



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Dayane Teixeira Ognibene

**Papel do sistema renina-angiotensina sobre a função vascular e plaquetária  
na gravidez normal e associada à hipertensão**

Rio de Janeiro

2010

Dayane Teixeira Ognibene

**Papel do sistema renina-angiotensina sobre a função vascular e plaquetária na gravidez normal e associada à hipertensão**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O34 Ognibene, Dayane Teixeira.  
Papel do sistema renina-angiotensina sobre a função vascular e plaquetária na gravidez normal e associada à hipertensão / Dayane Teixeira Ognibene. -  
2010.  
93 f. : il.

Orientadora: Angela de Castro Resende.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Hipertensão - Teses. 2. Gravidez - Teses. 3. Plaquetas - Teses. 4. Sistema renina-angiotensina - Teses. 5. Óxido nítrico - Teses. I. Resende, Angela de Castro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12-008.331.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Dayane Teixeira Ognibene

**Papel do sistema renina-angiotensina sobre a função vascular e plaquetária na gravidez normal e associada à hipertensão**

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de junho de 2010.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela de Castro Resende  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Lúcia Martins da Silva  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Miguel de Lemos Neto  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2010

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Carlos e Marlene, que me proporcionaram condições de chegar até aqui, com todo o amor, dedicação e esforço.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me guia, protege e fornece toda força para continuar minha caminhada.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Marlene, que me proporcionaram condições de chegar até aqui, com todo o amor, dedicação e esforço.

Aos meus irmãos, Alexandre, Carlos Eduardo e Thatiane, que sempre me apoiaram e torceram pela minha vitória.

Ao meu namorado, Leonardo, pelo amor, incentivo constante e por estar ao meu lado em mais uma conquista.

À professora Ângela de Castro Resende, pela confiança, orientação, amizade e exemplo profissional desde a minha iniciação científica.

Ao professor Roberto Soares de Moura pelos ensinamentos diários e pelo exemplo de amor e dedicação à pesquisa.

Aos professores Antônio Cláudio Mendes Ribeiro e Tatiana Marlowe Cunha Brunini pelo apoio durante o doutorado e pelo acolhimento no Laboratório de Transporte de Membranas.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Mediciniais, Ana Paula Machado da Rocha, Michelle Teixeira Teixeira, Giselle França da Costa, Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Cristiane Aguiar da Costa, Paola Raquel Braz de Oliveira, Pedro Henrique Pinto Bello, Grazielle Freitas de Bem, Taline Anne da Silva Amaral, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Marcelo Augusto Vieira de Souza e Carlos da Silva Lopes pelo apoio e colaboração durante todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Transporte de Membranas Monique Bandeira Moss, Cristiane Matsuura, Mariana Siqueira, Marcela dos Anjos Martins, Natália Rodrigues Pereira, Carmen Assumpção e Paula de Souza pela colaboração, amizade e apoio durante o doutorado.

Tudo Posso Naquele Que Me Fortalece  
*Filipenses 4:13*

## RESUMO

OGNIBENE, Dayane Teixeira. *Papel do sistema renina-angiotensina sobre a função vascular e plaquetária na gravidez normal e associada à hipertensão*. 2010. 93 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Na gravidez a circulação sistêmica materna se adapta para favorecer a perfusão útero-placentária e o sistema renina-angiotensina (SRA) tem um papel importante nessa adaptação. O objetivo deste estudo foi investigar a contribuição do SRA para a regulação cardiovascular materna no final da gravidez, assim como a via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR). O leito arterial mesentérico (LAM) e plaquetas foram obtidos no 20º dia de gravidez de ratas Wistar (NG) e SHR (HG) e respectivos controles em diestro (ND e HD). A pressão arterial sistólica foi reduzida no final da gravidez de ratas NG e HG. Os efeitos vasodilatadores induzidos pela angiotensina II e pela angiotensina 1-7, avaliados em LAM pré-contráído com norepinefrina, foram maiores em ratas HG do que nos outros grupos. A expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS) endotelial, avaliada em LAM pela técnica de Western Blotting, foi maior em NG e HG comparada com os respectivos controles. Enquanto isso, a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) e dos receptores AT<sub>1</sub> se apresentou aumentada em HD comparada aos grupos normotensos e a gravidez levou à redução das expressões em HG. A expressão de ECA2 foi maior nos grupos hipertensos do que dos grupos normotensos. O dano oxidativo, avaliado pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, foi menor em LAM de ratas NG e HG. A atividade da superóxido dismutase foi menor em HG comparada a HD. Enquanto isso, a gravidez aumentou a atividade da catalase em ratas normotensas e aumentou a atividade da glutatona peroxidase em ratas hipertensas. Em suspensão de plaquetas, as expressões de NOS endotelial e induzível, avaliadas por Western Blotting, assim como, a atividade da NOS intraplaquetária, mensurada pela conversão de L-[<sup>3</sup>H]-arginina a L-[<sup>3</sup>H]-citrulina, foram reduzidas em NG comparadas a ND, apesar do influxo inalterado de L-arginina. Paradoxalmente, os níveis de GMPc foram similares entre ND e NG, assim como a expressão de fosfodiesterase5 (PDE5) e a agregação plaquetária induzida por ADP. Em SHR, o influxo de L-arginina foi reduzido na gravidez. Ratas HG apresentaram menor expressão de NOS induzível e atividade da NOS quando comparadas com ratas HD. A expressão das enzimas guanilato ciclase solúvel e PDE5 foram menores em HG comparadas a HD, mas nenhuma diferença foi observada nos níveis de GMPc entre os dois grupos. Entretanto, níveis aumentados de GMPc foram observados em HG comparado aos grupos normotensos e a agregação plaquetária permaneceu inalterada. Os resultados sugerem que a redução da pressão arterial para valores normais no final da gravidez em SHR pode estar relacionada ao aumento da produção de NO e das respostas vasodilatadoras induzidas por angiotensina II e angiotensina 1-7, assim como à redução da expressão de ECA e receptores AT<sub>1</sub> e do estado oxidativo no LAM. Além disso, este estudo revela a presença da via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas de ratas. Apesar de uma reduzida biodisponibilidade plaquetária de NO, a agregação plaquetária permanece inalterada em HG, o que pode estar relacionado ao aumento dos níveis de GMPc e à reduzida expressão de PDE5.

Palavras-chave: Hipertensão. Gravidez. Leito arterial mesentérico. Plaquetas. Sistema renina-angiotensina. Óxido nítrico.

## ABSTRACT

During pregnancy the systemic maternal circulation adapts to facilitate uteroplacental perfusion and the renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in this adaptation. The objective of this study was to investigate the contribution of RAS on the maternal cardiovascular regulation at the end of pregnancy as well as the L-arginine-NO-cGMP pathway in platelets from normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR). Mesenteric arterial bed (MAB) and platelets were obtained in the 20th day of pregnancy from female SHR (SHR-P) and normotensive controls (P) or age-matched non-pregnant rats (SHR-NP and NP). The systolic blood pressure in P and SHR-P rats was reduced at the end of pregnancy. The vasodilator effects of angiotensin II and angiotensin 1-7, evaluated in norepinephrine precontracted MAB, were higher in SHR-P than in other groups. Endothelial nitric oxide synthase (NOS) expression in MAB was evaluated by Western Blotting and was increased in P and SHR-P compared to their non-pregnant counterparts. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and AT<sub>1</sub> receptor expressions were increased in MAB from SHR-NP compared to normotensive groups and the pregnancy reduced their expressions in SHR. On the other hand, ACE2 expression was higher in MAB from hypertensive than normotensive groups. Oxidative damage, evaluated by formation of thiobarbituric acid reaction substances (TBARS), was reduced in the pregnant groups compared to their non-pregnant counterparts. Superoxide dismutase activity was reduced in SHR-P compared to non-pregnant group. Pregnancy increased catalase activity in normotensive rats and increased glutathione peroxidase activity in SHR. In the platelet suspension, intraplatelet NOS activity measured by the conversion of L-[<sup>3</sup>H]-arginine to L-[<sup>3</sup>H]-citrulline was reduced in P compared to NP, despite unchanged in L-arginine influx. The expressions of endothelial and inducible NOS, evaluated by Western Blotting, were decreased during pregnancy in normotensive rats. Paradoxically, cGMP levels were similar between NP and P, as well as phosphodiesterase5 (PDE5) expression and platelet aggregation induced by ADP. In SHR, L-arginine influx was reduced in SHR-P compared to SHR-NP. SHR-P had impaired NOS activity and reduced inducible NOS expression compared with SHR-NP. Soluble guanylate cyclase and PDE5 expressions were lower in SHR-P compared to SHR-NP while no differences were noted in cGMP levels between groups. However, increased levels of cGMP levels were observed in SHR-P compared to normotensive groups and platelet aggregability remained unaltered. The results suggest that the reduction of blood pressure to normal values at the end of pregnancy in SHR may be related to an increased NO production and vasorelaxation to Ang II and Ang 1-7 associated with decreased expression of vascular ACE and AT<sub>1</sub> receptors and oxidative status. Moreover, this study reveals the presence of L-arginine-NO-cGMP pathway in rat platelets. Despite reduced platelet NO bioavailability in pregnant hypertensive rats, platelet aggregability remains unaltered, which may be related to increased levels of cGMP and reduced expression of PDE5.

**Keywords:** Hypertension. Pregnancy. Mesenteric arterial bed. Blood platelets. Renin-angiotensin system. Nitric oxide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais vias envolvidas na formação de angiotensinas.....	16
Figura 2 -	Via L-arginina-óxido nítrico.....	27
Figura 3 -	Vias envolvidas da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante.....	29
Figura 4 -	Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	35
Tabela 1 -	Pressão arterial sistólica.....	42
Figura 5 -	Efeito vasodilatador da Ang II em leito arterial mesentérico pré-contráído com norepinefrina de ratas ND, NG, HD e HG.....	43
Figura 6 -	Efeito vasodilatador da Ang 1-7 em leito arterial mesentérico pré-contráído com norepinefrina de ratas ND, NG, HD e HG.....	44
Figura 7 -	Expressão da eNOS em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	45
Figura 8 -	Expressão de receptores AT <sub>1</sub> em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	46
Figura 9 -	Expressão de receptores AT <sub>2</sub> em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	47
Figura 10 -	Expressão da ECA em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	48
Figura 11 -	Expressão da ECA2 em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	49
Figura 12 -	Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico em leito arterial mesentérico LAM de ratas ND, NG, HD e HG.....	50
Figura 13 -	Atividade da superóxido dismutase em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	51
Figura 14 -	Atividade da catalase em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	52
Figura 15 -	Atividade da glutathione peroxidase em leito arterial mesentérico de ratas ND, NG, HD e HG.....	53
Figura 16 -	Transporte de L-arginina em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	54
Figura 17 -	Efeito da Ang 1-7 sobre o transporte de L-arginina em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	55

Figura 18 -	Expressão da eNOS em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	56
Figura 19 -	Expressão da iNOS em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	57
Figura 20 -	Produção de L <sup>[3]H</sup> -citrulina em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG...	58
Figura 21 -	Efeito da Ang 1-7 sobre a produção de L <sup>[3]H</sup> -citrulina em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	59
Figura 22 -	Produção de GMPc em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	60
Figura 23 -	Expressão da subunidade $\beta_1$ da guanilato ciclase em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	61
Figura 24 -	Expressão da fosfodiesterase 5 em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	62
Figura 25 -	Agregação plaquetária (%) induzida por ADP em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	63
Figura 26 -	Efeito da Ang 1-7 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	3'5'-monofosfato de adenosina cíclica
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
BH <sub>4</sub>	Tetraidrobiopterina
BK	Bradicinina
CAT	Catalase
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GC	Guanilato ciclase
GMPc	3'5'-monofosfato de guanosina cíclica
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
GSSH	Glutationa reduzida
GR	Glutationa redutase
GTP	Trifosfato guanosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HD	Hipertensas em diestro
HG	Hipertensas grávidas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HSP90	Proteína de choque térmico 90
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LAM	Leito arterial mesentérico

L-NA	L-nitro-arginina
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
ND	Normotensas em diestro
NE	Norepinefrina
NG	Normotensas grávidas
Nitro	Nitroglicerina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
$\cdot\text{O}_2^-$	Ânion superóxido
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxil
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxil
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão salina fosfato
PDE	Fosfodiasterase
$\text{PGI}_2$	Prostaciclina
PPP	Plasma pobre em plaqueta
PRP	Plasma rico em plaqueta
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	15
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	20
1.1	<b>Hipertensão arterial e gravidez.....</b>	20
1.2	<b>Sistema renina-angiotensina.....</b>	21
1.3	<b>Via L-arginina-óxido nítrico.....</b>	24
1.4	<b>Estresse oxidativo.....</b>	27
2	<b>OBJETIVO.....</b>	32
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	33
3.1	<b>Animais utilizados.....</b>	33
3.2	<b>Medida da pressão arterial sistólica.....</b>	33
3.3	<b>Protocolos experimentais com leito arterial mesentérico.....</b>	34
3.3.1	<u>Isolamento do leito arterial mesentérico.....</u>	34
3.3.2	<u>Reatividade do leito arterial mesentérico.....</u>	34
3.3.3	<u>Western Blotting em leito arterial mesentérico.....</u>	35
3.3.4	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....</u>	36
3.3.5	<u>Atividade das enzimas antioxidantes.....</u>	37
3.3.5.1	Medida da superóxido dismutase.....	37
3.3.5.2	Medida da catalase.....	37
3.3.5.3	Medida da glutathione peroxidase.....	37
3.4	<b>Protocolos experimentais com plaquetas.....</b>	38
3.4.1	<u>Transporte de L-arginina em plaquetas.....</u>	38
3.4.2	<u>Atividade da NOS plaquetária.....</u>	39
3.4.3	<u>Western Blotting em plaquetas.....</u>	39
3.4.4	<u>Mensuração do GMP cíclico intraplaquetário.....</u>	40
3.4.5	<u>Ensaio de agregação plaquetária.....</u>	40
3.5	<b>Análise estatística.....</b>	41
4	<b>RESULTADOS.....</b>	42
4.1	<b>Medida da pressão arterial sistólica.....</b>	42
4.2	<b>Estudo da resposta vasodilatadora induzida por Ang II em leito arterial mesentérico.....</b>	43

4.3	<b>Estudo da resposta vasodilatadora induzida por Ang 1-7 em leito arterial mesentérico.....</b>	44
4.4	<b>Expressão de eNOS em leito arterial mesentérico.....</b>	45
4.5	<b>Expressão de receptores AT<sub>1</sub> da Ang II em leito arterial mesentérico.....</b>	46
4.6	<b>Expressão de receptores AT<sub>2</sub> da Ang II em leito arterial mesentérico.....</b>	47
4.7	<b>Expressão da ECA em leito arterial mesentérico.....</b>	48
4.8	<b>Expressão da ECA2 em leito arterial mesentérico.....</b>	49
4.9	<b>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....</b>	50
4.10	<b>Medida da superóxido dismutase.....</b>	51
4.11	<b>Medida da catalase.....</b>	52
4.12	<b>Medida da glutathiona peroxidase.....</b>	53
4.13	<b>Transporte de L-arginina em plaquetas.....</b>	54
4.14	<b>Efeito da Ang 1-7 sobre o transporte de L-arginina em plaquetas.....</b>	55
4.15	<b>Expressão da eNOS em plaquetas.....</b>	56
4.16	<b>Expressão da iNOS em plaquetas.....</b>	57
4.17	<b>Atividade da NOS plaquetária.....</b>	58
4.18	<b>Efeito da Ang 1-7 sobre a atividade da NOS plaquetária.....</b>	59
4.19	<b>Mensuração do GMP cíclico intraplaquetário.....</b>	60
4.20	<b>Expressão da subunidade <math>\beta_1</math> da guanilato ciclase em plaquetas.....</b>	61
4.21	<b>Expressão de fosfodiesterase 5 em plaquetas.....</b>	62
4.22	<b>Análise da agregação plaquetária.....</b>	63
4.23	<b>Efeito da Ang 1-7 sobre a agregação plaquetária.....</b>	64
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	65
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	73
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	74
	<b>APÊNDICE – Artigo aceito para publicação na revista Hypertension Research (2010).....</b>	88

## INTRODUÇÃO

A gestação normal é uma condição fisiológica caracterizada por um aumento progressivo dos diferentes componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) (BROSNIHAN, 2004). As conseqüências fisiológicas do SRA estimulado não são completamente entendidas e tampouco, se a alteração desse sistema pode contribuir para as desordens hipertensivas da gravidez.

Na gestação normal, o estrogênio e/ou progesterona promovem um aumento na atividade do SRA pelo aumento dos níveis circulantes e teciduais de angiotensinogênio e renina (OELKERS, 1996). Paralelamente ao aumento da atividade da renina, é observado um aumento progressivo dos níveis plasmáticos do hormônio peptídeo angiotensina II (Ang II), formado a partir da angiotensina I (Ang I) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (BROSNIHAN *et al.*, 2004). As ações da Ang II são mediadas pela ativação de pelo menos dois subtipos de receptores, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. A maioria das ações conhecidas da Ang II, incluindo a estimulação da vasoconstrição, retenção de sódio, crescimento celular e estresse oxidativo é mediada pelo receptor AT<sub>1</sub>, enquanto a função dos receptores AT<sub>2</sub> é bem menos conhecida, mas as evidências indicam que o receptor AT<sub>2</sub> deve contrapor as ações mediadas por AT<sub>1</sub> sobre a pressão arterial e proliferação celular (KASCHINA & UNGER, 2003).

Apesar do expressivo aumento da atividade do SRA durante o curso normal da gestação, a pressão arterial não aumenta. O que se observa na gestação, tanto em mulheres como em ratas normotensas, é um aumento do volume sanguíneo e débito cardíaco para suprir as demandas da circulação útero-placentária. Apesar disso, observa-se um discreto decréscimo da pressão arterial, no decorrer da gestação, atribuída à acentuada queda da resistência vascular periférica (RVP) (LEVY *et al.*, 2008; PALLER, 1987). Portanto, deve-se questionar por que a atividade aumentada do SRA não resulta em hipertensão na gestação normal.

Até o momento, tem sido proposto que mulheres grávidas são resistentes ao efeito pressor da Ang II, e por isso elas permanecem normotensas, apesar do aumento de 2.7 vezes na concentração plasmática do peptídeo. Na gestação normal, esta hiporreatividade vascular a Ang II tem sido associada, em parte, a uma menor expressão do receptor AT<sub>1</sub> (BROSNIHAN *et al.*, 2004). Além disso, a vasoconstrição poderia ser atenuada pela secreção de fatores relaxantes como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) pelas células endoteliais (VALDES *et al.*, 2009). Atualmente, as evidências sugerem que a secreção desses fatores

relaxantes derivados do endotélio está freqüentemente sob o controle de hormônios classicamente associados com a contração do músculo liso vascular, incluindo a Ang II, e que a gestação, particularmente, parece aumentar seletivamente esta resposta endotelial (STENNETT *et al.*, 2009). Entretanto, não se conhece se a própria Ang II é capaz de relaxar a vasculatura de ratas grávidas e, portanto, contribuir para a modulação do tônus vascular na gravidez; se esta resposta está aumentada na gestação normal e se este efeito é mediado por receptores  $AT_2$ , como já foi observado por nosso grupo em vasos de animais machos normotensos (SOARES DE MOURA *et al.*, 2004) e hipertensos (OGNIBENE *et al.*, 2009). Além disso, um possível aumento da síntese e expressão de outros componentes do SRA deve ser considerado.

A descoberta da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (DONOGHUE *et al.*, 2000), homóloga a ECA, imprimiu uma nova dimensão ao SRA, tornando-o muito mais complexo do que se pensava originalmente. A cascata enzimática do SRA agora inclui as vias dependentes de ECA2 que geram diretamente Angiotensina 1-9 a partir de Ang I e degradam Ang II em Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (Figura 1). Tem sido descrito que a Ang 1-7 via receptor  $AT_{1-7}$  ou *mas*, e Ang II via receptor  $AT_2$  promovem efeitos opostos àqueles mediados pelo receptor  $AT_1$  da Ang II, incluindo vasodilatação e efeito antiproliferativo (SANTOS *et al.*, 2005). A ECA2 é resistente aos inibidores da ECA (p. ex. captopril, lisinopril, e enalapril) que são largamente utilizados na terapia anti-hipertensiva. Este fato sugere que a ECA2 deve agir para contrabalançar a atividade dos componentes vasoconstritores do SRA.

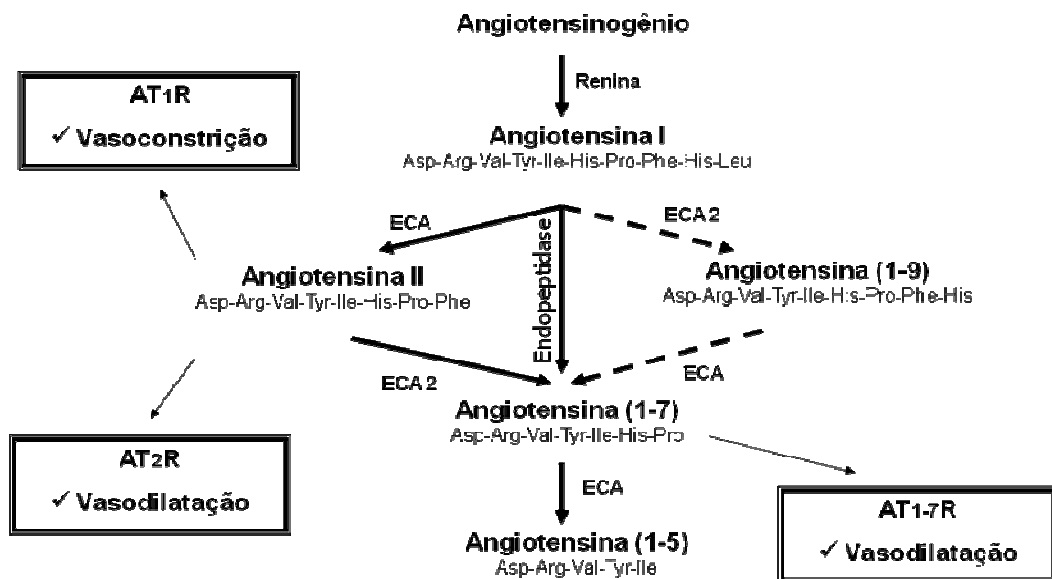


Figura 1- Principais vias envolvidas na formação de angiotensinas.

De fato, estudos prévios indicam que os níveis plasmático e urinário de Ang 1-7 estão aumentados em mulheres e ratas grávidas normotensas (BROSNIHAN *et al.*, 2005) e reduzidos em modelo de pré-eclampsia (JOYNER *et al.*, 2007). A localização e expressão útero-placentária de Ang 1-7 e ECA2 sugerem uma função autócrina da Ang 1-7 na regulação vasoativa durante a gestação (BROSNIHAN *et al.*, 2005; VALDÉS *et al.*, 2006). Além disso, o nível plasmático aumentado de Ang 1-7 está associado com um efeito vasodilatador aumentado deste peptídeo em artéria de resistência (NEVES *et al.*, 2003). Esses relevantes achados nos levaram a questionar se a Ang 1-7 e a ECA2 também poderiam contribuir para a regulação cardiovascular na gravidez e se a hipertensão pré-existente modifica essa regulação.

Portanto, a gravidez normal está associada a profundas modificações hemodinâmicas. A redução da pressão arterial acompanha a queda da resistência vascular periférica (PHIPPARD *et al.*, 1986; ROBSON *et al.*, 1989). Os mecanismos responsáveis pela vasodilatação associada à gravidez não são completamente entendidos, mas estudos anteriores demonstraram que o NO é o principal modulador dessa resposta (COCKELL & POSTON, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1997) e que há o aumento da sua síntese durante a gestação normal (SLADEK *et al.*, 1997; CONRAD *et al.*, 1993), assim como o aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e dos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (WEINER *et al.*, 1994b; NELSON *et al.*, 2000). Portanto, o NO liberado das células endoteliais é um importante vasodilatador que pode ter um papel fundamental na regulação cardiovascular durante a gravidez. Assim como nas células endoteliais, estudos apontam para o aumento da NOS endotelial (eNOS) em plaquetas de mulheres grávidas normotensas e a sua redução na gravidez associada à pré-eclâmpsia (DELACRÉTAZ *et al.*, 1995).

Em ratas espontaneamente hipertensas (SHR), o nível de pressão arterial sistólica (PAS) permanece elevado até, aproximadamente, o 14º dia de gravidez, entretanto é reduzido a valores normais no final da gravidez (RACASAN *et al.*, 2005; IACONO *et al.*, 2009), mesmo com um aumento do volume sanguíneo e do débito cardíaco. Esse fenômeno tem sido associado à diminuição da responsividade a agentes vasoconstritores (PALLER *et al.*, 1984; BALLEJO *et al.*, 2002), como também ao aumento da produção de NO e PGI<sub>2</sub> pelo endotélio (WARE *et al.*, 1993). Modificações adaptativas do SRA e do estado inflamatório parecem contribuir para essa redução. Recentemente foi demonstrado que um aumento da expressão renal de receptores AT<sub>2</sub>, associado à redução de receptores AT<sub>1</sub>, assim como, a redução do estado pró-inflamatório e de parâmetros oxidativos renais parecem contribuir para a queda da pressão arterial durante a gravidez em SHR (IACONO *et al.*, 2009). No entanto, ainda não é

conhecida a resposta vascular aos peptídeos Ang II e Ang 1-7, assim como a expressão vascular de suas enzimas geradoras, ECA e ECA2, dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> e o estado oxidativo vascular durante a gravidez em SHR.

