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

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

LETÍCIA CAROLINE CAVALHEIRO POLONIO

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H_2S) DERIVADO DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR (PVAT) NA HIPERTENSÃO GESTACIONAL

BOTUCATU
2019

LETÍCIA CAROLINE CAVALHEIRO POLONIO

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H_2S) DERIVADO DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR (PVAT) NA HIPERTENSÃO GESTACIONAL

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Botucatu-SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Polonio, Letícia Caroline Cavalheiro.
Caracterização farmacológica do sulfeto de hidrogênio (H2S) derivado do tecido adiposo perivascular (PVAT) na hipertensão gestacional / Letícia Caroline Cavalheiro Polonio. - Botucatu, 2019

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

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

Palavras-chave: Hipertensao gestacional; Sulfeto de hidrogênio; Tecido adiposo perivascular.

LETÍCIA CAROLINE CAVALHEIRO POLONIO

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H_2S) DERIVADO DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR (PVAT) NA HIPERTENSÃO GESTACIONAL

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

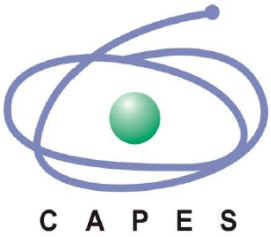
Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira
Departamento de Cirurgia e Ortopedia
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

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

Financiamento



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



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

Dedicatória

A minha mãe, Adriane...
que sempre esteve comigo, me apoiando,
ensinando, amando incondicionalmente
e ensinando-me a amar a Deus sob todas as coisas.
"A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará a seu tamanho original".
(Albert Einsten)

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida, por me dar forças pra vencer todos os obstáculos que enfrentei nessa jornada e por me guiar e iluminar minha trajetória.

Agradeço a minha mãe Adriane, que fez o que pode pra me ajudar e ser meu apoio em mais essa etapa da vida e esteve sempre rezando pelo meu sucesso.

Agradeço ao meu orientador, Professor Carlos, por ter me aceitado como orientanda e compreendido todas as minhas limitações me guiando a oferecer o que de melhor eu podia fazer.

Agradeço ao meu namorado Fernando, que esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins e me trouxe a palavra de Deus como conforto todos os dias.

Aos meus amigos de laboratório, Gabriela, Ediléia, Jéssica, Regina, José Sérgio, Thalita, Katiussia, Nayara, Mayara, Tamires, Alexandre, Noemia, Alan e André, os quais foram, são e serão muito importantes para mim pelos ensinamentos, conversas e pelo companheirismo.

Em especial, agradeço meu amigo José Sérgio que me auxiliou no delineamento do projeto de mestrado, a minha amiga Ediléia que me auxiliou na execução dos experimentos e as minhas amigas Gabriela e Katiussia que me apoioaram grandemente.

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

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

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

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

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

"Quanto maior o conhecimento,
menor o ego, quanto maior o ego,
menor o conhecimento".
(Albert Einsten)

Prefácio

A dissertação intitulada: Caracterização farmacológica do sulfeto de hidrogênio (H_2s) derivado do tecido adiposo perivascular (PVAT) Na Hipertensão Gestacional" é dividida em três partes.

Inicialmente a dissertação traz uma breve introdução a respeito do tecido adiposo perivascular, do H_2S, dos canais de potássio sensíveis ao ATP, das principais alterações vasculares que ocorrem no organismo materno com o início da gestação, seguida do papel do endotélio vascular nesse momento. Também são abordados alguns pontos da fisiopatologia da hipertensão gestacional e algumas fisiopatologias em que o tecido adiposo perivascular encontra-se disfuncional. Por fim, essa primeira parte da dissertação descreve alternativas terapêuticas que podem vir a ser exploradana hipertensão gestacional.

A segunda parte apresenta o artigo intitulado *"*Anticontractile effect of perivascular adipose tissue is enhanced by stimulated hydrogen sulfide formation and is ATP-sensitive potassium channel-dependent in hypertensive pregnant rats*",* submetido para publicação na revista *Vascular Pharmacology*.

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

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

Disciplinas cursadas

Disciplinas	Calendário	Conceito	Frequência	Créditos	Carga Horária
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	1^0/2018	**A**	100%	3	45
Farmacocinética e Toxicocinética	1^0/2018	**A**	100%	2	30
Farmacologia de Receptores na Comunicação Celular	1^0/2018	**A**	100%	4	60
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	2^0/2018	**A**	100%	3	45
Interação entre Pós-graduação e Ensino Médio	2^0/2018	**A**	100%	6	90
Pré-eclâmpsia: da bancada ao leito	2^0/2018	**A**	100%	4	60

Participação em eventos científicos:

1. VII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC- UNESP/Botucatu (2018).
2. 50^{th} Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics- Ribeirão Preto, Brasil (2018).
3. ENBM – Encontro Nacional de Biomedicina – Botucatu, Brasil (2018).
4. VIII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC- UNESP/Botucatu (2019).
5. XXIII Simpósio de Fisiologia Cardiovascular, UNESP/Araraquara (2019)

Resumos em eventos científicos:

1. Polonio LC, Possomato-Vieira JS, Chimini JS, Dias-Junior CA. Loss of anti-contractile effect mediated by aortic perivascular adipose tissue-derived hydrogen sulfide in hypertensive pregnancy. 50^{th} Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Ribeirão Preto, 2018.

2. Polonio LC, Possomato-Vieira JS, Chimini JS, Dias-Junior CA. Perda do efeito anti-contrátil mediada pelo sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adiposo aórtico

na hipertensão gestacional em ratas. ENBM Encontro Nacional de Biomedicina, Botucatu, 2018.

3. Paula-Souza E, Chimini JS, **POLONIO, L.C**, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sildenafil reduz a hipertensão em ratos intoxicados com chumbo por sete dias. ENBM Encontro Nacional de Biomedicina, Botucatu, 2018.

4. POLONIO, L.C.C, Possomato-Vieira JS, Zochio GP, Chimini JS, Paula-Souza E, Dias-Junior CA. Perda do efeito anti-contrátil mediada pelo sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adipose perivascular aórtico na hipertensão gestacional. XXIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, Araraquara, 2019.

5. Paula-Souza E, Zochio GP, **POLONIO LCC**, Chimini JS, Dias- Junior CA. Sildenafil induz a hipertensão em ratos intoxicados com chumbo por sete dias. XXIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, Araraquara, 2019.

6. POLONIO, L.C.C. "Perda do Efeito anticontrátil mediada pelo sulfeto de hidrogênio derivado do tecido adipose perivascular aórtico na hipertensão gestacional". VIII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia (SIMFARTEC), Botucatu, 2019.

Palestras / Aulas:

1. II Curso de inverno de Farmacologia e Biotecnologia. Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, 2018 (4h).
2. Curso sobre Cosméticos Naturais na Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2018(4 h).
3. Aula prática de reatividade Vascular na disciplia "Pré-Eclâmpsia: da bancada ao leito", UNESP- Botucatu, 2018 (3 h).
4. Aula teórico prática sobre Metodologia Experimental Farmacológica, UNESP– Botucatu, 2018/2019 (8h).
5. Aula sobre Terapias Alternativas, UNESP-BAURU, 2019 (3h).
6. Aula sobre Drogas de abuso: Lícitas e Ilícitas, UNESP-Bauru, 2019 (3h)

Lista de abreviaturas e siglas

3-MST – 3 mercaptopiruvato sulfurtransferase

ACh – Acetilcolina

ADRF – Fator de relaxamento derivado do tecido adiposo

CBS – Cistationina beta sintase

CO – Monóxido de carbono

CSE – Cistationina gama-liase

DOCA- Acetato de desoxicorticosterona

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Ensaio de imuno adsorção enzimática

H_2S – Sulfeto de Hidrogênio

HTN-Preg- Hipertensão Gestacional

K_{ATP} – Canal de potássio sensível ao ATP

NO – Óxido nítrico

Norm-Preg- Prenhez normotensa

PAG – DL-Propargilglicina

PE – Pré-eclâmpsia

Phe – Fenilefrina

PLGF – Fator de crescimento placentário

PLP- Piridoxal 5- Fosfato

PVAT – tecido adiposo perivascular

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

SHR- Ratos espontaneamente hipertensos

VEGF- Fator de crescimento do endotélio vascular

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.....19

ABSTRACT.....21

INTRODUÇÃO.....24

1.1. Tecido Adiposo Perivascular (PVAT).....24

1.2. Sulfeto de Hidrogênio (H_2S).....25

1.3. Canais de Potássio dependetes de ATP (K_{ATP}).....26

1.4. Fisiologia vascular da gestação.....27

1.5. Desordens hipertensivas gestacionais.....29

1.6. Disfunção endotelial.....31

1.7. Evidências do papel do Tecido Adiposo Perivascular (PVAT) no controle do tônus vascular.....32

1.8. Alternativas Terapêuticas na Hipertensão Gestacional.....33

DISCUSSÃO 65

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS......72

REFERÊNCIAS.....74

Resumo

RESUMO

INTRODUÇÃO: O tecido adiposo perivascular (PVAT) libera sob condições fisiológicas fatores de relaxamento derivados do tecido adiposo (ADRF), que possivelmente desempenham um papel importante na modulação do tônus vascular. Foi demonstrado que a inativação de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) aboliu o efeito anticontratil do PVAT. Outros estudos mostraram que o sulfeto de hidrogênio (H_2S) é produzido pelo PVAT devido a expressão da sua enzima precursora cistationina gamma liase (CSE) e que o H_2S atua através ativação dos K_{ATP}. Além disso, o PVAT sofre uma disfunção em condições fisiopatológicas como a hipertensão. No entanto, seus efeitos ainda não são bem explorados durante a hipertensão gestacional. Portanto, nosso objetivo foi examinar o envolvimento do H_2S derivado do PVAT na modulação do tônus vascular de ratas prenhes hipertensas e normotensas. **MÉTODOS:** Foram realizadas curvas concentração-resposta induzidas pela fenilefrina na presença e ausência de PVAT e endotélio em ratas prenhes normotensas (Norm-Preg) e hipertensas (HTN-Preg). A pressão arterial materna, os parâmetros fetais e placentários, a angiogenese e os níveis de H_2S também foram avaliados. **RESULTADOS:** A hipertensão gestacional foi associada ao desequilíbrio angiogênico e a restrição do crescimento fetal e placentário e o PVAT não se mostrou disfuncional. Além disso, sob a formação estimulada de H_2S pelo PVAT, mas não no endotélio, houve redução nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em aortas de ratas HTN-Preg. Ainda, o inibidor da síntese de H_2S foi responsável por eliminar os efeitos anticontráteis exercidos pelo PVAT e pelo endotélio. Ademais, o efeito anticontrátil do PVAT, mas não do endotélio foi abolido pelo bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Consistentemente, níveis elevados de H_2S no PVAT, placenta e plasma, mas não em aortas sem PVAT também foram observados no grupo HTN-Preg. **CONCLUSÃO:** O PVAT e o endotélio exercem efeitos anticontráteis, mas a ação do PVAT é dependente de canais de potássio sensíveis ao ATP em aorta de ratas prenhes normotensas e hipertensas, enquanto que a formação estimulada de H_2S preserva o efeito anticontrátil do PVAT, mas não do endotélio, em aorta de ratas prenhes hipertensas, sugerindo um papel fundamental do H_2S derivado do PVAT.

Palavras-chave:. Sulfeto de Hidrogênio; Tecido Adiposo Perivascular; Hipertensão Gestacional

Abstract

ABSTRACT

INTRODUCTION: Perivascular adipose tissue (PVAT) releases diffusible adipocyte-derived relaxing factors (ADRFs) under physiological conditions, which possibly play key roles to modulate the vascular tone. It was demonstrated that the inactivation of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) impaired the anticontractile effect of PVAT. Further studies have shown that hydrogen sulfide (H_2s) is released by PVAT due to the expression of cystathionine gamma lyase (CSE) and that (H_2s) acts through the activation of K_{ATP} channels. In addition, PVAT is impaired in pathophysiological situations such as hypertension. However, it is not yet well explorated during hypertension in pregnancy. Therefore, we aimed to examine the involvement of PVAT-derived H_2S to modulate the vascular tone in aorta from normotensive and hypertensive pregnant rats. **METHODS:** Phenylephrine-induced contractions in the presence and absence of PVAT and endothelium in aortas from normotensive pregnant (Norm-Preg) and HTN-Preg rats were investigated. Maternal blood pressure, fetal-placental parameters, angiogenesis and H_2S levels were also assessed. **RESULTS:** Hypertensive pregnancy associated with angiogenic imbalance and fetal-placental growth restrictions revealed that there is no PVAT dysfunction. Moreover, under stimulated H_2S formation PVAT, but not endothelium, reduces phenylephrine-induced contractions in aortas from HTN-Preg rats. Also, H_2S synthesis inhibitor abolishes anticontractile effects displayed by PVAT and endothelium. Furthermore, anticontractile effect of PVAT, but not of endothelium, was eliminated by ATP-sensitive potassium channels blocker. Consistently, increased H_2S levels in PVAT, placenta and plasma, but not in aortas without PVAT were observed in the HTN-Preg group as well. **CONCLUSIONS:** PVAT and endothelium provide anticontractile effects, but PVAT action is ATP-sensitive potassium channels dependent in aortas from normotensive and hypertensive pregnant rats, while stimulated H_2S production preserves anticontractile effect of PVAT, but not of endothelium, in aortas from hypertensive pregnant rats, implying a key role for PVAT-derived H_2S.

Key words: Hydrogen Sulfide; Perivascular adipose tissue; Hypertensive pregnancy.

Parte I

Introdução

INTRODUÇÃO

1.1. Tecido Adiposo Perivascular (PVAT)

O tecido adiposo perivascular (PVAT) por muitos anos foi limitado a um tecido de reserva energética e de termorregulação. No entanto, há mais de duas décadas foi observado que anéis aórticos de ratos com PVAT eram menos responsivos aos efeitos constritores de noreprinefrina quando comparados a anéis desprovidos de PVAT (Soltis e Cassis, 1991).

O PVAT corresponde a uma camada de gordura que envolve as principais artérias sistêmicas (Mann et al., 2015, Zaborska, Wareing e Austing, 2017). Demais estudos demonstram que o PVAT em condições normais libera substancias vasoativas atuando também sobre a modulação do tônus vascular (Beltowski, 2013; Ayala-Lopez *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2015). O PVAT é considerado um tecido adiposo misto, pois possui gordura marrom e gordura branca (Eringa, Bakker e Van Hinsbergh, 2012); é formado durante o desenvolvimento embrionário e permanece como uma camada fina que circunda os vasos e se mantém no decorrer da vida (Beltowski, 2013). Na década seguinte, foi observado que os efeitos vasoconstritores da angiotensina II, serotonina e fenilefrina (Phe) também eram menores na presença de PVAT (Lohn et al., 2002).

