



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

JESSICA SABBATINE CHIMINI

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS
EFEITOS MATERNO-FETAIS DA PRAVASTATINA NA
HIPERTENSÃO GESTACIONAL EM RATAS**

Botucatu-SP
2018

JESSICA SABBATINE CHIMINI

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS
EFEITOS MATERNO-FETAIS DA PRAVASTATINA NA
HIPERTENSÃO GESTACIONAL EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan
Candido Dias Junior

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

Chimini, Jessica Sabbatine.

Avaliação do envolvimento do óxido nítrico nos efeitos materno-fetais da pravastatina na hipertensão gestacional em ratas / Jessica Sabbatine Chimini. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior
Capes: 21001006

1. Hipertensão na gravidez. 2. Oxido nítrico. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Pravastatina.

Palavras-chave: hipertensão gestacional; óxido nítrico; pravastatina; ratas.

Jessica Sabbatine Chimini

Avaliação do envolvimento do óxido nítrico nos efeitos materno-fetais da pravastatina na hipertensão gestacional em ratas

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

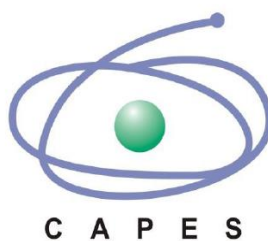
Banca Examinadora:

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

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

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

Financiamento



(Bolsa CAPES- mestrado: Período de vigência 03/2017 – 11/2018)



**Proc. 16/18782-3
(Auxílio regular à pesquisa)**

Dedicatória

Aos meus pais, Edmílson e Cristina...

*...que sempre estiveram comigo, ensinando-me,
apoando-me, amando-me incondicionalmente e
acreditando em meu potencial.*

*“A primeira e mais nobre lição que os pais
podem ensinar aos filhos é fé e coragem”.*
(Smiley Blanton)

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da minha vida, por me guiar, iluminar e me dar persistência e determinação para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço a todos os meus familiares e aos meus amigos, em particular à minha irmã Juliana, por ser meu exemplo desde quando nasci.

Meu muitíssimo obrigado ao meu orientador, Professor Carlos, por acreditar em mim e aceitar-me como orientanda, incentivar-me, ensinar-me e apoiar-me sempre que precisei.

Agradeço ao meu namorado, Lucas, a pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins e que me tranquiliza ao dizer “calma, vai dar tudo certo!”.

Agradeço a meu querido amigo Osvaldo, afinal sem seu apoio e incentivo, não teria alcançado mais essa conquista.

Aos meus amigos de laboratório, José Sérgio, Malu, Regina, Victor, Letícia, Léia, Gabi, Thalita, Bila, Mayara e André, os quais foram, são e serão muito importantes para mim pelos ensinamentos, conversas construtivas e não tão construtivas, pelo companheirismo e trabalho em equipe, companhia durante os experimentos ao longo das madrugadas, congressos e muitas aventuras no decorrer desta jornada.

Em especial, agradeço a meu amigo José Sérgio por ter me presenteado com tanta alegria ao longo desses dois anos, por ter me auxiliado na escrita do meu artigo e dissertação e tantas outras coisas.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia pelo apoio, amizade, momentos de descontração e convivência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu e a todos os professores do Departamento de Farmacologia por contribuírem com minha formação intelectual e pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cris, Janete, Hélio, Luís e Paulo, por toda ajuda, ensinamentos, broncas e por tornarem meus dias mais agradáveis.

À banca examinadora pela disponibilidade e por contribuir grandemente com o enriquecimento de minha formação acadêmica.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

***“Quanto mais aumenta nosso
conhecimento, mais evidente fica
nossa ignorância”.
(John F. Kennedy)***

A dissertação intitulada: “Avaliação do envolvimento do óxido nítrico nos efeitos materno-fetais da pravastatina na hipertensão gestacional em ratas” encontra-se dividida em três partes.

Inicialmente a dissertação traz uma breve introdução a respeito das principais alterações vasculares que ocorrem no organismo materno com o início da gestação, seguida do papel do endotélio vascular e do principal fator vasoativo, o óxido nítrico, na manutenção da pressão arterial materna. Também são abordados alguns pontos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia e algumas consequências dessa desordem hipertensiva gestacional na mãe e no feto. Por fim, essa primeira parte da dissertação descreve os efeitos das estatinas no sistema cardiovascular independentes da redução do colesterol, por meio do aumento do óxido nítrico e seu uso em ensaios clínicos e experimentais de hipertensão gestacional.

A segunda parte apresenta o artigo intitulado “*Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction*”, publicado na revista *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. Nele descrevemos o papel da pravastatina no aumento do óxido nítrico placentário e seus efeitos benéficos maternos e fetais por meio de um modelo experimental de hipertensão gestacional.

A terceira parte apresenta uma breve discussão dos achados do artigo apresentado, complementando alguns pontos importantes e, em seguida, expõe uma breve conclusão e considerações finais a respeito do que foi abordado ao longo da dissertação.

Além disso, durante a execução deste curso de mestrado, outras atividades foram desenvolvidas com o objetivo de enriquecer a formação acadêmica e são apresentadas a seguir:

Disciplinas cursadas

Disciplinas	Calendário	Conceito	Frequência	Créditos	Carga horária
Aspectos Farmacológicos e Bioquímicos da Síndrome Metabólica	1º / 2017	A	100%	4	60
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	1º / 2017	A	93,3%	3	45
Metabolismo Energético	1º / 2017	A	100%	4	60
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2º / 2017	A	83,3%	3	45
Farmacologia do Endotélio Vascular	2º / 2017	A	100%	4	60
Farmacologia de Receptores na Comunicação Celular	1º / 2018	A	100%	4	60

Trabalhos publicados (artigos)

1. **Chimini JS**, Possomato-Vieira JS, Santos da Silva ML, Dias-Junior CA. Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction. *Basic Clin Pharmacol and Toxicol* 2018.
2. Possomato-Vieira JS, **Chimini JS**, da Silva MLS, Dias-Junior CA. 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. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018;1-10.
3. 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. *BioMed Res Int* 2018; 4627391.

Participação em eventos científicos

1. 50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics - Ribeirão Preto, Brasil (2018).
2. ENBM Encontro Nacional de Biomedicina - Botucatu, Brasil (2018).
3. VII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC - UNESP/Botucatu (2018).
4. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics – Ribeirão Preto, Brasil (2017).
5. IV Simpósio em Biologia Vascular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil (2017).
6. VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC - UNESP/Botucatu (2017).

Resumos em eventos científicos

1. **Chimini JS**, Possomato-Vieira JS, Santos-Silva ML, Dias-Junior CA. Increased Placental Nitric Oxide and Restored Endothelium-dependent Vasodilation Underlie Pravastatin Effects Against Fetal Growth Restriction and Hypertension in Pregnant Rats. *50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Ribeirão Preto, 2018.
2. Possomato-Vieira JS, Tozzato GPZ, **Chimini JS**, Dias-Junior CA. Increases in Relaxation Mediated by Perivascular Adipose Tissue (PVAT) may Counterbalance the Loss of Anti-Contractile Effect of PVAT in Normal Pregnancy. *50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Ribeirão Preto, 2018.
3. Polonio LC, Possomato-Vieira JS, **Chimini JS**, Dias-Junior CA. Loss of anti-contraction effect mediated by aortic perivascular adipose tissue-derived hydrogen sulfide in hypertensive pregnancy. *50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Ribeirão Preto, 2018.
4. Paula-Souza E, **Chimini JS**, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sildenafil Reduces Hypertension in Seven-day Lead-treated Rats. *50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Ribeirão Preto, 2018.
5. **Chimini JS**, Possomato-Vieira JS, Santos-Silva ML, Dias-Junior CA. Pravastatina atenua a hipertensão gestacional e a restrição do crescimento fetal em ratas prenhes hipertensas por meio de aumento do óxido nítrico placentário e restabelecimento da função endotelial. *ENBM Encontro Nacional de Biomedicina*, Botucatu, 2018.
6. Polonio LC, Possomato-Vieira JS, **Chimini JS**, Dias-Junior CA. Perda do efeito anti-contrátil mediada pelo sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adiposo aórtico na

- hipertensão gestacional em ratas. *ENBM Encontro Nacional de Biomedicina*, Botucatu, 2018.
7. Paula-Souza E, **Chimini JS**, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sildenafil reduz a hipertensão em ratos intoxicados com chumbo por sete dias. *ENBM Encontro Nacional de Biomedicina*, Botucatu, 2018.
 8. **Chimini JS**, Possomato-Vieira JS, Santos-Silva ML, Dias-Junior CA. Avaliação do envolvimento do óxido nítrico nos efeitos materno-fetais da pravastatina na hipertensão gestacional em ratas. *VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC - UNESP*, Botucatu, 2018.
 7. **Chimini JS**, Possomato-Vieira JS, Santos-Silva ML, Dias-Junior CA. Pravastatin Attenuates Increased Blood Pressure and Fetal Growth Restriction in Hypertensive Pregnant Rats. *49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Ribeirão Preto, 2017.
 8. **Chimini JS**, Possomato-Vieira JS, Santos-Silva ML, Dias-Junior CA. Pravastatin Attenuates Increased Blood Pressure and Fetal Growth Restriction in Hypertensive Pregnant Rats. *IV Simpósio em Biologia Vascular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto*, 2017.
 9. Possomato-Vieira JS, **Chimini JS**, Santos-Silva ML, Gonçalves-Rizzi VH, Dias-Junior CA. 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*, Ribeirão Preto, 2017.
 10. Santos-Silva ML, Possomato-Vieira JS, **Chimini JS**, Dias-Junior CA. 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*, Ribeirão Preto, 2017.

Palestras

1. II Curso de inverno de Farmacologia e Biotecnologia. Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, 2018.

Lísta de abreviaturas e siglas

ACh – acetilcolina

Akt - proteína quinase B

cGMP – guanosina monofosfato cíclica

DOCA– acetato de desoxicorticosterona

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio de imuno adsorção enzimática

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

FMD – dilatação mediada pelo fluxo

HIF – fator induzido pela hipóxia

Hmox – heme oxigenase

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

HTN-Preg – hipertensão gestacional

HUVECs - células da veia umbilical humana

ICAM - molécula de adesão intercelular

iNOS– óxido nítrico sintase induzível

LDL - *low density lipoprotein*

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

L-NMMA- N ω -monometil-L-arginina

MDA – malondialdeído

nNOS– óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

Norm-Preg – prenhez normal

NOS – óxido nítrico sintase

O₂^{•-} - ânion superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

PHE – fenilefrina

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

PlGF– fator de crescimento placentário

PCR – proteína C reativa

ROS - espécies reativas de oxigênio

RUPP – redução da pressão de perfusão uterina

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

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – receptor de fator de crescimento do endotélio vascular

VCAM - molécula de adesão de células vascular

Sumário

Sumário

RESUMO.....	21
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	25
1.1. FISIOLOGIA VASCULAR DA GESTAÇÃO	25
1.2. ENDOTÉLIO E ÓXIDO NÍTRICO NA GESTAÇÃO	27
1.3. DESORDENS HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS.....	28
1.3.1. Pré-eclâmpsia.....	29
1.4. EFEITOS DA PRAVASTATINA INDEPENDENTES DA REDUÇÃO DO COLESTEROL	31
<i>PARTE II</i>.....	36
3. DISCUSSÃO	47
4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	55

Resumo

RESUMO

Durante a gestação, diversas adaptações fisiológicas ocorrem no organismo materno para atender as necessidades nutricionais do feto em desenvolvimento. Entre essas adaptações, encontramos aumento do débito cardíaco e do volume sanguíneo, os quais são compensados pela drástica redução da resistência vascular sistêmica, promovendo a manutenção da pressão arterial materna nas gestações. O endotélio vascular apresenta um importante papel neste processo fisiológico por secretar fatores vasoativos como o óxido nítrico, um vasodilatador que se encontra aumentado em gestações saudáveis. Em algumas mulheres, falhas nesses mecanismos podem causar distúrbios hipertensivos gestacionais. A pré-eclâmpsia é uma distúrbio hipertensivo gestacional caracterizada pela elevação da pressão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg), após a 20ª semana gestacional. É frequentemente acompanhada de proteinúria e acomete 5-8% das gestantes. Atualmente, embora a fisiopatologia da pré-eclâmpsia seja desconhecida, estudos sugerem que sua ocorrência envolva migração deficiente de citotrofoblastos, culminando em má placentação e consequente isquemia/hipóxia placentária, responsável pela liberação de fatores bioativos promovendo danos às células endoteliais. A disfunção endotelial resulta na redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, gerando as principais características da pré-eclâmpsia, como hipertensão materna e restrição de crescimento fetal. Recentes estudos apontam a importância da manutenção dos níveis de óxido nítrico por estar associada a gestações saudáveis. As estatinas vem sendo utilizadas em doenças cardiovasculares por seus efeitos vasoprotetores que envolvem aumento da síntese de óxido nítrico. A pravastatina é a estatina que apresenta menor potencial teratogênico, por esse motivo, é empregada em estudos clínicos e experimentais durante a gestação. Esse trabalho teve o objetivo de investigar os efeitos da pravastatina na formação de óxido nítrico placentário, função vascular e endotelial, equilíbrio angiogênico, estresse oxidativo, pressão arterial materna e parâmetros feto-placentários em ratas prenhes hipertensas. Para realização dos trabalhos, ratas Wistar prenhes foram utilizadas. A hipertensão gestacional foi induzida pelo modelo DOCA-sal, que consiste na administração intraperitoneal de acetato de desoxicorticosterona e substituição da água dos animais por solução salina, um modelo de imposição de aumento de volume. As ratas prenhes normotensas e hipertensas foram tratadas com pravastatina. Nós observamos que a pravastatina previne o aumento da pressão arterial e melhora os parâmetros feto-placentários em ratas submetidas ao modelo DOCA-sal. Além disso, restaura o equilíbrio angiogênico/anti-angiogênico, reduzindo níveis de sFlt-1 associado ao aumento dos níveis de PlGF, impede aumentos exacerbados de estresse oxidativo, previne a hiperreatividade ao vasoconstritor fenilefrina, previne o comprometimento da função endotelial e aumenta os níveis placentários de óxido nítrico. Todavia, nós mostramos que os níveis placentários de óxido nítrico aumentam em ratas prenhes hipertensas, assim como os níveis de PlGF e o peso placentário aumenta em ambos os grupos tratados com pravastatina. Por esse motivo, conclui-se que a pravastatina parece ter efeito tanto materno, atuando na prevenção do aumento da pressão arterial, quanto fetal, atuando na região uteroplacentária, melhorando o suprimento nutricional para os filhotes.