As desordens hipertensivas representam uma importante complicação na gestação, pois favorecem o retardo do crescimento intrauterino humano, contribuindo para a morbidade e mortalidade neonatal (BASSAN *et al.*, 2005; SHAH, 2005). Ao contrário do que se observa na gestação normal, a sensibilidade a norepinefrina e Ang II está elevada na gestação associada à hipertensão, caracterizando um aumento da resposta vasoconstritora, que contribui para o aumento da resistência periférica (GANT *et al.*, 1973).

A disfunção endotelial, caracterizada por uma redução no relaxamento vascular dependente de endotélio, também parece contribuir para o estado hipertensivo na gestação (RESENDE *et al.*, 2004), pois favorece também o aumento da resistência periférica. Dentre os fatores que contribuem para a etiologia da disfunção endotelial, grande destaque tem sido dado ao estresse oxidativo. Este, por sua vez, representa um desequilíbrio entre geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a proteção antioxidante, resultando no aumento da disponibilidade de EROs (TOUYZ, 2004). Apesar de estar bem estabelecido que a Ang II representa um dos principais mediadores do estresse oxidativo na hipertensão, contribuindo para a disfunção endotelial (TOUYZ, 2004), este papel ainda não foi esclarecido na hipertensão que acompanha a gestação. Como a Ang 1-7 parece mediar funções opostas às da Ang II, um possível efeito antioxidante deste peptídeo poderia contribuir para a manutenção de uma função endotelial na gestação normal. Trabalhos recentes demonstraram que a Ang 1-7 é capaz de modular negativamente o efeito pró-oxidante da Ang II em ratos e humanos (POLIZIO, 2007; SAMPAIO, 2007). Entretanto, nenhuma evidência nesse sentido foi observada no curso da gestação e tampouco se essa função estaria alterada na hipertensão.

Estudos sugerem que os fatores de risco para doenças cardiovasculares estão associados não somente à disfunção endotelial (BRUNNER *et al.*, 2005), mas também à ativação plaquetária (KONSTANTINOVA *et al.*, 2006). Na hipertensão, as plaquetas estão ativadas e ainda, nas doenças cardiovasculares, parece haver uma diminuição da responsividade plaquetária ao efeito anti-agregante do NO (CHIRKOV *et al.*, 2004). Estudos indicam que uma redução intraplaquetária de NO, associada com uma hiperagregabilidade plaquetária, pode estar envolvida nos eventos trombóticos em pacientes com hipertensão essencial (BRUNINI *et al.*, 2004; MOSS *et al.*, 2004, DE MEIRELLES *et al.*, 2009), uma vez que o NO inibe a adesão plaquetária (QUEEN *et al.*, 2000), agregação (RADOMSKI *et al.*,

1990), recrutamento (FREEDMAN *et al.*, 1997) e formação de agregados leucócito-plaqueta (CHUNG *et al.*, 2004). Dessa forma, o aumento da ativação plaquetária na hipertensão parece estar associado com uma diminuição na biodisponibilidade do NO (MOSS *et al.*, 2004; BRUNINI *et al.*, 2005; TADDEI *et al.*, 2006).

Além disso, evidências sugerem que as plaquetas possuem receptores para Ang II, e esse peptídeo, por sua vez, potencializa a agregação plaquetária (TOUYZ & SCHIFFRIN, 1993). Por outro lado, foi demonstrado que a Ang 1-7, peptídeo vasodilatador e possível antagonista das ações fisiológicas da Ang II (BROSNIHAN *et al.*, 1996), potencializa o efeito anti-agregante plaquetário induzido pelo nitroprussiato de sódio, um doador de NO (RAJENDRAN *et al.*, 2005). No entanto, não há evidências a respeito do papel da via L-arginina-NO em plaquetas e sua ativação durante a gravidez de ratas espontaneamente hipertensas.

Utilizando SHR como um modelo de gravidez associada com hipertensão pré-existente, avaliamos neste estudo as ações vasculares da Ang II e da Ang 1-7; a expressão vascular de componentes do SRA, como as enzimas conversoras (ECA e ECA2) e receptores (AT1 e AT2), e o estado oxidativo para a melhor compreensão da contribuição do SRA para a regulação cardiovascular materna normal e associada à hipertensão. Nós estudamos, ainda, a via L-arginina-NO intraplaquetária e sua correlação com a função plaquetária e a pressão arterial no final da gravidez de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Hipertensão Arterial e Gravidez

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) essencial é uma doença com imensas repercussões sociais devido a sua alta morbidade e mortalidade. De acordo com o VII *Joint National Committee* (VII JNC) são considerados hipertensos pacientes com pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mm Hg ou pressão diastólica maior ou igual a 90 mm Hg (VII JNC, 2003; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

Estima-se que, no mundo, cerca de um bilhão de pessoas apresentem HAS e que aproximadamente 7,1 milhões de mortes sejam atribuídas a esta doença (VII JNC, 2003). Os dados sobre a prevalência da hipertensão arterial sistêmica no Brasil são escassos e, muitas vezes, limitados a determinadas regiões geográficas (LESSA, 2001). Estudos populacionais realizados em algumas cidades do Brasil mostram prevalência de hipertensão arterial em 22,3% a 43,9% da população (IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2004).

Alguns fatores podem estar associados ao desenvolvimento da hipertensão arterial, sendo considerados fatores de risco, a idade, hábitos alimentares (incluindo o consumo de sal e a ingestão de álcool), obesidade, estresse psicossocial, tabagismo e sedentarismo (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2007).

Dados de estudos observacionais realizados nos anos 90 demonstram que, tanto hipertensão arterial sistólica como diastólica estão associadas com o aumento do risco de desenvolvimento de doença cardiovascular e acidentes vasculares encefálicos (LEWINGTON *et al.*, 2002), sendo que a redução dos níveis tensionais reduz o risco dessas complicações em 20% para doenças cardíacas isquêmicas e em até 40% para acidentes vasculares cerebrais (TURNBULL, 2003; VII JNC, 2003).

A hipertensão constitui uma grande complicação na gestação, apresentando uma elevada morbi-mortalidade. Em média atinge de 12 a 22% das gestações em diferentes classes sociais, sendo responsável por 17% de óbitos maternos nos EUA e aproximadamente 35% no Brasil. O diagnóstico de hipertensão durante a gestação também é baseado na presença de níveis tensionais iguais ou acima de 140/90 mm Hg (KAPLAN, 2001; JAMES *et al.*, 2004). No entanto, a classificação utilizada na descrição dos distúrbios hipertensivos encontrados em associação à gravidez ainda são arbitrários. Entretanto, é fundamental a distinção entre a HAS que antecede a gravidez e a hipertensão induzida pela gravidez.

A presença da pressão arterial elevada na gravidez indica quase sempre uma das quatro condições: 1) hipertensão gestacional: diagnosticada após a 20<sup>a</sup> semana; 2) pré-eclâmpsia: diagnosticada após a 20<sup>a</sup> semana e associada à proteinúria (300 mg/L em 24 horas), mas na presença de convulsão denomina-se eclâmpsia; 3) hipertensão essencial crônica: antecede a gestação; 4) pré-eclâmpsia sobreposta a HAS crônica ou nefropatia: quando ocorre uma piora de hipertensão na presença de proteinúria (300 mg/L em 24 horas) (JAMES *et al.* 2004).

Como a hipertensão experimental em animais, especialmente a hipertensão espontânea de origem genética, compartilha com a hipertensão essencial, no homem, características comuns, como a alta resistência vascular periférica, o rato SHR representa um dos modelos experimentais de hipertensão mais apropriados para o estudo das alterações cardiovasculares que acompanham a gestação com hipertensão pré-existente.

## 1.2 Sistema Renina-Angiotensina

O SRA atua de maneira sinérgica com o sistema nervoso simpático na regulação da pressão arterial. O principal fator determinante da atividade deste sistema é a renina (uma aspartil protease), que é secretada principalmente por células do aparelho justaglomerular. Esta enzima está envolvida no metabolismo do angiotensinogênio, uma  $\alpha_2$  globulina que se origina principalmente no fígado, formando Ang I (Figura 1).

Uma vez formada a Ang I, uma dipeptidil carboxipeptidase catalisa a remoção do dipeptídeo His-Leu da Ang I, dando origem a Ang II rapidamente na circulação (Figura 1). Esta enzima, ECA, foi descoberta por acaso no plasma (SKEGGS, 1984). A sua especificidade é muito baixa, hidrolisando diversos substratos além da Ang I, por exemplo, agindo sobre a bradicinina (BK), um potente peptídeo vasodilatador, formando fragmentos de cininas inativos, sendo por este motivo também conhecida como cininase II. Essa enzima é fundamental no controle neuro-humoral da pressão arterial e seus inibidores são utilizados no tratamento de diferentes formas de hipertensão e na insuficiência cardíaca (HANSSON *et al.*, 1999). Entretanto, alguns estudos mostram que a Ang II pode ser gerada por outras enzimas, além da ECA, por exemplo, as quimases (HUNSAIN, 1993). Dessa forma o bloqueio funcional pelos inibidores da ECA não é completo.

Em 2000, a ECA2 foi descoberta e caracterizada como uma enzima similar à ECA (TIPNIS *et al.*, 2000), contendo 805 aminoácidos com significativa homologia. No entanto, ao

contrário da ECA, a ECA2 hidrolisa Ang I a Ang 1-9, Ang II a Ang-(1-7) (Figura 1), e BK a BK-(1-7) (metabólito inativo). Além disso, a ECA2 não converte Ang I em Ang II, e sua atividade enzimática não é inibida pelos conhecidos inibidores da ECA. A ECA2 é um inibidor da formação de Ang II, por estimulação de vias alternativas de degradação de Ang I. Essa enzima foi localizada na membrana de miócitos cardíacos, células endoteliais e tubulares renais e no testículo (DONOGHUE *et al.*, 2000). O RNAm e os níveis de proteína para ECA2 estão diminuídos no rim de modelos de hipertensão em ratos. Além disso, já foi demonstrado que o aumento da expressão de ECA2 na vasculatura está relacionado à redução da pressão arterial e melhora da função endotelial em ratos hipertensos (RENTZSCH *et al.*, 2008). Os dados encontrados até o presente indicam que a ECA2 provavelmente atue contrabalançando as ações da ECA (CRACKOWER *et al.*, 2002).

A Ang II é o principal autacóide do SRA. A sequência de aminoácidos da Ang II, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, é igual em humanos, cavalos e porcos, sendo em bovinos o aminoácido isoleucina na posição 5 do peptídeo trocado pela valina. A Ang II exerce suas ações biológicas através da ligação a distintos receptores de membrana e, conseqüentemente, ativa diversas vias intracelulares. Dois principais subtipos de receptores foram identificados e clonados, e são conhecidos como AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (DE GASPARO *et al.*, 2000).

O receptor AT<sub>1</sub> é responsável por mediar a maioria dos efeitos da Ang II. Entre as principais ações mediadas por esse receptor destaca-se a vasoconstrição periférica, liberação de aldosterona, retenção de sódio, sede, ativação simpática, aumento da expressão de pró-oncogenes, aumento dos fatores de crescimento e aumento da síntese de proteína da matriz extracelular. A Ang II promove, portanto, alterações na resistência vascular periférica, na função renal e na estrutura cardiovascular (SCOTT-BURDEN, 1991; MORISHITA *et al.*, 1992; ITO *et al.*, 1995; WOLF *et al.*, 1995; UNGER *et al.*, 1996; STROTH & UNGER, 1999).

A função do receptor AT<sub>2</sub> é bem menos conhecida e as evidências sugerem que a sua ativação pela Ang II inibe a proliferação celular e reverte a hipertrofia induzida por AT<sub>1</sub> (NAKAJIMA *et al.*, 1995; STOLL *et al.*, 1995). O receptor AT<sub>2</sub> também tem sido associado a várias funções como, redução do crescimento celular e tecidual (STOLL *et al.*, 1995; MEFFERT *et al.*, 1996; TSUZUKI *et al.*, 1996), indução da diferenciação celular neuronal (COTE *et al.*, 1999; GENDRON *et al.*, 1999) e apoptose (CHAMOIX *et al.*, 1999; GALLINAT *et al.*, 1999). Além disso, o receptor AT<sub>2</sub> pode mediar efeitos hipotensores

(SCHEUER & PERRONE, 1993; ICHIKI *et al.*, 1995) e vasodilatadores (KATADA & MAJIMA, 2002; SOARES DE MOURA *et al.*, 2004; OGNIBENE *et al.*, 2009).

A Ang 1-7 é um heptapeptídeo formado a partir de Ang I ou Ang II por ação de endopeptidases e carboxipeptidases. Além disso, a ECA2 está sendo implicada na formação de Ang 1-7 por duas vias diferentes: diretamente de Ang II (VICKERS *et al.*, 2002) e indiretamente de Ang I (DONOGHUE *et al.*, 2000) (Figura 1). Recentemente, Santos et al. identificaram a Ang 1-7 como um ligante endógeno de receptor acoplado à proteína G, conhecido como *mas* (SANTOS *et al.*, 2003).

A Ang 1-7 está sendo considerada um importante componente do SRA, com algumas ações similares e outras opostas às desencadeadas pela Ang II (SANTOS & CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994; FERRARIO & IYER, 1998; CAREY & SIRAGY, 2003). A Ang 1-7 não possui efeito vasoconstritor, não age na liberação de aldosterona e não produz sede ou aumento da atividade simpática. Mas, como a Ang II, libera vasopressina, estimula a biossíntese de prostaglandinas e também exerce ação antidiurética no rim (DELLI PIZZI *et al.*, 1994). Estudos mostram que as ações promovidas pela Ang 1-7 contra-regulam àquelas da Ang II (FERRARIO *et al.*, 1991) e contribuem para a regulação da pressão arterial (IYER *et al.*, 2000a). O heptapeptídeo promove relaxamento em preparações de artérias coronárias e mesentéricas (BROSNIHAN *et al.*, 1996; GORELIK *et al.*, 1998), estimula a liberação de NO e prostaglandinas vasodilatadoras (RAJENDRAN *et al.*, 2005), assim como potencializa os efeitos da BK (LI *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1997; GRECO *et al.*, 2006). Evidências anteriores demonstram que a Ang 1-7 reverte o efeito estimulatório da Ang II na atividade Na<sup>+</sup>-ATPase no túbulo proximal, através de um antagonista do receptor *mas*, conhecido como A779 (LARA *et al.*, 2002). O heptapeptídeo também é capaz de potencializar o efeito anti-agregante plaquetário induzido pelo nitroprussiato de sódio e, ainda, apresenta efeito antitrombótico (RAJENDRAN *et al.*, 2005; FRAGA-SILVA *et al.*, 2008). Além disso, o tratamento crônico com iECA ou antagonistas de receptor AT<sub>1</sub> aumenta cerca de 25 vezes os níveis plasmáticos de Ang 1-7 (CHAPPELL *et al.*, 1998; IYER *et al.*, 2000b), sugerindo que o heptapeptídeo pode estar envolvido nos efeitos benéficos observados com essas terapias (IYER *et al.*, 2000b; COLLISTER & HENDEL, 2003).

Estudos relevantes têm demonstrado que o SRA pode ter uma participação importante na regulação cardiovascular durante a gestação. Evidência recente demonstra uma redução da resposta contrátil em anéis de aorta de ratas grávidas, quando comparado a ratas virgens, envolvendo o aumento da expressão e da atividade de receptores AT<sub>2</sub> e de eNOS, o que pode

contribuir para a diminuição da pressão arterial na gravidez (STENNETT *et al.*, 2009). Além disso, os níveis plasmático e urinário de Ang 1-7 estão aumentados na gestação normal (BROSNIHAN *et al.*, 2005), assim como há um aumento do efeito vasodilatador do heptapeptídeo em artérias de resistência (NEVES *et al.*, 2003). No entanto, não há evidências diretas a respeito da contribuição dos peptídeos Ang II e Ang 1-7 e suas respectivas enzimas geradoras, ECA e ECA2, para a regulação cardiovascular durante a gravidez normal ou acompanhada de hipertensão.

### 1.3 Via L-arginina-óxido nítrico

O primeiro relato de que o endotélio seria capaz de produzir um fator com atividade vasodilatadora foi descrito por Furchgott e Zawadski em 1980, e por alguns anos essa substância foi denominada fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). Em 1987, O EDRF foi identificado como sendo o NO, um gás de meia vida muito curta e que teria um efeito marcante na vasodilatação e na função plaquetária (IGNARRO *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1989).

Atualmente se sabe que o NO é um gás inorgânico lipofílico, com uma meia vida de menos de 30 segundos em sistemas biológicos, e que é produzido por diferentes tipos celulares, nos quais pode controlar ou influenciar importantes processos fisiológicos, como neurotransmissão, atividade citotóxica do sistema imune, além dos efeitos na adesão e agregação plaquetárias e na vasodilatação (MONCADA, 1997; HUYNH & CHIN-DUSTING, 2006).

A síntese de NO é resultado da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidinos da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela NOS (MARLETTA, 1993; MONCADA *et al.*, 1991) e se processa com a participação de alguns co-fatores como nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH), flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), flavina-mononucleotídeo (FMN) e tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (MARLETTA, 1994). O resíduo N terminal liga a BH<sub>4</sub> e a L-arginina se liga ao sítio ativo da enzima em uma porção próxima ao heme nesta região. O domínio C terminal liga os cofatores NADPH, FAD e FMN. Os domínios N e C são unidos por uma pequena seqüência que liga a calmodulina, um co-fator essencial para a atividade da NOS (STEUHR, 1997).

A síntese de NO, em várias condições fisiológicas e patológicas, depende de L-arginina extracelular. Vários estudos comprovam que o transporte da L-arginina é essencial

para a produção de NO em células como endotélio, leucócitos e plaquetas, independentemente da concentração intracelular deste aminoácido. (LOSCALZO & VITA, 2000; MAXWELL & COOKE, 2000; BRUNINI *et al.*, 2003). Esta dependência, que ocorre mesmo com o nível intracelular de L-arginina superior ao  $K_m$  das enzimas NOS, é denominada: “O paradoxo da L-arginina” (DEVES & BOYD, 1998; BRUNINI *et al.*, 2003; BOGER, 2004).

Quatro sistemas de transporte são responsáveis pelo transporte de L-arginina em mamíferos:  $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $B^{0,+}$  e  $b^{0,+}$  (DEVES & BOYD, 1998; MANN *et al.*, 2003). O transporte de L-arginina em plaquetas humanas, que é essencial para a produção de NO, é mediado via sistema  $y^+L$  e não pelo sistema de transporte de aminoácidos catiônicos clássico, sistema  $y^+$  (MENDES RIBEIRO *et al.*, 1999; BRUNINI *et al.*, 2003). O sistema  $y^+$  foi caracterizado como independente de  $Na^+$  e seletivo para aminoácidos catiônicos. Os demais sistemas,  $y^+L$ ,  $b^{0,+}$  e  $B^{0,+}$ , transportam tanto aminoácidos catiônicos quanto neutros, mas diferem na dependência ou não da presença de  $Na^+$ . O sistema  $y^+L$  transporta aminoácidos catiônicos na ausência de  $Na^+$  e aminoácidos neutros na dependência de  $Na^+$ . Os sistemas  $b^{0,+}$  e  $B^{0,+}$  transportam aminoácidos neutros e catiônicos, sendo o sistema  $B^{0,+}$  dependente de  $Na^+$  e o sistema  $b^{0,+}$  independente de  $Na^+$  (BRUNINI *et al.*, 2007).

As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias: a NOS constitutiva (cNOS) e a NOS induzível (iNOS, tipo II). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (nNOS, tipo I), detectada inicialmente em neurônios (BREDT & SNYDER, 1989; KNOWLES *et al.*, 1989) e a NOS endotelial (eNOS, tipo III), presente nas células endoteliais (Moncada *et al.*, 1991) e nas plaquetas (RADOMSKI *et al.*, 1990). A cNOS produz pequenas quantidades de NO e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de  $Ca^{++}$  (MARLETTA, 1994).

A iNOS, isoforma independente de  $Ca^{++}$ , não é expressa sob condições normais, mas induzida por citocinas ou endotoxinas em uma variedade de células como macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA, 1991). Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO do que a cNOS e a produção continua até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular (DUSTING & MCDONALD, 1995).

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel importante no relaxamento vascular. Normalmente, a vasodilatação ocorre quando alguns agentes como acetilcolina, bradicinina, histamina, Ang 1-7, dentre outros, ligam-se a seus receptores de membrana nas

células endoteliais, levando à ativação da eNOS presente nestas células e à consequente produção de NO (Figura 2). O NO produzido se difunde rapidamente, através da bicamada lipídica, para a célula muscular, onde interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), tornando-a ativa. A isoforma da GC melhor caracterizada é a  $\alpha 1/\beta 1$ , que responde a concentrações nanomolares de NO. Quando ativa, a GC catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), formando GMPc e pirofosfato (SNYDER & BREDT, 1992). O GMPc se liga a proteínas-alvo como proteínas quinase dependente de GMPc e canais iônicos regulados por GMPc, participando das vias finais de sinalização específicas para cada tipo celular (CARY *et al.*, 2006). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento, envolvendo a diminuição do  $Ca^{++}$  livre intracelular (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

O nível intracelular de GMPc ou de adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPc) é rigidamente controlado, seja pela sua taxa de síntese, através da GC e da adenilato ciclase (AC), respectivamente, ou mesmo pela sua taxa de hidrólise, através das fosfodiesterases (PDEs). As PDEs formam 11 famílias de enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos cíclicos, contendo mais de 50 variantes conhecidas. A PDE3A está presente nas plaquetas e hidrolisa tanto AMPc quanto GMPc. Já a PDE5A está presente tanto nas plaquetas quanto no músculo liso vascular, e é altamente específica para GMPc (MATSUMOTO *et al.*, 2003).

O NO que deixa a célula endotelial pode se difundir para as plaquetas, onde também leva ao aumento do GMPc e consequente diminuição de  $Ca^{++}$  livre. Como o  $Ca^{++}$  é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo é inibido (WOLIN, 2000). Além disso, as plaquetas também possuem NOS e são produtoras de NO. Então, o NO proveniente das células endoteliais e o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetária (RADOMSKI, 1990; VASTA *et al.*, 1995).

Estudos prévios sugerem que a administração de estradiol aumenta o relaxamento dependente do endotélio em aorta de coelhos e, ainda, que há uma maior produção de NO em fêmeas do que em machos. Além disso, o estrogênio parece aumentar tanto a atividade quanto a expressão da eNOS (WEINER *et al.*, 1994a). Por outro lado, ratas ovariectomizadas apresentam uma redução não somente na quantidade, mas também na atividade da eNOS. Além da atuação sobre a atividade e a expressão da eNOS, evidências indicam que o estrogênio reduz a geração de ânion superóxido na parede do vaso, levando ao aumento da biodisponibilidade de NO (KHALIL, 2005). Entretanto, não há evidências a respeito do

impacto da gestação normal ou, ainda, da gestação acompanhada de hipertensão sobre a via L-arginina-NO em plaquetas.

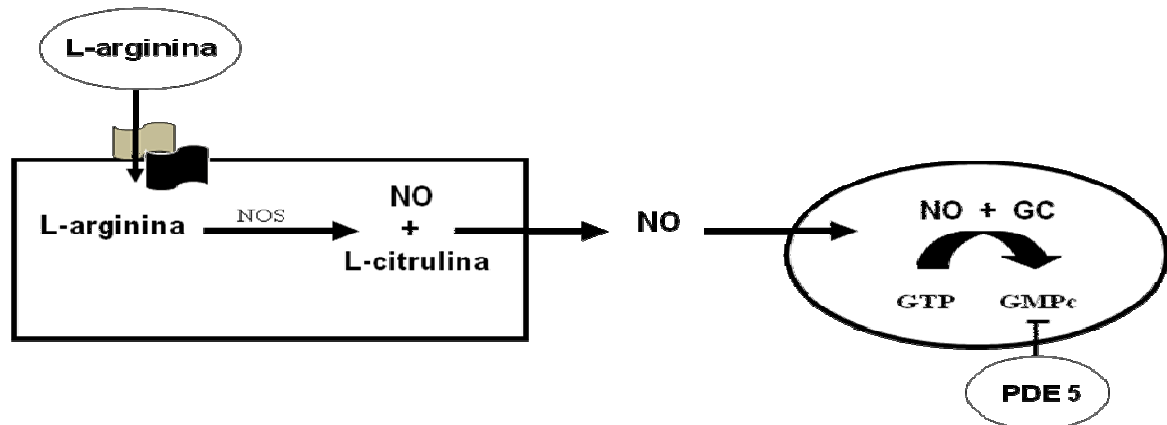


Figura 2- Via L-arginina-óxido nítrico (adaptado de MacAllister & Vallance, *Exp. Nephrol.* 1998; 6(3): 195-199).