Foi demonstrado que o PVAT libera diversas substâncias vasodilatadoras incluindo o peróxido de hidrogênio (Gao *et al.*, 2007), a adiponectina (Fesus *et al.*, 2007), a angiotensina 1-7 (Lee *et al.*, 2009), o óxido nítrico (NO) (Dashwood *et al.*, 2007) e o metil palmitato (Lee *et al.*, 2011). Estudos sugerem que o PVAT secreta um fator humoral denominado fator de relaxamento derivado do tecido adiposo (ADRF, do inglês *adipose tissue derived relaxing factor*) (Dubrovska *et al.*, 2004, Mann *et al.*, 2015, Lee et al., 2009., Lohn et al., 2002) e ainda que, o efeito vasodilatador do ADRF foi atenuado na presença de glibenclamida, um bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) (Lohn et al.,

2002; Beltowski, 2013), sugerindo que a natureza molecular do ADRF pode ser vinculada ao H_2S, visto que as respostas obtidas nesses estudos que analisaram os mecanismos vasculares do ADRF comportam-se de forma semelhante às respostas vasculares do H_2S (Beltowski et al., 2015).

1.2. Sulfeto de Hidrogênio (H_2S)

A produção endógena do H_2S foi descrita por Abe & Kimura em 1996 (Abe e Kimura, 1996), incluindo o H_2S entre os transportadores gasosos, juntamente com o NO e o monóxido de carbono (CO). O H_2S pode ser produzido por vias não-enzimáticas e enzimáticas, sendo a via enzimática a de maior relevância, pois é responsável por produzir a maior parte do H_2S endógeno (Cirino, Velleco e Bucci, 2017). O H_2S é produzido pelas enzimas cistationina-γ-líase (CSE), cistationina-β-sintase (CBS) e pela 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) (Abe e Kimura, 1996; Hosoki, Matsuki e Kimura, 1997; Cirino Velleco e Bucci, 2017; Kanagy, Szabo e Papapetropoulos, 2017). A CBS está presente predominantemente no sistema nervoso central e no fígado, enquanto a 3MST esta majoritariamente presente na mitocôndria e a CSE no sistema cardiovascular (Powell et al., 2018). A produção endógena de H_2S no sistema cardiovascular pela CSE acontece na presença de um cofator chamado piridoxal 5-fosfato e de um substrato a L-cisteína (Asimakopoulou et al., 2013).

O H_2S possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, auxilia na inibição da formação de placas, reduz a pressão arterial e pode exercer efeito vasodilatador (Kanagy Szabo e Papapetropoulos, 2017). O papel do H_2S na regulação da pressão arterial foi observado em ratos *knockout* para CSE que desenvolveram hipertensão dependente de idade, hiper-homocisteinemia severa e disfunção endotelial (Yang *et al.*, 2008). Além disso, a inibição farmacológica da CSE com DL-propargilglicina (PAG) promoveu um

aumento da pressão arterial em ratos (Yan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013). Foi detectada a presença de CSE no coração, no fígado, nos rins, em aorta e no PVAT (Fang *et al.*, 2009). Foi também descrito que o H_2S é capaz de exercer efeitos diretos sobre a vasculatura, com resposta predominantemente vasodilatadora (D'emmanuele Di Villa Bianca *et al.*, 2011; Aydinoglu *et al.*, 2017; Ertuna *et al.*, 2017; Sheibani *et al.*, 2017), demonstrando a importância do H_2S no controle do tônus vascular, sugerindo maiores investigações quanto ao papel desse mediador em diversas desordens hipertensivas.

Estudos complementares demonstraram que os níveis de H_2S se apresentam diminuídos no plasma de gestantes com PE comparados a gestantes saudáveis (Wang *et al.*, 2013). Ainda, a expressão gênica da CSE mostrou-se diminuída em placenta de pacientes com PE (Wang *et al.*, 2013). Foi também demonstrado que, enquanto a incubação do plasma de mulheres com PE diminui a formação do tubo endotelial em um ensaio de angiogênese, a co-incubação desses plasmas com doadores exógenos de H_2S reestabelece a formação do tubo endotelial (Wang *et al.*, 2013). Ainda, o silenciamento da transcrição da CSE aumenta a produção do fator antiangiogênico sFlt-1 em células endoteliais (Wang *et al.*, 2013). Estudos realizados com modelos animais de hipertensão gestacional também mostram que a utilização de doadores de H_2S foi capaz reverter os aumentos da pressão arterial, aumenta o número de filhotes viáveis, diminui os níveis de sFlt-1 (Holwerda *et al.*, 2014; Possomato-Vieira *et al.*, 2016) e aumenta os níveis de VEGF (Holwerda *et al.*, 2014).

1.3. Canais de Potássio dependentes de ATP (K_{ATP})

O principal processo pelo qual o H_2S atua no processo de sinalização é a S-persulfidação, que consiste na conversão de um tiol a um persulfeto (Ono et al., 2014; Powell, Dillon e Matson, 2018). A S-persulfidacao dos canais de potássio sensíveis ao ATP contribuem para o efeito vasodilatador induzido pelo H_2S (Filipovic 2015).

Estudos demonstraram que a inibição dos canais K_{ATP} e a inibição farmacológica da CSE abolem a modulação vascular exercida pelo H_2S derivado do PVAT (Beltowski *et al.*, 2015, Fang et al., 2009). Ainda, a utilização de precursores exógenos que promovem a formação do H_2S independentemente da atividade da CSE, restauraram as respostas moduladoras do H_2S derivado do PVAT mesmo após a inibição farmacológica da enzima (Beltowski *et al.*, 2015), evidenciando a atuação moduladora do H_2S derivado do PVAT. Além disso, sugere-se que os canais de potássio também são modulados na gestação saudável e nas desordens hipertensivas inerentes à gestação (Meyer, Brayden e Mclaughlin, 1993; Xiao, Buchholz e Zhang, 2006; Zhu, Xiao e Zhang, 2013).

1.4. Fisiologia vascular da gestação

Durante a gestação as primeiras adaptações da vasculatura iniciam-se logo após a implantação do embrião no útero, processo que dá inicio à invasão troflobástica e marca os primeiros estágios da placentação (Huppertz e Peeters 2005). A gestação promove alterações no sistema vascular da mãe permitindo o desenvolvimento de um sistema vascular completamente novo dentro do embrião em crescimento, incluindo a formação da placenta como órgão de troca entre as duas circulações (Huppertz e Peeters 2005).

O evento primário referente as alterações vasculares é provavelmente a vasodilatação periférica, que até então é correlacionada com fatores dependentes do endotélio, como a síntese de NO, regulada positivamente pelo estradiol e por prostaglandinas vasodilatadoras (Soma-Pillay et al 2016). A vasodilatação periférica leva a uma redução da resistência vascular sistêmica, acompanhada do aumento do débito cardíaco e do volume sistólico e em menor grau um aumento de frequência cardíaca (Soma-Pillay et al 2016, Osol e Moore, 2014)

Níveis aumentados de estradiol estimulam o sistema renina-angiotensina aldosterona promovendo uma maior reabsorção de sódio pelos rins (Irani e Xia, 2008), causando o aumento do volume sanguíneo 50% mairo em gestantes, quando comparado a mulheres em estados não gravídicos (Hytten 1985, Bernstein, Ziegler e Badger, 2001). Como consequência há também um aumento na frequência cardíaca (Soma-Pillay et al 2016).

No inicio do segundo trimestre de gestação, os trofloblastos invadem o miométrio em direção as artérias espiraladas e causam uma reorganização da parede vascular (Osol e Moore, 2014). Inicialmente, esses trofoblastos expressam integrinas características de células epiteliais (Mcmaster et al., 2004). Entretanto, enquanto invadem o miométrio, passam a expressar integrinas características de células endoteliais (Mcmaster, Zhou e Fisher, 2004), promovendo um remodelamento da camada endotelial da artéria espiralada uterina, aumentando-lhe a complacência e o volume sanguíneo dessa região. Dessa forma, aumenta o fluxo sanguíneo para a placenta, fornecendo oxigênio e nutrientes necessários ao feto em desenvolvimento (Osol e Moore, 2014).

As alterações concomitantes ocorridas na circulação uterina promovem uma dimunição significativa na resistência vascular periférica podendo chegar a ser de 6 a 8 vezes menor do que em mulheres não grávidas (Clark et al., 1991; Palmer et al., 1992). Com isso, sabe-se que apresar do aumento do volume sanguíneo, débito e frequência cardícaca fisiologicamente não há um aumento na pressão arterial devido a redução da resistência vascular periférica (Williams et al. 1997). A redução mais acentuada ocorre na na circulação uterina, devido ao aumento do fluxo sanguíneo (30-50 vezes), durante a gestação, comparado a estados não-gravídicos (Sladek, Magness e Conrad, 1997; Bird, Zhang e Magness, 2003).

Além das adaptações vasculares, o processo de angiogenese também é essencial para as as adaptações fisiológicas do periodo gestacional. Sendo regulada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Possomato-Vieira e Khalil 2016) e pelo fator de crescimento placentário PLGF (Possomato-Vieira e Khalil 2016). Esses mediadores biológicos promovem seus efeitos pró-angiogênicos através do acoplamento com os receptors de tirosina-quinase associados à membrana, os quais são: receptor de VEGF do tipo 1 (VEGFR-1 ou Flt-1) ou do tipo 2 (VEGFR-2 ou Flk-1) (Jardim et al., 2015). Apesar de o PLGF possuir uma afinidade de 1/10 pelo receptor VEGFR-1 comparada ao VEGF, seus níveis em gestantes saudáveis estão 40 vezes maiores em comparação aos níveis de VEGF (Shah e Khalil, 2015). Conclui-se que por conta disso, o PlGF também contribui para a dilatação dos vasos uterinos, promovendo a proliferação de células endoteliais e atuando na vasculogênese e no desenvolvimento placentário (Shah e Khalil, 2015).

Estudos primordiais de Furchgott e Zawadski mostraram o papel do endotélio no relaxamento vascular (Furchgott and Zawadzki 1980), com o auxilío do óxido nítrico (NO), responsável por grande parte do relaxamento vascular mediado pelas células endoteliais (Furchgott and Jothianandan 1991, Furchgott 1996), demais estudos destacaram o papel do NO nas adaptações fisiológicas da gestação. (Williams et al. 1997, Nelson et al. 2000, Dotsch et al. 2001). No entanto, pouco se sabe do papel do PVAT e do H_2S derivado dele durante a gestação humana.

1.5. Doenças hipertensivas gestacionais

Em algumas mulheres podem ocorrer falhas nos mecanismos de adaptações vasculares durante a gestação e estas podem desenvolver desordens hipertensivas gestacionais (Uzan et al., 2011). Dados recentes dos Estados Unidos do Sistema de

Vigilância da Mortalidade na Gravidez apontam que 15,5% das causas de óbitos durante a gravidez são decorrentes de condições cardiovasculares (Creanga er al., 2017) tornando esse distúrbio altamente relevante na saúde da mulher.

Segundo a ultima publicação da ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) em 2013, doenças hipertensivas gestacionais são divididas em 4 categorias: 1- pré-eclâmpsia/ eclampsia, 2- hipertensão crônica, 3- hipertensão crônica com superimposição da pré-eclâmpsia e 4- hipertensão gestacional. A pré-eclampsia caracteriza-se por um aumento da pressão arterial (acima de 140 x 90mmHg) a partir da 20ª semana gestacional, acompanhada ou não de proteinúria (níveis acima de 300mg/24 horas) e/ou acomentimento de algum órgão alvo podendo progredir pra eclampsia e quadros convulsivos (ACOG 2013). A hipertensão crônica é caracterizada por uma pressão arterial elevada detectada antes da 20ª semana gestacional (ACOG 2013). Enquanto a hipertensão crônica com superimposição da pré-eclâmpsia trata-se de um aumento da pressão arterial antes da 20ª semana gestacional acompanhada dos sintomas da pré-eclâmpsia (ACOG 2013). Por fim, a hipertensão gestacional trata-se da elevação da pressão arterial após a 20ª semana gestacional desacompanhada de sinais ou sintomas referentes ao comprometimento de um órgão (ACOG 2013). Dados no Brasil, demonstraram que entre 2000 e 2009 dos 16.520 óbitos maternos registrados, (11,8%) ocorreram devido a eclampsia, e (6,22%) devido a hipertensão gestacional e pré eclampsia (Ferraz e Bordignon 2012).

A fisiopatologia dessas doenças ainda não esta completamente elucidada mas sabe-se que primeiramente ocorre à formação placentária ineficiente, acarretando em isquemia/hipóxia placentária; e posteriormente, é observada à presença de disfunção endotelial generalizada promovida por fatores ativos liberados pela placenta em decorrência da isquemia/hipóxia placentária (Possomato-Vieira e Khalil 2016). Um

importante fator liberado durante a hipertensão gestacional e a pré-eclampsia é o fms-like tirosina kinase-1 solúvel (sFlt-1), um *splice* variante do receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que por não possuir os domínios transmembranares e citoplasmáticos (Maynard *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2005), permanece circulante e age como potente antagonista do fator de crescimento placentário (PlGF). Diversos estudos mostram que o sFlt-1 encontra-se elevado em mulheres com PE (Maynard *et al.*, 2003; Eleuterio *et al.*, 2013; Bian, Shixia e Duan, 2015; Garamvolgyi *et al.*, 2015; March *et al.*, 2015; Tuzcu *et al.*, 2015), ao passo que o PlGF encontra-se reduzido no primeiro trimestre da gravidez das mulheres que desenvolvem a hipertensão gestacional e PE (Torry, Labarrere e Mcintyre, 1998). Ainda, a hipótese da ação de fatores bioativos circulantes sobre as células endoteliais pôde ser confirmada através da incubação de plasma/soro de mulheres com PE em células endoteliais (Donker *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Luizon *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2016; Rocha-Penha *et al.*, 2017). Sabe-se que esses acontecimentos acarretam numa disfunção endotelial que participa das alterações presentes nos disturbios hipertensivos da gestação (Possomato-Vieira e Khalil 2016).

