

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 05/12/2020.

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

**EFEITOS DA DOXICICLINA RELACIONADOS À INIBIÇÃO
DAS METALOPROTEINASES EM MODELO DE PRÉ-
ECLÂMPSIA INDUZIDA POR L-NAME EM RATAS**

REGINA APARECIDA DO NASCIMENTO

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Botucatu-SP
2018

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

**EFEITOS DA DOXICICLINA RELACIONADOS À INIBIÇÃO
DAS METALOPROTEINASES EM MODELO DE PRÉ-
ECLÂMPsia INDUZIDA POR L-NAME EM RATAS**

Doutoranda: Regina Aparecida do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

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

Botucatu-SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Nascimento, Regina Aparecida do.

Efeitos da doxiciclina relacionados à inibição das metaloproteinases em modelo de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME em ratas / Regina Aparecida do Nascimento. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior

Capes: 21001006

1. Hipertensão na gravidez. 2. Doxiciclina. 3. Metaloproteases. 4. Óxido nítrico. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Hipertensão gestacional; Óxido nítrico; doxiciclina; metaloproteinases; ratas.

Regina Aparecida do Nascimento

Efeitos da doxíciclina relacionados à inibição das metaloproteínas em modelo de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME em ratas

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

Banca Examinadora

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

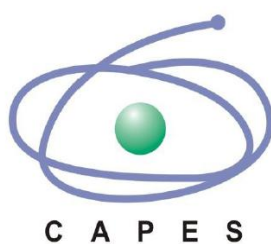
Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Departamento de Farmacologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Prof. Dra. Ellen Rizzi Sanchez
Unidade de Biotecnologia
Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP

Prof. Dr. Alaor Aparecido Almeida
Centro de Assistência Toxicológica/ CEATOX
Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP

Prof. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes
Departamento de Farmacologia
Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP

Finanziamento



(Bolsa CAPES- doutorado: Período de vigência 10/2015 – 11/2018)



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

Dedicatória



***Ao único Deus, cujo nome é Senhor somente tu, és
Altíssimo sobre toda a terra.
Salmo 83:18.***

Agradecimientos

Ao meu Deus, por estar sempre ao meu lado. “Portanto, ao **Rei eterno, imortal, invisível, Deus único**, seja honra e glória pelos séculos dos séculos. Amém! Invocarei ao **Senhor** enquanto viver, cantarei ao **SENHOR**; entoarei louvores ao meu **Deus**, enquanto eu existir”. 1 Timóteo 1:17 e Salmo 116:2; 104: 33.

Aos meus pais, Estanislau e Luzia, agradeço de coração pelo amor, incentivo, compreensão em todos os momentos! Agradeço a Deus por ser filha de pessoas tão maravilhosas como vocês!

À minha família, que sempre esteve me apoiando e incentivando a seguir em frente!

Ao meu pastor, Ruben Oliveira Lima, que nas minhas dificuldades esteve me orientando espiritualmente!

Ao grupo das amigas de oração, que sempre orou pela minha vitória!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior, pela oportunidade, amizade, colaboração durante todo o período de pós-graduação!

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Farmacologia, José Sérgio (Zezinho), Victor (Vitinho), Thalita (Tá), Bila, Gabriel, Mariam, Maria Luiza (Malu), Jéssica (Jess), Ediléia (Léia), Letícia (Léts) e Gabriela (Gaby) que estiveram comigo ao longo desses quase quatro anos e muito contribuíram com os meus trabalhos.

Ao Dr. José Sérgio Possomato-Vieira, querido Zé, você é o principal instrumento que Deus escolheu para me ajudar! Muito Obrigada!

A todos os colegas do Departamento de Farmacologia, em especial aos queridos, André Mueller, Rodrigo, Katiussia, Mayara, Naiara, Noêmia e Alexandre. É muito bom ter pessoas maravilhosas como vocês!

André Mueller, um agradecimento especial a você, meu querido amigo, meu professor de graduação na UNIGRAN. O André me indicou que fizesse o mestrado em Botucatu. Ao seguir sua recomendação, reencontramo-nos no doutorado. Obrigada por seu companheirismo e estar sempre pronto a contribuir de forma muito especial!

À Prof. Dra. Sandra Cordellini, pela imensa colaboração neste projeto!

Aos colegas Paulo, Luiz, Cris, Janete e Hélio, funcionários do departamento de farmacologia, pela amizade e auxílio profissional!

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

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

A tese intitulada: “Efeitos da doxíciclina relacionados à inibição das metaloproteinases em modelo de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME em ratas

Primeiramente a tese consta de uma introdução a respeito da gestação e das desordens hipertensivas gestacionais. São resumidamente abordados alguns fatores de predisposição que levam ao processo de má formação placentária e posterior disfunção endotelial características da hipertensão gestacional e posteriormente, descreve os principais efeitos da doxíciclina como inibidor de metaloproteinases associada à desordem hipertensiva gestacional.

O segundo capítulo traz o artigo intitulado “*Hypertension, augmented activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 and angiogenic imbalance in hypertensive pregnancy are attenuated by doxycycline*” publicado na revista *European Journal of Pharmacology* onde nós descrevemos os efeitos do tratamento com um inibidor de metaloproteinases, num modelo experimental de hipertensão gestacional induzida pelo inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) N^ω-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME).

O capítulo três traz o manuscrito “*Nitric oxide downregulates activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 during pregnancy, but reduced-nitric oxide-induced hypertensive pregnancy increases activity of these gelatinases*” submetido para publicação à revista *Nitric Oxide*. Neste manuscrito, avaliamos a atividade das MMP-2 e -9 em diferentes períodos da gestação e mudanças nas atividades de MMPs com diminuição da biodisponibilidade do NO ao longo da prenhe em ratas com hipertensão gestacional induzida por (L-NAME).

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

Também, no decorrer deste curso de doutoramento, outras atividades foram desenvolvidas com o objetivo de enriquecer a formação acadêmica e estas são apresentadas a seguir:

Disciplinas cursadas

Disciplinas	Ano	Período Letivo	Créditos	Carga Horária	Freq	Conceito
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	2015	1º semestre	3	45	92	B
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	2015	2º semestre	3	45	100	A
Modelos experimentais em farmacologia da reprodução: ênfase no papel dos reguladores endócrinos e na diferenciação sexual hipotalâmica	2016	1º semestre	2	30	100	A
Prática de ensino de Farmacologia	2016	2º semestre	4	60	83	B
Aspectos Farmacológicos e Bioquímicos da Síndrome Metabólica	2017	1º semestre	4	60	100	A
Metabolismo energético	2017	1º semestre	4	60	100	A
Créditos aproveitados do mestrado			15	225		
Total geral créditos em disciplinas			35	525		
Total de Créditos em atividades complementares			70	1050		
Total geral créditos			120	1800		

Artigos publicados

1. **Nascimento RA**, Possomato-Vieira JS, Gonçalves-Rizzi VH, Bonacio GF, Rizzi E, Dias-Junior CA. Hypertension, augmented activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 and angiogenic imbalance in hypertensive pregnancy are attenuated by doxycycline. Submetido à revista *Eur J Pharmacol*. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.10.017.
2. Possomato-Vieira JS, Gonçalves-Rizzi VH, **Nascimento RA**, Wandekin RR, Caldeira-Dias M, Chimini JS, Santos da Silva ML, Dias-Junior CA. Clinical and experimental evidences of hydrogen sulfide involvement in lead-induced hypertension. *Bio Med Res Int*. 2018 Mar 28.
3. Gonçalves-Rizzi VH, Possomato-Vieira JS, **Nascimento RA**, Caldeira-Dias M, Dias-Junior CA. Maternal hypertension and feto-placental growth restriction is reversed by sildenafil: Evidence of independent effects of circulating nitric oxide levels. *Eur J Pharmacol*. 2018 Jan 17.