Palavras-chave: hipertensão gestacional, óxido nítrico, ratas, pravastatina.

Abstract

ABSTRACT

During gestation, several physiological adaptations occur in the maternal organism to provide the nutritional demands of the developing fetus. Among these adaptations, we found increase in cardiac output and blood volume, which are compensated by the drastic reduction of systemic vascular resistance, promoting the maintenance of maternal blood pressure in gestations. Vascular endothelium plays an important role in this physiological process by secreting vasoactive factors such as nitric oxide, a vasodilator that is increased in healthy pregnancies. In some women, fails in these mechanisms may cause gestational hypertensive disorders. Preeclampsia is a gestational hypertensive disorder characterized by elevated blood pressure ($\geq 140 \times 90$ mmHg) after the 20th gestational week. It is often accompanied by proteinuria and affects 5-8% of pregnant women. Currently, although the pathophysiology of preeclampsia is unknown, studies suggest that its occurrence involves poor migration of cytotrophoblasts culminating in poor placentation and consequent ischemia/placental hypoxia, responsible for the release of bioactive factors promoting damage to endothelial cells. Endothelial dysfunction results in the reduction of the bioavailability of nitric oxide leading to the occurrence of the main characteristics of preeclampsia, mainly maternal hypertension and fetal growth restriction. Recent studies point to the importance of maintaining levels of nitric oxide, which is associated with healthy pregnancies. Statins have been used in cardiovascular diseases because of their vasoprotective effects, which involve increased nitric oxide synthesis. Pravastatin is the statin that has lower teratogenic potential, therefore, it is used in clinical and experimental studies during pregnancy. The objective of this study was to investigate the effects of pravastatin on placental nitric oxide formation, vascular and endothelial function, angiogenic balance, oxidative stress, maternal blood pressure and fetal-placental parameters in hypertensive pregnant rats. For the accomplishment of this study, pregnant Wistar rats were used. Initially, gestational hypertension was induced by the DOCA-salt model, which consist of the intraperitoneal administration of deoxycorticosterone acetate and the replacement of the water of the animals by saline solution, a model of volume increase imposition. Normotensive and hypertensive pregnant rats were treated with pravastatin. We have observed that pravastatin prevents increased blood pressure and improves fetal-placental parameters in rats submitted to the DOCA-salt model. In addition, it restores the angiogenic/anti-angiogenic balance, reducing sFlt-1 levels associated with increased PlGF levels, prevents exacerbated increases in oxidative stress, prevents hyperreactivity to a vasoconstrictor, prevents endothelial function impairment and increases in placental nitric oxide levels. However, we have shown that placental nitric oxide levels increase in hypertensive pregnant rats, as well as PlGF levels and placental weight increase in both pravastatin-treated groups. For this reason, we conclude that pravastatin seems to have an effect both maternal, acting in the prevention of increased blood pressure, and fetal, acting in the uteroplacental region, improving nutritional supply for puppies.

Key words: gestational hypertension, nitric oxide, rats, pravastatin.

Introdução

Introdução

1.1. Fisiologia vascular da gestação

Durante a gestação, diversas adaptações hemodinâmicas e cardiovasculares ocorrem no organismo materno para atender as necessidades nutricionais do feto em desenvolvimento. Nos estágios iniciais da gestação, ao redor da 6ª semana gestacional, estímulos hormonais iniciam as mudanças hematológicas que incluem aumento do volume de eritrócitos e volume plasmático (Torgersen e Curran, 2006; Tan e Tan, 2013; May, 2015).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona possui um importante papel no aumento do volume plasmático. Esse sistema é estimulado por um aumento dos níveis de estradiol (Irani e Xia, 2008) que promove uma maior reabsorção de sódio pelos rins, causando o aumento do volume sanguíneo em aproximadamente 50%, comparado a mulheres em estados não-gravídicos (Hyttén, 1985; Bernstein *et al.*, 2001). Como consequência, a frequência cardíaca aumenta, uma vez que as gestantes apresentam entre 15-20 batidas por minuto a mais do que mulheres não-gestantes (San-Frutos *et al.*, 2011).

Concomitantemente a essas alterações hematológicas e cardiovasculares, a circulação uterina também passa por um grande processo de remodelamento (Osol e Moore, 2014). No início do segundo trimestre de gestação (16-20ª semana), os trofoblastos extravilosos invadem o miométrio materno em direção às artérias espiraladas e causam uma reorganização da parede vascular (Osol e Moore, 2014). Inicialmente, esses trofoblastos expressam integrinas características de células epiteliais (Mcmaster *et al.*, 2004). Entretanto, enquanto invadem o miométrio, passam a expressar integrinas características de células endoteliais (Mcmaster *et al.*, 2004), promovendo um remodelamento da camada endotelial da artéria espiralada uterina, aumentando-lhe a complacência e o volume sanguíneo dessa região. Dessa forma, aumenta o fluxo sanguíneo para a placenta, fornecendo oxigênio e nutrientes necessários ao feto em desenvolvimento (Osol e Moore, 2014).

As alterações ocorridas na circulação uterina promovem uma drástica diminuição da resistência vascular periférica que pode chegar a ser 6-8 vezes menor do que em mulheres não-grávidas (Clark *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1992). Além disso, sabe-se que a diminuição da resistência vascular periférica sistêmica participa da manutenção da pressão arterial, porém a redução mais acentuada ocorre na circulação uterina, devido ao aumento do fluxo sanguíneo (30-50 vezes), durante a gestação, comparado a estados não-gravídicos (Sladek *et al.*, 1997; Bird *et al.*, 2003).

Além das alterações vasculares previamente citadas, um aumento expressivo do processo angiogênico também é essencial para as adaptações vasculares da gestação. A angiogênese durante a gestação é fortemente regulada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Kim *et al.*, 2013) e pelo fator de crescimento placentário (PlGF) (Vrachnis *et al.*, 2013). As ações pró-angiogênicas do VEGF e do PlGF são mediadas principalmente por meio da ligação aos seus receptores de tirosina-quinase associados à membrana, os quais são: receptor de VEGF tipo 1 (VEGFR-1 ou Flt-1) ou receptor de VEGF tipo 2 (VEGFR-2 ou Flk-1) (Jardim *et al.*, 2015). Os níveis plasmáticos de PlGF são baixos em mulheres não-gestantes (~44 pg/mL) (Romero *et al.*, 2008), mas aumentam consideravelmente durante a gestação, alcançando níveis aproximados de 574 pg/mL ao redor da 30ª semana gestacional (Krauss *et al.*, 2004). Ademais, embora o PlGF possua apenas 1/10 de afinidade pelo VEGFR-1 comparado ao VEGF, seus níveis estão 40 vezes maiores em comparação aos níveis de VEGF em gestantes saudáveis (Shah e Khalil, 2015). Por causa disso, o PlGF contribui para a dilatação dos vasos uterinos, promove a proliferação de células endoteliais e atua na vasculogênese e no desenvolvimento placentário (Shah e Khalil, 2015).

1.2. Endotélio e óxido nítrico na gestação

Dentre as inúmeras alterações vasculares observadas na gestação, uma importante consiste no papel desempenhado pelo endotélio vascular. O endotélio vascular é uma monocamada celular que circunda os vasos sanguíneos e é o principal responsável pela regulação do tônus vascular por secretar fatores vasoativos (Searle e Sahab, 1992; Cannon, 1998). Embora inicialmente o endotélio fosse considerado apenas uma barreira entre o lúmen e as camadas do vaso, verificou-se que além de seu papel de proteção mecânica, também possui funções sintéticas e secretoras (Fishman, 1982; Britten *et al.*, 1999).

Furchgott e Zawadzki mostraram pela primeira vez o papel do óxido nítrico (NO) no relaxamento vascular mediado por células endoteliais (Furchgott e Zawadzki, 1980). Esse importante mediador gasoso é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada e Higgs, 1993). A NOS apresenta três isoformas: NOS neuronal (nNOS – isoforma I), NOS induzida (iNOS – isoforma II) e NOS endotelial (eNOS – isoforma III). Na célula endotelial, a eNOS é a maior responsável pela produção de NO na vasculatura (Lamas *et al.*, 1992), em um processo mediado pela ligação do cálcio à calmodulina que promove a ativação da eNOS (Rafikov *et al.*, 2011).

Nas células endoteliais, a eNOS converte o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. O NO produzido difunde-se para as células musculares e promove um aumento intracelular do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Palmer *et al.*, 1988). Este inicia uma série de eventos intracelulares cujo produto final é a redução do cálcio intracelular da fibra muscular, promovendo o relaxamento vascular (Carvajal *et al.*, 2000).

Diversos estudos evidenciam o papel do NO durante as adaptações ocorridas na gestação. Foi mostrado que as concentrações de nitrito, um metabólito do NO, está aumentado no plasma de mulheres gestantes (Shaamash *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002). Além disso, tanto a expressão quanto a atividade de eNOS estão aumentadas na artéria uterina e na placenta de

gestantes saudáveis (Nelson *et al.*, 2000; Dotsch *et al.*, 2001). Ademais, estudos clínicos utilizando a técnica de dilatação mediada pelo fluxo (FMD) mostram que a dilatação da artéria braquial aumenta ao longo da gestação (Sierra-Laguado *et al.*, 2006). Uma vez que esse teste avalia a capacidade endotelial, uma maior dilatação pode estar relacionada à maior produção de NO (Sierra-Laguado *et al.*, 2006). Também foi observado que a infusão de N ω -monometil-L-arginina (L-NMMA), um inibidor não específico da NOS, promoveu uma maior resposta contrátil em vasos periféricos de mulheres gestantes quando comparado às não-gestantes (Williams *et al.*, 1997).

Estudos em animais também mostram a importância do NO nas adaptações vasculares da gestação. A expressão gênica e proteica de eNOS está aumentada em ratas prenhes saudáveis (Alexander *et al.*, 1999). Também foi relatado em camundongos *knockout* para a eNOS um aumento da pressão arterial na gestação (Hefler *et al.*, 2001). Além disso, diversos estudos em modelos animais mostraram que a inibição farmacológica da eNOS com o uso da nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) causa o aumento da pressão arterial materna e danos às mães e às proles (Goncalves-Rizzi *et al.*, 2018), evidenciando a importância do NO durante a gestação saudável.

1.3.Desordens hipertensivas gestacionais

Em algumas mulheres, falhas nos mecanismos de adaptação à gestação podem ocasionar desordens hipertensivas gestacionais, que são as maiores causas de morbidade e mortalidade tanto materna quanto fetal (Uzan *et al.*, 2011). Estas alterações hipertensivas podem ter as seguintes classificações:

- Hipertensão crônica/pré-existente, cujo níveis pressóricos maternos já estão aumentados antes da gravidez (pressão sistólica $\geq$ 140/ diastólica $\geq$ 90 mmHg), sem normalização desses níveis após o parto (American College Of *et al.*, 2013);

- Hipertensão gestacional cujo aumento dos níveis pressóricos se instalam durante a gestação, após a 20ª semana, sem presença de proteinúria ou complicações sistêmicas características da pré-eclâmpsia e são normalizados após o parto (Buchbinder *et al.*, 2002);
- Pré-eclâmpsia cuja hipertensão é diagnosticada após a 20ª semana gestacional com frequente presença de proteinúria ($\geq 0,3\text{g}/24\text{h}$). Além disso, podem ocorrer complicações hematológicas, hepáticas e neurológicas (Brennan *et al.*, 2014; Kao *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016);
- Hipertensão crônica/pré-existente sobreposta por pré-eclâmpsia. Nesse tipo de hipertensão, a mulher com hipertensão crônica, durante a gestação passa a apresentar proteinúria e outras alterações sistêmicas características da pré-eclâmpsia (American College Of *et al.*, 2013).

1.3.1. Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma desordem gestacional com alta prevalência, acometendo cerca de 5 a 8% das gestações (Possomato-Vieira e Khalil, 2016). Além disso, está relacionada à restrição do crescimento fetal (Kulandavelu *et al.*, 2013; Goulopoulou e Davidge, 2015; Zhu *et al.*, 2016), causando predisposição ao parto prematuro e maior risco ao recém-nascido (Backes *et al.*, 2011).

Embora a fisiopatologia permaneça desconhecida, diversos estudos consideram que a placenta apresenta um papel chave na ocorrência da pré-eclâmpsia (Ali e Khalil, 2015). Acredita-se que a pré-eclâmpsia se inicia com uma deficiente invasão trofoblástica nas artérias espiraladas, provocando um quadro de isquemia/hipóxia placentária pela insuficiente perfusão sanguínea (Karumanchi *et al.*, 2005). O estado de isquemia/hipóxia placentária aumenta o estresse oxidativo e a liberação de fatores anti-angiogênicos (Gilbert *et al.*, 2008). Em seguida, esses fatores liberados pela placenta atingem as células endoteliais (Roberts, 1998),

promovendo uma disfunção endotelial generalizada que culmina com o aumento da pressão arterial.

Um importante fator anti-angiogênico é o fms-like tirosina kinase solúvel 1 (sFlt-1). O sFlt-1 é a forma solúvel do receptor Flt-1, onde se ligam o VEGF e o PlGF. Uma vez que esse receptor encontra-se solúvel na circulação, ele se liga ao VEGF e ao PlGF e impede suas ações angiogênicas (Di Marco *et al.*, 2009). Ainda que não se conheçam os mecanismos exatos da regulação do sFlt-1, estes parecem estar associados à hipóxia, visto que pesquisas mostram uma secreção do sFlt-1 em tecido placentário *in vitro* exposto à baixas concentrações de oxigênio, provavelmente pela regulação do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) (George e Granger, 2011; Ali e Khalil, 2015).

