



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

Alexandre de Souza da Silva

Efeito do extrato do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no desenvolvimento da hipertensão e da disfunção endotelial em modelo experimental de pré-eclâmpsia

Rio de Janeiro

2018

Alexandre de Souza a Silva

Efeito do extrato do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no desenvolvimento da hipertensão e da disfunção endotelial em modelo experimental de pré-eclâmpsia

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene
Coorientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2018

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

S586 Silva, Alexandre de Souza da.
Efeito do extrato do caroço de açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) no desenvolvimento da hipertensão e da disfunção endotelial em modelo experimental de pré-eclâmpsia / Alexandre de Souza da Silva. – 2018.
92 f.

Orientadora: Dayane Teixeira Ognibene.
Coorientadora: Angela de Castro Resende.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Açaí – Uso terapêutico – Teses. 2. Hipertensão - Teses. 3. Pré-eclâmpsia - Teses. 4. Endotélio – Fisiopatologia - Teses. I. Ognibene, Dayane Teixeira. II. Resende, Angela de Castro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88:616.12-008.331.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Alexandre de Souza da Silva

Efeito do extrato do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no desenvolvimento da hipertensão e da disfunção endotelial em modelo experimental de pré-eclâmpsia

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de julho de 2018

Coorientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Caroline Fernandes dos Santos Bottino

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Marlete e a minha esposa Camila, que sempre me apoiaram e acreditaram nesse sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre esteve ao meu lado nos momentos de dificuldades, me dando forças, incentivo e apoio incondicional. À minha esposa Camila, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência destinados aos estudos durante minha caminhada. À minha mãe, que mesmo nas dificuldades, sempre me ofereceu condições de seguir na batalha.

À Prof^a. Dr^a. Dayane Teixeira Ognibene pela oportunidade, ensinamentos, paciência e empenho em me orientar, tornando possível a elaboração deste trabalho.

Às professoras Dr^a Angela de Castro Resende e Dr^a Cristiane Aguiar da Costa, pelos ensinamentos e apoio durante todo o período de trabalho no laboratório.

À Lenize Costa dos Reis Carvalho, pela grande colaboração no trabalho e astral contagiante que não deixa ninguém desanimar.

À Grazielle Freitas de Bem, pelos ensinamentos e toda colaboração no desenvolver dos trabalhos.

A todos os amigos e colegas do LFCPM: Anicett Okinga, Douglas Val Quintans, Thamires Barros, Matheus Pontes, Beatriz Cardoso, Matheus Henrique, Dafne Lopes, Julia Melo, Amanda Medeiros, Ricardo Soares, Michelle Gomes, Izabelle Barcelos, Viviane Cristino, Cristiane Santino, Jéssica Blanco, Lúcia Alves, Letícia Lopes, pelo ensinamentos e convívio amigo e prazeroso.

A todos que de alguma forma, contribuíram para que eu conseguisse chegar até o final desse curso.

Finalmente, o maior agradecimento a Deus, é dele todas as vitórias alcançadas em minha vida.

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

Marcel Proust

RESUMO

SILVA, Alexandre de Souza da. *Efeito do extrato do caroço de açaí (Euterpe oleracea Mart.) no desenvolvimento da hipertensão e da disfunção endotelial em modelo experimental de pré-eclâmpsia*. 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A pré-eclâmpsia (PE) complica em torno de 5% das gestações e é a principal causa de morbimortalidade materna e fetal. A administração de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) durante a gravidez de roedores constitui um modelo farmacológico de PE, que apresenta hipertensão, proteinúria e disfunção endotelial materna, bem como restrição do crescimento fetal. Estudos do nosso grupo evidenciam que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) é rico em polifenóis e apontam para suas ações antioxidante, vasodilatadora e anti-hipertensiva. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos preventivos do ASE sobre as alterações cardiovasculares que acompanham a PE experimental. A PE foi induzida em ratas Wistar grávidas (3 meses) pela administração de L-NAME (60mg/Kg/dia), do 13º ao 20º dia de gestação. Ainda, foram avaliados os efeitos do tratamento concomitante com ASE (200mg/Kg/dia) sobre as alterações cardiovasculares induzidas neste modelo. Foram utilizados 4 grupos experimentais: L-NAME; L-NAME+ASE; Controle; Controle+ASE. A pressão arterial (PA) foi aferida uma vez por semana por pletismografia de cauda. A microalbuminúria foi avaliada em urina de 24h, coletada no 19º dia de gestação. No 20º dia, as ratas foram anestesiadas com tiopental (50mg/Kg ip), o número e o peso dos fetos vivos, assim como a massa placentária total foram avaliados, foi realizada a coleta de sangue para análises bioquímicas, e o leito arterial mesentérico (LAM) foi isolado e acoplado a um sistema de perfusão de órgãos para avaliação da sua reatividade a substâncias vasoativas. O dano oxidativo a atividade das enzimas antioxidantes foram avaliados no plasma e em homogenato de LAM. Os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatória e do fator anti-angiogênico sFLT1 também foram avaliados. A expressão proteica da eNOS total e eNOS fosforilada (ser1177) foi avaliada no LAM por Western Blotting. Os resultados demonstraram que o ASE previne o desenvolvimento da hipertensão e a microalbuminúria neste modelo, bem como a redução da massa placentária e a restrição do crescimento fetal ($p < 0,05$). O ASE também preveniu a redução da resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina, bradicinina e angiotensina II no LAM pré-contráído com norepinefrina na PE experimental ($p < 0,05$). Ainda, o tratamento preveniu parcialmente o aumento da resposta vasoconstritora induzida pela angiotensina II ($p < 0,05$), mas não da noradrenalina neste modelo. O dano oxidativo plasmático, avaliado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (TBARS), apresentou-se aumentado no grupo L-NAME comparado ao controle e o ASE preveniu este aumento ($p < 0,05$). A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) não foram diferentes entre os grupos em amostras de plasma. Por outro lado, os níveis de TBARS foram menores no LAM do grupo L-NAME ($p < 0,05$) e o ASE não modificou este parâmetro, enquanto os níveis de carbonil no LAM não diferiram entre os grupos. A atividade das enzimas CAT e GPx estavam diminuídas no LAM dos grupos L-NAME e L-NAME+ASE ($p < 0,05$), enquanto a atividade da SOD não diferiu entre os grupos. A expressão proteica de eNOS total e sua forma fosforilada, bem como os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e de sFlt1 não diferiram entre os grupos. Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento com ASE previne o desenvolvimento da hipertensão e a restrição do crescimento fetal na PE experimental induzida pelo L-NAME. Os efeitos benéficos podem ser atribuídos, pelo menos em parte, a sua ação antioxidante e a melhora da disfunção endotelial neste modelo.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia. Hipertensão. Disfunção endotelial. Açaí.