4. Zhu ML, Zhao JP, Cui N, Gonçalves-Rizzi VH, Possomato-Vieira JS, **Nascimento RA**, Dias-Junior CA. Cardiac myeloperoxidase activity is elevated in hypertensive pregnant rats. *J HuazhongUnivSciTechnolog Med Sci*. 2017 Dec;37(6):904-909.
5. Possomato-Vieira JS, Gonçalves-Rizzi VH, Graça TU, **Nascimento RA**, Dias-Junior CA. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016 Dec;389(12):1325-1332.
6. Gonçalves-Rizzi VH, Possomato-Vieira JS, Sales Graça TU, **Nascimento RA**, Dias-Junior CA. Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor. *Nitric Oxide*. 2016 Jul 1;57:71-78.
7. Chaguri JL, Godinho AF, Horta DF, Gonçalves-Rizzi VH, Possomato-Vieira JS, **Nascimento RA**, Dias-Junior CA. Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016 Mar; 42:63-8.
8. Gonçalves-Rizzi VH, **Nascimento RA**, Possomato-Vieira JS, Dias-Junior CA. Sodium Nitrite Prevents both Reductions in Circulating Nitric Oxide and Hypertension in 7-Day Lead-Treated Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016 Mar; 118(3):225-30.
9. Nascimento RA, Mendes G, **Possomato-Vieira JS**, Gonçalves-Rizzi VH, Kushima H, Delella FK, Dias-Junior CA. Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015 Jun; 116(6):508-15.

Artigo submetido para publicação

1. **Nascimento RA**, Possomato-Vieira JS, Bonacio GF, Rizzi E, Dias-Junior CA. Nitric oxide downregulates activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 during pregnancy, but reduced-nitric oxide-induced hypertensive pregnancy increases activity of these gelatinases. Submetido à revista *Nitric oxide* Manuscript: NOX_2018_244

Participação em eventos científicos

1. XXII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil (2018).
2. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics – Ribeirão Preto, Brasil (2017).
3. IV Simpósio em Biologia Vascular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil (2017).
4. Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – SIMFARTEC -UNESP/Botucatu, (Brasil) 2017.

5. 7th International Symposium of Graduate and Research. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil (2016).
6. 19º Encontro Nacional de Biomedicina, realizado na cidade de Botucatu-SP, (Brasil) 2016.
7. V Simpósio de Farmacologia da UNESP - SIMFAR (UNESP/Botucatu), (Brasil) 2015.

Resumos em eventos científicos

1. **Nascimento, R.A**; Possomato-Vieira, J.S. ; Gonçalves-Rizzi, VH ; Dias-Junior, C.A. Doxycycline reduces blood pressure and reestablishes the antioxidant capacity without changes in feto-placental restriction in hypertensive pregnant rats. XXII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil (2018).
2. **Nascimento, R.A**; Possomato-Vieira, J.S. ; Gonçalves-Rizzi, VH ; Dias-Junior, C.A. Doxycycline reduces blood pressure and reestablishes the antioxidant capacity without changes in feto-placental restriction in hypertensive pregnant rats. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017, Ribeirão Preto.
3. Possomato-Vieira, J.S.; Gonçalves-Rizzi, VH ; **Nascimento, R.A** ; Silva, K.P ; Caldeira-Dias, M. ; Sandrim, V. C. ; Dias-Junior, C.A. Hydrogen Sulfide (H₂S) Donor Reduces Systolic Blood Pressure and Stimulates Nitric Oxide Production in rats with L-NAME-Induced Hypertension in Pregnancy. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2016, Foz do Iguaçu.
4. Gonçalves-Rizzi, VH ; Possomato-Vieira, J.S. ; **Nascimento, R.A** ; Silva, K.P ; Caldeira-Dias, M. ; Sandrim, V. C. ; Dias-Junior, C.A. Placental-fetal interface is affected positively by sodium nitrite and sildenafil and concomitantly shows reductions in hypertension-in-pregnancy. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and 21th Latin American Congress of Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu.
5. Possomato-Vieira, J.S.; Gonçalves-Rizzi, V.H ; Silva, K.P ; **Nascimento, R.A** ; Mendes, G ; Pupo, A.S ; Dias-Junior, CA. Hydrogen Sulfide (H₂S) Donor Attenuates Systolic Blood Pressure and Enhances Placentas Weights in Preeclampsia. Experimental Biology, 2015, Boston. The FASEB Journal, 2015. v. 29.
6. Gonçalves-Rizzi, VH. ; Possomato-Vieira, J.S. ; Mendes, G ; **Nascimento, R.A** ; Silva, K.P ; Pupo, A.S ; Dias-Junior, CA. Sodium Nitrite Reduces Systolic Blood Pressure in Preeclampsia. Experimental Biology, 2015, Boston. The FASEB Journal. v. 29. p. 4-4.

Lista de abreviaturas e Siglas

ABTS - Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)

CaCl₂ – cloreto de cálcio

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

Early- Período inicial da prenhez, entre os dias 4 e 8 da gestação

Early Preg – ratas prenhas no período inicial da prenhez entre os dias 4 e 8 da gestação

Early-Preg+L-NAME – ratas prenhas hipertensas no período inicial da prenhez, entre os dias 4 e 8 da gestação

cGMP – guanosina monofosfato cíclico

HTN-Preg – prenhas hipertensas

HTN-Preg+Doxy- prenhas hipertensas tratadas com doxiciclina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

KDa - Kilodauto

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

Late - período final da prenhez entre os dias 14 e 20 da gestação

Late-Preg- ratas prenhas no período final da prenhez entre os dias 14 e 20 da gestação

MDA – malondialdeído

Mid - período intermediário da prenhez entre os dias 9 e 15 da gestação

Mid Preg- ratas prenhas no período intermediário da prenhez entre os dias 9 e 15 da gestação

MMPs- metaloproteinases

MMP-2 – Metaloproteinases de matrix2

MMP-9 – Metaloproteinases de matrix 9

mmHg – milímetro de mercúrio

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

Norm-Preg – prenhe normal

NOS – óxido nítrico sintase

$O_2^{\bullet-}$ - ânion superóxido

$OONO^-$ - peroxinitrito

PE – pré-eclâmpsia

PLGF – fator de crescimento placentário

Preg+Doxy- prenhas tratadas com doxiciclina

ROS – espécie reativa de oxigênio

RUPP – redução da pressão de perfusão uterina

SBP – pressão arterial sistólica

SDS – duodecil sulfato de sódio

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

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEAC – capacidade antioxidante equivalente do Trolox

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Zn^{2+} - Zinco

Sumário

RESUMO	20
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	26
1.1 A GESTAÇÃO E AS MUDANÇAS HEMODINÂMICAS	27
1.2 COMPLICAÇÕES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS	29
1.3 FISIOPATOLOGIA DA PE	30
1.4 METALOPROTEINASES	32
1.5 O PAPEL DAS MMP-2 E MMP-9 EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES	33
1.6 DOXICICLINA, UMA ESTRATÉGIA PARA INIBIR AS METALOPROTEINASES AUMENTADAS DURANTE A HIPERTENSÃO GESTACIONAL	34
 2 CAPÍTULO I: “Hypertension, Augmented Activity Of Matrix Metalloproteinases-2 And -9 And Angiogenic Imbalance In Hypertensive Pregnancy Are Attenuated By Doxycycline”	 37
 3 CAPÍTULO II: “Nitric Oxide Down Regulates Activity Of Matrix Metalloproteinases-2 And -9 During Pregnancy, But Reduced-Nitric Oxide-Induced Hypertensive Pregnancy Increases Activity Of These Gelatinases”	 48
 4 DISCUSSÃO	82
5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	93