1.6. Disfunção endotelial

A disfunção endotelial é caracterizada pelo aumento na produção de substâncias vasoconstritoras derivadas do endotélio, como a endotelina e a diminuição de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, como o NO (Zhu *et al.*, 2016), que além de ser um potente vasodilatador e regulador do tônus vascular, possui importante papel na angiogênese (Boopathy *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Diversos estudos na área de PE e hipertensão gestacional relatam que os níveis circulantes de NO encontram-se reduzidos em PE (Schiessl *et al.*, 2006; Ehsanipoor *et al.*, 2013; Eleuterio *et al.*, 2013;

Pimentel *et al.*, 2013) e na hipertensão gestacional experimental em ratas (Amaral *et al.*, 2015; Goncalves-Rizzi *et al.*, 2016).

Como previamente descrito, diversos estudos procuram entender o papel exercido pelo endotélio no controle do tônus vascular em diversas condições patológicas. Além do controle do tônus vascular exercido pelo endotélio, estudos demonstram que o tecido adiposo perivascular (PVAT) em condições normais libera substâncias vasoativas, atuando também sobre a modulação do tônus vascular (Beltowski, 2013; Ayala-Lopez *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2015). Embora o NO seja uma importante molécula moduladora do sistema cardiovascular, os efeitos do gasotransmissor H_2S tem despertado interesse nos últimos anos.

Sabe-se que a disfunção endotelial é um fator importante que interfere na fisiopatologia da hipertensão gestacional (Possomato-Vieira e Khalil 2016), mas pouco se sabe sobre a interferência do PVAT nessa condição, se ele se mantém integro ou se ele também é alvo de uma disfunção tecidual acarretando em maiores danos para a gestante.

1.7. Evidências do papel do Tecido Adiposo Perivascular (PVAT) no controle do tônus vascular

Embora existam evidências de que alterações nos níveis e/ou atividade do H_2S possam contribuir para a fisiopatologia da hipertensão gestacional (Wang *et al.*, 2013; Holwerda *et al.*, 2014; Possomato-Vieira *et al.*, 2016); e que o PVAT exerce papel no controle do tônus vascular (Ayala-Lopez *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2015; Al-Jarallah e Oriowo, 2016; Beltowski e Jamroz-Wisniewska, 2016), a modulação vascular exercida pelo H_2S derivado do PVAT na hipertensão gestacional permanece inexplorada.

Em condições fisiopatológicas como a hipertensão (Galvez *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2011), a aterosclerose (Chang *et al.*, 2013) e o diabetes (Eringa, Bakker e Van Hinsbergh, 2012) o PVAT se torna disfuncional assim, o efeito anticontrátil exercido pelo

PVAT é atenuado, e o PVAT altera seu papel protetor e começa a liberar fatores vasoconstritores e espécies reativas de oxigênio (Tano, Schileifenbaum e Gollasch, 2014). Em contrapartida, poucos estudos investigaram o papel do PVAT na gestação (Mann *et al.*, 2015; Al-Jarallah e Oriowo, 2016), intensificando a relevância de se esclarecer a participação do PVAT nas alterações fisiológicas da gestação e também na fisiopatologia da hipertensão gestacional.

1.8. Alternativas Terapêuticas na Hipertensão Gestacional

Evidências científicas demonstram que níveis elevados de H_2S estão relacionados com a modulação da pressão arterial (Wang et al., 2013). Considerando a importância da produção endógena de H_2S pela via enzimática da CSE no sistema cardiovascular (Powell, 2018) e que essa produção tem como substrato o aminoácido L-cisteína (Asimakopoulou et al., 2013) é sugerido investigar o papel da suplementação desse aminoácido em distúrbios como a hipertensão gestacional e a pré-eclâmpsia.

A L-cisteína é um aminoácido semi-essencial que contém enxofre, que pode ser sintetizada pelo fígado de mamíferos (Kaçar et al., 2018). Um estudo realizado com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) expostos a um alto consumo de sal, suplementados com L-cisteína demonstrou que ela pode evitar a hipertensão e também danos aos rins (HSU et al., 2018). Se o papel da L-cisteína e da suplementação da via do H_2S demonstrar efeitos favoráveis em condições como a de uma gestação hipertensa, posteriores estudos podem investigar a suplementação com L-cisteína como método de prevenção e tratamento de desordens hipertensivas na gestação. A fim de elucidar esses mecanismos nosso estudo objetivou examinar o envolvimento do H_2S derivado do PVAT na modulação do tônus vascular em aorta de ratas prenhes normotensas e hipertensas.

Parte II

Anticontractile effect of perivascular adipose tissue is enhanced by stimulated hydrogen sulfide formation and is ATP-sensitive potassium channel-dependent in hypertensive pregnant rats

Leticia C.C. Polonio[1], Edileia Souza-Paula[1], Gabriela Palma Zochio[1], Jose S. Possomato-Vieira[1], Katiussia Pinho da Silva[1], Helio Kushima[1] and Carlos A. Dias-Junior[1]

1 Department of Pharmacology, Biosciences Institute of Botucatu,

Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brasil.

Author for correspondence:

Dias-Junior, Carlos Alan,

Department of Pharmacology,

Biosciences Institute of Botucatu

Sao Paulo State University, Distrito de Rubiao Junior. S/N

18.618-689, Botucatu, SP, Brazil,

Email: carlos.dias-junior@unesp.br

Fax number: +55 14 3880-023

Disclosure

All authors declare that there are no conflicts of interest.

Abstract

Introduction: Perivascular adipose tissue (PVAT) may modulate the vascular tonus. Hydrogen sulfide (H_2S) is synthetized by cystathionine gamma-lyase (CSE) in PVAT. However, the role of PVAT-derived H_2S in hypertensive pregnancy (HTN-Preg) is unclear.

Methods: Phenylephrine-induced contractions in the presence and absence of PVAT and endothelium in aortas from normotensive pregnant (Norm-Preg) and HTN-Preg rats were investigated. Maternal blood pressure, fetal-placental parameters, angiogenesis and H_2S levels were also assessed.

Results: Hypertensive pregnancy associated with angiogenic imbalance and fetal-placental growth restrictions revealed that there is no PVAT dysfunction. Moreover, under stimulated H_2S formation PVAT, but not endothelium, reduces phenylephrine-induced contractions in aortas from HTN-Preg rats. Also, H_2S synthesis inhibitor abolishes anticontractile effects displayed by PVAT and endothelium. Furthermore, anticontractile effect of PVAT, but not of endothelium, was eliminated by ATP-sensitive potassium channels blocker. Consistently, increased H_2S levels in PVAT, placenta and plasma, but not in aortas without PVAT were observed as well.

Conclusions: PVAT and endothelium provide anticontractile effects, but PVAT action is ATP-sensitive potassium channels dependent in aortas from normotensive and hypertensive pregnant rats, while stimulated H_2S production preserves anticontractile effect of PVAT, but not of endothelium, in aortas from hypertensive pregnant rats, implying a key role for PVAT-derived H_2S.

Keywords: Hydrogen sulfide; Perivascular adipose tissue; Hypertensive pregnancy.

1. INTRODUCTION

The perivascular adipose tissue (PVAT) is a thin fat layer that surrounds the main systemic arteries [1]. It has been reported that PVAT releases diffusible adipocyte-derived relaxing factors (ADRFs) under physiological conditions, which possibly play key roles to modulate the vascular tone [1,2,3]. Systemic arteries outfitted with PVAT have shown attenuated vascular contractions to angiotensin II, serotonin and phenylephrine [3]. The activation of potassium channels in vascular smooth muscle cells by ADRF has been suggested as major PVAT-dependent mechanism to vasodilation [4,5,6]. Importantly, hydrogen sulfide (H_2S) has been a target to clarify underlying mechanisms, because it acts through the activation of potassium channels and is synthetized by PVAT as well [5].

In male rats, previous findings revealed that H_2S may be an ADRF and that H_2S produced by PVAT was stimulated by phenylephrine-induced contraction, suggesting that anti-contractile effect referred to PVAT may be, at least in part, H_2S-dependent [5,7]. Also, the CSE may be the main synthase of the PVAT [8] to produce H_2S in the presence of its substrate (L-Cysteine) and its cofactor (Pyridoxal 5-phosphate) [9]. Accordingly, the anti-contractile effect of PVAT was impaired by CSE inhibitor propargylglycine (PAG) [8,10], which also reduced H_2S production by rat adipocytes and pre-adipocytes [11]. Inagaki 1996 [12] reported that glibenclamide was a selective blocker of ATP-sensitive potassium channels and it was also demonstrated that this blockage attenuated anticontractile effect found in aorta outfitted with PVAT [3,13]. Together, these previous results propose H_2S as a major ADRF released by adipocytes under physiological conditions. However, the function of PVAT-derived H_2S in modulating vascular tone is still unclear during pregnancy.

Healthy gestation has been associated with changes in adipose tissue distribution, showing tendency towards a reduction of subcutaneous and accumulation of preperitoneal adipose tissue depot [14]. Furthermore, healthy pregnancy is characterized by reduced systemic vascular resistance [15], suggesting that this cardiovascular adaptation may also be resultant of PVAT-dependent anti-contractile effect [1]. In search of vascular mechanisms underlying the anti-contractile effect presented by PVAT in pregnancy, we hypothesized H_2S may belong to the ADRFs group [5,8] and that PVAT-derived H_2S participates at the complex vascular physiological changes that occurs in healthy pregnancy.

By contrast, in pathophysiological conditions such as hypertension, PVAT possibly becomes dysfunctional [16,17] thus, the abovementioned “anti-contractile effect displayed by PVAT” is impaired, and, PVAT switches its protective role and starts to release vasoconstriction factors and reactive oxygen species [18]. However, it is not yet known whether the loss of PVAT-dependent anti-contractile effect occurs in hypertension in pregnancy. Therefore, this study aimed to examine the involvement of PVAT-derived H_2S to modulate the vascular tone in aorta from normotensive and hypertensive pregnant rats.

2. METHODS

2.1 Animals

Female Wistar rats (200-250 g) were housed in cages at 22 ± 2ºC on a 12-hour light/dark cycle, given free access to rat chow and drinking water, and, were mated overnight. The first pregnancy day was defined when spermatozoa and estrous cells were found in a vaginal smear.

Pregnant rats were randomized and assigned to two groups: **Norm-Preg group** (n=8) in which animals received intraperitoneal (i.p.) injections of vehicle (propylene glycol, 0.2-0.25 mL) on pregnancy days 1, 7 and 14; while in **HTN-Preg group** (n=8), hypertensive pregnancy was induced by the replacement of drinking water by 0.9% saline solution and by i.p. injections of desoxycorticosterone acetate (DOCA Sigma, St. Louis, MO, #D7000) on pregnancy day 1 (12.5 mg of DOCA/Kg) and on pregnancy days 7 and 14 (6.25 mg of DOCA/Kg), as previously described [19,20].

The animals were killed on gestational day 19 under overdose of isoflurane followed by exsanguination. Blood samples were collected in heparin tubes (Vacuntainer Becton Dickinson, Oxford, UK) for plasma separation. Plasma was stored at -80ºC until use for biochemical analysis. Thoracic aorta (with intact PVAT) were rapidly excised and placed in cold Krebs physiological solution to perform the experiments in organ bath chamber, and other fragments were stored at -80ºC until use for biochemical analysis.

All animal experiments were complied with the Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines, and were carried out in accordance with the National Institute of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH - Publications No. 8023, revised 1978), and, all procedures for animal experiments were approved by our institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Biosciences Institute, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil (protocol number: 1083/2018).

2.2 Blood Pressure measurements

Systolic blood pressure was measured using tail-cuff plethysmography (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalog #EFF 306) on pregnancy day 19. Conscious rats were first acclimated in a quiet room, conditioned and restrained for 5-10 minutes in a warm box (Insight, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, catalog #EFF 307). Systolic blood pressure was determined as the average of the cuff inflation-deflation (three to six) cycles by a trained operator.

2.3 Fetal and placental parameters

After euthanasia, dams were placed in a supine position and a caesarean section was performed to open the uterus. Then, litter size (total numbers of pups) and individual fetal and placental weights were recorded.

2.4 Aorta rings preparation and vascular reactivity experiments

With the aid of a dissection microscope, the thoracic aorta was carefully removed from the rat and cut into rings of 4 mm in length. Then, we examined vascular function in thoracic aorta as following: endothelium-intact aortas with PVAT (**+PVAT+E**), endothelium-denuded aortas with PVAT (**+PVAT-E**), endothelium-intact aortas without PVAT (**-PVAT+E**) and endothelium-denuded aortas without PVAT (**-PVAT-E**). For removed PVAT rings, surrounding PVAT was carefully dissected and separated from the artery. For endothelium-denuded rings, the endothelium was removed by scraping the vessel interior five times around the tip of forceps.

Thoracic aorta rings were placed into a 10mL organ chamber containing Krebs-Henseleit physiological solution (in mmol/L): NaCl 130; KCl 4.7; $CaCl_2$ 1.6;

KH_2PO_4 1.2; $MgSO_4$ 1.2; $NaHCO_3$; glucose 11.1; gassed continuously with a mixture of 95% O_2/5% CO_2, and maintained at 37°C and pH 7.4. Thoracic aorta rings were suspended between two wire hooks. One hook was fixed to a stationary support, and the other hook connected to an isomeric 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 [13, 21] and then were allowed to equilibrate for 60 min, with the bath physiological solution being changed every 15 to 20 min [13, 21].Changes in aorta tension were recorded using FORT10 isometric force transducers connected to a PC-based MP100 System and analyzed off-line using Acqkowledge version 3.5.7 software (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA).

After tissue equilibration, each thoracic aorta ring was challenged to maximal (96 mM) potassium chloride (KCl) contraction. In order to examine the PVAT and endothelial functions in regulating vascular tone, thoracic aorta rings were stimulated with KCl (10-120 mM) and phenylephrine (Phe, 10^{-10} – 10^{-4} M), which were cumulatively added into the organ bath chamber, and the evoked responses (g) were plotted to obtain concentration-response curves.

Phenylephrine-induced contractions (Phe, 10^{-10} – 10^{-4} M) were also examined incubating aorta rings with L-Cysteine (10 mM) [22] associated with Pyridoxal-5 phosphate (2 mM) [22] that are substrate and cofactor (respectively) for H_2S synthesis (for 10 minutes). L-Cysteine, in the presence of Pyridoxal-5 Phosphate, is converted enzymatically by CSE, an important H_2S synthase [9] and that is also expressed in PVAT [8].