ABSTRACT

SILVA, Alexandre de Souza da. *Effect of hydroalcoholic extract of the açai seed (Euterpe oleracea Mart.) on development of hypertension and endothelial dysfunction in experimental model of preeclampsia*. 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Preeclampsia (PE) complicates around 5% of pregnancies and is the main cause of maternal and fetal morbidity and mortality. The administration of L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) during rodent pregnancy constitutes a pharmacological model of PE, which presents hypertension, proteinuria and maternal endothelial dysfunction, as well as restriction of fetal growth. Studies of our group showed that the hydroalcoholic extract of the açai seed (ASE) is rich in polyphenols and points to its antioxidant, vasodilator and antihypertensive actions. This study aims to investigate the preventive effects of ASE on the cardiovascular changes that accompany the experimental PE. The PE was induced in pregnant Wistar rats (3 months) by the administration of L-NAME (60mg / kg / day), from 13th to the 20th day of gestation. We evaluated the effects of concomitant treatment with ASE (200 mg/kg/ day) on cardiovascular changes induced in this model. Four experimental groups were used: L-NAME; L-NAME + ASE; Control; Control + ASE. Blood pressure (BP) was measured once a week by tail plethysmography. Microalbuminuria was evaluated in 24-hour urine, collected on the 19th day of gestation. On day 20, rats were anesthetized with thiopental (50 mg / kg ip), number and weight of live fetuses, as well as total placental mass were evaluated, blood collection was performed for biochemical analyzes, and the mesenteric arterial bed (MAB) was isolated and coupled to an organ perfusion system to evaluate its reactivity to vasoactive substances. Oxidative damage and antioxidant enzyme activity was evaluated in plasma and MAB homogenate. Plasma levels of pro-inflammatory cytokines and anti-angiogenic factor sFLT1 were also evaluated. Protein expression of total eNOS and phosphorylated eNOS (ser1177) was evaluated in MAB by Western blotting. The results showed that ASE prevent the development of hypertension and microalbuminuria in this model, as well as the reduction of placental mass and restriction of fetal growth ($p < 0.05$). ASE also prevented the reduction of the vasodilatory response induced by acetylcholine, bradykinin and angiotensin II in pre-contracted MAB with norepinephrine in the experimental PE ($p < 0.05$). Furthermore, the treatment prevented partially the increase vasoconstrictor response induced by angiotensin II ($p < 0.05$) - but not of noradrenaline in this model. Plasma oxidative damage, evaluated by the formation of lipid peroxidation byproducts (TBARS), was increased in the L-NAME group compared to the control and the ASE prevented this increase ($p < 0.05$). The activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were not different between the groups in plasma samples. On the other hand, the levels of TBARS were lower in MAB of the L-NAME group ($p < 0.05$) and the ASE did not modify this parameter, whereas the carbonyl levels in the MAB did not differ between groups. The activity of the CAT and GPx enzymes were decreased in MAB of the L-NAME and L-NAME + ASE groups ($p < 0.05$), whereas the SOD activity did not differ between groups. Protein expression of total eNOS and its phosphorylated form, as well as plasma levels of pro-inflammatory cytokines and sFlt1 did not differ between groups. The results of the present study demonstrated that ASE treatment prevents the development of hypertension and restriction of fetal growth in PE experimental induced by L-NAME. The beneficial effects can be attributed, at least in part, to its antioxidant action and the improvement of endothelial dysfunction in this model.

Keywords: Preeclampsia. Hypertension. Endothelial dysfunction. Açai.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Classificação da pressão arterial de acordo com a 7ª diretriz brasileira de hipertensão arterial (2016).....	15
Quadro 2 –	Classificação da pressão arterial de acordo com a diretriz da Journal of the American College of Cardiology (2017).....	15
Figura 1 –	Placentação na gestação normal.....	18
Figura 2 –	Placentação anormal ocorrida na pré-eclâmpsia.....	19
Figura 3 –	Homeostase vascular em níveis fisiológicos de VEGF e TGF- β 1 e inibição de VEGF e TGF- β 1 causada pela secreção em excesso de sFLT1 e sENG.....	20
Figura 4 –	Via L-Arginina-óxido nítrico.....	26
Figura 5 –	Vias de formação de espécies reativas e o sistema antioxidante.....	28
Figura 6 –	Representação do equilíbrio entre oxidantes e defesa antioxidante.....	31
Figura 7 –	Ilustração da pletismografia de cauda.....	37
Figura 8 –	Sistema de perfusão de órgãos.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Pressão arterial sistólica, diastólica e média.....	46
Gráfico 2 –	Massa corporal materna.....	47
Gráfico 3 –	Volume urinário, creatinina e ureia na urina.....	48
Gráfico 4 –	Microalbuminúria materna.....	49
Gráfico 5 –	Níveis plasmáticos de ureia e creatinina.....	50
Gráfico 6 –	Número e massa dos filhotes vivos e massa placentária total.....	51
Gráfico 7 –	Resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina.....	54
Gráfico 8 –	Resposta vasoconstritora induzida pela angiotensina II.....	54
Gráfico 9 –	Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina.....	56
Gráfico 10 –	Resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina.....	56
Gráfico 11 –	Resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina.....	57
Gráfico 12 –	Resposta vasodilatadora induzida pela angiotensina II.....	57
Gráfico 13 –	Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	58
Gráfico 14 –	Níveis de Carbonilação proteica.....	59
Gráfico 15 –	Atividade da superóxido dismutase.....	60
Gráfico 16 –	Atividade da Catalase.....	61
Gráfico 17 –	Atividade da glutatona peroxidase.....	62
Gráfico 18 –	Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias.....	63
Gráfico 19 –	Níveis plasmáticos de sFLT1.....	64
Gráfico 20 –	Expressão de p-eNOS ^(ser 1177) /eNOS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas, do inglês <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ACh	Acetilcolina
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ASE	Extrato do caroço de açaí, do inglês <i>Açaí Stone Extract</i>
AT ₁ -AA	Auto-Anticorpo contra receptores AT ₁
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BK	Bradicinina
CAT	Catalase
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva, do inglês <i>Constitutive Nitric Oxide Synthase</i>
DAP	Doença Arterial Periférica
DCV	Doenças Cardiovasculares
E	Eclâmpsia
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio, do inglês <i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i>
Eng	Endoglina
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial, do inglês <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMN	Flavina Mononucleotídeo
GC	Guanilato Ciclase
GMPC	Monofosfato Cíclico de Guanosina, do inglês <i>Guanosine Monophosphate Cyclic</i>

GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC	Hipertensão Arterial Crônica
IAM	Infarto agudo do miocárdio
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível, do inglês <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LAM	Leito Arterial Mesentérico
L-NAME	Cloridrato de N- ω -nitro-L-arginina Metil Ester
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
NG	Nitroglicerina
NHA	N ^G -hidroxi-L-arginina
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal, do inglês <i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Óxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
NOR	Noradrenalina
NOS	Óxido Nítrico Sintases, do inglês <i>Nitric Oxide Synthase</i>
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Superóxido
OH	Radical Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAI-1	Inibidor 1 do Ativador do Plasminogênio, do inglês <i>Plasminogen activator Inhibitor – 1</i>
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PE	Pré-Eclâmpsia
PGH ₂	Prostaglandina H2
PIGF	Fator de Crescimento Placentário
PKG	Proteína Quinase dependente de GMPC

RCIU	Restrição do Crescimento Intrauterino
sEng	Endoglina Solúvel
sFLT1	Forma solúvel do receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês <i>Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, do inglês <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformador beta 1, do inglês <i>transforming growth factor – β1</i>
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular, do inglês <i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>
XO	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	34
1.1	Objetivo geral	34
1.2	Objetivos específicos	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1	Preparação do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	35
2.2	Animais	35
2.3	Medida dos parâmetros hemodinâmicos	36
2.4	Coleta de urina de 24h e análises bioquímicas	37
2.5	Eutanásia	37
2.6	Análises bioquímicas no plasma	38
2.7	Isolamento do leito arterial mesentérico	38
2.8	Reatividade do leito arterial mesentérico às substâncias vasoativas	39
2.8.1	<u>Resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (NOR) e angiotensina II (Ang II)</u>	40
2.8.2	<u>Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (Ach), nitroglicerina (NG), angiotensina II (Ang II) e bradicinina (BK)</u>	40
2.9	Ensaio pró-oxidantes	40
2.9.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u>	40
2.9.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	41
2.10	Atividade das enzimas antioxidantes	42
2.10.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u>	42
2.10.2	<u>Medida da catalase</u>	42
2.10.3	<u>Medida da glutathione peroxidase</u>	43
2.11	Análise dos níveis de proteínas por western blotting	43
2.12	Análise estatística	44
3	RESULTADOS	45
3.1	Pressão arterial sistólica, diastólica e média durante o período gestacional ..	45
3.2	Massa corporal materna no período gestacional	47

3.3	Análises bioquímicas na urina de 24h no final do período gestacional.....	48
3.3.1	<u>Volume urinário, creatinina e ureia</u>	48
3.3.2	<u>Microalbuminúria</u>	49
3.4	Níveis plasmáticos de ureia e creatinina	50
3.5	Número e massa dos filhotes vivos e massa placentária total	51
3.6	Reatividade do leito arterial mesentérico à substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras	53
3.6.1	<u>Resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (NOR) e angiotensina II (Ang II)</u>	53
3.6.2	<u>Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (Ach), nitroglicerina (NG), bradicinina (BK), e angiotensina II (Ang II)</u>	55
3.7	Dano oxidativo em plasma e leito arterial mesentérico	58
3.7.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u>	58
3.7.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	59
3.8	Atividade de enzimas antioxidantes em plasma e leito arterial mesentérico..	60
3.8.1	<u>Superóxido dismutase (SOD)</u>	60
3.8.2	<u>Catalase (CAT)</u>	61
3.8.3	<u>Glutathione peroxidase (GPx)</u>	62
3.9	Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias	63
3.10	Níveis plasmáticos do fator antiangiogênico sFLT1.....	64
3.11	Expressão proteica de eNOS e p-eNOS^(Ser 1177)	65
4	DISCUSSÃO.....	66
	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada pela elevação dos valores de pressão arterial de maneira sustentada, sendo considerado hipertenso o indivíduo que apresenta pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mm Hg e diastólica (PAD) ≥ 90 mm Hg (MALACHIAS et al., 2016). A pressão arterial em adultos é ainda classificada em 5 categorias, considerando los níveis pressóricos (Quadro 1). Essa categorização é importante para tomada de decisão na prática clínica e elaboração de políticas de saúde pública.

Quadro 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a 7ª diretriz brasileira de hipertensão arterial (2016)

Classificação	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)
Normal	≤ 120	≤ 80
Pré-hipertensão	121 - 139	81 - 89
Hipertensão estágio 1	140 - 159	90 - 99
Hipertensão estágio 2	160 - 179	100 - 109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110

Recentemente, a *American College of Cardiology* atualizou a classificação de pressão arterial (PA) em adultos, baseando-se em dados que relatam o aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) em níveis pressóricos antes considerados normais. Isso permite uma abordagem atualizada no controle da pressão, seja pela mudança no estilo de vida quando em PA elevada, ou pela opção de tratamento farmacológico em condição de estágio 1 de hipertensão associado ao risco aumentado de DCV. Assim, a PA passou a ser categorizada em 4 níveis baseando-se nas médias da PAS e PAD medidas em ambiente hospitalar (Quadro 2) (WHELTON et al., 2018).