Observou-se que o sFlt-1 está aumentado na circulação de mulheres com pré-eclâmpsia (Kim *et al.*, 2007) e esse aumento promove diminuição de 53% da relação VEGF/sFlt-1 e uma diminuição de 70% na relação PlGF/sFlt-1 na placenta pré-eclâmpsica (Ahmad e Ahmed, 2004). Estudos em modelos animais, utilizando a técnica da redução da pressão de perfusão uterina (RUPP), mimetizam o estado de isquemia/hipóxia placentária que ocorre na pré-eclâmpsia e eles demonstraram a ocorrência de aumento dos níveis plasmáticos de sFlt-1 (Gilbert *et al.*, 2007).

Também foi demonstrado que o sFlt-1 causa danos à células endoteliais *in vitro* e que esse dano é revertido pela administração exógena de VEGF e PlGF (Maynard *et al.*, 2003). Ainda, estudos mostram que em mulheres com pré-eclâmpsia, os níveis plasmáticos de sFlt-1 são inversamente relacionados aos níveis de nitrito (Sandrim *et al.*, 2008), indicando que o sFlt-1 causa dano endotelial e diminui os níveis de NO. Complementando esses achados, foi também relatado, por meio de estudos que empregaram modelos animais utilizando L-NAME para inibir a síntese de NO durante a gestação, a ocorrência de uma diminuição dos níveis de NO com concomitante aumento de sFlt-1 (Goncalves-Rizzi *et al.*, 2016; Possomato-Vieira *et al.*, 2016).

Pesquisas relataram também que, em modelos de hipertensão gestacional induzido por RUPP, há uma diminuição da sensibilidade de resposta contrátil à acetilcolina (ACh) na aorta, artéria mesentérica, artéria renal e artéria carótida (Zhu *et al.*, 2016), evidenciando uma disfunção endotelial. Além disso, artérias uterinas incubadas com o plasma de mulheres pré-eclâmpicas também apresentaram redução de resposta vasodilatadora do NO mediada por metacolina, um análogo sintético da ACh (Kao *et al.*, 2016). Kao (2016) relata que, na presença de *scavengers* de moléculas oxidantes, essas artérias uterinas previamente incubadas com plasma de mulheres pré-eclâmpicas tem suas respostas vasculares reestabelecidas. Portanto, compreende-se que o estresse oxidativo contribui para a instalação de disfunção endotelial na pré-eclâmpsia (Kao *et al.*, 2016) e pode estar associado aos níveis aumentados de sFlt-1 (George e Granger, 2011; Ali e Khalil, 2015). Esse processo fisiológico relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido (O_2^-), pode ter como explicação a capacidade do NO, produzido na célula endotelial, de reagir com as ROS, formando peroxinitrito ($ONOO^-$), consequentemente há diminuição da biodisponibilidade de NO, agravando os quadros hipertensivos (Forstermann e Li, 2011).

Além disso, em outros modelos animais de indução de hipertensão gestacional, como o modelo de imposição de expansão excessiva de volume pela administração de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) a ratas prenhes, cuja água potável foi substituída por solução salina (0,9%), também apresentaram redução dos níveis circulantes de PlGF (Agunanne *et al.*, 2010), além de redução dos níveis de NO (Mitchell *et al.*, 2007) e aumento de estresse oxidativo (Mitchell *et al.*, 2007).

1.4.Efeitos da pravastatina independentes da redução do colesterol

Como a diminuição dos níveis de NO causa problemas de hipertensão gestacional, a promoção do aumento de seus níveis plasmáticos torna-se interessante como estratégia

terapêutica na pré-eclâmpsia (Murphy *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2015; Goncalves-Rizzi *et al.*, 2016; Ormesher *et al.*, 2018). Nesse contexto, estudos tem mostrado que as estatinas são capazes de aumentar a biodisponibilidade de NO (Dobrucki *et al.*, 2001), apresentando-a como um potencial agente terapêutico no tratamento das desordens hipertensivas da gestação.

As estatinas são clinicamente prescritas por sua ação na redução dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), pois inibem competitivamente a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima redutase (HMG-CoA), enzima envolvida na síntese do colesterol endógeno (Alberts *et al.*, 1980). Porém, numerosos estudos clínicos confirmaram os múltiplos benefícios terapêuticos das estatinas independentes da redução do colesterol (Bedi *et al.*, 2016).

Ensaios pré-clínicos demonstraram a ação antioxidante das estatinas associada à diminuição da produção de ROS e aumento da expressão da hemoxigenase-1 (Hmox-1) (Ramma e Ahmed, 2014; Violi e Pignatelli, 2014; Brownfoot *et al.*, 2015), uma enzima com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Outra ação das estatinas resulta do seu mecanismo em reduzir marcadores e mediadores inflamatórios como a proteína C-reativa (PCR), moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e moléculas de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1), prevenindo a progressão da aterosclerose, da disfunção endotelial e processos pró-trombóticos (Jain e Ridker, 2005).

Além disso, estudos clínicos e experimentais descrevem os efeitos das estatinas na via do NO (Ma e Ma, 2014; Bao *et al.*, 2018; Kowalska *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Um estudo clínico avaliou os efeitos do tratamento com pravastatina na expressão de eNOS na aorta abdominal de pacientes submetidos à cirurgia para reparo de aneurisma aórtico. Esse estudo revelou que o tratamento com pravastatina aumentou a expressão de eNOS (Kowalska *et al.*, 2018). Ademais, um estudo mostrou que os efeitos benéficos promovidos pela pravastatina no dano pulmonar agudo eram revertidos pelo uso de L-NAME (Bao *et al.*, 2018), indicando que os efeitos dessa estatina eram mediados pelo NO produzido pela eNOS.

De maneira semelhante, o tratamento com pravastatina ou fluvastatina aumentaram a expressão da eNOS em ratos Sprague-Dawley, o que foi relacionado com a diminuição da área de lesão em infarto do miocárdio (Li *et al.*, 2018). O aumento da expressão da eNOS também foi observado em coelhos tratados com pravastatina e além disso, foi observado uma melhora no relaxamento NO-dependente, induzido pela ACh (Arora *et al.*, 2012). Nesse estudo, os autores também avaliaram a fosforilação dos resíduos de treonina⁴⁹⁵ e serina¹¹⁷⁷, que são vias de ativação da eNOS (Mount *et al.*, 2007; Arora *et al.*, 2012). Confirmando esses achados, estudos *in vitro* utilizaram células da veia umbilical humana (HUVECs), incubando-as por 24 horas com fluvastatina, lovastatina ou cerivastatina. Esses estudos mostraram um aumento da atividade e expressão da eNOS (Meda *et al.*, 2010). Além disso, esse trabalho demonstrou um acúmulo de GMPc, indicando a ativação da via do NO, após o tratamento com estatinas (Meda *et al.*, 2010).

As semelhanças fisiopatológicas e os fatores de risco compartilhados pela pré-eclâmpsia e pelas doenças cardiovasculares levaram à hipótese da eficácia semelhante das estatinas na prevenção ou no tratamento da pré-eclâmpsia.

Considerando os efeitos pleiotrópicos das estatinas, especialmente suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antitrombóticas e na melhora da disfunção endotelial (Hermida e Balligand, 2014; Girardi, 2017), foi aventada uma hipótese para eficácia semelhante das estatinas na prevenção ou no tratamento da pré-eclâmpsia. A seleção da pravastatina para novos estudos durante a gestação dentre outras estatinas é justificada por sua alta hidrofilicidade (Lecarpentier *et al.*, 2012; Esteve-Valverde *et al.*, 2018). Devido a essa característica farmacocinética, a transferência transplacentária de pravastatina da mãe para o feto é bastante limitada (Costantine *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, estudos em animais mostraram que as estatinas são eficazes na prevenção de complicações gestacionais importantes, como a hipertensão gestacional. A pravastatina usada em modelos animais de hipertensão gestacional reduziu a pressão arterial, melhorou a função vascular, reduziu os níveis de sFlt-1 circulantes e aumentou os níveis de PlGF e VEGF (Redecha *et al.*, 2009; Kumasawa *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2013; Saad *et al.*, 2014; Garrett *et al.*, 2018).

Além disso, um ensaio clínico utilizando pravastatina foi realizado com o objetivo de avaliar a farmacocinética e a segurança da pravastatina como tratamento profilático em gestantes com alto risco de desenvolver pré-eclâmpsia. No ensaio, as mulheres receberam pravastatina diariamente em uma dose de 10 mg ou placebo por via oral, iniciando o tratamento antes de 16 semanas de gestação até o parto. Os resultados mostraram que nenhum risco de segurança identificável foi associado ao uso de pravastatina nessas mulheres. Na maioria das pacientes, as concentrações de pravastatina no plasma materno e no cordão umbilical no momento do parto estavam abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio. Ademais, embora não estatisticamente significativa, no grupo tratado com pravastatina houve uma tendência a menores ocorrências de pré-eclâmpsia e também uma melhora no perfil angiogênico, ou seja, diminuição dos níveis de sFlt-1 e aumento dos níveis plasmáticos de PlGF (Costantine *et al.*, 2016).

Em 2016, Chaiworapongsa *et al.* conseguiram evitar a morte fetal em uma paciente com depósito maciço de fibrina na placenta e infarto do assoalho materno. O tratamento com pravastatina diminuiu os níveis de sFlt-1 e aumentou os níveis de PlGF, demonstrando assim o uso potencial da pravastatina no quadro de um desequilíbrio angiogênico (Chaiworapongsa *et al.*, 2016).

Estudos sobre o uso da pravastatina para a prevenção da pré-eclâmpsia precisam ser continuados, uma vez que os presentes achados parecem indicar a pravastatina como forte candidata terapêutica no tratamento da pré-eclâmpsia e de outros distúrbios hipertensivos da gestação.

Portanto, os estudos realizados durante esse curso de mestrado tiveram como objetivos investigar o envolvimento do NO na interface feto-placentária, sua relação com a restrição do crescimento fetal, vasodilatação dependente do endotélio, equilíbrio angiogênico e estresse oxidativo, bem como avaliar os reflexos maternos na pressão arterial mediado pelo tratamento com pravastatina em um modelo experimental de hipertensão gestacional.

ORIGINAL ARTICLE

Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction

Jessica Sabbatine Chimini | Jose Sergio Possomato-Vieira | Maria Luiza Santos da Silva | Carlos A. Dias-Junior

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

Correspondence

Carlos Alan Dias-Junior, Department of
Pharmacology, Biosciences Institute of
Botucatu, São Paulo State University,
Botucatu, Brazil.
Email: carlos.dias-junior@unesp.br

Abstract

Pre-eclampsia and hypertensive disorders of pregnancy are frequently associated with foeto-placental growth restriction, and that may be triggered by angiogenic imbalance and endothelial dysfunction. Impaired nitric oxide (NO) bioavailability seems to be involved in these pathophysiological changes observed in hypertensive pregnancy. Pravastatin has shown efficacy and to be safe during hypertension in pregnancy. However, NO involvement in pravastatin effects during maternal hypertension and foeto-placental development is unclear. Therefore, we aimed to examine pravastatin effects on placental NO formation, endothelium-dependent vasodilation, systolic blood pressure and foeto-placental development in hypertensive pregnant rats. Biochemical determinants of angiogenesis and oxidative stress were also assessed. Pregnant rats were distributed into four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava). Our results showed that pravastatin treatment blunts hypertension and foeto-placental growth restriction. Also, increases in placental NO levels were found in the HTN-Preg+Prava group. Pravastatin prevents impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation, exacerbated contractile response to phenylephrine and increases in oxidative stress in the HTN-Preg+Prava group. Increased soluble fms-like tyrosine kinase-1-to-placental growth factor (sFlt-1/PlGF) ratio is reversed by pravastatin treatment in the HTN-Preg+Prava group. We conclude that NO formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pleiotropic effects associated with pravastatin treatment against hypertension in pregnancy, intrauterine growth restriction, vascular dysfunction and angiogenic imbalance.

KEYWORDS

hypertensive pregnancy, nitric oxide, rats, statins, vascular reactivity

1 | INTRODUCTION

Statins are clinically prescribed for cholesterol biosynthesis inhibition and for preventing the onset and progression of atherosclerotic cardiovascular disease.¹ Although statin usage to this end is supported by decades of preclinical investigations and clinical trials,^{2,3} additional and beneficial effects have been revealed.⁴ In this regard, pleiotropic effects of statins have been associated with nitric oxide (NO) signalling,^{5,6} and pravastatin markedly increased endothelium-dependent vasodilation in spontaneously hypertensive male rats.⁷ Moreover, recent studies have demonstrated that pravastatin presents favourable safety and pharmacokinetic profiles to its use during pregnancy.^{8,9}

Pravastatin has shown protective effects during foetal development in gestational hypertension in animals.^{10,11} In addition, in humans, pravastatin effects involved augmented levels of vasodilator NO¹⁰ that prevented the onset of pre-eclampsia⁹ and attenuated the intrauterine growth restriction.^{10,12} However, these cholesterol-independent mechanisms due to pravastatin have not yet been fully clarified in hypertensive disorders of pregnancy correlated with foetal growth restriction.