#### 1.4 Estresse Oxidativo

As EROs e as espécies reativas de nitrogênio são produtos reativos do metabolismo celular encontrados em todos os sistemas biológicos (TOUYZ & SHIFFRIN, 2004). A formação dessas espécies é determinada pela perda ou ganho de um elétron, tornando-se um elétron desemparelhado e a molécula altamente reativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio molecular tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ) (BELLÓ, 2002). As formas reativas de nitrogênio compreendem o NO e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

O  $\cdot\text{O}_2^-$  é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formadas a partir dele as demais EROs (BELLÓ, 2002). Em condições fisiológicas, a reação favorecida é a dismutação, com a formação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entretanto, quando produzido em excesso, uma quantidade significativa de  $\cdot\text{O}_2^-$  reage com o NO, produzindo assim o  $\text{ONOO}^-$  (TOUYZ & SHIFFRIN, 2004). Além disso, essa espécie reativa é solúvel em água e só é capaz de atravessar membranas biológicas através de canais iônicos (SCHAFER & BUETTNER, 2001; HAN *et al.*, 2003).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é produzido principalmente pela dismutação do  $\cdot\text{O}_2^-$ . Essa reação pode ser espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD). Diferente do  $\cdot\text{O}_2^-$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é um radical livre, sendo assim uma molécula mais estável. Além disso, é lipossolúvel, atravessa membranas celulares e tem meia-vida maior que o  $\cdot\text{O}_2^-$  (TOUYZ & SHIFFRIN, 2004). Na presença de ferro, essa espécie reativa pode ser reduzida e gerar  $\text{OH}\cdot$  (Reação de Fenton e Reação de Harber-Weiss) (FRIDOVICH, 1997). Em sistemas biológicos, é removido pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (SCHAFER & BUETTNER, 2001).

O  $\text{OH}\cdot$  é extremamente reativo e induz dano no local onde é formado (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004). A sua combinação rápida com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O NO é um abundante radical reativo que age como uma importante molécula de sinalização biológica, em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa e relaxamento do músculo liso (BERGENDI *et al.*, 1999). Entretanto, quando em excesso, pode levar a reações de nitrosilação, o que acarreta alterações na estrutura de proteínas e consequente perda de função (VALKO *et al.*, 2006). Já o  $\text{ONOO}^-$  é um potente agente oxidante, que pode causar fragmentação no DNA, oxidação lipídica e protéica (CARR *et al.*, 2000). É formado quando o  $\text{O}_2^-$ , em excesso, doa um elétron para o NO (TOUYZ & SHIFFRIN, 2004).

Em condições fisiológicas, EROs são produzidas em baixas concentrações e agem como moléculas sinalizadoras no sistema cardiovascular, regulando a contração e o relaxamento, assim como o crescimento da célula do músculo liso vascular (RAO & BERK, 1992; COSENTINO, 1994; ZAFARI, 1998; TOUYZ & SCHIFFRIN, 1999). Em condições patológicas, o aumento da produção de EROs leva à disfunção endotelial, aumento da contratilidade, crescimento e apoptose das células do músculo liso vascular, peroxidação lipídica, inflamação e aumento da deposição de proteínas da matrix extracelular, processos que contribuem para o dano e conseqüente doença cardiovascular (RAO & BERK, 1992; HARRISON, 1997).

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a formação e a remoção dessas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou, ainda, do aumento da geração das espécies oxidantes (TOUYZ, 2004).

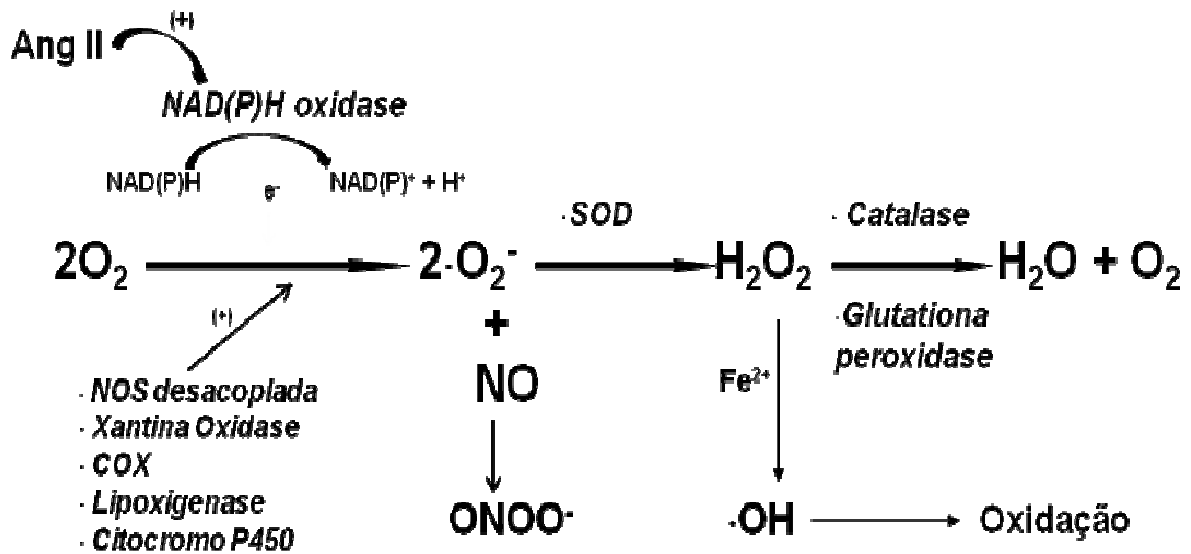


Figura 3- Vias envolvidas da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante (adaptado de Touyz RM, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37(8): 1263-1273.

A principal fonte de EROs nos diversos tipos celulares é a NADPH oxidase, mas há outras fontes enzimáticas capazes de gerar EROs como xantina oxidase, citocromo P450, cicloxigenase e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. A enzima NOS, responsável pela formação do NO, quando desacoplada, pode formar ONOO<sup>-</sup> (TOUYZ, 2004) (Figura 3).

Na vasculatura, essas espécies são produzidas em graus variados e são reguladas por sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre os sistemas enzimáticos destacam-se: SOD, CAT e GPx. Os sistemas não enzimáticos são exógenos em sua maioria, dentre os quais se destacam as vitaminas lipossolúveis (vitamina A, E e betacarotenos), as vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, manganês) (STRALIN *et al.*, 1995; HALLIWELL, 1999; CHANNON & GUZIK, 2002).

A SOD representa o maior sistema de defesa da célula vascular. Em mamíferos existem três isoformas: SOD-cobre-zinco (SOD1) está presente principalmente no citosol, SOD-manganês (SOD2) está localizada primariamente na mitocôndria e a SOD extracelular (SOD3) (TOUYZ & PARAVICINI, 2008). Esta enzima tem papel antioxidante, pois catalisa a dismutação do  $\text{O}_2^\bullet$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  na presença do próton  $\text{H}^+$  (ROSS & MOLDEUS, 1991; ACHARYA *et al.*, 1991).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e no citosol, que catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (TOUYZ, 2004).

A GPx catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , utilizando a glutatona (GSH) como co-substrato. A glutatona tem propriedade de doador de elétrons e pode ser regenerada através da glutatona redutase (GR), com a transferência do hidrogênio do NADPH (Figura 3). Neste processo são transferidos dois hidrogênios dos grupamentos sulfidrilas para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, resultando em glutatona dissulfeto (GSSH). A GPx geralmente ocorre associada ao selênio. Embora tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (SHAN *et al.*, 1990).

A fluidez das membranas celulares está relacionada com a presença de cadeias insaturadas dos ácidos graxos poliinsaturados. O ataque de algumas espécies reativas, que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991). Os radicais de carbono formados podem reagir espontaneamente com o oxigênio molecular, formando o radical peroxila, que propaga a cadeia de peroxidação lipídica (JIALAL & GRUNDY, 1992).

O malondialdeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico. Sua formação ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (BONNES & GUÈRIN, 1992; COSTA *et al.*, 2009).

A maior fonte de EROs na parede dos vasos e nas plaquetas é a enzima NADPH oxidase, que pode ser regulada por agentes vasoativos, dentre os quais destaca-se a Ang II (RUECKSCHLOSS *et al.*, 2002). A ativação da enzima por Ang II e a consequente produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  parecem estar aumentadas em algumas condições patológicas como hipertensão, aterosclerose e diabetes (GRIENGLING *et al.*, 2000; PLUMB *et al.*, 2005). Estudo prévio demonstrou que a inibição da ECA, enzima que gera Ang II, diminui os níveis de  $\cdot\text{O}_2^-$  e melhora a resistência plaquetária ao NO (CHIRKOV *et al.*, 2004). Em conjunto, esses dados mostram a importante participação da Ang II no estresse oxidativo e, conseqüentemente, nas condições patológicas associadas. Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que a Ang 1-7, um peptídeo que desempenha funções opostas àquelas classicamente induzidas pela Ang II, é capaz de modular negativamente o efeito pró-oxidante da Ang II em ratos e humanos (POLIZIO, 2007; SAMPAIO, 2007). Na gestação normal há aumento dos níveis plasmáticos

de Ang 1-7 (BROSNIHAN *et al.*, 2005) e talvez um possível efeito antioxidante do heptapeptídeo possa contribuir para a regulação cardiovascular materna, levando à redução da pressão arterial. No entanto, nenhuma evidência nesse sentido foi descrita até o momento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a contribuição do Sistema Renina-Angiotensina vascular, assim como, da via L-arginina-NO plaquetária para a regulação cardiovascular materna em ratas normotensas e espontaneamente hipertensas.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1- Investigar as respostas da Ang II e Ang 1-7 em leito arterial mesentérico (LAM) isolado;
- 2- Investigar a expressão das enzimas eNOS, ECA e ECA2, assim como dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> da Ang II no LAM;
- 3- Avaliar a peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) em LAM;
- 4- Estudar o transporte de L-arginina e a atividade da NOS em plaquetas;
- 5- Investigar a expressão das isoformas eNOS e iNOS e das enzimas sGC e PDE5 em plaquetas;
- 6- Avaliar a produção de GMPc em plaquetas e a agregação plaquetária;
- 7- Avaliar o efeito da Ang 1-7 sobre o transporte de L-arginina, atividade da NOS e agregação plaquetária.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais utilizados

Para este estudo foram utilizadas ratas virgens Wistar normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR), com 3 meses de idade, pesando entre 200 e 230 g. As ratas grávidas normotensas e hipertensas foram obtidas colocando-se as fêmeas com um macho da mesma espécie para acasalar durante a noite e verificando a presença do esperma no canal vaginal na manhã seguinte. O primeiro dia da gestação foi determinado pela primeira detecção de esperma no canal vaginal, pela manhã. As ratas foram utilizadas com 20 dias de gravidez e as ratas virgens em diestro com a mesma idade foram consideradas como controle.

Todos os animais são provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em ciclo de sono-vigília de 12 horas, com presença de luz a partir das 6:00 horas da manhã, sendo os experimentos realizados durante o dia. Os animais tiveram livre acesso à ração e água. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais da UERJ.

Portanto, foram utilizados quatro grupos experimentais: (i) Ratas normotensas em diestro (ND); (ii) Ratas normotensas grávidas (NG); (iii) Ratas espontaneamente hipertensas em diestro (HD) e (iv) Ratas espontaneamente hipertensas grávidas (HG).

#### 3.2 Medida da pressão arterial sistólica

A PAS foi medida por método não invasivo de pletismografia de cauda (Letica LE 5000 - Panlab, Comella, Spain), em ratas acordadas de todos os grupos experimentais, por meio de um garrote e de um sensor de pulso colocados em torno da cauda do animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e desinsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal, e assim determina a pressão arterial sistólica. As medidas foram realizadas 1 vez por semana, durante a gestação e por igual período nas ratas não grávidas, e imediatamente antes do sacrifício.

Os animais foram treinados por 2 semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante a medida da pressão arterial.

### 3.3 Protocolos experimentais com leito arterial mesentérico

#### 3.3.1 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)

As preparações de LAM foram isoladas de ratos dos 4 grupos experimentais, conforme descrito por McGregor (1965). Os ratos foram anestesiados com tiopental (70 mg/Kg) e, em seguida à laparotomia, o LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução de Krebs [composição em mM: NaCl (118.3); KCl (4.7); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2.5); MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O (1.2); NaHCO<sub>3</sub> (25.0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2); glicose (11.1); ácido etilenodiamino tetra acético – EDTA (0.026)]. Os ramos pancreático, duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50, Clay Adams Brand CA – Becton Dickinson) preenchido com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs para os experimentos de reatividade vascular ou PBS para os experimentos de atividade enzimática, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e Western Blotting.

#### 3.3.2 Reatividade do leito arterial mesentérico

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior, que foi conectada a uma bomba peristáltica (Abbott'Shaw Lifecare Model 4, North Chicago, IL, USA). A solução de Krebs, mantida a 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) foi infundida em fluxo constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em polígrafo (7754A; Hewlett-Packard, Lexington, MA, USA), por meio de um transdutor de pressão (1280; Hewlett-Packard, Lexington, MA, USA) (Figura 4).

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal manteve-se próxima de 20 a 40 mm Hg (Resende et al, 1997). Em seguida, testou-se a viabilidade dos vasos mesentéricos por meio de injeção “*in bolus*” de 120 μmol de KCl. Logo após, iniciou-se o período de sensibilização da preparação vascular, no qual a norepinefrina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em

concentração suficiente (30  $\mu\text{M}$ ) para que a pressão de perfusão fosse mantida estável em torno de 80-100 mm Hg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora constante da NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de acetilcolina (10 pmol), que produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Testamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular com a injeção de nitroglicerina (10 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular, liberando NO de sua estrutura, sendo seu efeito independente do endotélio.

Uma vez confirmada a presença do endotélio e do músculo liso vascular funcionantes, foram injetadas doses crescentes de Ang II (10; 30; 100 e 300 nmol) e posteriormente de Ang 1-7 (10; 30; 100 e 300 nmol).

A resposta vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela NE. Todas as injeções foram realizadas imediatamente antes da cânula arterial, em um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de micro-seringas de 10 e 100  $\mu\text{L}$  (Hamilton). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores.

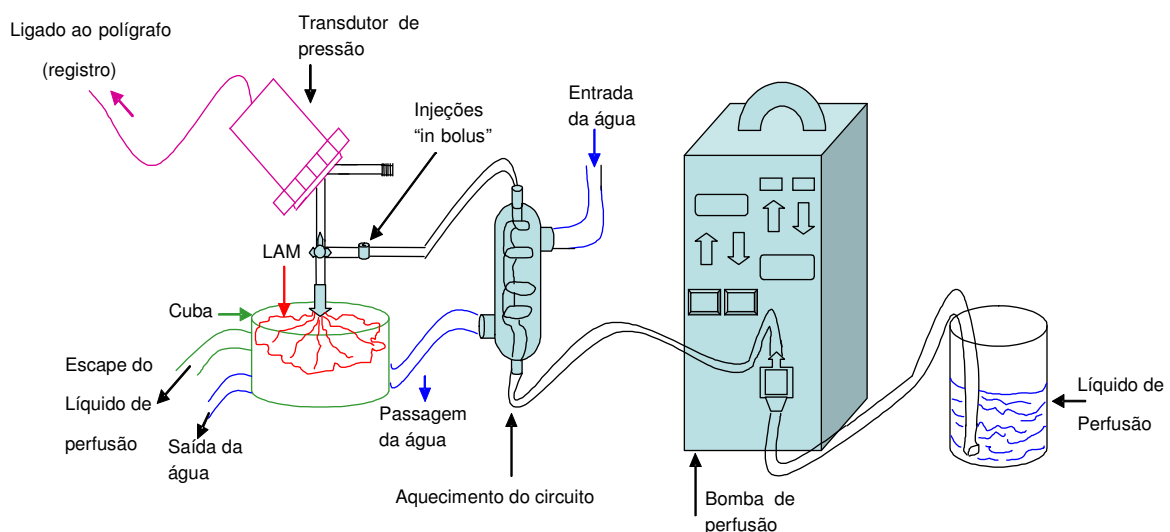


Figura 4 – Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.

### 3.3.3 Western Blotting em leito arterial mesentérico

As artérias mesentéricas isoladas foram lavadas com tampão salina fosfato gelado (PBS) e homogeneizadas com tampão de lise contendo PBS, Tryton X-100 (1 %), NaF (1 M), NaPPi (100 mM),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 M), pepstatina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), leupeptina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e aprotinina

(10 µg/mL), seguido de centrifugação (13000 rpm por 20 min) a 4°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratórios, Milão, Itália). Após desnaturação a 100 °C por 5 min, 30 µg de proteína foram depositadas em um gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sódio (8-10%), separadas por eletroforese (150V, 50mA por 1 hora) e transferidas para uma membrana de polivinilidina (15 V, 328mA por 1 hora). As membranas foram bloqueadas durante 1 hora com tampão de bloqueio (PBS, 0.1% Tween-20, ph 7.4 + 3% albumina) e, em seguida, incubadas “overnight” a 4° C com anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) contra a enzima eNOS (≈140 kDa; diluição 1:500), receptor AT<sub>1</sub> (≈43 kDa; diluição 1:200) e receptor AT<sub>2</sub> (≈44 kDa; diluição 1:200), ECA (≈ 195 kDa; 1:1.000) e ECA2 (≈ 90 kDa 1:1.500) diluídos em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas em solução de PBS-Tween-20 (0.1%), incubadas com anticorpo secundário (diluição 1:10.000 - 1:20.000) conjugado a peroxidase (incubação em 5% de leite), durante 1 hora a temperatura ambiente, e novamente lavadas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com ECL (Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK) durante 4 minutos e expostas a um filme auto-radiográfico (Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK). Após a revelação do filme, a densitometria das bandas foi medida por análise de computador, utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0.

#### 3.3.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (p. ex. malondialdeído - MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA). MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532nm).

A análise de TBARS foi avaliada em homogenato de vasos mesentéricos preparados em tampão fosfato. As amostras foram incubadas com ácido tricloroacético, centrifugadas a 1.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado em um tubo de ensaio e posteriormente foi adicionado TBA (0.67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (532nm; Ultrospec 2100 Pro - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper & Hadley (1990).

### 3.3.5 Atividade das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foi realizada em homogenato de vasos mesentéricos preparados com tampão fosfato.

#### 3.3.5.1 Medida da Superóxido Dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do  $\cdot\text{O}_2^-$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo  $\cdot\text{O}_2^-$ . Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister & Calabrese (1987) e adaptada para o tecido vascular.

As amostras foram incubadas com tampão glicina (2 mM) e noradrenalina (1 mM). A enzima CAT (1.2 mg/ml) também foi adicionada ao meio para retirar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 180 segundos.

#### 3.3.5.2 Medida da catalase

A catalase é uma heme proteína que catalisa a degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando oxigênio molecular e  $\text{H}_2\text{O}$ . A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela reação.

As amostras foram incubadas com PBS e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.16%). A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi avaliada por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 60 segundos (AEBI, 1984).

#### 3.3.5.3 Medida da Glutathiona Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para  $\text{H}_2\text{O}$  e álcool, usando a glutathiona (GSH) como doador de elétrons. A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH.

As amostras foram incubadas com tampão fosfato (PBS), glutatona reduzida (2 mM), glutatona redutase (0.11 mg/mL) e azida sódica (0.065 mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionada ao meio e foram realizadas leituras em um intervalo de 180 segundos. Posteriormente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé & Gunzler (1984) e adaptada para o tecido vascular.

### 3.4 Protocolos experimentais com plaquetas

#### 3.4.1 Transporte de L-arginina em plaquetas

O influxo de L-arginina foi realizado de acordo com um protocolo previamente estabelecido (MENDES RIBEIRO *et al.*, 1999).

Para os experimentos de transporte de L-arginina em plaquetas, o sangue foi coletado em tubos contendo [ácido cítrico (73.7 mM), citrato de trissódico (85.9 mM) e glicose (111 mM); pH=4] através de uma cânula introduzida na aorta descendente. Após centrifugação a 1.200 rpm por 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804 R), o plasma rico em plaquetas (PRP) foi retirado e centrifugado novamente a 2520 rpm por 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804 R). As plaquetas isoladas foram resuspensas em solução de Krebs [composição em mM: NaCl (119), MgCl<sub>2</sub> (1.2), KCl (4.6) CaCl<sub>2</sub> (1.5), NaHCO<sub>3</sub> (15), Glicose (11), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2); pH=7.4]. O transporte de L-arginina foi avaliado na condição basal ou na presença de pré-incubação por 15 minutos com L-Nitro-Arginina (L-NA) (1 mM), Ang 1-7 (100 nM) ou L-NA + Ang 1-7. Em seguida, L-arginina tritiada (100 μM) foi adicionada à suspensão de plaquetas e incubada por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, a amostra de plaquetas resuspensas foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 segundos (Eppendorf Centrifuge 5417 C). O sobrenadante foi removido e o *pellet* de plaquetas resuspensas em 1 mL de solução de Krebs, seguido por nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos (Eppendorf Centrifuge 5417 C). As células foram lisadas com Tryton X-100 (0.1%), e a radioatividade medida em um contador de cintilação β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., Fullerton, CA, USA).

### 3.4.2 Atividade da NOS plaquetária

A atividade total da NOS, na condição basal, foi avaliada pela conversão de L-[<sup>3</sup>H]-arginina em L-[<sup>3</sup>H]-citrulina (BRUNINI *et al.*, 2003).

L-[<sup>3</sup>H]-arginina (1 μM) foi adicionada à suspensão de plaquetas e incubada a 37 °C por 15 minutos na ausência ou na presença de incubação concomitante com L-nitro arginina (L-NA; 1 mM), Ang 1-7 (100 nM) ou L-NA + Ang 1-7. Após a incubação, a amostra de plaquetas resuspensas foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 segundos (Eppendorf Centrifuge 5417 C). O sobrenadante foi desprezado e o pellet de plaquetas resuspensas em 1 mL de solução de Krebs, seguido por nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos (Eppendorf Centrifuge 5417 C). As plaquetas foram lisadas com Tryton (0.1%) e transferidas para uma coluna contendo a resina catiônica Dowex. L-[<sup>3</sup>H]-citrulina foi removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante foi adicionado e a radioatividade medida em um aparelho de cintilação β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., Fullerton, CA, USA).

### 3.4.3 Western Blotting em plaquetas

A expressão intraplaquetária de eNOS, iNOS, GC e PDE5 foram avaliadas através de Western Blotting.

As proteínas foram extraídas a partir da suspensão de plaquetas, obtida como descrito anteriormente. O *pellet* de plaquetas foi dissolvido em tampão de extração de proteínas contendo inibidores de proteases (*Protease inhibitor Cocktail* – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguido por rápido congelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom por 15 minutos (MaxiClean 1400), centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417 C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até a sua utilização.

Após desnaturação a 90°C por 10 minutos, 10 μg de proteínas dos lisados de plaquetas suspensas foram aplicadas em gel de poliacrilamida NuPAGE® Novex Bis-Tris 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), separadas por eletroforese (200V, 50mA por 45 minutos) e transferidas para membranas de polivinilidina (15V, 328mA por 1 hora).

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais para eNOS (≈140 kDa; 1:1.000) e iNOS (≈ 130 kDa; 1:1.000) (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) e anticorpos primários

policlonais para PDE5 ( $\approx$  95 kDa; 1:500) e subunidade  $\beta_1$  da GC solúvel ( $\approx$  65 kDa; 1:1.000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). O procedimento para detecção empregado foi o sistema cromogênico Western Breeze (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o programa Adobe Photoshop 7.0.

#### 3.4.4 Mensuração de GMP cíclico intraplaquetário

Para a mensuração de GMPc em condição basal, a suspensão de plaquetas dos diferentes grupos experimentais foi incubada por 30 minutos com 200  $\mu$ M de IBMX (inibidor inespecífico de fosfodiesterases). Em seguida, foi adicionado ácido perclórico (150 mM) às amostras, que foram submetidas a um banho de ultrassom por 15 minutos (MaxiClean 1400) e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. Após centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5417 C), os sobrenadantes contendo GMPc foram coletados e estocados a  $-80^\circ\text{C}$  até a leitura por um ensaio enzimático utilizando o método ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

#### 3.4.5 Ensaio de agregação plaquetária

A função plaquetária foi avaliada nos 4 grupos experimentais por método previamente descrito (DE MEIRELLES *et al.*, 2007).

No protocolo utilizado nesse estudo, inicialmente, o sangue coletado foi anticoagulado com citrato trissódico a 3,8% e posteriormente centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente (Eppendorf Centrifuge 5804 R). O sobrenadante, contendo o plasma rico em plaquetas (PRP) foi removido. O remanescente foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804 R) para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A concentração plaquetária do PRP foi ajustada com o PPP para uma contagem constante de  $250 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ . A agregação foi induzida por difosfato de adenosina (ADP; 12  $\mu\text{M}$ ) em preparações de plaquetas, na ausência ou presença de pré-incubação por 3 minutos com Nitroglicerina (Nitro) (100  $\mu\text{M}$ ), Ang 1-7 (100 nM) ou Nitro + Ang 1-7, e a resposta monitorada por 5 minutos em um agregômetro de 4 canais (Chrono-Log, Havertown, PA). Os testes foram feitos a  $37^\circ\text{C}$  com uma velocidade de rotação de 1.200 rpm e a agregação máxima foi expressa em percentual.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média acompanhada do erro padrão da média ( $\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$ ). O programa Prisma 5.0 foi utilizado para a análise estatística e confecção dos gráficos. Todos os resultados foram analisados por meio de “One-way analysis of variance” (ANOVA), com posterior utilização do teste de Tukey, exceto a pressão arterial sistólica, que foi analisada por meio de “Two-way analysis of variance” com medidas repetidas. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Medida da pressão arterial sistólica

A PAS dos grupos HD e HG foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) do que aquela apresentada pelos grupos ND e NG no 1º dia de aferição. Os grupos ND e HD não apresentaram modificações no decorrer dos 20 dias. A PAS manteve-se elevada em HG no 14º dia de aferição. No entanto, no final da gestação, os grupos NG e HG apresentaram diminuição significativa da PAS ( $P < 0.05$ ), sendo que o grupo HG obteve valores que foram similares àqueles apresentados pelos animais normotensos.

