



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

Priscilla Bianca de Oliveira

Avaliação de respostas vasodilatadoras do sulfeto
de hidrogênio derivado do tecido adiposo
perivascular estimulado com L-Cisteína na
disfunção endotelial induzida por hipertensão na
gravidez em ratas

Botucatu, 2024

Priscilla Bianca de Oliveira

Avaliação de respostas vasodilatadoras do sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adiposo perivascular estimulado com L-Cisteína na disfunção endotelial induzida por hipertensão na gravidez em ratas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Botucatu, 2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Oliveira, Priscilla Bianca de.

Avaliação de respostas vasodilatadoras do sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adiposo perivascular estimulado com L-Cisteína na disfunção endotelial induzida por hipertensão na gravidez em ratas / Priscilla Bianca de Oliveira. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior

Capes: 21001006

1. Endotélio. 2. Hipertensão na gravidez. 3. Sulfeto de hidrogênio. 4. Tecido adiposo.

Palavras-chave: Disfunção endotelial; Gravidez hipertensiva; Sulfeto de hidrogênio; Tecido adiposo perivascular.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação de respostas vasodilatadoras do sulfeto de hidrogênio (H₂S) derivado do tecido adiposo perivascular (PVAT) estimulado com L-cisteína na disfunção endotelial induzida por hipertensão na gravidez em ratas

AUTORA: PRISCILLA BIANCA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: CARLOS ALAN CANDIDO DIAS JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS ALAN CANDIDO DIAS JUNIOR (Participação Presencial)
Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP

Prof^a. Dr^a. MICHELLY CRISTINA MONTENOTE (Participação Presencial)
Departamento de Embriologia / Faculdade de Medicina de Marília (Famema)

Prof. Dr. MARCONE LIMA SOBREIRA (Participação Presencial)
Divisão de Cirurgia Vascular e Endovascular / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI (Participação Presencial)
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Pós-doutoranda PRISCILA REZECK NUNES (Participação Presencial)
Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Botucatu, 06 de fevereiro de 2024

Amanda Regina Sanches
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-graduação
do Instituto de Biociências

Priscilla Bianca de Oliveira

Avaliação de respostas vasodilatadoras do sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adiposo perivascular estimulado com L-Cisteína na disfunção endotelial induzida por hipertensão na gravidez em ratas

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

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior
Departamento de Farmacologia – IBB/UNESP

Profa. Dra. Michelly Cristina Montenote
Departamento de Embriologia–Famema

Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira
Divisão de cirurgia vascular e endovascular–FMB/UNESP

Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Departamento de Microbiologia e Imunologia– UNESP

Profa. Dra. Priscila Rezeck Nunes
Departamento de Biofísica e Farmacologia– UNESP

Botucatu, 06 de fevereiro de 2024

Dedicatória

*Ao meu irmão Yan Kauê Santos Ferreira, eu
sempre vou te amar...*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a espiritualidade por conduzir meus passos nessa caminhada.

Aos meus pais **Milton e Cristina**, se mil vidas eu tiver, em todas quero estar com vocês.

Aos meus filhos **Alexandre e Sophia**, pela paciência, carinho e compreensão nos dias que precisei estar ausente, são tudo por vocês meus amores.

Ao **Silvio Renato**, por me olhar diariamente com carinho além de ser calma nos dias difíceis.

Aos meus **avós, tios e primos**, eu tenho muito orgulho das minhas raízes.

À **Gabriela Palma Zochio** por ser a primeira a me mostrar que meu sonho era possível.

À **Rosa Maria dos Santos Sabatine** por me impulsionar nos momentos de fraqueza.

Ao **Alisson Douglas Ventura Neves** pela amizade e por me encorajar diariamente.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior**, por ser o exemplo de profissional que quero me tornar, pelos ensinamentos, comprometimento e principalmente por ser meu incentivador em absolutamente todas as oportunidades.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, **Malu, Cristal, Léia, Nara**. Desejo todo sucesso do mundo pra vocês.

A todos os **docentes e funcionários** das Cadeiras Básicas da Faculdade de Medicina de Marília, em especial ao **Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies** pelo aprendizado diário que culminou na etapa atual da minha trajetória acadêmica.

Aos **funcionários da Seção de Pós Graduação do IBB**, pela paciência no esclarecimento de dúvidas.

Ao **Instituto de Biociências de Botucatu e aos docentes** que mesmo com as dificuldades ocasionadas pela pandemia, fizeram um trabalho incrível nas disciplinas remotas.

Meu maior respeito a todos os animais utilizados na pesquisa.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”
(Fernando Pessoa)

Prefácio

A tese “Avaliação de respostas vasodilatadoras do sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adiposo perivascular estimulado com L-Cisteína na disfunção endotelial induzida por hipertensão na gravidez em ratas” foi dividida em quatro partes.

A primeira parte refere-se a uma introdução sobre distúrbios hipertensivos gestacionais incluindo características, fisiopatologia, além de abordagem sobre o modelo de hipertensão utilizado na pesquisa e premissas sobre o papel do tecido adiposo perivascular (PVAT) por meio da liberação estimulada de sulfeto de hidrogênio nos distúrbios hipertensivos.

A segunda parte abrange dados do artigo “*Vasodilator Responses of Perivascular Adipose Tissue-Derived Hydrogen Sulfide Stimulated with L-Cysteine in Pregnancy Hypertension-Induced Endothelial Dysfunction in Rats*” publicado na revista “*Antioxidants*” onde é possível observar o envolvimento do H₂S derivado do PVAT estimulado com L-Cisteína na modulação do tônus vascular frente à disfunção endotelial na hipertensão gestacional.

A terceira parte inclui uma breve discussão acerca das descobertas que compuseram o artigo e a quarta parte contempla a conclusão da pesquisa realizada no decorrer do doutorado.

Durante a execução desse projeto, outras atividades foram desenvolvidas em paralelo por meio do meu trabalho no laboratório de farmacologia na Faculdade de Medicina de Marília, no qual sou grata por enriquecer a minha formação acadêmica.

Disciplinas cursadas no programa

Disciplinas	Ano	Período Letivo	Créditos	Carga Horária	Freq	Conceito
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2020	1º semestre	3	45	100	A
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2020	2º semestre	3	45	100	A
Farmacologia de Receptores na Comunicação Celular	2020	2º semestre	4	60	100	A
Tópicos de Biologia e Biotecnologia da Reprodução	2020	2º semestre	2	30	86,7	A
Pré-eclâmpsia: da bancada ao leito	2021	1º semestre	4	60	100	A

Disciplinas aproveitadas

Disciplinas	Ano	Período Letivo	Créditos	Carga Horária	Freq	Conceito
Aspectos Genéticos, Epidemiológicos e Sociais de Envelhecimento	2016	1º semestre	4	60	100	B
Bases da Metodologia de Pesquisa Científica Aplicada à Saúde	2016	1º semestre	6	90	100	B
Cuidado Interdisciplinar ao Indivíduo no Processo de Envelhecimento	2016	1º semestre	4	60	100	B
Metodologias de Ensino-Aprendizagem em Saúde	2016	1º semestre	4	60	100	B
Didática	2016	2º semestre	2	30	100	A
Técnicas Laboratoriais Empregadas na Investigação de Processos Fisiopatológicos Relacionados ao Envelhecimento	2016	2º semestre	4	60	100	A

Artigos publicados durante o doutorado

- **de Oliveira PB**, Zochio GP, Caetano ESP, da Silva MLS, Dias-Junior CA. Vasodilator Responses of Perivascular Adipose Tissue-Derived Hydrogen Sulfide Stimulated with L-Cysteine in Pregnancy Hypertension-Induced Endothelial Dysfunction in Rats. *Antioxidants* (Basel). 2023 Oct 26;12(11):1919. doi: 10.3390/antiox12111919. PMCID: PMC10669374.
- Camargo LF, Pinheiro GD, **Oliveira PB**, Losada DM, Chagas EFB, Sperança MA, Chies AB, Spadella MA, Martins LPA. Influence of galantamine in the inflammatory process and tissular lesions caused by *Trypanosoma cruzi* QM2 strain. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021 Nov 12;54:e0201.
- Oliveira PR, **Oliveira PB**, Rossignoli PS, Spadella MA, Chies AB. Exercise training attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction in the aorta of normotensive but not hypertensive rats. *Exp Physiol*. 2020 Apr;105(4):732-742.
- Pita LM, Spadella MA, Montenote MC, **Oliveira PB**, Chies AB. Repercussions of adjuvant-induced arthritis on body composition, soleus muscle, and heart muscle of rats. *Braz J Med Biol Res*. 2020 Mar 2;53(3):e8969.

Capítulo de livro publicado durante o doutorado

Santos FGE, Spadella MA, Suzuki RB, **Oliveira PB**, Losada DM, ChiesAB, MartinsLPA. Histopatologia e citomorfometria de cardiomiócitos durante a fase aguda da doença de chagas. 1ed. Ponta Grossa: Atena, 2021, v. 1, p. 1-19.

Participação em eventos

- 2º Simpósio Internacional de Imunometabolismo e Exercício—Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2023.
- III Simpósio de Hipertensão-LIACO realizado pela Liga Acadêmica de Cardiologia de Olinda- LIACO em parceria com a Faculdade de Medicina de Olinda (FMO), 2023.
- I Simpósio de Ciência, Inovação e Sociedade: o protagonismo do acadêmico no processo ensino-aprendizagem realizado pela EDUFOR- São Luís, 2023.

- I Congresso Online do Conselho Regional de Farmácia (CRF) do Pará, 2023.
- V Simpósio de Biologia Vascular, 2021.
- XI Simpósio de Ciências Aplicadas da Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP), 2020.

Aulas ministradas em curso de Graduação

- Professora da disciplina de citologia e citopatologia I para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 2º semestre de 2020.
- Professora da disciplina de Ética para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 1º semestre de 2021.
- Professora da disciplina de Eixo Integrador I para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 1º semestre de 2021.
- Professora da disciplina de Parasitologia e Microbiologia para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 1º semestre de 2021.
- Professora da disciplina de Parasitologia Clínica para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 2º semestre de 2021.
- Professora da disciplina de Hematologia para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 2º semestre de 2021.
- Professora da disciplina de Orientação de Estágio I para o curso de Biomedicina na Faculdade de Ensino Superior do Interior Paulista (FAIP) durante o 2º semestre de 2021.

Aula ministrada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas (UNESP)

Título da aula: “Interação do endotélio com o tecido adiposo perivascular na hipertensão gestacional”

Aula ministrada durante a disciplina de Farmacologia do Endotélio Vascular no dia 03 de outubro de 2023.

Lista de abreviaturas e siglas

3-MPST – 3 mercaptopiruvato sulfotransferase
ACh – acetilcolina
Ang-1–angiopoietina -1
Ang-2–angiopoietina -2
CBS – cistationina β - sintase
CSE – cistationina γ - liase
DOCA – desoxicorticosterona
ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
ERNs – espécies reativas de nitrogênio
EROs – espécies reativas de oxigênio
HG – hipertensão gestacional
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
L-Cys – L- Cisteína
L-NAME – Nw-nitro-L-arginina metil éster
mRNA– ácido ribonucleico mensageiro
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
PAG – propargilglicina
PE – pré-eclâmpsia
Phe – fenilefrina
PlGF- fator de crescimento placentário
PLP – piridoxal-5- fosfato
RCF – restrição do crescimento fetal
sEng – endoglin solúvel
sFlt-1 – tirosina quinase solúvel 1
SRAA– sistema renina angiotensina aldosterona
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β 3 – fator de crescimento transformador β 3
UCP-1 – proteína desaclopadora 1
VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular 1
VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

Lista de Figuras

Figura 1.	Anatomia das vilosidades placentárias e fatores sintetizados pelas células placentárias	17
Figura 2.	Diferenças nos níveis de fatores angiogênicos e antiangiogênicos no plasma materno e tecido placentário na pré-eclâmpsia e na restrição de crescimento fetal, comparadas a uma gestação normal	18
Figura 3.	Implicações do tratamento DOCA- Sal no organismo	21
Figura 4.	Características do PVAT relacionadas à sua composição	22
Figura 5.	Classificação do PVAT de acordo com diferentes localizações	23
Figura 6.	Síntese da conclusão obtida com base nos dados adquiridos na pesquisa	77

Sumário

Resumo

Abstract

1. Introdução

1.1	Hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia	15
1.2	Fisiopatologia	16
1.3	Modelo de hipertensão Doca Sal	20
1.4	Tecido adiposo perivascular (PVAT)	21
1.5	H ₂ S, de vilão a um importante vasodilatador	24
1.6	O sinergismo de H ₂ S e NO na modulação do tônus vascular	25

2.	Vasodilator Responses of Perivascular Adipose Tissue-Derived Hydrogen Sulfide Stimulated with L-Cysteine in Pregnancy Hypertension-Induced Endothelial Dysfunction in Rats	28
----	--	----

3.	Discussão	69
----	------------------	----

4.	Conclusão	77
----	------------------	----

	Referências	78
--	--------------------	----

Resumo

A capacidade de atuação na anticontratilidade do sulfeto de hidrogênio (H₂S) derivado do tecido adiposo perivascular (PVAT) em situações fisiológicas é fato, contudo, frente às circunstâncias disfuncionais o H₂S pode ter um comportamento diferente. No intuito de compreender melhor a influência do H₂S sintetizado pelo PVAT nas respostas anticontráteis na hipertensão gestacional (HG), o nosso grupo de pesquisa em trabalho anterior objetivou analisar essas respostas em ratas prenhes normotensas e hipertensas. Conseguimos notar que na gravidez saudável não há distúrbios no PVAT, em contrapartida na HG o PVAT teve seu efeito anticontrátil atenuado e ainda conseguimos demonstrar que o efeito anticontrátil atribuído ao PVAT é dependente dos canais de potássio sensíveis ao ATP, ressaltando que essa é a via utilizada pelo H₂S. Por fim ainda nesse estudo detectamos que ao contrário do endotélio o PVAT é reativo à produção de H₂S na HG e esse fato está correlacionado com instabilidade na angiogênese bem como com a diminuição de crescimento fetal e placentário. Após esse estudo ambicionamos conhecer as respostas vasculares com olhar principalmente voltado ao vasorrelaxamento frente a uma estimulação na síntese sulfeto de hidrogênio derivado do PVAT incluindo ratas virgens para resultados mais consistentes. Dessa forma o propósito desse estudo foi verificar possíveis modificações de respostas vasodilatadoras do H₂S derivado do PVAT na disfunção endotelial induzida pela hipertensão gestacional e, além disso, minuciar a participação do H₂S derivado do PVAT na reatividade vascular ao final da gestação.

Palavras-chave: sulfeto de hidrogênio, tecido adiposo perivascular, gravidez hipertensiva

Abstract

The ability to act on the anticontractility of hydrogen sulfide (H₂S) derived from perivascular adipose tissue (PVAT) in physiological situations is a fact, however, in the face of dysfunctional circumstances; H₂S may have a different behavior. In order to better understand the influence of H₂S synthesized by PVAT on anticontractile responses in gestational hypertension (HG), our research group in previous work aimed to analyze these responses in normotensive and hypertensive pregnant rats. We were able to note that in healthy pregnancy there are no disturbances in PVAT, on the other hand, in HG, PVAT had its anti-contractile effect attenuated and we were also able to demonstrate that the anti-contractile effect attributed to PVAT is dependent on ATP-sensitive potassium channels, highlighting that this is the pathway used by H₂S. Finally, in this study we detected that, unlike the endothelium, PVAT is reactive to the production of H₂S in HG and this fact is correlated with instability in angiogenesis as well as a decrease in fetal and placental growth. After this study, we aim to understand the vascular responses with a focus mainly on vasorelaxation in the face of stimulation of hydrogen sulfide synthesis derived from PVAT, including virgin rats for more consistent results. Therefore, the purpose of this study was to verify possible changes in the vasodilatory responses of H₂S derived from PVAT in endothelial dysfunction induced by gestational hypertension and, in addition, to detail the participation of H₂S derived from PVAT in vascular reactivity at the end of pregnancy.

Key Words: hydrogen sulfide, perivascular adipose tissue, hypertensive pregnancy

1 – Introdução

1.1 - Hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia

Os distúrbios hipertensivos gestacionais são desordens que acometem gestantes em todo o mundo. A hipertensão gestacional (HG) bem como a pré-eclâmpsia (PE), são complicações comuns que podem levar ao aumento da morbimortalidade materna e fetal durante a gravidez e podem afetar a saúde futura da mãe e do filho (HUTCHEON *et al.*, 2011). A HG é determinada por elevação da pressão arterial geralmente partindo de (PAS) > 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) > 90 mmHg, sendo considerada como leve (PAS 140-149 e PAD 90-99 mmHg), moderada (PAS 150-159 e PAD 100-109 mmHg) e grave (PAS $\geq$ 160 e PAD $\geq$ 110 mmHg) (KINTIRAKI *et al.*, 2015). Há complicações para o feto que vão desde uma diminuição no crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer, mas pode também ocasionar prematuridade e morte fetal. O termo HG refere-se à gestante hipertensa que não apresenta outros sintomas clínicos ou proteinúria. A PE é considerada uma desordem sistêmica acompanhada de comprometimento de múltiplos órgãos da gestante como fígado, pulmões, cérebro e rins, distúrbios vasculares com disfunção endotelial maciça e deficiência da manutenção prostanoide endotelial, estresse oxidativo e inflamação (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2013; CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2014).

As causas da HG e PE não são claras, pode-se dizer que são doenças multifatoriais que envolvem entre outros fatores alimentação, estresse, obesidade, hipertensão crônica e diabetes mellitus (STEEGERS *et al.*, 2010). Tais condições parecem ser prenunciadoras do aparecimento futuro de hipertensão essencial além de ser recorrente em outras gestações (PASCOAL, 2002).

1.2 - Fisiopatologia

A fisiopatologia dos distúrbios hipertensivos gestacionais não é absolutamente esclarecida, porém já foi observado que a isquemia útero placentária é um dos fatores cruciais (REDMAN; SARGENT, 2005). Autores já citaram também outros fatores envolvidos como, por exemplo, a inadaptação do sistema imune ao estado gravídico, deficiência na angiogênese, exacerbação da resposta inflamatória, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), disfunção endotelial e estresse oxidativo (GUPTA *et al.*, 2005; REDMAN; SARGENT, 2005; LEVINE *et al.*, 2006; SEDEEK *et al.*, 2008; PALEI *et al.*, 2013).

Para que a gravidez tenha êxito é imprescindível a funcionalidade da placenta, um órgão fetal indispensável que possibilita as trocas entre a mãe e o feto com envio de nutrientes e oxigênio durante a gestação (HAMILTON, 1970). As vilosidades placentárias são os sítios funcionais e são circundadas pela camada sinciciotrofoblástica (externa) que armazena o fator antiangiogênico tirosina quinase solúvel 1 (sFlt-1), a endoglina solúvel (sEng) que age semelhantemente ao sFlt-1 e o fator de crescimento placentário (PlGF) que vai atuar principalmente por volta da 24^a semana de gestação na expansão vascular da placenta para aprimorar a troca de nutrientes, além disso, há uma camada citotrofoblástica (interna) formando assim uma bicamada trofoblástica que envolve o núcleo mesenquimal que abriga macrófagos placentários, células tronco mesenquimais e os vasos sanguíneos do feto (UMAPATHY *et al.* 2019) (Fig. 1).

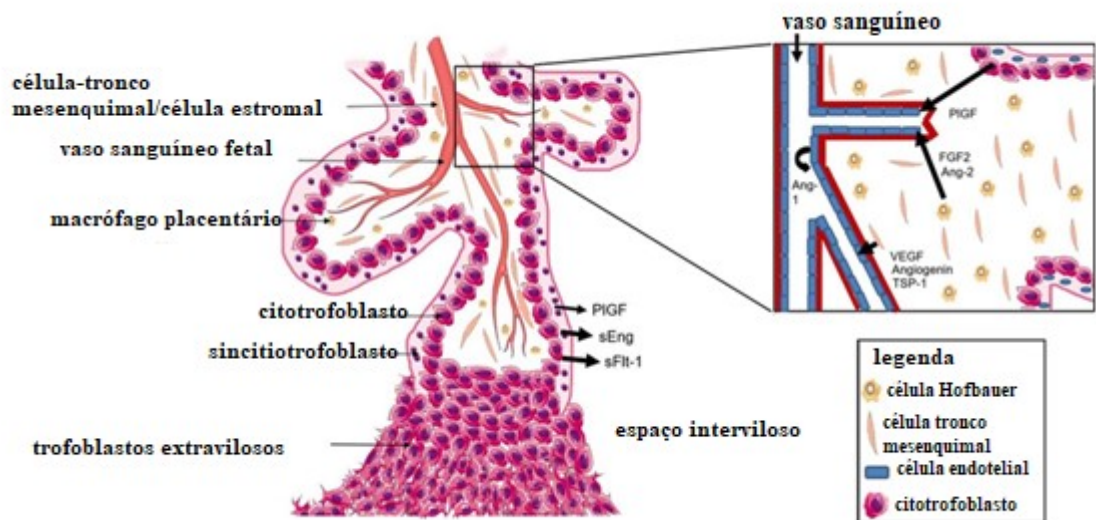


Figura 1. Anatomia das vilosidades placentárias. As vilosidades placentárias são compostas por uma bicamada externa de sincitiotrofoblasto e citotrofoblasto que circunda um núcleo mesenquimal contendo vasos sanguíneos fetais e macrófagos. Diferentes tipos de células da placenta secretam diferentes fatores (VEGF, PIGF, Ang-1, Ang-2, Angiogenina, TSP-1 e FGF2) que atuam na circulação placentária para promover o desenvolvimento dos vasos sanguíneos. (Reproduzido e adaptado de UMAPATHY *et al.* 2019).