Resumo

Resumo

O óxido nítrico (NO) é um gás produzido principalmente por células endoteliais, e durante a época gestacional, contribui para evitar aumento exacerbado da resistência vascular sistêmica (RVS), uma vez que, durante esse período, aumenta-se o volume sanguíneo e a frequência cardíaca. Quando, há disfunções endoteliais, reduz-se a biodisponibilidade de NO, provocando vasoconstrição e esta, por sua vez, consequentemente aumenta atividade das MMPs. Essa queda do NO e aumento das MMPs culminam em desordens hipertensivas gestacionais. Segundo estudos anteriores realizados em modelos de hipertensão em machos a doxíciclina, um antibiótico derivado das tetraciclina, diminuiu a pressão arterial sistólica devido a sua capacidade de inibir a atividade das MMPs. No entanto, há escassez de trabalhos que desenvolveram estudos sobre os efeitos da doxíciclina em modelos animais de hipertensão gestacional. Por esse motivo, investigamos os efeitos da doxíciclina na inibição das MMPs na hipertensão gestacional, induzida pelo N ω -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) em ratas. Para tanto, realizamos zimografia para avaliar a atividade da MMP-2 e -9 na placenta, no útero e na aorta torácica. Ainda avaliamos a pressão arterial sistólica, o desenvolvimento feto-placentário e os metabólitos do NO. Também foi avaliada a capacidade antioxidante plasmática, os níveis plasmáticos de *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) e o fator de crescimento placentário (PLGF). Nossos dados mostram que o tratamento com L-NAME aumentou a pressão arterial e diminuiu a prole destes animais. Por outro lado, a doxíciclina preveniu a hipertensão gestacional induzida por L-NAME sem afetar a prole. Observou-se também uma diminuição da biodisponibilidade de NO em ratas hipertensas. O tratamento com doxíciclina atenuou o aumento da atividade da MMP-2 e -9, provocados pela hipertensão induzida por L-NAME. Concomitantemente, a doxíciclina restaurou o equilíbrio angiogênico por meio do aumento dos níveis de PLGF e redução dos níveis de sFlt-1. A doxíciclina também aumentou a capacidade antioxidante do plasma nas ratas hipertensas. Por

causa disso, compreendemos que o aumento da atividade da MMP-2 e -9 deveu-se a uma redução do NO, causada pelo tratamento com L-NAME. Cabe ressaltar que o aumento da ativação de MMPs e o desequilíbrio angiogênico causados pelo modelo de hipertensão gestacional induzido por L-NAME estão associados ao aumento da pressão arterial sistólica, enquanto a doxíciclina restabeleceu todos esses parâmetros. Visto a importância do NO durante a gestação saudável, quanto durante a gestação hipertensiva devido a sua diminuição, realizamos um segundo estudo, em que avaliamos a atividade de MMP-2 e -9 em três diferentes períodos gestacionais: inicial (Early), intermediário (Mid) e tardio (Late). Nesse segundo estudo, observamos que a pressão arterial sistólica apresentou-se elevada nos três períodos gestacionais propostos, evidenciando-se principalmente nos dois últimos períodos (intermediário e tardio) em ratas hipertensas. Paralelamente, nesse mesmo grupo de animais, os níveis de NO plasmático apresentaram-se insuficientes, principalmente nos períodos gestacionais intermediário e tardio, em que há uma maior demanda de NO. Além disso, os parâmetros feto-placentários foram comprometidos em ratas hipertensas. Os níveis plasmáticos de malondialdeído e a atividade da MMP-2 e -9 apresentaram aumentos ao longo dos períodos gestacionais previamente adotados em ratas hipertensas. Em suma, os dados apresentados tanto no primeiro quanto no segundo estudo sugerem que o processo gestacional por si requer uma maior biodisponibilidade de NO e atuação do NO na modulação da atividade das MMPs ao longo da gestação, sendo essa demanda maior nos períodos finais da gestação.

Palavras chaves: Hipertensão gestacional; doxíciclina; metaloproteinases; óxido nítrico; ratas

Abstract

Abstract

Nitric oxide (NO) is a gas produced mainly by endothelial cells, and during the gestational period contributes to avoid an exacerbated increase in systemic vascular resistance (SVR), since during this period, there is a rise in blood volume and heart rate. When there are endothelial dysfunctions, the bioavailability of NO is reduced, causing vasoconstriction and this, in turn, consequently increases the activity of MMPs. This decrease in NO and increase in MMPs culminates in gestational hypertensive disorders. According to previous studies in non-gestational hypertension models, doxycycline, an antibiotic derived from tetracyclines, lowered systolic blood pressure due to its ability to inhibit MMP activity. However, there is a shortage of works that have developed studies on the effects of doxycycline in animal models of gestational hypertension. For this reason, we investigated the effects of doxycycline on the inhibition of MMPs in gestational hypertension, induced by N ω -nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) in rats. We performed a zymography to evaluate the activity of MMP-2 and -9 in the placenta, uterus and thoracic aorta. We also evaluated systolic blood pressure, fetal-placental development and NO metabolites. Plasma antioxidant capacity, plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PLGF) were also evaluated. Our data shows that the treatment with L-NAME increased blood pressure and decreased the offspring of these animals. On the other hand, doxycycline prevented L-NAME-induced gestational hypertension and the reduction of offspring. A decrease in NO bioavailability in hypertensive rats was also observed. Treatment with doxycycline attenuated the increased activity of MMP-2 and -9, caused by L-NAME-induced hypertension. Concomitantly, doxycycline restored the angiogenic balance by increasing PLGF levels and reducing levels of sFlt-1. Doxycycline also increased plasma antioxidant capacity in hypertensive rats. For this reason, we understand that the increased activity of MMP-2 and -9 was due to a reduction of NO caused by the treatment with L-NAME. It should be noted that

the increase in MMP activation and angiogenic imbalance caused by the L-NAME-induced gestational hypertension model are associated with increased systolic blood pressure, while doxycycline reestablished all of these parameters. Considering the importance of NO during a healthy gestation and during a hypertensive pregnancy due to its decrease, we performed a second study, in which we evaluated the activity of MMP-2 and -9 in three different gestational periods: initial, intermediate and late. In this second study, we observed that systolic blood pressure was elevated in the three proposed gestational periods, evidencing mainly in the last two periods (intermediate and late) in hypertensive rats. At the same time, in this same group of animals, plasma NO levels were insufficient, especially in the intermediate and late gestational periods, where there is a greater demand for NO. In addition, the fetal-placental parameters were compromised in hypertensive rats. Plasma levels of malondialdehyde and MMP-2 and -9 activity increased gradually over the gestational periods previously adopted in hypertensive rats. In summary, the data presented in both the first and second studies suggests that the gestational process itself requires a greater bioavailability of NO, and NO action in the modulation of the MMP activity during pregnancy, being this demand is greater in the final periods of gestation.

Keywords: Gestational hypertension; doxycycline; metalloproteinases; nitric oxide; rats

1 Introdução

1.1 A gestação e as mudanças hemodinâmicas

Devido à ocorrência da gestação, há inúmeras mudanças ocorrendo no corpo da mãe, ocasionadas, sobretudo por alterações hormonais. Relaciona-se com esse processo o remodelamento vascular e mudanças hemodinâmicas na circulação materna para o desenvolvimento fetal (Majed e Khalil, 2012), incluindo o aumento do volume sanguíneo, do débito cardíaco (Lopes Van Balen *et al.*, 2013) e do volume plasmático (Rodger *et al.*, 2015).