Quadro 2 - Classificação da pressão arterial de acordo com a diretriz para prevenção, detecção, avaliação e manejo da pressão arterial em adultos. *Journal of the American College of Cardiology* (2017)

Classificação	PAS (mm Hg)		PAD (mm Hg)
Normal	< 120	e	< 80
Elevada	120 - 129	e	< 80
Hipertensão estágio 1	130 - 139	ou	80 - 89
Hipertensão estágio 2	≥ 140	ou	≥ 90

A HAS apresenta prevalência de 46% da população dos Estados Unidos, atingindo 70% dos homens com idade entre 55 e 64 anos (WHELTON et al., 2018), além disso, a HAS ocorre em 69% dos casos de infarto agudo do miocárdio (IAM), 77% das ocorrências de acidente vascular encefálico (AVE), e 60% dos casos de doença arterial periférica (DAP) (MOZAFFARIAN et al., 2015). No que se refere a idade e etnia, a HAS aumenta substancialmente com o aumento da idade, e afeta mais negros que brancos, asiáticos e hispânicos (WHELTON et al., 2018). No Brasil, a HAS afeta 32,5% da população adulta, mais de 60% dos idosos, e contribui direta ou indiretamente no desenvolvimento de DCV (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015). Essas complicações estão entre as principais causas de mortes e internações no Brasil, representando elevados custos socioeconômicos (MALACHIAS et al., 2016).

Alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de HAS, dentre eles destacamos a idade (prevalência de 68% em indivíduos idosos no Brasil), obesidade, ingestão excessiva de sódio e insuficiente de potássio, etilismo e sedentarismo (incidência de HAS diminui em indivíduos que realizam atividades físicas) (MALACHIAS et al., 2016).

A HAS ocorre em diversas situações especiais, dentre elas, podemos destacar a hipertensão na gravidez, que representa entre 20 e 25% de todas as causas de morte materna no Brasil (MALACHIAS et al., 2016), e a segunda causa de morte materna no mundo (VEST; CHO, 2014). De acordo com o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG -*American College of Obstetricians and Gynecologists*), existem quatro categorias de desordem hipertensiva durante a gestação: 1) Hipertensão arterial Crônica (HC), hipertensão presente antes da gravidez, ou diagnosticada até a 20ª semana do período gestacional; se considera HC a hipertensão arterial ocorrida na gravidez, e que não normaliza após o parto. 2) Pré-eclâmpsia (PE), elevação da pressão arterial associada a proteinúria (300mg/L em 24 horas), ou na ausência de proteinúria, a ocorrência de trombocitopenia (contagem de plaqueta inferior a 100.000/mL) ou insuficiência renal (concentração sérica de creatinina superior a 1,1 mg/dL ou duplicação da concentração sérica de creatinina na ausência de outra doença renal), ou deficiência hepática (concentração sanguínea de transaminases hepática duas vezes mais elevada que o normal), ou edema pulmonar, ou sintomas cerebrais ou visuais. Quando a PE é acompanhada de convulsões, fica caracterizado o quadro de Eclâmpsia (E). 3) Pré-eclâmpsia Superposta à Hipertensão arterial Crônica, ocorrência dos sintomas da PE em gestantes que já apresentavam hipertensão previamente. 4) Hipertensão arterial Gestacional, aumento dos níveis de pressão que ocorre a partir da 20ª semana de gestação, sem presença dos sintomas de PE, e que retorna aos níveis pressóricos normais após o parto.

Pré-Eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação específica da gravidez, caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial (PAS>140mmHg e/ou PAD>90mmHg) associada a um quadro de proteinúria (excreção de 300mg/L ou mais de proteínas em 24 horas) que ocorre espontaneamente a partir da 20ª semana de gestação, sendo essas alterações normalizadas após o delivramento da placenta (WANG; RANA; KARUMANCHI, 2009). Atualmente, o diagnóstico de PE é considerado em casos onde não ocorre proteinúria, desde que a hipertensão seja acompanhada de quadros de trombocitopenia, e/ou insuficiência renal, e/ou deficiência hepática, e/ou edema pulmonar ou sintomas cerebrais e visuais (ACOG, 2013), isso se deve ao fato de que em alguns casos, mulheres tiveram o tratamento postergado por não apresentar quadro de proteinúria, mas que estavam com disfunção em múltiplos órgãos.

A PE é classificada como grave quando os níveis de PAS alcançam valores acima de 160 mmHg e/ou PAD acima de 110 mmHg, esse quadro também é considerado na ocorrência de síndrome HELLP (Hemólise, elevados níveis de enzimas hepáticas, e baixa contagem plaquetária), lesão renal aguda, edema cerebral, ou edema pulmonar (VEST; CHO, 2014). A PE sem manifestação do quadro severo da doença é caracterizada como leve (ACOG, 2013).

Trata-se de uma doença de grande importância na gestação humana, uma vez que consiste na principal causa de morte materna, fetal e neonatal, especialmente nos países em desenvolvimento (SALEEM et al., 2014), e apresenta prevalência de 3 a 5 % da população mundial de gestantes (VEST; CHO, 2014). No Brasil, estima-se que a incidência de PE seja de 1,5% das gestantes (MALACHIAS et al., 2016).

Dentre as complicações fetais da PE encontram-se a restrição do crescimento intrauterino (RCIU), o nascimento prematuro e a síndrome do desconforto respiratório neonatal (VEST; CHO, 2014). Já para as mães, o estágio grave da doença pode acarretar complicações como descolamento prematuro da placenta, acidente vascular cerebral, dor de cabeça, distúrbios visuais, lesão hepática aguda, edema pulmonar, oligúria, convulsões (Eclâmpsia), trombocitopenia, Síndrome HELLP (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010; SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005), além de aumentar o risco de depressão pós parto (PRICK et al., 2015).