Phenylephrine-induced contractions (Phe, 10^{-10} – 10^{-4} M) were also evaluated in the presence of DL-propargylglycine (PAG - 1mM, a CSE irreversible inhibitor)

[23,24]. To examine the importance of H_2S synthesized by CSE, phenylephrine-induced contractions (Phe, 10^{-10} – 10^{-4} M) were assessed with Pyridoxal 5-phosphate (2mM) [22], L-Cysteine (10mM) [22] and PAG (1mM) [23]. Also, to investigate the involvement of ATP-sensitive potassium channels in the H_2S effects, glibenclamide (1μM) [12] was incubated during 30 minutes before phenylephrine-induced contractions (Phe, 10^{-10} – 10^{-4} M) were evoked. All aforementioned drugs were pipetted directly into the organ chamber bath.

2.5 Drug solutions

The following compounds were used in this study: Phenylephrine (P6126), Acetylcholine (A-6625), Glibenclamide (PHR1287), DL-propargylglycine (P7888), L-Cysteine (w326305), Pyridoxal 5-phosphate (P9255), Deoxycorticosterone acetate (DOCA-D7000) and Sodium hydrosulfide (NaHS-161527). Glibenclamide was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO - D1435), DOCA was dissolved in propylene glycol (1883) whereas all other compounds were dissolved in distilled water. Propylene glycol was purchased from Dinamica chemicals (Sao Paulo, Brazil) and other compounds were purchased from Sigma chemicals (St. Louis, MO, USA).

2.6 Determination of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PLGF)

Commercial enzyme immunoassay (ELISA) kits for sFlt-1 (RayBiotech Inc., Norcross, GA, #ELM-VEGFR1) and PLGF (Elabscience Inc., Houston, TX, #E-EL-R0742) were used to determine plasma levels. Assays were performed according to

the manufacturer's instructions. Plasma levels of sFlt-1 and PLGF were expressed in pg/ml.

2.7 Determination of H_2S in PVAT, aortas without PVAT, plasma and placenta

H_2S levels were carried out based on the formation of lead sulfide [22, 25]. Briefly, PVAT, aortas without PVAT and placenta from Norm and HTN-Preg rats were excised, homogenized and centrifuged (10,000*g*, 10 min, 4 °C) and the H_2S levels were assessed in supernatants form each tissue as following:

Supernatants from PVAT, aorta without PVAT and placenta (200-400 µg protein) were incubated with substrate (L-Cysteine 10 mM and cofactor (Pyridoxal 5-phosphate 2 mM) for 4 h at 37 °C. The dark dots densities on the lead acetate white paper strips (12 × 8 cm) placed over the 96-wells microplate were analyzed from the digitalized images using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). H_2S concentrations were extrapolated from a calibration curve generated with a H_2S donor NaHS (7.8–500 µM) and expressed as µmol/L.

Plasma H_2S levels were examined as previously shown [26,27]. The absorbance of the resulting reaction was measured at 670 nm with a spectrophotometer (Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT, USA) in a 96-well plate. The concentration of H_2S in the solution was calculated against a calibration curve of NaHS (100-3.13 µmol/L).

2.8 Data analysis and statistics

The results are expressed as mean ± SD. Using Graph Pad Prism (Software version 6.0, San Diego, CA, USA) a Shapiro–Wilk test was applied to verify normality of data distribution. Comparisons between groups for values registered at the

pregnant rats and feto-placental parameters, and biochemical assays were assessed by *t* test.

For vascular reactivity experiments, individual concentration-contraction curves were constructed; sigmoidal curves were fitted to the data using the least square method, and the pEC_{50} values were calculated, and comparisons among E_{max} and pEC_{50} values were done. Probability value of $P < 0.05$ was considered significant. To compare E_{max} and pEC_{50} values, we used one-way analysis of variance (ANOVA), and the Tukey's test for *post hoc* analysis was applied; while two-way ANOVA was handled to examine the differences at the phenylephrine concentrations (point-by-point) among the thoracic aorta rings.

3. Results

Increases in systolic blood pressure measurements were found in HTN-Preg rats in comparison to those recorded in Norm-Preg group (Tab. 1, *P<0.05), while no significant differences were observed in body weight gain (Tab. 1). Furthermore, plasma sFlt-1 levels were significantly increased in the HTN-Preg compared to Norm-Preg group (Tab. 1, *P<0.05). In contrast, plasma PLGF levels were greater in the Norm-Preg compared to HTN-Preg group (Tab. 1, *P<0.05). In addition to the maternal parameters, fetal and placental developments were also assessed. We found significant decreases in pup and placental weights as well as in litter size in the HTN-Preg compared to Norm-Preg group (Tab. 1, *P<0.05).

Tab. 1 Effects of hypertensive pregnancy on maternal, fetal and placental parameters, and angiogenesis biomarkers.

Biological parameters	Norm-Preg	HTN-Preg
Systolic Blood Pressure (mmHg)	126 ± 7	163 ± 11 *
Body Weight gain (g)	82 ± 17	58 ± 24
sFlt-1 (pg/ml)	114 ± 107	406 ± 119*
PLGF (pg/ml)	81 ± 18	36 ± 19*
Placental Weight (g)	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1*
Pup Weight (g)	2.9 ± 1.0	1.7 ± 0.1*
Litter Size	13 ± 1	11 ± 3

Data are expressed as mean ± SD**.** Symbols represent significant differences for HTN-Preg compared to Norm-Preg group (*P<0.05, *t* test).

All endothelium-intact or endothelium-denuded aorta rings with or without PVAT, from Norm-Preg and HTN-Preg groups, presented similar baselines. Also, maximal KCl-induced contractions (96 mM) showed no significant differences among all aorta rings (data not shown).

In Norm-Preg rats, concentration-responses (range: 10^{-7}-10^{-4} M) and maximum response to phenylephrine-induced contractions were statistically lower in endothelium-denuded aortas with PVAT and endothelium-intact aortas without PVAT compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig.1A and Tab. 2, P <0.05). Also, endothelium-denuded aortas without PVAT revealed increases in maximum response to phenylephrine compared to endothelium-denuded aortas with PVAT, endothelium-intact aortas without PVAT and endothelium-intact aortas with PVAT (Fig.1A and Tab. 2, P <0.05). Regarding to pEC_{50}, endothelium-intact aortas with PVAT showed lower values compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Tab. 2, P <0.05). In addition, endothelium-denuded aortas with PVAT and

endothelium-intact aortas without PVAT showed similar pEC_{50} values to those calculated for endothelium-denuded aortas without PVAT (Tab. 2).

In HTN-Preg rats, concentration-responses (range: 10^{-7}-10^{-4} M) to phenylephrine-induced contractions were statistically lower in endothelium-intact aortas without PVAT, but not in endothelium-denuded aortas with PVAT, compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig.1B, $P < 0.05$). Moreover, lower pEC_{50} values were observed in endothelium-intact aortas with PVAT compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Tab. 2, $P < 0.05$). Moreover, endothelium-intact aortas without PVAT, but not endothelium-denuded aortas with PVAT, presented significant decreases in maximum response to phenylephrine compared to endothelium-denuded aortas without PVAT, and, endothelium-denuded aortas without PVAT displayed increases in maximum response to phenylephrine compared to endothelium-intact aortas with PVAT (Fig.1B and Tab. 2, $P < 0.05$).

To study the role of PVAT-derived H_2S in modulating the vascular tonus, we examined phenylephrine-induced contractions in aortas pre-incubated with Pyridoxal 5-phosphate and L-Cysteine. In this experimental approach, concentration-response to phenylephrine-induced contractions (range: $10^{-6,5}$ – 10^{-4} M) were significantly lower in endothelium-denuded aortas with PVAT and endothelium-intact aortas without PVAT compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig. 1C, $P < 0.05$). However, similar maximum responses to phenylephrine were found among endothelium-denuded aortas with PVAT, endothelium-intact aortas without PVAT and endothelium-intact aortas with PVAT (Fig. 1C and Tab. 2), while endothelium-denuded aortas without PVAT presented increases in maximum responses to phenylephrine compared to the others (Fig.1C and Tab. 2, $P < 0.05$). Regarding to pEC_{50}, endothelium-denuded aortas with PVAT and endothelium-intact aortas with

PVAT showed lower values than endothelium-intact and endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig.1C and Tab. 2, $P < 0.05$).

In HTN-Preg rats, significant decreases in maximum responses to phenylephrine were found in endothelium-denuded aortas with PVAT, but not in endothelium-intact aortas without PVAT, compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig. 1D and Tab. 2, $P < 0.05$). Regarding to pEC_{50}, no significant differences were observed among all aortas (Tab. 2). Also, we found significant lowers values (range: $10^{-5,5}$ – 10^{-4} M) to phenylephrine-induced contractions in endothelium-denuded and endothelium-intact aortas with PVAT compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig. 1D, $P < 0.05$), while no significant differences were found in endothelium-intact aortas without PVAT compared to endothelium-denuded aortas without PVAT (Fig. 1D).

In order to investigate whether vascular tonus is modulated by CSE-derived H_2S, a set of experiments was carried out after pre-incubation with PAG (CSE inhibitor). In this experimental approach, no significant differences were found in maximum responses to phenylephrine and concentration-response curves to phenylephrine-induced contractions in all aortas from both Norm-Preg and HTN-Preg rats (Fig. E and F, and Tab. 2). Furthermore, pEC_{50} values were lower in endothelium-intact aortas with PVAT when compared to endothelium-denuded aortas without PVAT from Norm-Preg rats (Fig.1E and Tab.2, $P < 0.05$). Also, pEC_{50} values were decreased in endothelium-intact aortas with PVAT when compared to endothelium-intact aortas without PVAT and endothelium-denuded aortas without PVAT from HTN-Preg rats (Fig.1F and Tab. 2, $P < 0.05$).

To examine the involvement of CSE-synthesized H_2S, phenylephrine-induced contraction curves were conducted in aortas pre-incubated with cofactor (Pyridoxal 5-phosphate), substrate (L-Cysteine) and inhibitor (PAG) of CSE. Then, we found no anticontractile effect of PVAT and endothelium because no reductions in maximum responses to phenylephrine were observed in all aorta preparations from Norm-Preg rats (Fig. 1G and Tab.2). Furthermore, confirming anticontractile effect of PVAT-derived H_2S, but not endothelium-derived H_2S, increased sensitivity to phenylephrine-induced contraction was found, because pEC_{50} value was statistically lower for endothelium-denuded aortas with PVAT compared to endothelium-intact aortas without PVAT from Norm-Preg rats (Tab. 2). Moreover, in aortas from HTN-Preg rats, we also observed no reduction in phenylephrine-induced contraction, by contrast, endothelium-denuded aortas with PVAT displayed maximum responses to phenylephrine significantly higher than those found in respective aortas under incubation with Pyridoxal 5-phosphate and L-Cysteine in the absence of PAG (Fig. 1H and Tab. 2, $P<0.05$), but no significant differences in pEC_{50} values were found among all aortas from HTN-Preg rats (Tab. 2). Furthermore, significant differences to phenylephrine-induced contractions (range: $10^{-6.5}$ – $10^{-4.5}$ M in Norm-Preg group, Fig. 1G, $P<0.05$, and, range: 10^{-6} – 10^{-5} M in HTN-Preg group, Fig. 1H, $P<0.05$) were observed comparing endothelium-denuded aortas with PVAT versus endothelium-intact aortas without PVAT.

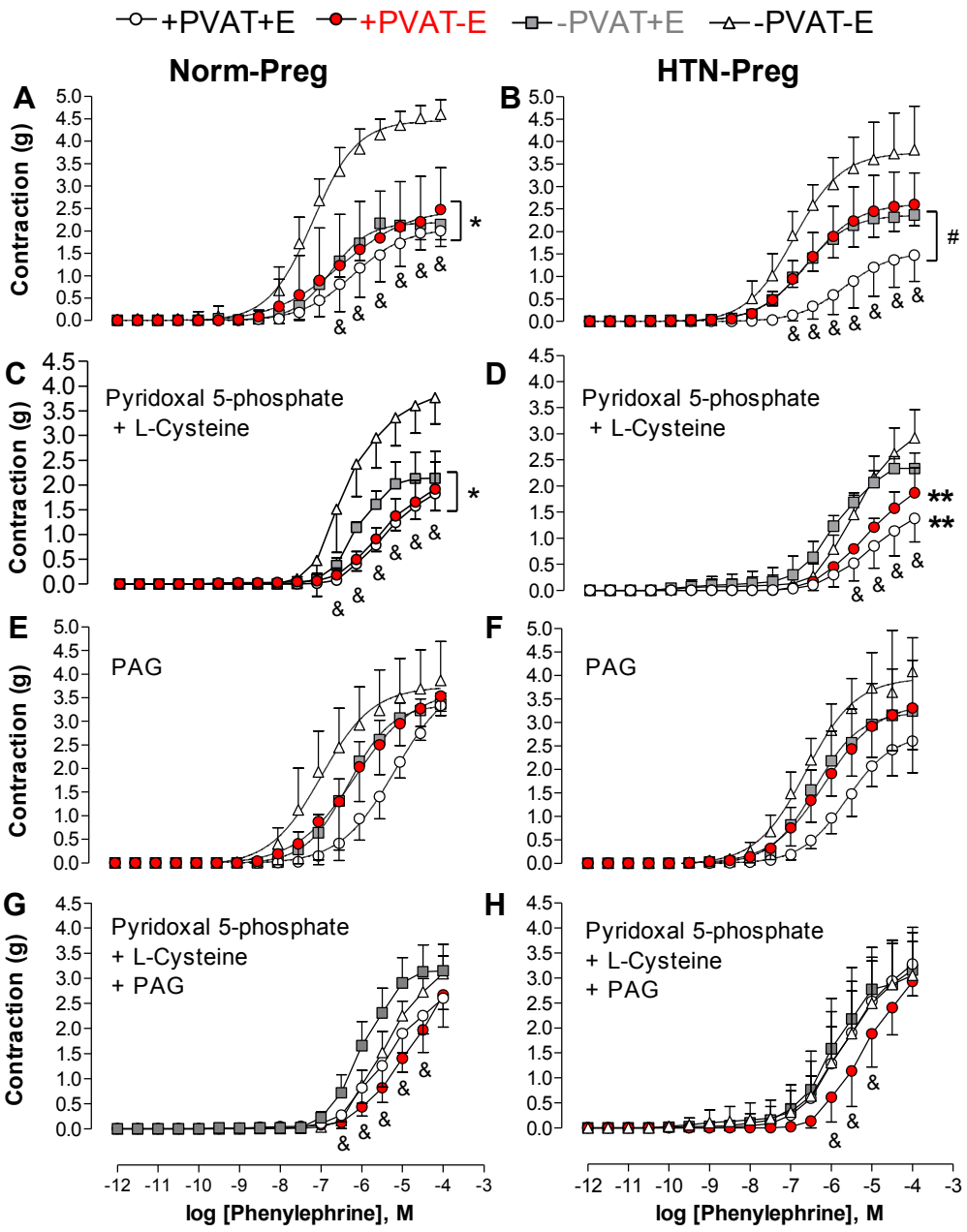


Fig. 1 Influence of the PVAT-derived H_2S on vascular contractions in aortas from normotensive (Norm-Preg) and hypertensive (HTN-Preg) pregnant rats. Endothelium-intact aortas with PVAT (+PVAT+E), endothelium-denuded aortas with PVAT (+PVAT-E), endothelium-intact aortas without PVAT (-PVAT+E) and endothelium-denuded aortas without (-PVAT-E) were submitted to cumulative concentration-response curves to phenylephrine (A and B) and in the presence of cofactor and substrate for H_2S synthesis (C and D) or CSE inhibitor (E and F) or cofactor, substrate and CSE inhibitor (G and H). Data are expressed as mean ± SD of 10 experiments. Symbols represent significant differences for +PVAT+E, +PVAT-E and -PVAT+E versus -PVAT-E (*P<0.05, one-way ANOVA, panel A and C) or +PVAT+E and -PVAT+E versus -PVAT-E ($^{\#}$P<0.05, one-way ANOVA, panel B) or

+PVAT+E and +PVAT-E versus -PVAT-E (**P<0.05, one-way ANOVA, panel D). Significant differences in the ranges for +PVAT+E, +PVAT-E and -PVAT+E versus respective -PVAT-E ($^{\&}$P<0.05, two-way ANOVA, panels A and C) or +PVAT+E and -PVAT+E versus respective -PVAT-E ($^{\&}$P<0.05, two-way ANOVA, panel B) or +PVAT+E and +PVAT-E versus respective -PVAT+E and -PVAT-E ($^{\&}$P<0.05, two-way ANOVA, panel D) or +PVAT-E versus respective -PVAT+E ($^{\&}$P<0.05, two-way ANOVA, panels G and H).

