

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA PRAVASTATINA SOBRE A ATIVIDADE
GELATINOLÍTICA DA METALOPROTEINASE 2 EM
RATAS PRENHES HIPERTENSAS**

CRISTAL DE JESUS TOGHI

ORIENTADOR: CARLOS ALAN CANDIDO DIAS JUNIOR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2022**

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

Toghi, Cristal de Jesus.

Influência da pravastatina sobre a atividade
gelatinolítica da metaloproteinase 2 em ratas prenhes
hipertensas / Cristal de Jesus Toghi. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carlos Alam Candido Dias Junior

Capes: 21001006

1. Pravastatina. 2. Metaloproteases. 3. Hipertensão na
gravidez. 4. Pré-eclâmpsia. 5. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante; Hipertensão gestacional;
Metaloproteinasas; Pravastatina; Pré eclâmpsia.

Dedico este trabalho em homenagem a minha família e meu orientador por todo o amparo que ofereceram durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares que ofereceram todo o suporte necessário para que eu concluísse a graduação e foram meu refúgio nos momentos difíceis, em especial a Jade.

Agradeço aos meus amigos pela jornada de crescimento e partilha durante a graduação e por todo o incentivo, em especial a Camila, Fernando, Maria Beatriz, Michelli O., Micheli e Marcos.

Agradeço aos professores que cruzaram meu caminho e enriqueceram meus aprendizados, experiências e perspectivas.

Ao meu orientador, Professor Drº. Carlos Alan Candido Dias Junior por todo acolhimento, paciência, auxílio e orientação para o desenvolvimento e finalização deste projeto.

E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2020/01829-2) pela concessão da possibilidade de crescimento pessoal e profissional através da realização deste trabalho.

RESUMO

Distúrbios hipertensivos da gestação são as principais causas de mortalidade materna e fetal, sendo caracterizados por elevações da pressão arterial materna e que podem comprometer o desenvolvimento fetal. A patogenia ainda é uma incógnita, porém há teorias de que ocorra diminuição da plasticidade dos vasos da interface materno-fetal, isquemia placentária acompanhada da disfunção endotelial materna. Recentemente, sugere-se que alguns mediadores endógenos podem estar relacionados e que parecem participar da patogenia da hipertensão gestacional, a saber: a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e a atividade elevada das metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs). Portanto, esse estudo objetivou avaliar o impacto da pravastatina sobre as MMPs, uma vez que, esta estatina revelou aumentar a biodisponibilidade de NO e apresentou efeitos antioxidantes em modelo experimental de hipertensão gestacional em ratas e não afetou o desenvolvimento fetal. Para atingirmos este objetivo, ratas prenhes foram divididas em quatro grupos: prenhes normotensas (Norm-Preg); prenhes tratadas com pravastatina (Norm-Preg+Prava); prenhes hipertensas (HTN-Preg) e prenhes hipertensivas tratadas com pravastatina (HTN-Preg+Prava). A hipertensão em ratas prenhes foi induzida pelo modelo DOCA-sal. Foi registrado a pressão arterial das ratas, o peso das placentas, bem como foi examinado a atividade gelatinolítica da MMP-2, os metabólitos do NO e balanço redox. Além disso, a fim de avaliarmos a função endotelial das ratas, foi realizada a técnica de reatividade vascular em aorta abdominal. Os principais efeitos da pravastatina observados foram a atenuação da pressão arterial, a diminuição da contração do músculo liso da aorta abdominal com concomitante aumento da vasodilatação no grupo das ratas hipertensas tratadas com pravastatina, nesse grupo também foi observado aumento da biodisponibilidade do NO e diminuição da atividade da MMP-2. Nós concluímos que os efeitos pleiotrópicos associados à pravastatina no tratamento da hipertensão gestacional, preveniu a disfunção vascular e o desbalanço angiogênico.

Palavras-chave: hipertensão gestacional, metaloproteinases, antioxidante, pravastatina.

ABSTRACT

Hypertensive disorders of pregnancy are the main causes of maternal and fetal mortality, characterized by elevations in maternal blood pressure which may compromise fetal development. The pathogenesis is still unknown, but there are theories that there is a decrease in the plasticity of the vessels of the maternal-fetal interface, placental ischemia accompanied by maternal endothelial dysfunction. Recently, it has been suggested that some endogenous mediators may be related and they seem to participate in the pathogenesis of gestational hypertension, namely: the decrease in the bioavailability of nitric oxide (NO) and the high activity of extracellular matrix metalloproteinases (MMPs). Therefore, we aimed to evaluate the impact of pravastatin on MMPs, since this statin has been shown to increase the bioavailability of NO and has provided antioxidant effects in hypertensive pregnant rats without affecting fetal development. To achieve this aim, pregnant rats were divided into four groups: normotensive pregnant (Norm-Preg); pregnant rats treated with pravastatin (Norm-Preg+Prava); hypertensive pregnant rats (HTN-Preg) and hypertensive pregnant rats treated with pravastatin (HTN-Preg+Prava). Hypertension in pregnant rats was induced by the DOCA-salt model. The blood pressure of the rats and placentas and pups weights were recorded, as well as gelatinolytic activity of MMP-2, the metabolites of NO and redox balance were examined. In addition, in order to assess the endothelial function of rats, we performed the technique of vascular reactivity in the abdominal aorta. The main effects of pravastatin observed were the decrease in blood pressure, the decrease of contraction with concomitant increase of vasodilatation in the abdominal aorta in group hypertensive pregnant rats treated with pravastatin, in this group also were observed increase in NO bioavailability and attenuated MMP-2 activity. We conclude that pleiotropic effects associated with pravastatin treatment against hypertension in pregnancy, prevented vascular dysfunction and angiogenic imbalance.

Keywords: Gestational hypertension, metalloproteinases, antioxidant, pravastatin.

SUMÁRIO

RESUMO	5
1 INTRODUÇÃO	7
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivo Específico	12
4 METODOLOGIA	
4.1 Animais e protocolos experimentais	13
4.2 Reatividade Vascular	14
4.3 Zimografia	15
4.4 Determinação do óxido nítrico	16
4.5 Determinação do estresse oxidativo	16
4.6 Análise estatística	16
5 RESULTADOS	
5.1 Parâmetros hemodinâmicos	18
5.2 Variáveis fetais	18
5.3 Biodisponibilidade de óxido nítrico e lipoperoxidação	19
5.4 Atividade gelatinolítica da MMP-2	20
5.5 Reatividade vascular	20
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.	28

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os distúrbios hipertensivos da gestação constituem a primeira causa de morbidade e mortalidade materna-fetal. As síndromes hipertensivas da gestação podem ser classificadas em quatro tipos, sendo (1):

1 - Hipertensão arterial crônica - na qual a gestante apresenta histórico de pressão arterial prévia a gestação, ou quando o aumento da pressão arterial é identificada e diagnosticada antes da 20ª semana de gestação;

2 - Hipertensão gestacional - é a identificação de hipertensão em gestantes previamente normotensas, sem a presença de lesão de órgãos-alvo e proteinúria, a partir da 20ª semana de gestação, apresentando riscos de evolução para pré-eclâmpsia. Geralmente, essa condição desaparece até 12 semanas após o parto. Contudo, a persistência dos níveis pressóricos elevados deve ser reclassificada como hipertensão arterial crônica, que foi mascarada pelas alterações fisiológicas da primeira metade da gestação (2);

3- Pré-eclâmpsia/eclâmpsia - é diagnosticada quando os sintomas apresentados incluem hipertensão arterial (valor de pressão arterial ≥ 140 e/ou 90 mmHg) e a presença de proteinúria (300 mg em urina de 24 horas ou relação proteína/creatinina urinárias $\geq 0,3$ mg/dL) e/ou lesão de órgãos-alvo (trombocitopenia, disfunção hepática, insuficiência renal, edema pulmonar, iminência de eclâmpsia ou eclâmpsia), após a 20ª semana de gestação (3). Além disso, a associação de hipertensão arterial com sinais de comprometimento placentário, como restrição de crescimento fetal e/ou alterações dopplervelocimétricas, também deve chamar atenção para o diagnóstico de pré-eclâmpsia, mesmo na ausência de proteinúria (3);

4 - Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão arterial crônica - esse diagnóstico é estabelecido quando (a) após, a 20ª semana de gestação, há o aparecimento ou a piora da proteinúria detectada na primeira metade da gravidez; (b) há a necessidade de intervenção terapêutica com anti-hipertensivos ou incremento das doses terapêuticas iniciais; (c) há disfunção de órgãos-alvo (4).