A ramificação vascular dentro das vilosidades placentárias é essencial para que haja sucesso no envio tanto de nutrientes quanto de oxigênio para o feto humano, para que essa ramificação seja suficiente é necessário que ocorra dois eventos fundamentais que são a vasculogênese e a angiogênese, processos que são modulados por fatores angiogênicos e antiangiogênicos (CHEN; ZENG, 2014). Tudo se inicia com a ação das células precursoras placentárias, os trofoblastos (LI *et al.*, 2012) os citotrofoblastos rumam até as arteríolas uterinas espiraladas onde se transformam em células com fenótipo endotelial, isso ocorre em torno da 20ª semana de gravidez (PALEI *et al.*, 2013). No transcurso de invasão dessas células, ocorre uma modificação gradativa do endotélio desses vasos e do tecido elástico muscular das artérias e arteríolas.

A remodelação das artérias espirais faz com que elas se dilatam significativamente e culmine em uma elevação significativa no fluxo sanguíneo que é fundamental para o

crescimento do feto (GRANGER *et al.*, 2001), quando isso não acontece pode ser gerado um distúrbio gestacional caracterizado como restrição do crescimento fetal (RCF) onde o peso fetal permanece inferior ao terceiro percentil, tornando a gestação crítica e com alta morbidade e mortalidade do feto (ARROYO *et al.* 2008). É necessário destacar que na gestação saudável há um equilíbrio entre os fatores pró angiogênicos e antiangiogênicos e em distúrbios gestacionais como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal, há um desbalanço desses fatores (Fig. 2).

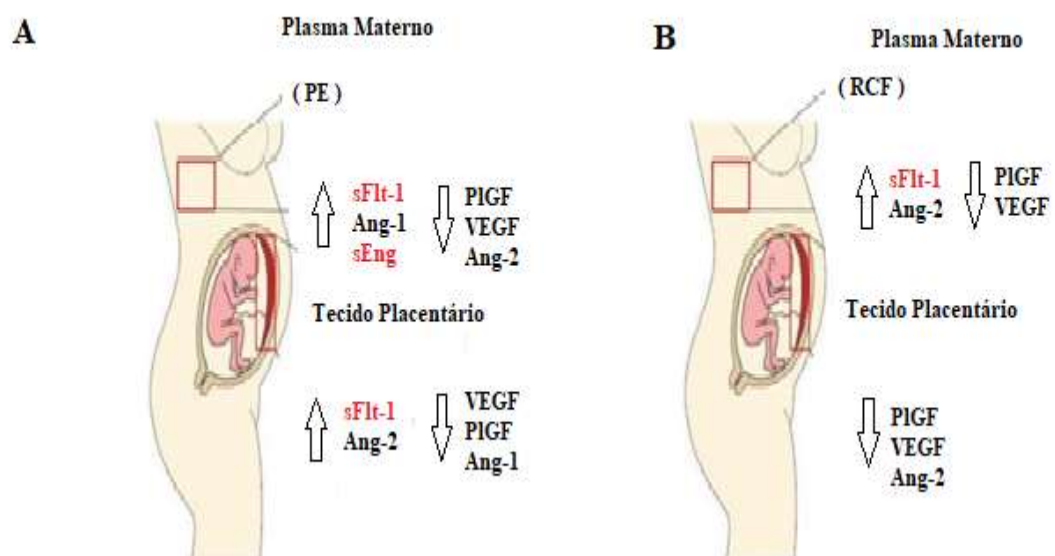


Figura 2. Diferenças nos níveis de fatores angiogênicos e anti- angiogênicos no plasma materno e tecido placentário na pré-eclâmpsia (A) e na restrição de crescimento fetal (B), comparadas à uma gestação normal. (Reproduzido e adaptado de UMAPATHY *et al.* 2019).

Na PE é sugerida uma insuficiência na invasão trofoblástica que leva a um defeito da remodelação vascular, resultando na modificação inconclusa das artérias espirais maternas e, à vista disso, na diminuição da perfusão sanguínea placentária (REEDMAN; SARGENT, 2005; MYATT; WEBSTER, 2008). As mulheres cuja gestação é saudável possuem um maior diâmetro das artérias epiralizadas comparadas às mulheres com PE sendo um processo gradativo, portanto, conforme a gestação pré-eclâmpica progride (GRANGER *et al.*, 2001).

Com a angiogênese afetada ocorrem complicações na diferenciação citotrofoblástica, além disso, ocorre hipóxia placentária gerando a expressão de fatores como o fator de crescimento transformador $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) que impede a diferenciação dos trofoblastos (MAYNARD *et al.*, 2003). A hipóxia aliada a um fluxo sanguíneo irregular podem levar a uma condição de estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A elevação do estresse oxidativo é refletida pela liberação de substâncias que irão mediar a disfunção endotelial, como citocinas pró-inflamatórias e peróxidos lipídicos (SEDEEK *et al.*, 2008).

Já foi demonstrado que a isquemia útero placentária é capaz de elevar os níveis de sFlt-1 (GEORGE *et al.*, 2013) que é um receptor solúvel para o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). O sFlt-1 se une ao VEGF circulante ocupando os sítios que seriam utilizados para a interação com receptores na membrana das células impedindo sua ação que sobretudo faz parte do início da ramificação da rede vascular placentária. O VEGF em sua forma bioativa, ou seja, sem estar ligado ao sFlt-1, possui a capacidade de aumentar células endoteliais além de proporcionar desenvolvimento dos cordões de células endoteliais primitivas, desse modo, o VEGF é considerado um fator angiogênico que atua na modulação do endotélio de estruturas importantíssimas como cérebro, fígado e rins (DI-MARCO *et al.*, 2009), ainda o VEGF atua em conjunto com a angiopoietina 1 (Ang-1) uma proteína secretada pelos pericitos envolvida na vasoproteção e na promoção do crescimento dos vasos por meio da utilização de células endoteliais, tornando a formação da rede vascular placentária satisfatória (WITZENBICHLER *et al.* 1998).

Com o sucesso na formação da rede vascular, outra proteína passa a ser sintetizada que é denominada angiopoietina 2 (Ang-2) e esta vai antagonizar a ação da Ang-1 trabalhando na ramificação dos vasos sanguíneos, inclusive já foi notado que placentas pré-eclâmpicas possuem uma elevação na expressão de mRNA de Ang-2 em comparação com placentas

normais e já foi sugerido que a elevação de Ang-2 na pré-eclâmpsia pode impedir o crescimento dos vasos sanguíneos levando a uma troca ineficaz (KAPPOU *et al.* 2014; LOBOV *et al.* 2002). Em suma, a isquemia placentária aliada à hipóxia sintetiza fatores antiangiogênicos que por um lado é extremamente importante na contenção do desenvolvimento de tumores, mas, por outro lado inibe endogenamente a angiogênese (THISSIER-LEVY *et al.*, 2013) e por sua vez, acaba por dificultar o desenvolvimento das células do endotélio além de impedir que o VEGF desempenhe atividades vasculares e protetoras por não estar em sua forma bioativa (WIKSTROM *et al.*, 2009).

1.3 – Modelo de hipertensão DOCA Sal

O modelo de hipertensão DOCA Sal começou a ser utilizado por pesquisadores na década de 1970, principalmente por propiciar a investigação de hipertensão essencial onde a etiologia não é conhecida, permitindo estabelecer o papel das vias que envolvem o sistema nervoso simpático bem como o sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) (CARRETERO *et al.*, 2000; GUYENET, 2006). Genuinamente esse modelo compreende a administração de desoxicorticosterona (DOCA), uninefrectomia e aumento do consumo de sal (JACOB *et al.*, 2005).

A DOCA é um corticosteroide sintético análogo à aldosterona que desempenha funções mineralocorticoides e glicocorticoides sendo que a ação mineralocorticoide é preponderante, ou seja, sua administração interfere na natremia fazendo que quantidades mais elevadas de sódio e água sejam reabsorvidas culminando em hipervolemia (DRENJANČEVIĆ-PERIC, I *et al.*, 2011). O modelo DOCA Sal como já descrito anteriormente por vários pesquisadores, implica em diversos constituintes neuro-hormonais, imunológicos, cardiovasculares e renais (UENO *et al.*, 1988; MARVAR *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015; BANEK *et al.*, 2016) (Fig. 3). No nosso trabalho não realizamos a uninefrectomia, nos baseamos em um protocolo já utilizado anteriormente, que justifica a não necessidade da

retirada do rim, haja vista que a gestação por si só já acarreta um aumento na retenção de água e sódio (IANOSI-IRIMIE *et al.*, 2005; MITCHELL *et al.*, 2007).

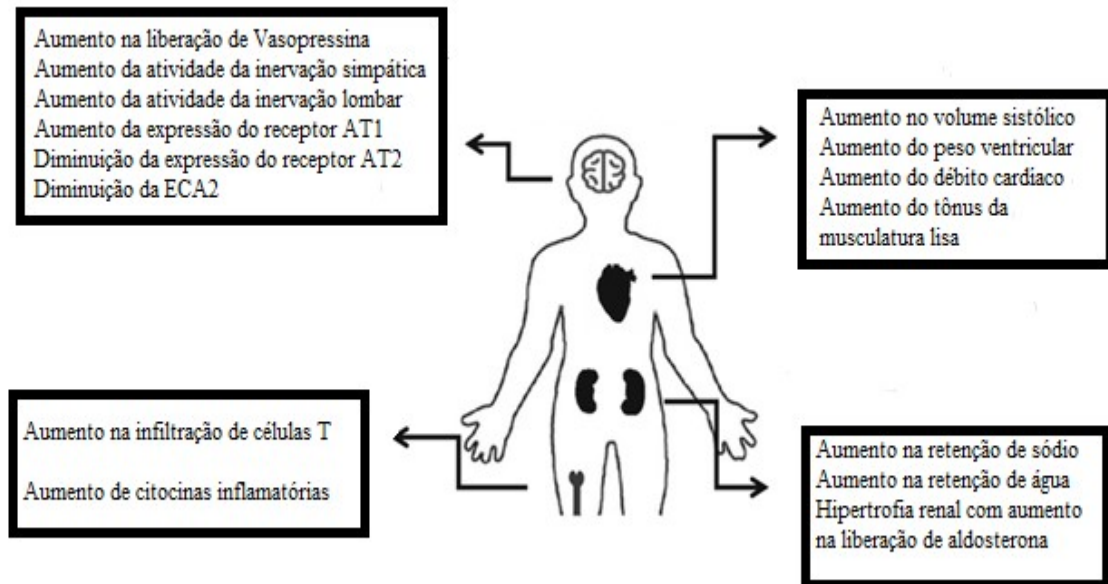


Figura 3. Algumas implicações do tratamento DOCA Sal no organismo (Reproduzido e adaptado de BASTING, T.; LAZARTIGUES, E. 2017).

1.4 – Tecido adiposo perivascular (PVAT)

O tecido adiposo possui em sua constituição vários componentes celulares, entre eles podemos citar os pré-adipócitos, fibras de colágeno, macrófagos, células T, nervos, capilares (BROWN *et al.*, 2014). Por muito tempo foi julgado apenas como um repositório de triglicerídeos, porém ao final da década de 1980 um trabalho demonstrou que o tecido adiposo possuía a capacidade endócrina, ou seja, era capaz de secretar várias substâncias envolvidas no metabolismo sistêmico (COOK *et al.*, 1987). O tecido adiposo geralmente é diferenciado primeiramente de acordo com suas características histológicas e funcionais, sendo muito comum na literatura encontrarmos o tecido adiposo sendo classificado por meio de sua

coloração, a exemplo disso, funções relacionadas ao armazenamento de energia, geralmente são atribuídas ao tecido adiposo branco (WAT, do inglês white adipose tissue) que curiosamente é composto por apenas uma gotícula de triglicerídeo (KWOK *et al.*, 2016), funções relacionadas ao calor e distribuição de energia usualmente são conferidas ao tecido adiposo marrom (BAT, do inglês brown adipose tissue), composto por inúmeras gotículas de gordura e grande quantidade de mitocôndrias em seu interior que expressam a proteína desacopladora-1 (UCP-1, do inglês uncoupling protein-1). Ainda existe o tecido adiposo bege, também denominado como tecido adiposo marrom induzível que contempla características que compõem uma combinação entre os fenótipos branco e marrom (ROSENWALD *et al.*, 2013) (Fig. 4) (CHENG *et al.*, 2023). Além disso, o tecido adiposo é categorizado com relação à sua localização, dessa forma, pode ser catalogado em tecido adiposo visceral, subcutâneo e perivascular.

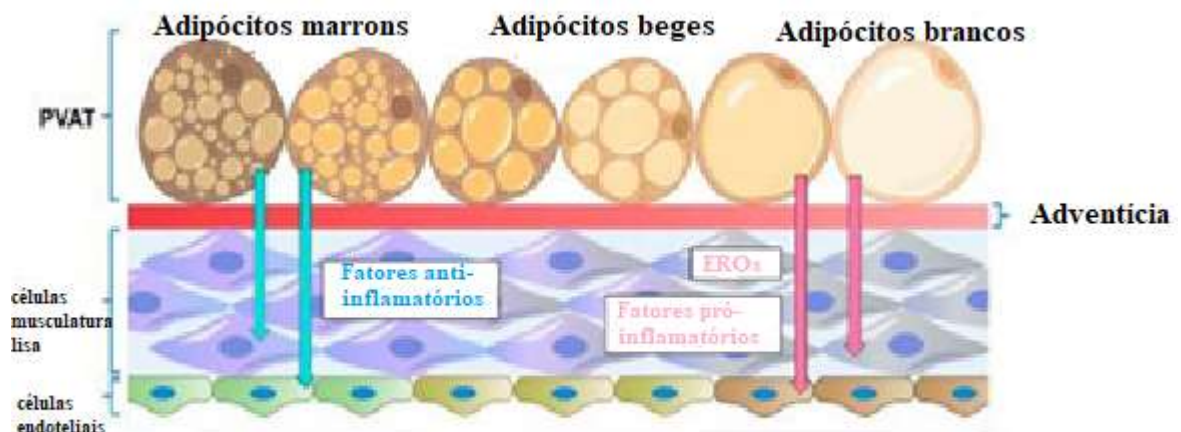


Figura 4. Características funcionais do PVAT de acordo com sua composição de adipócitos brancos, adipócitos beges e adipócitos marrons. (Reproduzido e adaptado de Cheng *et al.*, 2023).

No início da década de 1990 o tecido adiposo que circunda os vasos sanguíneos passou a ser motivo de atenção, foi demonstrado que essa fina camada de gordura denominada tecido adiposo perivascular (PVAT), morfologicamente e funcionalmente se difere dependendo do leito vascular em questão, por exemplo, o PVAT branco envolve a região esplâncnica que inclui a artéria mesentérica e também a artéria femoral e carótida, enquanto o PVAT bege é responsável por envolver a aorta abdominal. O PVAT da aorta torácica é o PVAT marrom, inclusive foi alvo do nosso trabalho, o PVAT marrom possui em seu interior grande quantidade mitocondrial conferindo a ele uma função termogênica frente às temperaturas mais baixas, modulando o tônus vascular por meio de atividades de vasodilatação e vasoconstrição (Fig. 5) (BROWN *et al.*,2014).

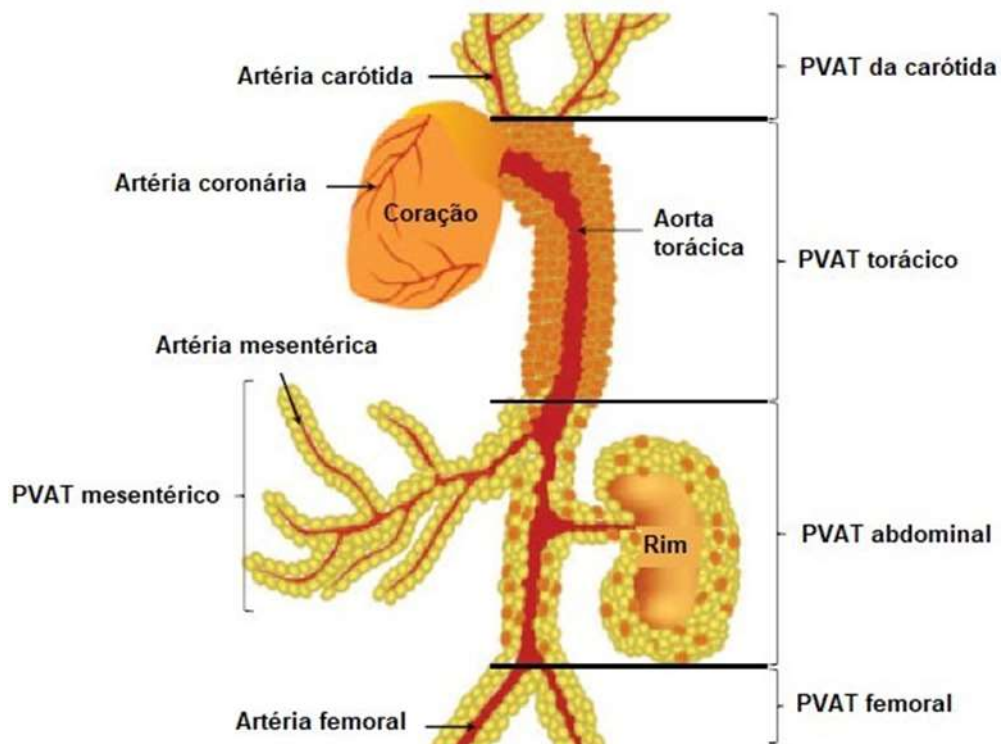


Figura 5. Classificação do PVAT de acordo com diferentes localizações. PVAT marrom envolve a aorta torácica, e o PVAT branco envolve principalmente as artérias mesentéricas, carótida e femoral, enquanto a aorta abdominal é envolvida pelo PVAT bege. (Reproduzido e adaptado de Brown *et al.*, 2014).

1.5 – H₂S, de vilão a um importante vasodilatador

O Sulfeto de hidrogênio (H₂S) por muito tempo foi considerado um gás extremamente tóxico e nocivo, inclusive em 1700 ele foi apontado como o causador de uma intensa e grave inflamação ocular que acometeu trabalhadores de rede de esgotos na Itália (RAMAZZINI, 1700). Em 1803 foi realizado o estudo pioneiro em animais com o intuito de analisar os efeitos de H₂S, neste foi demonstrado efeitos nocivos e letais em cavalos quando administrado diretamente em órgãos como, por exemplo, estômago ou simplesmente absorvido pela pele enquanto o animal estava ao ar livre (CHAUSSIER, 1908.). Desde então o H₂S não parou de ser investigado, com enfoque principalmente na área toxicológica, sendo constatada a sua síntese por bactérias, tecidos de mamíferos e inclusive plantas (GAYON 1877; DU VIGNEAUD *et al.*, 1934; DE CORMIS, 1968). Contudo a pesquisa minuciosa sobre a síntese enzimática só ocorreu na década de 70 com experimentos utilizando homogenatos de fígado de ratos (UBUKA *et al.*, 1977) e em meados de 1980 foram obtidos dados refinados e consistentes relatando as enzimas cistationina-beta-sintase (CBS), cistationina-gama-liase (CSE) e 3-mercaptopiruvato (3-MST) como produtoras de H₂S (KUO; STIPANUK, 1983), no final dessa mesma década um experimento em cérebro de animais sem qualquer exposição prévia observou que havia quantidades significativas de H₂S no tecidos cerebrais de ratos (WARENYCIA *et al.*, 1989), esse trabalho estimulou a realização de outra pesquisa que sugeriu que o H₂S endógeno tem um envolvimento operacional na atividade neuronal (ABE; KIMURA, 1996). Os autores deste trabalho continuaram suas pesquisas e conseguiram dados importantíssimos, pois conseguiram observar as enzimas sintetizadoras de H₂S no tecido vascular e, sobretudo demonstraram um efeito vasodilatador de forma singular ou em parceria com o óxido nítrico (NO), surgindo desse modo um novo gasotransmissor neuronal e cardiovascular (ABE; KIMURA, 1996).

A relevância do H₂S na modulação do tônus cardiovascular e pressão arterial é fato, tal afirmação foi apresentada em pesquisas que observaram a influência dos canais de potássio sensíveis ao ATP na vasodilatação ocasionada pelo H₂S (WANG *et al.*, 2009; WANG 2003), conseguiram inclusive sugerir o H₂S como o terceiro importante gasotransmissor, seguido de NO e monóxido de carbono (CO) (WANG, 2011). Nesse sentido, atualmente o H₂S é amplamente abordado por pesquisadores, e passou a ser de um gás nocivo a um mensageiro biológico que se mostra fundamental para a manutenção do equilíbrio orgânico.

1.6 – O sinergismo entre H₂S derivado do PVAT e NO na modulação do tônus vascular

H₂S e NO são moléculas de suma importância e ambos são considerados gasotransmissores devido ao fato de terem uma função relevante na transdução de sinal celular. As atribuições benéficas do NO na manutenção do tônus cardiovascular, inclusive impossibilitando agregação plaquetária e estimulando o aumento das células musculares lisas já são bem estabelecidas; ocorre que a disfunção endotelial é sabidamente uma característica da hipertensão (SILVA *et al.*, 2016) e frente à uma diminuição da biodisponibilidade de NO, o H₂S seria uma alternativa por desempenhar um papel importante no controle do tônus cardiovascular, podendo desta forma mitigar os efeitos da escassez do NO. Entretanto a atuação sincrônica entre NO e H₂S é discutível, por exemplo, um trabalho que utilizou anéis aórticos de roedores observou que o H₂S poderia impedir a ação da eNOS anulando a produção de NO (KUBO *et al.*, 2007), também já foi demonstrado que quando o H₂S foi banido houve elevação mRNA de iNOS em camundongos (HUA *et al.*, 2013).

Em contrapartida enquanto autores observaram que o NO teria a capacidade de elevar a síntese de H₂S, e, também que o H₂S elevaria o nível de expressão de iNOS por meio da interleucina-1 β (IL-1 β) na vasculatura (ZHAO *et al.*, 2001), outros pesquisadores afirmam que o H₂S inibe a ação vasodilatadora do NO (ALI *et al.*, 2006). Pesquisadores também

conflitam com relação a uma codependência entre NO e H₂S no controle do tônus cardiovascular, a exemplo disso, um trabalho revelou que existe uma relação de dependência mutualística entre eles em se tratando da ação de vasodilatação dependente de endotélio (COLETTA *et al.*, 2012), porém anteriormente já havia sido evidenciado que o H₂S exibiu autonomia, ou seja, exerceu ação vasodilatadora independente de ação endotelial por intermédio de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem das células da musculatura lisa vascular (AL-MAGABLEH *et al.*, 2011).