We also examined involvement of voltage-gated calcium channels in our study. Then, we observed that aortas from both Norm-Preg and HTN-Preg rats showed no significant differences neither in cumulative concentration-response curves to KCl-induced contractions or in pEC_{50} values from all preparations with or without PVAT (Fig.2A and 2B, and Tab. 2).

To assess anticontractile effect of PVAT dependent of ATP-sensitive potassium channels activation, a set of experiments were carried out after pre-incubation with glibenclamide. In this approach, we observed that endothelium-denuded aortas with PVAT presented similar maximum responses to phenylephrine to those found in endothelium-denuded aortas without PVAT, which were significantly greater than those displayed by endothelium-intact aortas with PVAT and endothelium-intact aortas without PVAT from Norm-Preg and HTN-Preg rats (Fig.2C and 2D, and Tab.2, P <0.05). Also, pEC_{50} values were not different among aorta rings in the Norm-Preg group (Fig.2C and Tab. 2, P <0.05). In contrast, pEC_{50} values of endothelium-denuded aortas with PVAT were significantly lower when compared to endothelium-denuded aortas without PVAT and higher when compared to endothelium-intact aortas with PVAT from HTN-Preg rats (Fig.2D and Tab.2, P<0.05).

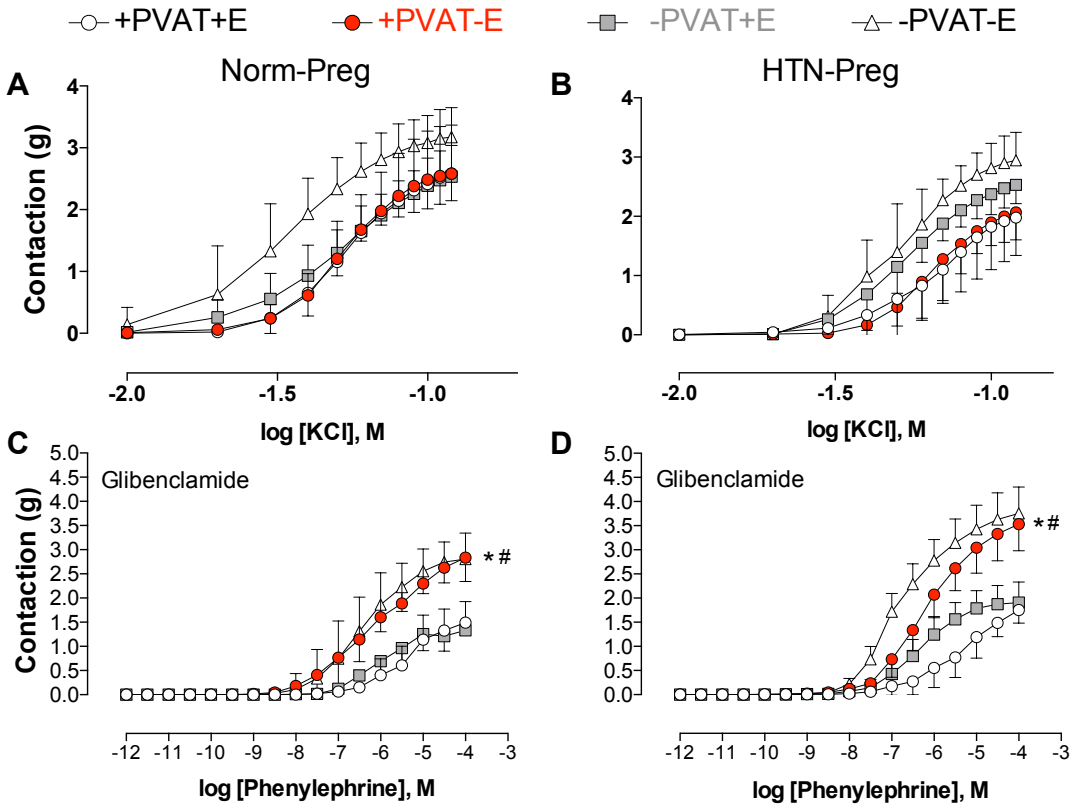


Fig. 2 Involvement of voltage-gated calcium channels and ATP-sensitive potassium channels on anti-contractile effect of PVAT in aortas from normotensive (Norm-Preg) and hypertensive (HTN-Preg) pregnant rats. Endothelium-intact aortas with PVAT (+PVAT+E), endothelium-denuded aortas with PVAT (+PVAT-E), endothelium-intact aortas without PVAT (-PVAT+E) and endothelium-denuded aortas without (-PVAT -E) were submitted to cumulative concentration-response curves to KCl (A and B) or cumulative concentrations-response curves to phenylephrine in the presence of ATP-sensitive potassium channels blocker. Data are expressed as mean ± SD of 10 experiments. Symbols represent significant differences for +PVAT-E compared to +PVAT+E (*P<0.05, one-way ANOVA) or +PVAT-E compared to -PVAT+E ($^{\#}$P<0.05, one-way ANOVA).

Tab. 2 Maximal response (E_{max}) and negative logarithm of the concentration that evoked 50% of the maximal response (pEC_{50}) were recorded for phenylephrine (Phe)-induced contraction in the absence (or presence) of Pidoxal 5-phosphate (PLP) and L-Cysteine (L-Cys) or PAG or PLP, L-Cys and PAG, and, KCl-induced contraction or Phe-induced contraction in the presence of glibenclamide in aortas from Norm-Preg and HTN-Preg rats, which were segmented as following: endothelium-intact aortas with PVAT (+PVAT+E), endothelium-denuded aortas with PVAT (+PVAT-E), endothelium-intact aortas without PVAT (-PVAT+E) and endothelium-denuded aortas without PVAT (-PVAT -E).

	Norm-Preg				HTN-Preg			
E_{max} and respective pEC_{50}	**+PVAT+E**	**+PVAT-E**	**-PVAT+E**	**-PVAT-E**	**+PVAT+E**	**+PVAT-E**	**-PVAT+E**	**-PVAT-E**
Phe E_{Max}	2.0 ± 0.3 *	2.3 ± 0.5 *	2.2 ± 0.3 *	4.6 ± 0.3	1.5 ± 0.6 *	2.6 ± 0.7	2.4 ± 0.3 *	3.8 ± 0.9
Phe pEC_{50}	6.1 ± 0.7	6.4 ± 0.7	6.7 ± 0.3	7.2 ± 0.2	5.4 ± 0.9 *	6.5 ± 0.3	6.7 ± 0.3	7.1 ± 0.4
Phe +PLP +L-Cys E_{Max}	1.8 ± 0.4 *	1.9 ± 0.8 *	2.1 ± 0.9 *	3.8 ± 0.8	1.3 ± 0.5 *	1.9 ± 0.5 *	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.5
Phe +PLP +L-Cys pEC_{50}	5.3 ± 0.3 *	5.4 ± 0.2 * #	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.3	5.0 ± 0.4	5.2 ± 0.3	5.8 ± 0.3	5.4 ± 0.2
Phe +PAG E_{Max}	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.9 ± 0.8	2.6 ± 0.7	3.3 ± 0.9	3.2 ± 1.1	4.1 ± 0.7
Phe +PAG pEC_{50}	5.2 ± 0.4 *	6.2 ± 0.5	6.3 ± 0.2	6.9 ± 0.4	5.6 ± 0.3 * #	6.2 ± 0.4	6.4 ± 0.1	6.7 ± 0.3
Phe +PLP L-Cys +PAG E_{max}	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.6	3.1 ± 0.5	3.0 ± 0.3	3.2 ± 0.6 $	2.9 ± 0.3 $	3.2 ± 0.6	3.1 ± 0.9
Phe +PLP L-Cys +PAG pEC_{50}	5.3 ± 0.4	4.7 ± 0.4 #	6.0 ± 0.1	5.5 ± 0.3	5.5 ± 0.5	5.3 ± 0.4	5.9 ± 0.6	5.7 ± 0.5
KCl E_{Max}	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.8	2.5 ± 0.5	3.1 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.7	2.5 ± 0.3	2.9 ± 0.5
KCl pEC_{50}	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Phe +Glibenclamide E_{Max}	1.5 ± 0.4	2.8 ± 0.5 # +	1.4 ± 0.1	2.8 ± 0.5 # +	1.7 ± 0.3	3.5 ± 0.5 # +	1.9 ± 0.4	3.7 ± 0.4 # +
Phe +Glibenclamide pEC_{50}	5.3 ± 0.5	6.1 ± 1.0	5.9 ± 0.6	6.4 ± 0.3	5.3 ± 0.5 * #	6.2 ± 0.3 *+	6.4 ± 0.3	6.8 ± 0.2

Data are expressed as mean ± SD of 10 experiments. Symbols represent significant differences versus respective -PVAT-E (*P<0.05, one-way ANOVA) or versus respective -PVAT+E ($^{\#}$P<0.05, one-way ANOVA) or versus respective +PVAT+E ($^{+}$P<0.05, one-way ANOVA) or E_{max} values in Phe+PLP+Lcys+PAG for +PVAT+E and +PVAT-E versus respective values in Phe+PLP+L-Cys incubation ($^{\$}$P<0.05, *t* test).

Endogenous H_2S formation was assessed in PVAT, aorta without PVAT, plasma and placenta from Norm-Preg and HTN-Preg groups. We found that there were increases in H_2S formation in PVAT from HTN-Preg (243 ± 115 nmol/mg protein) compared to Norm-Preg (183 ± 105 nmol/mg protein) group (Fig.3A), but no difference was found in H_2S formation in aorta without PVAT between Norm-Preg (235 ± 106 nmol/mg protein) and HTN-Preg (255 ± 54 nmol/mg protein) group (Fig. 3B). However, increases in plasma H_2S levels were observed in HTN Preg (68 ± 5 μmol/L) compared to Norm Preg (37± 5μmol/L) group (Fig.3C). Moreover, placental

H_2S levels were greater in HTN-Preg (245 ± 101 μmol/L) compared to Norm-Preg (147 ± 73μmol/L) rats (Fig. 3D).

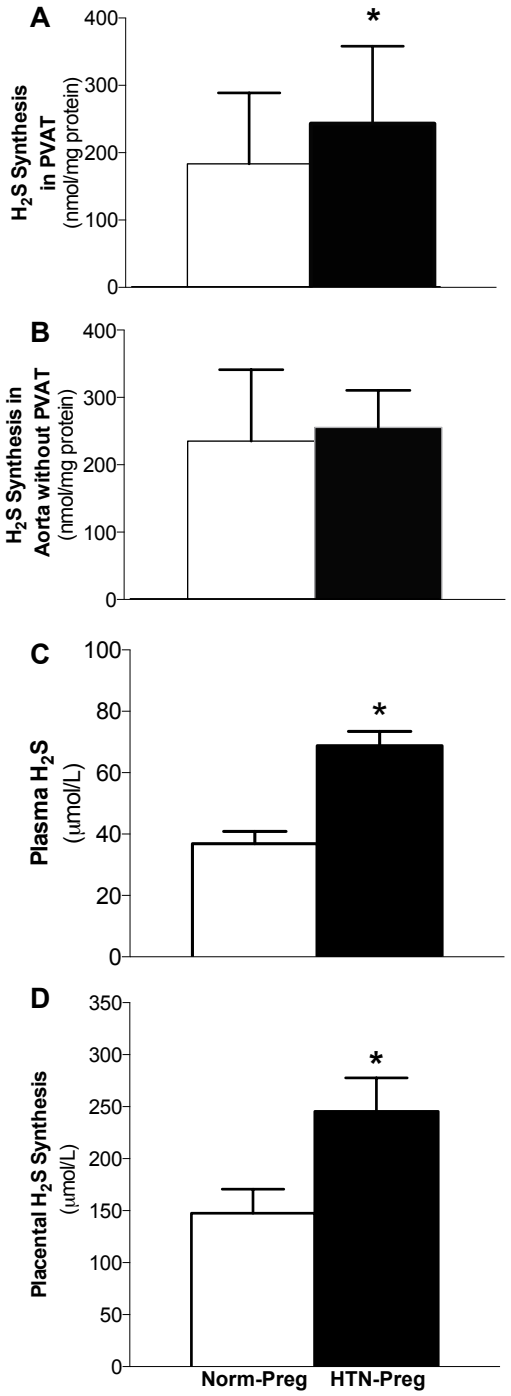


Fig. 3 Effects of hypertension in pregnancy on H_2S levels. Panels are plotted as following: PVAT (A), aorta without PVAT (B), plasma (C) and placenta (D). Data are

expressed as mean ± SD**.** Symbols represent significant differences for HTN-Preg compared to respective Norm-Preg group (*P < 0.05, *t* test).