Aproximadamente, 10% a 15% das mortes maternas diretas estão relacionadas à pré-eclâmpsia/eclâmpsia. A pré-eclâmpsia (PE) é uma patologia multissistêmica do ciclo gravídico puerperal, cuja etiologia é desconhecida, porém acredita-se que seja multifatorial

(4). Há duas formas que a PE pode se apresentar, sendo uma a pré-eclâmpsia placentária e a pré-eclâmpsia materna (4,5,6).

A etiologia da PE placentária é multifatorial e pode envolver predisposição genética, ambiental e nutricional, má adaptação imunológica e fatores raciais que levam a uma placentação anormal, caracterizando uma fisiopatologia composta por inflamação exacerbada, disfunção endotelial e distúrbios imunológicos (7,8). Em gestações saudáveis, as artérias espiraladas uterinas alteram seu fenótipo de vasos de alta resistência para vasos de baixa resistência, o que permite prover uma adequada implantação e crescimento do feto, que ocorre pela invasão trofoblástica normal (9). Entretanto, uma das teorias que podem explicar, ao menos em parte sua patogênese, é baseada na invasão trofoblástica deficiente que resulta em vasos de alta resistência e circulação placentária com baixo fluxo (10), que ocorre devido a falha da célula trofoblástica em alterar seu perfil de expressão de molécula de adesão característica de célula epitelial para célula endotelial. A PE também é caracterizada pelo predomínio de fatores antiangiogênicos, como o s-Flt e a s-Endoglina. Além disso, há uma mudança do padrão de células imunológicas T helper 1 para células T helper 2, as quais favorecem o desbalanço prostaciclina/tromboxano A₂, a redução da biodisponibilidade de vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), o aumento de vasoconstritores como a endotelina (ET-1), o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a desregulação do sistema renina angiotensina, ocasionando um aumento do tônus vascular, hipertensão arterial e disfunção endotelial. O desbalanço entre a biodisponibilidade de vasodilatadores e vasoconstritores, pode explicar a causa da restrição do crescimento intrauterino (11). Ademais, as espécies reativas de oxigênio em excesso resultam em estresse oxidativo e podem causar a ativação das metaloproteinases de matriz (12). As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem a uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes e são expressas em diversos tecidos, como músculo liso vascular, células endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias (13). As MMPs podem ser classificadas a partir da sua afinidade por determinados substratos que degradam, sendo classificadas em: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e de membrana (14). A gelatinase MMP-2 tem sido associada a doenças cardiovasculares, pois provoca degradação excessiva dos componentes da matriz extracelular ocasionando um remodelamento vascular hipertensivo que inclui disfunção endotelial, espessamento da parede, hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas dos vasos, migração, proliferação e apoptose celular (15,16). Além disso, a PE placentária pode envolver a lesão de órgãos-alvo, que inclui os rins, nos quais é possível observar o

comprometimento do fluxo sanguíneo e filtração glomerular, além de endoteliose e aumento da excreção de ácido úrico e creatinina; o fígado, no qual pode ser observado o aumento da resistência vascular, depósito de fibrina nos sinusóides, o aumento de transaminases hepáticas, entre outras alterações; cérebro, onde pode haver descontrole da pressão e de perfusão, lesão vascular, edema e hemorragia; coração, o qual apresenta aumento da resistência vascular, levando a um aumento da pós-carga e disfunção diastólica ventricular esquerda; placenta, o qual apresenta aumento de nós sinciciais, infarto e aumento de depósitos de fibrina, os quais contribuem para a diminuição do fluxo sanguíneo, oxigênio e nutrientes de maneira crônica, caracterizando sofrimento fetal crônico e restrição do crescimento fetal (4).

A PE materna apresenta duas origens, sendo a primeira relacionada ao comprometimento vascular materno pré-existente (senescência precoce da placenta), como em mulheres que apresentam hipertensão arterial crônica, diabetes Mellitus tipos 1 e 2, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome antifosfolípide, doença renal e índice de massa corpórea (IMC) ≥ 30 , e a segunda causa é relacionada ao crescimento exagerado da placenta, como nos casos de mola hidatiforme e gestação múltipla. É diagnosticada após a 34ª semana de gestação, e não leva a alteração no peso fetal e fluxo das arteríolas uterinas e umbilicais, como na PE placentária (4).

O caráter multissistêmico da pré-eclâmpsia implica a possibilidade de evolução para situações de maior gravidade como iminência de eclâmpsia, eclâmpsia, síndrome HELLP e morte (4). A iminência de eclâmpsia é um quadro grave que inclui comprometimento do sistema nervoso central, que se apresenta através dos sintomas de cefaleia, obnubilação, torpor e alteração comportamental; alterações visuais, que incluem escotomas, fosfenas, fotofobia, turvação e perda de visão; e alterações gástricas que envolvem dor epigástrica, náuseas e vômito (4). A eclâmpsia é caracterizada pela ocorrência de crise convulsiva tônico-clônica generalizada ou coma em gestantes com pré-eclâmpsia (4). A síndrome HELLP (do inglês Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets) envolve alterações como hemólise, diminuição da hemoglobina (levando a um quadro de anemia grave), aumento da bilirrubina total ($\geq 1,2$ mg), aumento da desidrogenase láctica (DHL), presença de esquizócitos, diminuição da haptoglobina (menor que 0,3 mg), aumento das transaminases hepáticas (TGO e TGP) e plaquetopenia (4).

A prevenção da PE é feita em gestantes que apresentam pelo menos um fator de alto risco (histórico de PE, gestação múltipla, obesidade, hipertensão arterial crônica, diabetes mellitus tipos 1 e 2 e doenças autoimunes) e dois ou mais fatores de risco moderado (nuliparidade, histórico familiar de PE, etnia afrodescendente, idade superior a 35 anos, história pessoal de baixo peso ao nascer, gravidez prévia com desfecho adverso e intervalo superior a 10 anos da última gestação), a qual envolve a administração de ácido acetilsalicílico (100 mg) a noite a partir da 12^a semana até a 36^a de gestação, o qual aumenta a prostaciclina, em relação a circulação de tromboxano A₂, e a suplementação de cálcio com carbonato de cálcio (1-2 mg/dia) ou citrato de cálcio (2-4 mg/dia) durante toda a gestação (3, 4, 17). Além disso, a prevenção também envolve impedir a progressão para formas mais graves, através do diagnóstico precoce, acompanhamento hospitalar especializado com ou sem sinais de gravidade, acompanhamento frequente dos exames laboratoriais para diagnóstico laboratorial prévio ao clínico e a aplicação do tratamento, o qual inclui o uso de anti-hipertensivos e sulfato de magnésio (18), que contribuem para a prevenção da crise hipertensiva e iminência de eclâmpsia, e a recomendação do parto prematuro (a partir da 37^a semana de gestação) (4,18). O tratamento para a pré-eclâmpsia é limitado, portanto estudos que investigam novas abordagens terapêuticas são muito importantes.