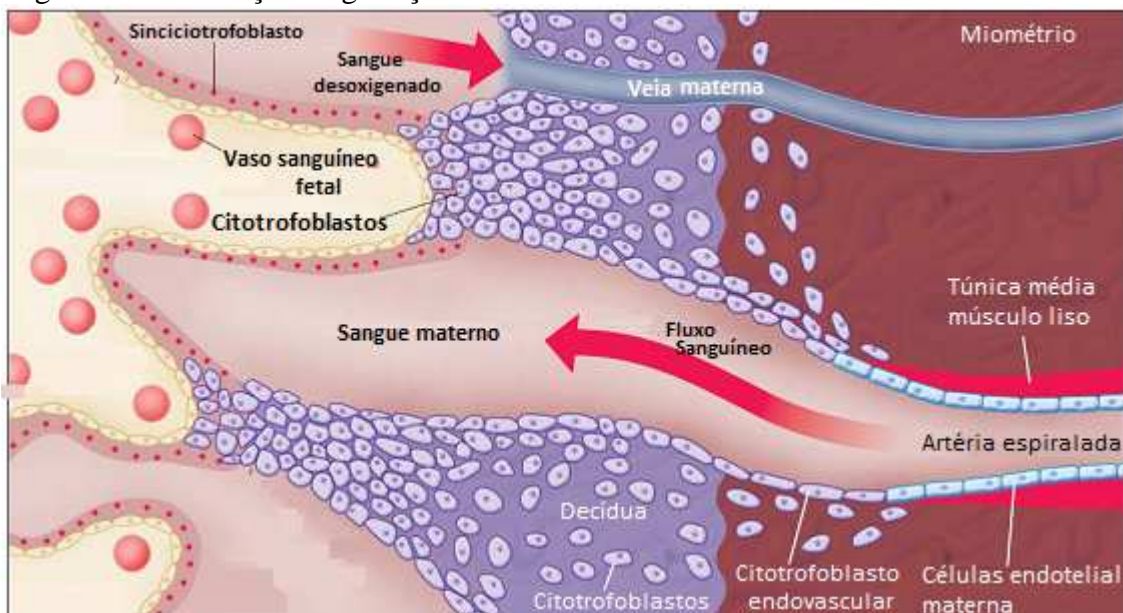
Alguns fatores de risco estão relacionados com uma maior incidência da doença. A frequência e severidade da pré-eclâmpsia são consideravelmente mais altas em mulheres com

gestação multifetal, hipertensão arterial crônica, casos anteriores de pré-eclâmpsia, diabetes mellitus, histórico de trombofilias, idade avançada (acima de 40 anos), doença renal, obesas, e com histórico familiar de pré-eclâmpsia (ACOG, 2013).

Embora a fisiopatologia da PE não seja completamente elucidada, sabe-se que o desenvolvimento vascular placentário é um processo crucial para um desenvolvimento adequado do feto, sendo assim, uma placentação anormal está intimamente associada ao desenvolvimento da doença, ocasionando uma pobre perfusão útero-placentária, que leva à condição hipóxica, estresse oxidativo, e produção excessiva de fatores pró-inflamatórios e anti-angiogênicos (AL-JAMEIL, 2014). Uma inadequada invasão dos citotrofoblastos no sítio de implantação da placenta é a primeira falha de um processo que culmina em uma disfunção endotelial generalizada materna, ocasionando hipertensão, proteinúria e outras manifestações sistêmicas da pré-eclâmpsia (WANG; RANA; KARUMANCHI, 2009).

Durante a gravidez normal, células citotrofoblásticas das vilosidades coriônicas migram em direção à parede uterina, atingindo a decídua e o miométrio, invadindo de forma profunda as artérias espiraladas uterinas, substituindo o revestimento endotelial materno dessas artérias, tornando-as vasos de grande calibre e alta capacitância, capazes de manter uma perfusão placentária adequada a sustentação do crescimento do feto (Figura 1) (FISHER, 2015).

Figura 1 - Placentação na gestação normal.

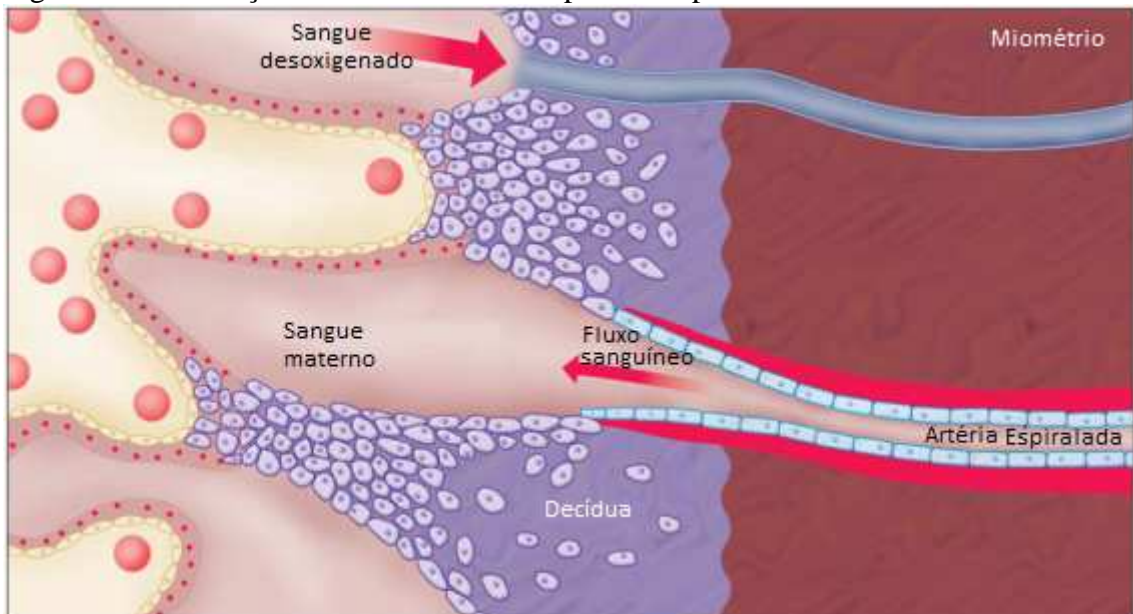


Fonte: Adaptado de Lam, Lim e Karumanchi (2005).