Tabela 1 – Pressão arterial sistólica (mm Hg).

Grupos	1º dia	7º dia	14º dia	20º dia
ND	137 ± 1.9	132 ± 1.5	125 ± 2.7	128 ± 3.0
NG	131 ± 2.3	124 ± 3.7	126 ± 2.6	110 ± 2.7 *
HD	182 ± 4.9 †	170 ± 3.1 †	180 ± 2.6 †	179 ± 3.7 †
HG	183 ± 5.4 †	174 ± 3.8 †	172 ± 4.6 †	128 ± 3.4 *

Legenda: ND, normotensa em diestro (n=7); NG, normotensa grávida (n=8); HD, hipertensa em diestro (n=6); HG, hipertensa grávida (n=6). Os valores representam a média ± erro padrão da média. \* $P < 0.05$  comparado ao 1º dia do grupo; † $P < 0.05$  comparados aos grupos normotensos no mesmo dia de aferição.

#### 4.2 Estudo da resposta vasodilatadora induzida por Ang II em LAM de ratas

Em preparações contraídas com norepinefrina (30  $\mu$ M), a Ang II (30-300 nmol) produziu uma resposta vasodilatadora de maneira dose-dependente.

O efeito vasodilatador induzido pela Ang II foi significativamente maior no grupo de ratas HG quando comparado aos demais grupos na dose de 300 nmol (Figura 5).

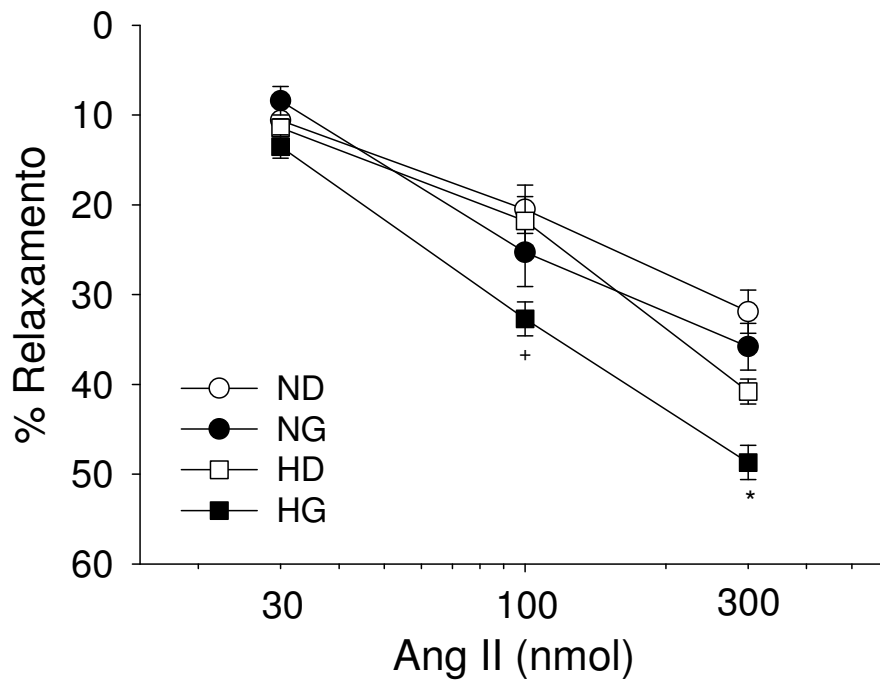


Figura 5 – Efeito vasodilatador induzido por Ang II em LAM pré-contraído com norepinefrina (30  $\mu$ M) de ratas ND (n=5), NG (n=5), HD (n=6) e HG (n=5).

Legenda: Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação aos demais grupos; +P<0.05 em relação aos grupos ND e HD. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.3 Estudo da resposta vasodilatadora induzida por Ang 1-7 em LAM de ratas

Em preparações contraídas com norepinefrina (30  $\mu$ M), a Ang 1-7 (30-300 nmol), produziu uma resposta vasodilatadora de maneira dose-dependente.

O efeito vasodilatador induzido pela Ang 1-7 foi significativamente maior no grupo de ratas HG quando comparado aos demais grupos nas doses de 30 e 300 nmol (Figura 6).

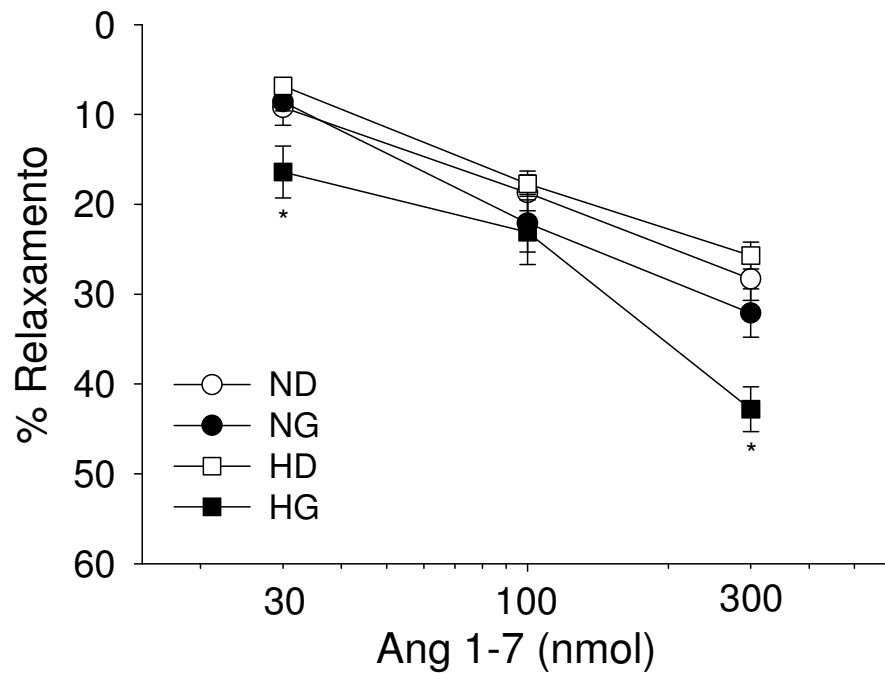


Figura 6 – Efeito vasodilatador induzido por Ang 1-7 em LAM pré-contraído com norepinefrina (30  $\mu$ M) de ratas ND (n=5), NG (n=5), HD (n=6) e HG (n=5).

Legenda: Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação aos demais grupos. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.4 Expressão de eNOS em LAM de ratas

A expressão de eNOS foi avaliada através de Western Blotting. Em preparações de LAM de ratas grávidas, normotensas e hipertensas, foi observada uma maior expressão da enzima, quando comparada aos respectivos grupos de ratas em diestro. A hipertensão, isoladamente, não modificou a expressão (Figura 7).

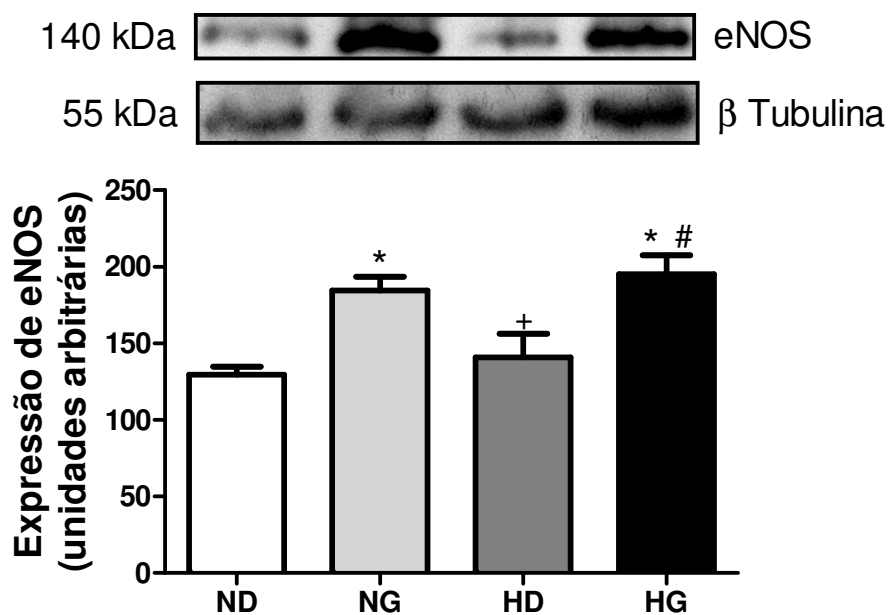


Figura 7 – Expressão da eNOS em LAM de ratas ND, NG, HD, HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0.05$  em relação ao grupo ND; † $P < 0.05$  em relação ao grupo NG; # $P < 0.05$  em relação ao grupo HD. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.5 Expressão de receptores AT<sub>1</sub> da Ang II em LAM de ratas

A expressão dos receptores AT<sub>1</sub> foi avaliada por Western Blotting. Em preparações de LAM de ratas HD houve uma maior expressão de receptores AT<sub>1</sub>, quando comparado aos grupos de ratas normotensas. A gravidez associada à hipertensão foi capaz de reduzir essa expressão aos níveis observados nos grupos normotensos (Figura 8).

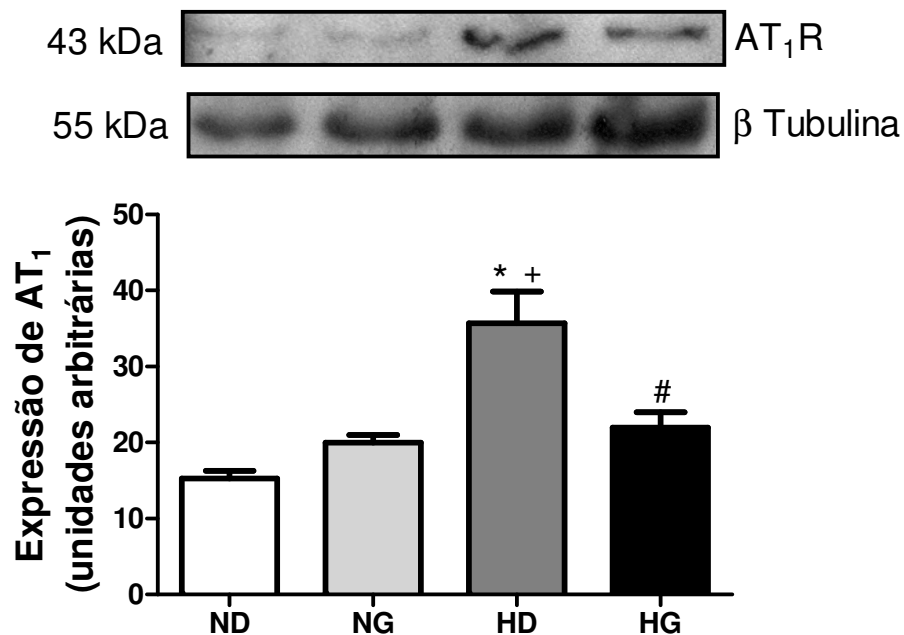


Figura 8 – Expressão de receptores AT<sub>1</sub> em LAM de ratas ND, NG, HD, HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. \*P<0.05 em relação ao grupo ND; +P<0.05 em relação ao grupo NG; #P<0.05 em relação ao grupo HD. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.6 Expressão de receptores AT<sub>2</sub> da Ang II em LAM de ratas

A expressão dos receptores AT<sub>2</sub> foi avaliada por Western Blotting. A expressão de receptores AT<sub>2</sub> não diferiu entre os grupos. A gravidez e a hipertensão, isoladamente ou associadas, não modificaram a expressão desse subtipo de receptor (Figura 9).

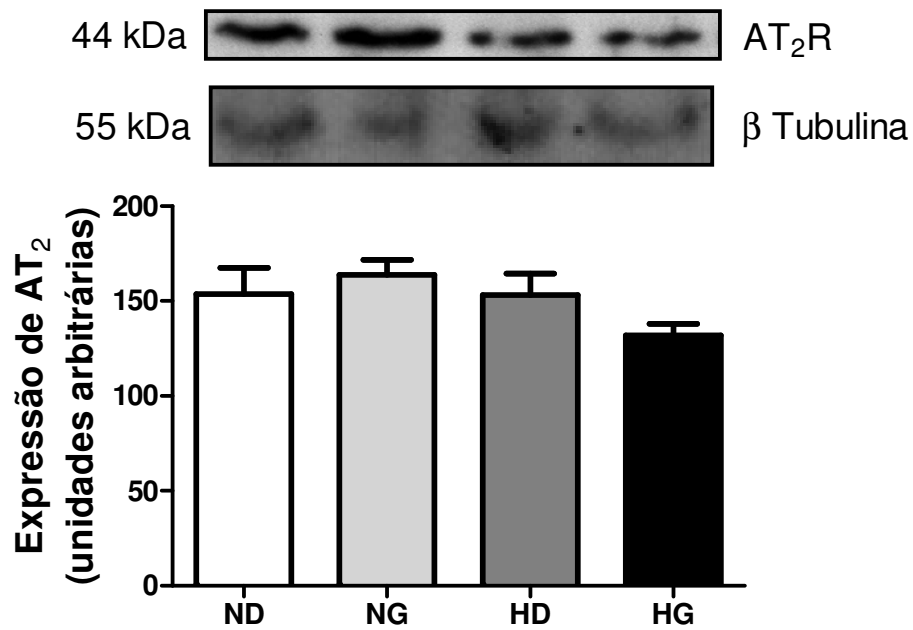


Figura 9 – Expressão de receptores AT<sub>2</sub> em LAM de ratas ND, NG, HD, HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.7 Expressão da enzima ECA em LAM de ratas

A expressão da enzima ECA foi avaliada por Western Blotting. Em preparações de LAM de ratas HD houve uma maior expressão dessa enzima, responsável pela conversão de Ang I em Ang II, comparada a de preparações de ratas ND e NG. Entretanto, em HG foi observada uma menor expressão dessa enzima comparada a HD, mas que não foi similar ao grupo ND (Figura 10).

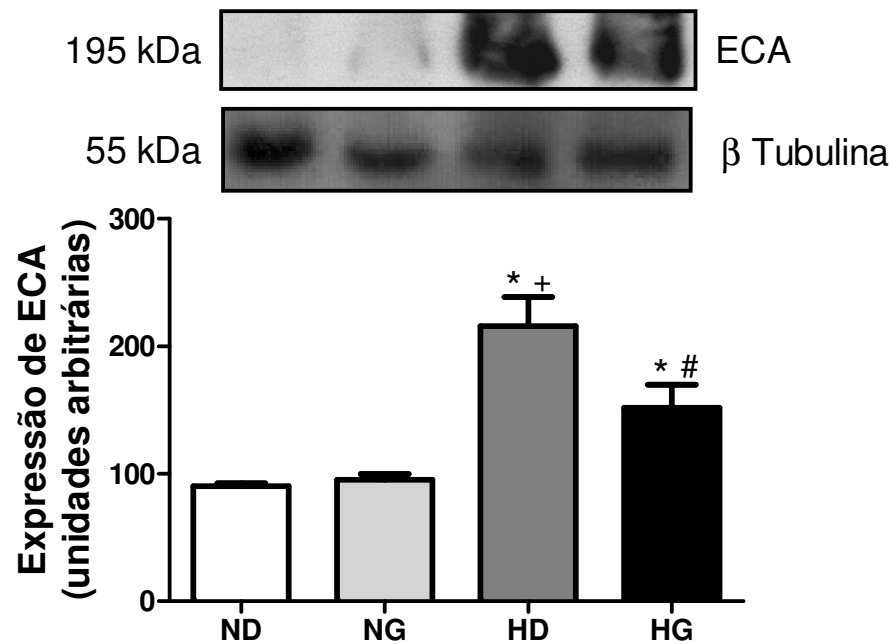


Figura 10 – Expressão da enzima ECA em LAM de ratas ND, NG, HD, HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0.05$  em relação ao grupo ND; + $P < 0.05$  em relação ao grupo NG; # $P < 0.05$  em relação ao grupo HD. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.8 Expressão da enzima ECA2 em LAM de ratas

A expressão da enzima ECA2 foi avaliada por Western Blotting. A expressão dessa enzima, responsável por converter Ang II em Ang 1-7, foi maior nos grupos de ratas hipertensas do que nos grupos de ratas normotensas. A gravidez, isoladamente, não alterou a expressão (Figura 11).

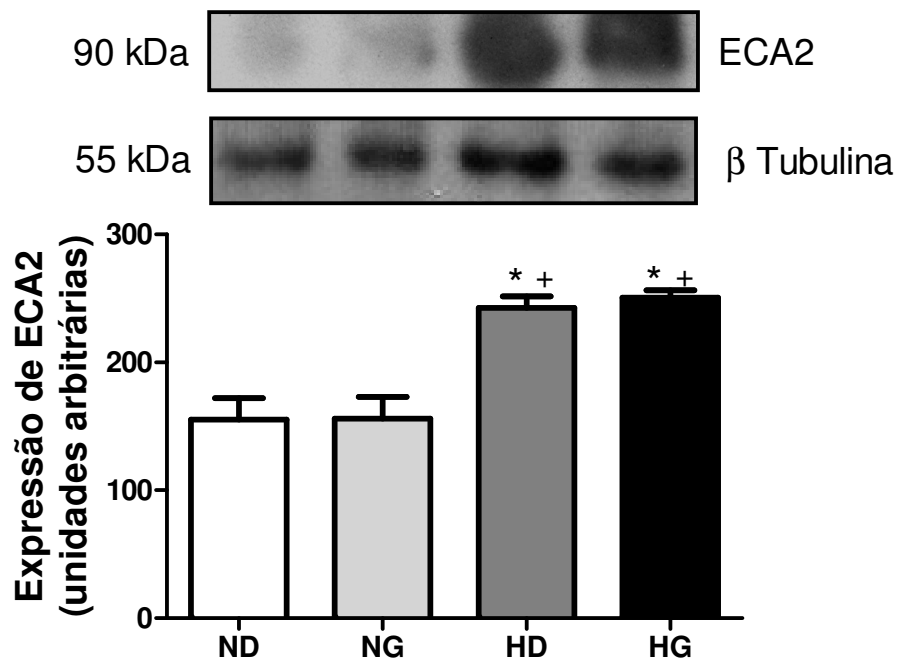


Figura 11 – Expressão da enzima ECA2 em LAM de ratas ND, NG, HD, HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0.05$  em relação ao grupo ND; + $P < 0.05$  em relação ao grupo NG. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.9 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

O dano em lipídeos de membrana foi determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação, que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA).

Em preparações de LAM de ratas grávidas, normotensas e hipertensas, houve uma menor formação de TBARS, quando comparada aos respectivos grupos em diestro. A hipertensão isoladamente não alterou a resposta (Figura 12).

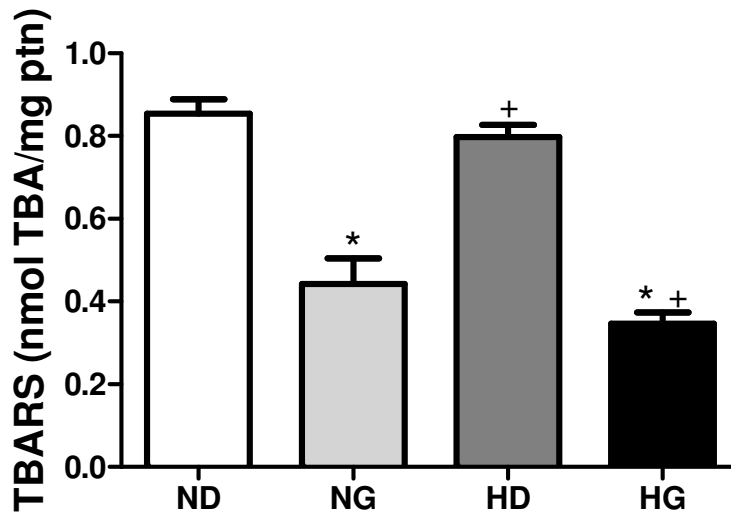


Figura 12 – Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico em LAM de ratas ND, NG, HD e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0.05$  em relação ao grupo ND; + $P < 0.05$  em relação ao grupo NG. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.10 Medida da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase, em preparações de LAM, não diferiu entre os grupos normotensos. No entanto, ratas HG apresentaram uma menor atividade da enzima do que ratas HD. A hipertensão isoladamente não modificou a atividade (Figura 13).

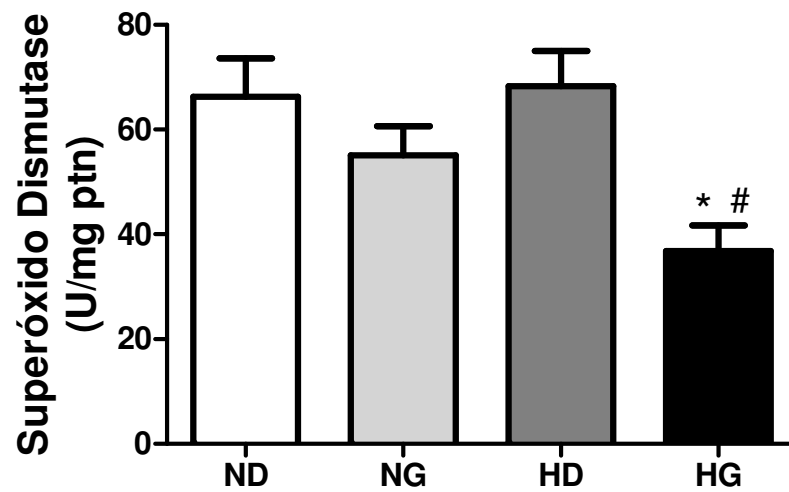


Figura 13 – Atividade da Superóxido Dismutase em LAM de ratas ND (n=13), NG (n=13), HD (n=12) e HG (n=8).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação ao grupo ND; #P<0.05 em relação ao grupo HD. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.11 Medida da catalase

A atividade da Catalase, avaliada em preparações de LAM, foi significativamente maior no grupo de ratas NG, quando comparada ao respectivo grupo em diestro. Entretanto, a hipertensão isoladamente ou a gravidez associada à hipertensão não modificaram a atividade da enzima (Figura 14).

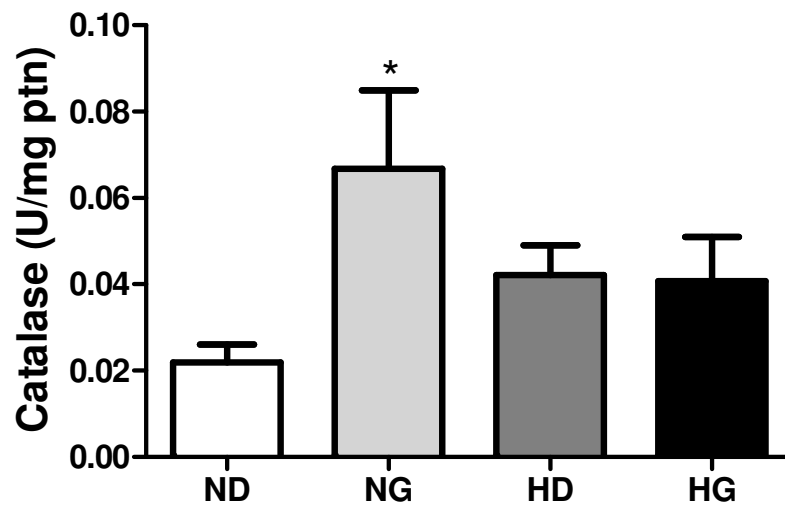


Figura 14 – Atividade da Catalase em LAM de ratas ND (n=7), NG (n=5), HD (n=8) e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação ao grupo ND. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.12 Medida da glutatona peroxidase

A atividade da Glutathione Peroxidase, avaliada em preparações LAM, não diferiu entre os grupos normotensos. No entanto, a atividade da enzima foi significativamente maior no grupo de ratas HG, quando comparada ao respectivo grupo em diestro. A hipertensão isoladamente não alterou a atividade da enzima (Figura 15).

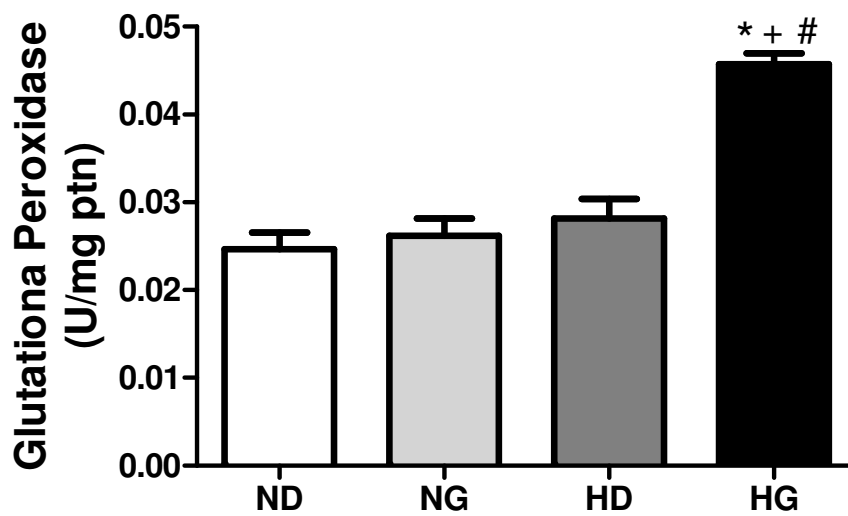


Figura 15 – Atividade da Glutathione Peroxidase em LAM de ratas ND (n=7), NG (n=8), HD (n=8) e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação ao grupo ND; +P<0.05 em relação ao grupo NG; #P<0.05 em relação ao grupo HD. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.13 Transporte de L-arginina em plaquetas

O transporte de L-arginina em plaquetas foi menor no grupo de ratas HG do que no grupo de ratas HD. Entretanto, o grupo de ratas NG não apresentou diferença no transporte basal de L-arginina com relação ao seu respectivo grupo em diestro. A hipertensão por si só não modificou o transporte (Figura 16).