A marked foetal growth and uteroplacental vascularization arise during pregnancy,¹³ and previous evidence *in vitro* suggests that NO produced into human foetoplacental circulation contributes to the maintenance of adequate blood supply to the growing foetus.¹⁴ Also, NO seems to be involved in modulation of placental growth factor (PlGF) and soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), the key molecules in angiogenesis and vasculogenesis.¹⁵ These findings are particularly interesting, since complications of pre-eclampsia involve endothelial and vascular dysfunctions that may be caused by angiogenic imbalance, pro-oxidant state and reduced NO bioavailability.¹⁶⁻¹⁸

Therefore, in the present study, we used an animal model of hypertensive pregnancy induced by deoxycorticosterone acetate (DOCA) and sodium chloride (DOCA-salt), which results from the imposition of excessive volume expansion¹⁹ and which in previous studies has shown that DOCA-salt-treated pregnant rats developed hypertension, foetal growth restriction, endothelial dysfunctions and other pre-eclamptic features.^{19,20} Accordingly, we aimed to investigate whether NO signalling underlies pravastatin pleiotropic effects in foeto-placental interface and in endothelium-dependent vasodilation. In order to examine these mechanisms in hypertension in pregnancy, we measured maternal blood pressure, foetal and placental weights, placental NO formation and vascular and endothelial functions, and we also evaluated biochemical determinants of angiogenesis and oxidative stress after pravastatin treatment.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals and experimental protocols

Wistar rats (200-250 g) were housed in cages at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12-hour light/dark cycle and given free access to water and rat chow. Each female rat was separately mated overnight. Day 1 of pregnancy was defined when spermatozoa were found in a vaginal smear. Hypertensive pregnancy was induced by the DOCA-salt model. Briefly, pregnant rats were injected with 12.5 mg of DOCA (#D7000; Sigma, St. Louis, MO, USA) intraperitoneally (i.p.) in a depot form on gestational day 1, followed by i.p. injections of DOCA (6.5 mg) on gestational days 7 and 14. Moreover, drinking water was replaced by 0.9% saline solution throughout gestation, as previously described.^{19,20}

Pregnant rats were randomized and assigned to four groups: pregnant rats receiving daily 0.9% saline solution (0.3-0.45 mL) injections (i.p.) and potable water (0.3-0.45 mL) via gavage (Norm-Preg, $n = 10$); pregnant rats submitted to the DOCA-salt model and treated with potable water via gavage (HTN-Preg, $n = 10$); pregnant rats receiving 0.9% saline solution injections (i.p.) and pravastatin solubilized in potable water (10 mg/kg per daily) via gavage (0.3-0.45 mL, Preg-Prava, $n = 10$); and pregnant rats submitted to the DOCA-salt model and treated with pravastatin (10 mg/kg per daily) via gavage (HTN-Preg+Prava, $n = 10$). Rats received pravastatin from gestational days 10 to 19. Pravastatin was given to the animals 3 hour before systolic blood pressure measurements. Pravastatin dosage was chosen based on its elimination half-life and likewise on the lowest dose used in women with pre-eclampsia.^{8,9}

Animals were killed on gestational day 19 under overdose of isoflurane followed by exsanguination. Soon after killing, dams were placed in a supine position and a caesarean section was performed. Then, foetal and placental weights and litter size (total number of pups) were recorded. Blood samples were collected in lyophilized heparin-containing tubes (Vacutainer; Becton Dickinson, Oxford, UK) and immediately centrifuged for plasma separation. Plasma was stored at -80°C until use for biochemical analysis.

All procedures for animal experimentation were approved by the Institutional Ethics Committee (protocol no. 960/2017), which complied with international guidelines of the European Community for the use of experimental animals. The study was conducted in accordance with the BCPT policy for experimental and clinical studies.²¹

2.2 | Blood pressure measurements

Systolic blood pressure (mmHg) was measured using tail-cuff plethysmography (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalogue #EFF-306). Briefly, conscious rats were

first acclimated in a quiet room, conditioned and restrained in a warm-box (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalogue #EFF-307) at 40°C for 5-10 min. Systolic blood pressure was determined as the average of the cuff inflation–deflation (3-6 cycles) by a trained operator.²² Measurements on gestational days 14, 16 and 19 were performed 3 hr before drug or saline administrations.

2.3 | Determination of placental nitrite/nitrate (NO_x)

We used Griess reagents followed by reduction of nitrous species with vanadium chloride III to examine NO_x concentrations.²³ Briefly, placental tissue was homogenized in cold Krebs solution and the homogenates were centrifuged at 15 000×g at 4°C for 15 minutes. Supernatant was removed and incubated with 100 µL of saturated solution of vanadium chloride III for 3 hour at 37°C with agitation for nitrate reduction. After incubation, 50 µL of 1% sulphanilamide 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 was added followed by 10-minutes incubation in the dark. Absorbance at 535 nm was read in spectrophotometer (Synergy 4; BIOTEK, Winooski, VT, USA), and NO_x concentration was calculated using a standard curve of sodium nitrite (1.56-100 µmol/L). The NO_x levels in placental tissue were expressed as µmol/100 mg tissue.

2.4 | Determination of placental lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined through measurements of thiobarbituric acid (TBA)–reactive substances (TBARS). Briefly, TBA reacts with malondialdehyde (MDA), which is the end product of lipid peroxidation and produces a colorimetric reaction that is measured by spectrophotometer at a wavelength of 532 nm.²⁴ In test tubes, a reaction mixture containing 100 µL of distilled water, 50 µL of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 100 µL of samples, 375 µL of acetic acid 20% and 375 µL of TBA 0.8% was incubated in a water bath at 95°C for 1 hour and subsequently centrifuged at 15 000×g for 10 minutes. Standard curve was prepared in a similar manner, replacing samples with 25 µL of known concentrations of MDA. Placental TBARS were calculated against a standard curve of MDA (20-320 nmol). The results were expressed as MDA levels/100 mg tissue.

2.5 | Determination of plasma sFlt-1 and PIGF levels

Commercial enzyme immunoassay (ELISA) kits for sFlt-1 (#ELM-VEGFR1; RayBiotech Inc., Norcross, GA, USA)

and PIGF (#E-EL-R0742; Elabscience Inc., Houston, TX, USA) were used. Assays were performed according to the manufacturer's instructions. Plasma levels were expressed in pg/mL.

2.6 | Vascular reactivity

Thoracic aortas were dissected and rings were obtained (3-4 mm). The aortic rings were placed 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) kept at pH 7.4 and 37°C and bubbled continuously with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Rings were suspended between two wire hooks. One hook was fixed to a stationary support, and the other hook was connected to an isometric force transducer. Changes in aorta tension were recorded using FORT10 isometric force transducers connected to Transbridge 4M Transducer Amplifier (WPI, Sarasota, FL, USA) connected to a PC-based MP100 System and analysed offline using AcqKnowledge version 3.5.7 software (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA).

Thoracic aorta rings were stretched under 1.5 g basal tension and were allowed to equilibrate for 45 minutes. After tissue equilibration, a control contraction to 96 mmol/L of KCl was elicited. 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, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M). In order to investigate endothelial function, vascular tissues were pre-contracted with PHE (10⁻⁶ M) followed by increasing concentrations of acetylcholine (ACh, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M). Participation of endothelium-dependent NO in vascular relaxation was evaluated in concentration-response curves to ACh obtained in the presence of Nω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 3 × 10⁻⁴ mol/L), added in the last 30-minutes stabilization period.^{22,25} Concentration-contraction curves were constructed, and the maximal response to PHE was recorded. Concentration-effect curves to ACh, in the presence or absence of L-NAME, were expressed as the % relaxation to PHE contraction. Non-linear regression (variable slope) of the obtained concentration-effect curves revealed the maximal response (*E*_{max}) and negative logarithm of the concentration that evoked 50% of the maximal response (pEC₅₀), as previously described.²¹

2.7 | Data analysis and statistics

The results are expressed as means ± SEM. Comparisons between groups were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) or one-way ANOVA followed by Tukey's test (GraphPad Prism® 6.0, San Diego, CA,

USA). A probability value $P < 0.05$ was considered significant.

3 | RESULTS

3.1 | Pravastatin prevents hypertensive pregnancy and intrauterine growth restriction

No significant differences were observed in systolic blood pressure on gestational day 14 (133 ± 5 to 148 ± 4 mmHg; Figure 1). On gestational days 16 and 19, systolic blood pressure was elevated in the HTN-Preg group (163 ± 2 and 160 ± 2 mmHg, respectively; Figure 1) compared to the Norm-Preg group (132 ± 2 and 127 ± 1 mmHg, $*P < 0.05$, respectively; Figure 1). However, pravastatin blunted the increases in systolic blood pressure in HTN-Preg+Prava animals on gestational days 16 and 19 (134 ± 2 and 136 ± 2 mmHg, respectively, $^{\#}P < 0.05$; Figure 1).

Decreases in foetal weight were found in the HTN-Preg group (1.75 ± 0.02 g, $*P < 0.05$; Figure 2A) compared to the Norm-Preg and Preg-Prava groups (2.84 ± 0.13 and 2.58 ± 0.06 g, respectively; Figure 2A). However, pravastatin reversed foetal growth restriction in the HTN-Preg+Prava group (2.4 ± 0.04 g, $^{\#}P < 0.05$; Figure 2A). Also, placental weight was reduced in the HTN-Preg group (0.25 ± 0.01 g; Figure 2B) compared to the Norm-Preg group (0.33 ± 0.01 g, $*P < 0.05$; Figure 2B). However, the Preg-Prava and HTN-Preg+Prava groups showed increases in placental weights (0.45 ± 0.01 and 0.46 ± 0.01 g, respectively, $^{\#}P < 0.05$; Figure 2B). Number of pups presented no significant differences among groups (13 ± 0.7 , 11 ± 1.6 , 12 ± 0.9 and 12 ± 0.2 were found in the Norm-Preg, Preg-Prava, HTN-Preg and HTN-Preg+Prava groups, respectively; Figure 2C).

3.2 | Pravastatin increases placental NO formation and prevents significant increases in oxidative stress in hypertensive pregnant rats

Increases in placental NOx were found in HTN-Preg+Prava animals (23 ± 2 $\mu\text{mol}/100$ mg tissue) compared to the Norm-Preg (14 ± 2 $\mu\text{mol}/100$ mg tissue) and HTN-Preg (15 ± 2 $\mu\text{mol}/100$ mg tissue) groups ($^{\#}P < 0.05$; Figure 3A). Placental total NOx in the Preg-Prava group (17 ± 3 $\mu\text{mol}/100$ mg tissue) was similar to those found in the Norm-Preg and HTN-Preg groups (Figure 3A). In addition, placental MDA levels were increased in the HTN-Preg group (28 ± 1 nmol/100 mg tissue) compared to Norm-Preg and Preg-Prava animals (16 ± 1 and 17 ± 2 nmol/100 mg tissue, respectively, $^{\#}P < 0.05$; Figure 3B). However, the HTN-Preg+Prava group presented no significant increases in placental MDA levels (22 ± 1 nmol/100 mg tissue) when compared to the Norm-Preg and Preg-Prava groups (Figure 3B).

3.3 | Pravastatin prevents angiogenic imbalance induced by hypertension in pregnancy

The sFlt-1/PlGF ratio was increased in the HTN-Preg group (12 ± 2) compared to the Norm-Preg group (5 ± 1 , $*P < 0.05$; Figure 4A). However, pravastatin restored sFlt-1/PlGF ratio in the HTN-Preg+Prava group (3 ± 0.3 , $^{\#}P < 0.05$; Figure 4A), since similar sFlt-1/PlGF ratios were found when compared to the Norm-Preg and Preg-Prava groups (Figure 4A). Also, plasma levels of sFlt-1 were reduced in the HTN-Preg+Prava group (274 ± 32 pg/mL) compared to the Norm-Preg group (450 ± 45 pg/mL, $*P < 0.05$; Figure 4B). Similar plasma levels of sFlt-1 were found in the Norm-Preg and Preg-Prava (355 ± 79 pg/mL) groups when compared to the HTN-Preg group (406 ± 29 pg/mL; Figure 4B). Also, plasma levels of PlGF were increased

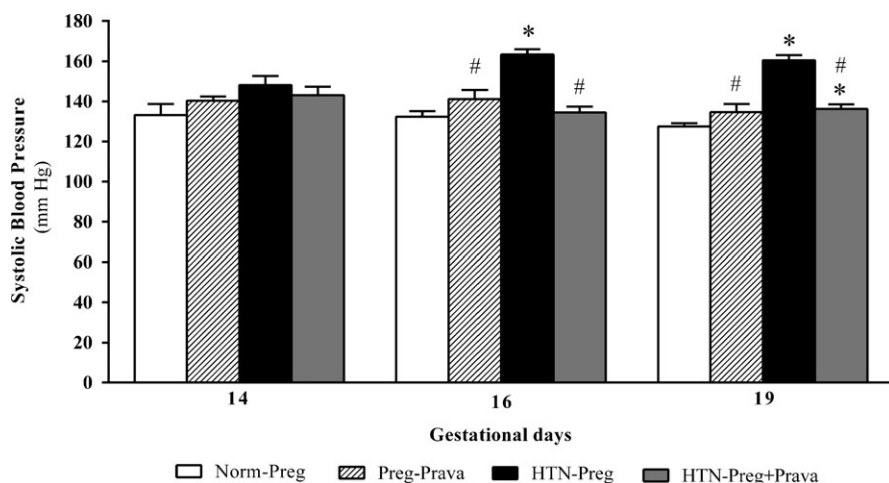


FIGURE 1 Systolic blood pressure measured on gestational days 14, 16 and 19 among the four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava). Values represent mean $\pm$ SEM. $*P < 0.05$ vs Norm-Preg; $^{\#}P < 0.05$ vs HTN-Preg

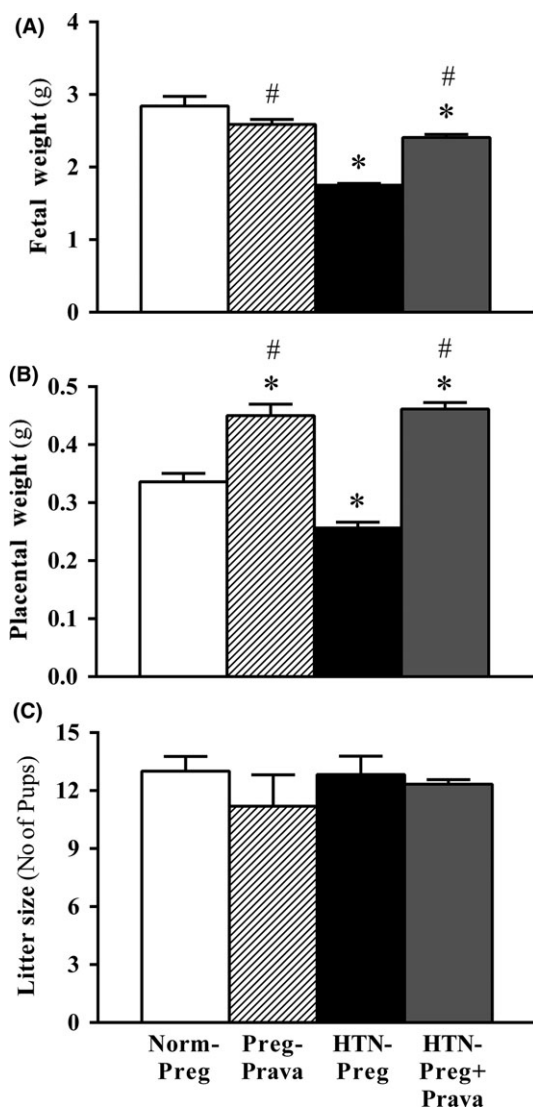


FIGURE 2 Foetal (A) and placental (B) weights and litter size (C) were recorded on gestational day 19 among the four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava). Values represent mean $\pm$ SEM. * P < 0.05 vs Norm-Preg; # P < 0.05 vs HTN-Preg

in the HTN-Preg-Prava group (77 ± 8 pg/mL) compared to the HTN-Preg group (39 ± 9 pg/mL, # P < 0.05; Fig. 4C). Similar plasma levels of PIGF were found in the Norm-Preg (63 ± 11 pg/mL) and Preg-Prava (52 ± 13 pg/mL) groups compared to the HTN-Preg group (Figure 4C).

