiperreatividade à PHE e, como a disfunção endotelial está relacionada à hipertensão (Lockette, Otsuka et al. 1986, Vanhoutte, Shimokawa et al. 2017), nós sugerimos que a diminuição da hiperreatividade à PHE poderia representar um restabelecimento das respostas relaxadoras derivadas do endotélio. Entretanto, não observamos diferenças nas curvas à ACh realizadas entre os grupos de prenhes hipertensas e prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S.

Nós observamos um aumento de sensibilidade à ACh em ratas prenhes normotensas tratadas com o doador em relação à ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador e

acreditamos que isso possa indicar a presença de interações H₂S/NO como previamente descrito (Hosoki, Matsuki et al. 1997, Wang, Mainali et al. 2008, Possomato-Vieira, Goncalves-Rizzi et al. 2016, Aydinoglu, Dalkir et al. 2017, Materazzi, Zagli et al. 2017), entretanto, os efeitos dessa interação são abolidos pela presença da hipertensão.

De forma interessante, demonstramos que após a incubação com L-NAME, anéis de aorta torácica de ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador de H₂S apresentam um relaxamento mediado por ACh maior do que o de ratas prenhes hipertensas. Esse relaxamento parece ser independente do NO, todavia, o H₂S pode aumentar a expressão e atividade da eNOS, gerando, dessa forma, quantidades excessivas de NO, que poderiam contribuir para o relaxamento vascular, mesmo após a inibição com L-NAME (Chen, Fu et al. 2014, Huang, Chen et al. 2015).

Foi também previamente demonstrado que o H₂S levou à formação de NO em condições de hipóxia. Esse trabalho demonstrou que em condições de hipóxia, o NO pode ser produzido de forma independente da NOS, por meio da redução do nitrito à NO (Bir, Kolluru et al. 2012). Como nossos achados sugerem uma isquemia uteroplacentária, esse mecanismo poderia contribuir para os efeitos vasculares observados em nosso estudo.

Todavia, os níveis plasmáticos de NO não diferiram entre os grupos, evidenciando nossa observação de que esse relaxamento parece ocorrer de forma independente do NO circulante. Além disso, uma vez que observamos esse relaxamento aparentemente independente do NO apenas nos vasos de ratas prenhes hipertensas tratadas com o doador em comparação com ratas prenhes normotensas tratadas com o doador de H₂S, nós sugerimos que esse mecanismo é apenas ativado durante a hipertensão.

Finalmente, apesar de nossas observações do comportamento vascular, após o tratamento com doador de H₂S, terem sido feitas em aorta torácica, especulamos que a ativação de mecanismos similares (como a redução da hiperreatividade à PHE e um relaxamento não mediado por NO) na circulação uteroplacentária também pode contribuir para os efeitos observados quanto aos parâmetros feto-placentários e quanto à diminuição da pressão arterial.

Conclusões e considerações finais

5 Conclusões e considerações finais

Tomados em conjunto, nossos dados confirmam resultados prévios do efeito anti-hipertensivo do H₂S e demonstram os efeitos do H₂S sobre a circulação uteroplacentária, evidenciado pelos resultados obtidos nos parâmetros feto-placentários após o tratamento com o doador de H₂S.

De maneira importante, nossos resultados parecem indicar um papel dual do H₂S, uma vez que nossas observações demonstram que o H₂S parece agir de uma maneira durante a gestação normotensa e de outra forma durante a hipertensão gestacional. Estudos prévios também demonstram uma ação dual do H₂S, principalmente no que tange a sua modulação do tônus vascular, visto que o H₂S pode levar à contração (Lim, Liu et al. 2008, d'Emmanuele di Villa Bianca, Sorrentino et al. 2011, Li, Ping et al. 2015) ou ao relaxamento vascular (d'Emmanuele di Villa Bianca, Sorrentino et al. 2011, Aydinoglu, Dalkir et al. 2017, Ertuna, Loot et al. 2017, Sheibani, Lechuga et al. 2017).

Além disso, poucos grupos de pesquisa trabalham com a investigação do papel do H₂S na hipertensão gestacional e encontramos uma grande deficiência na literatura, o que de certa forma dificulta a elaboração de conclusões mais assertivas. Além disso, nós encorajamos futuros estudos nessa área, uma vez que nossos resultados e o de outros grupos de pesquisa indicam a potencialidade do H₂S como terapêutica no tratamento das desordens hipertensivas gestacionais.

Outro ponto de interesse parece ser a interação H₂S/NO observada em nossos estudos. Essas interações foram previamente descritas (Geng, Cui et al. 2007, Kubo, Doe et al. 2007, Predmore, Julian et al. 2011, Altaany, Yang et al. 2013), entretanto (1) esses estudos ainda apresentam resultados conflitantes quanto a demonstrar se o H₂S modula positiva ou negativamente a produção de NO e (2) nenhum desses estudos investigou a interação H₂S/NO na gestação e na hipertensão gestacional e, uma vez que a gestação impõe alterações fisiológicas importantes, as respostas encontradas durante esse período podem diferir grandemente daquelas encontradas em condições não-gestacionais.

Além do mais, a teoria proposta por Roberts (Roberts 1998) afirma que os fatores bioativos produzidos pela placenta levam à disfunção endotelial e consequentes sinais e sintomas da PE. Portanto, outro ponto que merece consideração é que os estudos apresentados nessa tese não demonstraram como os fatores bioativos liberados durante a isquemia/hipóxia placentária podem afetar a produção/ação do H₂S produzido endogenamente, dado que estudos mostram que as células endoteliais expressam as enzimas produtoras do H₂S

(Altaany, Yang et al. 2013, Coletta, Modis et al. 2015, Kuo, Kim et al. 2016, Saha, Chakraborty et al. 2016, Tao, Wang et al. 2017, Zhang, Chen et al. 2017) e a disfunção endotelial promovida pelos fatores liberados pela placenta podem interferir com a produção desse mediador gasoso.

Referências

Referências

1. Abe, K. and H. Kimura (1996). "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator." J Neurosci **16**(3): 1066-1071.
2. ACOG (2013). "Hypertension in Pregnancy." Obstet Gynecol **122**: 9.
3. Agarwal, R., A. Loganath, A. C. Roy, Y. C. Wong and S. C. Ng (2001). "Expression profiles of interleukin-15 in early and late gestational human placenta and in pre-eclamptic placenta." Mol Hum Reprod **7**(1): 97-101.
4. Agunanne, E. E., M. N. Uddin, D. Horvat and J. B. Puschett (2010). "Contribution of angiogenic factors in a rat model of pre-eclampsia." Am J Nephrol **32**(4): 332-339.
5. Ahmad, F. U., M. A. Sattar, H. A. Rathore, M. H. Abdullah, S. Tan, N. A. Abdullah and E. J. Johns (2012). "Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) reduces blood pressure and prevents the progression of diabetic nephropathy in spontaneously hypertensive rats." Ren Fail **34**(2): 203-210.
6. Ahmad, S. and A. Ahmed (2004). "Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia." Circ Res **95**(9): 884-891.
7. Akhilesh, M., V. Mahalingam, S. Nalliah, R. M. Ali, M. Ganesalingam and N. Haleagrahara (2013). "Hypoxia-inducible factor-1alpha as a predictive marker in pre-eclampsia." Biomed Rep **1**(2): 257-258.
8. Alexander, B. T., K. L. Cockrell, M. B. Massey, W. A. Bennett and J. P. Granger (2002). "Tumor necrosis factor-alpha-induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression." Am J Hypertens **15**(2 Pt 1): 170-175.
9. Alexander, B. T., S. E. Kassab, M. T. Miller, S. R. Abram, J. F. Reckelhoff, W. A. Bennett and J. P. Granger (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**(4): 1191-1195.
10. Alexander, B. T., M. T. Miller, S. Kassab, J. Novak, J. F. Reckelhoff, W. C. Kruckeberg and J. P. Granger (1999). "Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats." Hypertension **33**(1 Pt 2): 435-439.
11. Ali, S. M. and R. A. Khalil (2015). "Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy." Expert Opin Ther Targets **19**(11): 1495-1515.
12. Altaany, Z., Y. Ju, G. Yang and R. Wang (2014). "The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide." Sci Signal **7**(342): ra87.
13. Altaany, Z., G. Yang and R. Wang (2013). "Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells." J Cell Mol Med **17**(7): 879-888.
14. Amaral, L. M., D. C. Cornelius, A. Harmon, J. Moseley, J. N. Martin, Jr. and B. LaMarca (2015). "17-hydroxyprogesterone caproate significantly improves clinical characteristics of preeclampsia in the reduced uterine perfusion pressure rat model." Hypertension **65**(1): 225-231.