Interessantemente em 2009, houve um trabalho que pioneiramente observou que o PVAT da aorta de ratos produz H₂S por meio da atuação da enzima CSE através desse substrato L-Cisteína e o cofator piridoxal-5- fosfato (PLP) (FANG *et al.*, 2009). Desde então investigações foram realizadas com o objetivo de estabelecer os efeitos anticontráteis do H₂S derivado do PVAT. Em aortas foi observado o efeito anticontrátil do H₂S derivado do PVAT frente ao desafio a vários vasoconstritores como, por exemplo, a fenilefrina, a angiotensina II e 5-hidroxitriptamina (5-HT) (FANG *ET al.*, 2009). Também foi demonstrado efeitos anticontráteis na região esplâncnica, pois o H₂S derivado do PVAT foi capaz de reduzir a contratilidade em artérias mesentéricas de ratos (SCHLEIFENBAUM *et al.*, 2010).

Acerca de dados tão relevantes, o nosso grupo de pesquisa ficou apeteado em analisar as respostas anticontráteis do H₂S derivado do PVAT frente à disfunção endotelial ocasionado pela hipertensão gestacional e por meio desse trabalho foram obtidos dados extremamente significativos, como por exemplo, foi observado que na gestação saudável não houve distúrbios no PVAT, além disso, na disfunção endotelial induzida pela hipertensão na gravidez, o PVAT teve seu efeito anticontrátil potencializado pela estimulação de H₂S, enquanto o endotélio não apresentou resposta anticontrátil. Ainda nesse trabalho nosso grupo de pesquisa demonstrou que o efeito anticontrátil atribuído ao PVAT foi dependente de canais de potássio sensíveis ao ATP (SOUZA-PAULA *et al.*, 2020).

Após essa pesquisa construímos uma hipótese profundamente pertinente em que hipotetizamos que a estimulação do H₂S derivado do PVAT com o substrato L-Cisteína poderia ter um papel importante nas respostas vasodilatadoras na presença da disfunção endotelial inerente à hipertensão gestacional e a partir dessa hipótese, contruímos os nossos objetivos.

Objetivo geral:

Avaliar as respostas vasodilatadoras do H₂S derivado do PVAT sob disfunção endotelial associada ao estresse oxidativo induzidos pela hipertensão gestacional em ratas.

Objetivo específico:

Caracterizar a participação do H₂S derivado do PVAT na função vascular no final da gestação associada à restrição do crescimento fetal e placentário.

2 - Artigo publicado na revista Antioxidants



Article

Vasodilator Responses of Perivascular Adipose Tissue-Derived Hydrogen Sulfide Stimulated with L-Cysteine in Pregnancy Hypertension-Induced Endothelial Dysfunction in Rats

Priscilla Bianca de Oliveira ^{1,2}, Gabriela Palma Zochio ¹, Edileia Souza Paula Caetano ¹, Maria Luiza Santos da Silva ¹ and Carlos Alan Dias-Junior ^{1,*}

¹ Department of Biophysics and Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-689, SP, Brazil; priscilla.bianca@unesp.br (P.B.d.O.); gabriela.zochio@unesp.br (G.P.Z.); edileia.paula@unesp.br (E.S.P.C.); mls.silva@unesp.br (M.L.S.d.S.)

² Laboratory of Pharmacology, Marília Medical School (FAMEMA), Marília 17519-030, SP, Brazil

* Correspondence: carlos.dias-junior@unesp.br

Vasodilator Responses of Perivascular Adipose Tissue-Derived Hydrogen Sulfide Stimulated with L-Cysteine in Pregnancy Hypertension-Induced Endothelial Dysfunction in Rats

Priscilla Bianca de Oliveira ^{1,2}, Gabriela Palma Zochio ¹, Edileia Souza Paula Caetano ¹, Maria Luiza Santos da Silva ¹ and Carlos Alan Dias-Junior ¹

¹ Department of Biophysics and Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP),

Botucatu 18618-689, SP, Brazil; priscilla.bianca@unesp.br (P.B.d.O.); gabriela.zochio@unesp.br (G.P.Z.); edileia.paula@unesp.br (E.S.P.C.); mls.silva@unesp.br (M.L.S.d.S.)

² Laboratory of Pharmacology, Marília Medical School (FAMEMA), Marília 17519-030, SP, Brazil

* Correspondence: carlos.dias-junior@unesp.br

Abstract

Endothelium-derived nitric oxide (NO)-induced vasodilation is impaired in pregnancy hypertension. However, the role of perivascular adipose tissue (PVAT)-derived hydrogen sulfide (H_2S), as an alternative for counteracting vascular dysfunction, is incompletely clear in hypertensive disorders of pregnancy. Therefore, PVAT-derived H_2S -induced vasodilation was investigated in pregnancy hypertension-induced endothelial dysfunction. Non-pregnant (Non-Preg) and pregnant (Preg) rats were submitted (or not) to the deoxycorticosterone (DOCA)-salt protocol and assigned as follows ($n = 10/\text{group}$): Non-Preg, Non-Preg+DOCA, Preg, and Preg+DOCA groups. Systolic blood pressure (SBP), angiogenesis-related factors, determinant levels of H_2S (PbS), NO (NOx), and oxidative stress (MDA) were assessed. Vascular changes were recorded in thoracic aortas with PVAT and endothelium (intact and removed layers). Vasorelaxation responses to the substrate (L-cysteine) for the H_2S -producing enzyme cystathionine- γ -lyase (CSE) were examined in the absence and presence of CSE-inhibitor DL-propargylglycine (PAG) in thoracic aorta rings pre-incubated with cofactor for CSE (pyridoxal-5 phosphate: PLP) and pre-contracted with phenylephrine. Hypertension was only found in the Preg+DOCA group. Preg+DOCA rats showed angiogenic imbalances and increased levels of MDA. PbS, but not NOx, showed increased levels in the Preg+DOCA group. Pre-incubation with PLP and L-cysteine elevated determinants of H_2S in PVAT and placentas of Preg-DOCA rats, whereas no changes were found in the aortas without PVAT. Aortas of Preg-DOCA rats showed that PVAT-derived H_2S -dependent vasodilation was greater compared to endothelium-derived H_2S , whereas PAG blocked these responses. PVAT-derived H_2S endogenously stimulated with the amino acid L-cysteine may be an alternative to induce vasorelaxation in endothelial dysfunction related to pregnancy hypertension.

Keywords: hydrogen sulfide; perivascular adipose tissue; endothelial dysfunction; pregnancy hypertension

1. Introduction

Strategies that aim to prevent or mitigate hypertensive disorders during pregnancy are being increasingly addressed by researchers; thus, a thin layer of fat that surrounds the important systemic arteries, named perivascular adipose tissue (PVAT), has become the target of all attention [1]. Studies suggest that PVAT may modulate vascular tone through the release of adipocyte-derived relaxing factors (ADRFs) under physiological conditions [2]. PVAT-derived factors have been shown to act as vasoactive agents that promote anticontractile effects [3]. Hence, reductions in vasoconstrictive responses induced by phenylephrine, angiotensin II, and serotonin have been found in systemic arteries with PVAT [4]. In normotensive pregnant rats, it has also been shown that PVAT plays an important role in controlling blood flow [5]. However, it remains unknown whether PVAT-released vasodilator factors are affected by endothelial dysfunction associated pregnancy hypertension. Endothelium-dependent vasodilation is also an essential mechanism for controlling blood pressure in healthy gestation [6]. Thereby, impaired endothelial function has been shown to be an aggravating factor for cardiovascular diseases, including gestational hypertension [7]. Previous evidence suggests that under endothelial dysfunction, the body activates compensatory mechanisms, in which PVAT may be of extreme relevance [8]. PVAT-dependent vasodilation may also involve the action of ADRFs through the activation of potassium channels; thus, it is essential to study molecules that act through this pathway and that are synthesized by PVAT, such as sulfide hydrogen (H_2S) [9]. Importantly, H_2S is produced by the endothelium, smooth muscle, and PVAT [9]. H_2S was considered a gas with harmful effects, but recent studies indicate that H_2S is an important molecule for stabilizing inflammatory processes and oxidative stress [10]. Studies demonstrate that PVAT-derived H_2S plays a crucial role in cardiovascular homeostasis, while other findings have suggested that PVAT-derived H_2S may also act negatively on cardiovascular diseases [11]. Interestingly,

Golas et al. (2022) demonstrated that H₂S synthesized by PVAT and the vascular wall had pro-contractile effects that may contribute to vascular dysfunction in hypertension in male rats [12]. However, the H₂S from the vascular wall has also been shown to have a pro-relaxation effect, suggesting a compensatory mechanism for counteracting the dysfunctional vascular tone [12]. Accordingly, it has been suggested that the H₂S produced by smooth muscle and the endothelium in pathological conditions may continue to exert a role in vascular homeostasis [13,14]. Regarding this, previous findings in male rats have demonstrated that H₂S may be a PVAT-derived ADRF and that H₂S may be involved in the anticontractility presented on the face of stimulation with phenylephrine and serotonin [15,16]. The mechanism by which H₂S exerts a vasodilator function seems to differ according to the anatomic location of the vessel [17,18]. Previous evidence suggests that H₂S is synthesized enzymatically, involving three enzymes: cystathionine beta-synthase (CBS), cystathionine gamma-lyase (CSE), and 3- mercaptopyruvate sulfur transferase (3-MPST) [19]. Earlier studies have demonstrated that CSE-derived H₂S synthesis may be stimulated by its substrate (L-cysteine) and cofactor (pyridoxal 5-phosphate) in the vascular system [20,21]. To demonstrate that H₂S is synthesized by CSE in the PVAT, experimental studies have used an inhibitor of CSE, propargylglycine (PAG), and authors showed that PAG inhibited the anticontractile effects of PVAT, and reductions in the synthesis of H₂S were also found in preadipocytes and adipocytes of rats, further confirming the extreme importance of PVAT-derived H₂S in vasodilation [15,22,23]. However, vasodilatory effects dependent on PVAT induced by H₂S stimulation in pregnancy hypertension-associated endothelial dysfunction warrant further investigation. Recent findings suggest that, in physiological situations, H₂S is elementary in the maintenance of vascular tone and that H₂S may even be conceptualized as an essential ADRF [24]. Moreover, in healthy pregnancy, there are marked transformations in the arrangement of adipose tissue [25] and several other physiological adaptations, including

reductions in systemic vascular resistance [26]. Hence, it is extremely relevant to understand how the PVAT-derived H_2S regulates vascular tonus in gestational hypertension, which is the focus of the present study. We and others have examined the role of PVAT-derived H_2S in anticontractility, and in healthy pregnancy, there were no disturbances in PVAT [1,27]. Moreover, in pregnancy hypertension-induced endothelial dysfunction, the PVAT had its anticontractile effect enhanced by H_2S stimulation, while the endothelium showed no anticontractile response, and the anticontractile effect attributed to PVAT was dependent on ATP-sensitive potassium channels [27]. However, the PVAT-derived H_2S -dependent vasodilation is still unclear in endothelial dysfunction induced by pregnancy hypertension. Therefore, in search of understanding the vascular function focusing on vasorelaxation in the face of stimulation in the synthesis of PVAT-derived H_2S , the objective of this study was to evaluate the vasodilator responses of the PVAT-derived H_2S under endothelial dysfunction induced by gestational hypertension.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA), Institute of Biosciences of Botucatu (IBB), São Paulo State University (CEUA/IBB, protocol number: 1083/2018, June, 2018), which complied with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines and with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. All experiments were carried out and analyzed by blind and trained operators. Age-timed male and female Wistar rats (200–250 g) from our institutional vivarium

were used. Animals were housed in cages on a 12 h light/dark cycle (at 22 ± 2 °C) and had free access to rat chow and drinking water. Female rats (n = 10 per group) were equally randomized and assigned as follows: non-pregnant rats not submitted to the DOCA-salt protocol (Non-Preg group), nonpregnant rats submitted to the DOCA-salt protocol (Non-Preg+DOCA), pregnant rats not submitted to the deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt protocol (Preg group), and pregnant rats submitted to the DOCA-salt protocol (Preg+DOCA group). Female virgin rats were used in the Non-Preg and Non-Preg+DOCA groups. In the Preg and Preg+DOCA groups, each female virgin rat was separately mated overnight. The 1st day of pregnancy was defined as the day on which the spermatozoa were found in a vaginal smear containing anucleated cornified squamous cells. The DOCA-salt protocol consisted of three intraperitoneal (i.p.) injections of DOCA (#D7000; Sigma, St. Louis, MO, USA) and the replacement of drinking water by saline (0.9% NaCl) solution throughout rat pregnancy. Preg+DOCA rats received an i.p. injection of DOCA (12.5 mg/kg) in depot form on the first day of pregnancy and i.p. injections of DOCA (6.25 mg/kg) on the seventh and fourteenth days of pregnancy. Preg rats received i.p. injections of saline on the respective days corresponding to the Preg+DOCA group. Non-Preg+DOCA rats received an i.p. injection of the first dose of DOCA (12.5 mg/kg) and i.p. injections of DOCA (6.25 mg/kg) on the seventh and fourteenth days later. Non-Preg rats received i.p. injections of saline on the respective days corresponding to the Non-Preg+DOCA group. The DOCA-salt protocol induces hypertension in pregnancy in rodents, as previously described [28,29].

2.2. Euthanasia, Blood Sampling, and Fetal and Placental Parameters

Preg and Preg+DOCA rats were weighed and euthanized on the nineteenth day of pregnancy. Non-Preg and Non-Preg+DOCA rats were weighed and euthanized on the nineteenth day after starting the protocol. All animals were euthanized with an isoflurane overdose (5%) followed by exsanguination. After euthanasia, all rats underwent a cesarean section to access

the uterus. Then, the individual weights of fetuses and placentas, and the 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, placenta, and thoracic aorta segments were stored at -80°C until used for biochemical analysis. The thoracic aorta segment was excised and placed in cold Krebs solutions to perform the vascular reactivity experiments.

2.3. Systolic Blood Pressure Measurements

Systolic blood pressure was measured using tail-cuff plethysmography (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, catalog #EFF 306) on the 1st (baseline), 14th, and 19th days of pregnancy in the Preg and Preg+DOCA groups, and on the 1st day of the protocol (baseline) and the 14th and 19th days after starting the protocol in the Non-Preg and NonPreg+DOCA groups. To record systolic blood pressure measurements, conscious rats were first acclimated, for 10 min, in a quiet room, conditioned, and contained in heated boxes (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, catalog #EFF 307). Systolic blood pressure was determined as the mean of cuff inflation–disinflation cycles (three measurements).

2.4. Vascular Reactivity Experiments

The thoracic aorta was dissected and cut into 8 rings of 4 mm in length, totaling 80 aortic rings from each group. Then, we analyzed the vascular function as follows: an aortic ring with intact PVAT and endothelium (+PVAT+E), an aortic ring with intact PVAT and denuded endothelium (+PVAT-E), an aortic ring without PVAT and intact endothelium (-PVAT+E), and an aortic ring without PVAT and endothelium (-PVAT-E). With the aid of a dissection microscope, the surrounding PVAT was carefully dissected and separated from the thoracic aorta. The endothelium was carefully removed by scraping (5 times) the interior of the thoracic aorta around the tip of the forceps. Thoracic aortic rings were placed in a 10 mL organ bath chamber containing KrebsHenseleit nutrient solution (in mmol/L): NaCl 130; KCl

4.7; CaCl₂ 1.6; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃; glucose 11.1; gassed continuously with a mixture of 95% O₂/5% CO₂; and maintained at 37 °C (pH 7.4). The thoracic aorta rings were suspended between two wire hooks. One hook was attached to a fixed support and the other hook was connected to an isometric force transducer. All thoracic aorta rings were stretched until an optimal basal tension of 1.5 g, which was determined by length–tension relationship experiments [30,31]. Then, aortic rings were allowed to equilibrate for 60 min, with the bath physiological solution being changed every 15–20 min. Changes in the tension of thoracic aorta rings were recorded using FORT10 isometric force transducers connected to a PC-based MP100 System and analyzed offline, using AcqKnowledge software (version 3.5.7, Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA). After the equilibration, each thoracic aorta ring was challenged to potassium chloride (KCl; 96 mM) as a test contraction and viability of the tissue. Once a reproducible and maximum KCl contraction was reached, all aortic rings were washed out (3 times) with Krebs–Henseleit solution (10 min intervals each), and the aortic rings returned to the baseline tension. Then, endothelium removal was determined by the absence of acetylcholine (ACh)-induced relaxation in the preparations +PVAT-E and -PVAT-E. PVAT removal was confirmed by the lower concentrations of phenylephrine (Phe) required to achieve the level of contractile tone observed in the thoracic aorta rings with PVAT, which was consistent with the anticontractile effect of PVAT, as previously demonstrated [27]. Each aortic ring was rinsed with Krebs–Henseleit physiological solution 3–5 times (10 min each) to avoid biases possibly caused by the KCl and ACh used. To assess the vasorelaxation induced by PVAT and the endothelium, thoracic aorta rings were pre-contracted with phenylephrine (Phe; 10⁻⁶ M). Once a steady state was reached, a pre-incubation (10 min) with pyridoxal-5 phosphate (PLP; 2 mM) was performed. Then, a concentration–response curve was performed using L-cysteine (L-Cys; 10⁻⁹–10⁻⁴ M). To investigate the involvement of CSE-synthesized H₂S, thoracic aorta rings were pre-contracted

with Phe (10^{-6} M). Once a steady state was reached, a pre-incubation (10min) with PLP (2 mM) in the presence of DL-propargylglycine (PAG; 1 mM) was made. Then, a cumulative concentration curve of L-Cys (10^{-9} – 10^{-4} M) was assessed. To examine the involvement of the endothelium in vasorelaxant responses, the thoracic aorta rings were pre-contracted with Phe (10^{-6} M). Once a plateau state was noticed, a cumulative concentration curve using ACh (10^{-9} – 10^{-4} M) was performed. To assess the contribution of NO synthesized by the NO synthase, thoracic aorta rings were pre-incubated (10 min) with the inhibitor of the NO synthase N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hydrochloride (10^{-4} M). Then, thoracic aorta rings were precontracted with Phe (10^{-6} M). Once a steady state was reached, a cumulative concentration curve using ACh (10^{-9} – 10^{-4} M) was assessed. Anticontractile effects of PVAT and the endothelium were also examined. In this experimental setup, a pre-incubation (10 min) with PLP (2 mM) and L-Cys (10 mM) was performed. Then, a cumulative concentration curve using Phe (10^{-12} – 10^{-4} M) was assessed.

2.5. Determination of Fms-Like Tyrosine Kinase 1 (sFlt-1) and Placental Growth Factor (PlGF) Levels in Plasma

Plasma levels of anti-angiogenic factor sFlt-1 (#ELM-VEGFR1, RayBiotech Inc., Norcross, GA, USA) and angiogenic factor PlGF (#E-EL-R0742, Elabscience Inc, Houston, TX, USA) were determined according to the manufacturer's instructions of the commercial enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits. Plasma levels of sFlt-1 and PlGF were expressed in pg/mL.

2.6. Determination of H₂S in Plasma

Determinants of H₂S levels in plasma were analyzed, as previously described [32,33]. Briefly, plasma samples (75 μ L) were mixed with zinc acetate 1% (250 μ L) and distilled water (425 μ L). In this mixture, 150 μ L (20 mmol/L) of N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate in HCl

(7.2 M) and 150 μL (30 mmol/L) of FeCl_3 in HCl (1.2 M) were added. Then, an incubation (10 min), at room temperature, with trichloroacetic acid 10% (250 μL) was added to remove proteins, and the reaction mixture was centrifuged (15 min) at 12,000 g. The absorbance of the resulting supernatant (200 μL) was read (670 nm) in a spectrophotometer (Synergy 4, BioTek, Winooski, VT, USA) in a 96-well microplate. The concentration of H_2S in the solution was calculated against a calibration curve (3.13–100 μM) of sodium hydrosulfide (NaHS). Determinants of H_2S levels were expressed as $\mu\text{mol/L}$.

2.7. Determination of NO Metabolites in Plasma

NO metabolites were examined with Griess reagents, as previously described [34]. Briefly, plasma (190 μL) was deproteinized by adding zinc acetate (10 μL) solution (300 g/L) and centrifuged (30 min) at 10,000 g (4 °C). In a microplate, 50 μL of plasma supernatant was incubated (3 h) at 37 °C with 50 μL of sulfanilamide (2%, m/v), 50 μL (0.1%, v/v) of N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride—NED), and 100 μL of vanadium chloride III (5%, m/v) solution in a mixer (Eppendorf, Darmstadt, Germany) under agitation and in the absence of light. A calibration curve (1.56–100 $\mu\text{mol/L}$) was piped by incubating prepared nitrite solutions with deionized water and Griess reagents. Absorbance was read at 535 nm in a spectrophotometer (Synergy 4, Biotek, Winooski, VT, USA). Nitrite and nitrate (NO_x) levels were expressed as $\mu\text{mol/L}$.

2.8. Determinants of Oxidative Stress in Plasma

Lipid peroxidation was determined using the measurements of thiobarbituric acid (TBA)–reactive species (TBARS), as previously described [35]. Briefly, TBA reacts with the end product of lipid peroxidation malondialdehyde (MDA), and a colorimetric reaction is produced. This product is read (at 532 nm) in a spectrophotometer (Synergy 4, Biotek, Winooski, VT, USA). Briefly, plasma samples (100 μL) were added in testing tubes containing a reaction mixture of distilled water (100 μL), 50 μL of sodium dodecyl sulfate

All procedures for animal experimentation were approved by the Ethics Committee, Biosciences Institute of Botucatu, State University of Sao Paulo (Protocol #618/2014), which is complied with international guidelines of the European Community for the use of experimental animals.