No primeiro trimestre, durante a sexta semana gestacional, o volume sanguíneo começa a aumentar, isso é notável até o início do segundo trimestre (Pisani *et al.*, 2017). O aumento de volume sanguíneo chega a progredir 50% entre 34 semanas gestacionais e o final do terceiro trimestre e o volume plasmático aumenta mais que 50–60% (Soma-Pillay *et al.*, 2016). O volume sanguíneo atinge em média 73-96 mL/kg a mais do que os valores normais de uma mulher não gestante (Ouzounian e Elkayam, 2012). Além disso, as mulheres no terceiro trimestre podem apresentar aumento do volume intersticial e plasmático, com maior volume de líquido extracelular no espaço intravascular em gestantes comparadas às não gestantes (Bird, Zhang e Magness, 2003).

O débito cardíaco atinge um aumento de 20% ainda na oitava semana gestacional e atinge 40% de aumento entre a vigésima e a vigésima oitava semana (Soma-Pillay *et al.*, 2016), podendo alcançar os 100%, no final do período gestacional, quando comparado a uma mulher não gestante (Lopes Van Balen *et al.*, 2013).

Esses parâmetros aumentados consequentemente poderiam promover o aumento da pressão arterial, no entanto, concomitantemente a essas várias mudanças, ocorrem também no sistema cardiovascular, durante toda a gestação, modificações para dilatar os vasos e diminuir a resistência (Dang *et al.*, 2013).

A redução da resistência vascular tem sido atribuída principalmente ao remodelamento das artérias espiraladas (James, Saghian et al. 2018), realizado por meio da migração dos trofoblastos, que substituem as células endoteliais da artéria espiralada uterina (Whitley and Cartwright 2010). Essa diferenciação dos citotrofoblastos deve-se ao papel das metaloproteinases (Zhang, Qi et al. 2010). Essas alterações dilatam os vasos de alta resistência, transformando-os em grandes vasos, com um fluxo sanguíneo aumentado e uma pressão bem reduzida.

A redução da resistência vascular sistêmica deve-se ao aumento de agentes vasodilatadores como óxido nítrico e prostaciclina (Gongora and Wenger 2015). A resistência vascular reduzida é uma importante adaptação para manter a pressão arterial sanguínea em níveis normais (Burton et al., 2009; Ouzounian e Elkayam, 2012).

Dentre os mediadores envolvidos no tônus vascular, o principal é o óxido nítrico (NO) (Furchgott e Zawadzki, 1980). O NO é um mediador gasoso que está envolvido em diversos processos fisiológicos, ele é produzido enzimaticamente no endotélio, principalmente pela isoforma endotelial da NO sintase (eNOS), enzima ativada pelo cálcio intracelular. Essa ativação converte o aminoácido L-arginina em NO e citrulina, com isso, o NO produzido na célula endotelial vascular difunde-se para a célula muscular lisa, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel a qual converte guanosina trifosfato em guanosina monofosfato cíclico (GMF). A GMF em seguida ativará a Proteína Kinase dependente do guanosina monofosfato cíclico, promovendo a redução de cálcio intracelular de três formas: aumento do recrutamento de cálcio para o retículo endoplasmático, ativação do efluxo de cálcio intracelular e inibição dos canais para entrada de cálcio, resultando em vasodilatação (Takimoto, 2012). No entanto, estudos sugerem que havendo comprometimento dessa via do NO, poderá haver a ocorrência de hipertensão, durante a gestação.

1.2 Complicações Hipertensivas Gestacionais

O período gestacional pode ser o tempo mais propenso a complicações hemodinâmicas (Santos e Couto, 2018), tendo sido associado a vários distúrbios materno-fetais, como parto prematuro, complicações vasculares e o desenvolvimento de doença cardiovascular a longo prazo (Rich-Edwards *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017). Desordens hipertensivas gestacionais afetam até 10% das mães em todo o mundo (Sutton, Harper e Tita, 2018). Elas são classificadas como:

- ✓ Hipertensão crônica/pré-existente: hipertensão (sistólica ≥ 140 ou diastólica ≥ 90 mmHg), diagnosticada antes da gestação ou antes da 20ª semana gestacional ou durante a gestação e não regride após o parto (Maloney, Heller e Baergen, 2012).
- ✓ Hipertensão gestacional: hipertensão diagnosticada após a 20ª semana gestacional, sem presença de proteinúria ou complicações sistêmicas. Há a regressão do quadro hipertensivo em aproximadamente 12 semanas após o parto (Sibai, 2003).
- ✓ Pré-eclâmpsia: hipertensão (sistólica ≥ 140 ou diastólica ≥ 90 mmHg) diagnosticada após a 20ª semana de gestação com presença de proteinúria ($\geq 0,3\text{g}/24\text{h}$) (Roberts *et al.*, 2003).
- ✓ Hipertensão crônica/pré-existente sobreposta por pré-eclâmpsia: mulheres com hipertensão crônica que desenvolvem proteinúria ou outra alteração clínica ou laboratorial característica da pré-eclâmpsia (Tuuli *et al.*, 2011)
- ✓ Eclâmpsia: é definida como a ocorrência de consequências neurológicas causadas como convulsões em associação com a pré-eclâmpsia (Mahran *et al.*, 2017).
- ✓ Síndrome HELLP: apresenta características severas de pré-eclâmpsia com hemólise, níveis elevados de enzimas hepáticas, e baixos níveis de plaquetas (Kongwattanakul *et al.*, 2018).

1.3 Fisiopatologia da PE

A PE está entre as complicações médicas mais comuns da gravidez (Lavie *et al.*, 2018). É uma síndrome exclusiva da gestação humana e sua fisiopatologia ainda não está completamente elucidada (Kallela *et al.*, 2016). A PE continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e perinatal (Spracklen *et al.*, 2016), sendo a principal causa de parto prematuro, a fim de proteger a mãe e o feto (Hashemi *et al.*, 2017). Atualmente não existe tratamento eficiente para PE, a não ser a retirada da placenta (Bortolotto, Francisco e Zugaib, 2018). Os médicos realizam esse procedimento porque, apesar da PE não ter etiologia totalmente esclarecida, há o alívio dos sintomas após o parto. Isso nos sugere que a placenta tem um papel importante associado a esta desordem.

A placenta é o órgão materno-fetal que começa a se desenvolver nos períodos iniciais da gestação e tem a função de realizar as trocas de nutrientes e gases entre a mãe e o feto. Estudos sugerem que diversos fatores de risco podem estar relacionados à ocorrência de uma falha no processo de placentação e ao desenvolvimento de desordens hipertensivas da gestação. Entre esses fatores, estudos mostram que a genética tem se mostrado importante no desenvolvimento da PE (Founds *et al.*, 2009), com uma maior incidência em mulheres afro-americanas do que em mulheres asiáticas (Rosenberg *et al.*, 2005).

De acordo com Lamminpaa, *et al* (2012), a idade também parece ser um fator de risco, uma vez que mulheres gestantes mais velhas têm apresentando maior prevalência de PE do que mulheres jovens. Além disso, o aumento de resposta imune pode causar a apoptose de células trofoblásticas e prejudicar a invasão trofoblástica, com inadequado remodelamento das artérias espiraladas e consequente má formação placentária (Redman e Sargent, 2010; Negishi *et al.*, 2018).

O desenvolvimento anormal da placenta e consequente isquemia/hipóxia placentária se relacionam com o primeiro estágio do desenvolvimento da PE (Rodriguez *et al.*, 2018). A

isquemia/hipóxia placentária propicia o segundo estágio do desenvolvimento da PE por promover a liberação de diversos fatores bioativos circulantes que atuam sobre o endotélio e desencadeiam a disfunção endotelial sistêmica, causando a vasoconstrição generalizada, aumento da resistência vascular periférica e hipertensão como ocorre na PE (Ali e Khalil, 2015).