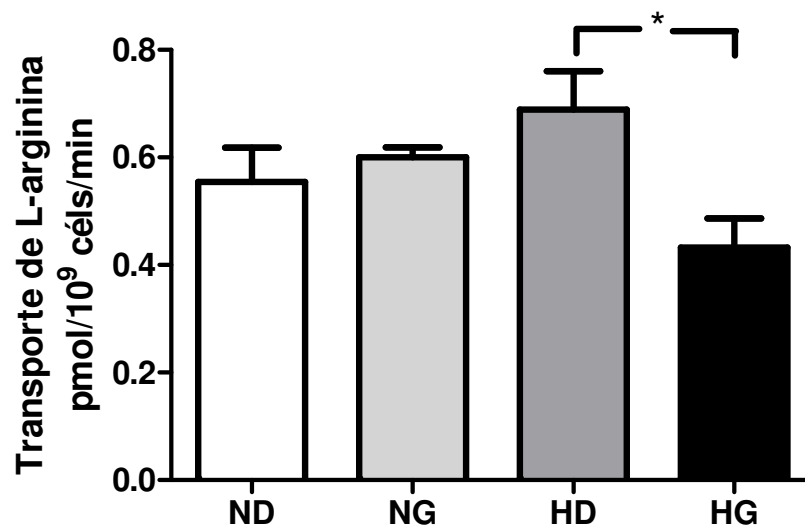


Figura 16 – Transporte de L-arginina em plaquetas de ratas ND (n=7), NG (n=8), HD (n=8) e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.14 Efeito da Ang 1-7 sobre o transporte de L-arginina em plaquetas

O transporte de L-arginina em plaquetas foi avaliado na condição basal ou na presença de tratamento com L-NA (1 mM), Ang 1-7 (100 nM) ou L-NA + Ang 1-7. O transporte de L-arginina em plaquetas foi reduzido com a utilização de L-NA, mas não foi alterado pela incubação com Ang 1-7, isoladamente, em todos os grupos experimentais (Figura 17).

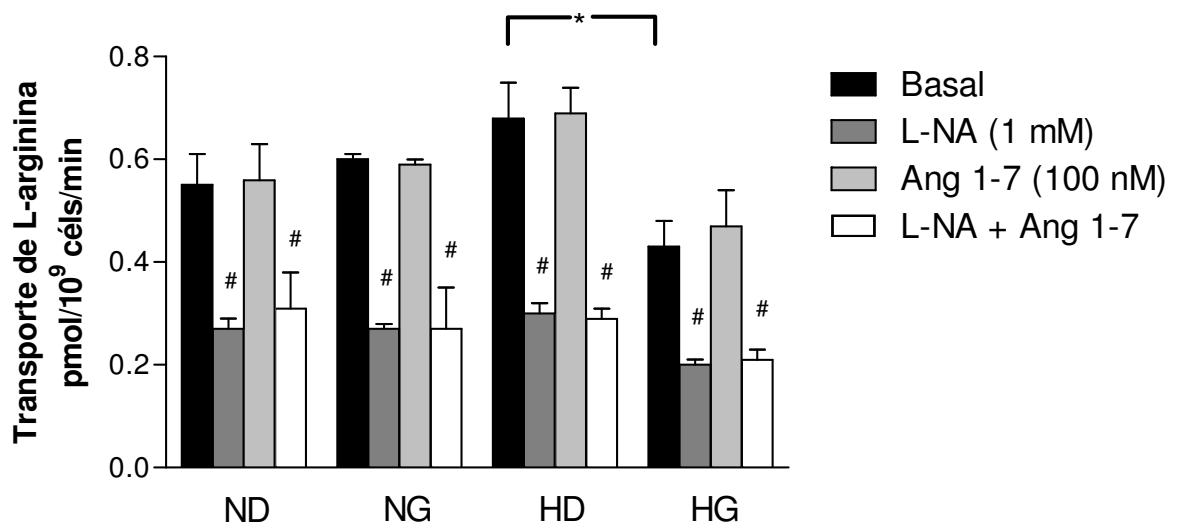


Figura 17 – Efeito da Ang 1-7 sobre o transporte de L-arginina em plaquetas de ratas ND (n=7), NG (n=8), HD (n=8) e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação ao transporte basal do respectivo grupo controle. #P<0.05 em relação ao transporte basal do grupo. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.15 Expressão de eNOS em plaquetas

A expressão de eNOS foi avaliada por Western Blotting. Em preparações de plaquetas de ratas NG houve uma menor expressão de eNOS quando comparada ao grupo controle. Em plaquetas de ratas HD e HG também houve uma menor expressão dessa isoforma quando comparada às ratas ND, indicando que a hipertensão reduz a expressão da eNOS em ratas não grávidas. Entretanto, a gravidez associada à hipertensão não alterou a expressão observada em ratas HD, como ocorreu entre os grupos normotensos (Figura 18).

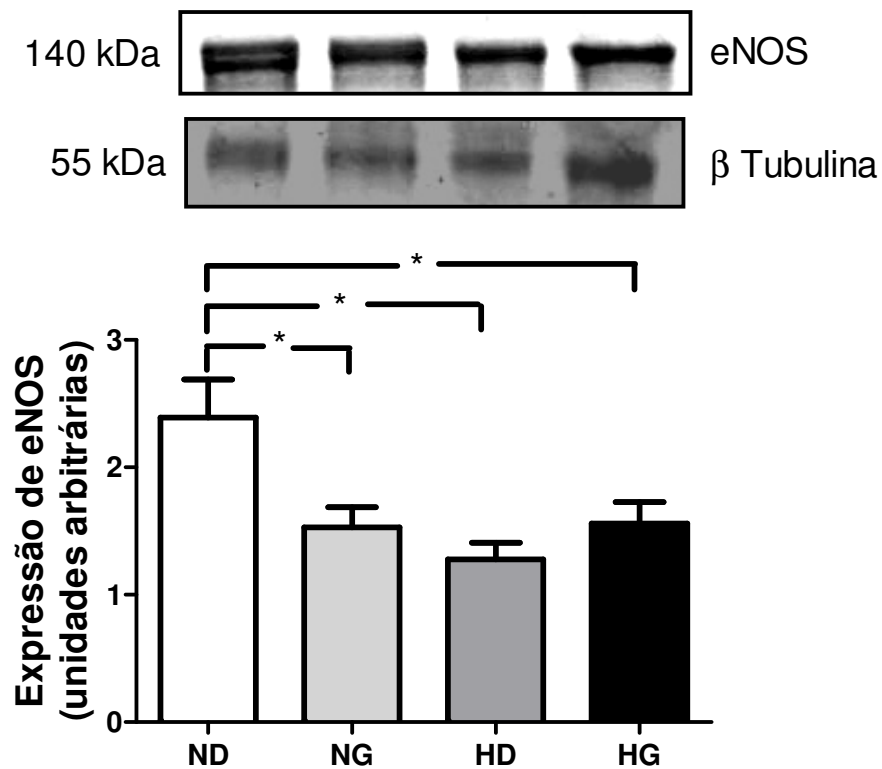


Figura 18 – Expressão da eNOS em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.16 Expressão de iNOS em plaquetas

A expressão de iNOS foi avaliada por Western Blotting. Em plaquetas de ratas NG e HG houve uma menor expressão dessa enzima quando comparada aos respectivos grupos em diestro. Logo, a gravidez, em condição de normotensão ou hipertensão, foi capaz de reduzir a expressão de iNOS. Entretanto, a hipertensão isoladamente não alterou a expressão da enzima (Figura 19).

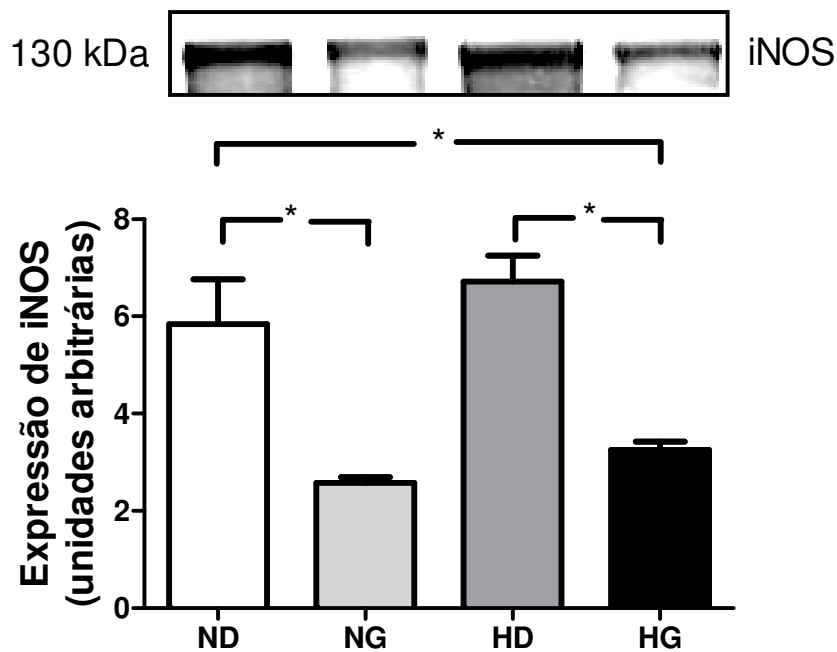


Figura 19 – Expressão da iNOS em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.17 Atividade basal da NOS plaquetária

A atividade basal da NOS em plaquetas, medida através da conversão de L-[<sup>3</sup>H]-arginina em L-[<sup>3</sup>H]-citrulina, foi menor em ratas NG e HG do que nos respectivos grupos em diestro. A hipertensão não modificou a atividade da enzima (Figura 20).

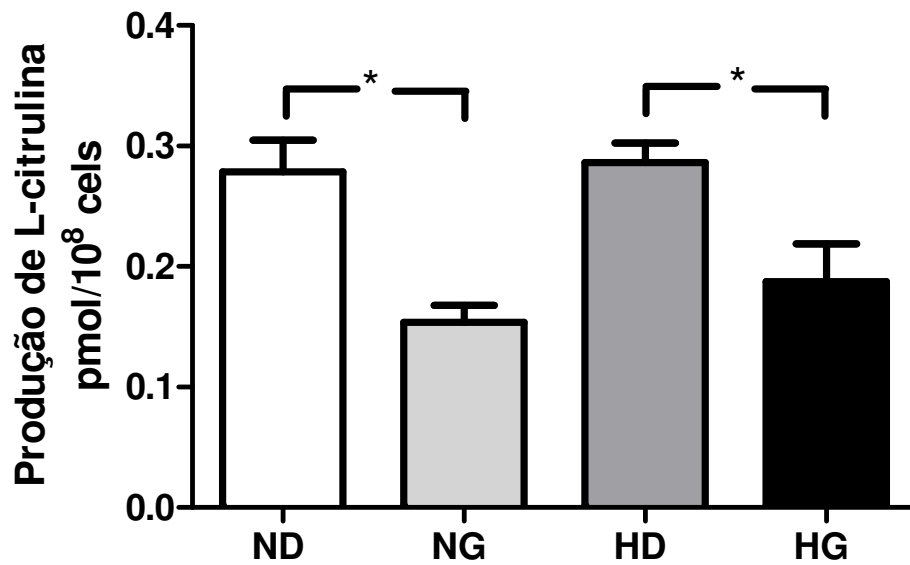


Figura 20 - Produção de L[<sup>3</sup>H]-citrulina em plaquetas de ratas ND (n=6), NG (n=8), HD (n=5) e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.18 Efeito da Ang 1-7 sobre a atividade da NOS plaquetária

A atividade da NOS em plaquetas, medida através da conversão de L-[<sup>3</sup>H]-arginina em L-[<sup>3</sup>H]-citrulina, foi avaliada na condição basal, assim como na presença de tratamento com L-NA (1 mM), Ang 1-7 (100 nM) ou L-NA + Ang 1-7. A atividade da enzima foi reduzida na presença de L-NA, mas não foi alterada pela incubação com Ang 1-7, isoladamente, em todos os grupos experimentais (Figura 21).

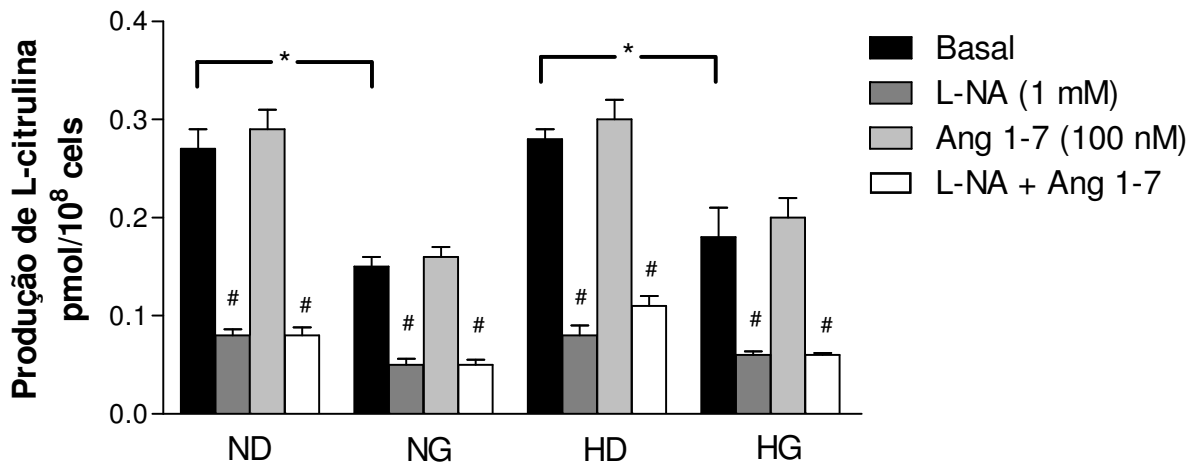


Figura 21 – Efeito da Ang 1-7 sobre a produção de L[<sup>3</sup>H]-citrulina em plaquetas de ratas ND (n=6), NG (n=8), HD (n=5) e HG (n=5).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação à atividade enzimática basal do respectivo grupo controle. #P<0.05 em relação à atividade enzimática basal do grupo. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.19 Mensuração do GMP cíclico intraplaquetário

A produção basal de GMPc intraplaquetário foi significativamente maior no grupo de ratas HG, quando comparada aos grupos normotensos. A gravidez em condição de normotensão e a hipertensão isoladamente não alteraram a produção de GMPc (Figura 22).

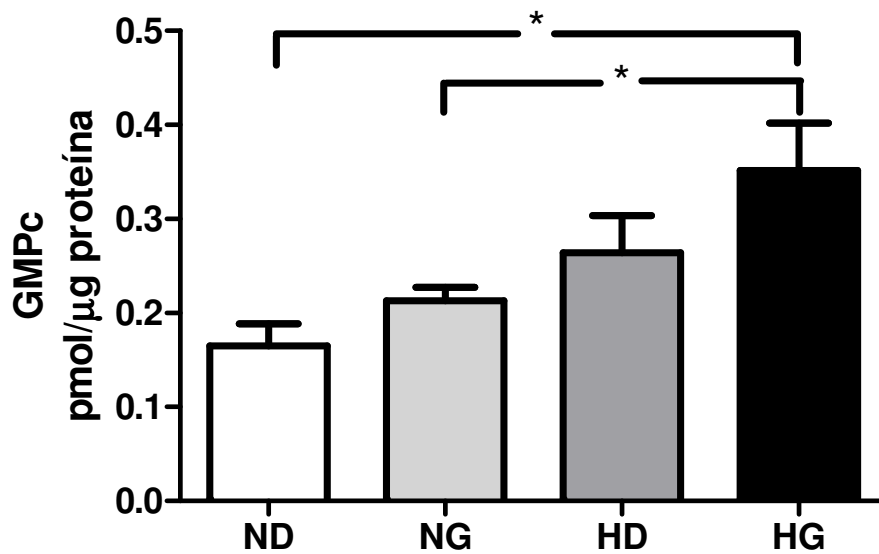


Figura 22 – Produção de GMPc em plaquetas de ratas ND (n=4), NG (n=5), HD (n=4) e HG (n=4).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.20 Expressão da subunidade $\beta_1$ da guanilato ciclase solúvel (GCs) em plaquetas

A expressão da subunidade  $\beta_1$  da guanilato ciclase solúvel, enzima responsável pela produção de GMPc, foi maior em plaquetas de ratas HD, quando comparada aos grupos de ratas normotensas. Em plaquetas de ratas HG foi observada uma menor expressão da enzima quando comparada a HD e que não diferiu daquela observada nos grupos normotensos (Figura 23).

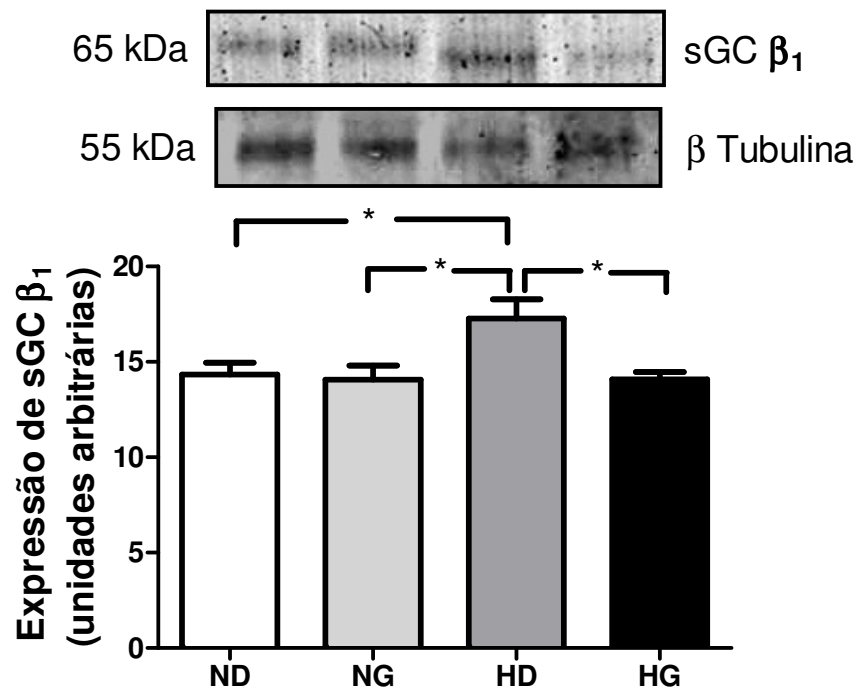


Figura 23 – Expressão da subunidade  $\beta_1$  da enzima guanilato ciclase solúvel em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.21 Expressão de fosfodiesterase 5 (PDE5) em plaquetas

A expressão de PDE5, uma enzima que metaboliza GMPc em plaquetas, foi maior em ratas HD, quando comparada aos grupos de ratas normotensas. Em plaquetas de ratas HG foi observada uma menor expressão da enzima quando comparada a HD e que não diferiu daquela observada nos grupos normotensos (Figura 24).

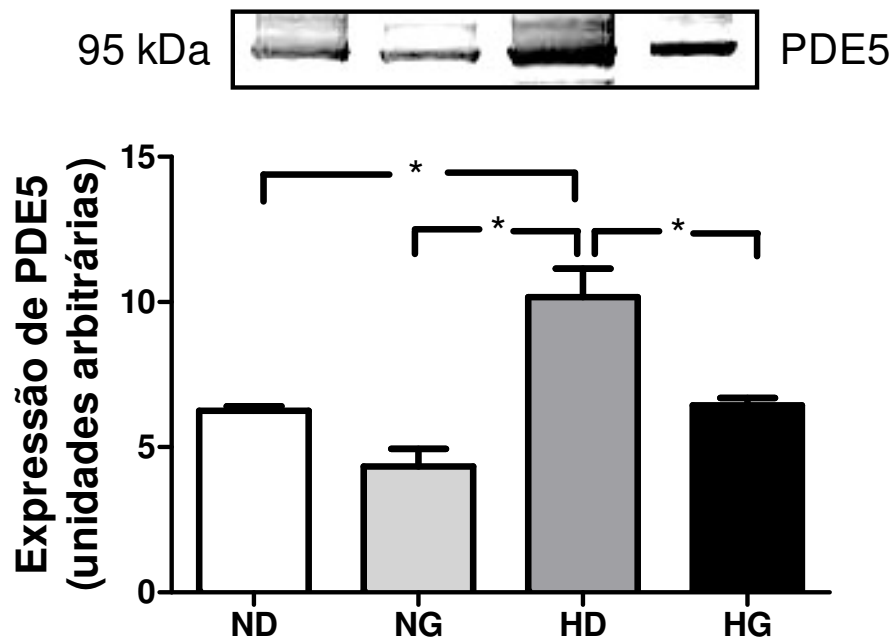


Figura 24 – Expressão de PDE5 em plaquetas de ratas ND, NG, HD e HG (n=3).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.22 Análise da agregação plaquetária

A agregação plaquetária (%) em plasma rico em plaquetas, em resposta ao ADP (12  $\mu$ M), não diferiu significativamente entre os grupos experimentais. Tanto a gravidez, quanto a hipertensão, isoladamente, não modificaram a agregação plaquetária (Figura 25).

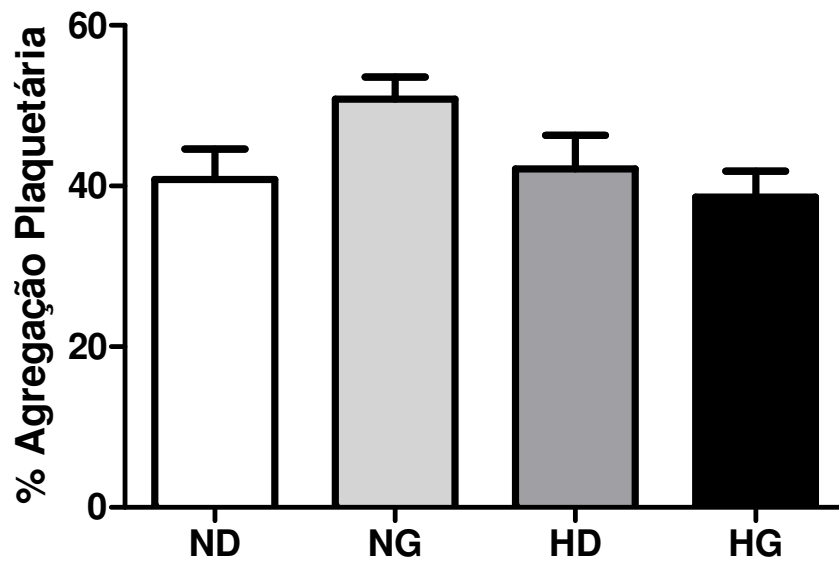


Figura 25 – Agregação plaquetária (%) induzida por ADP (12  $\mu$ M) em plaquetas de ratas ND (n=7), NG (n=7), HD (n=8) e HG (n=8).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

#### 4.23 Efeito da Ang 1-7 sobre a agregação plaquetária

A agregação plaquetária (%) em PRP, em resposta ao ADP (12  $\mu$ M), foi avaliada na ausência e na presença de incubação com Nitro (100  $\mu$ M), Ang 1-7 (100 nM) ou Nitro + Ang 1-7. A agregação plaquetária foi reduzida com a utilização de Nitroglicerina em todos os grupos experimentais, mas não foi alterada pela incubação com Ang 1-7 isoladamente ou associada à Nitroglicerina (Figura 26).

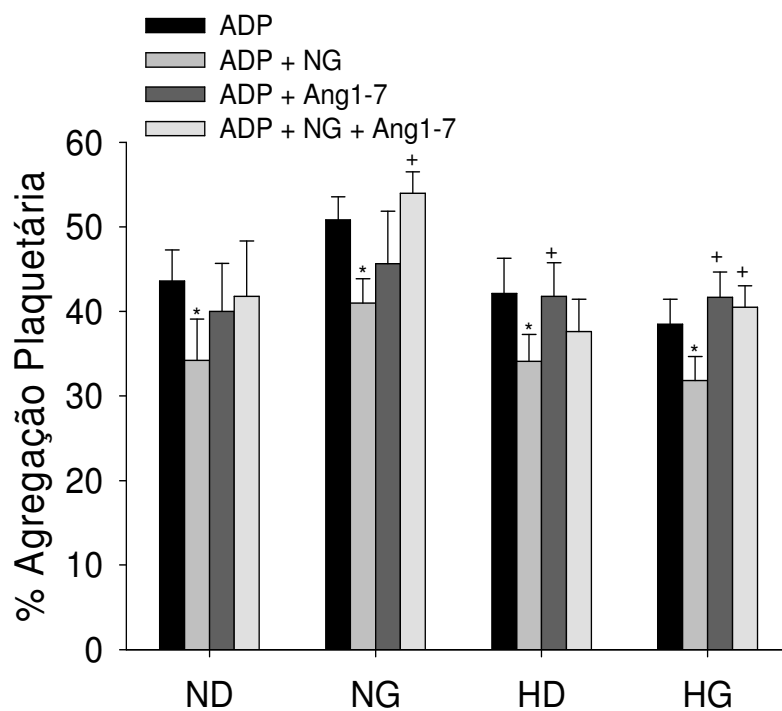


Figura 26 – Efeito da Ang 1-7 sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (12  $\mu$ M) em plaquetas de ratas ND (n=7), NG (n=7), HD (n=8) e HG (n=8).