2.9. Determination of H₂S Levels in PVAT, the Aorta without PVAT, and the Placenta

Determinants of H₂S levels in tissue samples were assessed using the method of lead sulfide (PbS) formation, as previously described [36,37]. The PVAT, the aorta without PVAT, and the placentas were excised, homogenized in cold sterile phosphate buffer saline (PBS), and centrifuged (10 min) at 10,000 g (4 °C). In a microplate, supernatants (0.2 mg/mL protein) diluted with PBS (100 mM, pH 7.4) were mixed with CSE cofactor PLP (2 mM) and substrate L-Cys (10 mM). A filter paper was used to cover the microplate, which was pre-embedded with lead (Pb) acetate (100 mM). Then, the covered microplate was allowed to dry (3 h) at 37 °C. The PbS formed a dark brown precipitate, and dark spots on the filter paper were read by the optical density, analyzed, and quantified using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). To calculate the concentrations, a calibration curve (7.8–500 mM) was generated with the H₂S donor (NaHS). Determinants of H₂S levels in tissue samples were expressed as nmol/mg protein.

2.10. Statistical Analysis

Shapiro–Wilk tests were applied to verify the normality of data distribution, using the GraphPad Prism® (8.0) software (San Diego, CA, USA). Student's t-tests were used, and one-way analysis of variance (ANOVA) and repeated-measure two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests were applied for multiple comparisons. A value of probability (p) < 0.05 was considered statistically significant. The results are expressed as mean ± SEM.

2.11. Drugs and Chemicals

Deoxycorticosterone acetate (DOCA, D7000), L-cysteine (w326305), pyridoxal 5- phosphate (P9255), DL-propargylglycine (P7888), acetylcholine (A6625), L-NAME (N5751), phenylephrine (P6126), and sodium hydrosulfide (NaHS-161527) were used in this study. DOCA was dissolved in propylene glycol (1883), whereas all other compounds were dissolved in distilled water. Propylene glycol was purchased from Dinamica Chemicals (São Paulo, Brazil), and other compounds were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3. Results

3.1. Systolic Blood Pressure Measurements in Non-Pregnant and Pregnant Rats Submied (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

Baseline values showed no differences in the systolic blood pressure measurements, while significant increases were recorded on pregnancy days 14 and 19 of the Preg+DOCAgroup compared to the other groups (Figure 1; Supplementary Table S1).

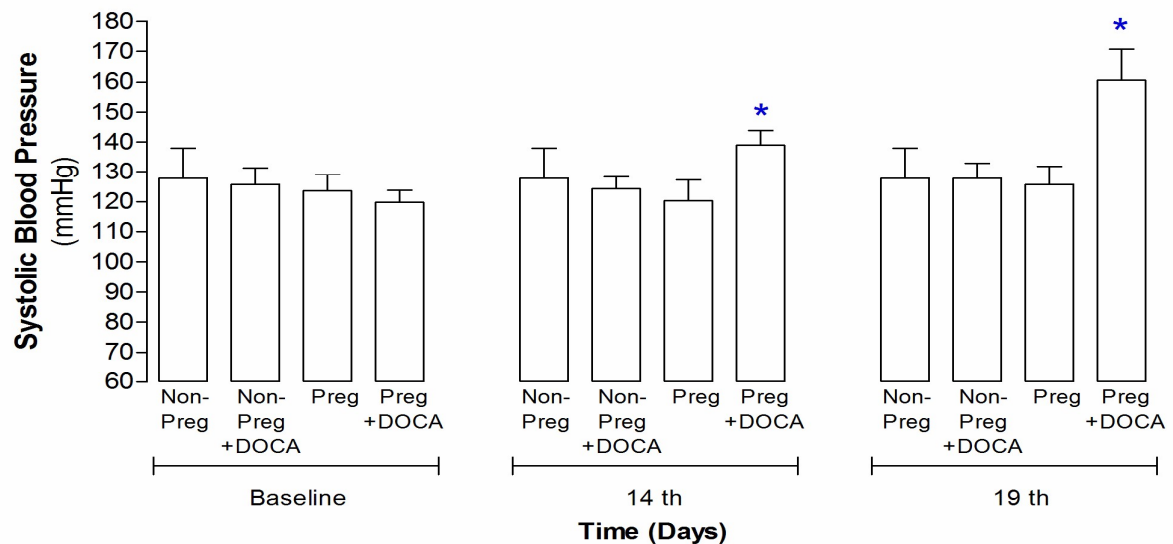


Figure 1. Systolic blood pressure in Non-Preg, Non-Preg+DOCA, Preg, and Preg+DOCA groups. Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) in the Preg+DOCA group versus the respective baseline.

3.2. Placental and Fetal Parameters of Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt

Pregnant rats submitted to the DOCA-salt protocol clearly showed significant reductions in fetal and placental weights and decreased number of pups in the Preg+DOCA group compared to the Preg group (Figure 2; Supplementary Table S2).

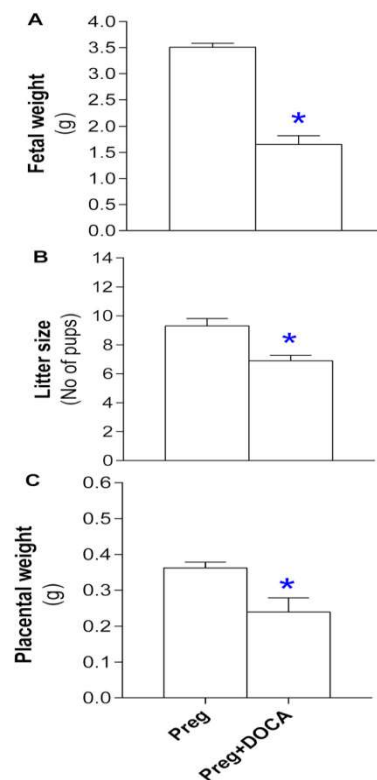


Figure 2. Fetal weight (A), total number of pups (litter size, (B)), and placental weight (C) of the Preg and Preg+DOCA groups. Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus Preg group.

3.3. Angiogenesis Biomarker Levels in Plasma from Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

The sFlt-1/PlGF ratio was calculated and was greater in the Preg+DOCA rats compared to the Preg group (Figure 3A; Supplementary Table S2). Plasma PlGF levels were lower in the Preg+DOCA rats compared to the Preg group, while both non-pregnant groups showed no

PlGF in plasma (Figure 3B; Supplementary Table S2). Plasma sFlt-1 levels were higher in the Preg+DOCA group compared to the Preg group (Figure 3C; Supplementary Table S2).

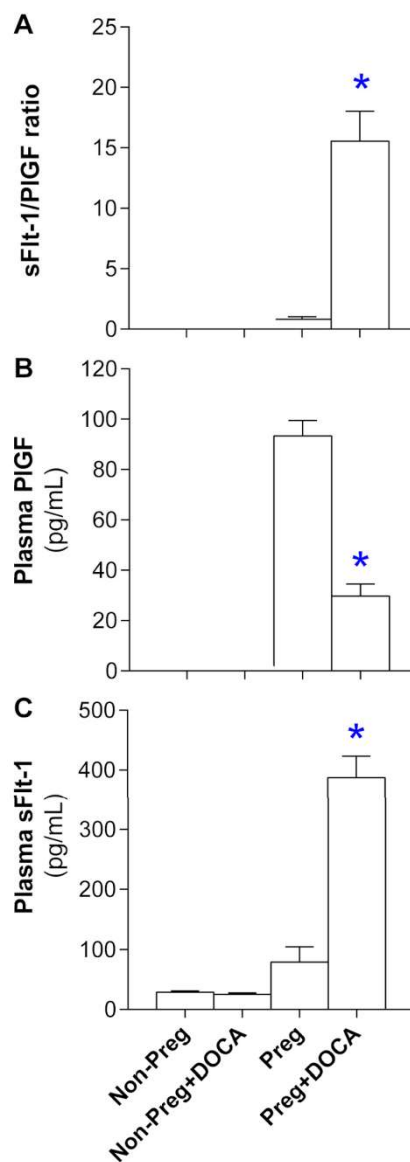


Figure 3. Levels of anti-angiogenic (soluble fms-like tyrosine kinase-1: sFlt-1) and angiogenic (placental growth factor: PlGF) factors in plasma. sFlt-1/PlGF ratio (A), plasma levels of PlGF (B), and sFlt-1 (C) in Non-Preg, Non-Preg+DOCA, Preg, and Preg+DOCA groups. Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus Preg group.

3.4. Plasma Level Determinants of H₂S, NO, and Oxidative Stress in Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

Reductions in plasma level determinants of H₂S were found in the Preg group compared to the non-pregnant groups, and elevated levels were found in the Preg+DOCA group compared to the Preg group (Figure 4A; Supplementary Table S2). Plasma levels of NO metabolites showed a significant increase in the Preg group compared to the others (Figure 4B; Supplementary Table S2). Plasma levels of MDA were higher in both Preg and Preg+DOCA groups compared to the others (Figure 4C; Supplementary Table S2).

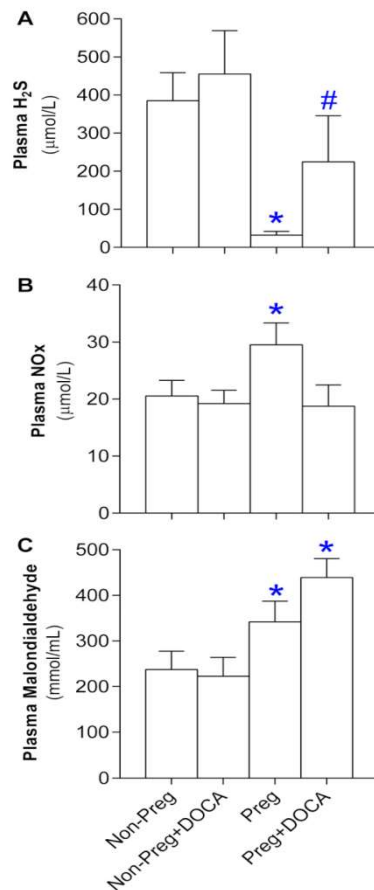


Figure 4. Plasma level determinants of H₂S (A), NO (B), and oxidative stress (C) in Non-Preg, Non-Preg+DOCA, Preg, and Preg+DOCA groups. Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus Non-Preg and Non-Preg+DOCA groups (A); # $p < 0.05$ versus Preg.

3.5. Stimulated H₂S Synthesis in the PVAT, the Aorta without PVAT, and the Placenta

Incubation with PLP and L-cysteine showed increases in the PVAT level determinants of H₂S in the Preg+DOCA group compared to the others (Figure 5A), while no significant differences among all groups were found in the aortas without PVAT (Figure 5B). Increases in placental level determinants of H₂S were found in the Preg+DOCA group compared to the Preg group (Figure 5C).

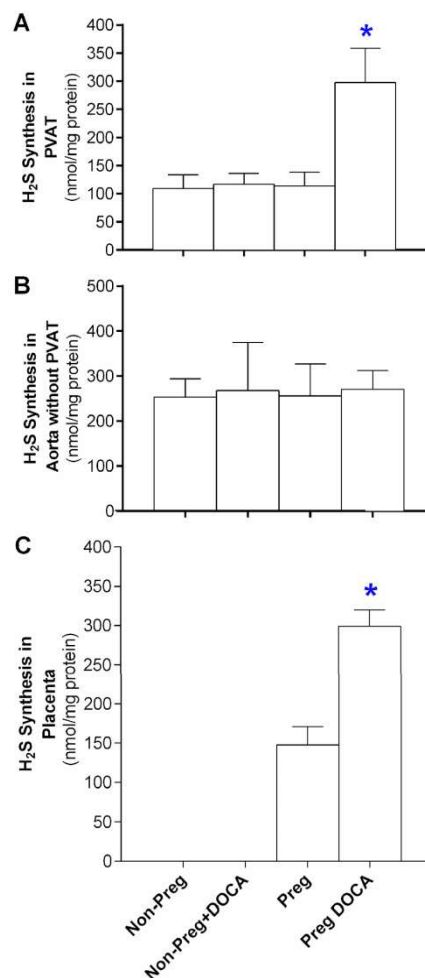


Figure 5. Level determinants of H₂S in PVAT (A) and aorta without PVAT (B) from Non-Preg, Non-Preg+DOCA, Preg, and Preg+DOCA groups. Level determinants of H₂S in the placenta of the Preg and Preg+DOCA groups. Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus other groups (A) and * $p < 0.05$ versus Preg group (C).

3.6. Vasodilation Responses via Endogenous H₂S Stimulation in Aortas with Intact (or Removed) PVAT and/or Endothelium from Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

L-cysteine, the substrate for H₂S synthesis, showed similar concentration-dependent vasodilation responses in aortic rings with PVAT and endothelium, without endothelium, and without PVAT, whereas lower and similar vasorelaxation responses were found in the aortic rings without PVAT and endothelium from the Non-Preg, Non-Preg+DOCA, and Preg groups (Figure 6A–C; Supplementary Table S3).

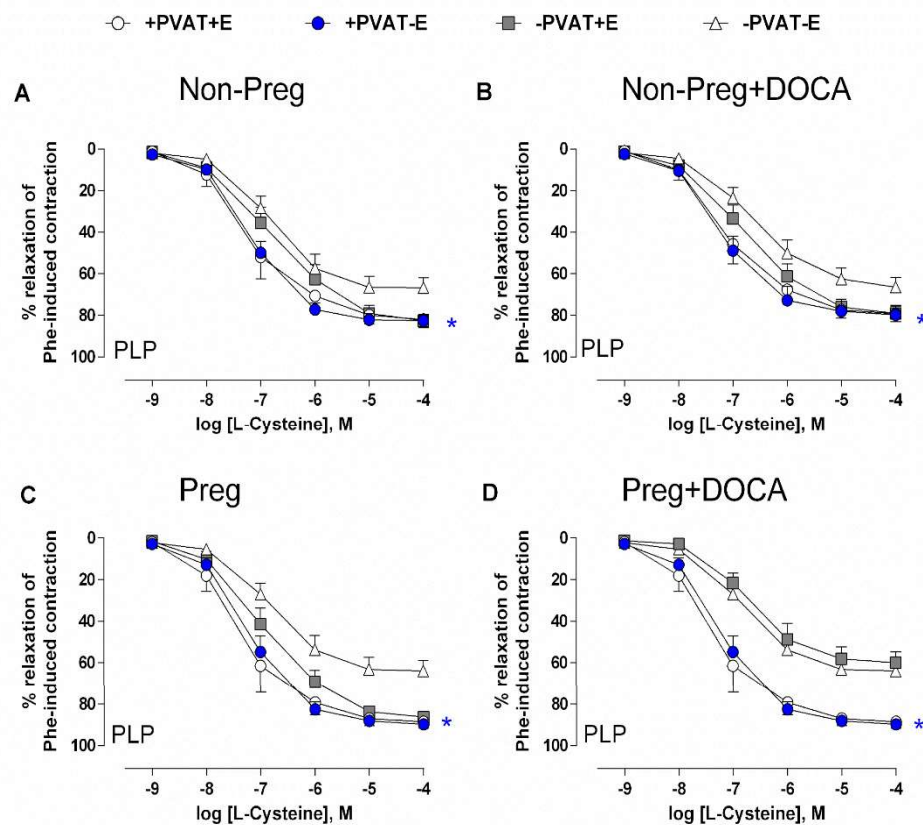


Figure 6. Concentration –dependent vasodilation responses to L –cysteine, after pre –incubation with PLP and pre –contracted with phenylephrine, in thoracic aortic rings with intact PVAT and endothelium (+PVAT+E), intact PVAT and endothelium removed (+PVAT –E), PVAT removed and intact endothelium (–PVAT+E), and both PVAT and endothelium removed (–PVAT –E) from Non–Preg group (A), Non –Preg+DOCA group (B), Preg group (C), and Preg+DOCA group (D). Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus the respective aortic rings –PVAT –E (6A–C); significant differences (* $p < 0.05$) versus the respective aortic rings –PVAT+E and –PVAT –E (Figure 6D).

In aortic rings from the Preg+DOCA group in which PVAT was preserved, L-cysteine-induced vasorelaxation maximal responses were significantly higher compared to the aortas without PVAT in which the endothelium was preserved or removed (Figure 6D; Supplementary Table S3).

3.7. Vascular Responses to L-cysteine in the Presence of H₂S Synthesis Inhibitor in Aortas with Intact (or Removed) PVAT and/or Endothelium from Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

Vasorelaxation responses to L-cysteine in all aortic rings from the Non-Preg, Non-Preg+DOCA, and Preg groups were inhibited in the presence of the CSE inhibitor PAG (Figure 7A–C; Supplementary Table S3). Aortic rings without PVAT and intact endothelium from the Preg-DOCA group showed total blockage of L-cysteine-induced vasorelaxation in the presence of PAG, while the other three preparations of aortic rings with PVAT and endothelium, with PVAT and endothelium removed, and without PVAT and endothelium elicited significant and weaker L-cysteine-induced vasodilation (Figure 7D; Supplementary Table

S3).

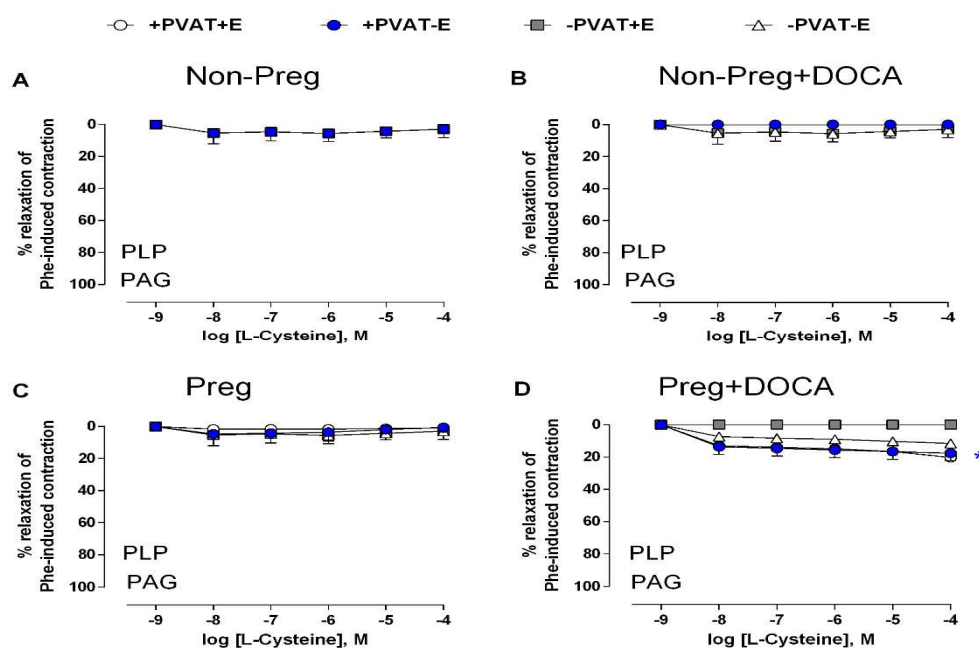


Figure 7. Concentration –dependent responses to L –cysteine, after pre –incubation with PLP and CSE inhibitor (PAG), and pre –contracted with phenylephrine, in thoracic aortic rings with intact PVAT and endothelium (+PVAT+E), intact PVAT and endothelium removed (+PVAT –E), PVAT re- moved and intact endothelium (–PVAT+E), and both PVAT and endothelium removed (–PVAT –E) from Non –Preg group (A), Non –Preg+DOCA group (B), Preg group (C), and Preg+DOCA group (D). Values are means $\pm$ SEM. Symbol (*) indicates significant differences (* $p < 0.05$) for aortic rings +PVAT+E and +PVAT –E versus the respective aortic ring –PVAT+E (Figure 7D).

3.8. Vasodilation Responses via Endogenous NO Stimulation in Aortas with Intact (or Removed) PVAT and/or Endothelium from Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

Acetylcholine was used to activate NO synthase and induce NO-dependent vasorelaxation. Aortic rings with intact endothelium in which PVAT was preserved or removed from Non-Preg, Non-Preg+DOCA, and Preg groups showed similar maximal vasodilation responses (Figure 8A–C; Supplementary Table S3). However, aortic rings with intact PVAT and denuded endothelium showed a total absence of response, which was similar to that observed in aortic rings without PVAT and endothelium (Figure 8A–C; Supplementary Table S3). Aortic rings from the Preg+DOCA group showed that endothelium-dependent maximal responses were significantly impaired in intact endothelium aortas with PVAT and without PVAT, while aortic rings in which the endothelium was removed and PVAT was preserved showed no significant response, which was similar to what was observed in aortic rings without PVAT and endothelium (Figure 8D; Supplementary Table S3).

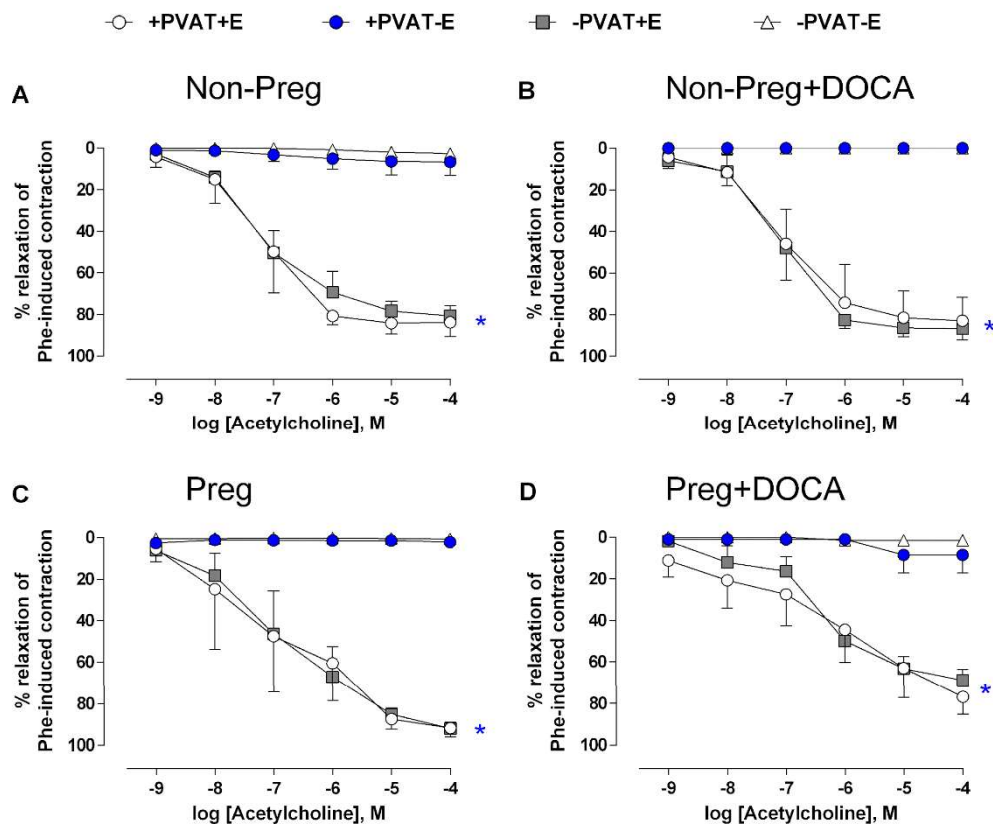


Figure 8. Concentration-dependent vasodilation responses to acetylcholine, after pre-contracted with phenylephrine, in thoracic aortic rings with intact PVAT and endothelium (+PVAT+E), intact PVAT and endothelium removed (+PVAT-E), PVAT removed and intact endothelium (-PVAT+E), and both PVAT and endothelium removed (-PVAT-E) from Non-Preg group (A), Non-Preg+DOCA group (B), Preg group (C), and Preg+DOCA group (D). Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus the respective aortic rings +PVAT-E and -PVAT-E (8A-D).