3.4 | Pravastatin prevents impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation and hyper-reactive response to phenylephrine caused by hypertension in pregnancy

While $E_{\max}$ to phenylephrine showed no difference among groups (Figure 5A and Table 1), pEC_{50} values were only

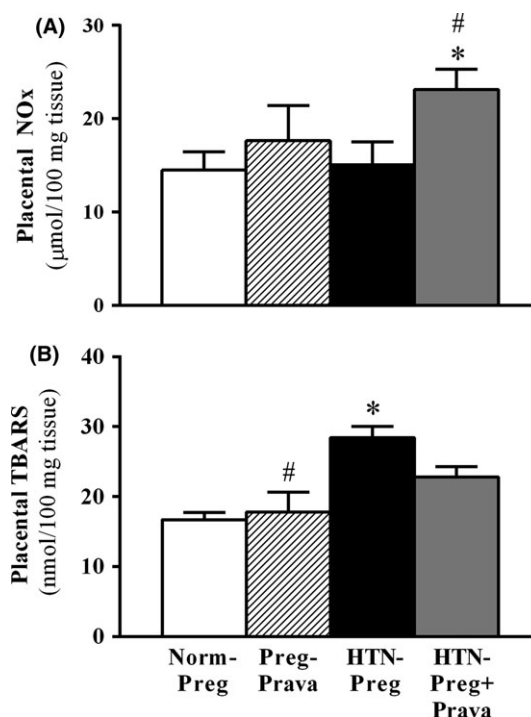


FIGURE 3 Placental levels of NOx (A) and TBARS (B) were determined among the four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava). Values represent mean $\pm$ SEM. * P < 0.05 vs Norm-Preg; # P < 0.05 vs HTN-Preg

increased in the HTN-Preg group compared to the other groups. However, pravastatin blunted hyper-reactive response to phenylephrine in the HTN-Preg+Prava group (# P < 0.05; Figure 5A and Table 1). In addition, while maximum acetylcholine-induced vasodilation was only impaired in the HTN-Preg group compared to the other groups, pravastatin restored maximum acetylcholine-induced vasodilation in the HTN-Preg+Prava group (# P < 0.05; Figure 5B and Table 1). However, L-NAME inhibited acetylcholine-induced vasodilation in all groups (Figure 5C and Table 1). Moreover, no significant differences among groups were observed in KCl-induced contraction (Figure 5D and Table 1).

4 | DISCUSSION

The main findings are as follows: (a) pravastatin blunts increases in systolic blood pressure and foeto-placental growth restriction induced by hypertensive pregnancy. (b) Augmented levels of NO in placenta, increased plasma PIGF with concomitant decreased plasma sFlt-1 and reduced sFlt-1/PIGF ratio were found in hypertensive pregnant rats treated with pravastatin. (c) Pravastatin prevented impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation and hyper-reactive vasoconstrictor response to

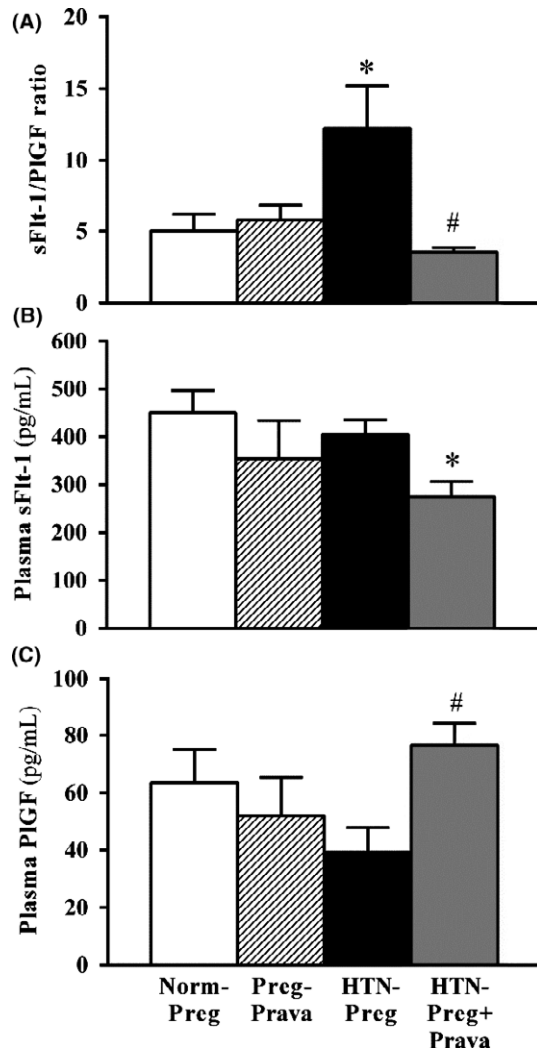


FIGURE 4 Plasma levels of anti-angiogenic (soluble fms-like tyrosine kinase-1: sFlt-1) and angiogenic (placental growth factor: PIGF) factors. sFlt-1/PIGF ratio (A) and plasma levels of anti-angiogenic (sFlt-1, (B) and pro-angiogenic (PIGF, (C) factors were evaluated among the four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava). Values represent mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs Norm-Preg; # $P < 0.05$ vs HTN-Preg

phenylephrine caused by hypertensive pregnancy. (d) Elevated oxidative stress induced by hypertensive pregnancy is prevented by pravastatin.

Insufficiency of the uteroplacental blood flow, angiogenic imbalance and hypertensive pregnancy may be leading events causing pre-eclampsia and abnormal foetal development.²⁶ These features of pre-eclampsia have been reproduced in the same rat model^{19,20} used in the present study. In line with previous findings, foeto-placental growth restriction with concomitant elevations in systolic blood pressure, in plasma sFlt-1/PIGF ratio and in oxidative stress was observed here (HTN-Preg group). Also, we

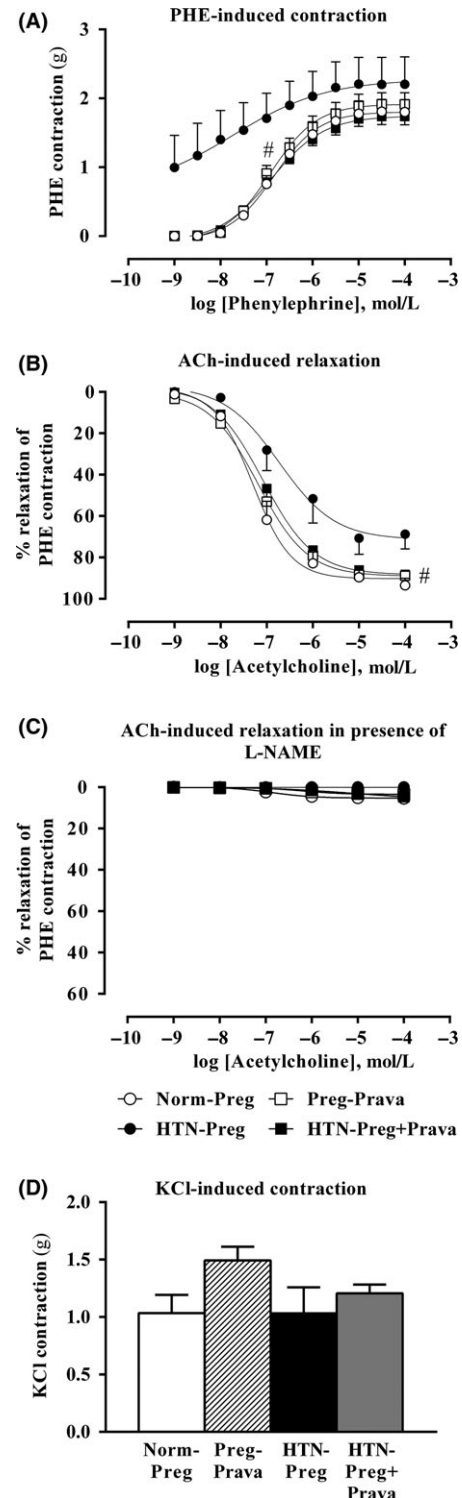


FIGURE 5 Phenylephrine (PHE)-induced contraction (A), acetylcholine (ACh)-induced vasodilation (B), ACh-induced vasodilation in the presence of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, (C) and KCl-induced contraction (D) were evaluated in thoracic aorta rings from four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava). Values represent mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs Norm-Preg; # $P < 0.05$ vs HTN-Preg

TABLE 1 Maximal response ($E_{\max}$) and negative logarithm of the concentration that evoked 50% of the maximal response (pEC_{50}) were recorded for phenylephrine (PHE)-induced contraction, acetylcholine (ACh)-induced vasodilation, ACh-induced vasodilation in the presence of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and KCl-induced contraction in thoracic aorta rings from four groups: normal pregnancy (Norm-Preg), pregnancy+pravastatin (Preg-Prava), hypertensive pregnancy (HTN-Preg) and hypertensive pregnancy+pravastatin (HTN-Preg+Prava)

	Norm-Preg	Preg-Prava	HTN-Preg	HTN-Preg+Prava
PHE $E_{\max}$ (g)	1.95 $\pm$ 0.19	1.94 $\pm$ 0.16	2.22 $\pm$ 0.39	1.70 $\pm$ 0.11
PHE pEC_{50} ($-\log$ M)	6.91 $\pm$ 0.11*	6.94 $\pm$ 0.08*	7.80 $\pm$ 0.30	6.88 $\pm$ 0.08*
ACh $E_{\max}$ (%)	93.46 $\pm$ 3.37*	90.43 $\pm$ 2.77*	71.36 $\pm$ 8.04	87.77 $\pm$ 1.84*
ACh pEC_{50} ($-\log$ M)	7.18 $\pm$ 0.12	7.13 $\pm$ 0.15	6.49 $\pm$ 0.38	6.99 $\pm$ 0.12
ACh+ L-NAME $E_{\max}$ (%)	6.33 $\pm$ 0.90	3.58 $\pm$ 1.50	0.72 $\pm$ 0.72	6.27 $\pm$ 2.02
KCl $E_{\max}$ (g)	1.29 $\pm$ 0.30	1.8 $\pm$ 0.14	1.54 $\pm$ 0.19	1.49 $\pm$ 0.17

Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

* $P < 0.05$ vs the HTN-Preg group.

found impaired endothelium-mediated vasodilation in response to acetylcholine and hyper-reactivity in the contractile response to phenylephrine in thoracic aorta rings of the HTN-Preg group, as previously reported.^{20,22} In addition, although KCl-induced contraction responses suggest that vascular calcium influx through voltage-gated calcium channels could not be behind hyper-reactive response to phenylephrine observed in the HTN-Preg group,²⁷ it is possible that phenylephrine had further activated calcium influx through receptor and store-operated calcium channels,²⁷ and thus, a greater calcium influx could have occurred in HTN-Preg rats. Taken together, our present observations support those changes in vascular function and angiogenic imbalance as important mechanisms that underlie hypertension and reduced foeto-placental development.^{25,28,29} However, our hypothesis was that pravastatin could prevent these deleterious changes.

Results from the HTN-Preg+Prava group confirm our hypothesis and provide evidence that reduced systolic blood pressure, increased foetal and placental weights and restored vascular function involved endothelial and placental NO formation. Supporting these suggestions, enhancing placental NO was only found in the HTN-Preg+Prava group, thus suggesting that placental effect of pravastatin is particular to the concurrent presence of hypertensive pregnancy.³⁰ Also, pravastatin restored endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation in the HTN-Preg+Prava group, which was similar to that found in the Norm-Preg group, and this pravastatin effect counteracted hyper-reactive contractile response to phenylephrine in thoracic aorta rings from HTN-Preg+Prava rats. Furthermore, confirming the NO involvement in pravastatin treatment, our findings showed that pre-incubation with a non-selective NO synthase inhibitor (L-NAME²⁵) eliminated endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation.