Legenda: Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0.05 em relação à agregação plaquetária induzida por ADP do grupo. +P<0.05 em relação à agregação plaquetária induzida por ADP na presença de Nitroglicerina do grupo. ND (normotensa em diestro); NG (normotensa grávida); HD (hipertensa em diestro) e HG (hipertensa grávida).

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a contribuição do SRA vascular para a regulação cardiovascular materna no final da gravidez em ratas normotensas e espontaneamente hipertensas. Paralelamente, investigamos o impacto da gravidez e hipertensão sobre a via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas e sua correlação com a função plaquetária.

A gravidez é caracterizada por importantes modificações hemodinâmicas. Há redução da resistência vascular periférica e queda da pressão arterial, enquanto há aumento do débito cardíaco e da contratilidade cardíaca (ROBSON *et al.*, 1989). Os mecanismos responsáveis pela vasodilatação durante a gravidez não são completamente entendidos, mas alguns dados sugerem que o NO é o principal mediador na queda da resistência vascular (DORUP *et al.*, 1999). Em modelos animais e em humanos a síntese de NO torna-se elevada durante a gravidez (CONRAD *et al.*, 1996; COCKELL & POSTON, 1997), podendo contribuir para a expansão da circulação útero-placentária.

Inicialmente, constatamos que tanto ratas normotensas quanto hipertensas, no final da gestação, apresentaram uma redução significativa da pressão arterial sistólica. Os níveis obtidos em ratas grávidas hipertensas não diferiram significativamente daqueles encontrados nos grupos de ratas normotensas, o que corrobora dados prévios do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa (CHUNG *et al.*, 2004; RESENDE *et al.*, 2004; RACASAN *et al.*, 2005). Estes resultados poderiam ser explicados, em parte, por um aumento da produção de NO e PGI<sub>2</sub> pelo endotélio vascular, e que contribuem para a vasodilatação e conseqüente queda na resistência vascular (BALLEJO *et al.*, 2002).

Na gestação, o estrogênio e/ou progesterona promovem um aumento na atividade do SRA pelo aumento dos níveis circulantes e teciduais de angiotensinogênio e renina (OELKERS, 1996) e, conseqüentemente, do peptídeo vasoconstritor Ang II. Por outro lado, o estrogênio também aumenta a expressão de importantes enzimas relacionadas a vasodilatação como a eNOS (WEINER *et al.*, 1994a,b). Estudos em culturas de células demonstraram que concentrações fisiológicas de estrogênio promovem a liberação de NO através da ativação direta de eNOS, sem envolver alteração da expressão gênica (HISAMOTO *et al.*, 2001). De fato, nossos estudos em LAM demonstraram que ratas grávidas, tanto normotensas quanto hipertensas, apresentaram maior expressão de eNOS, que pode contribuir com uma maior produção de NO relacionada à gravidez.

Evidências crescentes sugerem que os mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo estão envolvidos na fisiopatologia da hipertensão. A Ang II parece estar envolvida na inflamação vascular associada à hipertensão (CHENG *et al.*, 2005) e, ainda, a inibição dos receptores AT<sub>1</sub> não somente normaliza a pressão arterial, como também reduz o estado inflamatório em ratos espontaneamente hipertensos (SANZ-ROSA *et al.*, 2005). Além disso, a redução significativa da pressão arterial induzida pela gravidez na linhagem SHR pode estar relacionada à queda dos indicadores de estresse oxidativo nos rins (IACONO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, o dano oxidativo também está reduzido na gravidez, acompanhada de hipertensão ou não. Esse fenômeno está relacionado ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, mas parece ocorrer de maneira distinta entre os grupos. Enquanto ratas normotensas grávidas apresentaram aumento da atividade da catalase, em ratas hipertensas grávidas houve aumento da atividade da enzima glutationa peroxidase. Cabe ressaltar que a atividade da SOD, uma das principais enzimas antioxidantes, está reduzida em ratas hipertensas grávidas, entretanto, o significativo aumento da atividade da GPx nesse grupo parece compensar a deficiência antioxidante da SOD, permitindo que os níveis de TBARS permaneçam reduzidos como nas ratas normotensas grávidas. Portanto, a maior expressão da eNOS e a diminuição do estresse oxidativo poderiam explicar, em parte, uma maior produção e maior biodisponibilidade de NO nos vasos e conseqüente queda na pressão arterial na gravidez, em condições de normotensão e hipertensão.

A queda da pressão arterial no final da gravidez pode envolver outros mecanismos. Além de uma redução do estresse oxidativo, o SRA parece desempenhar um papel importante nas alterações vasculares associadas à gravidez. Nossos resultados demonstraram que em preparações de LAM pré-contraídas, a Ang II e a Ang 1-7 produziram respostas vasodilatadoras em ratas virgens e grávidas, normotensas e hipertensas. Cabe ressaltar que esta é a primeira descrição sobre o efeito vasodilatador induzido pela Ang II em preparações pré-contraídas de fêmeas normotensas e hipertensas. Estes dados estão de acordo com os achados anteriores de Soares de Moura *et al.* (2004) em LAM de ratos normotensos adultos, que demonstraram ainda que a resposta vasodilatadora da Ang II é dependente de endotélio e da ativação da via NO-GMPc. Da mesma forma, o efeito vasodilatador induzido pela Ang II foi demonstrado recentemente por nosso grupo em LAM de ratos espontaneamente hipertensos (OGNIBENE *et al.*, 2009), sugerindo que a expressão aumentada de receptores AT<sub>2</sub>, mantida com a idade, representa um benefício adicional para os efeitos hemodinâmicos dos antagonistas AT<sub>1</sub> utilizados como terapia anti-hipertensiva. Este efeito vasodilatador

dependente de endotélio também foi demonstrado em arteríola aferente de coelho (ARIMA *et al.*, 1997) e em artéria mesentérica isolada de rato (KATADA E MAJIMA, 2002).

Esta também é a primeira evidência mostrando o efeito vasodilatador induzido pela Ang 1-7 em ratas hipertensas grávidas e não grávidas. Outros estudos demonstraram que o heptapeptídeo promove relaxamento em preparações de artérias coronárias e mesentéricas de animais normotensos (GORELIK *et al.*, 1998 BROSNIHAN *et al.*, 2004) e estimula a liberação de NO e prostaglandinas (RAJENDRAN *et al.*, 2005).

No presente estudo foi demonstrado que as respostas vasodilatadoras induzidas por Ang II ou Ang 1-7 foram similares em LAM de ratas normotensas não grávidas e grávidas. Esta observação confirma os dados de diferentes grupos, que não observaram diferença entre as respostas induzidas por agentes vasodilatadores dependentes do endotélio, como BK e ACh (RESENDE *et al.*, 2004; BALLEJO *et al.*, 2002), sugerindo que a função endotelial não é alterada durante a adaptação normal da gravidez. Os estudos de Brosnihan *et al.* (2004) demonstraram que há um aumento dos níveis plasmáticos e urinários de Ang 1-7 e um aumento da resposta vasodilatadora promovida pelo heptapeptídeo em artérias mesentéricas isoladas de ratas normotensas grávidas. Em nosso estudo não foi observado o aumento da resposta vasodilatadora da Ang1-7 em LAM na gravidez de ratas normotensas, mas a utilização de preparações vasculares distintas pode justificar a diferença de resultados.

Nossos dados também demonstraram que o LAM de ratas hipertensas grávidas apresenta maior resposta vasodilatadora induzida por Ang II e Ang 1-7 do que o LAM de ratas hipertensas não grávidas. Essa resposta parece ser específica para os peptídeos do SRA, pois estudo prévio do nosso grupo demonstrou uma redução da resposta vasodilatadora induzida por BK em artérias mesentéricas de SHR grávidas quando comparada a SHR não grávidas, enquanto as respostas vasodilatadoras induzidas por ACh e nitroglicerina foram similares entre os grupos (RESENDE *et al.*, 2004). Esses dados mostram a provável e importante participação dos peptídeos do SRA nas modificações hemodinâmicas e redução da pressão arterial durante a gravidez em ratas geneticamente hipertensas.

As ações da Ang II são mediadas pela ativação de dois subtipos de receptores, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. O receptor AT<sub>1</sub> é amplamente distribuído nos adultos, enquanto o receptor AT<sub>2</sub> é altamente expresso durante o desenvolvimento fetal, mas reduz progressivamente após o nascimento (DE GASPARO *et al.*, 2000). Além disso, já foi demonstrado que a expressão aumentada do receptor AT<sub>2</sub> na vasculatura de camundongos transgênicos induz vasodilatação e neutraliza o efeito pressor mediado pelo receptor AT<sub>1</sub> (TSUTSUMI *et al.*, 1999). Isto sugere

que a expressão modificada dos receptores da Ang II pode estar envolvida na regulação da pressão arterial e da homeostase cardiovascular. Os resultados do presente estudo demonstraram que não houve uma alteração significativa na expressão de receptores AT<sub>1</sub> em LAM de ratas normotensas grávidas e não grávidas. No entanto, SHR grávidas apresentaram uma expressão reduzida desse receptor em comparação às ratas SHR não grávidas. A redução significativa da expressão de receptores AT<sub>1</sub> em LAM de SHR grávidas observada neste estudo sustenta o papel protetor do receptor AT<sub>2</sub>, que apresentou uma expressão inalterada na gravidez e que deve estar associada à resposta vasodilatadora aumentada da Ang II e Ang 1-7. Nossa hipótese é de que na vigência de uma expressão reduzida de AT<sub>1</sub> em vasos de ratas SHR grávidas, a Ang II promova preferencialmente vasodilatação mediada por AT<sub>2</sub>. Dados recentes do nosso grupo mostram que a Ang II induz vasodilatação em LAM de ratos normotensos e hipertensos mediada por AT<sub>2</sub>. Esta resposta também é mediada por ativação de receptor de Ang 1-7, já que é parcialmente reduzido pelo inibidor A779 do receptor *mas* (OGNIBENE *et al.*, 2009). Portanto, a Ang 1-7 parece contribuir para a resposta vasodilatadora da Ang II. Além disso, o heptapeptídeo por si só produz resposta vasodilatadora ligando-se a seu receptor específico *mas* (GIRONACCI *et al.*, 1999). Nossos resultados em LAM estão de acordo com o estudo de Iacono *et al.* (2009), que demonstraram uma significativa redução na expressão renal de receptores AT<sub>1</sub> que, no entanto, foi associada ao aumento do subtipo AT<sub>2</sub> em SHR grávidas. Portanto, um aumento na relação AT<sub>2</sub>/AT<sub>1</sub> nos rins e na vasculatura pode contribuir para o controle da hemodinâmica glomerular e redução da resposta vasoconstritora induzida pela Ang II, resultando em um efeito benéfico sobre a pressão arterial sistêmica em SHR grávidas.

O SRA é um regulador central dos eventos cardiovasculares. Enquanto a atividade do eixo vasoconstritor e proliferativo ECA/Ang II/AT<sub>1</sub> tem sido relacionada a complicações cardiovasculares como a trombose, a atividade do eixo ECA2/Ang 1-7/*mas* parece atuar de maneira contra-regulatória, estando envolvida em ações protetoras do SRA, como vasodilatação e efeito antitrombogênico (SANTOS *et al.*, 2008; FRAGA-SILVA *et al.*, 2010). Diversas observações e evidências experimentais sugerem um papel benéfico da ECA2 sobre a função cardiovascular. Evidências demonstram que a expressão de ECA2 já se encontra elevada nos estágios iniciais da hipertensão, o que pode indicar um papel protetor da ECA2 (SANTOS *et al.*, 2005). Além disso, estudos indicam um aumento da expressão de receptores *mas* em animais adultos, enquanto a expressão dos receptores AT<sub>2</sub> é reduzida (ALENINA *et al.*, 2002; DE GASPARO *et al.*, 2000), sugerindo que a ação contra-regulatória exercida pelos

receptores  $AT_2$  nas fases iniciais do desenvolvimento é progressivamente substituída pelo eixo ECA2/Ang 1-7/mas em fases posteriores.

Nossos dados demonstraram que em LAM de SHR não grávidas há uma maior expressão das enzimas ECA e ECA2, responsáveis pela geração de Ang II e Ang 1-7, respectivamente. No entanto, no final da gravidez em SHR, houve uma redução significativa nos níveis de ECA, enquanto a expressão de ECA2 permaneceu aumentada. Estes resultados mostram uma importante regulação dos eixos do SRA, sugerindo um deslocamento para o eixo ECA2/Ang 1-7 como uma resposta adaptativa e a provável relação com a redução da pressão arterial na gravidez de animais espontaneamente hipertensos.

Portanto, os resultados sugerem que a redução da pressão arterial para valores normais no final da gravidez em SHR pode estar relacionada ao aumento da produção de NO e das respostas vasodilatadoras induzidas por Ang II e Ang 1-7, assim como à redução da expressão de ECA e receptores  $AT_1$  e do estado oxidativo.

Diversos estudos têm investigado o metabolismo do aminoácido precursor L-arginina na gestação, no entanto esta é a primeira evidência de que plaquetas de ratos constitutivamente expressam tanto eNOS quanto iNOS, que são capazes de gerar ativamente NO a partir do aminoácido semi-essencial L-arginina. Evidências anteriores sustentam um papel importante do NO derivado de plaquetas como anti-agregante plaquetário e no impedimento das propriedades de adesão em humanos (MONCADA & HIGGS, 1993). O primeiro passo para a produção de NO é o transporte transmembrana de L-arginina através de sistemas transportadores de aminoácidos (DEVÉS & BOYD, 1998). Os resultados de nosso estudo mostraram que o transporte total de L-arginina e a atividade da NOS diminuíram em plaquetas de ratas hipertensas grávidas em comparação com hipertensas não grávidas. Evidências recentes demonstraram que o transporte de L-arginina na aorta materna é profundamente atenuada na gravidez, sustentando que há um deslocamento de arginina preferencialmente para o feto (RESHEF *et al.*, 2008). Estes dados podem explicar a redução no transporte de L-arginina em plaquetas de ratas grávidas hipertensas. Tanto o influxo quanto a disponibilidade intracelular de L-arginina são fatores limitantes para a produção de NO (GOUMAS *et al.*, 2001). Portanto, é possível que a diminuição da atividade enzimática observada neste estudo esteja relacionada à menor quantidade de substrato, juntamente com a diminuição da expressão da iNOS.

Neste estudo, verificamos que os níveis de GMPc intraplaquetário são iguais em ratas SHR não grávidas e normotensas. No entanto, neste estágio de hipertensão, a expressão da

PDE5, que metaboliza o GMPc, está aumentada em ratas SHR comparada com as normotensas, mas a expressão aumentada de GCs parece compensar o metabolismo aumentado neste grupo. Por outro lado, observamos uma maior produção de GMPc e manutenção de uma agregação plaquetária dentro da normalidade na gravidez associada à hipertensão. Apesar da diminuição do transporte de L-arginina e da atividade da NOS, e ainda, da menor expressão da GCs, um dos fatores que podem contribuir para o aumento dos níveis de GMPc é a redução da expressão da proteína PDE5. Este dado sugere uma importante resposta regulatória para a modulação da agregação plaquetária durante a gravidez. Outra explicação seria a redução do estresse oxidativo durante a gravidez, levando à manutenção da biodisponibilidade de NO e consequentemente dos níveis de GMPc. A hipertensão tem sido associada ao estresse oxidativo, o que foi demonstrado em machos (GRUNFELD *et al.*, 1995) e fêmeas SHR (IACONO *et al.*, 2009). Recentes evidências têm demonstrado que os níveis de malondilaldeído (MDA), gerado pela peroxidação lipídica, estão elevados nos rins de fêmeas SHR e que a gravidez diminui esses níveis (IACONO *et al.*, 2009).

Em contrapartida, o transporte total de L-arginina foi mantido na gravidez na condição de normotensão. Mas, semelhante às ratas hipertensas, a atividade da enzima NOS, medida pela conversão de L-arginina em L-citrulina, foi reduzida. Também foi observado que a expressão das isoformas eNOS e iNOS foram reduzidas na gestação normal. Embora seja aparente uma inibição da via de produção de NO, a produção de GMPc e a agregação plaquetária foram similares ao grupo controle. Portanto, a atividade reduzida da NOS em plaquetas de ratas normotensas grávidas pode estar relacionada à menor expressão de ambas as isoformas. No entanto, a agregação plaquetária normal também é sustentada pelos níveis inalterados de GMPc. Alternativamente, além do NO, outros fatores podem regular a atividade da enzima GCs, como o monóxido de carbono (CO) e o OH, afetando assim os níveis de GMPc. Estudos prévios demonstraram que o CO e o NO têm efeitos semelhantes sobre a agregação plaquetária (BRUNE & ULRICH, 1987), a função do músculo liso vascular e o nível intracelular de GMPc. Além disso, o OH foi sugerido como um mediador fisiológico do relaxamento vascular dependente do endotélio (SCHMIDT *et al.*, 1993). Assim, além do NO, tanto o CO quanto o OH podem representar potenciais mediadores da função plaquetária.

A interação da NOS com uma variedade de proteínas tem um papel importante na regulação da produção de NO. Uma das proteínas que interagem com a NOS é a proteína de choque térmico 90 (HSP90), que parece exercer um importante papel na função e na

estabilidade da enzima (PRESLEY *et al.*, 2008). Entretanto, a degradação da NOS tem sido proposta como um mecanismo regulatório em condições de elevada produção de NO para prevenir os efeitos tóxicos desse composto (BENDER *et al.*, 2000; MUSIAL & EISSA, 2001) e parece estar associada a menor interação com HSP90 (AVERNA *et al.*, 2007). Como a gestação é caracterizada pela elevada produção de NO, principalmente pelas células endoteliais, o excesso desse composto poderia levar à degradação das isoformas da enzima NOS em plaquetas. Dessa forma, a menor expressão de NOS promove a menor atividade da enzima e como conseqüência a menor produção de NO. Outra possibilidade é que o aumento da produção de NO e PGI<sub>2</sub> pelo endotélio na gravidez (VALDÉS *et al.*, 2009) possa participar da manutenção da agregação normal, mesmo na presença de uma produção intraplaquetária de NO reduzida. Portanto, embora a via L-arginina-NO esteja inibida durante a gravidez, com a conseqüente diminuição da produção do NO endógeno, provavelmente há uma compensação pelo NO produzido pelas células endoteliais.

Os antagonistas plaquetários aumentam os níveis de AMPc e GMPc através da ativação das respectivas ciclases. Em contrapartida, os níveis desses nucleotídeos cíclicos são reduzidos através da degradação pelas PDEs. As plaquetas contêm principalmente PDE3, que hidrolisa preferencialmente AMPc, e PDE5, que catalisa preferencialmente a degradação de GMPc (HASLAM *et al.*, 1999). Além disso, o GMPc parece modular os níveis de AMPc e a atividade da PKA através da inibição da atividade da PDE3 (VASDECASTEELE *et al.*, 2001).

Relevantes estudos têm demonstrado uma importante participação da Ang 1-7 sobre a função plaquetária. O heptapeptídeo é capaz de potencializar o efeito anti-agregante plaquetário induzido pelo nitroprussiato de sódio, um doador de NO, e também apresenta efeito antitrombótico (RAJENDRAN *et al.*, 2005; FRAGA-SILVA *et al.*, 2008). No presente estudo, a incubação de plaquetas com Ang 1-7, na concentração de 100 nM, não foi capaz de potencializar o efeito anti-agregante da nitroglicerina, um doador de NO, ou ainda, alterar o transporte de L-arginina e a atividade da NOS em plaquetas. Um estudo mais detalhado do papel da Ang 1-7 na função plaquetária precisa ser realizado, utilizando diferentes concentrações de Ang 1-7 e maior tempo de incubação das plaquetas com o peptídeo.

Similarmente aos humanos, este estudo revela a presença da via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas de ratos. Além disso, a gravidez diminui o transporte de L-arginina, a atividade da NOS e a expressão da iNOS em plaquetas de ratas hipertensas em comparação com hipertensas não grávidas. Apesar da reduzida biodisponibilidade de NO plaquetário em ratas

hipertensas, a agregação plaquetária permanece inalterada, o que pode estar relacionado ao aumento dos níveis de GMPc e a menor expressão de PDE5. Esses dados podem contribuir com o estudo sobre a complexa fisiopatologia da hipertensão gestacional.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a redução da pressão arterial para valores normais no final da gravidez em SHR pode estar relacionada ao aumento da produção de NO e das respostas vasodilatadoras induzidas por Ang II e Ang 1-7, assim como à redução da expressão de ECA e receptores AT<sub>1</sub> e do estado oxidativo no LAM. Além disso, este estudo revela a presença da via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas de ratos. Apesar de uma reduzida biodisponibilidade plaquetária de NO, a agregação plaquetária permanece inalterada em SHR grávidas, o que pode estar relacionado ao aumento dos níveis de GMPc a à reduzida expressão de PDE5.

## REFERÊNCIAS

Acharya J, PUNCHARD NA, Taylor JA, Thompson RPH, Pearson TC. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur. J. Haematol.* 1991; 47: 287-91.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.

Arima S, Endo Y, Yaoita H, Omata K, Ogawa S, Tsunoda K, Abe M, Takeuchi K, Abe K, Ito S. Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(11): 2816-2823.

Averna M, Stifanese R, De Tullio R, Salamino F, Bertuccio M, Pontremoli S, Melloni E. Proteolytic degradation of nitric oxide synthase isoforms by calpain is modulated by expression levels of HSP90. *FEBS J.* 2007; 274: 6116-6127.

Ballejo G, Barbosa TA, Coelho EB, Antoniali C, Salgado MC. Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. *Life Sci.* 2002; 70: 3131-3142.

Bannister JV & Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 1987; 32: 279-312.

Bassan H, Bassan M, Pinhasov A, Kariv N, Giladi E, Gozes I, Harel S. The pregnant spontaneously hypertensive rat as a model of asymmetric intrauterine growth retardation and neurodevelopmental delay. *Hypertens. Pregnancy* 2005; 24(3): 201-211.

Belló A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: Marroni NP ET AL. *Estresse oxidativo e antioxidantes.* Porto Alegre: Editora Ulbra. 2002; 15-19.

Bender A, Demady DR, Osawa Y. Ubiquitination of neuronal nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 17407-17411.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, & Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65: 1865-1874.

Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "l-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J. Nutr.* 2004; 134(10): 2842S-2847S.

Bonnes T, Guèrin T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? *Biochemical Pharmacology.* 1992; v.44, n.5, p.985-988.

Bredt DS & Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 9030-9033.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin (1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996; 27:523-528.

Brosnihan KB, Neves LAA, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz. J. Med. Biol.* 2004; 37: 1255-1262.

Brosnihan KJ, Neves LAA, Chappell MC. Does the angiotensin-converting enzyme (ACE)/ACE2 balance contribute to the fate of angiotensin peptides in programmed hypertension? *Hypertension* 2005; 46: 1097-1099.

Brune B, Ulrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* 1987; 32: 497-504.

Brunini TM, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozentul A, Mann G, Ellory J, Soares de Moura R, Mendes-Ribeiro A. Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-L-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004; 31: 738-740.

Brunini TMC, Resende AC, Moss MB, Soares de Moura R, Mendes Ribeiro AC. L-arginine-availability as a pathological mechanism in essential hypertension, chronic renal and HF. *Vascular Disease Prevention* 2005; 2: 37-51.

Brunini TM, Yagoob MM, Novaes Malagris LE, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Increase nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transporte via system y+L. *Pflugers Arch.* 2003; 445(5): 547-550.

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the working group on endothelins and endothelial factors of the European Society of Hypertension. *J. Hypertension* 2005; 23: 233-246.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.* 2003; 24: 261-271.

Carr A, McCall MR, & Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1716-1723.

Cary SPL, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends in Biochemical Sciences* 2006; 31: 231-239.

Chamoux E, Breault L, Lehoux JG, Gallo-Payer N. Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development. *J. Clin. Endocrinol. Soc.* 1999; 84: 4722-4730.

Channon KM & Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002; 53(4 Pt1): 515-524.

Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin (1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1998; 31(pt2): 362-367.

Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11: RA194-RA205.

Chirkov YY, Holmes AS, Martelli JD, Horowitz JD. Effect of perindopril on platelet nitric oxide resistance in patients with chronic heart failure secondary to ischemic left ventricular dysfunction. *Am. J. Cardiol.* 2004; 93: 1438-1440.

Chung AW, Radomski A, Alonso-Escolano D, Jurasz P, Stewart MW, Malinski T, Radomski MW. Platelet-leukocyte aggregation induced by par agonists: Regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 143: 845-855.

Clark MA, Tallant EA, Diz DI. Downregulation of AT1A receptor by pharmacologic concentrations of angiotensin 1-7. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001; 37: 437-448.

Closs, EJ, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma Membrane Transporters for Arginine. *J. Nut.* 2004; 134: 2752S-2759S.

Cockell AP & Poston L. Flow-mediated vasodilation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension* 1997; 30: 247-251.

Collister JP, Hendel MD, The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J. Renin Angioten. Aldost. Syst.* 2003; 4: 176-179.

Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochell LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.* 1993; 7: 566-571.

Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelial-dependent contraction. *Hypertension* 1994; 23: 229-235.

Costa CA, Amaral TA, Carvalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Moss MB, Valença SS, de Moura RS, Resende AC. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. *Am. J. Hypertes.* 2009; 22(12): 1242-1249.