3.9. Vascular Responses to Acetylcholine in The Presence of NO Synthesis Inhibitor in Aortas with Intact (or Removed) PVAT and/or Endothelium from Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

In the presence of the NO synthase inhibitor L-NAME, acetylcholine-induced responses were not found in aortic rings from the Non-Preg, Non-Preg+DOCA, Preg, and Preg+DOCA groups (Figure 9A-D).

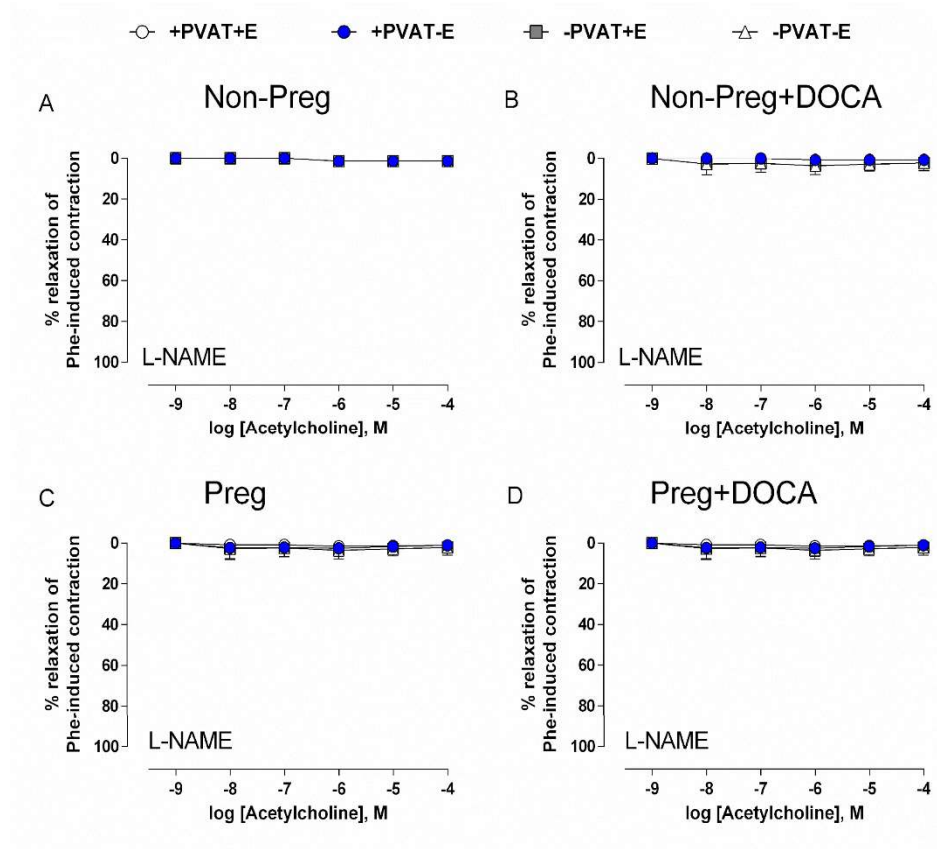


Figure 9. Concentration –dependent vasodilation responses to acetylcholine, after pre –incubation with NO synthase inhibitor (L-NAME) and pre –contracted with phenylephrine, in thoracic aortic rings with intact PVAT and endothelium (+PVAT+E), intact PVAT and endothelium removed (+PVAT –E), PVAT removed and intact endothelium (–PVAT+E), and both PVAT and endothelium removed (–PVAT –E) from Non –Preg group (A), Non –Preg+DOCA group (B), Preg group (C), and Preg+DOCA group (D). Values are means $\pm$ SEM.

3.10. Anticontractile Responses Induced by PVAT and Endothelium in Aortas from Non-Pregnant and Pregnant Rats Submitted (or Not) to the DOCA-Salt Protocol

Pre-incubation with PLP and L-cysteine showed no significant differences in the phenylephrine-induced contractions among all aortic rings with (or without) PVAT and (or)endothelium from the Non-Preg and Non-Preg+DOCA groups (Figure 10A,B; Supplementary Table S3).Aortic rings from the Preg group with intact PVAT and endothelium, intact PVATand denuded endothelium, and PVAT removed and intact endothelium showed lowerphenylephrine-induced maximum responses compared to the aortic rings in which both PVAT and endothelium were removed (Figure 10C; Supplementary Table

S3). However, both aortas in which PVAT was left intact (with endothelium) and denuded endothelium from the Preg+DOCA group showed greater anticontractile responses to phenylephrine compared to the contractions found in the aortic ring preparations in which PVAT was removed, aortas without PVAT and intact endothelium, and aortas without PVAT and denuded endothelium (Figure 10D; Supplementary Table S3).

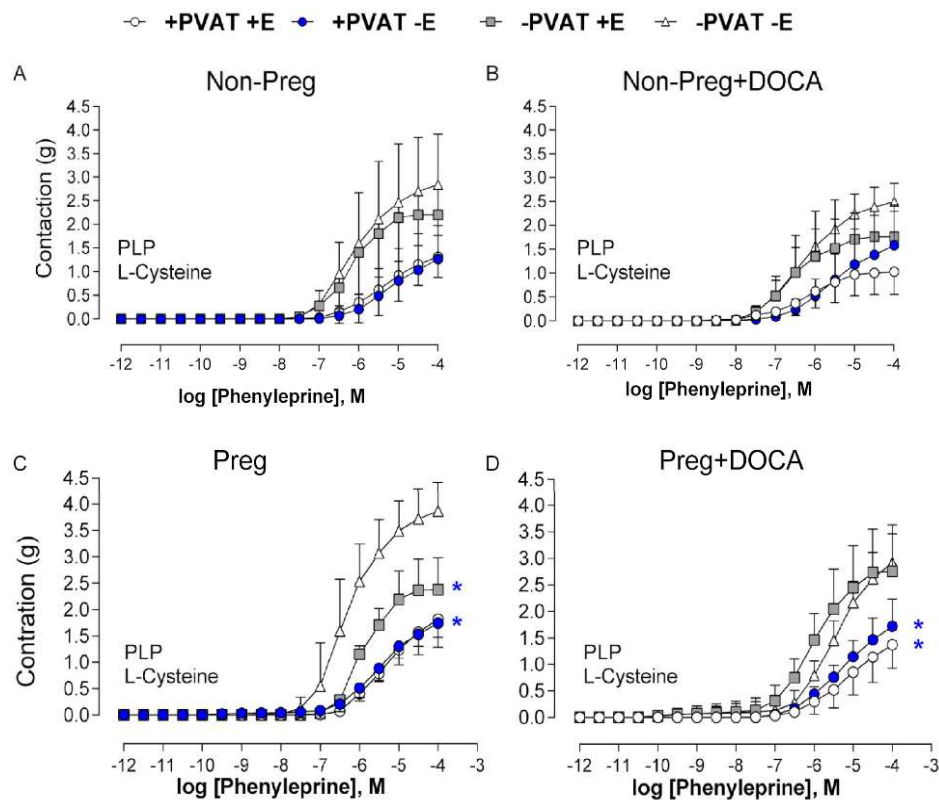


Figure 10. Cumulative concentration responses to phenylephrine after pre-incubation with cofactor (PLP) and substrate (L-cysteine) for H_2S synthesis in thoracic aortic rings with intact PVAT and endothelium (+PVAT+E), intact PVAT and endothelium removed (+PVAT-E), PVAT removed and intact endothelium (-PVAT+E), and both PVAT and endothelium removed (-PVAT-E) from Non-Preg group (A), Non-Preg+DOCA group (B), Preg group (C), and Preg+DOCA group (D). Values are means $\pm$ SEM. Symbols indicate significant differences (* $p < 0.05$) versus the respective response in aortic rings -PVAT-E (C); * $p < 0.05$ versus the respective response in aortic rings -PVAT+E and -PVAT-E (D).

4. Discussion

To induce pregnancy hypertension in the present study, we used the DOCA-salt rat model. The success of the animal model was confirmed by increases in the systolic blood pressure measurements, which were found on the 14th and 19th days of pregnancy in the Preg+DOCA group compared to the respective days and baseline measurements of the other 3 groups. Hence, the present results demonstrate that this rat model resembles human pregnancy hypertension, thereby corroborating previous reports [28,29].

The most severe form of the hypertensive disorder of pregnancy is preeclampsia [7]. Preeclampsia has been associated with maternal angiogenic imbalance as well as restriction of placental and fetal development [7]. Thus, we also examined these parameters in the present study. Then, we found reduced placental and fetal weights and decreased litter size in the Preg+DOCA group compared with the Preg group. Thereby, the pregnancy hypertension rat model demonstrates that both fetal and placental developments are impaired, which are also features of preeclampsia. Moreover, in this pre-eclamptic rat model, sFlt-1 levels were increased, and concomitant decreases in PlGF levels were only found in pregnant rats submitted to the DOCA-salt protocol. Thus, our present findings suggest that this rat model induces an angiogenic imbalance of preeclampsia, as previously reported [28,35,38].

Ex vivo experiments with aortic rings were performed to assess the individual contributions of PVAT and endothelium to the endogenous H₂S-induced vasodilation responses stimulated with L-cysteine. In aortic rings with PVAT left intact of the Preg+DOCA rats, vasorelaxation responses induced by L-cysteine were not affected by pregnancy hypertension, whereas impairments were recorded in aortic rings with preserved endothelium and removed PVAT. Furthermore, aortic rings from Non-Preg, Non-Preg+DOCA, and Preg groups showed smaller vasorelaxation responses only in aortic rings in which both PVAT and endothelium were removed, while other aortic rings with PVAT and/or endothelium left intact the vasodilator

responses were similar. Importantly, there are few studies examining the role of PVAT on vascular function in normotensive pregnancy [1,39] and in hypertensive pregnancy [27], and, to the best of our knowledge, the present study is the first to investigate endogenous H₂S-induced vasodilation responses in pregnancy hypertension.

The present results disagree with the work carried out by Al-Jarallah and Oriowo (2016) in rat aorta, in which it was observed that the aortic PVAT lost its anticontractile function during pregnancy [39]. This discrepancy in the results may be related to the anatomic location of the PVAT as well as changes inherent to pregnancy [40]. However, Mann et al. (2015) found that the PVAT of the mesenteric arteries of pregnant rats showed increases in vasodilator responses [1]. In addition, Watts et al. (2020) demonstrated that the thoracic aorta with PVAT enhanced stress relaxation compared with the respective artery without PVAT [41]. These previous studies are in accordance with our present findings. Interestingly, our results in thoracic aorta rings may also suggest that the PVAT of hypertensive and normotensive pregnant rats was responsible for the maintenance of vasodilation. Also, aortic rings with PVAT left intact showed greater vasodilation compared to aortic rings without PVAT that contained an endothelium and/or muscular layers. Thus, the present findings suggest that PVAT-dependent vasodilation may be enhanced by endogenous H₂S stimulation in pregnancy hypertension, whereas endothelium-derived H₂S-induced vasodilation showed no additional response compared to the aortic rings in which both PVAT and endothelium were removed.

To confirm the involvement of PVAT-derived H₂S, we performed pre-incubation with PAG, a CSE inhibitor, followed by PLP incubation, and we then repeated the cumulative concentration curve for L-cysteine. In this experiment setting, the data demonstrated that there was no relaxation in all preparations of Non-Preg, Non-Preg+DOCA, and Preg groups, thus corroborating the findings reported by Fang et al., (2009) [15]. However, interestingly, in the

preparations from hypertensive pregnant rats (Preg+DOCA group), there was a slight relaxation in the aortic rings, in which both PVAT and endothelium were maintained, whereas the aortic rings without PVAT and intact endothelium showed no relaxation. Thus, these findings suggest that other H₂S-producing enzymes may be activated to cause modest vasorelaxant responses induced by L-cysteine, as previously demonstrated [42,43]. By contrast, previous studies with PVAT also showed pro-contractile effects [44], whereas our data reinforce the importance of PVAT-derived H₂S in maintaining vascular tone in pregnancy hypertension. Hence, our findings suggest that L-cysteine may induce a slight vasorelaxation independently of the H₂S synthesized by CSE in PVAT and vascular smooth muscle layers of aortas from hypertensive pregnant rats, whereas the endothelium showed no response to L-cysteine in the presence of PAG, which suggests that H₂S synthesized by CSE is the major enzyme in the endothelium, whereas H₂S released by PVAT may be synthesized by other enzymes such as CBS [9,43].

As previously demonstrated, metabolic responses to acetylcholine may differ in adipose tissue during pregnancy [45]. Considering that PVAT from non-pregnant or pregnant rats may release substances that distinctively affect acetylcholine metabolism, as previously observed in uterine arteries [46], we then aimed to distinguish the relevance of the roles of PVAT and endothelium in vasodilator responses. To this end, we carried out further experiments to evaluate the acetylcholine-induced responses. We then observed that when the endothelium was preserved in aortic rings without PVAT or with PVAT left intact, there were relaxations with the same magnitude in virgin rats treated (or not) with DOCA-salt (Non-Preg and Non-Preg+DOCA groups). Moreover, the same occurred in the preparations from untreated pregnant rats (Preg group). However, impairments of acetylcholine-induced vasorelaxation responses were found in aortic rings with a preserved endothelium (with or without PVAT) from the Preg+DOCA group, thus confirming that endothelium-derived NO-

dependent vasodilation is impaired in pregnancy hypertension [47]. The present results are in accordance with the endothelial dysfunction previously observed in pregnancy hypertension in rats [27]. Thus, our results confirm that NO-dependent vasodilation is impaired and may be associated with pregnancy hypertension-induced endothelial dysfunction [29,47]. Furthermore, our findings demonstrated that aortic rings in which the endothelium was removed but with PVAT left intact do not respond to acetylcholine. Our results may also be corroborated by a previous study that observed a reduction in the vasodilator response to acetylcholine and that was associated with uncoupling of endothelial NO synthase in aortic PVAT of obese mice compared with controls in which PVAT was left intact [48].

To further examine the endothelium-derived NO-dependent vasodilation on endothelial dysfunction-associated pregnancy hypertension, aortic rings were pre-incubated with L-NAME, a non-selective NO synthase inhibitor. Our results demonstrate that no relaxations were found in the aortic rings of all experimental groups, suggesting that NO-dependent vasodilation was blocked by L-NAME, which is in accordance with previous studies [27,49]. Thus, our findings suggest that NO-induced vasodilation is dependent on the endothelium, while PVAT shows no acetylcholine-induced response.

To further understand the involvement of H₂S and NO in pregnancy hypertension [50], we have analyzed the circulating levels of H₂S and NO in plasma. We observed that there was a decrease in H₂S in pregnant rats compared to virgin rats. However, in hypertensive pregnant rats, we noticed an increase in circulating levels of H₂S compared to normotensive pregnant rats. Moreover, the determination of metabolites of NO in plasma revealed that there was a significant increase in circulating levels of NO in the group of normotensive pregnant rats compared to the other groups, including no increases in the Preg+DOCA group. Hence, the present results suggest that there may be an increased demand for H₂S in the maternal organism, which results in reduced levels of H₂S, whereas the

production of NO is increased in healthy pregnancy. However, in pregnancy hypertension, we found increases in H₂S levels and an absence of elevations in NO levels in comparison with the healthy pregnant group, which is in accordance with a previous clinical report [51]. Also, in this previous study, the authors observed that plasma H₂S increased considerably in preeclampsia compared to the healthy pregnant women group, possibly indicating a compensatory mechanism of the maternal organism in the face of the reduction in NO, which is frequently found in pregnancy hypertension and preeclampsia [52–56].

It is proposed that the decrease in NO bioavailability may be caused, among other factors, by oxidative stress [55,56]. A healthy pregnancy itself is already related to oxidative stress, including several changes in the immune response [57]. The placenta has already been mentioned as one of the main sources of reactive oxygen species (ROS) [57,58]. However, there is previous evidence that further increases in oxidative stress and inflammatory processes occur in gestational hypertension and preeclampsia [59]. Thus, our current results support this concept and demonstrate that increased oxidative stress may be associated with a healthy pregnancy. Also, in the present study, our findings suggest that there may be further elevated levels of plasma malondialdehyde (a biomarker for assessing oxidative stress) in pregnancy hypertension, as previously reported [60,61].

To provide greater robustness to our results, we also measured the stimulated synthesis of H₂S in the aortic PVAT, in the aorta without PVAT, and in the placenta. We noticed that there was a significant increase in H₂S production in the aortic PVAT of the Preg+DOCA group compared to the other groups. Placental H₂S synthesis was also higher in the Preg+DOCA group compared to the Preg group. However, the aorta in which PVAT was removed showed no changes in H₂S synthesis stimulated with PLP and L-cysteine in all groups, thus corroborating results previously found [27].

Additional experiments were conducted to further confirm the participation of PVAT-derived H_2S . Then, the vascular tone was challenged to assess the anticontractile effects of H_2S . Aortic rings were submitted to increasing concentrations of phenylephrine to evaluate the contraction after pre-incubation with PLP and L-cysteine. No significant differences were found in all aortas from the Non-Preg and Non-Preg+DOCA rats, whereas anticontractile effects were observed in aortic rings from the Preg rats in which PVAT and/or endothelium were left intact in comparison with respective aortic rings in which both PVAT and endothelium were removed. However, aortic rings from Preg+DOCA rats showed significant anticontractile responses in aortic rings with both PVAT and endothelium as well as aortic rings with PVAT and denuded endothelium, while loss of anticontractile effect was found in the aortic rings without PVAT and intact endothelium. Then, the present results suggest that in pregnancy hypertension, PVAT-derived H_2S is important for maintaining anticontractile responses, thus contributing to the regulation of vascular tone in endothelial dysfunction.

The present results demonstrate that vasorelaxation response dependent on endothelium-derived NO is impaired in pregnancy hypertension, indicating that a hypertensive pregnant state renders the endothelium less responsive to NO-induced vasodilation, while PVAT-derived H_2S -dependent vasodilation is not affected. Thereby, the present results are in accordance with the features of the pregnancy hypertension-associated endothelial dysfunction, as previously demonstrated [47]. Thus, our findings suggest that PVAT-derived H_2S -dependent vasodilation is preserved in pregnancy hypertension and indicate that hypertensive pregnancy-associated vascular adaptations may have counter-acting mechanisms that involve, in part, the vasodilation response dependent on PVAT. Taken together, our findings demonstrate that the PVAT-related anticontractile effect is not affected by pregnancy hypertension and is enhanced by H_2S stimulation, whereas this response is impaired on the endothelium.

The current findings should be carefully interpreted. Further studies should investigate if the DOCA-salt model of hypertension in pregnant rats could reproduce the morphological changes in the thoracic aorta featured by increases in wall thickness, wall area, and wall-to-lumen ratio, thus suggesting that local changes in the vascular wall occurred in response to increased arterial blood pressure, as previously demonstrated in hypertensive male rats [62–66]. Furthermore, although the present results were demonstrated in the late period of pregnancy in rats, which could resemble the eighth and ninth months of human gestation, further investigation is warranted to examine the role of PVAT-derived H_2S from a clinical perspective, also considering differences in dietary intake, age, and period of the pregnancy in patients.

5. Conclusion

The present study provides evidence that PVAT-derived H_2S -induced vasodilation may be stimulated with L-cysteine, whereas endothelium-derived H_2S -induced vasodilation is impaired by the increased oxidative stress related to pregnancy hypertension associated with angiogenic imbalance and fetal-placental growth restriction. Thus, endogenous PVAT-derived H_2S stimulation with the amino acid L-cysteine may be a clinical alternative to attenuate hypertensive disorders of pregnancy associated with endothelial dysfunction. Further studies are warranted to investigate the potential and beneficial effect of L-cysteine on maternal PVAT in patients with pregnancy hypertension.

6. Author contributions

Conceptualization, P.B.d.O. and C.A.D.-J. ; methodology, P.B.d.O., G.P.Z.,

E.S.P.C. and M.L.S.d.S.; validation, P.B.d.O., G.P.Z. and E.S.P.C.; formal analysis, P.B.d.O., G.P.Z. and E.S.P.C.; investigation, P.B.d.O., G.P.Z. and M.L.S.d.S.; data curation, P.B.d.O. and C.A.D.-J.; visualization, G.P.Z., M.L.S.d.S. and C.A.D.-J.; writing—original draft, P.B.d.O.; writing—review and editing, C.A.D.-J.; supervision, C.A.D.-J.; project administration, C.A.D.-J.; funding acquisition, C.A.D.-J.; resources, C.A.D.-J.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

7. Funding

This study was supported by the Sao Paulo Research Foundation, Brazil (FAPESP—Finance Codes: 2020/03135-8; 2021/08380-3; 2021/12010-7), National Council for Scientific and Technological Development, Brazil (CNPq—Finance codes: 305091/2021-2; 406442/2022-3), and Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior-Brazil (CAPES—Finance Code 001).