The increase in plasma sFlt-1/PlGF ratio found in the HTN-Preg group is consistent with earlier studies reporting

angiogenic imbalance in women with pre-eclampsia³⁰ and in animal models.^{25,32,33} However, the HTN-Preg+Prava group presented elevations in circulating PlGF with concomitant reductions in circulating sFlt-1 and in sFlt-1/PlGF ratio. We suggest that the increase in placental NO formation observed with pravastatin ameliorated angiogenic balance in the HTN-Preg+Prava group. In accordance, previous studies have demonstrated NO-mediated regulation of pro- and anti-angiogenic genes, resulting in an enhanced PlGF associated with reduced sFlt-1.^{15,16} Consequently, increases in placental NO caused by pravastatin resulted in adequate blood supply into foeto-maternal interface; thus, NO allowed foeto-placental development because it protected against unappropriated remodelling of the maternal uteroplacental vasculature induced by hypertensive pregnancy and that caused foeto-placental growth restriction.^{34,35} Therefore, we believe that the effects of NO signalling may be due to their general effects on angiogenesis, endothelial cell growth, endothelium-dependent vasodilation, vasculogenesis and placental development.^{10,11,15,36}

We also evaluated antioxidant effects of pravastatin. While the HTN-Preg group showed elevations in oxidative stress, the HTN-Preg+Prava group presented no significant increases compared to those found in Norm-Preg rats. This is similar to other recent findings with pravastatin in hypertensive pregnancy.^{11,37} Of note, antioxidant effect of pravastatin appears to be hypertension-dependent, since the same pravastatin dosage showed no effects in the Preg-Prava group compared to the Norm-Preg group. Therefore, our results suggest that pleiotropic effects of pravastatin in hypertensive pregnancy include relieving the oxidative stress.¹¹

While clinicians have major concern to prescribe pravastatin during hypertension in pregnancy, a previous trial has reported that pravastatin concentrations in the umbilical cord, right after delivery, were below the detection limit.⁹ Also, experimental studies were addressed to

compare teratogenic effects of statins, and because pravastatin is a polar hydrophilic compound, the authors found no deleterious effects.^{9,38} In accordance, we found that the Preg-Prava group presented foetal weights similar to those found in the Norm-Preg group. Moreover, placental weights were surprisingly higher in animals treated with pravastatin (the Preg-Prava and HTN-Preg+Prava groups), suggesting that there may be a pravastatin-dependent effect which was probably because pravastatin could facilitate trophoblast cell invasion and spiral artery remodelling, resulting in enhanced placental development, as previously reported.³⁹

Some limitations should be considered. Firstly, DOCA may directly cause premature rupture of amniotic membranes that result in low birthweight.⁴⁰ Secondly, previous clinical findings, from small observational studies, showed less convincing effects of pravastatin regarding foetal development,^{9,12} and therefore, further studies are warranted to confirm the pravastatin effects in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. Thirdly, the tail-cuff method may impose a substantial amount of thermal and restrain stress that influences blood pressure measurements.⁴¹ Lastly, placental labyrinth and inverted yolk sac placenta of rat could be more sensitive to hypertension featuring intrauterine growth restriction than the free-floating villi in human beings.⁴²

5 | CONCLUSION

In conclusion, our results implicate that NO underlies pleiotropic effects associated with pravastatin during experimental pre-eclampsia. It is possible that NO formation stimulated by pravastatin restored sFlt-1/PlGF ratio, re-established endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation and counteracted the hyper-reactive vasoconstriction response to phenylephrine in hypertensive pregnancy. Taken together, these pravastatin effects prevented increases in systolic blood pressure and intrauterine growth restriction induced by hypertension in pregnancy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

CONFLICT OF INTEREST

All authors have disclosed that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA 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*. 2014;63:2889-2934.
2. Gocmen AY, Ocak GA, Ozbilim G, Delibas N, Gumuslu S. Effect of atorvastatin on atherosclerotic plaque formation and platelet activation in hypercholesterolemic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91:680-685.
3. Foody JM, Joyce AT, Jeffers BW, Liu LZ, Benner JS. A large observational study of cardiovascular outcomes associated with atorvastatin or simvastatin therapy in hypertensive patients without prior cardiovascular disease. *Am J Ther*. 2011;18:110-116.
4. Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, Kumar P. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2016;389:695-712.
5. Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Pinheiro LC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol*. 2013;1:578-585.
6. Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit*. 2001;7:622-627.
7. Kassan M, Montero MJ, Sevilla MA. Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2009;158:541-547.
8. Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Gil-Aliberas N, Baraldès-Farré A, Llurba E, Alijotas-Reig J. Pravastatin for preventing and treating preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv*. 2018;73:40-55.
9. Costantine MM, Cleary K, Hebert MF, et al. Safety and pharmacokinetics of pravastatin used for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women: a pilot randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214:720e1-e17.
10. Jurisic A, Jurisic Z, Lefkou E, Pombo J, Girardi G. 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*. 2018;110:64-70.
11. Redecha P, van Rooijen N, Torry D, Girardi G. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood*. 2009;113:4101-4109.
12. Lefkou E, Mamopoulos A, Dagklis T, Vosnakis C, Rouso D, Girardi G. Pravastatin improves pregnancy outcomes in obstetric antiphospholipid syndrome refractory to antithrombotic therapy. *J Clin Invest*. 2016;126:2933-2940.
13. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009;30:473-482.
14. Napolitano M, Miceli F, Calce A, et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2318-2323.

15. Groesch KA, Torry RJ, Wilber AC, et al. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. *Placenta*. 2011;32:926-931.
16. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension*. 2008;52:402-407.
17. Pimentel AM, Pereira NR, Costa CA, et al. L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertens Res*. 2013;36:783-788.
18. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001;38:718-722.
19. Ianosi-Irimie M, Vu HV, Whitbred JM, et al. A rat model of preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2005;27:605-617.
20. Mitchell BM, Cook LG, Danchuk S, Puschett JB. Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2007;20:1297-1304.
21. Tveden-Nyborg P, Bergmann TK, Lykkesfeldt J. Basic & clinical pharmacology & toxicology policy for experimental and clinical studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;123(3):233-235.
22. Possomato-Vieira JS, Chimini JS, da Silva MLS, Dias-Junior CA. 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. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;00:1-10.
23. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5:62-71.
24. Périco LL, Heredia-Vieira SC, Beserra FP, et al. Does the gastro-protective 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;172:312-324.
25. 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;311:R505-R521.
26. Crispi F, Llubra E, Domínguez C, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;31:303-309.
27. Murphy JG, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Enhanced $[Ca^{2+}]_i$ in renal arterial smooth muscle cells of pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H393-H403.
28. Maynard SE, Min JY, Merchan J, 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;111:649-658.
29. Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr Res*. 2005;57:1R-7R.
30. Kane AD, Herrera EA, Hansell JA, Giussani DA. Statin treatment depresses the fetal defence to acute hypoxia via increasing nitric oxide bioavailability. *J Physiol*. 2012;590:323-334.
31. Kim SY, Ryu HM, Yang JH, et al. Increased sFlt-1 to PlGF ratio in women who subsequently develop preeclampsia. *J Korean Med Sci*. 2007;22:873-877.
32. Agunanne EE, Uddin MN, Horvat D, Puschett JB. Contribution of angiogenic factors in a rat model of pre-eclampsia. *Am J Nephrol*. 2010;32:332-339.
33. Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension*. 2007;50:1142-1147.
34. Fox KA, Longo M, Tamayo E, et al. Effects of pravastatin on mediators of vascular function in a mouse model of soluble Fms-like tyrosine kinase-1-induced preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205:366e1-366e5.
35. Kulandavelu S, Whiteley KJ, Bainbridge SA, Qu D, Adamson SL. Endothelial NO synthase augments fetoplacental blood flow, placental vascularization, and fetal growth in mice. *Hypertension*. 2013;61:259-266.
36. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, et al. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:1451-1455.
37. Bauer AJ, Banek CT, Needham K, et al. Pravastatin attenuates hypertension, oxidative stress, and angiogenic imbalance in rat model of placental ischemia-induced hypertension. *Hypertension*. 2013;61:1103-1110.
38. Lecarpentier E, Morel O, Fournier T, Elefant E, Chavatte-Palmer P, Tsatsaris V. Statins and pregnancy: between supposed risks and theoretical benefits. *Drugs*. 2012;72:773-788.
39. Yang MY, Diao ZY, Wang ZY, et al. Pravastatin alleviates lipopolysaccharide-induced placental TLR4 over-activation and promotes uterine arteriole remodeling without impairing rat fetal development. *J Biomed Res*. 2018;32:288-297.
40. Lockshin MD, Sammaritano LR. Corticosteroids during pregnancy. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1998;107:136-138.
41. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*. 2005;146:160-173.
42. Kulvietis V, Zalgeviciene V, Didziapetriene J, Rotomskis R. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp Med*. 2011;225:225-234.

How to cite this article: Chimini JS, Possomato-Vieira JS, da Silva MLS, Dias-Junior CA. Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13149>

Discussão

3. Discussão

A incidência de hipertensão arterial vem aumentando a cada ano no mundo todo, logo, é um fator de risco de extrema importância para doenças cardiovasculares e atualmente exige grandes gastos de recursos públicos em seus tratamentos (Kreatsoulas e Anand, 2010; Wang *et al.*, 2017). Dentre as doenças hipertensivas, as gestacionais carecem de uma maior atenção devido às limitações que a gestação impõe e devido aos prejuízos que causam não apenas à mãe, mas também à prole.

Muitos estudos adotam metodologias que buscam mimetizar em modelos animais de hipertensão gestacional o que acontece clinicamente durante a pré-eclâmpsia (Cushen e Goulopoulou, 2017). Nosso método de indução de hipertensão por DOCA-sal mostrou várias das condições encontradas em patologias hipertensivas gestacionais. A administração de um derivado mineralocorticoide sintético, DOCA, em combinação com a alta ingestão de solução salina na dieta de ratas Wistar adultas jovens, induz hipertensão por expansão de volume sanguíneo (Ianosi-Irimie *et al.*, 2005). De maneira similar às pesquisas anteriores, em nossos estudos a implementação do modelo DOCA-sal resultou em aumento de pressão arterial, acompanhada de restrição do crescimento fetal, desequilíbrio angiogênico, aumento de estresse oxidativo, sensibilidade a vasoconstritores e comprometimento da função endotelial.

Em nossos estudos, uma hiperreatividade ao agente vasoconstritor PHE concomitantemente a uma redução da resposta vasodilatadora do endotélio induzida por ACh foram observadas nos anéis de aorta torácica do grupo HTN-Preg, indicando um comprometimento da função endotelial deste grupo. Um aumento de sensibilidade a agentes vasoconstritores e o comprometimento do relaxamento dependente do endotélio estão associados à hipertensão gestacional (Khalil e Granger, 2002) e nosso estudo confirma esses achados.

Em contrapartida, nossos estudos mostraram o restabelecimento do relaxamento dependente do endotélio induzido pela ACh em ratas hipertensas tratadas com pravastatina (HTN-Preg+Prava) e ainda, que esse tratamento preveniu também a resposta contrátil hiperreativa à PHE nos anéis de aorta torácica no grupo HTN-Preg+Prava. De fato, uma diminuição na resistência vascular em anéis aórticos de camundongos incubados com pravastatina foi detectada em estudos prévios (Jurisic *et al.*, 2018).

As estatinas, nas células endoteliais, ativam uma via de sinalização intracelular, a via PI3K/Akt, que promove a fosforilação de resíduos de serina¹¹⁷⁷ da eNOS, aumentando a sensibilidade de ligação Ca^{2+} /calmodulina com a eNOS, acentuando a atividade da eNOS e a síntese de NO (Mount *et al.*, 2007). Além disso, foi mostrado que a pravastatina aumenta a expressão de mRNA da eNOS e reduz a expressão da Caveolina-1, um regulador negativo da atividade da eNOS (Suh *et al.*, 2010; Lecarpentier *et al.*, 2012). É possível que tais mecanismos contribuam para o restabelecimento da resposta dilatadora dependente do NO endotelial, promovida pela ACh nos anéis de aorta torácica do grupo HTN-Preg+Prava.

Ademais, para confirmar o envolvimento do NO no tratamento com pravastatina na restauração do relaxamento induzido pela ACh dependente do endotélio, realizamos uma pré-incubação com um inibidor não seletivo da síntese do NO (L-NAME) (Zhu *et al.*, 2016) e observamos que o relaxamento induzido pela ACh foi eliminado. O restabelecimento de respostas dilatadoras à ACh, seguido pela diminuição da hiperreatividade ao agente vasoconstritor PHE podem explicar, ao menos parcialmente, a prevenção do aumento da pressão sistólica em ratas prenhes hipertensas tratadas com pravastatina (grupo HTN-Preg+Prava).

O uso das estatinas em desordens hipertensivas gestacionais revelou uma melhora de muitos parâmetros, incluindo fluxo sanguíneo uteroplacentário, estresse oxidativo,

desequilíbrio angiogênico, hipertensão e desenvolvimento fetal anormal em muitos estudos clínicos e experimentais (Bauer *et al.*, 2013; Garrett *et al.*, 2018; Jurisic *et al.*, 2018) que também foram observados em nossa pesquisa. Ainda, confirmamos a hipótese de que esses efeitos da pravastatina envolvem sua intervenção farmacológica por aumentar a biodisponibilidade do NO, como observado neste estudo pelo aumento do NO placentário no grupo HTN-Preg+Prava.

A redução dos níveis de NO está associada à ocorrência de desordens hipertensivas gestacionais em modelos animais e pré-eclâmpsia em mulheres (Sandrim *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015; Goncalves-Rizzi *et al.*, 2018). Em um estudo do nosso grupo de pesquisa, utilizando L-NAME, para a indução de hipertensão gestacional, foi observado aumento da pressão arterial sistólica e redução do peso fetal e placentário, indicando que o NO produz efeitos na circulação sistêmica e uteroplacentária (Possomato-Vieira *et al.*, 2018). Nossos achados mostraram que o tratamento com pravastatina aumentou a produção placentária de NO em ratas prenhes hipertensas (grupo HTN-Preg+Prava).

O NO produzido pela eNOS não somente é essencial para a manutenção do tônus vascular (Lopez-Jaramillo *et al.*, 2008), como também para processos angiogênicos (Groesch *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* verificaram que o aumento da disponibilidade de NO em sinciciotrofoblastos primários hipóxicos aumentou a expressão de PlGF e VEGF com significativa redução dos níveis de sFlt-1 (Groesch *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que o aumento da geração de NO em situações de hipóxia é provavelmente uma resposta compensatória para restaurar um ambiente pró-angiogênico.

Além disso, foi demonstrado que os níveis circulantes de sFlt-1 são inversamente proporcionais aos níveis de NO em mulheres com pré-eclâmpsia (Sandrim *et al.*, 2008). Em conformidade com esses achados, em nossos estudos, encontramos um aumento dos níveis de

NO placentário e concomitante aumento dos níveis de PlGF plasmático e a restauração do equilíbrio sFlt-1/PlGF no grupo de ratas prenhes hipertensas, tratadas com pravastatina.