Na pré-eclâmpsia, essa invasão citotrofoblástica é superficial e a invasão da artéria espiralada é incompleta, limitada à decídua superficial, assim o segmento miometrial das

artérias espiraladas permanece estreito, como vaso de alta resistência (Figura 2) (WANG; RANA; KARUMANCHI, 2009). Tal condição incorre em uma insuficiente perfusão útero-placentária, criando um ambiente hipóxico, favorável ao desenvolvimento do estresse oxidativo (AOUACHE et al., 2018). Acredita-se que essa condição conduz a um segundo estágio do desenvolvimento da PE, em que respostas inflamatórias e uma expressão desregulada de fatores angiogênicos são observados (FISHER, 2015).

Figura 2 - Placentação anormal ocorrida na pré-eclâmpsia



Fonte: Adaptado de Lam, Lim e Karumanchi (2005).

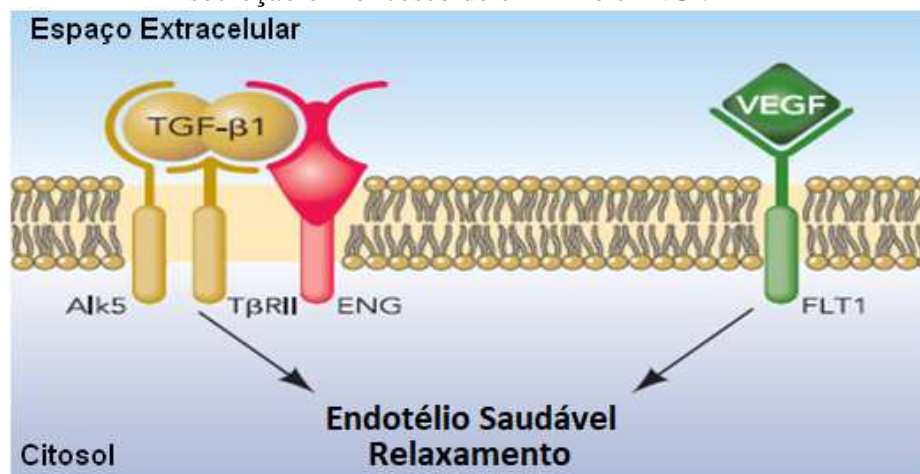
As manifestações da PE podem ser explicadas através do dano vascular, e o desequilíbrio angiogênico tem papel relevante nesse processo. Fatores angiogênicos como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento placentário (PlGF - *placental growth factor*) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1 - *transforming growth factor*) são essenciais para o desenvolvimento de uma vascularização placentária normal (WANG; RANA; KARUMANCHI, 2009). Na gestação regular, os níveis circulantes de VEGF e PlGF estão aumentados, já em pacientes com PE, observam-se altos níveis de produção de fatores antiangiogênicos como a endoglina solúvel (sEng) e a forma solúvel do receptor 1 de Fator de crescimento endotelial (sFLT1), em associação ao estresse oxidativo (ZHOU et al., 2002; COX et al., 2011).

O VEGF e TGF- β 1, além de serem cruciais ao promover a angiogênese, são responsáveis também por manter estáveis e funcionais as células endoteliais (REDMAN;

STAFF, 2015). Esses fatores induzem relaxamento vascular através da ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (VENKATESHA et al., 2006), sendo atores de grande relevância na manutenção da função endotelial. A sinalização de VEGF é realizada através de dois receptores, o Flk, e o Flt-1. Já sFLT1 é uma variação solúvel do receptor Flt-1 que se liga no sítio de ligação do VEGF, impedindo a sua interação com seus receptores endógenos, provocando assim deficiência de VEGF, e conseqüentemente disfunção endotelial (Figura 3).

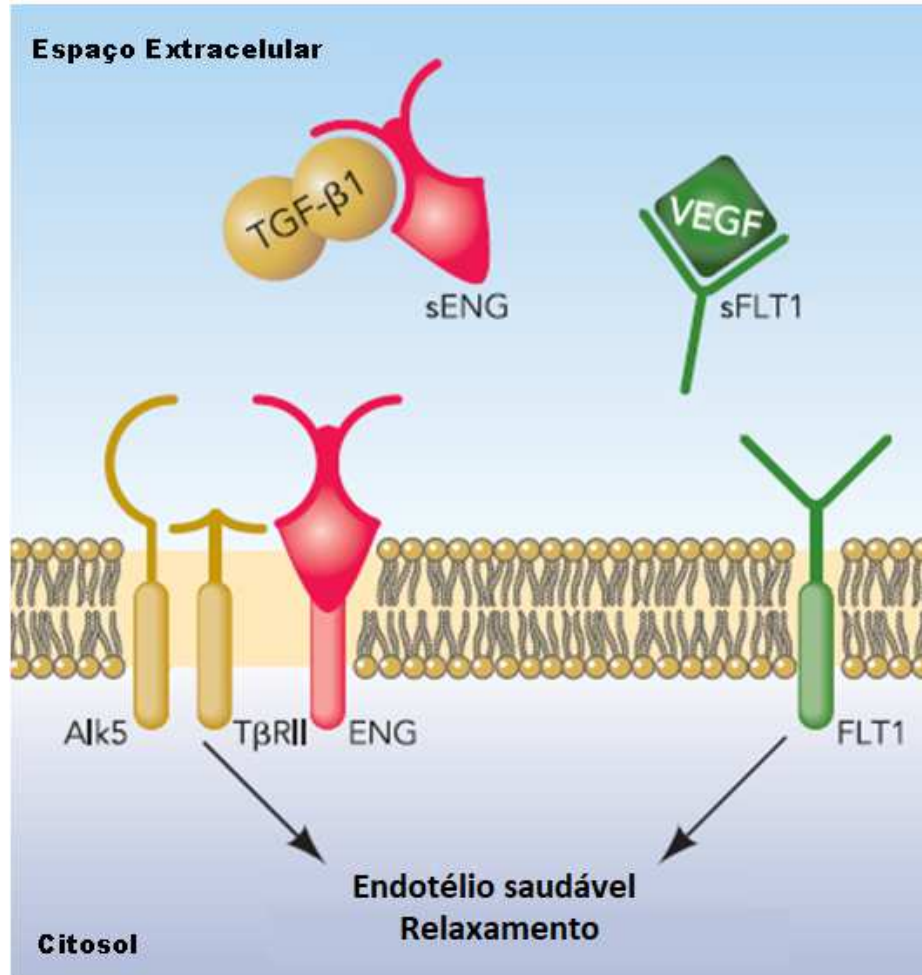
A sinalização de TGF- β 1 se dá pela endogлина (Eng), que é um co-receptor de membrana altamente expresso em células endoteliais e sinciciotrofoblastos (CHEIFETZ et al., 1992). A forma solúvel da endogлина (sEng) inibe a sinalização da TGF- β 1 (Figura 3), agindo como uma molécula antiangiogênica, acentuando ainda mais a disfunção endotelial (VENKATESHA et al., 2006).