4. DISCUSSION

The present study evaluated the influence of PVAT on vascular contractions of aortas from normotensive and hypertensive pregnant rats. We observed that stimulation of H_2S formation enhances anticontractile effect of PVAT. Also, anticontractile effect of PVAT, but not of endothelium, is ATP-sensitive potassium channel-dependent. In addition, both anticontractile effects of PVAT and endothelium are abolished by CSE inhibitor. Furthermore, increases in PVAT-derived H_2S was found in HTN-Preg rats as well as in plasma and placenta, but not in aortas without PVAT.

Previous findings have shown that phenylephrine-induced contractile responses were attenuated when isolated arteries from non-pregnant rats were exposed to PVAT from pregnant rats [1]. In accordance, an elegant earlier study revealed that PVAT mediates anticontractile action in the arteries from healthy male and female rats [28]. By contrast, under pathophysiological conditions, there may be PVAT dysfunction followed by contractile (not anticontractile) action, including high-fat diet-fed rats, in which authors reported that PVAT evokes a contractile effect in male rats and a trend towards PVAT in being contractile in female rats when compared to respective controls [28]. Furthermore, loss of anticontractile effect of PVAT was also identified in spontaneous hypertensive male rats during aging [29].

Our present study suggests that there may be not PVAT dysfunction in pregnant rats, because PVAT shows a significant anticontractile effect, similarly to

the endothelium, in aortas from normal pregnant rats, and, a trend of anticontractile effect of PVAT in aortas from hypertensive pregnant rats, suggesting that these anticontractile effects to phenylephrine-induced contractions may be involved in the vascular adaptations that occur during pregnancy. However, our present observations contrast with previous study in which was showed loss of anticontractile effect of PVAT in pregnant compared to non-pregnant rats [30].

To expand our findings, we also examined the anticontractile effects to phenylephrine-induced contractions in thoracic aortas pre-incubated with Pyridoxal 5-phosphate (cofactor) [5,9] and L-Cysteine (substrate) [5,9] for H_2S synthesis. Then, we observed that both PVAT and endothelium in aortas from normotensive pregnant rats showed greater and significant anticontractile effects compared to endothelium-denuded aortas without PVAT. However, aortas from hypertensive pregnant rats revealed that PVAT, but not endothelium, is responsive to cofactor and substrate for H_2S formation, implying that anticontractile action of endothelium is observed in aortas without PVAT from Norm-Preg rats, while this action is lost in endothelium-intact aortas without PVAT from HTN-Preg rats.

Giving support to above results, H_2S synthesis stimulation revealed to be greater in PVAT but not in aorta without PVAT from hypertensive pregnant compared to normotensive pregnant rats, suggesting PVAT, but not endothelium, is responsive to stimulated synthesis of H_2S and that PVAT evokes vasodilation, thus anticontractile effect is enhanced by PVAT-derived H_2S. Interestingly, stimulated synthesis of H_2S also revealed to be greater in placenta from hypertensive pregnant compared to normotensive pregnant rats. Moreover, increases in plasma H_2S were found in hypertensive pregnant rats, suggesting that endogenous H_2S formation is triggered by hypertension. Therefore, our present study indicates that H_2S synthesis

stimulation may be a therapeutic target to attenuate hypertensive disorders [31], including hypertension in pregnancy.

Earlier reports have shown that endogenous H_2S production is resultant of enzymatic conversion from cysteine [5,9]. In the cardiovascular system, CSE catalyzes the Pyridoxal 5-phosphate-dependent reaction of L-Cysteine that results in the H_2S synthesis [9]. By inhibiting CSE with PAG (in the absence of cofactor and substrate), our results demonstrated that no reductions in phenylephrine-induced contractions were found in all thoracic aorta rings, confirming that H_2S synthesis by CSE may occur in PVAT [8], endothelium [32] and vascular smooth muscle cells [33], i.e., under CSE inhibition, no anticontractile effect has occurred.

Faced with abovementioned results, we also examined cumulative concentrations-response curves to phenylephrine in aortas incubated with cofactor, substrate and inhibitor of CSE. Then, we found that significant anticontractile PVAT-dependent action was lost in this experimental approach, because maximum responses to phenylephrine exhibited no significant reductions in aortas from Norm-Preg group. Confirming anticontractile effect of PVAT, pEC_{50} values in endothelium-denuded aortas with PVAT were significantly lower compared to endothelium-intact aortas without PVAT from Norm-Preg rats, displaying increases in the sensitivity to phenylephrine-induced contractions. Interestingly, aortas from HTN-Preg rats revealed that maximum responses (but not pEC_{50} values) to phenylephrine were significantly higher than those exhibited by incubation with cofactor and substrate in the absence of inhibitor of CSE, further suggesting that stimulation of PVAT-derived H_2S may play a key role in modulating vascular tonus in aortas from hypertensive pregnant animals.

To date, there is no evidence of endothelial dysfunction in normal pregnancy, as previously revised [15,34], and our present study suggest that PVAT may also modulate vascular tonus in health gestation. Accordingly, significant reduced responses to phenylephrine-induced contractions were found in endothelium-denuded aortas with PVAT compared to endothelium-denuded aortas without PVAT from Norm-Preg rats, suggesting that there may not be PVAT dysfunction in normotensive pregnancy. However, under H_2S stimulation, we unexpectedly observed a significant endothelium dysfunction in aortas without PVAT from hypertensive pregnant rats. Therefore, our present results suggest that during normal pregnancy CSE activity is not impaired in endothelium and PVAT, while in the hypertensive pregnancy the CSE of the endothelium is not responsive to cofactor and substrate, but PVAT may provide an alternative action against contractile response through stimulated H_2S formation.

In search of mechanism that underlies anticontractile effect of PVAT in pregnancy, we investigated the involvement of voltage-gated calcium channels and ATP-sensitive potassium channels. In this regard, we observed no significant differences among KCl-induced contractions in all thoracic aorta preparations from both Norm-Preg and HTN-Preg rats, suggesting that vascular calcium influx through voltage-gated calcium channels was not affected. Thus, our present results suggest that anticontractile effect of PVAT is not influenced by vascular contraction induced by calcium entry, which is caused by cumulative concentration-responses to KCl [1], but anticontractile effect of PVAT is possibly due to activation of potassium channels [3, 4].

It has been reported that PVAT releases ADRF that acts through ATP-sensitive potassium channels [3,4]. Using a pharmacological blocker of ATP-

sensitive potassium channels, we demonstrated that only endothelium-denuded aortas with PVAT, but not endothelium-intact aorta without PVAT, presented similar maximum responses to phenylephrine to those found in endothelium-denuded aorta without PVAT, indicating that anticontractile effect displayed by PVAT, but not by endothelium, is abolished when the ATP-sensitive potassium channels are blocked by glibenclamide.

In order to give support to the present results described above, our animal model shows that hypertension in pregnancy was associated with fetal and placental growth restriction, which is in accordance to previous studies that adopted the same rat model [19,35]. Also, we found angiogenic imbalance, which was featured by increases in sFlt-1 with concomitant decreases in PLGF in the HTN-Preg group, as previously reported [35,36], suggesting that our animal model resembles angiogenic imbalance that is observed in women with pre-eclampsia [37,38]. Moreover, no significant differences were found in body weight gain and litter size, which may be resultant of pregnancy in rat, since it is a multiple rather than singleton pregnancy, as it is often presented in woman gestation.

It has been observed that H_2S is able to produce effects on the vasculature, predominantly vasodilation responses [39,40,41] demonstrating the relevance of H_2S in modulating the vascular tonus. In addition, although we found increases in circulating H_2S, our present results suggest that augmented endogenous H_2S may be an unsuccessful compensatory response to protect against hypertension in pregnancy [42], suggesting that further studies are warranted to examine the effects of L-Cysteine supplementation [43] during hypertension in pregnancy.

Taken together, the present results show that PVAT may be important in modulating the vascular contractility during pregnancy. Moreover, our findings are in accordance with the hypothesis that there is no dysfunction of PVAT in hypertensive pregnancy, at least in that followed by no significant changes in body weight gain.

5. Conclusions

We concluded that there is no PVAT dysfunction in normal pregnancy and that PVAT, but not endothelium, is responsive to the stimulated H_2S formation in hypertensive pregnancy. Also, anticontractile effect of PVAT is ATP-sensitive potassium channels-dependent.

6. Acknowledgements

This study was supported by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Brazil (FAPESP – Finance Code: 2018/24.484-0), National Council for Scientific and Technological Development, Brazil (CNPq- 301370/2018-4) and Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior - Brazil (CAPES – Finance Code 001). The authors thank Jessica S. Chimini for technical assistance.

REFERENCES

[1] S.E. Mann, N. Maille, D. Clas, G. Osol,Perivascular Adipose Tissue: A Novel Regulator of Vascular Tone in the Rat Pregnancy, Reprod. Sci. 22 (7) (2015) 802-807.

[2] Y.J. Gao, C. Lu, L.Y. Su, A.M. Sharma, R.M. Lee, Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide, Br. J. Pharmacol. 151 (3) (2009) 323–331.

[3] M. Lohn, G. Dubrovska, B. Lauterbach, F.C. Luft, M. Gollasch, A.M. Sharma, Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor, FASEB J. 16 (2002) 1057–1063.

[4] R.M. Lee, C. Lu, L.Y. Su, Y.J. Gao, Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue, J. Hypertens. 27 (4) (2009) 782–790.

[5] J. Beltowski, A. Jamroz-Wisniewska, Hydrogen Sulfide in the Adipose Tissue-Physiology, Pathology and a Target for Pharmacotherapy, Molecules 22 (1) (2016).

[6] G. Fesus, G. Dubrovska, K. Gorzelniak, R. Kluge, Y. Huang, F.C. Luft, M. Gollasch, Adiponectin is a novel humoral vasodilator, Cardiovasc. Res. 75 (2007) 719–727.

[7] – C. Kohn, J. Schleifenbaum, I. A. Szijartó, L. Markó, G. Dubrovska, Y. Huang, M. Gollasch, Differential Effects of Cystathionine-γ-lyase-dependent Vasodilatory H_2S in Periadventitial Vasoregulation of Rat and Mouse Aortas. PLoS ONE 7 (8) (2012).

[8] L. Fang, Z. Jing, C. Yu, T. Ma, G. Xu, C. Tang, X. Liu, B. Geng. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator, J. Hypertens. 27(11) (2009) 2174-2185.

[9] C.R. Powell, K.M. Dillon, J.B. Matson, A review of hydrogen sulfide (H 2 S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications, Biochem. Pharmacol. 149 (2018) 110–123.

[10] A. Asimakopoulou, P. Panopoulos, C.T Chasapis, C. Coletta, Z. Zhou, G. Cirino, A. Giannis, C. Szabo, G.A. Spyroulias, A. Papapetropoulos, Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE), Br. J. Pharmacol. 169 (4) (2013) 922–932.

[11] X. Feng, Y. Chen, J. Zhao, C. Tang, Z. Jiang, B. Geng, Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator, Biochem. Biophys Res. Commun. 380 (1) (2009) 153–159.

[12] N. Inagaki, T. Gonoi, J.P. Clement, C.Z. Wang, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, S. Seino, A family of sulfonylrea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K+ channels, Neuron 16 (5) (1996)1011-1017.

[13] N.A. Gonzaga, W.M.C. Awata, G.T. do Vale, K.C. Marchi, J.J. Muniz, J.E. Tanus-Santos, C.R. Tirapelli, Perivascular adipose tissue protects against the vascular dysfunction induced by acute ethanol intake: Role of hydrogen peroxide, Vascul. Pharmacol. 111 (2018) 44-53.

[14] A. Selovic, J. Sarac, S. Missoni, Changes in adipose tissue distribution during pregnancy estimated by ultrasonography, J. Matern. Fetal Neonatal Med. 29 (13) (2015) 2131–2137.

[15] P. Soma-Pillay, C. Nelson-Piercy, H. Tolppanen, A. Mebazaa, Physiological changes in pregnancy, Cardiovasc. J. Afr. 27 (2) (2016) 89–94.

[16] B. Galvez-Prieto, G. Dubrovska, M.V. Cano, M. Delgado, I. Aranguez, M.C. Gonzalez, M. Ruiz-Gayo, M. Gollasch, M.S. Fernandez-Alfonso. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats, Hypertens Res. 31 (7) (2008) 415-423.

[17] B. Galvez, J. de Castro, D. Heroid, G. Dubrovska, S. Arribas, M. C. Gonzales, I. Aranguez, F. C. Luft, M. P. Ramos, MTano, J.Schle. Gollasch, M.S. Fernandez Alfonso. ifenbaum, M.Gollasch, Perivascular adipose tissue and Mesenteric Vascular Function in Spontaneously Hypertensive Rats, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26 (2006) 1297-1302.

[18] J.Y. Tano, J.Schleifenbaum, M.Gollasch, Perivascular adipose tissue, potassium channels, and vascular dysfunction, Arterioscler. Thromb. Vasc, Biol. 34 (2014) 1827–1830.

[19] M. Ianosi-Irimie, H.V. Vu, J.M. Whitbred, C.A. Pridjian, J.D. Nadig, M.Y. Williams, D.C. Wrenn, G. Pridjian, J.B. Puschett, A rat model of preeclampsia, Clin. Exp. Hypertens. 27 (2005) 605-617.

[20] B.M. Mitchell, L.G. Cook, S. Danchuk, J.B. Puschett, Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension, Am. J. Hypertens. 20 (2007) 1297-1304.

[21] C.R. Tirapelli, J. Al-Khpury, G. Bkaily, P.D. Ans-Juste, V.L. Lanchote, S.A. Uyemura, A.M. De Oliveira, Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta, J. Pharmacol. Exp. Ther. 316 (1) (2006) 233-241.

[22] L. Rogrigues, E. Ekundi-Valentim, J. Florenzano, A.R. Cerqueira, A.G Soares, T.P. Schmidt, K.T. Santos, S.A. Teixeira, M.T. Ribela, S.F. Rodrigues, M.H. de Carvalho, G. de Nucci, M. Wood, M. Whiteman, M.N. Muscará, S.K. Costa.Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice, Pharmacol. Res. 115 (2017) 255-266.

[23] Y.F. Njie-Mbye, M. Kulkarni, C.A. Opere, S.E. Ohia, Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells, Exp. Eye Res. 98 (2012) 16-22.

[24] J.R. Uren, R. Ragin, M. Chaykovsky, Modulation of Cysteine metabolism in mice- effects of properglylglycine and L-cyst(e)ine-degrading enzymes, Biochem. Pharmacol. 27 (24) (1978) 2807-2814.