15. Amaral, L. M., L. C. Pinheiro, D. A. Guimaraes, A. C. Palei, J. T. Sertorio, R. L. Portella and J. E. Tanus-Santos (2013). "Antihypertensive effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in experimental pre-eclampsia." J Cell Mol Med **17**(10): 1300-1307.
16. Aydinoglu, F., F. T. Dalkir, H. O. Demirbag and N. Ogulener (2017). "The interaction of l-cysteine/H₂S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum." Nitric Oxide **70**: 51-58.
17. Bai, K., K. Wang, X. Li, J. Wang, J. Zhang, L. Song, J. Wang, S. Zhang, W. B. Lau, X. Ma and H. Liu (2013). "Autoantibody against angiotensin AT1 receptor from preeclamptic patients enhances collagen-induced human platelet aggregation." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **45**(9): 749-755.
18. Baijnath, S., N. Soobryan, I. Mackraj, P. Gathiram and J. Moodley (2014). "The optimization of a chronic nitric oxide synthase (NOS) inhibition model of pre-eclampsia by evaluating physiological changes." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **182**: 71-75.
19. Baragatti, B., E. Ciofini, D. Sodini, S. Luin, F. Scebba and F. Coceani (2013). "Hydrogen sulfide in the mouse ductus arteriosus: a naturally occurring relaxant with potential EDHF function." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(7): H927-934.
20. Berzan, E., R. Doyle and C. M. Brown (2014). "Treatment of preeclampsia: current approach and future perspectives." Curr Hypertens Rep **16**(9): 473.
21. Bian, Z., C. Shixia and T. Duan (2015). "First-Trimester Maternal Serum Levels of sFLT1, PGF and ADMA Predict Preeclampsia." PLoS One **10**(4): e0124684.
22. Bir, S. C., G. K. Kolluru, P. McCarthy, X. Shen, S. Pardue, C. B. Pattillo and C. G. Kevil (2012). "Hydrogen sulfide stimulates ischemic vascular remodeling through nitric oxide synthase and nitrite reduction activity regulating hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis." J Am Heart Assoc **1**(5): e004093.
23. Bird, I. M., L. Zhang and R. R. Magness (2003). "Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(2): R245-258.
24. Bobek, G., L. Surmon, K. M. Mirabito, A. Makris and A. Hennessy (2015). "Placental Regulation of Inflammation and Hypoxia after TNF-alpha Infusion in Mice." Am J Reprod Immunol **74**(5): 407-418.
25. Boeldt, D. S. and I. M. Bird (2017). "Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia." J Endocrinol **232**(1): R27-R44.
26. Bos, E. M., H. G. Leuvenink, P. M. Snijder, N. J. Kloosterhuis, J. L. Hillebrands, J. C. Leemans, S. Florquin and H. van Goor (2009). "Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury." J Am Soc Nephrol **20**(9): 1901-1905.
27. Brandao, A. H., L. R. Felix, C. Patricio Edo, H. V. Leite and A. C. Cabral (2014). "Difference of endothelial function during pregnancies as a method to predict preeclampsia." Arch Gynecol Obstet **290**(3): 471-477.
28. Brennan, M. L., M. S. Penn, F. Van Lente, V. Nambi, M. H. Shishehbor, R. J. Aviles, M. Goormastic, M. L. Pepoy, E. S. McErlean, E. J. Topol, S. E. Nissen and S. L. Hazen (2003).

- "Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain." *N Engl J Med* **349**(17): 1595-1604.
29. Bucci, M., A. Papapetropoulos, V. Vellecco, Z. Zhou, A. Pyriochou, C. Roussos, F. Roviezzo, V. Brancaleone and G. Cirino (2010). "Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(10): 1998-2004.
 30. Cacanyiova, S., A. Berenyiova, F. Kristek, M. Drobna, K. Ondrias and M. Grman (2016). "The adaptive role of nitric oxide and hydrogen sulphide in vasoactive responses of thoracic aorta is triggered already in young spontaneously hypertensive rats." *J Physiol Pharmacol* **67**(4): 501-512.
 31. Cai, W. J., M. J. Wang, P. K. Moore, H. M. Jin, T. Yao and Y. C. Zhu (2007). "The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation." *Cardiovasc Res* **76**(1): 29-40.
 32. Celik, H., B. Avci and Y. Isik (2013). "Vascular endothelial growth factor and endothelin-1 levels in normal pregnant women and pregnant women with pre-eclampsia." *J Obstet Gynaecol* **33**(4): 355-358.
 33. Chambers, J. C., L. Fusi, I. S. Malik, D. O. Haskard, M. De Swiet and J. S. Kooner (2001). "Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia." *JAMA* **285**(12): 1607-1612.
 34. Chen, D. B., L. Feng, J. K. Hodges, T. J. Lechuga and H. Zhang (2017). "Human trophoblast-derived hydrogen sulfide stimulates placental artery endothelial cell angiogenesis." *Biol Reprod* **97**(3): 478-489.
 35. Chen, P. H., Y. S. Fu, Y. M. Wang, K. H. Yang, D. L. Wang and B. Huang (2014). "Hydrogen sulfide increases nitric oxide production and subsequent S-nitrosylation in endothelial cells." *ScientificWorldJournal* **2014**: 480387.
 36. Chen, S., F. Z. Sun, X. Huang, X. Wang, N. Tang, B. Zhu and B. Li (2015). "Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction linked to reduced fetal weight in mice." *Sci Rep* **5**: 10596.
 37. Cindrova-Davies, T., E. A. Herrera, Y. Niu, J. Kingdom, D. A. Giussani and G. J. Burton (2013). "Reduced cystathionine gamma-lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator." *Am J Pathol* **182**(4): 1448-1458.
 38. Cindrova-Davies, T., D. A. Sanders, G. J. Burton and D. S. Charnock-Jones (2011). "Soluble FLT1 sensitizes endothelial cells to inflammatory cytokines by antagonizing VEGF receptor-mediated signalling." *Cardiovasc Res* **89**(3): 671-679.
 39. Cirino, G., V. Vellecco and M. Bucci (2017). "Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system." *Br J Pharmacol* **174**(22): 4021-4031.
 40. Clark, D. E., S. K. Smith, Y. He, K. A. Day, D. R. Licence, A. N. Corps, R. Lammoglia and D. S. Charnock-Jones (1998). "A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation." *Biol Reprod* **59**(6): 1540-1548.