Dentre os diferentes fatores ativos que podem contribuir para o dano endotelial durante a hipertensão gestacional, foi identificado o fms-like tirosina quinase-1 solúvel (sFlt-1), o qual é um receptor solúvel para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). O sFlt-1 se liga às moléculas de VEGF e do Fator de Crescimento Placentário (PLGF) circulantes, impedindo que esses fatores angiogênicos se acoplem aos seus receptores usuais na membrana celular (Di-Marco et al., 2009). Por esse motivo, estudos sugerem que o sFlt-1 possui papel importante no dano às células endoteliais e que o excesso de sFlt-1 poderia ter papel na fisiopatologia da PE por abolir as respostas vasodilatadoras mediadas por VEGF e pelo PLGF (Maynard et al., 2003).

Estudos experimentais mostraram que os níveis de sFlt-1 encontram-se elevados em modelos animais de hipertensão gestacional (Agunanne et al., 2010; Baijnath et al., 2017) e também em mulheres com PE (Bian, Shixia e Duan, 2015). Ainda, devido a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), há a rápida reação do O^{2-} (ânion superóxido) com NO para formar peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$) e diminuição da biodisponibilidade de NO (Di Marco et al., 2009).

Como a disfunção endotelial é caracterizada por uma diminuição da liberação de fatores de relaxamento e um aumento da liberação de fatores de contração derivados do endotélio, a diminuição do NO, um importante fator de relaxamento do endotélio vascular, pode estar relacionada, conforme estudos experimentais em ratas do modelo de hipertensão

gestacional (Baijnath, Soobryan et al. 2014) e em mulheres com PE (Ehsanipoor, Fortson et al. 2013), com essa diminuição do relaxamento vascular.

É claramente notável o importante o papel do NO e de suas interações com diversas substâncias de interesse na hipertensão gestacional. Uma maneira de modular farmacologicamente a síntese endógena do NO é utilizando ω -Nitro-L-arginine methylester (L-NAME), um inibidor não seletivo da síntese de NO. O mecanismo de ação do L-NAME consiste em um falso substrato para sintase NO, ou seja, o L-NAME compete com a L-Arginina pela Nos. Dessa maneira, não há a síntese de NO e citrulina.

Tem-se utilizado o L-NAME como agente farmacológico indutor de hipertensão arterial em ratas prenhes por causá-la e por restringir o crescimento fetal, mimetizando exatamente o que ocorre na PE.

1.4 Metaloproteinases

Assim como o NO, as metaloproteinases também se mostram alteradas durante a hipertensão gestacional. Elas são enzimas envolvidas na degradação de componentes da matrix extracelular, exercendo remodelamento e reparação tecidual nos processos fisiológicos, como a angiogênese e a morfogênese (Stamenkovic, 2003; Theocharis et al., 2016).

Atualmente são identificados 28 tipos de metaloproteinases, que são classificadas em seis grupos: **(1)** collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), **(2)** gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B), **(3)** estromelisinases (MMP-3 ou estromelisina 1 e MMP-10 ou estromelisina 2), **(4)** matrilisinas (MMP-7 ou matrilisina 1 e MMP-26 ou matrilisina 2), **(5)** MMPs de membranas (MT1-MMP (MMP-14), MT2- MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP, [MT5-MMP e MT6-MMP (MMP- 25)] e **(6)** outras

MMPs (MMP-12, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) (Visse e Nagase, 2003).

As MMPs são secretadas como zimogênios inativos e requerem uma ativação proteolítica a qual ocorre após a remoção do pró-peptídeo que disponibiliza o sítio ativo para catálise (Lu *et al.*, 2011; Khokha, Murthy e Weiss, 2013). As MMPs podem ser ativadas por vários fatores, dentre eles, hormônios, estresse oxidativo e estresse de cisalhamento (Rizzi *et al.*, 2009).

1.5 O papel das MMP-2 e MMP-9 em doenças cardiovasculares:

As metaloproteinases estão envolvidas em muitos processos fisiológicos, entretanto essas mesmas enzimas participam de processos patológicos (Barbosa, Gerlach e Tanus-Santos, 2006), e de diversos eventos cardiovasculares (Castro e Tanus-Santos, 2013), especificamente MMP-2 e MMP-9, que se destacam nas doenças cardiovasculares (Wang e Khalil, 2018).

As gelatinases são capazes de clivar diferentes tipos de colágeno, incluindo o tipo IV, V e XI (Xu *et al.*, 2001). O colágeno tipo IV é o componente mais importante da membrana basal vascular (Hudson, Reeders e Tryggvason, 1993). Em modelo experimental com ratos espontaneamente hipertensivos, houve mudanças morfológicas na parede aórtica, com significativo aumento da atividade e expressão da MMP-2 (Antonio *et al.*, 2014). Neste contexto, estudos têm mostrado que a atividade excessiva ou desequilibrada de MMP-2 e MMP-9 estão associadas à patogênese de hipertensão e remodelamento vascular em modelos animais (Pereira *et al.*, 2018) e em humanos (Kostov *et al.*, 2016).

Curiosamente, estudos experimentais mostraram MMP-2 aumentada em tecidos de útero e aorta de ratas prenhas (Dang *et al.*, 2013) e em todas as regiões da placenta de mulheres gestantes hipertensas (Sahay *et al.*, 2018b). Além disso, um estudo clínico observou

mulheres em diferentes períodos de gestação e mostrou uma aumentada concentração de MMP-2 no plasma sanguíneo de gestantes a partir da vigésima segunda semana gestacional (Myers *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a MMP-2 também se encontra em concentrações elevadas na urina de gestantes prestes a desenvolver a PE (Martinez-Fierro *et al.*, 2018). Ademais, aumentada atividade de MMP-9 tem sido correlacionada de forma positiva com os sintomas de hipertensão gestacional (Xiao *et al.*, 2018). Alguns estudos também mostraram aumentados níveis circulantes de ambas gelatinases MMP-2 e MMP-9 em mulheres com pré-eclâmpsia, quando comparado a gestantes normais (Eleuterio *et al.*, 2015).

Pelo exposto, fica claro a escassez de estudos e o importante papel desempenhado pelas MMPs durante desordens hipertensivas da gestação e que a inibição dessas enzimas pode ser uma estratégia terapêutica interessante para essa patologia. Estudos utilizando modelos animais de hipertensão mostraram que a doxíciclina atua inibindo as MMPs e por consequência impede alterações anormais na estrutura vascular associadas à hipertensão arterial (Castro, Tanus-Santos e Gerlach, 2011).

1.6 Doxíciclina, uma estratégia para inibir as metaloproteinases aumentadas durante a hipertensão gestacional

A doxíciclina é um antibiótico semi-sintético derivado das tetraciclinas, capaz de inibir a atividade das MMPs, entretanto o mecanismo de ação dessa inibição não está totalmente esclarecido. Sabe-se que as tetraciclinas são quelantes de Zn^{2+} , sugere-se assim que a doxíciclina possa se ligar próximo ao Zn^{2+} , bloqueando o sítio catalítico e inibindo a atividade de MMPs (Garcia *et al.*, 2005). Especula-se ainda que o mecanismo de ação da inibição de MMPs ocorra por meio da indução da atividade de inibidores endógenos teciduais (Yao *et al.*, 2007).

Em modelos experimentais com ratos, a doxiciclina inibiu a atividade da MMP-9 na dosagem de 5mg/dia e sua expressão foi coibida na dose de 10 mg/dia (Lee *et al.*, 2006). Em humanos, a atividade da MMP-2 foi reduzida pela doxiciclina na dose de 20mg/dia (Schulze *et al.*, 2013).