8. Institutional Review Board Statement

The study was conducted in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee (protocol number: 1083/2018, June 2018) of the Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University.

9. Informed Consent Statement

Not applicable.

10. Data Availability Statement

Authors declare that all the data supporting the results of the present study are included in the article.

11. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

12. References

1. Mann, S.E.; Maille, N.; Clas, D.; Osol, G. Perivascular adipose tissue: A novel regulator of vascular tone in the rat pregnancy. *Reprod. Sci.* **2015**, *22*, 802–807.
2. Gao, Y.; Lu, C.; Su, L.; Sharma, A.M.; Lee, R.M.K.W. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: The role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 323–331. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707228>.
3. Saxton, S.N.; Clark, B.J.; Withers, S.B.; Eringa, E.C.; Heagerty, A.M. Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1701–1763. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2018>.
4. Löhn, M.; Dubrovskaja, G.; Lauterbach, B.; Luft, F.C.; Gollasch, M.; Sharma, A.M. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.* **2002**, *16*, 1057–1063. <https://doi.org/10.1096/.02-0024com>.
5. Osikoya, O.; Ahmed, H.; Panahi, S.; Bourque, S.L.; Gouloupoulou, S. Uterine perivascular adipose tissue is a novel mediator of uterine artery blood flow and reactivity in rat pregnancy. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 3833–3852. <https://doi.org/10.1113/jp277643>.
6. Zeigler, M.B.; Fay, E.E.; Moreni, S.L.; Mao, J.; Totah, R.A.; Hebert, M.F. Plasma hydrogen sulfide, nitric oxide, and thiocyanate levels are lower during pregnancy compared to postpartum in a cohort of women from the Pacific northwest of the United States. *Life Sci.* **2023**, *322*, 121625. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121625>.
7. Boeldt, D.S.; Bird, I.M. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *J. Endocrinol.* **2017**, *232*, R27–R44. <https://doi.org/10.1530/joe-16-0340>.

8. Baltieri, N.; Guizoni, D.M.; Victorio, J.A.; Davel, A.P. Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterolemic LDL Receptor-Deficient Mice. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 229. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00229>.
9. Beltowski, J.; Jamroz-Wisniewska, A. Hydrogen sulfide in the adipose tissue-physiology, pathology and a target for pharma- cotherapy. *Molecules* **2016**, *22*, 63.
10. Polhemus, D.J.; Calvert, J.W.; Butler, J.; Lefer, D.J. The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarc- tion and heart failure. *Scientifica* **2014**, *2014*, 768607. <https://doi.org/10.1155/2014/768607>.
11. Wang, Y.-Z.; Ngowi, E.E.; Wang, D.; Qi, H.-W.; Jing, M.-R.; Zhang, Y.-X.; Cai, C.-B.; He, Q.-L.; Khattak, S.; Khan, N.H.; et al. The Potential of Hydrogen Sulfide Donors in Treating Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2194. <https://doi.org/10.3390/ijms22042194>.
12. Golas, S.; Berenyiova, A.; Majzunova, M.; Drobna, M.; Tuorkey, M.J.; Cacanyiova, S. The Vasoactive Effect of Perivascular Adi- pose Tissue and Hydrogen Sulfide in Thoracic Aortas of Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Biomolecules* **2022**, *12*, 457. <https://doi.org/10.3390/biom12030457>.
13. Zhao, W.; Zhang, J.; Lu, Y.; Wang, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6008–6016.
14. Mustafa, A.K.; Sikka, G.; Gazi, S.K.; Steppan, J.; Jung, S.M.; Bhunia, A.K.; Barodka, V.M.; Gazi, F.K.; Barrow, R.K.; Wang, R.; et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulAydrites potassium channels. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1259– 1268. <https://doi.org/10.1161/circresaha.111.240242>.

15. Fang, L.; Zhao, J.; Chen, Y.; Ma, T.; Xu, G.; Tang, C.; Liu, X.; Geng, B. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *J. Hypertens.* **2009**, *27*, 2174–2185. <https://doi.org/10.1097/hjh.0b013e328330a900>.
16. Köhn, C.; Schleifenbaum, J.; Szijártó, I.A.; Markó, L.; Dubrovská, G.; Huang, Y.; Gollasch, M. Differential effects of cystathionine- γ -lyase-dependent vasodilatory H₂S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41951.
17. Tang, G.; Yang, G.; Jiang, B.; Ju, Y.; Wu, L.; Wang, R. H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1634–1646.
18. Kanagy, N.L.; Szabo, C.; Papapetropoulos, A. Vascular biology of hydrogen sulfide. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2017**, *312*, C537–C549. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2016>.
19. Cirino, G.; Szabo, C.; Papapetropoulos, A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol. Rev.* **2023**, *103*, 31–276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2021>.
20. Kabil, O.; Vitvitsky, V.; Xie, P.; Banerjee, R. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 363–372. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3781>.
21. Powell, C.R.; Dillon, K.M.; Matson, J.B. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *149*, 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014>.
22. Asimakopoulou, A.; Panopoulos, P.; Chasapis, C.T.; Coletta, C.; Zhou, Z.; Cirino, G.; Giannis, A.; Szabo, C.; Spyroulias, G.A.; Papapetropoulos, A. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 922–932.

23. Feng, X.; Chen, Y.; Zhao, J.; Tang, C.; Jiang, Z.; Geng, B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380*, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.059>.
24. Gheibi, S.; Jeddi, S.; Kashfi, K.; Ghasemi, A. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *149*, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.017>.
25. Selovic, A.; Sarac, J.; Missoni, S. Changes in adipose tissue distribution during pregnancy estimated by ultrasonography. *J. Matern. Neonatal Med.* **2016**, *29*, 2131–2137. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1077220>.
26. Trivett, C.; Lees, Z.J.; Freeman, D.J. Adipose tissue function in healthy pregnancy, gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2021**, *75*, 1745–1756. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00948-9>.
27. Souza-Paula, E.P.D.; Polonio, L.C.P.D.M.; Zochio, G.P.P.; da Silva, K.P.; Kushima, H.; Dias-Junior, C.A.P.D. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue but Not of Endothelium Is Enhanced by Hydrogen Sulfide Stimulation in Hypertensive Pregnant Rat Aortae. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2020**, *76*, 715–729. <https://doi.org/10.1097/c.0000000000000917>.
28. Ianosi-Irimie, M.; Vu, H.V.; Whitbred, J.M.; Pridjian, C.A.; Nadig, J.D.; Williams, M.Y.; Wrenn, D.C.; Pridjian, G.; Puschett, J.B. A rat model of preeclampsia. *Clin. Exp. Hypertens.* **2005**, *27*, 605–617.
29. Mitchell, B.M.; Cook, L.G.; Danchuk, S.; Puschett, J.B. Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2007**, *20*, 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2007.08.007>.

30. Gonzaga, N.A.; Awata, W.M.; Vale, G.T.D.; Marchi, K.C.; Muniz, J.J.; Tanus-Santos, J.E.; Tirapelli, C.R. Perivascular adipose tissue protects against the vascular dysfunction induced by acute ethanol intake: Role of hydrogen peroxide. *Vasc. Pharmacol.* **2018**, *111*, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.08.010>.
31. Tirapelli, C.R.; Al-Khoury, J.; Bkaily, G.; D'Orléans-Juste, P.; Lanchote, V.L.; Uyemura, S.A.; de Oliveira, A.M. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *Experiment* **2006**, *316*, 233–241. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.092999>.
32. Wang, K.; Ahmad, S.; Cai, M.; Rennie, J.; Fujisawa, T.; Crispi, F.; Baily, J.; Miller, M.R.; Cudmore, M.; Hadoke, P.W.; et al. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation* **2013**, *127*, 2514–2522.
33. Zhao, F.; Lei, F.; Zhang, S.; Yan, X.; Wang, W.; Zheng, Y. Hydrogen sulfide alleviates placental injury induced by maternal cigarette smoke exposure during pregnancy in rats. *Nitric Oxide* **2018**, *74*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.07.003>.
34. Toghi, C.J.; Martins, L.Z.; Pacheco, L.L.; Caetano, E.S.P.; Mattos, B.R.; Rizzi, E.; Dias-Junior, C.A. Pravastatin Prevents Increases in Activity of Metalloproteinase-2 and Oxidative Stress, and Enhances Endothelium-Derived Nitric Oxide-Dependent Vasodilation in Gestational Hypertension. *Antioxidants* **2023**, *12*, 939. <https://doi.org/10.3390/antiox12040939>.
35. Chimini, J.S.; Possomato-Vieira, J.S.; da Silva, M.L.S.; Dias-Junior, C.A. 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.* **2019**, *124*, 385–393.

36. Rodrigues, L.; Ekundi-Valentim, E.; Florenzano, J.; Cerqueira, A.; Soares, A.; Schmidt, T.; Santos, K.; Teixeira, S.; Ribela, M.; Rodrigues, S.; et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. *Pharmacol. Res.* **2017**, *115*, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.006>.
37. Uren, J.R.; Ragin, R.; Chaykovsky, M. Modulation of Cysteine Metabolism in Mice—Effects of Propargylglycine and L-Cyst(e)ine-degrading Enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 2807–2814.
38. Perusquía, M.; Hanson, A.E.; Meza, C.M.; Kubli, C.; Herrera, N.; Stallone, J.N. Antihypertensive responses of vasoactive androgens in an in vivo experimental model of preeclampsia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *178*, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.001>.
39. Al-Jarallah, A.; Oriowo, M.A. Loss of Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue on Pregnant Rats: A Potential Role of Tumor Necrosis Factor- α . *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2016**, *67*, 145–151.
40. Osikoya, O.; Cushen, S.C.; Ricci, C.A.; Gouloupoulou, S. Cyclooxygenase-dependent mechanisms mediate in part the anti-dilatory effects of perivascular adipose tissue in uterine arteries from pregnant rats. *Pharmacol. Res.* **2021**, *171*, 105788.
41. Watts, S.W.; Flood, E.D.; Garver, H.; Fink, G.D.; Roccabianca, S. A New Function for Perivascular Adipose Tissue (PVAT): Assistance of Arterial Stress Relaxation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1807. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58368-x>.
42. Donovan, J.; Wong, P.S.; Garle, M.J.; Alexander, S.P.H.; Dunn, W.R.; Ralevic, V. Coronary artery hypoxic vasorelaxation is augmented by perivascular adipose tissue through a mechanism involving hydrogen sulphide and cystathionine- β -synthase. *Acta Physiol.* **2018**, *224*, e13126. <https://doi.org/10.1111/apha.13126>.

43. Hart, J.L. Vasorelaxation elicited by endogenous and exogenous hydrogen sulfide in mouse mesenteric arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2020**, *393*, 551–564. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01752-w>.
44. Ramirez, J.G.; O'Malley, E.J.; Ho, W.S.V. Pro-contractile effects of perivascular fat in health and disease. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 3482–3495. <https://doi.org/10.1111/bph.13767>.
45. Yang, T.-T.; Chang, C.-K.; Tsao, C.-W.; Hsu, Y.-M.; Hsu, C.-T.; Cheng, J.-T. Activation of muscarinic M-3 receptor may decrease glucose uptake and lipolysis in adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* **2009**, *451*, 57–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.12.029>.
46. Kameshima, S.; Yamada, K.; Morita, T.; Okada, M.; Yamawaki, H. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor augments acetylcholine-induced relaxation via the inhibition of acetylcholine esterase activity in rat isolated mesenteric artery. *Acta Physiol.* **2016**, *216*, 203–210. <https://doi.org/10.1111/apha.12563>.
47. Possomato-Vieira, J.S.; Khalil, R.A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv. Pharmacol.* **2016**, *77*, 361–431.
48. Xia, N.; Horke, S.; Habermeier, A.; Closs, E.I.; Reifenberg, G.; Gericke, A.; Mikhed, Y.; Münzel, T.; Daiber, A.; Förstermann, U.; et al. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 78–85. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.115.306263>.
49. Gil-Ortega, M.; Condezo-Hoyos, L.; García-Prieto, C.F.; Arribas, S.M.; González, M.C.; Aranguéz, I.; Ruiz-Gayo, M.; Somoza, B.; Fernández-Alfonso, M.S. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates

- long- term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095312>.
50. Bartha, J.L.; Comino-Delgado, R.; Bedoya, F.J.; Barahona, M.; Lubian, D.; Garcia-Benasach, F. Maternal serum nitric oxide levels associated with biochemical and clinical parameters in hypertension in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **1999**, *82*, 201–207. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(98\)00234-6](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(98)00234-6).
 51. Possomato-Vieira, J.S.; Palei, A.C.; Pinto-Souza, C.C.; Cavalli, R.; Dias-Junior, C.A.; Sandrim, V. Circulating levels of hydrogen sulphide negatively correlate to nitrite levels in gestational hypertensive and preeclamptic pregnant women. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2021**, *48*, 1224–1230. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13534>.
 52. Socha, M.W.; Stankiewicz, M.; Żołnierzewicz, K.; Puk, O.; Wartęga, M. Decrease in Nitric Oxide Production as a Key Mediator in the Pathogenesis of Preeclampsia and a Potential Therapeutic Target: A Case-Control Study. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2653. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102653>.
 53. Tashie, W.; Fondjo, L.A.; Owiredun, W.K.B.A.; Ephraim, R.K.D.; Asare, L.; Adu-Gyamfi, E.A.; Seidu, L. Altered Bioavailability of Nitric Oxide and L-Arginine Is a Key Determinant of Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 3251956. <https://doi.org/10.1155/2020/3251956>.
 54. Sandrim, V.C.; Palei, A.C.; Medger, I.F.; Gomes, V.A.; Cavalli, R.C.; Tanus-Santos, J.E. 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. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.108.115006>.
 55. Palei, A.C.; Granger, J.P.; Spradley, F.T. Placental Ischemia Says “NO” to Proper NOS-Mediated Control of Vascular Tone and Blood Pressure in Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11261. <https://doi.org/10.3390/ijms222011261>.

56. Gouloupoulou, S.; Davidge, S.T. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends Mol. Med.* **2015**, *21*, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.009>.
57. Burton, G.J.; Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2011**, *25*, 287–299.
58. Opichka, M.A.; Rappelt, M.W.; Gutterman, D.D.; Grobe, J.L.; McIntosh, J.J. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Cells* **2021**, *10*, 3055. <https://doi.org/10.3390/cells10113055>.
59. Redman, C.; Sargent, I. Placental stress and pre-eclampsia: A revised view. *Placenta* **2009**, *30*, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.021>.
60. Al-Sheikh, Y.A.; Al-Zahrani, K.Y. The Status of Biochemical and Molecular Markers of Oxidative Stress in Preeclamptic Saudi Patients. *Curr. Mol. Med.* **2018**, *18*, 475–485. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190104105843>.
61. Serdar, Z.; Gür, E.; Develioğlu, O. Serum iron and copper status and oxidative stress in severe and mild preeclampsia. *Cell. Biochem. Funct.* **2006**, *24*, 209–215.
62. Fujita, K.; Matsumura, Y.; Miyazaki, Y.; Takaoka, M.; Morimoto, S. Effects of the endothelin ETA-receptor antagonist FR139317 on development of hypertension and cardiovascular hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **1996**, *70*, 313–320. <https://doi.org/10.1254/jjp.70.313>.
63. Agafonova, I.G.; Kotelnikov, V.N.; Geltser, B.I. Structural and Functional Changes of the Thoracic Aorta in Experimental Arterial Hypertension. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2023**, *174*, 308–311. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05697-2>.
64. Matsumura, Y.; Kita, S.; Morimoto, S.; Akimoto, K.; Furuya, M.; Oka, N.; Tanaka, T. Antihypertensive effect of sesamin. I. Protection against deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiovascular hypertrophy. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1016–1019. <https://doi.org/10.1248/bpb.18.1016>.

65. Piecha, G.; Koleganova, N.; Rid, E.; Müller, A.; Fedorova, O.V.; Bagrov, A.Y.; Lud, D.; Schirmacher, P.; Gross-Weissmann, M.-L. High salt intake causes adverse fetal programming—Vascular effects beyond blood pressure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 3464–3476. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs027>.
66. Uddin, M.N.; McLean, L.B.; Hunter, F.A.; Horvat, D.; Severson, J.; Tharakan, B.; Childs, E.W.; Puschett, J.B. Vascular Leak in a Rat Model of Preeclampsia. *Am. J. Nephrol.* **2009**, *30*, 26–33. <https://doi.org/10.1159/000193220>.

13. Supplementary Material

Table S1. Average maternal systolic blood pressure (mmHg).

Table.	Non-Preg	Non-Preg+DOCA	Preg	Preg+DOCA
Baseline	128±10	126±5	123±5	120±4
14th	128±10	124±4	120±7	139±5*
19th	128±10	128±5	126±6	161±10*

Values are means ± SEM. Symbols indicate significant differences (*P<0.05) in the Preg+DOCA group versus the respective baseline.

Table S2. Average maternal, fetal, placental and biochemical parameters.

Parameters	Non-Preg	Non-Preg+DOCA	Preg	Preg+DOCA
Fetalweight(g)	—	—	3.50± 0.07	1.65± 0.02*
Littersize(numberofpups)	—	—	0.362± 0.01	6.9± 0.37*
Placentalweight(g)	—	—	0.362± 0.01	0.239±0.005*
sFlt-1PIGFratio	—	—	0.82± 0.20	15.56± 2.47*
PlasmasFlt-1(pg/mL)	28.9± 2.0	25.2± 2.5	79.4± 25.4	387.2± 35.9*
PlasmaPIGF(pg/mL)	—	—	93.3± 6.1	29.7± 4.8*
PlasmaH ₂ S(μmol/L)	385.2± 26.07	455.0± 36.1	32.4±3.07*	224.7± 38.3 [#]
PlasmaNOx(μmol/L)	20.5± 1.2	19.20± 0.88	29.5± 2.22*	18.7±1.52
Plasmamalondialdehyde	237.5± 17.9	222.6± 18.4	341.7± 22.8*	439.1± 15.7*

Values are means ± SEM. Symbols indicate significant differences (*P< 0.05) versus Non-Preg group; [#]P < 0.05 versus. Non-Preg and Preg groups.

Table S3. Vascular reactivity measurements.

	+PVAT+E	+PVAT-E	-PVAT+E	-PVAT-E
R_{max} (%)				
L-CysteineNon-Preg	82±5*	82±3*	82±3*	67±5
L-CysteineNon-Preg+DOCA	79±14*	80±14*	79±14*	66±12
L-CysteinePreg	89±3*	90±16*	86±1*	64±5
L-CysteinePreg+DOCA	89±3*	90±1*	60±5	64±5
PAGandL-CysteineNon-Preg	3±3	3 ± 3	3 ± 3	3 ± 3
PAGandL-CysteineNon-Preg+DOCA	0	0	3 ± 3	3 ± 3
PAGandL-CysteinePreg	1±0.2	1 ± 0.6	3 ± 3	3 ± 3
PAGandL-CysteinePreg+DOCA	20±0.3*	18±3*	0	12±0.8*
AcetylcholineNon-Preg	84±3*	7 ± 6	81±5*	3 ± 2
AcetylcholineNon-Preg+DOCA	83±3*	0	87±1*	0
AcetylcholinePreg	92±2*	2 ± 1	92±1*	1 ± 0.3
AcetylcholinePreg+DOCA	77±8*	8 ± 8	69±5*	1 ± 1
PLP+L-CysandPhenyleprineNon-Preg	1±0.2	1 ± 0.3	2	3 ± 0.5
PLP+L-CysandPhenyleprineNon-Preg+DOCA	1±0.2	1 ± 0.4	2 ± 0.2	2 ± 0.2
PLP+L-CysandPhenyleprinePreg	2±0.2	2 ± 0.2	2 ± 0.3	4 ± 0.3
PLP+L-CysteineandPhenyleprinePreg+DOCA	1±0.1	2 ± 0.2	3 ± 0.4	3 ± 0.2
pEC₅₀				
L-CysteineNon-Preg	7±0.2	7 ± 0.1	7 ± 0.2	7 ± 0.1
L-CysteineNon-Preg+DOCA	7±0.1	7 ± 0.2	7 ± 0.2	6 ± 0.2
L-CysteinePreg	7±0.3	7 ± 0.1	7 ± 0.2	5 ± 1
L-CysteinePreg+DOCA	7±0.2	7 ± 0.1	6 ± 0.2	7 ± 0.2
PAGand L-Cysteine Non-Preg	6±1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
PAGand L-Cysteine Non-Preg+DOCA	0	0	6 ± 1	6 ± 1
PAGandL-CysteinePreg	7±2	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
PAGandL-CysteinePreg+DOCA	17 ± 1	14±1	0	20±3
AcetylcholineNon-Preg	7±0.2	5 ± 1	7 ± 0.3	6 ± 0.2
AcetylcholineNon-Preg+DOCA	7±0.1	0	0	7 ± 0.1
AcetylcholinePreg	7±0.3	6	7 ± 0.4	7 ± 0.5
AcetylcholinePreg+DOCA	6±0.6	5	7 ± 0.6	6
PLP+L-Cysteine andPhenyleprineNon-Preg	5±0.3	5 ± 0.3	6 ± 0.3	6 ± 0.3
PLP+L-Cysteine andPhenyleprineNon-Preg+DOCA	6±0.3	5 ± 0.2	6 ± 0.2	6 ± 0.3
PLP+L-Cysteine andPhenyleprinePreg	5±0.1	5 ± 0.1	6 ± 0.1	6 ± 0.1
PLP+L-Cysteine andPhenyleprinePreg+DOCA	5±0.2	5 ± 0.1	6 ± 0.1	5 ± 0.1

Values are means ± SEM. Symbols indicate significant differences (*P<0.05) versus the respective aortic rings
- PVAT-E.