41. Clark, S. L., D. B. Cotton, W. Lee, C. Bishop, T. Hill, J. Southwick, J. Pivarnik, T. Spillman, G. R. DeVore, J. Phelan and et al. (1989). "Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy." Am J Obstet Gynecol **161**(6 Pt 1): 1439-1442.
42. Coelho, S. C., O. Berillo, A. Caillon, S. Ouerd, J. C. Fraulob-Aquino, T. Barhoumi, S. Offermanns, P. Paradis and E. L. Schiffrin (2018). "Three-Month Endothelial Human Endothelin-1 Overexpression Causes Blood Pressure Elevation and Vascular and Kidney Injury." Hypertension **71**(1): 208-216.
43. Coletta, C., K. Modis, B. Szczesny, A. Brunyanszki, G. Olah, E. C. Rios, K. Yanagi, A. Ahmad, A. Papapetropoulos and C. Szabo (2015). "Regulation of Vascular Tone, Angiogenesis and Cellular Bioenergetics by the 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase/H2S Pathway: Functional Impairment by Hyperglycemia and Restoration by DL-alpha-Lipoic Acid." Mol Med **21**: 1-14.
44. Coletta, C., A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Modis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, D. Gero, I. Sharina, E. Martin and C. Szabo (2012). "Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(23): 9161-9166.
45. Cotechini, T., M. Komisarenko, A. Sperou, S. Macdonald-Goodfellow, M. A. Adams and C. H. Graham (2014). "Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia." J Exp Med **211**(1): 165-179.
46. Cui, X. L., D. Brockman, B. Campos and L. Myatt (2006). "Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia." Placenta **27**(4-5): 422-431.
47. d'Emmanuele di Villa Bianca, R., R. Sorrentino, C. Coletta, E. Mitidieri, A. Rossi, V. Vellecco, A. Pinto, G. Cirino and R. Sorrentino (2011). "Hydrogen sulfide-induced dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed." J Pharmacol Exp Ther **337**(1): 59-64.
48. Damsky, C. H., M. L. Fitzgerald and S. J. Fisher (1992). "Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo." J Clin Invest **89**(1): 210-222.
49. Damsky, C. H., C. Librach, K. H. Lim, M. L. Fitzgerald, M. T. McMaster, M. Janatpour, Y. Zhou, S. K. Logan and S. J. Fisher (1994). "Integrin switching regulates normal trophoblast invasion." Development **120**(12): 3657-3666.
50. Dias-Junior, C. A., J. Chen, N. Cui, C. L. Chiang, M. Zhu, Z. Ren, J. S. Possomato-Vieira and R. A. Khalil (2017). "Angiogenic imbalance and diminished matrix metalloproteinase-2 and -9 underlie regional decreases in uteroplacental vascularization and fetoplacental growth in hypertensive pregnancy." Biochem Pharmacol.
51. Dongo, E., G. Beliczai-Marosi, A. S. Dybvig and L. Kiss (2017). "The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone." Nitric Oxide.
52. Donker, R. B., S. A. Asgeirsdottir, F. Gerbens, M. G. van Pampus, C. G. Kallenberg, G. J. te Meerman, J. G. Aarnoudse and G. Molema (2005). "Plasma factors in severe early-onset preeclampsia do not substantially alter endothelial gene expression in vitro." J Soc Gynecol Investig **12**(2): 98-106.

53. Doridot, L., B. Passet, C. Mehats, V. Rigourd, S. Barbaux, A. Ducat, F. Mondon, M. Vilotte, J. Castille, M. Breuiller-Fouche, N. Daniel, F. le Provost, A. L. Bauchet, V. Baudrie, A. Hertig, C. Buffat, U. Simeoni, G. Germain, J. L. Vilotte and D. Vaiman (2013). "Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment." Hypertension **61**(3): 662-668.
54. Dotsch, J., N. Hogen, Z. Nyul, J. Hanze, I. Knerr, M. Kirschbaum and W. Rascher (2001). "Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **97**(2): 163-167.
55. Dunn, W. R., S. P. Alexander, V. Ralevic and R. E. Roberts (2016). "Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle." Pharmacol Ther **158**: 101-113.
56. Ehsanipoor, R. M., W. Fortson, L. E. Fitzmaurice, W. X. Liao, D. A. Wing, D. B. Chen and K. Chan (2013). "Nitric oxide and carbon monoxide production and metabolism in preeclampsia." Reprod Sci **20**(5): 542-548.
57. Eleuterio, N. M., A. C. Palei, J. S. Rangel Machado, J. E. Tanus-Santos, R. C. Cavalli and V. C. Sandrim (2013). "Relationship between adiponectin and nitrite in healthy and preeclampsia pregnancies." Clin Chim Acta **423**: 112-115.
58. Eleuterio, N. M., A. C. Palei, J. S. Rangel Machado, J. E. Tanus-Santos, R. C. Cavalli and V. C. Sandrim (2014). "Correlations between circulating levels of adipokines and anti-angiogenic factors in women with BMI <30 and a late-onset preeclampsia." Hypertens Pregnancy **33**(1): 72-80.
59. Ertuna, E., A. E. Loot, I. Fleming and G. Yetik-Anacak (2017). "The role of eNOS on the compensatory regulation of vascular tonus by H₂S in mouse carotid arteries." Nitric Oxide **69**: 45-50.
60. Fan, X., A. Rai, N. Kambham, J. F. Sung, N. Singh, M. Petitt, S. Dhal, R. Agrawal, R. E. Sutton, M. L. Druzin, S. S. Gambhir, B. K. Ambati, J. C. Cross and N. R. Nayak (2014). "Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications." J Clin Invest **124**(11): 4941-4952.
61. Faulkner, J. L., D. C. Cornelius, L. M. Amaral, A. C. Harmon, M. W. Cunningham, Jr., M. M. Darby, T. Ibrahim, D. S. Thomas, F. Herse, G. Wallukat, R. Dechend and B. LaMarca (2016). "Vitamin D supplementation improves pathophysiology in a rat model of preeclampsia." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **310**(4): R346-354.
62. Fisher, S. J. and C. H. Damsky (1993). "Human cytotrophoblast invasion." Semin Cell Biol **4**(3): 183-188.
63. Founds, S. A., Y. P. Conley, J. F. Lyons-Weiler, A. Jeyabalan, W. A. Hogge and K. P. Conrad (2009). "Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia." Placenta **30**(1): 15-24.
64. Fowden, A. L., A. N. Sferruzzi-Perri, P. M. Coan, M. Constancia and G. J. Burton (2009). "Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation." J Physiol **587**(Pt 14): 3459-3472.
65. Furchgott, R. F. (1996). "The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide." JAMA **276**(14): 1186-1188.

66. Furchgott, R. F. and D. Jothianandan (1991). "Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light." Blood Vessels **28**(1-3): 52-61.
67. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
68. Garamvolgyi, Z., Z. Prohaszka, J. Rigo, Jr., A. Kecskemeti and A. Molvarec (2015). "Increased circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) levels in gestational diabetes mellitus: a pilot study." Cell Stress Chaperones **20**(4): 575-581.
69. Geng, B., Y. Cui, J. Zhao, F. Yu, Y. Zhu, G. Xu, Z. Zhang, C. Tang and J. Du (2007). "Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(4): R1608-1618.
70. George, E. M., A. C. Palei, E. A. Dent and J. P. Granger (2013). "Sildenafil attenuates placental ischemia-induced hypertension." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **305**(4): R397-403.
71. Gheibi, S., S. Jeddi, K. Kashfi and A. Ghasemi (2018). "Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension." Biochem Pharmacol.
72. Gilbert, J. S., S. A. Babcock and J. P. Granger (2007). "Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression." Hypertension **50**(6): 1142-1147.
73. Gilbert, J. S., C. T. Banek, A. J. Bauer, A. Gingery and K. Needham (2012). "Exercise training attenuates placental ischemia-induced hypertension and angiogenic imbalance in the rat." Hypertension **60**(6): 1545-1551.
74. Gilbert, J. S., S. A. Gilbert, M. Arany and J. P. Granger (2009). "Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression." Hypertension **53**(2): 399-403.
75. Gillis, E. E., J. M. Williams, M. R. Garrett, J. N. Mooney and J. M. Sasser (2015). "The Dahl salt-sensitive rat is a spontaneous model of superimposed preeclampsia." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **309**(1): R62-70.
76. Goncalves-Rizzi, V. H., J. S. Possomato-Vieira, T. U. Sales Graca, R. A. Nascimento and C. A. Dias-Junior (2016). "Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor." Nitric Oxide **57**: 71-78.
77. Greaney, J. L., J. L. Kutz, S. W. Shank, S. Jandu, L. Santhanam and L. M. Alexander (2017). "Impaired Hydrogen Sulfide-Mediated Vasodilation Contributes to Microvascular Endothelial Dysfunction in Hypertensive Adults." Hypertension **69**(5): 902-909.
78. Guimaraes, M. F., A. H. Brandao, C. A. Rezende, A. C. Cabral, A. P. Brum, H. V. Leite and C. A. Capurco (2014). "Assessment of endothelial function in pregnant women with preeclampsia and gestational diabetes mellitus by flow-mediated dilation of brachial artery." Arch Gynecol Obstet **290**(3): 441-447.