[25] C. Hine, E. Harputlugil, Y. Zhang, C.Ruckenstuhl, B.C. Lee, L. Brace, A. Longchamp, J.H. Treviño-Villarreal, P.Mejia, C.K Ozaki, R. Wang, V.N Gladyshev, F. Madeo, W.B Mair, J.R Mitchell, Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits, Cell 160 (2015) 132-144.

[26] K. Wang, S. Ahmad, M. Cai, J. Rennie, T. Fujisawa, F. Crispi, J. Baily, M.R. Miller, M. Cudmore, P.W. Hadoke, R. Wang, E. Gratacos, I.A. Buhimsch, C.S. Buhimschi, A. Ahmed. Dysregulation of Hydrogen Sulfide Producing Enzyme Cystathionine γ-lyase Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia, Circulation 127-25 (2013), 2514–2522.

[27] F. Zhao, F. Lei, S. Zhang, X. Yan, W. Wang, & Y. Zheng, Hydrogen sulfide alleviates placental injury induced by maternal cigarette smoke exposure during pregnancy in rats. Nitric Oxide 74 (2018) 102–111.

[28] K.E. Zaborska, G. Edwards, C. Austin, & M. Wareing, The Role of O-GlcNAcylation in Perivascular Adipose Tissue Dysfunction of Offspring of High-Fat Diet-Fed Rats, J. Vasc. Res. 54 (2) (2017) 79–91.

[29] R.L. Kong, D.R. Chen, C.C. Ruan, P.J. Gao, Decreases of Perivascular Adipose Tissue Browning is Associated with vascular dysfuntion in Spontaneous Hypertensive Rats During Aging, Front. Physiol. 9 (2018).

[30] A. Al-Jarallah, M.A. Oriowo, Loss of Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue on Pregnant Rats: A Potential Role of Tumor Necrosis Factor-alpha, J. Cardiovasc. Pharmacol. 67 (2) (2016) 145-151.

[31] L.L. Pan, X.H. Liu, Q.H. Gong, H.B. Yang, Y.Z. Zhu, Role of Cystathionine γ-Lyase/Hydrogen Sulfide Pathway in Cardiovascular Disease: A Novel Therapeutic Strategy?, Antioxid. Redox Signal. 17 (1) (2012) 106–118.

[32] R.K. Mistry, T.V. Murray, O. Prysyazhna, D. Martim, J. R. Burgoyne, C. Santos, A.M Shah, A.C. Brewer, Transcriptional Regulation of Cystathionine-Ƴ-Lyase in Endothelial Cells by NADPH Oxidase 4-Dependent Signanling, J. Biol. Chem. 291 (4) (2016) 1774-1788.

[33] G. Yang, L. Wu, N. Khaper, S. Mani, R. Wang, Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells, Cardiovasc. Res. 86 (3) (2010) 457-495.

[34] J.S. Possomato-Vieira, R.A. Khalil, Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia, Adv. Pharmacol. 77 (2016) 361-431.

[35] J.S. Chimini, J.S. Possomato-Vieira, M.L.S. da Silva, C.A. Dias-Junior, 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. 124 (4) (2019) 385-393.

[36] F. Crispi, E. Llurba, C. Domínguez, P. Martín -Gallán, L. Cabero, E. Gratacós, Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early - versus late -onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction, Ultrasound Obstet. Gynecol. 31 (2008) 303 -309.

[37] S.E. Maynard, J.Y. Min, J. Merchan, K.H. Lim, J. Li, S. Mondal, T.A. Libermann, J.P. Morgan, F.W. Sellke, I.E. Stillman, F.H. Epstein, V.P Sukhatme, S.A. Karumanchi, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia, J. Clin. Invest. 111 (5) (2003) 649-658.

[38] D.S. Torry, C.A. Labarrere, J.A Mcintyre, Uteroplacental vascular involvement in recurrent spontaneous abortion, Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 10 (5) (1998) 379-382.

[39] F. Aydinoglu, F.T. Dalkir, H.O. Demirbag, N. Ogulener, The interaction of l-cysteine/H_2S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum, Nitric Oxide 70 (2017) 51-58.

[40] E. Ertuna, A.E. Loot, I. Fleming, G. Yetik-Anacak, The role of eNOS on the compensatory regulation of vascular tonus by H_2S in mouse carotid arteries, Nitric Oxide 69 (2017) 45-50.

[41] L. Sheibani, T.J. Lechuga, H. Zhang, A. Hameed, D.A. Wing, S. Kumar, C.R. Rosenfeld, D.B. Chen, Augmented H_2S production via cystathionine-beta-synthase upregulation plays a role in pregnancy-associated uterine vasodilation, Biol. Reprod. 96 (3) (2017) 666-672.

[42] J.S. Possomato-Vieira, J.S Chimini, M.L.S. da Silva, C.A. Dias-Junior, Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-mediated relaxation, underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of hydrogen sulphide donor in hypertensive pregnancy, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 45 (11) (2018) 1-10.

[43] C.N. Hsu, Y.J. Lin, P.C. Lu, Y.L Tain, Early supplementation of D-cysteine or L-Cysteine prevents hypertension and kidney damage in spontaneously hypertensive rats exposed to high-salt intake, Mol. Nutr. Food Res. 62 (2018) 2.

Parte III

Discussão

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a influência do PVAT nas contrações vasculares de aortas de ratas normotensas e hipertensas. Foi observado que a formação estimulada de H_2S aumenta o efeito anticontrátil do PVAT. Ainda que, o efeito anticontrátil do PVAT, mas não do endotélio, é dependente de canal de potássio sensível ao ATP. Observou-se também que os efeitos anticontráteis tanto do PVAT quanto do endotélio, são diminuídos na presença de um inibidor farmacológico da CSE. Além disso, foram encontrados aumentos no H_2S derivado do PVAT, tanto no plasma quanto na placenta e no PVAT de ratas do grupo HTN-Preg, mas não foram encontradas diferenças em aortas sem PVAT.

Estudos prévios, mostraram que as respostas máximas induzidas pela fenilefrina foram atenuadas na presença de PVAT de artérias de ratas não prenhes (Mann et al., 2015). De acordo, um elegante estudo demonstrou que o PVAT exerce uma ação anticontrátil na artéria de ratos machos e fêmeas saudáveis (Zaborska et al., 2017). Contudo, em condições fisiopatológicas, o PVAT pode sofrer uma disfunção acarrentando em uma ação contrátil, incluindo ratos alimentados com dieta rica em gordura, nos quais os autores relataram que o PVAT promoveu um efeito contrátil em ratos machos e uma tendência a contração em ratas fêmeas quando comparadas com o grupo controle (Zaborska et al., 2017). Além disso, a perda do efeito anticontrátil também foi identificada em ratos espontaneamente hipertensos do sexo masculino durante o envelhecimento (Kong et al., 2018).

Nosso estudo sugere que pode não existir disfunção no PVAT em ratas prenhes, pois o PVAT demonstra um efeito anticontrátil significativo, semelhante ao endotélio, em aortas de rastas prenhes, e, uma tendência ao efeito anticontrátil em aorta de ratas prenhes hipertensas, sugerindo que esse efeito anticontratil em resposta a contração induzida pela feniledrina pode estar envolvido nas adaptações vasculares que ocorrem durante a gestação. No entanto, nossos achados contrastam com um estudo prévio, no qual foi demonstrada uma perda do efeito

anticontrátil do PVAT em gestantes em comparação com ratas não prenhes (Al-Jarallah e Oriowo 2016).

Para ampliar nossos achados, nós também avaliamos os efeitos anticontráteis às contrações induzidas pela fenilefrina em aortas torácicas pré-incubadas com piridoxal-5-fosfato (cofator) (Beltowski e Jamroz-Wisniewska 2016; Powell, Dillon e Matson, 2018) e L-Cisteina (substrato) (Beltowski e Jamroz-Wisniewska 2016; Powell, Dillon e Matson, 2018) para a síntese de H_2S. Posteriormente, observamos que tanto o PVAT quanto o endotélio em aorta de ratas normotensas gestantes apresentaram efeitos anticontráteis significativamente maiores em comparação com aorta sem PVAT e sem endotélio. No entanto, aortas de ratas hipertensas revelaram que o PVAT, mas não o endotélio, é responsivo ao cofator e substrato para formação de H_2S, sugerindo que a ação anticontrátil do endotélio é observada em aortas PVAT do grupo de ratas Norm-Preg, enquanto que essa ação é perdida em aorta com endotélio e sem PVAT do grupo HTN-Preg.

Dando suporte aos resultados acima, a estimulação da síntese de H_2S relevou-se maior no PVAT mas não em aortas sem PVAT no grupo de prenhes hipertensas comparado ao cgrupo de ratas prenhes normotensas, sugerindo que o PVAT, mas não o endotélio, é responsivo a síntese estimulada de H_2S e que o PVAT exerce vasodilatação, com isso esse efeito anticontrátil é aumentado pelo H_2S derivado do PVAT. Curiosamente, a síntese estimulada de H_2S também se demonstrou elevada em placenta de ratas prenhes hipertensas comparadas com as ratas prenhes normotensas. Ainda, foram encontrados aumentos nos níveis plasmáticos de H_2S de ratas prenhes hipertensas, sugerindo que a formação endógena de H_2S é desencadeada pela hipertensão. Portanto, nosso estudo indica que a estimulação da síntese de H_2S pode ser um alvo terapêutico para atenuar os distúrbios hipertensivos (Pan et al., 2012), incluindo na hipertensão gestacional.

Relatos anteriores mostraram que a produção endógena de H_2S é resultante da conversão enzimática da cisteina (Beltowski e Jamroz-Wisniewska 2016; Powell, Dillon e Matson, 2018). No sistema cardiovascular, a CSE catalisa a reação de formação do H_2S na presença da L-cisteina e de piridoxal-5-fosfato (Powell, Dillon e Matson, 2018). Ao inibir a CSE com PAG (na ausência de cofator e substrato), nossos resultados demonstraram que não houve redução de contração frente a contrações induzidas pelas fenilefrina em todos os anéis aórticos, confirmando que a síntese do H_2S pela CSE ocorre no PVAT (Fang et al., 2009), no endotélio (Mistry et al., 2016) e nas células vasculares de musculo liso (Yang et al., 2010), ou seja, ao inibirmos a CSE, nenhum efeito anticontrátil foi observado.

Diante dos resultados supracitados, também examinamos curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em aortas pré-incubadas com cofator, substrato e inibidor da CSE. Com isso, observamos que a ação anticontrátil do PVAT foi perdida nessa abordagem experimental, pois as respostas máximas à fenilefrina não exibiram reduções significativas em aortas do grupo Norm-Preg. Confirmando o efeito anticontrátil do PVAT, valores de pEC_{50} em aortas sem endotélio e com PVAT foram significativamente menores quando comparadas a aortas com endotélio intacto e sem PVAT do grupo de ratas Norm-Preg, demonstrando aumento na sensibilidade a contração induzida pela fenilefrina. De forma interessante, aorta de ratas do grupo HTN-Preg tiveram respostas máximas à fenilefrina (mas não valores de pEC_{50}) significativamente maiores do que aquelas exibidas pela incubação com cofator e substrato na ausência de inibidor da CSE, sugerindo ainda que a estimulação do H_2S derivado do PVAT pode exercer um papel fundamental na modulação do tônus vascular em aortas de animais com hipertensão gestacional.

Até o momento, não existem evidências de disfunção endotelial em prenhez normotensa, como previamente descrito (Soma-Pillay et al., 2016; Possomato-Vieira e Khalil 2016), e o nosso estudo sugere que o PVAT também pode modular o tônus vascular na

gestação saudável. Consequentemente, foram encontradas respostas significativamente menores em contrações induzidas pela fenilefrina em aorta sem endotélio e com PVAT de ratas do grupo Norm-Preg, sugerindo que não existe disfunção do PVAT durante a prenhez normotensa. No entanto, ao estimar a produção de H_2S, observamos inesperadamente uma disfunção endotelial significativa em aortas sem PVAT das ratas prenhes hipertensas. Portanto, nossos resultados sugerem que a durante a gestação normal, a atividade da CSE não é prejudicada no endotélio, nem no PVAT, enquanto na hipertensão gestacional a CSE do endotélio não responde ao cofator e ao substrato, mas o PVAT pode promover uma ação alternativa contra a resposta contrátil através da formação estimulada de H_2S.

Em busca do mecanismo subjacente ao efeito anticontrátil do PVAT da gestação, investigamos o envolvimento de canais de cálcio dependentes de voltagem e dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Não foram observadas diferenças entre as contrações induzidas por KCl em todas as preparações de aorta torácica tanto naas ratas do grupo Norm-Preg quanto no grupo HTN-Preg, sugerindo que o influxo vascular de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem não foi afetado. Assim, nossos resultados sugerem que o efeito anticontrátil do PVAT não é influenciado pela contração vascular induzida pela entrada de cálcio, que é causada pelas curvas de concentração resposta cumulativas ao KCl ((Mann et al., 2015), mas o efeito anticontratil do PVAT tem sua ação possivelmente devido a ativação dos canais de potássio (Lohn et al., 2009; Lee et al., 2009).

Foi demonstrado que o PVAT libera um ADRF que atua através dos canais de potássio sensíveis ao ATP (Lohn et al., 2009; Lee et al., 2009). Utilizando um bloqueador farmacológico de canais de potássio sensíveis ao ATP, nós demonstramos que apenas as aortas sem endotélio e com PVAT, mas não em aortas com endotélio e sem PVAT, apresentaram respostar máximas à fenilefrina similares àquelas encontradas em aortas sem endotélio e sem PVAT, indicando que o efeito anticontrátil exercido pelo PVAT, mas não

pelo endotélio, é abolido quando o canal de potássio sensível ao ATP é bloqueado pela glibenclamida.

A fim de dar suporte aos resultados descritos acima, nosso modelo animal mostra que a hipertensão gestacional foi associada a restrição do crescimento fetal e placentário, o que está de acordo com estudos anteriores que adotaram o mesmo modelo de rato (Ianosini-Irimie et al., 2005; Chimini et al., 2019). Além disso, encontramos desequilíbrio angiogenico, que foi caracterizado por aumentos nos níveis de sFlt-1 e concomitante diminuição dos níveis de PLGF no grupo HTN-Preg, como previamente descrito (Chimini et al., 2019; Crispi et al., 2008) sugerindo que nosso modelo animal se assemelha quanto ao desequilíbrio angiogênico observado em mulheres com pré-eclâmpsia (Maynard et al., 2003; Torry, Labarrere e Mcintyre, 1998). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas no ganho de peso corporal e no tamanho da ninhada, que pode ser resultante da gravidez em ratos, já que é uma gestação múltipla em vez de singletona, como é frequentemente apresentada na gestação da mulher.