A doxiciclina é considerada o inibidor mais potente e não seletivo de MMPs (Castro *et al.*, 2012). Além disso, em estudos experimentais, não foi encontrada teratogenicidade em ratos com dose superior a 100 vezes a dose humana de doxiciclina (Nahum, *et al.*, 2006).

A doxiciclina é de baixa toxicidade oral, em um estudo experimental de toxicidade crônica com diversas doses de doxiciclina em ratos, hamsters, porcos, cães e macacos, notou-se um efeito NOEL (nenhum nível de efeito observado) na dose 25mg/kg (figura 1), durante um mês de tratamento. Por esse motivo, concluiu-se que não há evidências de toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento como também nenhuma evidência de potencial genotóxico, (EMA/MRL, 1997).

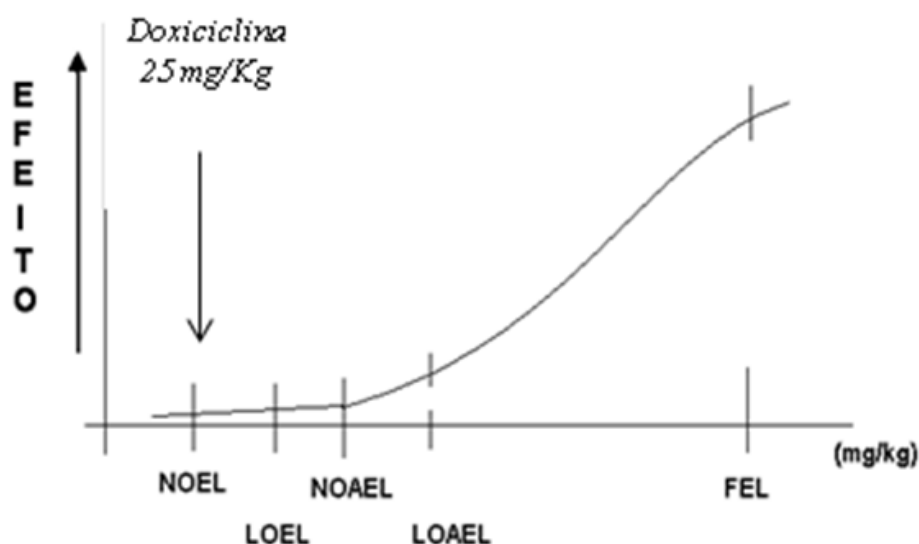


Figura 1: Gráfico do Efeito versus dosagem recebida. Sendo NOEL nenhum nível de efeito observado; LOEL baixo nível de efeito observado; NOAEL nenhum nível de efeito adverso observado; LOAEL baixo nível de efeito adverso observado e FEL Franco nível de efeito.

Conclusão

5 Conclusão

Os nossos achados estão de acordo com as nossas hipóteses de que reduções na formação de NO podem estar correlacionadas ao aumento das atividades de MMP-2 e -9, sugerindo que pode haver um *crosstalk* entre redução da síntese de NO e aumento da atividade de MMPs na hipertensão durante a gravidez. Além disso, nossos estudos sugerem também que após a inibição da NOS, a doxíciclina reduz a pressão arterial sistólica e atenua os aumentos das atividades de MMP-2 e -9.

Em resumo, nossos dados indicam que a demanda por NO pode ser maior durante os períodos finais da gestação e que o NO pode modular negativamente as MMPs durante a gestação saudável, uma vez que, quando a biodisponibilidade de NO é reduzida, observamos aumentos na atividade das MMP-2 e -9. Portanto, nossos resultados estão de acordo com a hipótese de que o NO modula a atividade das MMPs durante a gestação.

Referências

Referências

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

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

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

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

ANTONIO, R. C. et al. Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. **Mol Cell Biochem**, v. 386, n. 1-2, p. 99-105, Jan 2014. ISSN 1573-4919 (Electronic) 0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114660> >.

ATIBA, A. S. et al. Plasma Malondialdehyde (MDA): An Indication of Liver Damage in Women with Pre-Eclampsia. **Ethiop J Health Sci**, v. 26, n. 5, p. 479-486, Sep 2016. ISSN 2413-7170 (Electronic) 1029-1857 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28446854> >.

BAIJNATH, S. et al. The effects of sildenafil citrate on urinary podocin and nephrin mRNA expression in an L-NAME model of pre-eclampsia. **Mol Cell Biochem**, v. 427, n. 1-2, p. 59-67, Mar 2017. ISSN 1573-4919 (Electronic) 0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995418> >.

BAKACAK, M. et al. Changes in Copper, Zinc, and Malondialdehyde Levels and Superoxide Dismutase Activities in Pre-Eclamptic Pregnancies. **Med Sci Monit**, v. 21, p. 2414-20, Aug 17 2015. ISSN 1643-3750 (Electronic) 1234-1010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280939> >.

BARBOSA, F., JR.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 98, n. 6, p. 559-64, Jun 2006. ISSN 1742-7835 (Print) 1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700817> >.

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. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25906026> >.

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

BORTOLOTTI, M. R.; FRANCISCO, R. P. V.; ZUGAIB, M. Resistant Hypertension in Pregnancy: How to Manage? **Curr Hypertens Rep**, v. 20, n. 8, p. 63, Jun 11 2018. ISSN 1534-3111 (Electronic) 1522-6417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29892919> >.

BURTON, G. J. et al. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. **Placenta**, v. 30, n. 6, p. 473-82, Jun 2009. ISSN 1532-3102 (Electronic) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375795> >.

CARDOZO, E. R. et al. MicroRNA 21a-5p overexpression impacts mediators of extracellular matrix formation in uterine leiomyoma. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 16, n. 1, p. 46, May 11 2018. ISSN 1477-7827 (Electronic) 1477-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29747655> >.

CASTRO, M. M. et al. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 3, p. 162-8, Mar 31 2012. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327038> >.

CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. **Curr Drug Targets**, v. 14, n. 3, p. 335-43, Mar 2013. ISSN 1873-5592 (Electronic) 1389-4501 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316965> >.

CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. **Pharmacol Res**, v. 64, n. 6, p. 567-72, Dec 2011. ISSN 1096-1186 (Electronic) 1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514386> >.

CAVALLI, R. C. et al. PP070. Maternal flow-mediated dilation and nitrite concentration during third trimester of pregnancy and postpartum period. **Pregnancy Hypertens**, v. 2, n. 3, p. 279, Jul 2012. ISSN 2210-7789 (Print) 2210-7789 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26105392> >.

CHEN, J. et al. Decreased homodimerization and increased TIMP-1 complexation of uteroplacental and uterine arterial matrix metalloproteinase-9 during hypertension-in-pregnancy. **Biochem Pharmacol**, v. 138, p. 81-95, Aug 15 2017. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28506758> >.

CHISHOLM, K. M. et al. Classification of Preterm Birth With Placental Correlates. **Pediatr Dev Pathol**, p. 1093526618775958, May 14 2018. ISSN 1093-5266 (Print) 1093-5266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29759046> >.

DANG, Y. et al. EMMPRIN-mediated induction of uterine and vascular matrix metalloproteinases during pregnancy and in response to estrogen and progesterone. **Biochem Pharmacol**, v. 86, n. 6, p. 734-47, Sep 15 2013. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856290> >.

DE VIVO, A. et al. Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 87, n. 8, p. 837-42, 2008. ISSN 1600-0412 (Electronic) 0001-6349 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607829> >.