79. Hall, D., S. Gebhardt, G. Theron and D. Grove (2014). "Pre-eclampsia and gestational hypertension are less common in HIV infected women." *Pregnancy Hypertens* **4**(1): 91-96.
80. Hefler, L. A., C. A. Reyes, W. E. O'Brien and A. R. Gregg (2001). "Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice." *Biol Reprod* **64**(2): 666-673.
81. Hiby, S. E., J. J. Walker, M. O'Shaughnessy K, C. W. Redman, M. Carrington, J. Trowsdale and A. Moffett (2004). "Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success." *J Exp Med* **200**(8): 957-965.
82. Holwerda, K. M., E. M. Bos, A. Rajakumar, C. Ris-Stalpers, M. G. van Pampus, A. Timmer, J. J. Erwich, M. M. Faas, H. van Goor and A. T. Lely (2012). "Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia." *Placenta* **33**(6): 518-521.
83. Holwerda, K. M., S. D. Burke, M. M. Faas, Z. Zsengeller, I. E. Stillman, P. M. Kang, H. van Goor, A. McCurley, I. Z. Jaffe, S. A. Karumanchi and A. T. Lely (2014). "Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor." *J Am Soc Nephrol* **25**(4): 717-725.
84. Hosoki, R., N. Matsuki and H. Kimura (1997). "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide." *Biochem Biophys Res Commun* **237**(3): 527-531.
85. Hu, T., G. Wang, Z. Zhu, Y. Huang, H. Gu and X. Ni (2015). "Increased ADAM10 expression in preeclamptic placentas is associated with decreased expression of hydrogen sulfide production enzymes." *Placenta* **36**(8): 947-950.
86. Hu, T. X., X. Guo, G. Wang, L. Gao, P. He, Y. Xia, H. Gu and X. Ni (2017). "MiR133b is involved in endogenous hydrogen sulfide suppression of sFlt-1 production in human placenta." *Placenta* **52**: 33-40.
87. Hu, T. X., G. Wang, X. J. Guo, Q. Q. Sun, P. He, H. Gu, Y. Huang, L. Gao and X. Ni (2016). "MiR 20a, -20b and -200c are involved in hydrogen sulfide stimulation of VEGF production in human placental trophoblasts." *Placenta* **39**: 101-110.
88. Huang, B., C. T. Chen, C. S. Chen, Y. M. Wang, H. J. Hsieh and D. L. Wang (2015). "Laminar shear flow increases hydrogen sulfide and activates a nitric oxide producing signaling cascade in endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **464**(4): 1254-1259.
89. Huang, P., Z. Shen, J. Liu, Y. Huang, S. Chen, W. Yu, S. Wang, Y. Ren, X. Li, C. Tang, J. Du and H. Jin (2016). "Hydrogen Sulfide Inhibits High-Salt Diet-Induced Renal Oxidative Stress and Kidney Injury in Dahl Rats." *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 2807490.
90. Hunter, A., M. Aitkenhead, C. Caldwell, G. McCracken, D. Wilson and N. McClure (2000). "Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy." *Hypertension* **36**(6): 965-969.
91. Huppertz, B. and L. L. Peeters (2005). "Vascular biology in implantation and placentation." *Angiogenesis* **8**(2): 157-167.
92. Ianosi-Irimie, M., H. V. Vu, J. M. Whitbred, C. A. Pridjian, J. D. Nadig, M. Y. Williams, D. C. Wrenn, G. Pridjian and J. B. Puschett (2005). "A rat model of preeclampsia." *Clin Exp Hypertens* **27**(8): 605-617.

93. Intapad, S., J. P. Warrington, F. T. Spradley, A. C. Palei, H. A. Drummond, M. J. Ryan, J. P. Granger and B. T. Alexander (2014). "Reduced uterine perfusion pressure induces hypertension in the pregnant mouse." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **307**(11): R1353-1357.
94. Jang, H., M. Y. Oh, Y. J. Kim, I. Y. Choi, H. S. Yang, W. S. Ryu, S. H. Lee and B. W. Yoon (2014). "Hydrogen sulfide treatment induces angiogenesis after cerebral ischemia." *J Neurosci Res* **92**(11): 1520-1528.
95. Jardim, L. L., D. R. Rios, L. O. Perucci, L. P. de Sousa, K. B. Gomes and L. M. Dusse (2015). "Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia?" *Clin Chim Acta* **447**: 34-38.
96. Kagota, S., Y. Tada, Y. Kubota, N. Nejime, Y. Yamaguchi, K. Nakamura, M. Kunitomo and K. Shinozuka (2007). "Peroxyntirite is Involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats." *J Cardiovasc Pharmacol* **50**(6): 677-685.
97. Kanagal, D. V., A. Rajesh, K. Rao, U. H. Devi, H. Shetty, S. Kumari and P. K. Shetty (2014). "Levels of Serum Calcium and Magnesium in Pre-eclamptic and Normal Pregnancy: A Study from Coastal India." *J Clin Diagn Res* **8**(7): OC01-04.
98. Kanagy, N. L., C. Szabo and A. Papapetropoulos (2017). "Vascular biology of hydrogen sulfide." *Am J Physiol Cell Physiol* **312**(5): C537-C549.
99. Kaya, A., A. Boztosun, H. Seckin, A. S. Guven, Z. Kucukdurmaz, S. Gulturk and O. Cevit (2011). "The evaluation of hypoxia-inducible factor 1 in N-nitro-L-arginine methyl ester preeclampsia model of pregnant rats." *J Investig Med* **59**(8): 1268-1272.
100. Kemse, N. G., A. A. Kale and S. R. Joshi (2014). "A combined supplementation of omega-3 fatty acids and micronutrients (folic acid, vitamin B12) reduces oxidative stress markers in a rat model of pregnancy induced hypertension." *PLoS One* **9**(11): e111902.
101. Kendall, R. L., G. Wang and K. A. Thomas (1996). "Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR." *Biochem Biophys Res Commun* **226**(2): 324-328.
102. Kenny, L. C., P. N. Baker, D. A. Kendall, M. D. Randall and W. R. Dunn (2002). "Differential mechanisms of endothelium-dependent vasodilator responses in human myometrial small arteries in normal pregnancy and pre-eclampsia." *Clin Sci (Lond)* **103**(1): 67-73.
103. King, A. (2000). "Uterine leukocytes and decidualization." *Hum Reprod Update* **6**(1): 28-36.
104. Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." *J Leukoc Biol* **77**(5): 598-625.
105. Knock, G. A. and L. Poston (1996). "Bradykinin-mediated relaxation of isolated maternal resistance arteries in normal pregnancy and preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* **175**(6): 1668-1674.
106. Kondo, K., S. Bhushan, A. L. King, S. D. Prabhu, T. Hamid, S. Koenig, T. Murohara, B. L. Predmore, G. Gojon, Sr., G. Gojon, Jr., R. Wang, N. Karusula, C. K. Nicholson, J. W.