Cote F, Do TH, Laflamme L, Gallo JM, Gallo-Payer N. Activation of the AT2 receptor of the angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 31686-31692.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pel Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PM, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417: 822-828.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami I, Wright JW, Unger TH. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Res.* 2000; 52: 415-472.

de Meirelles LR, Mendes-Ribeiro AC, Mendes MA, da Silva MN, Ellory JC, Mann GE, Brunini TM. Chronic exercise reduces platelet activation in hypertension: Upregulation of the l-arginine-nitric oxide pathway. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 2009; 19: 67-74.

Delacrétaç E, de Quay N, Waeber B, Vial Y, Schutz PE, Burnier M, Bossart H, Schaad NC. Differential nitric oxide synthase activity in human platelets during normal pregnancy and pré-eclampsia. *Clin. Sci. (Lond)*. 1995; 88: 607-610.

Delli Pizzi AM, Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Natriuretic action of angiotensin (1-7). *Br. J. Pharmacol.* 1994; 111: 1-3.

Devés R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 487-545.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxipeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Res.* 2000; 87: e1-e9.

Dorup I, Skajaa K, Sorensen K. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1999; 276: 821-825.

Draper HH & Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.

Dusting GJ & McDonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann. Med.* 1995; 27: 395-406.

Ferrario CM & Iyer SN. Angiotensin (1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* 1998; 78: 13-18.

Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA. Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 1991; 18: III126-III133.

Ferreira, AL; Matsubara, LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Méd. Brasil.* 1997; 43(1): 61-8.

Flohé L & Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 114-121.

Fraga-Silva RA, Pinheiro SVB, Gonçalves ACC, Alenina N, Bader M, Santos RAS. The antithrombotic effect of angiotensin 1-7 involves Mas-mediated NO release from platelets. *Mol. Med.* 2008; 14(1-2): 28-35.

Fraga-Silva RA, Sorg BS, Wankhede M, Deugd C et al. ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Mol. Med.* 2010; 16: 210-215.

Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 350-356.

Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 18515-18517.

- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- Gallinat S, Burche S, Schutze S, Kronke M, Unger T. AT<sub>2</sub> receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett.* 1999; 443: 75-79.
- Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J. Clin. Invest.* 1973; 52(11): 2682-2689.
- Gendron L, Laflamme L, Rivard N, Asselin C, Payet MD, Gallo-Payet N. Signals from the AT<sub>2</sub> receptor of angiotensin II inhibit p21<sup>ras</sup> and activate MAPK to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells. *Mol. Endocrinol.* 1999; 13: 1615-1626.
- Gewaltig MT, & Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Research* 2002; 55: 250-260.
- Gironacci MM, Coba MP, Pena C. Angiotensin 1-7 binds at the type 1 angiotensin II receptors in rat renal cortex. *Regul. Pept.* 1999; 84: 51-54.
- Gorelik G, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin (1-7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286: 403-410.
- Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C, Toutouzas P. Therapeutic modification of the l-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2001; 154: 255-267.
- Greco AJ, Master, RG, Fokin Jr A, Baber SR, Kadowitz PJ. Angiotensin 1-7 potentiates responses to bradykinin but does not change responses to angiotensin I. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 84(11): 1163-1175.
- Griendling KK, Sorensen D & Ushio-Fukai M. NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 2000; 86: 494-501.
- Grunfeld S Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26:854-857.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 1999; 31(4): 261-272.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* (3<sup>rd</sup> ed.). Oxford University Press. 1999.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltagedependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 5557-5563.

Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE. Effect of angiotensin converting – enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 1999; 353 (9153): 611-616.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(9): 2153-2157.

Haslam RJ, Dickinson NT, Jang EK. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 412-423.

Hisamoto K, Masahide O, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(5): 3459-3467.

Hunsain A. The chymase angiotensin system in humans. Editorial review. *J. Hypert.* 1993; 11: 1155-1159.

Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006; 33(1-2): 1-8.

Iacono A, Bianco G, Mattace Raso G, Esposito E, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Cuzzocrea S, Calignano A, Autore G, Meli R. Maternal adaptation in pregnant hypertensive rats: Improvement of vascular and inflammatory variables and oxidative damage in the kidney. *Am. J. Hypertens.* 2009; 22: 777-783.

Ichiki T, Kambayashi Y, Inagami T. Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type 2 receptor in R3T3 cells. *Cir. Res.* 1995; 77: 1070-1076.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 9265-9269.

Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92(8): 3521-3525.

IV Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension. *Arq. Bras. Cardiol.* 2004; 82(suppl 4): 7-22.

Iyer SN, Averill DB, Chappel MC, Yamada K, Allred AJ, Ferrario CM. Contribution of Angiotensin 1-7 to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36(3): 417-422.

Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin (1-7): an update. *Reg. Pept.* 2000; 91: 45-62.

Jialal I, Grundy SD. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences, New York.* 1992; v.669, n.30, p.239-248.

JNC 7 Report - The Seventh Report of Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.

Joyner J, Neves LA, Granger JP, Alexander BT, Merrill DC, Chappell MC, Ferrario CM, Davis WP, Brosnihan KB. Temporal-spatial expression of Ang-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 293(1): R169-R177.

Kaplan NM. Systemic hypertension: mechanism and diagnostic. En: *Heart Disease* (eds. Braunwald E; Zipes D.P., Libby P.). Editora W.B. Saunders, Philadelphia. 2001; p. 941-971.

Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 2003, 12(2):70-88.

Katada J & Majima M. AT2 receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 484-491.

Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension* 2005; 46: 249-254.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 5159-5162.

Konstantinova E, Ivanova L, Tolstaya T, Mironova E. Rheological properties of blood and parameters of platelets aggregation in arterial hypertension. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2006; 35: 135-138.

Lara LS, Bica RB, Sena SL, Correa JS, Marques-Fernandes MF, Lopes AG, Caruso-Neves C. Angiotensin (1-7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na (+)-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. *Regul. Pept.* 2002; 103 (1): 17-22.

Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2001; 8: 383-392.

Levy A, Yagil Y, Bursztyn M, Barkalifa R, Scharf S, Yagil C. ACE2 expression and activity are enhanced during pregnancy. *Am. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 295(6): 1953-1961.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360: 1903-1913.  
Li P, Cappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin 1-7 augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension* 1997; 29: 394-400.

Lima CV, Paula RD, Resende FL, Khosla MC, Santos RA. Potentiation of hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin 1-7 in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 542-548.

- Loscalzo J, Vita J. Nitric Oxide and the cardiovascular system. Human. Press. Inc. 2000; 4.
- Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003; 83: 183-252.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(17): 12231-12234.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994; 78: 927-930.
- Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res.* 2003; 39(4): 67-86.
- Maxwell AJ, Cooke JP. L-arginine. Em: Nitric Oxide and Cardiovascular System (eds. Loscalzo J, Vita JA). Editora Humana Press, Totowa. 2000, 547-585.
- MacAllister RJ, Vallance P. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis: how important are they? *Exp. Nephrol.* 1998; 6(3): 195-199.
- McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation of vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* 1965; 177: 21-30.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 1996; 122: 59-67.
- Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Yagoob M, Aronson JK, Mann GE, Ellory JC. Identification of system y+L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. *Pflugers Arch.* 1999; 438(4): 573-575.
- Mendes Ribeiro AC, Brunini TM. L-Arginine transport in disease. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc.* 2004; 2(2): 123-131.
- Mendes-Ribeiro AC, Brunini TMC, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Card. Res.* 2001; 49: 697-712.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 2002-2012.
- Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 1997; 811: 60-67.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews* 1991; 43(2): 109-142.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 1989; 38(11): 1709-1715.

Morishita R, Higaki J, Miyazaki M, Ogihara T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1992; 19(2 Suppl): II62-II67.

Moss MB, Brunini TM, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Diminished l-arginine bioavailability in hypertension. *Clin. Sci. (Lond)* 2004; 107: 391-397.

Musial A & Eissa T. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 24268-24273.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horichi M, Pratt R, Dzau VJ. The angiotensin II (AT<sub>2</sub>) receptor antagonizes the growth effects of the AT<sub>1</sub> receptor. Gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Sci. USA* 1995; 92: 10663-10667.

Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ. Res.* 2000; 87(5): 406-411.

Neves LA, Williams AF, Averill DB, Ferrario CM, Walkup MP, Brosnihan KB. Pregnancy enhances the angiotensin (Ang)-(1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of Ang-(1-7). *Endocrinology* 2003; 144(8): 3338-3343.

Oelkers WKH. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 1996; 61: 166-171.

Ognibene DT, Oliveira PR, Marins de Carvalho LR, Costa CA, Espinoza LA, Criddle DN, Tano T, Soares de Moura R, Resende AC. Angiotensin II-mediated vasodilation is reduced in adult spontaneously hypertensive rats despite enhanced expression of AT<sub>2</sub> receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009; 36: 12-19.

Paller MS. Decreased pressor responsiveness in pregnancy: studies in experimental animals. *Am. J. Kidney Dis.* 1987; 9: 308-311.

Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am. J. Physiol.* 1984; 247: H100-108.

Phippard AF, Horvath JS, Glynn EM. Circulatory adaptation to pregnancy: serial studies on haemodynamics blood volume, rennin and aldosterone in the baboon (*Papio hamadryas*). *J. Hypertension* 1986; 4: 773-779.

Plumb RD, El-Sherbeeny NA, Dixon LJ, Hugles SMT, Devine AB, Leahey WJ, McVeigh GE. NADPH-dependent superoxide production in platelets: The role of angiotensin II and protein kinase C. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 607-613.

Polizio AH, Ginonacci MM, Tomaro ML, Pena C. Angiotensin 1-7 blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. *Pharmacological Research* 2007; 56: 86-90.

Presley T, Vedam K, Velayutham M, Zweier JL, Ilangovan G. Activation of HSP90-eNOS and increased NO generation attenuate respiration of hypoxia-treated endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008; 295: C1281-1291.

Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, Ferro A. Beta(2)-adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ. Res.* 2000; 87: 39-44.

Racasan S, Braam B, Koomans HA, Joles JA. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: The inverted barker phenomenon. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005; 288: F626-636.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 5193-5197.

Rajendran S, Chircov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. Angiotensin 1-7 enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005; 46(4): 459-463.

Rao GN & Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cells growth and proto-oncogene expression. *J. Cell Physiol.* 1992; 151(2): 361:366.

Remuzzi G, Ruggenti P. Prevention and treatment of pregnancy-associated hypertension. What have we learned in the last 10 years? *Am. J. Kid. Dis.* 1991; 18(3): 285-305.

Rentzsch B, Todiras M, Ilieuscu R, Popova E, Campos LA, Oliveira ML, Baltatu OC, Santos RAS, Bader M. Transgenic ACE2 overexpression in vessels of SHR-SP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension* 2008; 52(5): 967-973.

Resende AC, Pimentel AML, Soares de Moura R. Captopril reverses the reduced vasodilator response to bradykinin in hypertensive pregnant rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004; 31: 756-761.

Reshef R, Schwartz D, Ingbir M, Shtabsky A, Chernichovski T, Isserlin BA, Chernin G, Levo Y, Schwartz IF. A profound decrease in maternal arginine uptake provokes endothelial nitration in the pregnant rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 294: H1156-1163.

Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am. J. Physiol.* 1989; 256: H1060-H1065.

Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press. 1991;151-70.

Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1845-1851.

Sampaio WO, Castro CH, Santos RS, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin 1-7 counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 2007; 50: 1093-1098.

Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2005; 14(8): 1019-1031.

Santos RAS, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme2-angiotensin 1-7-Mas axis. *Exp. Physiol*. 2008; 93: 519-527.

Santos RAS, Simoes e Siva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100: 8258-8263.

Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos RJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2005; 14: 1019-1031.

Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediél E, de las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, Lahera V, Cachofeiro V. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2005; 288: H1111-H1115.

Scheuer DA & Perrone MH. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am. J. Physiol*. 1993; 264: R917-923.

Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1178:153-175.

Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Vanhoutte PM. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1991; 17(Suppl 7): S96-100.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox enviroment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med*. 2001; 30: 1191-1212.

Shah DM. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2005; 288: F614-F625.

Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther*. 1990; 47: 61-71.

Skeggs L Jr. Historical overview of the renin-angiotensin system. In: Hypertension and the angiotensin system: Therapeutic Approachs. New York (Doyle AE and Bearn AG eds) Reven. Press. 1984; 31-45.

Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am. J. Physiol*. 1997; 272: R441-R463.

Snyder SH & Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 1992; may: 28-35.

Soares de Moura R, Resende AC, Emiliano AF, Tano T, Mendes-Ribeiro AC, Correia ML, de Carvalho LC. The role of bradykinin, AT<sub>2</sub> and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141(5): 860-866.

Stennett AK, Qiao X, Falone AE, Koledove VV, Khalil RA. Increased vascular angiotensin type II receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296(3): H745-H755.

Steuhr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 339-59.

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 651-657.

Stralin P, Karlson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15(11): 2032-2036.

Stroth U & Unger T. The renin-angiotensin system and its receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33(Suppl): S21-28.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Versari D, Salvetti A. Endothelium, aging and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 2006; 8: 84-89.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxipeptidase. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 33238-33243.

Touyz R, Paravicini T. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. *Diabetes Care.* 2008; 31: 170-80.

Touyz RM & Schiffrin EL. Angiotensin II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999; 34: 976-982.

Touyz RM & Schiffrin EL. Effects of angiotensin II and endothelin-1 on platelet aggregation and cytosolic pH and free Ca<sup>2+</sup> concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 1993; 22: 853-862.

Touyz RM & Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell Biol.* 2004; 122: 339-352a.

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37(8): 1263-1273.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nazawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka Y. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 925-935.

Tsuzuki S, Matoba T, Eguchi S, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension* 1996; 28: 916-918.

Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomized trials. *Lancet* 2003; 362(9395): 1527-35.

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinay S, Gohlke PJ. Angiotensin receptors. *J. Hypertension* 1996; 14(Suppl): S95-103.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Ver. Bras. de Hipertensão* 2006; 13(4): 260-262.

Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009; 7: 79.

Valdes G, Neves LAA, Anton L, Corthorn J, Chacon C, German AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J. Distribution of Angiotensin 1-7 and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta.* 2006; 27(2-3): 200-207.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006; 39: 44-84.

Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J. Physiol.* 2001; 533: 329-340.

Vasta V, Meacci E, Farnararo M, Bruni P. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 1995; 206(3): 878-884.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007; 89(3): e24-e79.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme –related carboxipeptidase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 14838-14843.

Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the beth israel hospital, boston. Platelet-endothelium interactions. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 628-635.

Weiner CP, Knowles RG, Moncada S. Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994; 171: 838-843b.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium dependent nitric oxide synthase by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:5212-5216a.

Williams DJ, Vallance PJT, Neild GH, Spencer JAD, Imms FJ. Nitric oxide mediated vasodilation in human pregnancy. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: H748-H752.

Wolf D, Ziyadeh FN, Helmchen U, Zahner G, Schroeder R, Stahl RA. ANG II is a mitogen for a murine cell line isolated from medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Am. J. Physiol.* 1995; 268(5 Pt 2): F940-947.

Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1430-1442.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Griendlin K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998; 32: 488-495.



## ORIGINAL ARTICLE

## Characterization of the L-arginine–NO–cGMP pathway in spontaneously hypertensive rat platelets: the effects of pregnancy

Dayane Teixeira Ognibene, Monique Bandeira Moss, Cristiane Matsuura, Tatiana M Brunini, Roberto Soares de Moura, Antônio Cláudio Mendes-Ribeiro and Ângela de Castro Resende

Nitric oxide (NO) is a short-lived intercellular messenger that provides an efficient vascular regulatory mechanism to support homeostasis and prevent thrombosis. Endothelial dysfunction and reduced NO bioavailability have a central role in hypertension associated with pregnancy. The purpose of this study was to investigate the impact of pregnancy on the L-arginine–NO–cGMP pathway in platelets and its correlation to platelet function and blood pressure in normotensive rats and spontaneously hypertensive rats (SHRs). Platelets were obtained from blood on the 20th day of pregnancy from female SHRs (SHR-P) and normotensive controls (P) or age-matched nonpregnant rats (SHR-NP and NP). Intraplatelet NO synthase (NOS) activity was reduced in P compared to NP, despite unchanged L-arginine influx. The expression levels of endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS) were diminished during pregnancy in normotensive rats. Paradoxically, cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels were similar between NP and P, as were phosphodiesterase type 5 (PDE5) expression and platelet aggregation induced by adenosine diphosphate. In SHRs, L-arginine influx was reduced in SHR-P compared to SHR-NP. SHR-P exhibited impaired NOS activity and reduced iNOS expression compared with SHR-NP. Soluble guanylyl cyclase and PDE5 expression in platelets were lower in SHR-P than in SHR-NP, whereas no differences were noted between groups with respect to cGMP levels. However, increased levels of cGMP were observed in SHR-P compared to normotensive groups and platelet aggregability remained unaltered. In conclusion, these observations prompted the hypothesis that normal platelet aggregation in pregnant SHRs may be related to a reduction in PDE5 expression and consequently the maintenance of cGMP levels, independently of reduced platelet NO bioavailability.

*Hypertension Research* (2010) 0, 000–000. doi:10.1038/hr.2010.102

**Keywords:** blood platelets; cyclic GMP; nitric oxide; pregnancy

### INTRODUCTION

Chronic hypertension imposes a high risk of developing adverse obstetric outcomes in humans and rats, such as abruptio placenta, superimposed preeclampsia, fetal loss, preterm labor, low birth weight and perinatal death.<sup>1,2</sup> It is also well known that hypertensive patients are at a high risk of developing thrombotic events,<sup>3</sup> and it has been suggested that platelet activation together with endothelial dysfunction may provide an important link between pregnancy and hypertension.<sup>4</sup>

In human platelets, nitric oxide (NO) is formed from the cationic amino-acid L-arginine by inducible NO synthase (iNOS) and endothelial NOS (eNOS).<sup>5</sup> Extracellular L-arginine transport into human platelets is mediated by systemic  $\gamma^4L$ , which modulates NO production in these cells.<sup>6</sup> The majority of NO effects occur through a highly regulated interplay of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) formation mediated by the activation of soluble guanylyl cyclase (sGC) and degradation by phosphodiesterase type 5 (PDE5).<sup>7</sup>

Previous studies by our group have shown that a reduction in intraplatelet NO bioavailability associated with platelet hyperaggregability might be involved in thrombotic events in patients with essential hypertension<sup>8–10</sup> because NO inhibits platelet adhesion,<sup>11</sup> aggregation<sup>12</sup> and recruitment,<sup>13</sup> as well as the formation of leukocyte–platelet aggregates.<sup>14</sup>

In spontaneously hypertensive rats (SHRs), systolic blood pressure (SBP) is reduced to normal values at the end of pregnancy,<sup>15,16</sup> even though cardiac output and total blood volume are increased. This phenomenon has been associated with decreases in responsiveness to vasoconstrictor agents and systemic blood pressure.<sup>17–19</sup> It has also been suggested that there is substantial production of NO and prostacyclin by the endothelium.<sup>20</sup> Conversely, the responsiveness to vasodilators such as bradykinin is decreased in resistance arteries of pregnant SHRs<sup>21</sup> as well as in small subcutaneous arteries and myometrial resistance arteries from women with preeclampsia.<sup>22,23</sup> Because bradykinin endothelium-dependent relaxation is mediated

by NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor, these findings suggest that endothelial dysfunction may contribute to the altered vasoreactivity seen in pregnant SHRs,<sup>21</sup> to preeclampsia and to decreased placental perfusion and its associated intrauterine growth restriction.<sup>24</sup>

The endothelium has a key role in maintaining blood fluidity and in preventing thrombus formation. NO contributes to such physiological features by inhibiting platelet aggregation and adhesion and inducing vasodilation.<sup>25,26</sup> Endothelial dysfunction is widely thought to have a role in the hypertensive disease associated with pregnancy. To date, there is no evidence of the role of the L-arginine-NO-cGMP pathway in platelets and their activation in pregnant SHRs. Using SHRs as a model of pregnancy associated with preexisting hypertension, we studied the intraplatelet L-arginine-NO-cGMP pathway and its correlation with platelet function and blood pressure at the end of gestation in normotensive rats and SHRs.

## METHODS

### Animals

All experiments were reviewed and approved by the ethics committee of Animal Experiments at Rio de Janeiro State University. The experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The animals were maintained under standard conditions (12 h light/dark cycles,  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , humidity  $60 \pm 10\%$  and  $15 \text{ min h}^{-1}$  air exhaustion cycle). Twenty-week-old female Wistar normotensive rats (body weight  $212 \pm 7.2 \text{ g}$ ;  $n=7$ ) and SHRs (body weight  $200 \pm 10 \text{ g}$ ;  $n=6$ ) were matched with respective male strains, and day 1 of pregnancy was documented by the presence of spermatozoa after a vaginal smear. The animals were used at the end of pregnancy (20th day). Age-matched virgin Wistar normotensive rats (body weight  $201 \pm 4.7 \text{ g}$ ;  $n=9$ ) and SHRs (body weight  $173 \pm 6 \text{ g}$ ;  $n=6$ ) in the diestrus cycle from each group served as controls, which yielded four groups: nonpregnant normotensive rat (NP), SHR (SHR-NP), pregnant normotensive rat (P) and SHR (SHR-P). Body weight was also determined at the end of pregnancy.

### Measurement of SBP

SBP was measured by the tail-cuff method using a Leticia LE 5000 device (Panlab, Comella, Spain). Rats were trained for 2 weeks before starting the experimental protocol so that blood pressure could be recorded consistently with minimal restraint and stress to the animals. SBP was measured after mating and at 7, 14 and 20 days of pregnancy and in control nonpregnant rats; just before measurement of SBP, the rats were kept at  $30\text{--}32^\circ\text{C}$  for 15 min to render the tail artery pulsations detectable. When three consecutive blood pressure values were obtained without disturbance of the signal, SBP was recorded.

### Platelet suspension

Animals were anesthetized with thiopental ( $70 \text{ mg kg}^{-1}$ ), and blood was collected by puncture of the descending aorta, with citric acid-dextrose ( $\text{mmol l}^{-1}$ : citric acid (73.7), trisodium citrate (85.9), dextrose (111); pH 4.0) to prevent coagulation. Blood samples were centrifuged at  $200 \text{ g}$  for 15 min. The supernatant was collected and centrifuged again at  $900 \text{ g}$  for 10 min and then the pellet was resuspended in Krebs buffer ( $\text{mmol l}^{-1}$ : NaCl (119), KCl (4.6),  $\text{CaCl}_2$  (1.5),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.2),  $\text{MgCl}_2$  (1.2),  $\text{NaHCO}_3$  (15), glucose (11); pH 7.4).

### Measurement of total L-[3H]arginine influx in platelets

The platelet suspension was incubated with L-[3H]arginine ( $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), followed by two washes in Krebs buffer, centrifugation ( $2000 \text{ g}$  for 15 s) and lysis by Triton X-100 (0.1%) for  $\beta$ -scintillation counting (LS 6500 Liquid Scintillation Counter; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).<sup>27</sup>

### Measurement of platelet NOS activity

Total NOS activity was determined from the conversion of L-[3H]arginine to L-[3H]citrulline.<sup>28,29</sup> The platelet suspension was incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of L-[3H]arginine ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) for 15 min. All reactions were stopped by rapid centrifugation ( $2000 \text{ g}$ , 15 s), followed by two washes with Krebs buffer. The platelet pellet was lysed with 0.1% Triton X-100 and applied to a Dowex cation exchange resin column. The L-[3H]citrulline was eluted and radioactivity measured by liquid scintillation counting (LS 6500 Liquid Scintillation Counter; Beckman Coulter).

### Assay of platelet cGMP levels

Basal cGMP content was determined in washed platelets using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). The platelet suspension was incubated with  $200 \mu\text{mol l}^{-1}$  of 3-isobutyl-1-methylxanthine (a phosphodiesterase inhibitor) for 30 min. Ice-cold perchloric acid ( $150 \text{ mmol l}^{-1}$ ) was added to the samples, and platelets were lysed by sonication for 15 min followed by rapid freezing in liquid nitrogen. Cell debris was centrifuged at  $2000 \text{ g}$  for 10 min and supernatants containing cGMP were collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the enzyme-linked immunosorbent assay was performed.<sup>9,30,31</sup>

### Platelet aggregation protocol

Platelet aggregation was evaluated in platelet-rich plasma by optical densitometry.<sup>32</sup> First, blood samples were anticoagulated with 3.8% trisodium citrate and centrifuged at  $200 \text{ g}$  for 15 min at room temperature. Platelet-poor plasma was obtained by centrifuging the remaining blood at  $900 \text{ g}$  for 10 min. The platelet concentration in platelet-rich plasma was adjusted with platelet-poor plasma to achieve a constant count of  $250 \times 10^9$  per l. Aggregation was induced by adenosine diphosphate ( $12 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) and responses were monitored for 5 min in a four-channel optical aggregometer (Chrono-Log, Havertown, PA, USA). Tests were performed at  $37^\circ\text{C}$  with a stirring speed of  $1200 \text{ r.p.m.}$  Maximal aggregation was expressed as a percentage.

### Western blot

Platelets were isolated from the platelet-rich plasma by centrifugation, washed and lysed with lysis buffer. Protein was quantified using the BCA protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific Pierce Protein Research, Rockford, IL, USA). Amounts of  $10 \mu\text{g}$  protein were loaded on the gel, subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then transferred to polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were incubated at room temperature overnight with mouse monoclonal antibodies (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) against eNOS (1:1000) and iNOS (1:1000) or rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) against PDE5 (1:500) and sGC  $\beta_1$  subunit (1:1000). The WesternBreeze chromogenic system (Invitrogen) was used for detection of the proteins.