4. Discussão

Cada vez mais os distúrbios hipertensivos gestacionais vêm sendo alvo de pesquisas, dentre eles, a forma mais grave é a pré-eclampsia. No intuito de mimetizar o quadro hipertensivo na gestação utilizamos o modelo DOCA Sal. O sucesso do nosso modelo foi confirmado pela elevação nas aferições de pressão arterial sistólica nos 14º e 19º dias no grupo Preg+DOCA em comparação com as medidas basais nos outros dias nos demais grupos, inclusive nossos dados demonstram que o modelo DOCA Sal ocasiona uma condição semelhante à hipertensão gestacional humana, inclusive corroborando trabalhos anteriores (IANOSI-IRIMIE *et al.*, 2005; MITCHELL *et al.*, 2007).

O desequilíbrio angiogênico materno aliado à restrição do desenvolvimento fetal e placentário fazem parte dessa condição tão preocupante (BOELDT *et al.*, 2017). Nesse sentido, no nosso trabalho examinamos os parâmetros fetais e placentários, e também tivemos o cuidado de analisar fatores angiogênicos e anti-angiogênicos. Os nossos achados por meio desse modelo animal demonstram que o desenvolvimento fetal e placentário está prejudicado na gravidez hipertensiva, o que também é uma particularidade da pré-eclampsia. Igualmente, encontramos elevação nos níveis de sFlt-1, e redução nos níveis de PlGF apenas em ratas grávidas submetidas ao protocolo DOCA Sal. Desse modo, nossos achados sugerem que este modelo de rato induz um desequilíbrio angiogênico de pré-eclâmpsia, como relatado anteriormente (IANOSI-IRIMIE *et al.*, 2005; CHIMINI *et al.*, 2019; PERUSQUIA *et al.*, 2018).

Realizamos experimentos de reatividade vascular com anéis aórticos no intuito de avaliar as contribuições individuais de PVAT e endotélio para as respostas de vasodilatação induzidas por H₂S endógeno e estimuladas com L-Cisteína. Nos anéis aórticos com PVAT intacto das ratas Preg+DOCA, as respostas de vasorrelaxamento induzidas pela L-Cisteína não foram afetadas pela hipertensão na gravidez, enquanto comprometimentos foram

registrados em anéis aórticos com endotélio preservado e PVAT removido. Além disso, os anéis aórticos dos grupos Non-Preg, Non-Preg+DOCA e Preg apresentaram menores respostas de vasorrelaxamento apenas nos anéis aórticos nos quais tanto o PVAT quanto o endotélio foram removidos, enquanto outros anéis aórticos com PVAT e/ou endotélio deixaram intactas as respostas vasodilatadoras eram semelhantes. É importante ressaltar que existem poucos estudos que examinam o papel do PVAT na função vascular na gravidez normotensa (MANN *et al.*, 2015; AL-JARALLAH *et al.*, 2016) e na gravidez hipertensa (SOUZA-PAULA *et al.*, 2020) e, até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a investigar o H₂S endógeno respostas de vasodilatação induzidas na hipertensão da gravidez.

Os presentes resultados discordam do trabalho realizado por Al- Jarallah e Oriowo (2016) em aorta de ratos, no qual foi observado que o PVAT aórtico perdeu sua função anticontrátil durante a gravidez (AL-JARALLAH *et al.*, 2016). Essa discrepância nos resultados pode estar relacionada à localização anatômica do PVAT, bem como às alterações inerentes à gravidez (OSIKOYA *et al.*, 2021). No entanto, Mann *et al.* (2015) descobriram que o PVAT das artérias mesentéricas de ratas grávidas obtiveram aumento nas respostas vasodilatadoras. Além disso, Watts *et al.* (2020) demonstraram que a aorta torácica com PVAT tiveram um melhor relaxamento em comparação com a respectiva artéria sem PVAT. Estes estudos anteriores estão de acordo com as nossas descobertas atuais. Curiosamente, nossos resultados em anéis de aorta torácica também podem sugerir que o PVAT de ratas gestantes hipertensas e normotensas foi responsável pela manutenção da vasodilatação. Além disso, os anéis aórticos com PVAT deixados intactos apresentaram maior vasodilatação em comparação aos anéis aórticos sem PVAT que continham endotélio e/ou camadas musculares. Assim, os presentes achados sugerem que a vasodilatação dependente do PVAT pode ser aumentada pela estimulação endógena de H₂S na hipertensão da gravidez, enquanto a vasodilatação induzida por H₂S derivada do endotélio não mostrou resposta adicional em

comparação com os anéis aórticos nos quais tanto o PVAT quanto o endotélio foram removidos.

Para confirmar o envolvimento do H₂S derivado do PVAT, realizamos pré-incubação com PAG, um inibidor de CSE, seguida de incubação com PLP, e então repetimos a curva de concentração cumulativa para L-Cisteína. Neste cenário de experimento, os dados demonstraram que não houve relaxamento em todas as preparações dos grupos Non- Preg, Non- Preg+DOCA e Preg, corroborando assim os achados relatados por Fang *et al.* (2009). Porém, curiosamente, nas preparações de ratas prenhes hipertensas (grupo Preg+DOCA), houve um leve relaxamento nos anéis aórticos, nos quais tanto o PVAT quanto o endotélio foram mantidos, enquanto os anéis aórticos sem PVAT e endotélio intacto não apresentaram relaxamento. Assim, estes resultados sugerem que outras enzimas produtoras de H₂S podem ser ativadas e causar respostas vasorrelaxantes tênues induzidas pela L-Cisteína, como demonstrado anteriormente (DONOVAN *et al.*, 2018; HART, 2020).

Por outro lado, estudos anteriores com PVAT também mostraram efeitos pró-contráteis (RAMIREZ *et al.*, 2017), enquanto nossos dados reforçam a importância do H₂S derivado do PVAT na manutenção do tônus vascular na hipertensão da gravidez. Contudo, nossos achados sugerem que a L-Cisteína pode induzir um leve vasorrelaxamento independentemente do H₂S sintetizado por CSE no PVAT e nas camadas de músculo liso vascular das aortas de ratas grávidas hipertensas, enquanto o endotélio não mostrou resposta à L-Cisteína na presença de PAG, o que sugere que a CSE é a principal sintetizadora de H₂S no endotélio, enquanto o H₂S liberado pelo PVAT pode ser sintetizado por outras enzimas, como a CBS (BELTOWSKI; JAMROZ-WINIEWSKA, 2016; HART, 2020).

Como já observado anteriormente, as respostas metabólicas à acetilcolina podem diferir no tecido adiposo durante a gravidez (YANG *et al.*, 2009). Considerando que o PVAT de ratas não grávidas ou grávidas pode liberar substâncias que afetam distintamente o

metabolismo da acetilcolina, como observado anteriormente nas artérias uterinas (KAMESHIMA *et al.*, 2016), nosso objetivo então foi distinguir a relevância dos papéis do PVAT e do endotélio nas respostas vasodilatadoras. Para tanto, realizamos novos experimentos para avaliar as respostas induzidas pela acetilcolina. Observamos então que quando o endotélio foi preservado em anéis aórticos sem PVAT ou com PVAT intacto, ocorreram relaxamentos com a mesma magnitude em ratos virgens tratados (ou não) com DOCA Sal (grupos Non-Preg e Non-Preg+DOCA). Além disso, o mesmo ocorreu nas preparações de ratas prenhes não tratadas (grupo Preg). No entanto, foram encontradas deficiências nas respostas de vasorrelaxamento induzidas pela acetilcolina em anéis aórticos com endotélio preservado (com ou sem PVAT) do grupo Preg+DOCA, confirmando assim que a vasodilatação dependente de NO derivada do endotélio está prejudicada na hipertensão da gravidez (POSSOMATO-VIEIRA; KHALIL, 2016).

Nossos resultados estão de acordo com a disfunção endotelial previamente observada na hipertensão gestacional em ratos (SOUZA-PAULA *et al.*, 2020). Assim, nossos resultados confirmam que a vasodilatação dependente de NO está prejudicada e pode estar associada à disfunção endotelial induzida pela hipertensão na gravidez (MITCHELL *et al.*, 2007; POSSOMATO-VIEIRA; KHALIL, 2016). Além disso, nossos achados demonstraram que os anéis aórticos nos quais o endotélio foi removido, mas com o PVAT deixado intacto, não responderam à acetilcolina. Nossos resultados também podem ser corroborados por um estudo anterior que observou uma redução na resposta vasodilatadora à acetilcolina e que foi associada ao desacoplamento da NO sintase endotelial no PVAT aórtico de camundongos obesos em comparação com controles nos quais o PVAT foi deixado intacto (XIA *et al.*, 2016).

No intuito de examinar a vasodilatação dependente de NO derivada do endotélio na hipertensão na gravidez associada à disfunção endotelial, os anéis aórticos foram pré-

incubados com L-NAME, um inibidor não seletivo da NO sintase. Nossos resultados demonstram que não foram encontrados relaxamentos nos anéis aórticos de todos os grupos experimentais, sugerindo que a vasodilatação dependente de NO foi bloqueada pelo L-NAME, o que está de acordo com estudos anteriores (SOUZA- PAULA *et al.*, 2020; GIL-ORTEGA *et al.*, 2014). Assim, nossos achados sugerem que a vasodilatação induzida pelo NO é dependente do endotélio, enquanto o PVAT não apresenta resposta induzida pela acetilcolina.

Para compreender melhor o envolvimento de H₂S e NO na hipertensão na gravidez, analisamos os níveis circulantes de H₂S e NO no plasma. Observamos que houve diminuição do H₂S em ratas prenhes em comparação com ratas virgens. Entretanto, em ratas gestantes hipertensas, notamos um aumento nos níveis circulantes de H₂S em comparação com ratas gestantes normotensas. Além disso, a determinação dos metabólitos do NO plasmático revelou que houve um aumento significativo nos níveis circulantes de NO no grupo de ratas grávidas normotensas em comparação com os outros grupos, incluindo nenhum aumento no grupo Preg+DOCA. Assim, os presentes resultados sugerem que pode haver um aumento na demanda por H₂S no organismo materno, o que resulta em níveis reduzidos de H₂S, enquanto a produção de NO é aumentada na gravidez saudável. No entanto, na hipertensão da gravidez, encontramos aumentos nos níveis de H₂S e ausência de elevações nos níveis de NO em comparação com o grupo de grávidas saudáveis, o que está de acordo com um relatório clínico anterior (POSSOMATO- VIEIRA *et al.*, 2021). Ainda neste estudo anterior, os autores observaram que o H₂S plasmático aumentou consideravelmente na pré-eclâmpsia em comparação ao grupo de gestantes saudáveis, possivelmente indicando um mecanismo compensatório do organismo materno diante da redução do NO, frequentemente encontrada em hipertensão na gravidez e pré-eclâmpsia (SOCHA *et al.*, 2022; TASHIE *et al.*, 2020; SANDRIM *et al.*, 2008; PALEI *et al.*, 2021; GOULOPOULOU; DAVIDGE, 2014). Propõe-se

que a diminuição da biodisponibilidade do NO pode ser causada, entre outros fatores, pelo estresse oxidativo (PALEI *et al.*, 2021; GOULOPOULOU; DAVIDGE, 2014).

Uma gravidez saudável em si já está relacionada ao estresse oxidativo, incluindo diversas alterações na resposta imunológica (BURTON; JAUNIAUX, 2011). A placenta já foi mencionada como uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BURTON; JAUNIAUX, 2011; OPICHKA *et al.*, 2021). No entanto, há evidências anteriores de que aumentos adicionais no estresse oxidativo e nos processos inflamatórios ocorrem na hipertensão gestacional e na pré-eclâmpsia (REDMAN; SARGENT, 2009). Assim, nossos resultados atuais apoiam esse conceito e demonstram que o aumento do estresse oxidativo pode estar associado a uma gravidez saudável. Além disso, no presente estudo, nossos resultados sugerem que pode haver níveis ainda mais elevados de malondialdeído plasmático (um biomarcador para avaliar o estresse oxidativo) na hipertensão na gravidez, como relatado anteriormente (AL-SHEIKH; AL- ZAHrani, 2018; SERDAR *et al.*, 2006).

Para dar maior robustez aos nossos resultados, também mensuramos a síntese estimulada de H₂S no PVAT aórtico, na aorta sem PVAT e na placenta. Observamos que houve um aumento significativo na produção de H₂S no PVAT aórtico do grupo Preg+DOCA em comparação aos demais grupos. A síntese placentária de H₂S também foi maior no grupo Preg+DOCA em comparação ao grupo Preg. Entretanto, a aorta onde o PVAT foi removido não apresentou alterações na síntese de H₂S estimulada com PLP e L- Cisteína em todos os grupos, corroborando resultados previamente encontrados (SOUZA-PAULA *et al.*, 2020).

Experimentos adicionais foram conduzidos para confirmar ainda mais a participação do H₂S derivado do PVAT. Em seguida, o tônus vascular foi desafiado para avaliar efeitos do H₂S na atividade anticontrátil. Os anéis aórticos foram submetidos a concentrações crescentes de fenilefrina para avaliar a contração após pré-incubação com PLP e L-Cisteína. Não foram encontradas diferenças significativas em todas as aortas das ratas Non- Preg e Non-

Preg+DOCA, enquanto efeitos anticontráteis foram observados em anéis aórticos de ratas do grupo Preg nos quais o PVAT e/ou o endotélio foram deixados intactos em comparação com os respectivos anéis aórticos nos quais tanto o PVAT quanto o endotélio foram removidos. No entanto, as preparações de ratas Preg+DOCA mostraram respostas anticontráteis significativas em anéis aórticos com PVAT e endotélio, bem como anéis aórticos com PVAT e endotélio removidos, enquanto a perda do efeito anticontrátil foi encontrada nos anéis aórticos sem PVAT e com endotélio intacto. Então, nossos resultados sugerem que na hipertensão gestacional, o H_2S derivado do PVAT é importante para manter as respostas anticontráteis, contribuindo assim para a regulação do tônus vascular na disfunção endotelial.

Os presentes resultados demonstram que a resposta de vasorrelaxamento dependente do NO derivado do endotélio é prejudicada na hipertensão da gravidez, indicando que um estado hipertensivo de gravidez torna o endotélio menos responsivo à vasodilatação induzida por NO, enquanto a vasodilatação dependente de H_2S derivada de PVAT não é afetada. Assim, nossos resultados estão de acordo com as características da disfunção endotelial associada à hipertensão na gravidez, como demonstrado anteriormente (POSSOMATO-VIEIRA; KHALIL, 2016). Assim, nossos achados sugerem que a vasodilatação dependente de H_2S derivada do PVAT é preservada na hipertensão da gravidez e indicam que as adaptações vasculares hipertensivas associadas à gravidez podem ter mecanismos neutralizantes que envolvem, em parte, a resposta de vasodilatação dependente do PVAT. Tomados em conjunto, nossos resultados demonstram que o efeito anticontrátil relacionado ao PVAT não é afetado pela hipertensão na gravidez e é aumentado pela estimulação de H_2S , enquanto esta resposta é prejudicada no endotélio.

Descobertas atuais devem ser cuidadosamente interpretadas. Estudos adicionais devem investigar se o modelo de hipertensão com DOCA Sal em ratas grávidas poderia reproduzir as alterações morfológicas na aorta torácica caracterizadas por aumentos na espessura da parede,

área da parede e relação parede-lúmen, sugerindo assim que alterações locais na parede vascular ocorreram em resposta ao aumento da pressão arterial, como demonstrado anteriormente em ratos machos hipertensos (FUJITA *et al.*, 1996; AGAFONOVA *et al.*, 2023; MATSUMARA *et al.*, 1995; PIECHA *et al.*, 2012; UDDIN *et al.*, 2009). Além disso, embora os presentes resultados tenham sido demonstrados no período final da gravidez em ratos, o que poderia assemelhar-se ao oitavo e nono meses de gestação humana, são necessárias investigações adicionais para examinar o papel do H₂S derivado do PVAT de uma perspectiva clínica, também considerando diferenças na ingestão alimentar, idade e período de gravidez nas pacientes.

5. Conclusão

Os dados que compuseram nosso artigo fundamentam que a vasodilatação dependente de PVAT pode ser aumentada pela estimulação de H_2S com L-Cisteína na hipertensão da gravidez, enquanto a vasodilatação induzida por H_2S derivada do endotélio não mostrou resposta adicional em comparação com os anéis aórticos nos quais tanto o PVAT quanto o endotélio foram removidos, provavelmente esse prejuízo é decorrente do aumento do estresse oxidativo induzido pela hipertensão na gravidez associada ao desequilíbrio angiogênico e à restrição do crescimento fetal-placentário. É importante ressaltar que o único tratamento eficaz para a pré-eclampsia é o parto, e no intuito de protelar um parto precoce a estratégia é amenizar os sintomas hipertensivos. Lamentavelmente apenas quatro anti-hipertensivos podem ser utilizados, com apenas três disponíveis aqui no Brasil. Assim, a estimulação endógena de H_2S derivada de PVAT com o aminoácido L-Cisteína pode ser uma alternativa clínica para mitigar distúrbios hipertensivos da gravidez associados à disfunção endotelial.

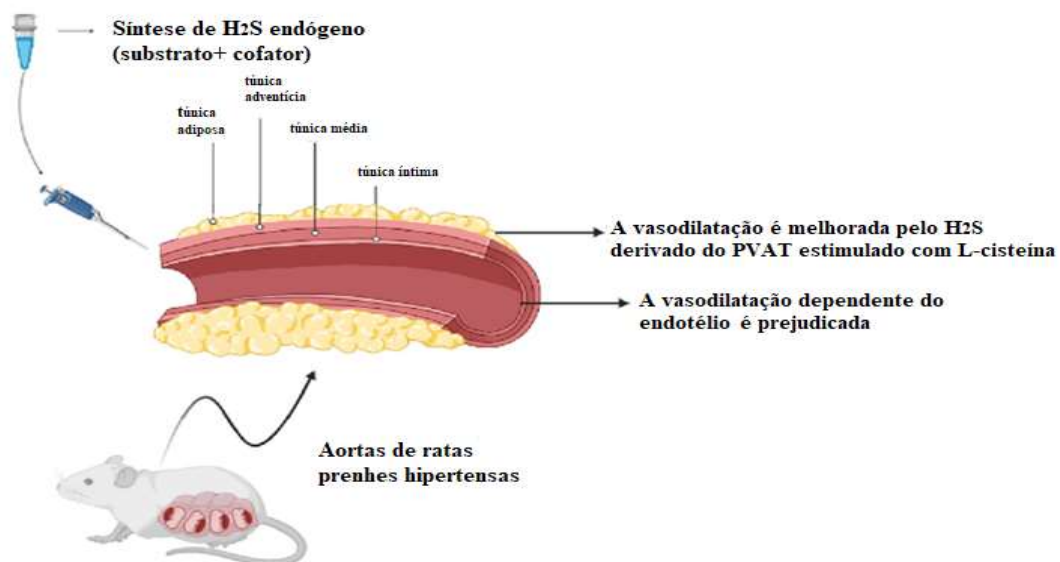


Figura 2. Síntese da conclusão obtida com base nos dados adquiridos na pesquisa (Figura do autor).

Referências

- ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci.* 1996;16:1066–71.
- AGAFONOVA, I.G.; KOTELNIKOV, V.N.; GELTSER, B.I. Structural and Functional Changes of the Thoracic Aorta in Experimental Arterial Hypertension. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023, 174, 308–311. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05697-2>.
- ALI, M.Y.; PING, C.Y.; MOK, Y.Y.; LING, L.; WHITEMAN, M.; BHATIA, M.; MOORE, P.K. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol.* 2006 Nov;149(6):625-34. doi: 10.1038/sj.bjp.0706906. Epub 2006 Oct 3. PMID: 17016507; PMCID: PMC2014646.
- AL-MAGABLEH, M.R.; HART, J.L. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011 Apr;383(4):403-13. doi: 10.1007/s00210-011-0608-z. Epub 2011 Feb 19. PMID: 21336541.
- AL-SHEIKH, Y.A.; AL-ZAHRANI, K.Y. The Status of Biochemical and Molecular Markers of Oxidative Stress in Preeclamptic Saudi Patients. *Curr. Mol. Med.* 2018, 18, 475–485. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190104105843>.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' task force on hypertension in pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, New York, v. 122, n. 5, p. 1122-1131, Nov. 2013.
- ARROYO, J.A.; WINN, V.D. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. *Semin Perinatol.* 2008 Jun;32(3):172-7. doi: 10.1053/j.semperi.2008.02.006. PMID: 18482617.
- BANEK, C.T.; KNUEPFER, M.M.; FOSS, J.D.; FIEGE, J.K.; ASIRVATHAM-JEYARAJ, N.; VAN HELDEN, D.; SHIMIZU, Y.; OSBORN, J.W. Resting Afferent Renal Nerve Discharge and Renal Inflammation: Elucidating the Role of Afferent and Efferent Renal Nerves in Deoxycorticosterone Acetate Salt Hypertension. *Hypertension.* 2016 Dec;68(6):1415-1423. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07850. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27698066; PMCID: PMC5159336.
- BASTING, T.; LAZARTIGUES, E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr Hypertens Rep.* 2017 Apr;19(4):32. doi: 10.1007/s11906-017-0731-4. PMID: 28353076; PMCID: PMC6402842.
- BELTOWSKI, J.; JAMROZ-WISNIEWSKA, A. Hydrogen sulfide in the adipose tissue-physiology, pathology and a target for pharma- cotherapy. *Molecules* 2016, 22, 63.
- BOELDT, D.S.; BIRD, I.M. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *J. Endocrinol.* 2017, 232, R27–R44. <https://doi.org/10.1530/joe-16-0340>.

BROWN, N.K.; ZHOU, Z.; ZHANG, J.; ZENG, R.; WU, J.; EITZMAN, D.T.; CHEN, Y.E.; CHANG, L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Aug;34(8):1621-30. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303029. Epub 2014 May 15. PMID: 24833795; PMCID: PMC4104287.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2011, 25, 287–299.

CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation.* 2000 Jan 25;101(3):329-35. doi: 10.1161/01.cir.101.3.329. PMID: 10645931.

CHAIWORAPONGSA, T.; CHAEMSAITHONG, P.; YEO, L.; ROMERO, R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014 Aug;10(8):466-80. doi: 10.1038/nrneph.2014.102. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25003615; PMCID: PMC5893150.