- Calvert and D. J. Lefer (2013). "H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase." Circulation **127**(10): 1116-1127.
107. Kubo, S., I. Doe, Y. Kurokawa, H. Nishikawa and A. Kawabata (2007). "Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension." Toxicology **232**(1-2): 138-146.
108. Kubo, S., M. Kajiwara and A. Kawabata (2007). "Dual modulation of the tension of isolated gastric artery and gastric mucosal circulation by hydrogen sulfide in rats." Inflammopharmacology **15**(6): 288-292.
109. Kuo, M. M., D. H. Kim, S. Jandu, Y. Bergman, S. Tan, H. Wang, D. R. Pandey, T. P. Abraham, A. A. Shoukas, D. E. Berkowitz and L. Santhanam (2016). "MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery." Am J Physiol Heart Circ Physiol **310**(1): H71-79.
110. Labarrere, C. A., H. L. DiCarlo, E. Bammerlin, J. W. Hardin, Y. M. Kim, P. Chaemsaitong, D. M. Haas, G. S. Kassab and R. Romero (2017). "Failure of physiologic transformation of spiral arteries, endothelial and trophoblast cell activation, and acute atherosclerosis in the basal plate of the placenta." Am J Obstet Gynecol **216**(3): 287 e281-287 e216.
111. Lala, P. K. and C. Chakraborty (2003). "Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury." Placenta **24**(6): 575-587.
112. Lamminpaa, R., K. Vehvilainen-Julkunen, M. Gissler and S. Heinonen (2012). "Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008." BMC Pregnancy Childbirth **12**: 47.
113. Leik, C. E. and S. W. Walsh (2004). "Neutrophils infiltrate resistance-sized vessels of subcutaneous fat in women with preeclampsia." Hypertension **44**(1): 72-77.
114. Li, L., M. Whiteman, Y. Y. Guan, K. L. Neo, Y. Cheng, S. W. Lee, Y. Zhao, R. Baskar, C. H. Tan and P. K. Moore (2008). "Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide." Circulation **117**(18): 2351-2360.
115. Li, S., N. N. Ping, L. Cao, Y. N. Mi and Y. X. Cao (2015). "H₂S induces vasoconstriction of rat cerebral arteries via cAMP/adenylyl cyclase pathway." Toxicol Appl Pharmacol **289**(3): 389-396.
116. Liang, G. H., A. Adebisi, M. D. Leo, E. M. McNally, C. W. Leffler and J. H. Jaggar (2011). "Hydrogen sulfide dilates cerebral arterioles by activating smooth muscle cell plasma membrane KATP channels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(6): H2088-2095.
117. Lillegard, K. E., A. C. Johnson, S. J. Lojovich, A. J. Bauer, H. C. Marsh, J. S. Gilbert and J. F. Regal (2013). "Complement activation is critical for placental ischemia-induced hypertension in the rat." Mol Immunol **56**(1-2): 91-97.
118. Lim, J. J., Y. H. Liu, E. S. Khin and J. S. Bian (2008). "Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **295**(5): C1261-1270.

119. Liu, L., H. Liu, D. Sun, W. Qiao, Y. Qi, H. Sun and C. Yan (2012). "Effects of H₂S on myogenic responses in rat cerebral arterioles." *Circ J* **76**(4): 1012-1019.
120. Lockette, W., Y. Otsuka and O. Carretero (1986). "The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension." *Hypertension* **8**(6 Pt 2): II61-66.
121. Lu, M., Y. H. Liu, H. S. Goh, J. J. Wang, Q. C. Yong, R. Wang and J. S. Bian (2010). "Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity." *J Am Soc Nephrol* **21**(6): 993-1002.
122. Luizon, M. R., M. Caldeira-Dias, E. Deffune, K. S. Fernandes, R. C. Cavalli, J. E. Tanus-Santos and V. C. Sandrim (2016). "Antihypertensive therapy in pre-eclampsia: effects of plasma from nonresponsive patients on endothelial gene expression." *Pharmacogenomics* **17**(10): 1121-1127.
123. Lyall, F., S. C. Robson and J. N. Bulmer (2013). "Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome." *Hypertension* **62**(6): 1046-1054.
124. Ma, R. Q., M. N. Sun and Z. Yang (2010). "Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestational stage on fetoplacental outcomes in a mouse model." *Chin Med J (Engl)* **123**(6): 707-712.
125. Macarthur, H., T. C. Westfall and G. H. Wilken (2008). "Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(1): H183-189.
126. Mackenzie, R. M., V. C. Sandrim, D. M. Carty, J. D. McClure, D. J. Freeman, A. F. Dominiczak, M. W. McBride and C. Delles (2012). "Endothelial FOS expression and preeclampsia." *BJOG* **119**(13): 1564-1571.
127. March, M. I., C. Geahchan, J. Wenger, N. Raghuraman, A. Berg, H. Haddow, B. A. McKeon, R. Narcisse, J. L. David, J. Scott, R. Thadhani, S. A. Karumanchi and S. Rana (2015). "Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Adverse Outcomes among Haitian Women with Preeclampsia." *PLoS One* **10**(5): e0126815.
128. Masoura, S., I. Kalogiannidis, K. Makedou, T. Theodoridis, K. Koiou, S. Gerou, A. Athanasiadis and T. Agorastos (2014). "Biomarkers of endothelial dysfunction in preeclampsia and neonatal morbidity: a case-control study." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **175**: 119-123.
129. Materazzi, S., G. Zagli, R. Nassini, I. Bartolini, S. Romagnoli, C. Chelazzi, S. Benemei, A. Coratti, A. R. De Gaudio and R. Patacchini (2017). "Vasodilator activity of hydrogen sulfide (H₂S) in human mesenteric arteries." *Microvasc Res* **109**: 38-44.
130. Matsubara, K., Y. Matsubara, S. Hyodo, T. Katayama and M. Ito (2010). "Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia." *J Obstet Gynaecol Res* **36**(2): 239-247.
131. Maynard, S., F. H. Epstein and S. A. Karumanchi (2008). "Preeclampsia and angiogenic imbalance." *Annu Rev Med* **59**: 61-78.
132. Maynard, S. E., J. Y. Min, J. Merchan, K. H. Lim, J. Li, S. Mondal, T. A. Libermann, J. P. Morgan, F. W. Sellke, I. E. Stillman, F. H. Epstein, V. P. Sukhatme and S. A. Karumanchi (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may

- contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest **111**(5): 649-658.
133. Mayr, A. J., W. Lederer, H. J. Wolf, M. Dunser, K. Pfaller and M. G. Mortl (2005). "Morphologic changes of the uteroplacental unit in preeclampsia-like syndrome in rats." Hypertens Pregnancy **24**(1): 29-37.
 134. Mazzuca, M. Q., W. Li, O. M. Reslan, P. Yu, K. M. Mata and R. A. Khalil (2014). "Downregulation of microvascular endothelial type B endothelin receptor is a central vascular mechanism in hypertensive pregnancy." Hypertension **64**(3): 632-643.
 135. McLaren, A. (1965). "Genetic and Environmental Effects on Foetal and Placental Growth in Mice." J Reprod Fertil **9**: 79-98.
 136. McMaster, M. T., Y. Zhou and S. J. Fisher (2004). "Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia." Semin Nephrol **24**(6): 540-547.
 137. Mitchell, B. M., L. G. Cook, S. Danchuk and J. B. Puschett (2007). "Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension." Am J Hypertens **20**(12): 1297-1304.
 138. Molvarec, A., I. Czegle, J. Szijarto and J. Rigo, Jr. (2015). "Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia." J Reprod Immunol **112**: 53-57.
 139. Morris, R., S. K. Spencer, P. B. Kyle, J. M. Williams, A. Harris, M. Y. Owens and K. Wallace (2016). "Hypertension in an Animal Model of HELLP Syndrome is Associated With Activation of Endothelin 1." Reprod Sci **23**(1): 42-50.
 140. Motta, C., C. Grosso, C. Zanuzzi, D. Molinero, N. Picco, R. Bellingeri, F. Alustiza, C. Barbeito, A. Vivas and M. C. Romanini (2015). "Effect of Sildenafil on Pre-Eclampsia-Like Mouse Model Induced By L-Name." Reprod Domest Anim **50**(4): 611-616.
 141. Murphy, S. R. and K. Cockrell (2015). "Regulation of soluble fms-like tyrosine kinase-1 production in response to placental ischemia/hypoxia: role of angiotensin II." Physiol Rep **3**(2).
 142. Mustafa, A. K., G. Sikka, S. K. Gazi, J. Steppan, S. M. Jung, A. K. Bhunia, V. M. Barodka, F. K. Gazi, R. K. Barrow, R. Wang, L. M. Amzel, D. E. Berkowitz and S. H. Snyder (2011). "Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels." Circ Res **109**(11): 1259-1268.
 143. Nakamura, M., A. Sekizawa, Y. Purwosunu, S. Okazaki, A. Farina, N. Wibowo, H. Shimizu and T. Okai (2009). "Cellular mRNA expressions of anti-oxidant factors in the blood of preeclamptic women." Prenat Diagn **29**(7): 691-696.
 144. Nanjo, S., S. Minami, M. Mizoguchi, M. Yamamoto, T. Yahata, S. Toujima, M. Shiro, A. Kobayashi, Y. Muragaki and K. Ino (2017). "Levels of serum-circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction." J Obstet Gynaecol Res.
 145. Nelson, S. H., O. S. Steinsland, Y. Wang, C. Yallampalli, Y. L. Dong and J. M. Sanchez (2000). "Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy." Circ Res **87**(5): 406-411.

146. Ouzounian, J. G. and U. Elkayam (2012). "Physiologic changes during normal pregnancy and delivery." Cardiol Clin **30**(3): 317-329.
147. Ozawa, C. R., A. Banfi, N. L. Glazer, G. Thurston, M. L. Springer, P. E. Kraft, D. M. McDonald and H. M. Blau (2004). "Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis." J Clin Invest **113**(4): 516-527.
148. Papapetropoulos, A., A. Pyriochou, Z. Altaany, G. Yang, A. Marazioti, Z. Zhou, M. G. Jeschke, L. K. Branski, D. N. Herndon, R. Wang and C. Szabo (2009). "Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21972-21977.
149. Payne, J. A., B. T. Alexander and R. A. Khalil (2003). "Reduced endothelial vascular relaxation in growth-restricted offspring of pregnant rats with reduced uterine perfusion." Hypertension **42**(4): 768-774.
150. Peracoli, M. T., C. F. Bannwart, R. Cristofalo, V. T. Borges, R. A. Costa, S. S. Witkin and J. C. Peracoli (2011). "Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women." Am J Reprod Immunol **66**(6): 460-467.
151. Pimentel, A. M., N. R. Pereira, C. A. Costa, G. E. Mann, V. S. Cordeiro, R. S. de Moura, T. M. Brunini, A. C. Mendes-Ribeiro and A. C. Resende (2013). "L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia." Hypertens Res **36**(9): 783-788.
152. Pollock, J. S. and D. M. Pollock (2011). "Endothelin, nitric oxide, and reactive oxygen species in diabetic kidney disease." Contrib Nephrol **172**: 149-159.
153. Possomato-Vieira, J. S., V. H. Goncalves-Rizzi, T. U. Graca, R. A. Nascimento and C. A. Dias-Junior (2016). "Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **389**(12): 1325-1332.
154. Predmore, B. L., D. Julian and A. J. Cardounel (2011). "Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism." Front Physiol **2**: 104.
155. Pupo, E., A. F. Pla, D. Avanzato, F. Moccia, J. E. Cruz, F. Tanzi, A. Merlino, D. Mancardi and L. Munaron (2011). "Hydrogen sulfide promotes calcium signals and migration in tumor-derived endothelial cells." Free Radic Biol Med **51**(9): 1765-1773.
156. Rajakumar, A., H. M. Michael, P. A. Rajakumar, E. Shibata, C. A. Hubel, S. A. Karumanchi, R. Thadhani, M. Wolf, G. Harger and N. Markovic (2005). "Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women." Placenta **26**(7): 563-573.
157. Ramesar, S. V., I. Mackraj, P. Gathiram and J. Moodley (2011). "Sildenafil citrate decreases sFlt-1 and sEng in pregnant l-NAME treated Sprague-Dawley rats." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **157**(2): 136-140.

158. Ramma, W., I. A. Buhimschi, G. Zhao, A. T. Dulay, U. A. Nayeri, C. S. Buhimschi and A. Ahmed (2012). "The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia." Angiogenesis **15**(3): 333-340.
159. Redman, C. W. and I. L. Sargent (2010). "Immunology of pre-eclampsia." Am J Reprod Immunol **63**(6): 534-543.
160. Regal, J. F., K. E. Lillegard, A. J. Bauer, B. J. Elmquist, A. C. Loeks-Johnson and J. S. Gilbert (2015). "Neutrophil Depletion Attenuates Placental Ischemia-Induced Hypertension in the Rat." PLoS One **10**(7): e0132063.
161. Roberts, J. M. (1998). "Endothelial dysfunction in preeclampsia." Semin Reprod Endocrinol **16**(1): 5-15.
162. Roberts, J. M. and C. Escudero (2012). "The placenta in preeclampsia." Pregnancy Hypertens **2**(2): 72-83.
163. Rocha-Penha, L., M. Caldeira-Dias, J. E. Tanus-Santos, R. de Carvalho Cavalli and V. C. Sandrim (2017). "Myeloperoxidase in Hypertensive Disorders of Pregnancy and Its Relation With Nitric Oxide." Hypertension **69**(6): 1173-1180.
164. Rodriguez, M., C. Couve-Perez, S. San Martin, F. Martinez, C. Lozano and A. Sepulveda-Martinez (2017). "Perinatal outcome and placental apoptosis in patients with late-onset pre-eclampsia and abnormal uterine artery Doppler at diagnosis." Ultrasound Obstet Gynecol.
165. Romero, R., J. K. Nien, J. Espinoza, D. Todem, W. Fu, H. Chung, J. P. Kusanovic, F. Gotsch, O. Erez, S. Mazaki-Tovi, R. Gomez, S. Edwin, T. Chaiworapongsa, R. J. Levine and S. A. Karumanchi (2008). "A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate." J Matern Fetal Neonatal Med **21**(1): 9-23.
166. Rosenberg, T. J., S. Garbers, H. Lipkind and M. A. Chiasson (2005). "Maternal obesity and diabetes as risk factors for adverse pregnancy outcomes: differences among 4 racial/ethnic groups." Am J Public Health **95**(9): 1545-1551.
167. Roy, A., A. H. Khan, M. T. Islam, M. C. Prieto and D. S. Majid (2012). "Interdependency of cystathione gamma-lyase and cystathione beta-synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats." Am J Hypertens **25**(1): 74-81.
168. Sabry, S., F. Mondon, M. Levy, F. Ferre and A. T. Dinh-Xuan (1995). "Endothelial modulation of vasoconstrictor responses to endothelin-1 in human placental stem villi small arteries." Br J Pharmacol **115**(6): 1038-1042.
169. Saha, S., P. K. Chakraborty, X. Xiong, S. K. Dwivedi, S. B. Mustafi, N. R. Leigh, R. Ramchandran, P. Mukherjee and R. Bhattacharya (2016). "Cystathionine beta-synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration." FASEB J **30**(1): 441-456.
170. Saito, T., N. Takeda, E. Amiya, T. Nakao, H. Abe, H. Semba, K. Soma, K. Koyama, Y. Hosoya, Y. Imai, T. Isagawa, M. Watanabe, I. Manabe, I. Komuro, R. Nagai and K. Maemura (2013). "VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing." FEBS Lett **587**(14): 2179-2185.