### Statistical analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m of measurements in 4–8 rats. Statistical analysis of all data was performed by one-way analysis of variance test, followed by Bonferroni's test, except for SBP, which was tested by a two-way analysis of variance with repeated measures. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Body weight and SBP

As expected, there was a significant increase in body weight at the end of pregnancy as compared to day 1 of pregnancy in normotensive rats ( $295.0 \pm 12.3$  vs.  $212.1 \pm 7.2 \text{ g}$ ) as well as in SHRs ( $265.0 \pm 17.4$  vs.  $200.0 \pm 10.2 \text{ g}$ ). SBP (mm Hg) measurements during the experimental period for both normotensive and hypertensive rats are shown in Table 1. The SBP was increased in SHR-NP compared to NP rats. The SBP in P rats as well as in SHR-P rats was significantly reduced at the end of pregnancy. The levels obtained from SHR-P were not significantly different from those of the normotensive groups.

Table 1 Measurements of systolic blood pressure (mm Hg)

Group	Day 1	Day 20
NP	137 ± 1.9	128 ± 3.0
P	131 ± 2.3	110 ± 2.7*
SHR-NP	182 ± 4.9†	179 ± 3.7†
SHR-P	183 ± 5.4†	128 ± 3.4*

Abbreviations: NP, nonpregnant normotensive ( $n=7$ ); P, pregnant normotensive ( $n=8$ ); SHR-NP, nonpregnant spontaneously hypertensive rat ( $n=6$ ); SHR-P, pregnant SHR ( $n=6$ ).

\* $P < 0.05$  compared to day 1.

† $P < 0.05$  compared to NP and P on the same day of measurement.

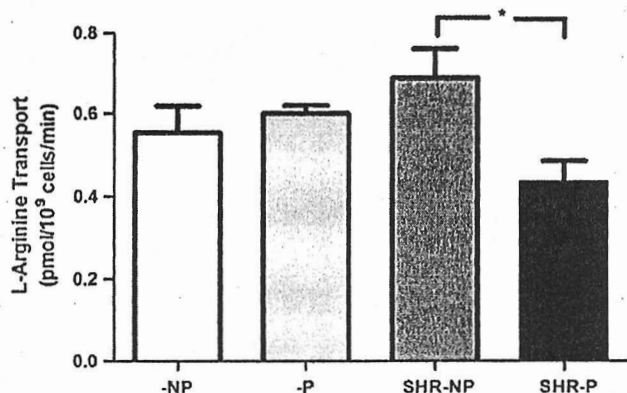


Figure 1 L-[3H]arginine transport in platelets from normotensive nonpregnant (NP;  $n=7$ ) and pregnant (P;  $n=8$ ) or hypertensive nonpregnant (SHR-NP;  $n=8$ ) and pregnant (SHR-P;  $n=5$ ) rats. Values are reported as mean ± s.e.m. (\* $P < 0.05$ ).

#### Total L-[3H]arginine transport in platelets

Total L-arginine transport in platelets is mainly mediated by system  $y^+L$  and diffusion. System  $y^+L$  transports cationic amino acids independent of  $Na^+$  (for example, L-lysine and L-arginine) and neutral amino acids in the presence of  $Na^+$  (for example, L-leucine) with high affinity, as described in classic experiments on human red blood cells and platelets.<sup>27,33</sup>

Total L-[3H]arginine influx in platelets from SHR-P was significantly reduced when compared to SHR-NP rats, but no differences were observed between platelets from NP and P rats. L-[3H]arginine transport in platelets from SHR-NP was not significantly different from that in NP rats (Figure 1).

#### Basal activity and expression of eNOS and iNOS in platelets

Platelets from P and SHR-P rats showed decreased NOS activity, as measured by the conversion of L-[3H]arginine to L-[3H]citrulline, when compared to NP and SHR-NP rats, respectively. NOS activity in platelets from SHR-NP was not significantly different from that observed in NP rats (Figure 2a). In normotensive animals, there was a significant decrease in platelet eNOS expression at day 20 of pregnancy. SHR-NP had a lower expression of eNOS in platelets than NP, but no significant change was observed for platelet eNOS expression in SHR-P as compared to SHR-NP (Figure 2b). The inducible isoform of NOS expression was decreased in platelets from P compared to NP rats. Similarly, in the SHR-P animals as compared to SHR-NP, a significant reduction in iNOS was observed. iNOS expression did not differ between the NP and SHR-NP groups (Figure 2c).

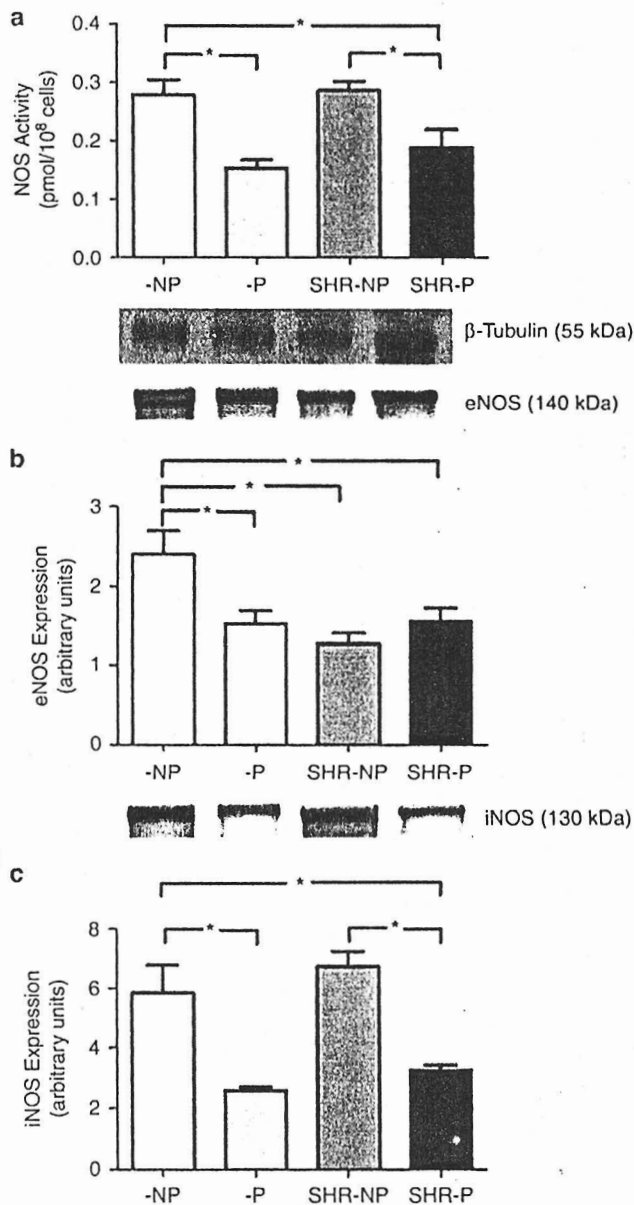


Figure 2 Total NOS activity (a), eNOS expression (b) and iNOS expression (c) in platelets from normotensive nonpregnant (NP;  $n=7$ ) and pregnant (P;  $n=8$ ) or hypertensive nonpregnant (SHR-NP;  $n=8$ ) and pregnant (SHR-P;  $n=5$ ) rats. Values are reported as mean ± s.e.m. (\* $P < 0.05$ ).

#### Intraplatelet cGMP levels and expression of sGC and PDE5

Intraplatelet cGMP levels did not differ among NP, P and SHR-NP groups. However, cGMP levels were increased in the SHR-P group compared to the normotensive groups but not to the SHR-NP group (Figure 3a). Expression levels of sGC (Figure 3b) and PDE5 (Figure 3c) were increased in the SHR-NP group as compared to NP and P rats. Pregnancy decreased the expression of both sGC and PDE5 in SHR rats.

#### Platelet aggregation

Platelet aggregation in platelet-rich plasma was induced by adenosine diphosphate and responses were monitored for 5 min. There was

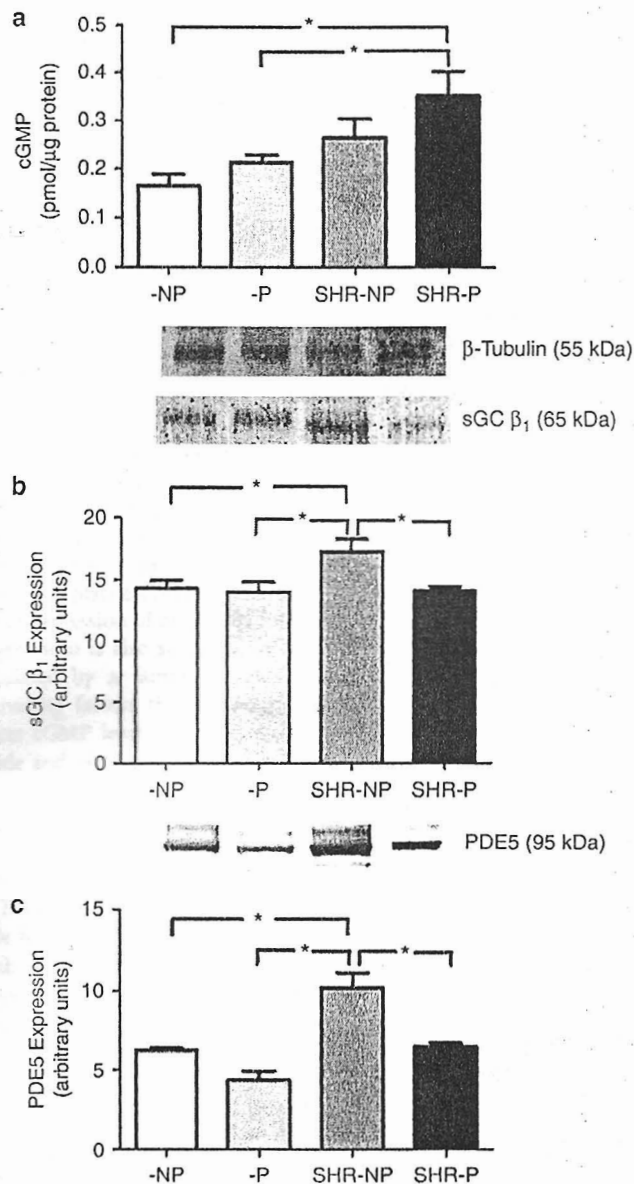


Figure 3 Basal cGMP levels (a), sGC expression (b) and PDE5 expression (c) in platelets from normotensive nonpregnant (NP;  $n=3-4$ ) and pregnant (P;  $n=3-5$ ) or hypertensive nonpregnant (SHR NP;  $n=3-4$ ) and pregnant (SHR P;  $n=3-4$ ) rats. Values are reported as mean  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ ).

no significant difference in platelet aggregation among the groups (Figure 4).

## DISCUSSION

This study investigated the impact of pregnancy on the L-arginine-NO-cGMP pathway in platelets from SHRs. The results show that, despite an inhibition of the intraplatelet L-arginine-NO pathway, platelet aggregation from pregnant hypertensive rats remained normal, which may be due to increased cGMP levels and decreased PDE5 expression.

Initially, we found that in normotensive and hypertensive rats, blood pressure was reduced at the end of pregnancy. The levels obtained from pregnant hypertensive rats were not significantly

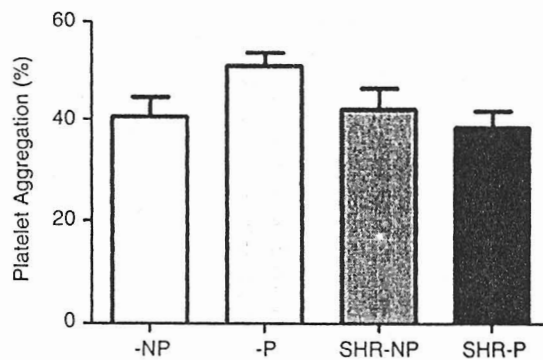


Figure 4 Platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) ( $12 \mu\text{M}$ ) from normotensive nonpregnant (NP;  $n=7$ ) and pregnant (P;  $n=7$ ) or hypertensive nonpregnant (SHR-NP;  $n=8$ ) and pregnant (SHR-P;  $n=8$ ) rats. Values are reported as mean  $\pm$  s.e.m.

different from those obtained from the normotensive groups, which were in agreement with previous findings.<sup>15,16,21</sup> These results might be partially explained by an increased production of NO and prostacyclin from vascular endothelium<sup>20</sup> and a hyporeactivity to vasoconstrictors,<sup>34</sup> which may contribute to vasodilation and consequent reduction in peripheral vascular resistance. Although a specific role for NO in the induction of hemodynamic alterations in pregnancy is somewhat controversial, it is widely accepted that an excess of NO is generated by endothelial cells during normal pregnancy.<sup>35,36</sup>

Several studies have investigated L-arginine metabolism at gestation, but there was no evidence of NO synthesis in rat platelets. This is the first evidence that rat platelets, similar to human platelets, constitutively express both eNOS and iNOS, which actively generate NO from the semi-essential amino-acid L-arginine. Previous observations support a role for platelet-derived NO production in antiplatelet aggregation and adhesion properties.<sup>37</sup> The first step for NO production is the cellular uptake of L-arginine through amino-acid transporter systems.<sup>38</sup> Results from our study showed that total L-arginine transport and NOS activity were decreased in platelets from pregnant hypertensive rats as compared to nonpregnant hypertensive rats. Recent evidence has come to light that maternal aortic L-arginine uptake is profoundly attenuated in pregnancy, and the researchers of that study assume that rather than supplying its own endothelium, maternal L-arginine stores are depleted due to a preferential shift to the fetus.<sup>39</sup> These data could explain the reduction in L-arginine transport in platelets from pregnant hypertensive rats. Both influx and availability of intracellular L-arginine are limiting factors in NO production.<sup>40</sup> Therefore, it is possible that the reduced enzyme activity observed here is related to reduced levels of substrate together with decreased expression of iNOS. Nevertheless, we observed higher production of cGMP and no change in platelet aggregation during pregnancy in the hypertensive condition compared to the normotensive condition. Despite decreased activity of the L-arginine transporter and NOS, and the reduced expression of sGC, responsible for converting GTP in cGMP, one of the factors that could contribute to the increased cGMP levels is the reduction in PDE5 protein expression, an enzyme responsible for cGMP metabolism. There is evidence that oxidative stress markers are increased in maternal blood, urine, placenta and placental trophoblast cells, and that this state of oxidative stress is heightened in pregnancies complicated by preeclampsia and intrauterine growth restriction.<sup>41</sup> These findings suggest that pregnancy *per se* is a state of oxidative stress due to the high metabolic activity

of the placenta and the maternal metabolism during pregnancy. However, there are few reports about oxidative damage in pregnant SHRs associated with the preexisting hypertension that persists mid-way through pregnancy. There is recent evidence that the increased proinflammatory and oxidative markers (malondialdehyde content and protein nitrosylation) seen in SHRs are greatly ameliorated by pregnancy.<sup>16</sup> Together with changes in the renin-angiotensin system in the kidney, reduction of oxidative markers seems to contribute to the reduction of blood pressure near term in SHRs, as observed in our study. Future studies on oxidative stress in pregnant SHRs should be carried out in other tissues and platelets to support the hypothesis that a decrease in oxidative stress near term may contribute to the maintenance of NO and cGMP bioavailability.

Total L-arginine transport was maintained during pregnancy in the normotensive condition. However, similar to hypertensive rats, NOS activity, measured by the conversion of L-arginine to L-citrulline, was reduced. In addition, we observed that the expression of eNOS and iNOS isoforms was reduced in normal pregnancy. Aside from an apparent decrease in NO production, cGMP levels and platelet aggregation were not affected in this group. Therefore, reduced activity of NOS in platelets from normotensive pregnant rats may be related to lower expression of both NOS isoforms. Nevertheless, normal platelet aggregation is also sustained by unaltered cGMP levels. sGC is also regulated by a family of enzymatically formed guanylyl cyclase-activating factors that includes carbon monoxide and OH<sup>-</sup>, which affect cGMP levels. Previous studies have shown that carbon monoxide and NO have similar effects on platelet aggregation,<sup>42</sup> vascular smooth muscle function and intracellular cGMP levels. OH<sup>-</sup> was suggested to function as a physiological mediator of endothelium-dependent relaxation.<sup>43</sup> Thus, aside from NO, both carbon monoxide and OH<sup>-</sup> may represent potential mediators of platelet function.

The interaction of NOS with a variety of proteins has an important role in regulating NO production. One of the proteins that interacts with NOS is heat shock protein 90, which appears to have an important role in the function and stability of the enzyme.<sup>44</sup> However, degradation of NOS has been proposed as a regulatory mechanism to prevent the toxic effects of this compound in conditions of high NO production<sup>45,46</sup> and appears to be associated with less interaction with heat shock protein 90.<sup>47</sup> As pregnancy is characterized by high NO production, mainly by endothelial cells, an excess of this compound could lead to degradation of NOS isoforms in platelets. Thus, reduced expression of NOS promotes reduced enzyme activity and consequently decreased intraplatelet NO production. Another possibility is that the increase of NO and prostacyclin production in pregnancy by endothelium<sup>48</sup> could participate in the maintenance of normal aggregation, even in the presence of reduced intraplatelet NO production. Therefore, even though the L-arginine pathway is inhibited in pregnancy with a consequent decrease in production of endogenous NO, there is probably compensation for the NO produced by endothelial cells.

Platelet antagonists inhibit platelet function by increasing intracellular levels of the cyclic nucleotides cAMP and cGMP through the activation of the respective cyclases. Cyclic nucleotide levels are downregulated by phosphodiesterase-mediated degradation. Platelets contain mainly PDE3, which preferentially hydrolyzes cAMP as a substrate, and PDE5, which preferentially catalyzes the breakdown of cGMP.<sup>49</sup> In addition, the effects of cGMP could involve the modulation of cAMP levels and PKA activity through inhibition of cAMP-hydrolyzing PDE3 activity.<sup>50</sup>

Finally, NO-independent mechanisms of cGMP formation in response to platelet agonists have been recently described,<sup>51</sup> which

supports NO-mediated activation of cGMP in human platelets. These studies provide evidence that sGC can be activated independently of increased NO synthesis in response to the platelet activator adipo-nectin, leading to elevated cGMP levels and activation of cGMP-protein kinase G. The platelet cGMP signaling cascade seems to be activated by a novel tyrosine kinase-dependent mechanism in the absence of NO. Therefore, this novel mechanism may also explain the maintenance of cGMP levels in normal pregnancy or the increased production of cGMP associated with hypertension.

In conclusion, this study provides evidence for an active L-arginine-NO-cGMP pathway in rat platelets. Moreover, pregnancy decreases L-arginine transport, NOS activity and iNOS expression in platelets from hypertensive rats as compared to nonpregnant hypertensive rats. Despite reduced platelet NO bioavailability in pregnant hypertensive rats, platelet aggregability remains unaltered, which may be related to increased levels of cGMP and reduced expression of PDE5. This research provides new insights into the complex pathophysiology of gestational hypertension.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported, in part, by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and the Rio de Janeiro State Research Agency (FAPERJ).

- Sibai BM. Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002; **100**: 369-377.
- Fernandez CL, Carbajo RM, Munoz RM. Intrauterine growth restriction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Pregnancy* 2004; **23**: 275-283.
- Poli KA, Toller GH, Larson MG, Evans JC, Sutherland PA, Lipinska I, Mittleman MA, Muller JE, D'Agostino RB, Wilson PW, Levy D. Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the framingham offspring population. *Circulation* 2000; **101**: 264-269.
- Kakar P, Lip GY. Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; **5**: 441-450.
- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006; **176**: 213-254.
- Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Ellory JC, Mann GE. Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: a role for L-arginine supplementation in vascular protection? *Cardiovasc Res* 2007; **73**: 359-367.
- Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koelsing D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long term effects within NO-cGMP signaling. *J Cell Biol* 2003; **160**: 719-727.
- Brunini T, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozentul A, Mann G, Ellory J, Soares de Moura R, Mendes-Ribeiro A. Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-L-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; **31**: 738-740.
- de Meirelles LR, Mendes-Ribeiro AC, Mendes MA, da Silva MN, Ellory JC, Mann GE, Brunini TM. Chronic exercise reduces platelet activation in hypertension: upregulation of the L-arginine-nitric oxide pathway. *Scand J Med Sci Sports* 2009; **19**: 67-74.
- Moss MB, Brunini TM, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2004; **107**: 391-397.
- Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, Ferro A. Beta(2)-adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res* 2000; **87**: 39-44.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5193-5197.
- Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keane JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997; **100**: 350-356.
- Chung AW, Radomski A, Alonso-Escobedo D, Jurasz P, Stewart MW, Malinski T, Radomski MW. Platelet-leukocyte aggregation induced by par agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases. *Br J Pharmacol* 2004; **143**: 845-855.
- Racasan S, Braam B, Koomans HA, Joles JA. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted barker phenomenon. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**: F626-F636.
- Iacono A, Bianco G, Malface Raso G, Esposito E, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Cuzzocrea S, Calignano A, Autore G, Meli R. Maternal adaptation in

- pregnant hypertensive rats: improvement of vascular and inflammatory variables and oxidative damage in the kidney. *Am J Hypertens* 2009; 22: 777-783.
- 17 Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol* 1984; 247: H100-H108.
  - 18 Coelho EB, Ballejo G, Salgado MC. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. *Hypertension* 1997; 30: 585-588.
  - 19 Ballejo G, Barbosa TA, Coelho EB, Antoniali C, Salgado MC. Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. *Life Sci* 2002; 70: 3131-3142.
  - 20 Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med* 1993; 328: 628-635.
  - 21 Resende AC, Pimentel AML, Soares de Moura R. Captopril reverses the reduced vasodilator response to bradykinin in hypertensive pregnant rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 756-761.
  - 22 Knock GA, Poston L. Bradykinin-mediated relaxation of isolated maternal resistance arteries in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1668-1674.
  - 23 Ashworth JR, Baker PN, Warren AY, Johnson JR. Mechanisms of endothelium-dependent relaxation in myometrial resistance vessels and their alteration in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1999; 18: 57-71.
  - 24 Gilham JC, Kenny LC, Baker PN. An overview of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in normal and compromised pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109: 2-7.
  - 25 Lüscher TF. Platelet-vessel wall interaction: role of nitric oxide, prostaglandins and endothelins. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 609-627.
  - 26 Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost* 1993; 70: 36-41.
  - 27 Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Yaqoob M, Aronson JK, Mann GE, Ellory JC. Identification of system y+L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. *Plugers Arch* 1999; 438: 573-575.
  - 28 Morris HR, Morris HR, Etienne AT, Panico M, Tippins JR, Alagband-Zadeh J, Holland SM, Mehdizadeh S, de Belleruche J, Das I, Khan NS, de Wardener HE. Hypothalamic hypertensive factor: an inhibitor of nitric oxide synthase activity. *Hypertension* 1997; 30: 1493-1498.
  - 29 O'Kane P, Xie L, Liu Z, Queen L, Jackson G, Ji Y, Ferro A. Aspirin acetylates nitric oxide synthase type 3 in platelets thereby increasing its activity. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 123-130.
  - 30 Burkhardt M, Glazova M, Gambaryan S, Vollkommer T, Butt E, Bader B, Heermeier K, Lincoln TM, Waller U, Palmelshofer A. KT5823 inhibits cGMP dependent protein kinase activity *in vitro* but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 33536-33541.
  - 31 Halvey EJ, Vernon J, Roy B, Garthwaite J. Mechanisms of activity-dependent plasticity in cellular nitric oxide-cGMP signaling. *J Biol Chem* 2009; 284: 25630-25641.
  - 32 Paul W, Queen LR, Page CP, Ferro A. Increased platelet aggregation *in vivo* in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 105-111.
  - 33 Devés R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (y+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol* 1992; 454: 491-501.
  - 34 Brosnihan KB, Neves LAA, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol* 2004; 37: 1255-1262.
  - 35 Norris LA, Higgins JR, Darling MR, Walshe JJ, Bonnar J. Nitric oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulations in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 958-963.
  - 36 Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006; 27: 438-444.
  - 37 Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
  - 38 Devés R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998; 78: 487-545.
  - 39 Reshef R, Schwartz D, Ingbir M, Shtabsky A, Chernichovski T, Isserlin BA, Chernin G, Levo Y, Schwartz IF. A profound decrease in maternal arginine uptake provokes endothelial nitration in the pregnant rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H1156-H1163.
  - 40 Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C, Toutouzas P. Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2001; 154: 255-267.
  - 41 Myatt L. Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010; 31(Suppl): S66-S69.
  - 42 Brune B, Ulrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987; 32: 497-504.
  - 43 Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1178: 153-175.
  - 44 Presley T, Vedam K, Velayutham M, Zweier JL, Ilangovan G. Activation of HSP90-eNOS and increased NO generation attenuate respiration of hypoxia-treated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C1281-C1291.
  - 45 Bender AT, Demady DR, Osawa Y. Ubiquitination of neuronal nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 2000; 275: 17407-17411.
  - 46 Musial A, Eissa NT. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 24268-24273.
  - 47 Averna M, Stifanese R, De Tullio R, Salamino F, Bertuccio M, Pontremoli S, Melloni E. Proteolytic degradation of nitric oxide synthase isoforms by calpain is modulated by the expression levels of hsp90. *FEBS J* 2007; 274: 6116-6127.
  - 48 Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Ericcs R, Brosnihan KB, Joyner Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 79.
  - 49 Haslam RJ, Dickinson NT, Jang EK. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb Haemost* 1999; 82: 412-423.
  - 50 Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* 2001; 533: 329-340.
  - 51 Riba R, Patel B, Aburima A, Naseem KM. Globular adiponectin increases cGMP formation in blood platelets independently of nitric oxide. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2121-2131.