CHAUSSIER F. Précis d'expériences faites sur les animaux avec le gaz hydrogène sulfuré *J Gen de Med, Chir et Pharm Paris.* 1908;15:19–39.

CHEN, D.B.; ZHENG, J. Regulation of placental angiogenesis. *Microcirculation.* 2014 Jan;21(1):15-25. doi: 10.1111/micc.12093. PMID: 23981199; PMCID: PMC5589442.

CHENG, C.K.; DING, H.; JIANG, M.; YIN, H.; GOLLASCH, M.; HUANG, Y. Perivascular adipose tissue: Fine-tuner of vascular redox status and inflammation. *Redox Biol.* 2023 Jun;62:102683. doi: 10.1016/j.redox.2023.102683. Epub 2023 Mar 20. PMID: 36958248; PMCID: PMC10038789.

CHIMINI, J.S.; POSSOMATO-VIEIRA, J.S.; DA SILVA, M.L.S.; DIAS-JUNIOR, C.A. 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.* 2019, 124, 385–393.

COLETTA, C.; PAPAPETROPOULOS, A.; ERDELYI, K.; OLAH, G.; MÓDIS, K.; PANOPOULOS, P.; ASIMAKOPOULOU, A.; GERÖ, D.; SHARINA, I.; MARTIN, E.; SZABO, C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 5;109(23):9161-6. doi: 10.1073/pnas.1202916109. Epub 2012 May 8. PMID: 22570497; PMCID: PMC3384190.

COOK, K.S.; MIN, H.Y.; JOHNSON, D.; CHAPLINSKY, R.J.; FLIER, J.S.; HUNT, C.R.; SPIEGELMAN, B.M. Adipsin: A circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237: 402-405, 1987.

DE CORMIS, L. Release of hydrogen sulfide into an atmosphere containing sulfur dioxide. *C R Acad Sci.* 1968;266:683–685

DI MARCO, G.S.; REUTER, S.; HILLEBRAND, U.; AMLER, S.; KÖNIG, M.; LARGER, E.; OBERLEITHNER, H.; BRAND, E.; PAVENSTÄDT, H.; BRAND, M. The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Oct;20(10):2235-45. doi: 10.1681/ASN.2009010061. Epub 2009 Jul 16. PMID: 19608702; PMCID: PMC2754110.

DONOVAN, J.; WONG, P.S.; GARLE, M.J.; ALEXANDER, S.P.H.; DUNN, W.R.; RALEVIC, V. Coronary artery hypoxic vasorelaxation is augmented by perivascular adipose tissue through a mechanism involving hydrogen sulphide and cystathionine- β -synthase. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018 Dec;224(4):e13126. doi: 10.1111/apha.13126. Epub 2018 Jul 11. PMID: 29896909.

DRENJANČEVIĆ-PERIC, I.; JELAKOVIĆ, B.; LOMBARD, J.H.; KUNERT, M.P.; KIBEL, A.; GROS, M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34(1):1-11. doi: 10.1159/000320387. Epub 2010 Nov 12. PMID: 21071956; PMCID: PMC3214830.

DU VIGNEAUD, V.; BROWN, G.B.; CHANDLER, J.P. The synthesis of β -amino- β -carboxyethyl homocysteine and the replacement by it of cystine in the diet. *J Biol Chem*. 1942;143:59

FANG, L.; ZHAO, J.; CHEN, Y.; MA, T.; XU, G.; TANG, C.; LIU, X.; GENG, B. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens*. 2009 Nov;27(11):2174-85. doi: 10.1097/HJH.0b013e328330a900. PMID: 19644389.

FUJITA, K.; MATSUMURA, Y.; MIYAZAKI, Y.; TAKAOKA, M.; MORIMOTO, S. Effects of the endothelin ETA-receptor antagonist FR139317 on development of hypertension and cardiovascular hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol*. 1996 Apr;70(4):313-9. doi: 10.1254/jjp.70.313. PMID: 8774759.

GAYON, M.U. Note presentee par M. Pasteur. Sur les alterations des oeufs, a l'occasion d'une Note de MM. A. Bechamp et G. Eustache. *Ann Ecole Normale Super Sér2*. 1877;IV:205

GEORGE, E.M.; PALEI, A.C.; DENT, E.A.; GRANGER, J.P. Sildenafil attenuates placental ischemia-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Aug 15;305(4):R397-403. doi: 10.1152/ajpregu.00216.2013. Epub 2013 Jun 19. PMID: 23785075; PMCID: PMC3833396.

GIL-ORTEGA, M.; CONDEZO-HOYOS, L.; GARCÍA-PRIETO, C.F.; ARRIBAS, S.M.; GONZÁLEZ, M.C.; ARANGUEZ, I.; RUIZ-GAYO, M.; SOMOZA, B.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2014 Apr 23;9(4):e95312. doi: 10.1371/journal.pone.0095312. PMID: 24760053; PMCID: PMC3997398.

GOULOPOULOU, S.; DAVIDGE, S.T. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends Mol. Med*. 2015, 21, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.009>.

GRANGER, J.P.; ALEXANDER, B.T.; BENNETT, W.A.; KHALIL, R.A. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2001 Jun;14(6 Pt 2):178S-185S. doi: 10.1016/s0895-7061(01)02086-6. PMID: 11411754.

GUPTA, S.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. v. 60, n. 12, p. 807-816, 2005.

GUYENET, PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006 May;7(5):335-46. doi: 10.1038/nrn1902. PMID: 16760914.

HAMILTON, W.J. The Human Placenta. *J Clin Pathol*. 1970 Oct;23(7):648. PMCID: PMC476860.

HART, J.L. Vasorelaxation elicited by endogenous and exogenous hydrogen sulfide in mouse mesenteric arteries. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 2020, 393, 551–564. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01752-w>.

HUA, W.; CHEN, Q.; GONG, F.; XIE, C.; ZHOU, S.; GAO, L. Cardioprotection of H₂S by downregulating iNOS and upregulating HO-1 expression in mice with CVB3-induced myocarditis. *Life Sci*. 2013 Dec 5;93(24):949-54. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.007. Epub 2013 Oct 18. PMID: 24140888.

HUTCHEON, J. A.; LISONKOVA, S.; JOSEPH, K. S. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 391-403, 2011.

IANOSI-IRIMIE, M.; VU, H.V.; WHITBRED, J.M.; PRIDJIAN, C.A.; NADIG, J.D.; WILLIAMS, M.Y.; WRENN, D.C.; PRIDJIAN, G.; PUSCHETT, J.B. A rat model of preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2005 Nov;27(8):605-17. doi: 10.1080/10641960500298608. PMID: 16303637.

JACOB, F.; CLARK, L.A.; GUZMAN, P.A.; OSBORN, J.W. Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Oct;289(4):H1519-29. doi: 10.1152/ajpheart.00206.2005. Epub 2005 Jun 3. PMID: 15937098.

KAMESHIMA, S.; YAMADA, K.; MORITA, T.; OKADA, M.; YAMAWAKI, H. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor augments acetylcholine-induced relaxation via the inhibition of acetylcholine esterase activity in rat isolated mesenteric artery. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016 Feb;216(2):203-10. doi: 10.1111/apha.12563. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26264600.

KAPPOU, D.; SIFAKIS, S.; ANDROUTSOPOULOS, V.; KONSTANTINIDOU, A.; SPANDIDOS, D.A.; PAPANTONIOU, N. Placental mRNA expression of angiopoietins (Ang)-1, Ang-2 and their receptor Tie-2 is altered in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta*. 2014 Sep;35(9):718-23. doi: 10.1016/j.placenta.2014.07.001. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25047691.

KINTIRAKI, E.; PAPAKATSIKA, S.; KOTRONIS, G.; GOULIS, D.G.; KOTSIS, V. Pregnancy-Induced hypertension. *Hormones (Athens)*. 2015 Apr-Jun;14(2):211-23. doi: 10.14310/horm.2002.1582. PMID: 26158653.

KUBO, S.; DOE, I.; KUROKAWA, Y.; NISHIKAWA, H.; KAWABATA, A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology*. 2007 Mar 22;232(1-2):138-46. doi: 10.1016/j.tox.2006.12.023. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17276573.

KUO, S.M.; LEA, T.C.; STIPANUK, M.H. Developmental pattern, tissue distribution, and subcellular distribution of cysteine: alpha-ketoglutarate aminotransferase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activities in the rat. *Biol Neonate*. 1983;43(1-2):23-32. doi: 10.1159/000241634. PMID: 6573924.

KWOK, K.H.M.; LAM, K.S.L.; XU, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* 48: e215, 2016.

LEE, L.K.; KIM, M.Y.; KIM, J.H.; LEE, J.U.; PARK, B.S.; YANG, S.M.; JEON H.J.; LEE, W.D.; NOH, J.W.; KWAK, T.Y.; LEE, T.H.; KIM, J.Y.; KIM, H.Y.; HWANG, B.Y.; KIM, B.; KIM, J. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *J Phys Ther Sci.* 2015 Jan;27(1):303-7. doi: 10.1589/jpts.27.303. Epub 2015 Jan 9. PMID: 25642096; PMCID: PMC4305587.

LEVINE, R.J.; LAM, C.; QIAN, C.; YU, K.F.; MAYNARD, S.E.; SACHS, B.P.; SIBAI, B.M.; EPSTEIN, F.H.; ROMERO, R.; THADHANI, R.; KARUMANCHI, S.A.; CPEP STUDY GROUP. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006 Sep 7;355(10):992-1005. doi: 10.1056/NEJMoa055352. Erratum in: *N Engl J Med.* 2006 Oct 26;355(17):1840. PMID: 16957146.

LI, J.; LAMARCA, B.; RECKELHOFF, J.F. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RuPP) model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v.303, p.1-8, 2012.

LOBOV, I.B.; BROOKS, P.C.; LANG, R.A. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11205-10. doi: 10.1073/pnas.172161899. Epub 2002 Aug 5. PMID: 12163646; PMCID: PMC123234.

MARVAR, P.J.; THABET, S.R.; GUZIK, T.J.; LOB, H.E.; MCCANN, L.A.; WEYAND, C.; GORDON, F.J.; HARRISON, D.G. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res.* 2010 Jul 23;107(2):263-70. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217299. Epub 2010 Jun 17. PMID: 20558826; PMCID: PMC2921936.

MATSUMURA, Y.; KITA, S.; MORIMOTO, S.; AKIMOTO, K.; FURUYA, M.; OKA, N.; TANAKA, T. Antihypertensive effect of sesamin. I. Protection against deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiovascular hypertrophy. *Biol Pharm Bull.* 1995 Jul;18(7):1016-9. doi: 10.1248/bpb.18.1016. PMID: 7581242.

MAYNARD, S.E.; MIN, J.Y.; MERCHAN, J.; LIM, K.H.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T.A.; MORGAN, J.P.; SELLKE, F.W.; STILLMAN, I.E.; EPSTEIN, F.H.; SUKHATME, V.P.; KARUMANCHI, S.A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):649-58. doi: 10.1172/JCI17189. PMID: 12618519; PMCID: PMC151901.

MITCHELL, B.M.; COOK, L.G.; DANCHUK, S.; PUSCHETT, J.B. Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2007, 20, 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2007.08.007>.

MYATT, L.; WEBSTER, R.P. Vascular biology of preeclampsia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* v. 7, p. 375-384, 2008.

OPICHKA, M.A.; RAPPELT, M.W.; GUTTERMAN, D.D.; GROBE, J.L.; MCINTOSH, J.J. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Cells.* 2021 Nov 6;10(11):3055. doi: 10.3390/cells10113055. PMID: 34831277; PMCID: PMC8616535.

PALEI, A.C.; GRANGER, J.P.; SPRADLEY, F.T. Placental Ischemia Says “NO” to Proper NOS-Mediated Control of Vascular Tone and Blood Pressure in Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11261. <https://doi.org/10.3390/ijms222011261>.

PALEI, A.C.; SPRADLEY, F.T.; WARRINGTON, J.P.; GEORGE, E.M.; GRANGER, J.P. Pathophysiology of hypertension in pre-eclampsia: a lesson in integrative physiology. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013 Jul;208(3):224-33. doi: 10.1111/apha.12106. Epub 2013 May 7. PMID: 23590594; PMCID: PMC3687012.

PASCOAL, LF. Hipertensão e gravidez. *Rev. Bras. Hipertens.*, Rio de Janeiro, v. 9, p. 256-261, 2002.

PERUSQUÍA, M.; HANSON, A.E.; MEZA, C.M.; KUBLI, C.; HERRERA, N.; STALLONE, J.N.. Antihypertensive responses of vasoactive androgens in an in vivo experimental model of preeclampsia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018 Apr;178:65-72. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.11.001. Epub 2017 Nov 4. PMID: 29113921.

PIECHA, G.; KOLEGANOVA, N.; RITZ, E.; MÜLLER, A.; FEDOROVA, O.V.; BAGROV, A.Y.; LUTZ, D.; SCHIRMACHER, P.; GROSS-WEISSMANN, M.L. High salt intake causes adverse fetal programming--vascular effects beyond blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Sep;27(9):3464-76. doi: 10.1093/ndt/gfs027. Epub 2012 Mar 19. PMID: 22431707; PMCID: PMC3433771.

POSSOMATO-VIEIRA, J.S.; KHALIL, R.A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv Pharmacol*. 2016;77:361-431. doi: 10.1016/bs.apha.2016.04.008. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27451103; PMCID: PMC4965238.

POSSOMATO-VIEIRA, J.S.; PALEI, A.C.; PINTO-SOUZA, C.C.; CAVALLI, R.; DIAS-JUNIOR, C.A.; SANDRIM, V.C. Circulating levels of hydrogen sulphide negatively correlate to nitrite levels in gestational hypertensive and preeclamptic pregnant women. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021 Sep;48(9):1224-1230. doi: 10.1111/1440-1681.13534. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34080216.

RAMAZZINI, B. De Morbis Artificum Diatriba. Antonii Capponi. *Mutinae (Modena)* 1700.

RAMIREZ, J.G.; O'MALLEY, E.J.; HO, W.S.V. Pro-contractile effects of perivascular fat in health and disease. *Br. J. Pharmacol*. 2017;174, 3482–3495. <https://doi.org/10.1111/bph.13767>.

REDMAN, C.; SARGENT, I. Placental stress and pre-eclampsia: A revised view. *Placenta* 2009, 30, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.021>.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1592-4, 2005.

ROSENWALD, M.; PERDIKARI, A.; RÜLICHE, T.; WOLFRUM, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 2013 Jun;15(6):659-67. doi: 10.1038/ncb2740. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23624403.

SANDRIM, V.C.; PALEI, A.C.; METZGER, I.F.; GOMES, V.A.; CAVALLI, R.C.; TANUS-SANTOS, J.E. 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 Aug;52(2):402-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.115006. Epub 2008 Jun 23. PMID: 18574068.
- SCHLEIFENBAUM, J.; KÖHN, C.; VOBLOVA, N.; DUBROVSKA, G.; ZAVARIRSKAYA, O.; GLOE, T.; CREAM, C.S.; LUFT, F.C.; HUANG, Y.; SCHUBERT, R.; GOLLASCH, M. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. J Hypertens. 2010 Sep;28(9):1875-82. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833c20d5. PMID: 20577128.
- SEDEEK, M.; GILBERT, J.S.; LAMARCA, B.B.; SHOLOOK, M.; CHANDLER, D.L.; WANG, Y.; GRANGER, J.P. Role of reactive oxygen species in hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats. Am J Hypertens. 2008 Oct;21(10):1152-6. doi: 10.1038/ajh.2008.239. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18670418; PMCID: PMC2786058.
- SERDAR, Z.; GÜR, E.; DEVELIOĞLU, O. Serum iron and copper status and oxidative stress in severe and mild preeclampsia. Cell Biochem Funct. 2006 May-Jun;24(3):209-15. doi: 10.1002/cbf.1235. PMID: 15898124.
- SILVA, G.C.; SILVA, J.F.; DINIZ, T.F.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. Endothelial dysfunction in DOCA-salt-hypertensive mice: role of neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide. Clin Sci (Lond). 2016 Jun 1;130(11):895-906. doi: 10.1042/CS20160062. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26976926.
- SOCHA, M.W.; STANKIEWICZ, M.; ŻOŁNIEŻEWICZ, K.; PUK, O.; WARTĘGA, M. Decrease in Nitric Oxide Production as a Key Mediator in the Pathogenesis of Preeclampsia and a Potential Therapeutic Target: A Case-Control Study. Biomedicines. 2022 Oct 20;10(10):2653. doi: 10.3390/biomedicines10102653. PMID: 36289915; PMCID: PMC9599382.
- SOUZA-PAULA, E.; POLONIO, L.C.C.; ZOCHIO, G.P.; DA SILVA, K.P.; KUSHIMA, H.; DIAS-JUNIOR, C.A. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue But Not of Endothelium Is Enhanced by Hydrogen Sulfide Stimulation in Hypertensive Pregnant Rat Aortae. J Cardiovasc Pharmacol. 2020 Dec;76(6):715-729. doi: 10.1097/FJC.0000000000000917. PMID: 32976209.
- STEEGERS, E.A.; VON DADELSZEN, P.; DUVEKOT, J.J.; PIJNENBORG, R. Preeclampsia. Lancet. 2010 Aug 21;376(9741):631-44. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60279-6. Epub 2010 Jul 2. PMID: 20598363.
- TASHIE, W.; FONDJO, L.A.; OWIREDU, W.K.B.A.; EPHRAIM, R.K.D.; ASARE, L.; ADU-GYAMFI, E.A.; SEIDU, L. Altered Bioavailability of Nitric Oxide and L-Arginine Is a Key Determinant of Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. Biomed Res Int. 2020 Oct 22;2020:3251956. doi: 10.1155/2020/3251956. PMID: 33145345; PMCID: PMC7599412.
- THISSIER-LEVY, S.; BOUCOIRAN, I.; LUO, Z.C.; NUYT, A.M.; JULIEN, P.; FRASER, W.D.; AUDIBERT, F. Endostatin levels and the risk of subsequent preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013 Oct;170(2):396-400. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.07.039. Epub 2013 Aug 7. PMID: 23958573.
- UBUKA, T.; YUASA, S.; ISHIMOTO, Y.; SHIMOMURA, M. Desulfuration of l-cysteine through transamination and transsulfuration in rat liver. Physiol Chem Phys. 1977;9(3):241-6. PMID: 594191.

UDDIN, M.N.; MCLEAN, L.B.; HUNTER, F.A.; HORVAT, D.; SEVERSON, J.; THARAKAN, B.; CHILDS, E.W.; PUSCHETT, J.B. Vascular leak in a rat model of preeclampsia. *Am J Nephrol*. 2009;30(1):26-33. doi: 10.1159/000193220. Epub 2009 Feb 5. PMID: 19194101; PMCID: PMC2821446.

UENO, Y.; MOHARA, O.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Characteristics of hormonal and neurogenic mechanisms of deoxycorticosterone-induced hypertension. *Hypertension*. 1988 Feb;11(2 Pt 2):I172-7. doi: 10.1161/01.hyp.11.2_pt_2.i172. PMID: 3346052.

UMAPATHY, A.; CHAMLEY, L.W.; JAMES, J.L. Reconciling the distinct roles of angiogenic/anti-angiogenic factors in the placenta and maternal circulation of normal and pathological pregnancies. *Angiogenesis*. 2020 May;23(2):105-117. doi: 10.1007/s10456-019-09694-w. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31707538.

WANG, R. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011 Mar;20(2):107-12. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283430651. PMID: 21301337.

WANG, R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*. 2003 Aug;5(4):493-501. doi: 10.1089/152308603768295249. PMID: 13678538.

WANG, Y.; ZHAO, X.; JIN, H.; WEI, H.; LI, W.; BU, D.; TANG, X.; REN, Y.; TANG, C.; DU, J. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Feb;29(2):173-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179333. Epub 2008 Nov 6. PMID: 18988885.

WARENYCIA, M.W.; GOODWIN, L.R.; BENISHIN, C.G.; REIFFENSTEIN, R.J.; FRANCOM, D.M.; TAYLOR, J.D.; DIEKEN, F.P. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol*. 1989 Mar 15;38(6):973-81. doi: 10.1016/0006-2952(89)90288-8. PMID: 2930598.

WATTS, S.W.; FLOOD, E.D.; GARVER, H.; FINK, G.D.; ROCCABIANCA, S. A New Function for Perivascular Adipose Tissue (PVAT): Assistance of Arterial Stress Relaxation. *Sci Rep*. 2020 Feb 4;10(1):1807. doi: 10.1038/s41598-020-58368-x. PMID: 32019956; PMCID: PMC7000722..

WIKSTRÖM, A.K.; LARSSON, A.; AKERUD, H.; OLOVSSON, M. Increased circulating levels of the antiangiogenic factor endostatin in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Reprod Sci*. 2009 Oct;16(10):995-1000. doi: 10.1177/1933719109339348. Epub 2009 Jun 29. PMID: 19564642.

WITZENBICHLER, B.; MAISONPIERRE, P.C.; JONES, P.; YANCOPOULOS, G.D.; ISNER, J.M. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18514-21. doi: 10.1074/jbc.273.29.18514. PMID: 9660821.

XIA, N.; HORKE, S.; HABERMEIER, A.; CLOSS, E.I.; REIFENBERG, G.; GERICKE, A.; MIKHED, Y.; MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; FÖRSTERMANN, U.; LI, H. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese

Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016 Jan;36(1):78-85. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306263. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26586660.

YANG, T.T.; CHANG, C.K.; TSAO C.W.; HSU, Y.M.; HSU, C.T.; CHENG, J.T. Activation of muscarinic M-3 receptor may decrease glucose uptake and lipolysis in adipose tissue of rats. *Neurosci Lett.* 2009 Feb 13;451(1):57-9. doi: 10.1016/j.neulet.2008.12.029. Epub 2008 Dec 24. PMID: 19111904.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; WANG, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):6008-16. doi: 10.1093/emboj/20.21.6008. PMID: 11689441; PMCID: PMC125693.