171. Sanchez-Aranguren, L. C., C. E. Prada, C. E. Riano-Medina and M. Lopez (2014). "Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress." Front Physiol **5**: 372.
172. Sandrim, V. C., M. C. Dias, A. L. Bovolato, J. E. Tanus-Santos, E. Deffune and R. C. Cavalli (2016). "Plasma from pre-eclamptic patients induces the expression of the anti-angiogenic miR-195-5p in endothelial cells." J Cell Mol Med **20**(6): 1198-1200.
173. Sandrim, V. C., A. C. Palei, I. F. Metzger, V. A. Gomes, R. C. Cavalli and J. E. Tanus-Santos (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**(2): 402-407.
174. Shaamash, A. H., E. D. Elsnosy, A. M. Makhlof, M. M. Zakhari, O. A. Ibrahim and E. L.-d. HM (2000). "Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia." Int J Gynaecol Obstet **68**(3): 207-214.
175. Shah, D. A. and R. A. Khalil (2015). "Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia." Biochem Pharmacol **95**(4): 211-226.
176. Shefa, U., S. G. Yeo, M. S. Kim, I. O. Song, J. Jung, N. Y. Jeong and Y. Huh (2017). "Role of Gasotransmitters in Oxidative Stresses, Neuroinflammation, and Neuronal Repair." Biomed Res Int **2017**: 1689341.
177. Sheibani, L., T. J. Lechuga, H. Zhang, A. Hameed, D. A. Wing, S. Kumar, C. R. Rosenfeld and D. B. Chen (2017). "Augmented H2S production via cystathionine-beta-synthase upregulation plays a role in pregnancy-associated uterine vasodilation." Biol Reprod **96**(3): 664-672.
178. Shen, X., E. A. Peter, S. Bir, R. Wang and C. G. Kevil (2012). "Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens." Free Radic Biol Med **52**(11-12): 2276-2283.
179. Shi, X., P. Chen, H. Liu, F. Qiao, H. Liu, X. Gong, Y. Li, H. Du, W. Liu, G. Tang, J. Cao and Y. Wu (2015). "Decitabine Improves the Clinical Manifestations of Rats With l-NAME-Induced Pre-eclampsia: A Potential Approach to Studying Pre-eclampsia." Hypertens Pregnancy **34**(4): 464-473.
180. Shi, Y. X., Y. Chen, Y. Z. Zhu, G. Y. Huang, P. K. Moore, S. H. Huang, T. Yao and Y. C. Zhu (2007). "Chronic sodium hydrosulfide treatment decreases medial thickening of intramyocardial coronary arterioles, interstitial fibrosis, and ROS production in spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(4): H2093-2100.
181. Siddiqui, A. H., R. A. Irani, W. Zhang, W. Wang, S. C. Blackwell, R. E. Kellems and Y. Xia (2013). "Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated soluble fms-like tyrosine kinase-1 induction contributes to impaired adrenal vasculature and decreased aldosterone production in preeclampsia." Hypertension **61**(2): 472-479.
182. Siebert, N., D. Cantre, C. Eipel and B. Vollmar (2008). "H2S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of K(ATP) channels." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(6): G1266-1273.
183. Sladek, S. M., R. R. Magness and K. P. Conrad (1997). "Nitric oxide and pregnancy." Am J Physiol **272**(2 Pt 2): R441-463.

184. Sones, J. L., H. E. Lob, C. E. Isroff and R. L. Davisson (2014). "Role of decidual natural killer cells, interleukin-15, and interferon-gamma in placental development and preeclampsia." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **307**(5): R490-492.
185. Sonke, E., M. Verrydt, C. O. Postenka, S. Pardhan, C. J. Willie, C. R. Mazzola, M. D. Hammers, M. D. Pluth, I. Lobb, N. E. Power, A. F. Chambers, H. S. Leong and A. Sener (2015). "Inhibition of endogenous hydrogen sulfide production in clear-cell renal cell carcinoma cell lines and xenografts restricts their growth, survival and angiogenic potential." Nitric Oxide **49**: 26-39.
186. Stampalija, T., L. Monasta, D. D. Di Martino, M. Quadrifoglio, L. Lo Bello, G. D'Ottavio, S. Zullino, C. Mastroianni, D. Casati, V. Signorelli, E. Rosti, V. Cecotti, M. Ceccarello and E. Ferrazzi (2017). "The association of first trimester uterine arteries Doppler velocimetry with different clinical phenotypes of hypertensive disorders of pregnancy: a longitudinal study." J Matern Fetal Neonatal Med: 1-9.
187. Story, L. and L. C. Chappell (2017). "Preterm pre-eclampsia: What every neonatologist should know." Early Hum Dev.
188. Szabo, C. (2017). "Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications." Am J Physiol Cell Physiol **312**(1): C3-C15.
189. Szabo, C., C. Coletta, C. Chao, K. Modis, B. Szczesny, A. Papapetropoulos and M. R. Hellmich (2013). "Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(30): 12474-12479.
190. Szabo, C. and M. R. Hellmich (2013). "Endogenously produced hydrogen sulfide supports tumor cell growth and proliferation." Cell Cycle **12**(18): 2915-2916.
191. Tal, R. (2012). "The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha in preeclampsia pathogenesis." Biol Reprod **87**(6): 134.
192. Tang, G., G. Yang, B. Jiang, Y. Ju, L. Wu and R. Wang (2013). "H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor." Antioxid Redox Signal **19**(14): 1634-1646.
193. Tao, B., R. Wang, C. Sun and Y. Zhu (2017). "3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase, Not Cystathionine beta-Synthase Nor Cystathionine gamma-Lyase, Mediates Hypoxia-Induced Migration of Vascular Endothelial Cells." Front Pharmacol **8**: 657.
194. Tao, B. B., S. Y. Liu, C. C. Zhang, W. Fu, W. J. Cai, Y. Wang, Q. Shen, M. J. Wang, Y. Chen, L. J. Zhang, Y. Z. Zhu and Y. C. Zhu (2013). "VEGFR2 functions as an H₂S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045-Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells." Antioxid Redox Signal **19**(5): 448-464.
195. Tinsley, J. H., S. South, V. L. Chiasson and B. M. Mitchell (2010). "Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(3): R713-719.
196. Toohey, J. I. (2011). "Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane?" Anal Biochem **413**(1): 1-7.