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

EHSANIPOOR, R. M. et al. Nitric oxide and carbon monoxide production and metabolism in preeclampsia. **Reprod Sci**, v. 20, n. 5, p. 542-8, May 2013. ISSN 1933-7205 (Electronic) 1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012314> >.

ELEUTERIO, N. M. et al. Positive correlations between circulating adiponectin and MMP2 in preeclampsia pregnant. **Pregnancy Hypertens**, v. 5, n. 2, p. 205-8, Apr 2015. ISSN 2210-7797 (Electronic) 2210-7789 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943646> >.

FOUND, S. A. et al. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 15-24, Jan 2009. ISSN 0143-4004 (Print) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027158> >.

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

GARCIA, R. A. et al. Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 4, p. 1128-36, Apr 2005. ISSN 0026-895X (Print) 0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665254> >.

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

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

GONCALVES-RIZZI, V. H. et al. Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor. **Nitric Oxide**, v. 57, p. 71-78, Jul 1 2016. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27181106> >.

HASHEMI, V. et al. Natural killer T cells in Preeclampsia: An updated review. **Biomed Pharmacother**, v. 95, p. 412-418, Nov 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28863381> >.

HODZIC, J. et al. Nitric oxide biosynthesis during normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia. **Med Glas (Zenica)**, v. 14, n. 2, p. 211-217, Aug 1 2017. ISSN 1840-2445 (Electronic) 1840-0132 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28786966> >.

HUDSON, B. G.; REEDERS, S. T.; TRYGGVASON, K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. **J Biol Chem**, v. 268, n. 35, p. 26033-6, Dec 15 1993. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253711> >.

KALLELA, J. et al. The diagnosis of pre-eclampsia using two revised classifications in the Finnish Pre-eclampsia Consortium (FINNPEC) cohort. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 16, p. 221, Aug 12 2016. ISSN 1471-2393 (Electronic) 1471-2393 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27520381> >.

KAYA, A. et al. The evaluation of hypoxia-inducible factor 1 in N-nitro-L-arginine methyl ester preeclampsia model of pregnant rats. **J Investig Med**, v. 59, n. 8, p. 1268-72, Dec 2011. ISSN 1708-8267 (Electronic) 1081-5589 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941213> >.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 649-65, Sep 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969736> >.

KONGWATTANAKUL, K. et al. Incidence, characteristics, maternal complications, and perinatal outcomes associated with preeclampsia with severe features and HELLP syndrome. **Int J Womens Health**, v. 10, p. 371-377, 2018. ISSN 1179-1411 (Print) 1179-1411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30046254> >.

KOSTOV, K. et al. Serum Concentrations of Endothelin-1 and Matrix Metalloproteinases-2, -9 in Pre-Hypertensive and Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 8, Aug 1 2016. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27490532> >.

KUSINSKI, L. C. et al. eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 1, p. R86-93, Jul 1 2012. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552791> >.

LAVIE, A. et al. Maternal cardiovascular hemodynamics in normotensive versus preeclamptic pregnancies: a prospective longitudinal study using a noninvasive cardiac system (NICaS). **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 18, n. 1, p. 229, Jun 14 2018. ISSN 1471-2393 (Electronic) 1471-2393 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29898711> >.

LEE, C. Z. et al. Dose-response effect of tetracyclines on cerebral matrix metalloproteinase-9 after vascular endothelial growth factor hyperstimulation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 9, p. 1157-64, Sep 2006. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395286> >.

LI, W. et al. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy. **Biochem Pharmacol**, v. 89, n. 3, p. 370-85, Jun 1 2014. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704473> >.

LOMBARDI, A. et al. Expression of Matrix Metalloproteinases in the Mouse Uterus and Human Myometrium During Pregnancy, Labor, and Preterm Labor. **Reprod Sci**, v. 25, n. 6, p. 938-949, Jun 2018. ISSN 1933-7205 (Electronic) 1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28950743> >.

LOPES VAN BALEN, V. A. et al. Early pregnancy circulatory adaptation and recurrent hypertensive disease: an explorative study. **Reprod Sci**, v. 20, n. 9, p. 1069-74, Sep 2013. ISSN 1933-7205 (Electronic) 1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420822> >.

LU, P. et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 12, Dec 1 2011. ISSN 1943-0264 (Electronic) 1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917992> >.

MAHRAN, A. et al. Risk factors and outcome of patients with eclampsia at a tertiary hospital in Egypt. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 17, n. 1, p. 435, Dec 22 2017. ISSN 1471-2393 (Electronic) 1471-2393 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29272998> >.

MAJED, B. H.; KHALIL, R. A. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 3, p. 540-82, Jul 2012. ISSN 1521-0081 (Electronic) 0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679221> >.

MALONEY, K. F.; HELLER, D.; BAERGEN, R. N. Types of maternal hypertensive disease and their association with pathologic lesions and clinical factors. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 31, n. 5, p. 319-23, Oct 2012. ISSN 1551-3823 (Electronic) 1551-3815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432966> >.

MARTINEZ-FIERRO, M. L. et al. Matrix metalloproteinase multiplex screening identifies increased MMP-2 urine concentrations in women predicted to develop preeclampsia. **Biomarkers**, v. 23, n. 1, p. 18-24, Feb 2018. ISSN 1366-5804 (Electronic) 1354-750X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055277> >.

MATSUBARA, K. et al. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 3, p. 4600-14, Mar 2 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739077> >.

MATSUBARA, K. et al. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 36, n. 2, p. 239-47, Apr 2010. ISSN 1447-0756 (Electronic) 1341-8076 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492372> >.

MAYER, F. et al. Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions? **Forensic Sci Int**, v. 288, p. 181-188, Jul 2018. ISSN 1872-6283 (Electronic) 0379-0738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29753936> >.

MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 649-58, Mar 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618519> >.

MAZZUCA, M. Q. et al. Downregulation of microvascular endothelial type B endothelin receptor is a central vascular mechanism in hypertensive pregnancy. **Hypertension**, v. 64, n. 3, p. 632-43, Sep 2014. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914193> >.

METZGER, I. F.; SANDRIM, V. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Endogenous nitric oxide formation correlates negatively with circulating matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 levels in black subjects. **Mol Cell Biochem**, v. 360, n. 1-2, p. 393-9, Jan 2012. ISSN 1573-4919 (Electronic) 0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956669> >.

MORI, K. et al. A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. **FEBS J**, Oct 3 2018. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30281903> >.

MYATT, L.; WEBSTER, R. P. Vascular biology of preeclampsia. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. 3, p. 375-84, Mar 2009. ISSN 1538-7836 (Electronic) 1538-7836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19087223> >.

MYERS, J. E. et al. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 24, n. 2, p. 103-15, 2005. ISSN 1064-1955 (Print) 1064-1955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16036395> >.

NASCIMENTO, R. A. et al. Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 116, n. 6, p. 508-15, Jun 2015. ISSN 1742-7843 (Electronic) 1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25308714> >.

NASCIMENTO, R. A. et al. Hypertension, augmented activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 and angiogenic imbalance in hypertensive pregnancy are attenuated by doxycycline. **Eur J Pharmacol**, Oct 15 2018. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30336141> >.

NEGISHI, Y. et al. Innate immune cells in reproduction. **J Obstet Gynaecol Res**, Jul 29 2018. ISSN 1447-0756 (Electronic) 1341-8076 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30058156> >.

OUZOUNIAN, J. G.; ELKAYAM, U. Physiologic changes during normal pregnancy and delivery. **Cardiol Clin**, v. 30, n. 3, p. 317-29, Aug 2012. ISSN 1558-2264 (Electronic) 0733-8651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22813360> >.

PEREIRA, S. C. et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. **Atherosclerosis**, v. 270, p. 146-153, Mar 2018. ISSN 1879-1484 (Electronic) 0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29425960> >.