Atualmente, as estatinas estão sendo estudadas para o tratamento de PE, em razão dos efeitos pleiotrópicos associados a esta classe farmacológica. As estatinas são drogas que inibem a 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a qual está envolvida com a síntese do colesterol endógeno (19-22), portanto, são prescritas clinicamente para a inibição da biossíntese de colesterol e para prevenir a progressão da arteriosclerose (23,24). Há seis tipos de estatinas, as naturais, as quais incluem a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina, e as sintéticas, que são a atorvastatina, fluvastatina e a rosuvastatina. Estudos demonstraram que a pravastatina é a única estatina com potencial para o tratamento da PE, devido ao seu perfil hidrofílico, enquanto as demais não são solúveis em água, o que limita o transporte através da placenta. Além disso, estudos demonstraram que os efeitos pleiotrópicos da pravastatina incluem melhora da disfunção endotelial, aumento da biodisponibilidade de NO (20,21), atenuação da pressão arterial sistólica e da restrição do crescimento intra-uterino, redução do estresse oxidativo (25) e atenuação da disfunção cardiovascular pós-parto em ratas hipertensas sem prejudicar a prole (26). Portanto, este estudo objetivou avaliar o impacto da pravastatina sobre a MMP-2 e na biodisponibilidade de NO em modelo animal de prenhez hipertensa induzida pelo modelo DOCA-sal. A fim de avaliarmos esses mecanismos na

prenhez hipertensa, foi mensurado a pressão arterial sistólica, o peso placentário, a formação de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio plasmático, a função endotelial e a atividade da metaloproteinase-2 placentária.

2. JUSTIFICATIVA

Devido à escassez de fármacos para tratar a hipertensão gestacional e também de informações sobre os efeitos pleiotrópicos das estatinas, incluindo a pravastatina, este grupo de drogas tem revelado potenciais ações benéficas e que merecem ser melhor exploradas, para que futuramente possa vir a ser usada no tratamento dos distúrbios hipertensivos da gestação humana (27).

Entre as ações benéficas apresentadas com o uso das estatinas, encontra-se a estimulação da expressão do óxido nítrico sintase (eNOS) (28,29,30) com consequente aumento da síntese de óxido nítrico, (31,32). Estas ações atribuídas às estatinas podem estar relacionadas com o efeito anti-hipertensivo encontrado em ratas prenhes hipertensas (25,33). No entanto, nenhum estudo investigou se a pravastatina é capaz de atenuar a atividade gelatinolítica vascular da MMP-2 na hipertensão gestacional.

Portanto, foi investigado se os efeitos antioxidantes atribuídos à pravastatina (33) são acompanhados da redução da atividade gelatinolítica da MMP-2, uma vez que há poucas alternativas de drogas que apresentem estas ações e que, ao mesmo tempo, oferecem segurança tanto para a gestante quanto para o feto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos da pravastatina sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2, que está associada ao remodelamento vascular patológico, como previamente observado em gestantes com pré-eclâmpsia (15,34,35) e também experimentalmente (36,37).

3.2 Objetivos específicos

De maneira interessante, aumentos na atividade da MMP-2 foram acompanhados de reduções das concentrações plasmáticas de metabólitos do óxido nítrico em modelo animal de hipertensão gestacional (37), sendo assim, também foram quantificados os metabólitos do óxido nítrico no plasma sanguíneo das ratas para avaliação desta relação.

Além disso, foram avaliadas as repercussões vasculares maternas por meio da aferição da pressão arterial sistólica e da técnica de reatividade vascular, e também foram mensurados o peso placentário e o número total de filhotes para examinar a repercussão da pravastatina nesses parâmetros.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais e protocolos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu - IBB/UNESP, com o protocolo número 3902030620-CEUA. Ratos da raça Wistar, pesando entre 200 a 250g, com 12-16 semanas de idade ficaram alojados em gaiolas e mantidos sob um ciclo de 12 horas (claro-escuro) e com livre acesso à água e ração, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

Para o acasalamento “overnight”, foram separados um macho e duas fêmeas (sistema Harém) dentro de uma caixa, no final da tarde. Na manhã seguinte, foi realizado o esfregaço vaginal em todas as ratas para confirmar a presença de espermatozóides e a fase de estro, os quais determinaram o primeiro dia da prenhez. Após a confirmação da prenhez, as ratas foram transferidas para gaiolas individuais até o dia 19 da prenhez.

Após a confirmação da prenhez, as ratas foram separadas em caixas e aleatoriamente distribuídas nos seguintes grupos:

Grupo Norm-Preg (n = 8) – ratas prenhes normotensas que receberam soro fisiológico (0,3 – 0,45 mL) por gavagem a partir do dia 10 até o dia 19 da prenhez e injeções intraperitoneais (i.p.) de soro fisiológico nos dias 1, 7 e 14 da prenhez e, tiveram livre acesso à água potável.

Grupo Norm-Preg+Prava (n = 8) – ratas prenhes normotensas que receberam pravastatina (10 mg/kg/dia) por gavagem a partir do dia 10 até o dia 19 da prenhez e injeções i.p. de soro fisiológico nos dias 1, 7 e 14 da prenhez e tiveram livre acesso à água potável.

Grupo HTN-Preg (n = 8) – ratas prenhes que receberam soro fisiológico (0,3 – 0,45 mL) por gavagem a partir do dia 10 até o dia 19 da prenhez e injeções i.p. de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) nos dias 1, 7 e 14 da prenhez para indução e manutenção da hipertensão e, além disso, tiveram livre acesso para beber salina.

Grupo HTN-Preg+Prava (n = 8) – ratas prenhes receberam pravastatina (10 mg/kg/dia) por gavagem a partir do dia 10 até o dia 19 da prenhez e injeções i.p. de DOCA nos dias 1, 7 e 14 da prenhez e, além disso, tiveram livre acesso para beber salina.

A primeira injeção de DOCA foi através da aplicação i.p. da dose de 12,5 mg/kg no primeiro dia da prenhez (dia 1), seguidas por doses subsequentes de 6,5 mg/kg de DOCA nos respectivos dias 7 e 14 da prenhez. A pravastatina (10 mg) foi solubilizada em água potável (1mL).

Para a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, as ratas conscientes foram contidas em uma caixa de acrílico e colocadas em bio-aquecedor por 5-10 minutos em uma temperatura de 40°C (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP). A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada com a média da inflação-deflação três vezes do manguito de cauda do pletismógrafo (Pletismógrafo de cauda digital, Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A PAS foi medida nos dias 1, 7 e dos dias 10 ao 19 da gestação, antes das administrações de medicamentos ou soluções salinas.

As ratas foram mortas individualmente no dia 19 da prenhez, sob baixas doses de Isoflurano (3%), para perda dos reflexos sensoriais e motores. Após, foi realizada uma exsanguinação por punção cardíaca e o sangue foi armazenado em tubo liofilizado contendo heparina e imediatamente submetido à centrifugação, para a separação do plasma, levando o animal à morte por hipovolemia. Em seguida, foram retiradas a aorta abdominal, as placentas e os filhotes. A aorta abdominal foi utilizada para a realização do protocolo de reatividade vascular, enquanto as placentas foram pesadas e utilizadas para a determinação da atividade da MMP-2 através das técnicas de zimografia, e os filhotes determinaram o número total de filhote por ninhada.

4.2 Reatividade vascular

A aorta abdominal, de cada rata, foi dissecada e segmentada em quatro anéis de 3-4mm, sendo que dois anéis tiveram seu endotélio removido mecanicamente e dois tiveram seu endotélio conservado. Os anéis aórticos foram colocados em uma câmara de órgãos de 10mL contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl 130; KCl 4,7; CaCl₂ 1,6; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 15; glucose 11,1, in mmol/L) com pH de 7,4 a 37°C, e borbulhando continuamente com uma mistura carbogênica composta de 95% O₂ e 5% CO₂. Os anéis foram suspensos entre dois ganchos de arame (27), sendo um gancho fixado a um suporte estacionário e o outro foi conectado a um transdutor de força isométrico. As alterações na tensão da aorta foram registradas usando transdutores de força isométricos FORT10 conectados ao Transbridge 4M Transbridge Amplifier conectado a um PC com o sistema MP100 e analisados offline usando o software AcqKnowledge versão 3.5.7 (27). Os anéis

foram esticados sob 1,5 g de tensão basal e foram deixados em equilíbrio por 45 minutos, sendo que o tecido foi lavado com solução de Krebs-Henseleit a cada 15 minutos.