197. Trowsdale, J. and A. Moffett (2008). "NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy." Semin Immunol **20**(6): 317-320.
198. Trundley, A. and A. Moffett (2004). "Human uterine leukocytes and pregnancy." Tissue Antigens **63**(1): 1-12.
199. Tsatsaris, V., F. Goffin, C. Munaut, J. F. Brichant, M. R. Pignon, A. Noel, J. P. Schaaps, D. Cabrol, F. Frankenne and J. M. Foidart (2003). "Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5555-5563.
200. Tsukimori, K., K. Fukushima, A. Tsushima and H. Nakano (2005). "Generation of reactive oxygen species by neutrophils and endothelial cell injury in normal and preeclamptic pregnancies." Hypertension **46**(4): 696-700.
201. Turpin, C. A., S. A. Sakyi, W. K. Owiredu, R. K. Ephraim and E. O. Anto (2015). "Association between adverse pregnancy outcome and imbalance in angiogenic regulators and oxidative stress biomarkers in gestational hypertension and preeclampsia." BMC Pregnancy Childbirth **15**: 189.
202. Tuzcu, Z. B., E. Ascioglu, M. Sunbul, B. Ozben, H. Arikan and M. Koc (2015). "Circulating endothelial cell number and markers of endothelial dysfunction in previously preeclamptic women." Am J Obstet Gynecol **213**(4): 533 e531-537.
203. Uddin, M. N., D. Horvat, S. Demorrow, E. Agunanne and J. B. Puschett (2011). "Marinobufagenin is an upstream modulator of Gadd45a stress signaling in preeclampsia." Biochim Biophys Acta **1812**(1): 49-58.
204. Umaru, B., A. Pyriochou, V. Kotsikoris, A. Papapetropoulos and S. Topouzis (2015). "ATP-sensitive potassium channel activation induces angiogenesis in vitro and in vivo." J Pharmacol Exp Ther **354**(1): 79-87.
205. van Dijk, M. and C. Oudejans (2013). "(Epi)genetics of pregnancy-associated diseases." Front Genet **4**: 180.
206. van Goor, H., J. C. van den Born, J. L. Hillebrands and J. A. Joles (2016). "Hydrogen sulfide in hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **25**(2): 107-113.
207. Vanhoutte, P. M., H. Shimokawa, M. Feletou and E. H. Tang (2017). "Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update." Acta Physiol (Oxf) **219**(1): 22-96.
208. Veenstra van Nieuwenhoven, A. L., M. J. Heineman and M. M. Faas (2003). "The immunology of successful pregnancy." Hum Reprod Update **9**(4): 347-357.
209. Velloso, E. P., R. L. Pimentel, J. F. Braga, A. C. Cabral, Z. S. Reis, M. Bader, R. A. Santos and G. Wallukat (2016). "Identification of a Novel Agonist-Like Autoantibody in Preeclamptic Patients." Am J Hypertens **29**(3): 405-412.
210. Venkatesha, S., M. Toporsian, C. Lam, J. Hanai, T. Mammoto, Y. M. Kim, Y. Bdolah, K. H. Lim, H. T. Yuan, T. A. Libermann, I. E. Stillman, D. Roberts, P. A. D'Amore, F. H. Epstein, F. W. Sellke, R. Romero, V. P. Sukhatme, M. Letarte and S. A. Karumanchi (2006). "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia." Nat Med **12**(6): 642-649.

211. Virtanen, A., T. Toimela, K. Tihtonen, J. R. Sarkanen, O. Huttala, T. Heinonen and J. Uotila (2016). "Strong inhibitory effect of pre-eclampsia serum on angiogenesis detected in vitro by human cell-based angiogenesis tests." *Pregnancy Hypertens* **6**(4): 367-373.
212. Wallace, A. E., S. S. Goulwara, G. S. Whitley and J. E. Cartwright (2014). "Oxygen modulates human decidual natural killer cell surface receptor expression and interactions with trophoblasts." *Biol Reprod* **91**(6): 134.
213. Wang, K., S. Ahmad, M. Cai, J. Rennie, T. Fujisawa, F. Crispi, J. Baily, M. R. Miller, M. Cudmore, P. W. Hadoke, R. Wang, E. Gratacos, I. A. Buhimschi, C. S. Buhimschi and A. Ahmed (2013). "Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine gamma-lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia." *Circulation* **127**(25): 2514-2522.
214. Wang, L., T. Yang, Y. Ding, Y. Zhong, L. Yu and M. Peng (2015). "Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia." *Endocrine* **48**(1): 299-308.
215. Wang, M. J., W. J. Cai, N. Li, Y. J. Ding, Y. Chen and Y. C. Zhu (2010). "The hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia." *Antioxid Redox Signal* **12**(9): 1065-1077.
216. Wang, Y. F., P. Mainali, C. S. Tang, L. Shi, C. Y. Zhang, H. Yan, X. Q. Liu and J. B. Du (2008). "Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats." *Chin Med J (Engl)* **121**(5): 420-423.
217. Wei, W., Z. W. Chen, Q. Yang, H. Jin, A. Furnary, X. Q. Yao, A. P. Yim and G. W. He (2007). "Vasorelaxation induced by vascular endothelial growth factor in the human internal mammary artery and radial artery." *Vascul Pharmacol* **46**(4): 253-259.
218. Wells, M. (2007). "The pathology of gestational trophoblastic disease: recent advances." *Pathology* **39**(1): 88-96.
219. Whitfield, N. L., E. L. Kreimier, F. C. Verdial, N. Skovgaard and K. R. Olson (2008). "Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(6): R1930-1937.
220. Williams, D. J., P. J. Vallance, G. H. Neild, J. A. Spencer and F. J. Imms (1997). "Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy." *Am J Physiol* **272**(2 Pt 2): H748-752.
221. Williams, P. J., J. N. Bulmer, R. F. Searle, B. A. Innes and S. C. Robson (2009). "Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy." *Reproduction* **138**(1): 177-184.
222. Williams, P. J., R. F. Searle, S. C. Robson, B. A. Innes and J. N. Bulmer (2009). "Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy." *J Reprod Immunol* **82**(1): 24-31.
223. Yan, H., J. Du and C. Tang (2004). "The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(1): 22-27.

224. Yang, G., L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder and R. Wang (2008). "H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase." Science **322**(5901): 587-590.
225. Yang, J., L. Li, J. Y. Shang, L. Cai, L. Song, S. L. Zhang, H. Li, X. Li, W. B. Lau, X. L. Ma and H. R. Liu (2015). "Angiotensin II type 1 receptor autoantibody as a novel regulator of aldosterone independent of preeclampsia." J Hypertens **33**(5): 1046-1056.
226. Yu, Y., L. Wang, T. Liu and H. Guan (2015). "MicroRNA-204 suppresses trophoblast-like cell invasion by targeting matrix metalloproteinase-9." Biochem Biophys Res Commun **463**(3): 285-291.
227. Zhang, H. H., J. C. Chen, L. Sheibani, T. J. Lechuga and D. B. Chen (2017). "Pregnancy Augments VEGF-Stimulated In Vitro Angiogenesis and Vasodilator (NO and H₂S) Production in Human Uterine Artery Endothelial Cells." J Clin Endocrinol Metab **102**(7): 2382-2393.
228. Zhao, W., J. F. Ndisang and R. Wang (2003). "Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues." Can J Physiol Pharmacol **81**(9): 848-853.
229. Zhao, W., J. Zhang, Y. Lu and R. Wang (2001). "The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener." EMBO J **20**(21): 6008-6016.
230. Zhou, Z., E. Martin, I. Sharina, I. Esposito, C. Szabo, M. Bucci, G. Cirino and A. Papapetropoulos (2016). "Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide." Pharmacol Res **111**: 556-562.
231. Zhu, M., Z. Ren, J. S. Possomato-Vieira and R. A. Khalil (2016). "Restoring placental growth factor-soluble fms-like tyrosine kinase-1 balance reverses vascular hyper-reactivity and hypertension in pregnancy." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **311**(3): R505-521.
232. Zhu, M. L., J. P. Zhao, N. Cui, V. H. Goncalves-Rizzi, J. S. Possomato-Vieira, R. A. Nascimento and C. A. Dias-Junior (2017). "Cardiac myeloperoxidase activity is elevated in hypertensive pregnant rats." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **37**(6): 904-909.