Figura 3 - Homeostase vascular em níveis fisiológicos de VEGF e TGF- β e inibição da VEGF e TGF- β 1 causada pela secreção em excesso de sFLT1 e sENG .



Nota: Níveis fisiológicos TGF- β 1 e VEGF
 Fonte: Adaptado de Karumanchi e Epstein (2007)

Figura 3 - Homeostase vascular em níveis fisiológicos de VEGF e TGF- β e inibição da VEGF e TGF- β causada pela secreção em excesso de sFLT1 e sENG.



Nota: Inibição de TGF- β 1 e VEGF por alto níveis de sENG e sFLT1.
 Fonte: Adaptado de Karumanchi e Epstein (2007)

A participação fisiológica da PlGF ocorre estimulando a angiogênese, se ligando ao receptor de VEGF (VEGFR-1), servindo como um amplificador da sinalização de VEGF (ROMERO et al., 2008).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de utilizar esses fatores como biomarcadores para diagnóstico e predição de PE. Níveis elevados de sEng, por exemplo, podem estar associados ao desenvolvimento de PE (ALLEN et al., 2014). A relação sFLT1 / PlGF elevada no soro também permite diferenciar as formas grave e leve da doença (RANA; KARUMANCHI; LINDHEIMER, 2014). Assim, uma avaliação automatizada e mais confiável desses fatores poderia ser útil no diagnóstico mais preciso da doença, auxiliando na prevenção e no tratamento da PE.

Outra molécula que parece ter papel ativo no desenvolvimento da PE é o óxido nítrico (NO). Trata-se de uma molécula gasosa produzida pela óxido nítrico sintase (NOS) a partir da oxidação da L-arginina, e possui um potente efeito vasodilatador e relaxante do músculo liso vascular, constituindo assim um importante mediador vasoativo na regulação do tônus vascular.

Na gravidez normal a produção de NO está aumentada (SHAAMASH et al., 2000) e a NOS apresenta uma maior atividade na placenta (DÖTSCH et al., 2001) e nas artérias uterinas (NELSON et al., 2000), contribuindo para uma adaptação vascular de forma a manter uma baixa resistência vascular (PONIEDZIALEK-CZAJKOWSKA et al., 2011). Além disso, o NO participa da invasão trofoblástica do desenvolvimento placentário e representa o principal vasodilatador da placenta (KRAUSE; HANSON; CASANELLO, 2011).

Na PE, os níveis de produção de NO estão significativamente reduzidos (BRENNECKE et al., 1997) bem como a atividade da NOS (GARMENDIA et al., 1997), contribuindo para modificações vasculares que incluem aumento da resistência vascular periférica e da sensibilidade à angiotensina II (Ang II) e noradrenalina (NOR) (CHESLEY et al., 1965; GANT et al., 1973). Apesar do papel do NO na fisiopatologia da PE ainda não ser bem esclarecido, uma produção reduzida de NO contribui para o comprometimento da perfusão placentária (PONIEDZIALEK-CZAJKOWSKA et al., 2011), tendo importante papel na etiologia da PE (CHOI; IM; PAI, 2002).

A disfunção endotelial está frequentemente associada a uma redução da biodisponibilidade de NO, se caracterizando por uma redução no relaxamento vascular dependente do endotélio, e parece contribuir para o estado hipertensivo na pré-eclâmpsia.

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um ator essencial na regulação da pressão arterial, assim, sua atuação inserida nas mudanças cardiovasculares observadas na gestação é de grande importância.

A Ang II é um poderoso vasoconstritor, atuando de maneira rápida e intensa através da sua ligação a receptores de membranas, dando início a vias celulares que promovem vasoconstrição nas arteríolas, aumentando a resistência vascular periférica total (HIGUCHI et al., 2007).

Dos receptores de Ang II, 2 subtipos foram identificados e estudados com maior profundidade, são os receptores AT₁ e AT₂ (GASPARO et al., 2000). O AT₁ é um receptor acoplado a proteína G que medeia praticamente todas as ações fisiológicas da Ang II, sendo o principal responsável pelos efeitos vasoconstritores da Ang II (GASPARO et al., 2000), sendo responsáveis por estimular a síntese de aldosterona, vasoconstrição (MISTRY;

KURLAK; PIPKIN, 2013), além de estar predominantemente expresso em células cardiovasculares, contribuindo para o remodelamento vascular, hipertrofia e migração de células do músculo liso vascular (HIGUCHI et al., 2007). A função do receptor AT₂ 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 AT₁ (NAKAJIMA et al., 1995; STOLL et al., 1995). O receptor AT₂ também tem sido associado a varias 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 (CÔTÉ et al., 1999; GENDRON* et al., 1999) e apoptose (CHAMOUX et al., 1999; GALLINAT et al., 1999). Além disso, o receptor AT₂ pode mediar efeitos hipotensores (SCHEUER; PERRONE, 1993; ICHIKI; KAMBAYASHI; INAGAMI, 1995) e vasodilatadores (KATADA; MAJIMA, 2002; MOURA et al., 2004; OGNIBENE et al., 2009).