Para avaliar a capacidade da contratilidade dos anéis aórticos, eles foram estimulados com diferentes drogas e concentrações. Primeiro os anéis foram estimulados com 480µL de KCl (96mmol/L) para contração dependente do músculo liso vascular. Os anéis não responsivos ao KCl foram descartados. Em seguida, os anéis foram estimulados com 50µL de KCl (96mmol/L) em uma curva de contração crescente que variou desde -10 até atingirem a concentração de -120 na cuba, após estabilizarem na contração máxima induzida. Posteriormente, os anéis foram estimulados com concentrações crescentes de fenilefrina (Phe, 100µL de 10^{-9} ; 20µL de $10^{-8,5}$; 70µL de 10^{-8} ; 20µL de $10^{-7,5}$; 70µL de 10^{-7} ; 20µL de $10^{-6,5}$; 70µL de 10^{-6} ; 20µL de $10^{-5,5}$; 70µL de 10^{-5} ; 20µL de $10^{-4,5}$ e 70µL de 10^{-4}) para contração, e para investigação da função endotelial, os anéis já previamente contraídos após a curva Phe foram estimulados com concentrações crescentes de acetilcolina (ACh, 100µL 10^{-9} ; 90µL 10^{-8} - 10^{-4}). Para a avaliação da participação do NO dependente de endotélio na vasodilatação, foi incubado 100µL 10^{-3} de L-NAME durante 20 minutos, e após, os anéis foram estimulados com 100µL a 10^{-6} de Phe, e após alcançado uma concentração máxima, foram adicionadas concentrações crescentes de acetilcolina (100µL 10^{-9} ; 90µL 10^{-8} - 10^{-4}). Para a avaliação da vasodilatação não-dependente de endotélio, os vasos foram estimulados com 100µL a 10^{-6} de Phe, e em seguida foi realizada a curva de concentrações crescentes de nitroprussiato (NPS, 100µL 10^{-11} ; 90µL 10^{-10} - 10^{-6}).

4.3 Zimografia

A zimografia determinou a atividade da MMP-2 na placenta. As amostras dos tecidos foram congeladas em um freezer a -80°C . As amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA (constituído por 1mM de 1,10-ortofenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM e N-etilmaleimida 1 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e com inibidores de proteases (constituído por fluoreto de 4- (2-aminoetil) benzenossulfonila, E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina e EDTA) na proporção de 100 µL de RIPA + inibidor de protease para cada 10 mg de amostra de tecido. Em seguida, a amostra foi colocada no gelo e submetida à agitação leve durante 2 horas, e centrifugada a 12 mil rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos (37). As concentrações de proteínas presentes nos tecidos foram medidas através do ensaio de Bradford (Sigma Aldrich). As amostras de proteínas da placenta (5 µg) foram diluídos 1:1

com tampão de amostra (concentração final): dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2%, Tris – HCl 125 mM, pH 6,8, glicerol a 10% e 0,001 % de azul de bromofenol (37).

Após serem diluídas, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12% copolimerizada com gelatina (0,05%) como substrato. Os géis obtidos da eletroforese foram primeiro incubados duas vezes por 30 minutos a temperatura ambiente com solução de Triton X-100 a 2%, em seguida foram lavados e incubados a 37°C por 18 horas com tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 10 mmol / L CaCl₂. Posteriormente, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,05%, e em seguida foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. A atividade gelatinolítica foi identificada utilizando o software ImageJ (37).

4.4 Determinação do óxido nítrico

Os metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato) foram examinados através do método de Griess, expressos em $\mu\text{mol} / 100 \text{ mg}$ de tecido. O plasma armazenado no -20°C foi homogeneizado e centrifugado a 15.000g a 4°C durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e incubado com 100 μL de solução saturada de cloreto de vanádio III durante 3 horas a 37° C com agitação. Logo após, foram adicionados 50 μL de sulfanilamida a 1% diluída em ácido fosfórico a 5% e 50 μL de 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil) –etilenodiamina, e incubados durante 10 minutos protegido da luz. A luminescência foi lida no espectrofotômetro (Synergy 4; BIOTEK, Winooski, VT, EUA) a 535 nm (25).

4.5 Determinação do estresse oxidativo

A peroxidação lipídica foi determinada através de medidas de ácido tiobarbitúrico (TBA). Foram adicionados nos tubos de ensaio 100 μL de água destilada, 50 μL de dodecilsulfato de sódio a 8,1% (SDS), 100 μL de amostras (plasma), 375 μL de ácido acético a 20% e 375 μL de TBA a 0,8%, que foram submetidos a banho maria durante uma hora a 95° C, e em sequência foram centrifugados a $15.000 \times g$ por 10 minutos (38). A reação TBA com malondialdeído (MDA), o qual é o produto final da lipoperoxidação produziu uma reação colorimétrica que foi medida pelo espectrofotômetro (Synergy 4; BIOTEK, Winooski, VT, EUA) em um comprimento de onda de 533 nm (25). Os níveis de lipoperoxidação foram expressos em nmol/ml (38).

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. As comparações entre os grupos foram avaliadas por análise de variância bidirecional (ANOVA) ou ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Tukey. Foi considerado um valor de probabilidade $P < 0,05$ significativo. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 6.01).

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros hemodinâmicos

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas da pressão arterial sistólica (PAS) entre os grupos, no período compreendido entre o primeiro ao décimo quinto dia da prenhez (Tabela 1). Contudo, no período compreendido entre os dias 16° a 19° de prenhez, foi observado uma diminuição na PAS no grupo HTN-Preg+Prava comparado aos grupos Norm-Preg, Norm-Preg+Prava e HTN-Preg (101 ± 2 , 110 ± 2 , 115 ± 2 e 116 ± 2 mmHg, $^{*}\#P < 0.05$, respectivamente, Tabela 1). Além disso, o grupo HTN-Preg+Prava apresentou uma diminuição na PAS durante o período de tratamento compreendido entre os dias 11-15 e 16-19 comparados ao sétimo dia gestacional, no qual o grupo apenas recebeu DOCA (109 ± 3 , 101 ± 2 e 125 ± 4 , mmHg, $P < 0.05$, respectivamente, Tabela 1). Em contraste, o grupo HTN-Preg não apresentou nenhuma diferença nos mesmos períodos.

Tabela 1. Variáveis hemodinâmicas dos grupos: Norm-Preg (n = 8), Norm-Preg+Prava (n = 8), HTN-Preg (n = 8) e HTN-Preg+Prava (n = 8). Aferições realizadas do primeiro dia da prenhez ao décimo nono. Os dados estão apresentados como média $\pm$ S.E.M., $^{*}\#P < 0.05$.

Grupos	Pressão arterial sistólica				
	1°	7°	10°	11°-15°	16°-19°
Norm-Preg	115 ± 4	120 ± 4	104 ± 5	110 ± 3	110 ± 2
Norm-Preg+Prava	112 ± 4	119 ± 4	120 ± 4	116 ± 3	115 ± 2
HTN-Preg	116 ± 4	125 ± 4	119 ± 4	115 ± 3	116 ± 2
HTN-Preg+Prava	110 ± 4	125 ± 4	110 ± 4	109 ± 3	$101 \pm 2^{*}\#$

Dados são expressos como média $\pm$ SEM.

$^{*}P < 0.05$ vs HTN-Preg.

5.2 Variáveis fetais

A pravastatina reverteu a restrição do crescimento placentário no grupo HTN-Preg+Prava (0.288 ± 0.012 g, $P < 0.05$; Tabela 2). O grupo HTN-Preg+Prava não demonstrou diferenças significativas com os grupos das ratas normotensas (0.288 ± 0.012 g e 0.294 ± 0.013 g foi encontrado nos grupos Norm-Preg e Norm-Preg+Prava, respectivamente, $P < 0.05$; Tabela 2). Entretanto, o grupo das ratas hipertensas não tratadas também não demonstrou diferenças significativas entre os demais grupos.

O número total de filhotes não demonstrou diferenças significativas entre os quatro grupos (8 ± 1 , 8 ± 2 , 10 ± 1 e 9 ± 1 foram encontrados nos grupos Norm-Preg, Norm-Preg+Prava, HTN-preg e HTN-Preg+Prava, respectivamente; $P < 0.05$; Tabela 2).