Observamos também em nosso estudo, que os pesos fetais do grupo hipertenso tratado com pravastatina foram restaurados. De fato, estudos demonstraram uma melhora do fluxo sanguíneo das artérias umbilicais de gestantes com restrição de crescimento fetal, após tratamento com pravastatina, prolongando a gravidez e melhorando os pesos fetais (Jurisic *et al.*, 2018). E, embora existam diferenças morfo-funcionais entre a placenta humana e a placenta de roedores (Kulvietis *et al.*, 2011), nossos resultados sugerem que os aumentos dos níveis de NO placentário e PlGF plasmático promovidos pela pravastatina no grupo hipertenso (HTN-Preg+Prava) resultou em suprimento sanguíneo adequado na interface feto-materna por seus efeitos vasodilatadores e estimuladores da angiogênese, protegendo a vasculatura uteroplacentária contra o remodelamento inadequado induzido pela hipertensão materna.

Pudemos observar que tanto animais normotensos quanto hipertensos tratados com pravastatina tiveram um significativo aumento dos pesos placentários. Como relatado anteriormente, níveis de NO e PlGF apenas foram aumentados no grupo hipertenso tratado com pravastatina, sugerindo que esses aumentos dos pesos placentários de animais normotensos e hipertensos tenham ocorrido como efeito da própria pravastatina independentes do NO e do PlGF. O desenvolvimento placentário aumentado ocorreu provavelmente porque a pravastatina pode facilitar a invasão de células trofoblásticas e a remodelação da artéria espiral, como relatado no estudo de Yang *et al.*, 2018 (Yang *et al.*, 2018).

A redução dos níveis de NO também ocorre por intermédio do aumento do estresse oxidativo (Pierini e Bryan, 2015). As ROS são produzidas fisiologicamente pelo organismo como mecanismo de defesa contra agentes patogênicos (Yu, 1994). No entanto, sua produção exacerbada pode promover um aumento da biodegradação do NO. O O_2^- reage com o NO,

formando ONOO^- , que em grandes quantidades causam danos celulares, além de induzir o desacoplamento da eNOS. Uma vez desacoplada, a eNOS passa a produzir O_2^- ao invés de NO (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Radi *et al.*, 2002). A gestação saudável impõe o aumento de ROS no organismo, entretanto, o aumento da produção de moléculas antioxidantes previne a ocorrência de estresse oxidativo (Leal *et al.*, 2011).

Essa compensação não ocorre na hipertensão gestacional, pois ela é caracterizada por aumento de estresse oxidativo (Rogers *et al.*, 2006; Draganovic *et al.*, 2016). Os resultados de nossos estudos estão em conformidade com o dessas pesquisas, pois observamos um aumento de estresse oxidativo no grupo HTN-Preg que foi acompanhado do comprometimento da função endotelial. No entanto, o tratamento com pravastatina impediu a ocorrência de um aumento exacerbado nos níveis de estresse oxidativo. Portanto, os aumentos dos níveis de NO placentário, bem como efeitos antioxidantes da própria pravastatina podem estar relacionados à melhora da função endotelial e à melhora dos parâmetros fetais em ratas do grupo HTN-Preg+Prava.

Conclusões e considerações finais

4. Conclusões e considerações finais

Em nosso estudo, observamos que a pravastatina preveniu o aumento da pressão arterial sistólica e a restrição de crescimento feto-placentário induzidos pela hipertensão experimental. Além disso, observamos níveis aumentados de NO placentário, aumento dos níveis plasmáticos de PlGF, com diminuição concomitante dos níveis plasmáticos de sFlt-1 e consequente redução da relação sFlt-1/PlGF em ratas hipertensas tratadas com pravastatina. A pravastatina preveniu a resposta vasoconstritora hiperreativa à PHE e reestabeleceu o relaxamento induzido pela ACh dependente do endotélio, que pode ser comprometido durante a gestação hipertensiva e também impediu o aumento exacerbado do estresse oxidativo induzido pela gravidez hipertensiva.

Com isso, buscamos esclarecer, com esse estudo, que o NO estaria envolvido na restauração de vários parâmetros da pré-eclâmpsia, culminando em efeitos benéficos maternos e fetais. Além disso, alguns parâmetros como redução de sFlt-1, aumento de PlGF e aumento de NO, sob tratamento com pravastatina não estiveram presentes em animais normotensos, sugerindo que esses efeitos foram específicos para a condição de hipertensão. Esses achados são importantes, pois juntamente com a melhora do peso fetal, complementam a segurança da pravastatina usada durante a gestação.

De forma significativa, nosso estudo contribui para o crescente número de trabalhos da literatura destinados a investigar os efeitos da pravastatina na hipertensão gestacional, esclarecendo o envolvimento do NO nesses efeitos. Porém, nosso trabalho é limitado, uma vez que foi desenvolvido em modelo experimental de pré-eclâmpsia, mas a relação pravastatina/NO demonstrou ter relevância para os efeitos da pravastatina durante a hipertensão gestacional de ratas e merece futuras investigações.

Referências

Referências

AGUNANNE, E. E. et al. Contribution of angiogenic factors in a rat model of pre-eclampsia. **Am J Nephrol**, v. 32, n. 4, p. 332-9, 2010. ISSN 1421-9670 (Electronic). 0250-8095 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720407> >.

AHMAD, S.; AHMED, A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. **Circ Res**, v. 95, n. 9, p. 884-91, Oct 29 2004. ISSN 1524-4571 (Electronic). 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472115> >.

ALBERTS, A. W. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 7, p. 3957-61, Jul 1980. ISSN 0027-8424 (Print). 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6933445> >.

ALEXANDER, B. T. et al. Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 435-9, Jan 1999. ISSN 0194-911X (Print). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931143> >.

ALI, S. M.; KHALIL, R. A. Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. **Expert Opin Ther Targets**, v. 19, n. 11, p. 1495-515, 2015. ISSN 1744-7631 (Electronic). 1472-8222 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26294111> >.

AMARAL, L. M. et al. 17-hydroxyprogesterone caproate significantly improves clinical characteristics of preeclampsia in the reduced uterine perfusion pressure rat model. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 225-31, Jan 2015. ISSN 1524-4563 (Electronic). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368030> >.

AMERICAN COLLEGE OF, O.; GYNECOLOGISTS; TASK FORCE ON HYPERTENSION IN, P. 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. 1122-31, Nov 2013. ISSN 1873-233X (Electronic). 0029-7844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24150027> >.

ARORA, R.; HARE, D. L.; ZULLI, A. Simvastatin reduces endothelial NOS: caveolin-1 ratio but not the phosphorylation status of eNOS in vivo. **J Atheroscler Thromb**, v. 19, n. 8, p. 705-11, 2012. ISSN 1880-3873 (Electronic). 1340-3478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850448> >.

BACKES, C. H. et al. Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. **J Pregnancy**, v. 2011, p. 214365, 2011. ISSN 2090-2735 (Electronic). 2090-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547086> >.

BAO, X. C. et al. Simvastatin decreases hyperbaric oxygen-induced acute lung injury by upregulating eNOS. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 314, n. 2, p. L287-L297, Feb 1 2018. ISSN 1522-1504 (Electronic). 1040-0605 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074491> >.

BAUER, A. J. et al. Pravastatin attenuates hypertension, oxidative stress, and angiogenic imbalance in rat model of placental ischemia-induced hypertension. **Hypertension**, v. 61, n. 5, p. 1103-10, May 2013. ISSN 1524-4563 (Electronic). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460290> >.

BEDI, O. et al. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 389, n. 7, p. 695-712, Jul 2016. ISSN 1432-1912 (Electronic). 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27146293> >.

BERNSTEIN, I. M.; ZIEGLER, W.; BADGER, G. J. Plasma volume expansion in early pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 97, n. 5 Pt 1, p. 669-72, May 2001. ISSN 0029-7844 (Print). 0029-7844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11339913> >.

BIRD, I. M.; ZHANG, L.; MAGNESS, R. R. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284, n. 2, p. R245-58, Feb 2003. ISSN 0363-6119 (Print). 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529278> >.

BRENNAN, L. J.; MORTON, J. S.; DAVIDGE, S. T. Vascular dysfunction in preeclampsia. **Microcirculation**, v. 21, n. 1, p. 4-14, Jan 2014. ISSN 1549-8719 (Electronic). 1073-9688 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890192> >.

BRITTEN, M. B.; ZEIHNER, A. M.; SCHACHINGER, V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. **J Intern Med**, v. 245, n. 4, p. 315-27, Apr 1999. ISSN 0954-6820 (Print). 0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10356593> >.

BROWNFOOT, F. C. et al. Effects of Pravastatin on Human Placenta, Endothelium, and Women With Severe Preeclampsia. **Hypertension**, v. 66, n. 3, p. 687-97; discussion 445, Sep 2015. ISSN 1524-4563 (Electronic). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222708> >.

BUCHBINDER, A. et al. Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 1, p. 66-71, Jan 2002. ISSN 0002-9378 (Print). 0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11810087> >.

CANNON, R. O., 3RD. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clin Chem**, v. 44, n. 8 Pt 2, p. 1809-19, Aug 1998. ISSN 0009-9147 (Print). 0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9702990> >.

CARVAJAL, J. A. et al. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **J Cell Physiol**, v. 184, n. 3, p. 409-20, Sep 2000. ISSN 0021-9541 (Print). 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911373> >.

CHAIWORAPONGSA, T. et al. Pravastatin to prevent recurrent fetal death in massive perivillous fibrin deposition of the placenta (MPFD). **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 6, p. 855-62, Mar 2016. ISSN 1476-4954 (Electronic). 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25893545> >.

CHOI, J. W.; IM, M. W.; PAI, S. H. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. **Ann Clin Lab Sci**, v. 32, n. 3, p. 257-63, Summer 2002. ISSN 0091-7370 (Print). 0091-7370 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175088> >.

CLARK, S. L. et al. Position change and central hemodynamic profile during normal third-trimester pregnancy and post partum. **Am J Obstet Gynecol**, v. 164, n. 3, p. 883-7, Mar 1991. ISSN 0002-9378 (Print). 0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003555> >.

COSTANTINE, M. M. et al. Safety and pharmacokinetics of pravastatin used for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women: a pilot randomized controlled trial. **Am J Obstet Gynecol**, v. 214, n. 6, p. 720 e1-720 e17, Jun 2016. ISSN 1097-6868 (Electronic). 0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26723196> >.

CUSHEN, S. C.; GOULOPOULOU, S. New Models of Pregnancy-Associated Hypertension. **Am J Hypertens**, v. 30, n. 11, p. 1053-1062, Nov 1 2017. ISSN 1941-7225 (Electronic). 0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472224> >.

DI MARCO, G. S. et al. The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 10, p. 2235-45, Oct 2009. ISSN 1533-3450 (Electronic). 1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608702> >.

DOBRUCKI, L. W. et al. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. **Med Sci Monit**, v. 7, n. 4, p. 622-7, Jul-Aug 2001. ISSN 1234-1010 (Print). 1234-1010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433186> >.

DOTSCH, J. et al. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 97, n. 2, p. 163-7, Aug 2001. ISSN 0301-2115 (Print). 0301-2115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451542> >.

DRAGANOVIC, D.; LUCIC, N.; JOJIC, D. Oxidative Stress Marker and Pregnancy Induced Hypertension. **Med Arch**, v. 70, n. 6, p. 437-440, Dec 2016. ISSN 0350-199X (Print). 0350-199X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28210016> >.

ESTEVE-VALVERDE, E. et al. Pravastatin for Preventing and Treating Preeclampsia: A Systematic Review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 73, n. 1, p. 40-55, Jan 2018. ISSN 1533-9866 (Electronic). 0029-7828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29368790> >.

FISHMAN, A. P. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. **Ann N Y Acad Sci**, v. 401, p. 1-8, 1982. ISSN 0077-8923 (Print). 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6963119> >.

FORSTERMANN, U.; LI, H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 2, p. 213-23, Sep 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic). 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198553> >.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980. ISSN 0028-0836 (Print). 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831> >.

GARRETT, N. et al. Pravastatin therapy during preeclampsia prevents long-term adverse health effects in mice. **JCI Insight**, v. 3, n. 8, Apr 19 2018. ISSN 2379-3708 (Electronic). 2379-3708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29669946> >.

GEORGE, E. M.; GRANGER, J. P. Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia. **Am J Hypertens**, v. 24, n. 9, p. 964-9, Sep 2011. ISSN 1941-7225 (Electronic). 0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677700> >.

GILBERT, J. S.; BABCOCK, S. A.; GRANGER, J. P. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. **Hypertension**, v. 50, n. 6, p. 1142-7, Dec 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923588> >.

GILBERT, J. S.; NIJLAND, M. J.; KNOBLICH, P. Placental ischemia and cardiovascular dysfunction in preeclampsia and beyond: making the connections. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 6, n. 10, p. 1367-77, Nov 2008. ISSN 1744-8344 (Electronic). 1477-9072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018690> >.

GIRARDI, G. Pravastatin to treat and prevent preeclampsia. Preclinical and clinical studies. **J Reprod Immunol**, v. 124, p. 15-20, Nov 2017. ISSN 1872-7603 (Electronic). 0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29028516> >.

GONCALVES-RIZZI, V. H. et al. Maternal hypertension and feto-placental growth restriction is reversed by sildenafil: Evidence of independent effects of circulating nitric oxide levels. **Eur J Pharmacol**, v. 822, p. 119-127, Mar 5 2018. ISSN 1879-0712 (Electronic). 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29355552> >.

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**, v. 57, p. 71-78, Jul 1 2016. ISSN 1089-8611 (Electronic). 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27181106> >.

GOULOPOULOU, S.; DAVIDGE, S. T. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. **Trends Mol Med**, v. 21, n. 2, p. 88-97, Feb 2015. ISSN 1471-499X (Electronic). 1471-4914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541377> >.

GROESCH, K. A. et al. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. **Placenta**, v. 32, n. 12, p. 926-31, Dec 2011. ISSN 1532-3102 (Electronic). 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963217> >.