Tem sido observado que o H_2S é capaz de produzir efeitos na vasculatura, predominantemente vasodilatadoras (Aydinoglu et al., 2017; Ertuna et al., 2017; Sheibani et al., 2017) demonstrando a relevância do H_2S na modulação do tônus vascular. Além disso, embora tenhamos encontrado aumentos no H_2S circulante, nossos resultados atuais sugerem que o H_2S endógeno aumentado pode ser uma resposta compensatória malsucedida para proteger contra a hipertensão gestacional (Possomato-Vieira et al., 2018), sugerindo que mais estudos são necessários para examinar os efeitos da suplementação com L-cisteina (Hsu et al., 2018) durante a hipertensão gestacional.

Em conjunto, os presentes resultados mostram que o PVAT pode ser importante na modulação da contratilidade vascular durante a gestação. Além disso, nossos achados estão de

acordo com a hipótese de que não há disfunção de PVAT na gestação hipertensiva, pelo menos quando não existem alterações significativas de ganho de peso corporal.

Conclusões e considerações finais

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nós concluímos que não há disfunção do PVAT na gestação saudável e que o PVAT, mas não o endotélio, é responsivo à formação estimulada de H_2S na hipertensão gestacional. Além disso, o efeito anticontrátil do PVAT é dependente dos canais de potássio sensíveis ao ATP.

Referências

REFERÊNCIAS

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 1066–1071, 1 fev. 1996.

ACOG. Hypertension in Pregnancy. **Obstet Gynecol,** v. 122, p. 9, 2013.

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. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 67, n. 2, p. 145–151, fev. 2016.

AMARAL, J. H. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biology**, v. 5, p. 340–346, 23 jun. 2015.

ASIMAKOPOULOU, A. et al. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 4, p. 922–932, jun. 2013.

AYALA-LOPEZ, N. et al. Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 2, n. 3, p. e00041, 1 jun. 2014.

AYDINOGLU, F. et al. The interaction of l-cysteine/H2S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 70, p. 51–58, 1 nov. 2017.

BELTOWSKI, J. Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 11, p. 889–898, nov. 2013.

BELTOWSKI, J. et al. Hydrogen-sulfide-mediated vasodilatory effect of nucleoside 5'-monophosphorothioates in perivascular adipose tissue. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 7, p. 585–595, jul. 2015.

BELTOWSKI, J.; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A. Hydrogen Sulfide in the Adipose Tissue-Physiology, Pathology and a Target for Pharmacotherapy. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 1, 31 dez. 2016.

BERNSTEIN, I. M.; ZIEGLER, W.; BADGER, G. J. Plasma volume expansion in early pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 97, n. 5 Pt 1, p. 669–672, maio 2001.

BIAN, Z.; SHIXIA, C.; DUAN, T. First-Trimester Maternal Serum Levels of sFLT1, PGF and ADMA Predict Preeclampsia. **PloS One**, v. 10, n. 4, p. e0124684, 2015.

BIRD, I. M.; ZHANG, L.; MAGNESS, R. R. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 2, p. R245-258, fev. 2003.

BOOPATHY, G. T. K. et al. Cavin-2 regulates the activity and stability of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) in angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 43, p. 17760–17776, 27 2017.

CHANG, L. et al. Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension. **Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 77, n. 1, p. 11–18, 2013.

CHIMINI, J. S. et al. Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 124, n. 4, p. 385–393, abr. 2019.

CIRINO, G.; VELLECCO, V.; BUCCI, M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 22, p. 4021–4031, nov. 2017.

CLARK, S. L. et al. Position change and central hemodynamic profile during normal third-trimester pregnancy and post partum. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, n. 3, p. 883–887, mar. 1991.

CREANGA, A. A. et al. Pregnancy-Related Mortality in the United States, 2011-2013. **Obstetrics and Gynecology**, v. 130, n. 2, p. 366–373, 2017.

CRISPI, F. et al. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 31, n. 3, p. 303–309, mar. 2008.

DASHWOOD, M. R. et al. Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery? **Journal of Vascular Research**, v. 44, n. 3, p. 175–181, 2007.

D'EMMANUELE DI VILLA BIANCA, R. et al. Hydrogen sulfide-induced dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 59–64, abr. 2011.

DONKER, R. B. et al. Plasma factors in severe early-onset preeclampsia do not substantially alter endothelial gene expression in vitro. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 98–106, fev. 2005.

DÖTSCH, J. et al. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 97, n. 2, p. 163–167, ago. 2001.

DUBROVSKA, G. et al. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 3, p. H1107-1113, mar. 2004.

EHSANIPOOR, R. M. et al. Nitric oxide and carbon monoxide production and metabolism in preeclampsia. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 20, n. 5, p. 542–548, maio 2013.

ELEUTERIO, N. M. et al. Relationship between adiponectin and nitrite in healthy and preeclampsia pregnancies. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical**

Chemistry, v. 423, p. 112–115, 23 ago. 2013.

ERINGA, E. C.; BAKKER, W.; VAN HINSBERGH, V. W. M. Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue. **Vascular Pharmacology**, v. 56, n. 5–6, p. 204–209, jun. 2012.

ERTUNA, E. et al. The role of eNOS on the compensatory regulation of vascular tonus by H2S in mouse carotid arteries. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 69, p. 45–50, 30 set. 2017.

FANG, L. et al. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 11, p. 2174–2185, nov. 2009.

FERRAZ, L; BORDIGNON, M. Mortalidade materna no Brasil: uma realidade que precisa melhorar. **Rev. baiana saúde pública**, 2012. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-0233/2012/v36n2/a3253.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2019.

FÉSÜS, G. et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 4, p. 719–727, 1 set. 2007.

FILIPOVIC, M. R. Persulfidation (S-sulfhydration) and H2S. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 230, p. 29–59, 2015.

FURCHGOTT, R. F. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. **JAMA**, v. 276, n. 14, p. 1186–1188, 9 out. 1996.

FURCHGOTT, R. F.; JOTHIANANDAN, D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. **Blood Vessels**, v. 28, n. 1–3, p. 52–61, 1991.

GÁLVEZ, B. et al. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1297–1302, jun. 2006.

GAO, Y.-J. et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 323–331, jun. 2007.

GARAMVÖLGYI, Z. et al. Increased circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) levels in gestational diabetes mellitus: a pilot study. **Cell Stress & Chaperones**, v. 20, n. 4, p. 575–581, jul. 2015.

GONÇALVES-RIZZI, V. H. et al. Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 57, p. 71–78, 01 2016.

HOLWERDA, K. M. et al. Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 25, n. 4, p. 717–725, abr. 2014.

HOSOKI, R.; MATSUKI, N.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 237, n. 3, p. 527–531, 28 ago. 1997.

HSU, C.-N. et al. Early Supplementation of d-Cysteine or l-Cysteine Prevents Hypertension and Kidney Damage in Spontaneously Hypertensive Rats Exposed to High-Salt Intake. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 2, 2018.

HUPPERTZ, B.; PEETERS, L. L. H. Vascular biology in implantation and placentation. **Angiogenesis**, v. 8, n. 2, p. 157–167, 2005.

HYTTEN, F. Blood volume changes in normal pregnancy. **Clinics in Haematology**, v. 14, n. 3, p. 601–612, out. 1985.

IANOSI-IRIMIE, M. et al. A rat model of preeclampsia. **Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)**, v. 27, n. 8, p. 605–617, nov. 2005.

IRANI, R. A.; XIA, Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 763–771, set. 2008.

JARDIM, L. L. et al. Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 447, p. 34–38, 20 jul. 2015.

KAÇAR, S. et al. L-Cysteine Partially Protects Against Acrylamide-Induced Testicular Toxicity. **Balkan Medical Journal**, v. 35, n. 4, p. 311–319, jul. 2018.

KANAGY, N. L.; SZABO, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Vascular biology of hydrogen sulfide. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 312, n. 5, p. C537–C549, 1 maio 2017.

KONG, L.-R. et al. Decrease of Perivascular Adipose Tissue Browning Is Associated With Vascular Dysfunction in Spontaneous Hypertensive Rats During Aging. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 400, 2018.

LEE, R. M. K. W. et al. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 782–790, abr. 2009.

LEE, Y.-C. et al. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. **Circulation**, v. 124, n. 10, p. 1160–1171, 6 set. 2011.

LÖHN, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 9, p. 1057–1063, jul. 2002.

LU, C. et al. Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, n. 1–3, p. 68–73, 10 abr. 2011.

LUIZON, M. R. et al. Antihypertensive therapy in pre-eclampsia: effects of plasma from nonresponsive patients on endothelial gene expression. **Pharmacogenomics**, v. 17, n. 10, p. 1121–1127, 2016.

MACKENZIE, R. M. et al. Endothelial FOS expression and pre-eclampsia. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 119, n. 13, p. 1564–1571, dez. 2012.

MANN, S. E. et al. Perivascular Adipose Tissue: A Novel Regulator of Vascular Tone in the Rat Pregnancy. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 22, n. 7, p. 802–807, jul. 2015.

MARCH, M. I. et al. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Adverse Outcomes among Haitian Women with Preeclampsia. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0126815, 2015.

MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 649–658, mar. 2003.

MAYNARD, S. E. et al. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. **Pediatric Research**, v. 57, n. 5 Pt 2, p. 1R-7R, maio 2005.

MCMASTER, M. T.; ZHOU, Y.; FISHER, S. J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 6, p. 540–547, nov. 2004.

MEYER, M. C.; BRAYDEN, J. E.; MCLAUGHLIN, M. K. Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 6, p. 1510–1516, dez. 1993.

MISTRY, R. K. et al. Transcriptional Regulation of Cystathionine-γ-Lyase in Endothelial Cells by NADPH Oxidase 4-Dependent Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 4, p. 1774–1788, 22 jan. 2016.

NELSON, S. H. et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. 406–411, 1 set. 2000.

ONO, K. et al. Redox chemistry and chemical biology of H2S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 77, p. 82–94, dez. 2014.

OSOL, G.; MOORE, L. G. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)**, v. 21, n. 1, p. 38–47, jan. 2014.

PALMER, S. K. et al. Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 80, n. 6, p. 1000–1006, dez. 1992.

PAN, L. L. et al. Role of cystathionine γ-lyase/hydrogen sulfide pathway in cardiovascular disease: a novel therapeutic strategy? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 1, p. 106–118, 1 jul. 2012.

PIMENTEL, A. M. L. et al. L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 36, n. 9, p. 783–788, set. 2013.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S. et al. Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-

mediated relaxation, underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of hydrogen sulphide donor in hypertensive pregnancy. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 45, n. 11, p. 1118–1127, nov. 2018.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S. et al. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 12, p. 1325–1332, dez. 2016.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S.; KHALIL, R. A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. **Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 77, p. 361–431, 2016.

POWELL, C. R.; DILLON, K. M.; MATSON, J. B. A review of hydrogen sulfide (H2S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 149, p. 110–123, 2018.

ROCHA-PENHA, L. et al. Myeloperoxidase in Hypertensive Disorders of Pregnancy and Its Relation With Nitric Oxide. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 69, n. 6, p. 1173–1180, 2017.

SCHIESSL, B. et al. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 274, n. 3, p. 150–154, jun. 2006.

SHAH, D. A.; KHALIL, R. A. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. **Biochemical Pharmacology**, v. 95, n. 4, p. 211–226, 15 jun. 2015.

SHEIBANI, L. et al. Augmented H2S production via cystathionine-beta-synthase upregulation plays a role in pregnancy-associated uterine vasodilation. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 3, p. 664–672, 01 2017.

SLADEK, S. M.; MAGNESS, R. R.; CONRAD, K. P. Nitric oxide and pregnancy. **The American Journal of Physiology**, v. 272, n. 2 Pt 2, p. R441-463, fev. 1997.

SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice**, v. 13, n. 2, p. 277–296, 1991.

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 27, n. 2, p. 89–94, 2016.

TANO, J.-Y.; SCHLEIFENBAUM, J.; GOLLASCH, M. Perivascular adipose tissue, potassium channels, and vascular dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 9, p. 1827–1830, set. 2014.

TORRY, D. S.; LABARRERE, C. A.; MCINTYRE, J. A. Uteroplacental vascular involvement in recurrent spontaneous abortion. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 10, n. 5, p. 379–382, out. 1998.

TUZCU, Z. B. et al. Circulating endothelial cell number and markers of endothelial dysfunction in previously preeclamptic women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4, p. 533.e1–7, out. 2015.

UZAN, J. et al. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. **Vascular Health and Risk Management**, v. 7, p. 467–474, 2011.

VIRTANEN, A. et al. Strong inhibitory effect of pre-eclampsia serum on angiogenesis detected in vitro by human cell-based angiogenesis tests. **Pregnancy Hypertension**, v. 6, n. 4, p. 367–373, out. 2016.

WANG, K. et al. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ-lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. **Circulation**, v. 127, n. 25, p. 2514–2522, 25 jun. 2013.

WILLIAMS, D. J. et al. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. **The American Journal of Physiology**, v. 272, n. 2 Pt 2, p. H748-752, fev. 1997.

XIAO, D.; BUCHHOLZ, J. N.; ZHANG, L. Pregnancy attenuates uterine artery pressure-dependent vascular tone: role of PKC/ERK pathway. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 6, p. H2337-2343, jun. 2006.

YAN, H.; DU, J.; TANG, C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 1, p. 22–27, 2 jan. 2004.

YANG, G. et al. Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 3, p. 487–495, 1 jun. 2010.

YANG, G. et al. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5901, p. 587–590, 24 out. 2008.

ZABORSKA, K. E. et al. The Role of O-GlcNAcylation in Perivascular Adipose Tissue Dysfunction of Offspring of High-Fat Diet-Fed Rats. **Journal of Vascular Research**, v. 54, n. 2, p. 79–91, 2017.

ZABORSKA, K. E.; WAREING, M.; AUSTIN, C. Comparisons between perivascular adipose tissue and the endothelium in their modulation of vascular tone. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3388–3397, out. 2017.

ZHANG, H.-H. et al. Pregnancy Augments VEGF-Stimulated In Vitro Angiogenesis and Vasodilator (NO and H2S) Production in Human Uterine Artery Endothelial Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 7, p. 2382–2393, 01 2017.

ZHU, M. et al. Restoring placental growth factor-soluble fms-like tyrosine kinase-1 balance reverses vascular hyper-reactivity and hypertension in pregnancy. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 311, n. 3, p. R505-521, 01 2016.

ZHU, R.; XIAO, D.; ZHANG, L. Potassium channels and uterine vascular adaptation to

pregnancy and chronic hypoxia. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 737–747, set. 2013.