Tabela 2. Os pesos placentários e o número total de filhotes foram registrados no dia 19 da prenhez entre os quatro grupos: Norm-Preg ($n = 8$), Norm-Preg+Prava ($n = 8$), HTN-Preg ($n = 8$) e HTN-Preg+Prava ($n = 8$). Os dados estão apresentados como média $\pm$ S.E.M., $^{*}P < 0.05$.

Grupos				
Variáveis	Norm-Preg	Norm-Preg+Prava	HTN-Preg	HTN-Preg+Prava
Nº de filhotes	8 ± 1	8 ± 2	10 ± 1	9 ± 1
Peso placentário (g)	$0,288 \pm 0,012g$	$0,294 \pm 0,013g$	$0,295 \pm 0,018g$	$0,288 \pm 0,012g$

Dados são expressos como média $\pm$ SEM.

$^{*}P < 0.05$ vs HTN-Preg.

5.3 Biodisponibilidade de óxido nítrico e lipoperoxidação

Foi observado que o grupo HTN-Preg apresentou maiores valores de peroxidação lipídica no plasma ($0,170 \pm 0,010$ mmol/L) comparado aos grupos Norm-Preg, HTN-Preg e HTN-Preg+Prava ($0,113 \pm 0,010$, $0,120 \pm 0,01$ e $0,132 \pm 0,011$ mmol/L, respectivamente, $^{*}P < 0.05$. Figura 1A). Também foi observado uma diminuição significativa na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) no plasma no grupo das ratas hipertensas ($0,222 \pm 0,02$ mmol/L) comparado aos grupos Norm-Preg, Norm-Preg+Prava e HTN-Preg+Prava ($0,302 \pm 0,024$, $0,313 \pm 0,022$ e $0,296 \pm 0,021$ mmol/L, respectivamente; $^{*}P < 0.05$. Figura 1B).

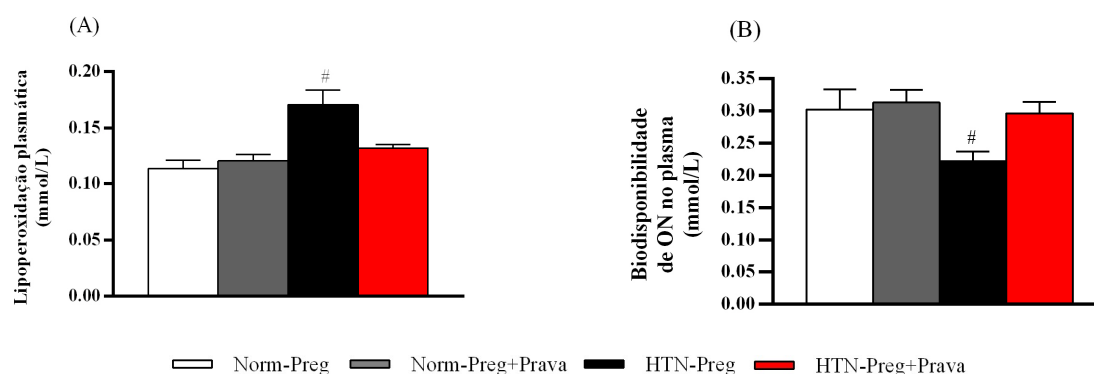


Figura 1. Avaliação da biodisponibilidade de NO (A) e níveis de lipoperoxidação no plasma dos grupos experimentais, sendo estes: Norm-Preg ($n = 8$), Norm-Preg+Prava ($n = 8$), HTN-Preg ($n = 8$) e HTN-Preg+Prava ($n = 8$). Os valores estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. $^{*}P < 0.05$.

5.4 Atividade gelatinolítica da MMP-2

A atividade da isoforma ativa da MMP-2 (65 KDa) na placenta foi mais alta no grupo das ratas hipertensas comparado aos grupos das ratas normotensas, normotensas tratadas e hipertensas tratadas com pravastatina (0.1007 ± 0.01 , 0.073 ± 0.013 , 0.073 ± 0.011 and 0.06870 ± 0.01 *#P < 0.05, respectivamente; Figura 2C). Contudo, a atividade de ambas as formas inativas da MMP-2 (75 KDa e 72 KDa) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 2A e Figura 2B, respectivamente).

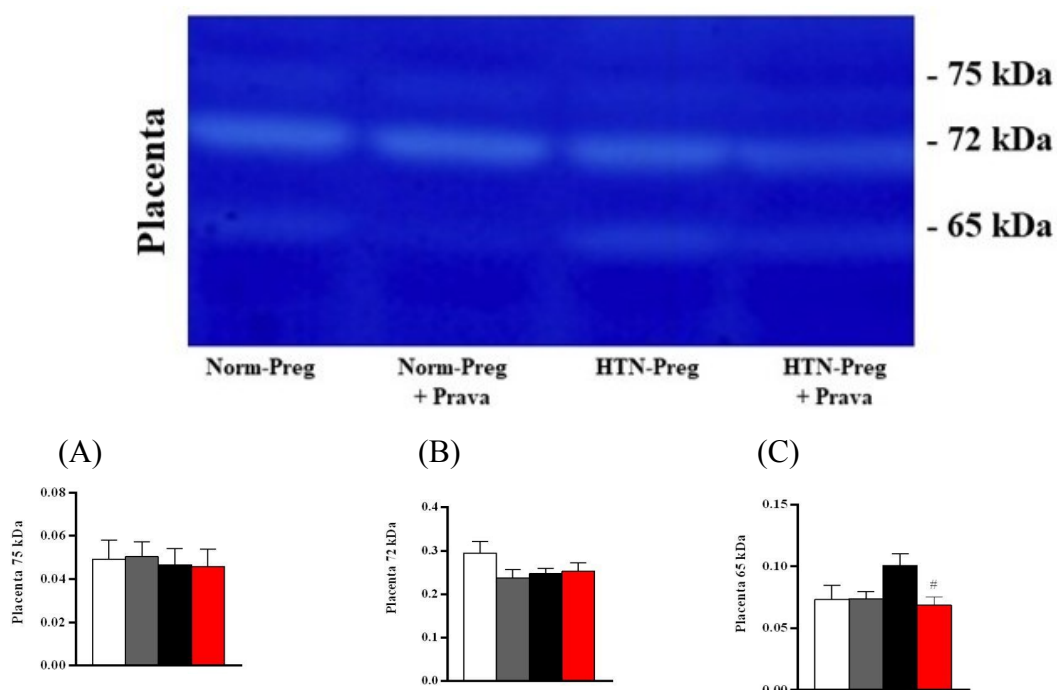


Figura 2. Gel representativo do gel de zimografia da placenta. (A) Atividade gelatinolítica da MMP-2 75 KDa, (B) Atividade gelatinolítica da MMP-2 72 KDa; (C) Atividade gelatinolítica da MMP-2 65 KDa, entre os quatro grupos: Norm-Preg (n = 8), Norm-Preg+Prava (n = 8), HTN-Preg (n = 8) e HTN-Preg+Prava (n = 8). Os valores estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. #*P<0.05.

5.5 Reatividade vascular

Foi observada uma diminuição da resposta vasoconstritora hiper-reativa ao KCl no anéis da aorta abdominal no grupo HTN-Preg+Prava comparado aos grupos Norm-Preg, Norm-Preg+Prava e HTN-Preg (0.860 ± 0.448 , 2.146 ± 0.468 , 2.000 ± 0.413 e 2.025 ± 0.448 , respectivamente, #*P < 0.05; Figura 2A).

Ademais, na curva concentração-resposta ao KCl, os anéis aórticos do grupo das ratas hipertensas tratadas com pravastatina demonstrou uma diminuição da contração comparado aos grupos Norm-Preg, Norm-Preg+Prava e HTN-Preg (0.6963 ± 0.097 , 1.039 ± 0.106 , 1.183 ± 0.106 e 1.175 ± 0.097 , respectivamente, $\#*P < 0.05$; Figura 2B).