PIMENTEL, A. M. et al. L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. **Hypertens Res**, v. 36, n. 9, p. 783-8, Sep 2013. ISSN 1348-4214 (Electronic) 0916-9636 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575380> >.

PISANI, I. et al. Correlation between maternal body composition and haemodynamic changes in pregnancy: different profiles for different hypertensive disorders. **Pregnancy Hypertens**, v. 10, p. 131-134, Oct 2017. ISSN 2210-7797 (Electronic) 2210-7789 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29153665> >.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S. et al. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 389, n. 12, p. 1325-1332, Dec 2016. ISSN 1432-1912 (Electronic) 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620880> >.

RAIJMAKERS, M. T.; DECHEND, R.; POSTON, L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 374-80, Oct 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326082> >.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Immunology of pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 534-43, Jun 2010. ISSN 1600-0897 (Electronic) 1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331588> >.

RICH-EDWARDS, J. W. et al. Pregnancy characteristics and women's future cardiovascular health: an underused opportunity to improve women's health? **Epidemiol Rev**, v. 36, p. 57-70, 2014. ISSN 1478-6729 (Electronic) 0193-936X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025350> >.

RIZZI, E. et al. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. **Arch Toxicol**, v. 83, n. 5, p. 439-49, May 2009. ISSN 1432-0738 (Electronic) 0340-5761 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836702> >.

RIZZI, E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. **J Card Fail**, v. 16, n. 7, p. 599-608, Jul 2010. ISSN 1532-8414 (Electronic) 1071-9164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610236> >.

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

ROBERTS, J. M. et al. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. **Hypertens Pregnancy**, v. 22, n. 2, p. 109-27, 2003. ISSN 1064-1955 (Print) 1064-1955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908996> >.

RODGER, M. et al. Haematological problems in obstetrics. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 29, n. 5, p. 671-84, Jul 2015. ISSN 1532-1932 (Electronic) 1521-6934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819750> >.

RODRIGUEZ, M. et al. Perinatal outcome and placental apoptosis in patients with late-onset pre-eclampsia and abnormal uterine artery Doppler at diagnosis. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 51, n. 6, p. 775-782, Jun 2018. ISSN 1469-0705 (Electronic) 0960-7692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28452161> >.

ROSENBERG, T. J. et al. Maternal obesity and diabetes as risk factors for adverse pregnancy outcomes: differences among 4 racial/ethnic groups. **Am J Public Health**, v. 95, n. 9, p. 1545-51, Sep 2005. ISSN 0090-0036 (Print) 0090-0036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118366> >.

SAHAY, A. S. et al. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases -9 (MMP-9) are differentially expressed in different regions of normal and preeclampsia placentae. **J Cell Biochem**, Apr 17 2018a. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29665148> >.

_____. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases -9 (MMP-9) are differentially expressed in different regions of normal and preeclampsia placentae. **J Cell Biochem**, v. 119, n. 8, p. 6657-6664, Aug 2018b. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29665148> >.

SANCHEZ-ARANGUREN, L. C. et al. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. **Front Physiol**, v. 5, p. 372, 2014. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346691> >.

SANDRIM, V. C. et al. Increased circulating cell-free hemoglobin levels reduce nitric oxide bioavailability in preeclampsia. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 3, p. 493-500, Aug 1 2010. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510352> >.

SANTOS, A.; COUTO, R. D. Lipoprotein Profile Modifications during Gestation: A Current Approach to Cardiovascular risk surrogate markers and Maternal-fetal Unit Complications. **Rev Bras Ginecol Obstet**, May 16 2018. ISSN 1806-9339 (Electronic) 0100-7203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29768640> >.

SCHIESSL, B. et al. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. **Arch Gynecol Obstet**, v. 274, n. 3, p. 150-4, Jun 2006. ISSN 0932-0067 (Print) 0932-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16532320> >.

SCHULZE, C. J. et al. Doxycycline reduces cardiac matrix metalloproteinase-2 activity but does not ameliorate myocardial dysfunction during reperfusion in coronary artery bypass patients undergoing cardiopulmonary bypass. **Crit Care Med**, v. 41, n. 11, p. 2512-20, Nov 2013. ISSN 1530-0293 (Electronic) 0090-3493 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928836> >.

SEO, K. W. et al. Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR-beta/Akt signaling pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70437, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950935> >.

SEO, K. W. et al. Mechanical stretch enhances the expression and activity of osteopontin and MMP-2 via the Akt1/AP-1 pathways in VSMC. **J Mol Cell Cardiol**, v. 85, p. 13-24, Aug 2015. ISSN 1095-8584 (Electronic) 0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25986148> >.

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

SIBAI, B. M. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 102, n. 1, p. 181-92, Jul 2003. ISSN 0029-7844 (Print) 0029-7844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850627> >.

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovasc J Afr**, v. 27, n. 2, p. 89-94, Mar-Apr 2016. ISSN 1680-0745 (Electronic) 1015-9657 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27213856> >.

SPRACKLEN, C. N. et al. Physical Activity During Pregnancy and Subsequent Risk of Preeclampsia and Gestational Hypertension: A Case Control Study. **Matern Child Health J**, v. 20, n. 6, p. 1193-202, Jun 2016. ISSN 1573-6628 (Electronic) 1092-7875 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26910608> >.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol**, v. 200, n. 4, p. 448-64, Jul 2003. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12845612> >.

SUTTON, A. L. M.; HARPER, L. M.; TITA, A. T. N. Hypertensive Disorders in Pregnancy. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 45, n. 2, p. 333-347, Jun 2018. ISSN 1558-0474 (Electronic) 0889-8545 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29747734> >.

TAKIMOTO, E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. **Circ J**, v. 76, n. 8, p. 1819-25, 2012. ISSN 1347-4820 (Electronic) 1346-9843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22785374> >.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 97, p. 4-27, Feb 1 2016. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26562801> >.

TILAKARATNE, A.; SOORY, M. Antioxidant response of osteoblasts to doxycycline in an inflammatory model induced by C-reactive protein and interleukin-6. **Infect Disord Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 14-22, 2014. ISSN 2212-3989 (Electronic) 1871-5265 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25159306> >.

TUULI, M. G. et al. Perinatal outcomes in women with preeclampsia and superimposed preeclampsia: do they differ? **Am J Obstet Gynecol**, v. 204, n. 6, p. 508 e1-7, Jun 2011. ISSN 1097-6868 (Electronic) 0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419381> >.

VALDES, G. et al. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 79, Jul 31 2009. ISSN 1477-7827 (Electronic) 1477-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646248> >.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2 2003. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128> >.

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. **Adv Pharmacol**, v. 81, p. 241-330, 2018. ISSN 1557-8925 (Electronic) 1054-3589 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29310800> >.

WU, P. et al. Preeclampsia and Future Cardiovascular Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Circ Cardiovasc Qual Outcomes**, v. 10, n. 2, Feb 2017. ISSN 1941-7705 (Electronic) 1941-7713 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28228456> >.

XIAO, S. et al. Celastrol attenuates symptoms of preeclampsia in rats by inhibiting matrix metalloproteinase-9. **Eur J Pharmacol**, v. 830, p. 33-38, Jul 5 2018. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29694830> >.

XU, J. et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. **J Cell Biol**, v. 154, n. 5, p. 1069-79, Sep 3 2001. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535623> >.

YAO, J. S. et al. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration. **Neurochem Int**, v. 50, n. 3, p. 524-30, Feb 2007. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145119> >.

YU, W. et al. Molecular Determinants of Microvascular Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. **Microcirculation**, p. e12508, Oct 19 2018. ISSN 1549-8719 (Electronic) 1073-9688 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30338879> >.