HEFLER, L. A. et al. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Biol Reprod**, v. 64, n. 2, p. 666-73, Feb 2001. ISSN 0006-3363 (Print). 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159371> >.

HERMIDA, N.; BALLIGAND, J. L. Low-density lipoprotein-cholesterol-induced endothelial dysfunction and oxidative stress: the role of statins. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 8, p. 1216-37, Mar 10 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic). 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924077> >.

HYTTEN, F. Blood volume changes in normal pregnancy. **Clin Haematol**, v. 14, n. 3, p. 601-12, Oct 1985. ISSN 0308-2261 (Print). 0308-2261 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4075604> >.

IANOSI-IRIMIE, M. et al. A rat model of preeclampsia. **Clin Exp Hypertens**, v. 27, n. 8, p. 605-17, Nov 2005. ISSN 1064-1963 (Print). 1064-1963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16303637> >.

IRANI, R. A.; XIA, Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 763-71, Sep 2008. ISSN 0143-4004 (Print). 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687466> >.

JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 12, p. 977-87, Dec 2005. ISSN 1474-1776 (Print). 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341063> >.

JARDIM, L. L. et al. Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? **Clin Chim Acta**, v. 447, p. 34-8, Jul 20 2015. ISSN 1873-3492 (Electronic). 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982781> >.

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, Nov 2018. ISSN 1879-3649 (Electronic). 1537-1891 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29879462> >.

KAO, C. K. et al. Mechanism of vascular dysfunction due to circulating factors in women with pre-eclampsia. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 7, p. 539-49, Apr 1 2016. ISSN 1470-8736 (Electronic). 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733722> >.

KARUMANCHI, S. A. et al. Preeclampsia: a renal perspective. **Kidney Int**, v. 67, n. 6, p. 2101-13, Jun 2005. ISSN 0085-2538 (Print). 0085-2538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882253> >.

KHALIL, R. A.; GRANGER, J. P. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 283, n. 1, p. R29-45, Jul 2002. ISSN 0363-6119 (Print). 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069928> >.

KIM, M. et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. **EMBO Mol Med**, v. 5, n. 9, p. 1415-30, Sep 2013. ISSN 1757-4684 (Electronic). 1757-4676 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853117> >.

KIM, S. Y. et al. Increased sFlt-1 to PlGF ratio in women who subsequently develop preeclampsia. **J Korean Med Sci**, v. 22, n. 5, p. 873-7, Oct 2007. ISSN 1011-8934 (Print). 1011-8934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982238> >.

KOWALSKA, K. et al. Lower levels of Caveolin-1 and higher levels of endothelial nitric oxide synthase are observed in abdominal aortic aneurysm patients treated with simvastatin. **Acta Biochim Pol**, v. 65, n. 1, p. 111-118, 2018. ISSN 1734-154X (Electronic). 0001-527X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29549671> >.

KRAUSS, T.; PAUER, H. U.; AUGUSTIN, H. G. Prospective analysis of placenta growth factor (PlGF) concentrations in the plasma of women with normal pregnancy and pregnancies complicated by preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 23, n. 1, p. 101-11, 2004. ISSN 1064-1955 (Print). 1064-1955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117604> >.

KREATSOULAS, C.; ANAND, S. S. The impact of social determinants on cardiovascular disease. **Can J Cardiol**, v. 26 Suppl C, p. 8C-13C, Aug-Sep 2010. ISSN 1916-7075 (Electronic). 0828-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847985> >.

KULANDAVELU, S. et al. Endothelial NO synthase augments fetoplacental blood flow, placental vascularization, and fetal growth in mice. **Hypertension**, v. 61, n. 1, p. 259-66, Jan 2013. ISSN 1524-4563 (Electronic). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150513> >.

KULVIETIS, V. et al. Transport of nanoparticles through the placental barrier. **Tohoku J Exp Med**, v. 225, n. 4, p. 225-34, Dec 2011. ISSN 1349-3329 (Electronic). 0040-8727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052087> >.

KUMASAWA, K. et al. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 4, p. 1451-5, Jan 25 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic). 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187414> >.

LAMAS, S. et al. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 14, p. 6348-52, Jul 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print). 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378626> >.

LEAL, C. A. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. **Redox Rep**, v. 16, n. 6, p. 230-6, 2011. ISSN 1743-2928 (Electronic). 1351-0002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22195990> >.

LECARPENTIER, E. et al. Statins and pregnancy: between supposed risks and theoretical benefits. **Drugs**, v. 72, n. 6, p. 773-88, Apr 16 2012. ISSN 1179-1950 (Electronic). 0012-6667 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480340> >.

LI, H. et al. Pravastatin Decreases Infarct Size Induced by Coronary Artery Ischemia/Reperfusion with Elevated eNOS Expression in Rats. **Int Heart J**, v. 59, n. 1, p. 154-160, 2018. ISSN 1349-3299 (Electronic). 1349-2365 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29375110> >.

LOPEZ-JARAMILLO, P. et al. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, v. 2, n. 4, p. 261-75, Aug 2008. ISSN 1753-9447

(Print). 1753-9447 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124426> >.

MA, S.; MA, C. C. Recent developments in the effects of nitric oxide-donating statins on cardiovascular disease through regulation of tetrahydrobiopterin and nitric oxide. **Vascul Pharmacol**, v. 63, n. 2, p. 63-70, Nov 2014. ISSN 1879-3649 (Electronic). 1537-1891 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139660> >.

MAY, L. Cardiac Physiology of Pregnancy. **Compr Physiol**, v. 5, n. 3, p. 1325-44, Jul 1 2015. ISSN 2040-4603 (Electronic). 2040-4603 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140720> >.

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**, v. 111, n. 5, p. 649-58, Mar 2003. ISSN 0021-9738 (Print). 0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618519> >.

MCMASTER, M. T.; ZHOU, Y.; FISHER, S. J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. **Semin Nephrol**, v. 24, n. 6, p. 540-7, Nov 2004. ISSN 0270-9295 (Print). 0270-9295 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15529288> >.

MEDA, C. et al. Effects of statins on nitric oxide/cGMP signaling in human umbilical vein endothelial cells. **Pharmacol Rep**, v. 62, n. 1, p. 100-12, Jan-Feb 2010. ISSN 1734-1140 (Print). 1734-1140 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360620> >.

MITCHELL, B. M. et al. Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 12, p. 1297-304, Dec 2007. ISSN 0895-7061 (Print). 0895-7061 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047920> >.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print). 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210> >.

MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, n. 2, p. 271-9, Feb 2007. ISSN 0022-2828 (Print). 0022-2828 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839566> >.

MURPHY, S. R. et al. L-arginine supplementation abolishes the blood pressure and endothelin response to chronic increases in plasma sFlt-1 in pregnant rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 302, n. 2, p. R259-63, Jan 15 2012. ISSN 1522-1490 (Electronic). 0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071155> >.

NELSON, S. H. et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. **Circ Res**, v. 87, n. 5, p. 406-11, Sep 1 2000. ISSN 1524-4571 (Electronic). 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969039> >.

ORMESHER, L. et al. Effects of dietary nitrate supplementation, from beetroot juice, on blood pressure in hypertensive pregnant women: A randomised, double-blind, placebo-controlled feasibility trial. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 37-44, Aug 9 2018. ISSN 1089-8611 (Electronic). 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30099096> >.

OSOL, G.; MOORE, L. G. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Microcirculation**, v. 21, n. 1, p. 38-47, Jan 2014. ISSN 1549-8719 (Electronic). 1073-9688 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23941526> >.

PALMER, R. M. et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 153, n. 3, p. 1251-6, Jun 30 1988. ISSN 0006-291X (Print). 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3390182> >.

PALMER, S. K. et al. Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 80, n. 6, p. 1000-6, Dec 1992. ISSN 0029-7844 (Print). 0029-7844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1448242> >.

PIERINI, D.; BRYAN, N. S. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. **Methods Mol Biol**, v. 1208, p. 63-71, 2015. ISSN 1940-6029 (Electronic). 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323499> >.

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. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Jun 21 2018. ISSN 1440-1681 (Electronic). 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29927503> >.

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**, v. 389, n. 12, p. 1325-1332, Dec 2016. ISSN 1432-1912 (Electronic). 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620880> >.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S.; KHALIL, R. A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. **Adv Pharmacol**, v. 77, p. 361-431, 2016. ISSN 1557-8925 (Electronic). 1054-3589 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27451103> >.

RADI, R. et al. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 11, p. 1451-64, Dec 1 2002. ISSN 0891-5849 (Print). 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446202> >.

RAFIKOV, R. et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **J Endocrinol**, v. 210, n. 3, p. 271-84, Sep 2011. ISSN 1479-6805 (Electronic). 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642378> >.

RAMMA, W.; AHMED, A. Therapeutic potential of statins and the induction of heme oxygenase-1 in preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 101-102, p. 153-160, Mar 2014. ISSN 1872-7603 (Electronic). 0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503248> >.

REDECHA, P. et al. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 4101-9, Apr 23 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic). 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234141> >.

ROBERTS, J. M. Endothelial dysfunction in preeclampsia. **Semin Reprod Endocrinol**, v. 16, n. 1, p. 5-15, 1998. ISSN 0734-8630 (Print). 0734-8630 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9654603> >.

ROGERS, M. S. et al. Oxidative stress in midpregnancy as a predictor of gestational hypertension and pre-eclampsia. **BJOG**, v. 113, n. 9, p. 1053-9, Sep 2006. ISSN 1470-0328 (Print). 1470-0328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956336> >.

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**, v. 21, n. 1, p. 9-23, Jan 2008. ISSN 1476-7058 (Print). 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175241> >.

SAAD, A. F. et al. Effects of pravastatin on angiogenic and placental hypoxic imbalance in a mouse model of preeclampsia. **Reprod Sci**, v. 21, n. 1, p. 138-45, Jan 2014. ISSN 1933-7205 (Electronic). 1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749761> >.

SAN-FRUTOS, L. et al. Hemodynamic changes during pregnancy and postpartum: a prospective study using thoracic electrical bioimpedance. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 24, n. 11, p. 1333-40, Nov 2011. ISSN 1476-4954 (Electronic). 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21338331> >.

SANDRIM, V. C. et al. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 402-7, Aug 2008. ISSN 1524-4563 (Electronic). 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18574068> >.

SEARLE, N. R.; SAHAB, P. Endothelial vasomotor regulation in health and disease. **Can J Anaesth**, v. 39, n. 8, p. 838-57, Oct 1992. ISSN 0832-610X (Print). 0832-610X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1288910> >.

SHAAMASH, A. H. et al. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 68, n. 3, p. 207-14, Mar 2000. ISSN 0020-7292 (Print). 0020-7292 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699190> >.

SHAH, D. A.; KHALIL, R. A. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. **Biochem Pharmacol**, v. 95, n. 4, p. 211-26, Jun 15 2015. ISSN 1873-2968 (Electronic). 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25916268> >.

SIERRA-LAGUADO, J.; GARCIA, R. G.; LOPEZ-JARAMILLO, P. Flow-mediated dilatation of the brachial artery in pregnancy. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 93, n. 1, p. 60-1, Apr 2006. ISSN 0020-7292 (Print). 0020-7292 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16527277> >.

SLADEK, S. M.; MAGNESS, R. R.; CONRAD, K. P. Nitric oxide and pregnancy. **Am J Physiol**, v. 272, n. 2 Pt 2, p. R441-63, Feb 1997. ISSN 0002-9513 (Print). 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124465> >.

SUH, J. W. et al. HMG-CoA reductase inhibitor improves endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats via down-regulation of caveolin-1 and activation of endothelial nitric oxide synthase. **J Korean Med Sci**, v. 25, n. 1, p. 16-23, Jan 2010. ISSN 1598-6357 (Electronic). 1011-8934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20052342> >.

TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 27, n. 6, p. 791-802, Dec 2013. ISSN 1532-1932 (Electronic). 1521-6934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012425> >.

TORGERSEN, K. L.; CURRAN, C. A. A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. **Crit Care Nurs Q**, v. 29, n. 1, p. 2-19, Jan-Mar 2006. ISSN 0887-9303 (Print). 0887-9303 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456359> >.

UZAN, J. et al. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. **Vasc Health Risk Manag**, v. 7, p. 467-74, 2011. ISSN 1178-2048 (Electronic). 1176-6344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822394> >.

VASQUEZ-VIVAR, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 16, p. 9220-5, Aug 4 1998. ISSN 0027-8424 (Print). 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689061> >.

VIOLI, F.; PIGNATELLI, P. Statins as regulators of redox signaling in platelets. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 8, p. 1300-12, Mar 10 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic). 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992095> >.

VRACHNIS, N. et al. Placental growth factor (PlGF): a key to optimizing fetal growth. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 26, n. 10, p. 995-1002, Jul 2013. ISSN 1476-4954 (Electronic). 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330778> >.

WANG, G.; GROSSE, S. D.; SCHOOLEY, M. W. Conducting Research on the Economics of Hypertension to Improve Cardiovascular Health. **Am J Prev Med**, v. 53, n. 6S2, p. S115-S117, Dec 2017. ISSN 1873-2607 (Electronic). 0749-3797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29153111> >.

WANG, L. et al. Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia. **Endocrine**, v. 48, n. 1, p. 299-308, Feb 2015. ISSN 1559-0100 (Electronic). 1355-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840719> >.

WILLIAMS, D. J. et al. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. **Am J Physiol**, v. 272, n. 2 Pt 2, p. H748-52, Feb 1997. ISSN 0002-9513 (Print). 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124434> >.

YANG, M. Y. et al. Pravastatin alleviates lipopolysaccharide-induced placental TLR4 over-activation and promotes uterine arteriole remodeling without impairing rat fetal development. **J Biomed Res**, v. 32, n. 4, p. 288-297, Jul 23 2018. ISSN 1674-8301 (Print). 1674-8301 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30008464> >.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, v. 74, n. 1, p. 139-62, Jan 1994. ISSN 0031-9333 (Print). 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295932> >.

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, n. 3, p. R505-21, Sep 1 2016. ISSN 1522-1490 (Electronic). 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27280428> >.