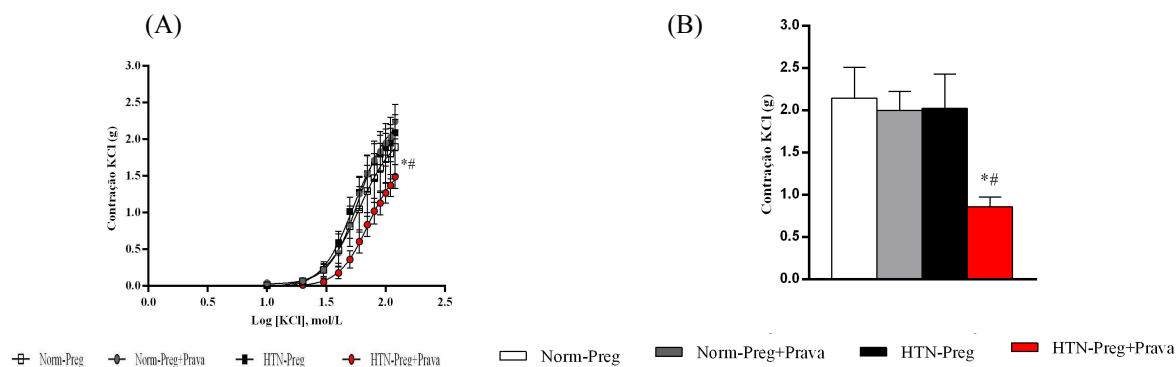


Figura 2. Contração hiper-reativa (A) e contração reativa (B) ao KCl nos anéis da aorta abdominal nos quatro grupos avaliados, sendo estes: Norm-Preg (n = 8), Norm-Preg+Prava (n = 8), HTN-Preg (n = 8) e HTN-Preg+Prava (n = 8). Os valores estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. $\#*P < 0.05$.

As contrações hiper-reativa (Figura 4A) e reativa (Figura 4B) induzidas pela fenilefrina (Phe) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

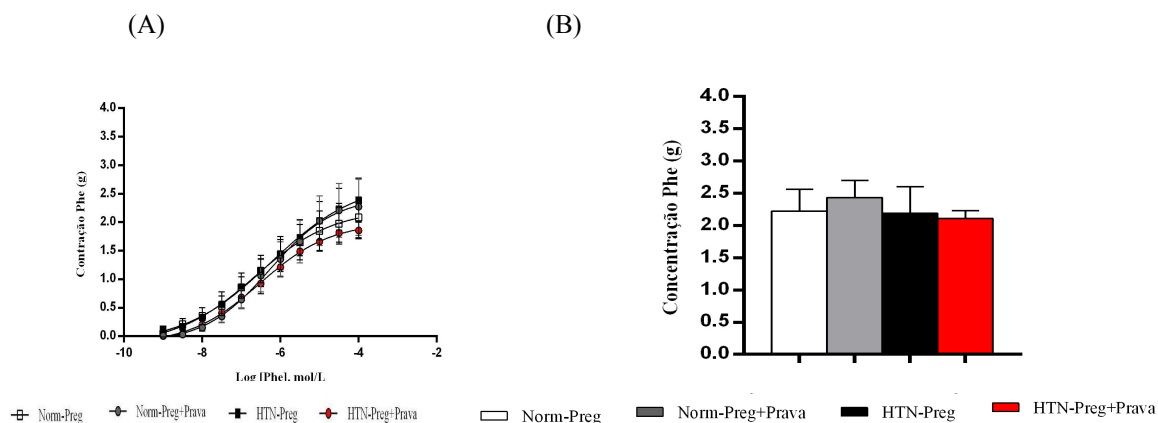


Figura 3. Contrações hiper-reativa (A) e reativa (B) induzida pela fenilefrina nos anéis de aorta abdominal nos quatro grupos experimentais, sendo estes: Norm-Preg (n = 8), Norm-Preg+Prava (n = 8), HTN-Preg (n = 8) e HTN-Preg+Prava (n = 8). Phe = fenilefrina. Os valores estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. $\#*P < 0.05$.

A curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh), na presença de L-NAME ou não, foram expressas como porcentagem (%) de relaxamento em resposta à contração induzida por Phe. Na curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh), foi observado uma vasodilatação

prejudicada no grupo das ratas hipertensas não tratadas (Figura 4A). Além disso, ambos os grupos tratados com a pravastatina demonstraram uma melhor vasodilatação induzida pela Ach comparado aos grupos não tratados (52.06 ± 2.789 , 35.87 ± 2.789 , 46.98 ± 2.865 e 38.97 ± 3.104 foram observados nos grupos Norm-Preg, Norm-Preg+Prava, HTN-Preg e HTN-Preg+Prava, respectivamente, $\#*P < 0.05$; Figura 4A). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na curva concentração-resposta à ACh nos anéis aórticos com o endotélio removido mecanicamente (Figura 4B) e também, na presença de L-NAME (Figura 4C).

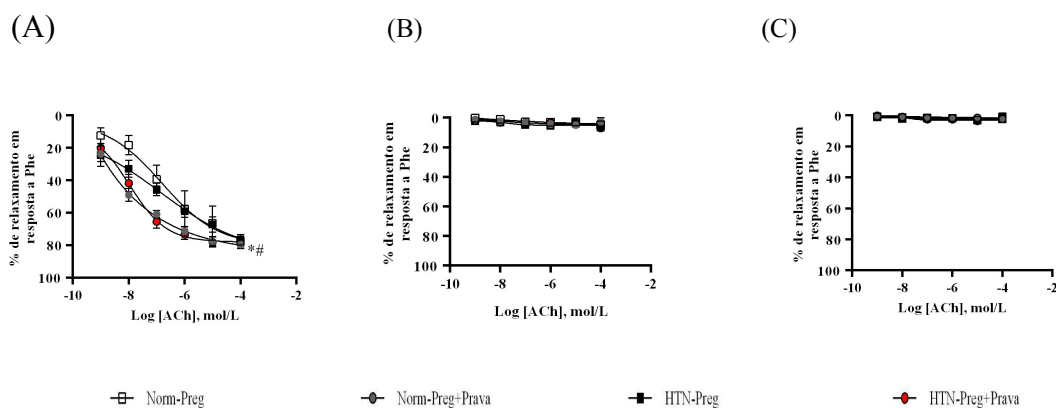


Figura 4. Indução do relaxamento de anéis aórticos através da administração de acetilcolina em anéis com endotélio (A) e anéis com endotélio removido (B) e na presença de L-NAME (C) nos diferentes grupos experimentais, sendo estes: Norm-Preg (n = 8), Norm-Preg+Prava (n = 8), HTN-Preg (n = 8) e HTN-Preg+Prava (n = 8). Ach = acetilcolina. Phe = fenilefrina. Os valores estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. $\#P < 0.05$.

A vasodilatação não dependente de endotélio foi avaliada através da curva de concentração-resposta ao nitroprussiato, a qual demonstrou que o grupo das ratas normotensas tratadas com a pravastatina obteve uma melhor resposta comparado aos grupos Norm-Preg, HTN-Preg e HTN-Preg+Prava (35.19 ± 2.319 , 48.77 ± 2.319 , 50.79 ± 2.643 e 49.93 ± 2.643 , respectivamente, $\#*P < 0.05$; Figura 5).

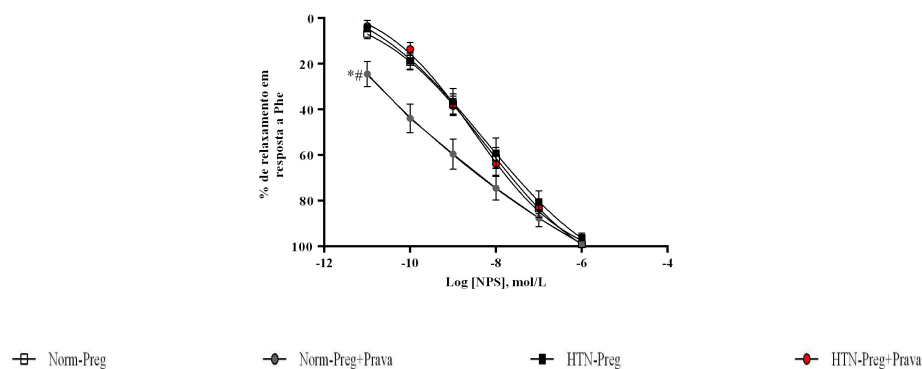


Figura 5. Indução do relaxamento de anéis aórticos através da administração de nitroprussiato nos diferentes grupos experimentais, sendo estes: Norm-Preg (n = 8), Norm-Preg+Prava (n = 8), HTN-Preg (n = 8) e HTN-Preg+Prava (n = 8). NPS = nitroprussiato. Phe = fenilefrina. Os valores estão apresentados como média $\pm$ S.E.M. #P<0.05.

6. DISCUSSÃO

Os principais achados foram: (a) pravastatina diminui a pressão arterial sistólica no grupo das ratas prenhes hipertensas tratadas com pravastatina; (b) diminuição da contração induzida pelo KCl e prevenção do comprometimento da vasodilatação dependente de endotélio induzido pela acetilcolina nos anéis aórticos do grupo das ratas hipertensas tratadas; (c) pravastatina diminuiu a atividade enzimática da forma ativa da MMP-2, quando comparado ao grupo das ratas hipertensas tratadas com as não tratadas; (d) pravastatina aumentou os níveis de NO plasmático no grupo das ratas tratadas com pravastatina; (e) a pravastatina preveniu a elevação do estresse oxidativo induzido pela hipertensão. Os resultados provenientes dos grupos das ratas prenhes hipertensas tratadas com pravastatina confirmaram nossa hipótese e proveram evidências que a pravastatina atenuou a pressão sistólica, reduziu a atividade da MMP-2 na placenta e restaurou a função vascular envolvida com a formação do NO endotelial e diminuiu o estresse oxidativo.

Os dados das variáveis hemodinâmicas coletadas sugerem e confirmam estudos prévios de que a pravastatina é capaz de atenuar a pressão arterial sistólica (PAS) (25, 39). Corroborando este dado, os níveis de NO plasmático no grupo HTN-Preg+Prava foi similar ao encontrado em ambos os grupos das ratas normotensas. Consequentemente, o aumento nos níveis de NO devido a pravastatina resultaram em um adequado suprimento sanguíneo na interface materno-fetal, o que também é corroborado pelo fato de a pravastatina ter demonstrado efeito protetor ao não apresentar diferenças estatísticas significativas no tamanho da placenta entre os grupos (39). Além disso, os efeitos antioxidantes da pravastatina foram avaliados e demonstraram que houve redução dos níveis de peroxidação lipídica no plasma do grupo HTN-Preg+Prava comparado com o grupo das ratas hipertensas não tratadas, e também não demonstrou diferença significativa entre os grupos normotensos (25, 33, 40), o que permitiu o desenvolvimento apropriado do feto e da placenta, porque protegeu contra o remodelamento inadequado da vasculatura materna útero-placentária induzida pela prenhez hipertensa, sugerindo que os efeitos pleiotrópicos da pravastatina incluem diminuição do estresse oxidativo (25,40). Contrário a estes achados, somente o grupo das ratas hipertensas não tratadas demonstraram baixos níveis de NO plasmático e altos níveis de peroxidação lipídica no plasma, o que contribui para a manutenção da hipertensão arterial, contrações vasculares hiper-reativas e ativação das MMPs.

Desde o início do tratamento (a partir do décimo dia de prenhez), as ratas hipertensas demonstraram atenuação da pressão arterial sistólica quando comparado aos dias sem tratamento (1º, 7º e 10º dias gestacionais), no qual o grupo apresentou somente hipertensão.

Ademais, somente no último período gestacional, compreendido entre os dias 16 a 19 da gestação, que o grupo HTN-Preg+Prava demonstrou uma diminuição da PAS comparado ao grupo HTN-Preg. Em oposição a este achado, o grupo das ratas hipertensas não tratadas não demonstraram diferenças na PAS durante a prenhez.

A contração promovida pelo KCl nos anéis aórticos sugere que a pravastatina neutralizou a contração hiper-reativa e reativa no grupo das ratas hipertensas tratadas. O grupo das ratas hipertensas tratadas com pravastatina apresentou menor nível de contração frente ao KCl, o que pode contribuir para a diminuição da contração dos vasos sanguíneos e consequentemente provocar diminuição da pressão arterial e aumentar o fluxo sanguíneo útero-placentário.

A vasodilatação dependente de endotélio induzida pela acetilcolina foi maior nos grupos das ratas normotensas e hipertensas tratadas quando comparados a ambos os grupos não tratados, demonstrando que a pravastatina deteve ação protetora nesses grupos. Além disso, a vasodilatação no grupo HTN-Preg+Prava foi similar a do grupo Norm-Preg+Prava. O envolvimento do óxido nítrico no tratamento com a pravastatina foi confirmado pela pré-incubação com o inibidor não seletivo do óxido nítrico sintase (L-NAME) (25,41) nos anéis aórticos, o que eliminou a vasodilatação dependente de endotélio induzida pela acetilcolina em resposta a contração prévia induzida pela fenilefrina (25,42,43). Também foi avaliada a vasodilatação não dependente de endotélio, induzida pelo nitroprussiato, que demonstrou que a pravastatina deteve ação protetora nos anéis do grupo Norm-Preg+Prava, pois a vasodilatação foi maior neste grupo quando comparado aos demais.

Em concordância, estudos prévios demonstraram que há aumento na atividade da MMP-2 na placenta na prenhez hipertensa avançada (37). Geralmente, é observado que na gravidez saudável há aumento da biodisponibilidade de NO com concomitante diminuição da atividade da MMP-2 na placenta, e contrariamente é observado na prenhez hipertensa, na qual há diminuição do NO e aumento de MMP-2 placentária (37). O aumento excessivo da atividade das MMPs tem sido associado a diminuição da biodisponibilidade do NO (34-37;44-46), o que contribui para a patofisiologia dos distúrbios hipertensivos da gravidez, incluindo a pré-eclâmpsia. Além disso, a disfunção endotelial na pré-eclâmpsia pode ser resultante do aumento do estresse oxidativo associado com a redução da biodisponibilidade de NO (39;49-52), o que pode aumentar as concentrações de peroxinitrito, o qual contribui diretamente para a ativação das MMPs (53). Contudo, nossos resultados demonstraram achados similares e sugerem que a pravastatina atenuou a ativação da MMP-2 placentária. No grupo das ratas prenhes hipertensas tratadas com a pravastatina foi observado o aumento da

biodisponibilidade de NO com concomitante redução dos níveis de MMP-2 no tecido placentário e estresse oxidativo. Entretanto, o contrário foi observado no grupo HTN-Preg, houve a diminuição da biodisponibilidade de NO com concomitante aumento dos níveis de MMP-2 no tecido placentário e estresse oxidativo.

Algumas limitações devem ser consideradas. Primeiramente, o tratamento com DOCA pode causar ruptura prematura das membranas amnióticas, resultando em baixo peso ao nascer (25,52). Também devemos considerar que nem todos estudos prévios associando a pravastatina a pré-eclâmpsia confirmam que é segura (39, 53). Além disso, a determinação da pressão arterial através do pletismógrafo de cauda pode enviesar as aferições, uma vez que pode impor uma quantidade substancial de estresse térmico e de restrição (25). Também, o labirinto placentário e o saco vitelino invertido do rato podem ser mais sensíveis à hipertensão do que as vilosidades flutuantes em seres humanos (54). Por fim, embora este seja o primeiro artigo que demonstra que ratas prenhes hipertensas exibiram atenuação da atividade da MMP-2 pela pravastatina, seguida do aumento do NO circulante e redução do estresse oxidativo, mais estudos são necessários para examinar os mecanismos subjacentes da pravastatina ligando o aumento de NO e a redução de MMPs nas alterações hipertensivas induzidas pela gravidez.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os efeitos pleiotrópicos da pravastatina em modelo experimental de pré-eclâmpsia, preveniu o aumento da pressão arterial sistólica e diminuiu a contração do músculo liso da artéria abdominal do grupo das ratas prenhes hipertensas tratada com pravastatina. Além disso, os efeitos pleiotrópicos da pravastatina também foram associados ao aumento do óxido nítrico circulante e redução da atividade da metaloproteinase 2 placentária nos grupos das ratas prenhes hipertensas tratadas com a pravastatina.

REFERÊNCIAS

1. American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.*, v. 122, n. 5, p. 1122-1131, 2013.
2. BROWN, M. A. et al. International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice [Review]. *Hypertension*, v. 72, n. 1, p. 24-43, 2018.
3. HENDERSON, J. T. et al. Low-dose aspirin for prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.*, v. 160, n. 10, p. 695-703, 2014.
4. PERAÇOLI, J. C. et al. Pré-eclâmpsia/eclâmpsia. *Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia*, n. 8, p. 258-273, 2018.
5. VON DADELSZEN, P.; MAGEE, L. A.; ROBERTS, J. M. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, v. 22, n. 2, p. 143-148, 2003.
6. HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*, v. 51, n. 4, p. 970-975, 2008.
7. MURPHY, D. J.; STIRRAT, G. M. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, v. 19, n. 2, p. 221-231, 2000.
8. NESS, R. B.; SIBAI, B. M. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 195, n. 1, p. 40-49, 2006.
9. MOURA, M. D. R. DE. et al. Hipertensão arterial na gestação - importância do seguimento materno no desfecho neonatal. *Com. Ciências Saúde*, v. 22, p. 113-120, 2011.
10. BRANDÃO, A. H. F.; et al. Endothelial function, uterine perfusion and central flow in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Sociedade Brasileiro de Cardiologia*, 2012.
11. BURTON G.J. et al. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, v. 30, p. 30:473-482, 2009.
12. SVINENG, G. et al. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connective tissue research*, v. 49, n. 3-4, p. 197-202, 2008.
13. OHBAYASHI, H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci*, v. 3, n. 4, p. 409-421, 2002.
14. GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther*, v. 133, n. 3, p. 257-79, 2012.
15. CHEIN, J. KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci*, v. 148, p.87-165, 2017.

16. GUIMARÃES, D. A. et al. Inibição de metaloproteinases de matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 17, p. 226-230, 2010.
17. HOFMEYR, G. J. et al. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev.*, v. 6, 2014.
18. PHIPPS, E. A. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat Rev Nephrol*, v. 15, n. 5, p. 275-189, 2019.
19. FUJIWARA, T. et al. Decreased plasma and cardiac matrix metalloproteinase activities in patients with coronary artery disease and treated with pravastatin. *European Journal of Pharmacology*, v. 594, p. 146-151, 2008.
20. DAVIGNON, J. Beneficial Cardiovascular Pleiotropic Effects of Statins. *Circulation*, v. 109, p. 39-43, 2004.
21. WANG, C-Y.; LIU, P-Y.L.; LIAO, J.K. Pleiotropic effects of statin therapy. *Trends Mol Med.*, v. 14, n. 1, p. 37-44, 2008.
22. KUMASAWA, K. et al. Pravastatin for preeclampsia: From animal to human. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 46, p. 1255-1262, 2020.
23. DIRAJLAL- FARGO, S. et al. Effect of statin on arginine metabolites in treated HIV-infection. *Atherosclerosis*, v.266, p. 74-80, 2017.
24. STONE, N. J. et al. Guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am Coll Cardiol*, v. 63, p. 2889-2934, 2014.
25. CHIMINI, J. S. et al. Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction. *Revista Basic Clin Pharmacology and Toxicology*, p. 1-9, 2018.
26. KRAKER, K. et al. Statins Reverse Postpartum Cardiovascular Dysfunction in a Rat Model of Preeclampsia. *Hypertension*, v. 75, p. 202-210, 2020.
27. KATSI, V. et al. The Role of Statins in Prevention of Preeclampsia: A Promise for the future? *Front Pharmacol*, v. 8, p. 247, 2017.
28. DOBRUCKI, L. W. et al. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit*, v. 7, p. 622-627, 2001.
29. CHENG, W. H. et al. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signaling to cause eNOS up-regulation. *Br J Pharmacol*, v. 170, p. 847-858, 2013.
30. JURISIC, A. et al. Pravastatin and-L-arginine combination improves umbilical artery blood flow and neonatal outcomes in dichorionic twin pregnancies through an nitric oxide-dependent vasorelaxant effect. *Vascul Pharmacol* v. 110, p. 64-70, 2018.
31. GUIMARÃES, D. A. et al. Atorvastatin and sildenafil decrease vascular TGF- β levels and MMP-2 activity and ameliorate arterial remodeling in a model of renovascular

hypertension. *Redox Biol*, p. 386-395, 2015.

32. GARRET, N. et al. Pravastatin therapy during preeclampsia prevents long-term adverse health effects in mice. *JCI Insight*, v. 3, 2018.

33. BAUER, A. J. et al. Pravastatin attenuates hypertension, oxidative stress, and angiogenic imbalance in rat model of placental ischemia-induced hypertension. *Hypertension* v. 61, p. 1103-1110, 2013.

34. ELEUTERIO, N. M. et al. Positive correlations between circulating adiponectin and MMP2 in preeclampsia pregnant. *Pregnancy Hypertension*, v. 2, p. 205-208, 2015.

35. MAYERS, J. E. et al. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently developed preeclampsia. *Hypertension Pregnancy*, v. 24, p. 103-115, 2005.

36. DIESSLER, M. et al. Differential expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine early placenta. *Reprod Domest Anim*, v. 52, p. 35-43, 2017.

37. NASCIMENTO, R. A. et al. Reductions of circulating nitric oxide are followed by hypertension during pregnancy and increased activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in rats. *Cells*, v. 8, 2019.

38. TANUS-SANTOS, J. E. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. *Redox Biology* v. 5, p. 340-346, 2015

39. COSTANTINE, M.M. Safety and pharmacokinetics of pravastatin used for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women: a pilot randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 214, p. 720-725, 2016.

40. REDECHA, P. et al. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood*, v. 113, p. 4101-4109, 2009.

41. 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*, v. 311, p. 505-521, 2016.

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

43. POSSOMATO-VIEIRA, J.S. et al. Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-mediated relaxation, underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of hydrogen sulphide donor in hypertensive pregnancy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 45, p. 1118-1127, 2018.

44. SANDRIM, V.C. et al. Increased circulating cell-free hemoglobin levels reduce nitric oxide bioavailability in preeclampsia. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 493-500, 2010.

45. EHSANIPOOR, R. M. et al. Nitric oxide and carbon monoxide production and metabolism in preeclampsia. *Reprod. Sci.*, v. 20, p. 542-548, 2013.

46. MATSUBARA, K. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, v. 36, p. 239-247, 2010.

47. GGILBERT, J.S. et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 294,

p. 41-50, 2008.

48. BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, v. 11, p. 342-352, 2004.
49. ROGGENSACK, A. M.; ZHANG, Y.; DAVIDGE, S. T. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*. v. 33, p. 83-89, 1999.
50. WALSH, S.W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin Reprod. Endocrinol.*v. 16, p. 93-104, 1998.
51. CHOW, A. K.; CENA, J. SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br. J. Pharmacol.*, v. 152, p. 189-205, 2007.
52. LOCKSHIN M.D.; SAMMARITANO, L.R. Corticosteroids during pregnancy. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1998; 107:136-138.
53. LEFKOU, E. et al. Pravastatin improves pregnancy outcomes in obstetric antiphospholipid syndrome refractory to antithrombotic therapy. *J Clin Invest.*, v. 126, p. 2933-2940, 2016.
54. KULVIETIS, V. et al. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp Med.*, v. 225, p. 225-234, 2011.