Os níveis de Ang II estão aumentados em gestantes, porém, é observado que a sensibilidade aos efeitos da Ang II na gestação normal é diminuída, resultando em uma queda da resistência vascular periférica (LEVY et al., 2008; PALLER, 1987). Por outro lado, pacientes com PE não apresentam essa resistência à Ang II, apresentando uma resposta aumentada à esse peptídeo (GRAAF et al., 2013). Isso parece ter relação com uma maior expressão de receptores AT₁ de pacientes com PE (HERSE et al., 2007), com desequilíbrio na expressão dos receptores AT₁ e AT₂, estando o AT₁ aumentando e o AT₂ diminuído (RANA et al., 2012), e ao estresse oxidativo que aumenta a reatividade vascular na PE (MISHRA et al., 2011). Outra possível explicação para isso é a expressão do auto-anticorpo contra receptores AT₁ (AT₁-AA) (SEKI, 2014).

O AT₁-AA é expresso em grávidas com PE e seus níveis de expressão estão diretamente relacionados à severidade da doença (SIDDIQUI et al., 2010). Seus efeitos são múltiplos, dentre eles podemos destacar a indução da vasoconstrição ao estimular receptores AT₁ de células do músculo liso vascular, regula positivamente a expressão de sFLT1 (ZHOU et al., 2002), ativa a NADPH-oxidase (DECHEND et al., 2003), regula positivamente a expressão de inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), diminuindo a invasão trofoblástica e contribuindo para uma placentação anormal (BOBST et al., 2005).

A prevenção da PE pode ser feita administrando baixas doses (60 – 80 mg) de aspirina em mulheres com histórico de PE ou parto prematuro (menos que 34 semanas) em gestações anteriores, é sugerido que se inicie esse procedimento ao final do primeiro trimestre (ACOG, 2013).

O tratamento da HAS na gravidez visa prevenir o desenvolvimento de hipertensão grave, e possibilitar o prolongamento da gestação, permitindo um maior tempo de amadurecimento do feto. No entanto, o manejo da hipertensão durante a gravidez é bastante complicado, isso porque muitos anti-hipertensivos comumente utilizados são contraindicados por serem potenciais causadores de danos ao feto (ex. Inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores de receptores AT1 de angiotensina) (WHELTON et al., 2018). A PE por ser uma doença dinâmica, exige frequentes reavaliações para determinar a evolução da doença bem como sua terapia.

O tratamento com anti-hipertensivos para mulheres com PAS menor que 160 mmHg ou PAD menor que 110 mmHg e sem características graves da PE não é indicado, porém quando os valores pressóricos ultrapassam esse limite, a terapia anti-hipertensiva é recomendada (ACOG, 2013). Atualmente, o uso de Nifedipina (um bloqueador de canais de cálcio), metildopa (agonista α_2 adrenérgico) e labetalol (bloqueador α e β adrenérgico) são indicados para hipertensão leve (WHELTON et al., 2018) enquanto que a administração de magnésio é indicada para hipertensão severa (ACOG, 2013).

Outra importante avaliação a ser feita em condições de PE é o momento do parto, sendo indicada a realização do mesmo em casos onde a gestante não apresenta características graves da doença, e já tenha passado de 37 semanas de gestação (ACOG, 2013).

Essas limitações evidenciam a necessidade de estudos em busca de novas abordagens terapêuticas, onde se possa conferir proteção materna sem fetotoxicidade.

A utilização do Cloridrato de N- ω -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima NOS, do período médio ao final da gestação, constitui um modelo experimental de PE, reproduzindo os sinais observados nessa doença, tais como hipertensão, dano oxidativo sistêmico e placentário, atividade antioxidante diminuída, disfunção endotelial e aumento da vasoconstrição periférica (AMARAL et al., 2018). Além disso, o modelo de PE experimental via L-NAME restringe o crescimento dos fetos (MAYR et al., 2005), e da placenta (MOTTA et al., 2015) e aumenta a expressão de sFLT1 (GONÇALVES-RIZZI et al., 2016). O L-NAME promove ainda o aumento da secreção de fatores pró-inflamatórios e inibe os anti-inflamatórios (DONG; SHI, 2016). Sendo assim, esse modelo tem gerado dados fundamentais relacionados com o papel da biodisponibilidade reduzida de NO na mediação de alguns aspectos da PE.

Endotélio e Disfunção endotelial

Durante o período de gravidez, a gestante passa por várias mudanças cardiovasculares e hemodinâmicas, incluindo aumento do débito cardíaco, vasodilatação sistêmica, diminuição da resistência vascular e redução sutil da PA (POSTON; MCCARTHY; RITTER, 1995; THORNBURG et al., 2000) que possibilitam suprir o feto com oxigênio e nutrientes, garantindo assim o seu crescimento normal. Essas modificações estão atreladas a uma participação crucial do endotélio, que passa a produzir uma maior quantidade de substâncias vasodilatadoras em diferentes tecidos e órgãos maternos (VALDES et al., 2009). Assim, embora a pré-eclâmpsia tenha a sua origem na placenta, o endotélio materno também representa um alvo de grande relevância no desenvolvimento da PE.

O endotélio é uma camada única e contínua de células que separam o sangue da parede vascular e do interstício. Em condições fisiológicas, ele é responsável por diversas atividades, entre elas, podemos destacar a manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Sua atuação se dá pela síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras (óxido nítrico, fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF - *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*), prostaciclina e cininas), vasoconstritoras (Ang II e Endotelina-1), anti-trombóticas, antioxidantes e anti-inflamatórias. Quando a função do endotélio está normal, existe um equilíbrio na produção dessas substâncias com uma tendência à vasodilatação (BAHIA et al., 2006).

Dentre as substâncias vasodilatadoras, podemos destacar o óxido nítrico (NO), que é um radical livre instável com um elétron desemparelhado e de meia vida relativamente curta. É sintetizado por diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase que são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (cNOS) e a NOS induzível (iNOS), produzidas por macrófagos e outras células ativadas por citocinas e que estão envolvidas no processo inflamatório (MARLETTA, 1993; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

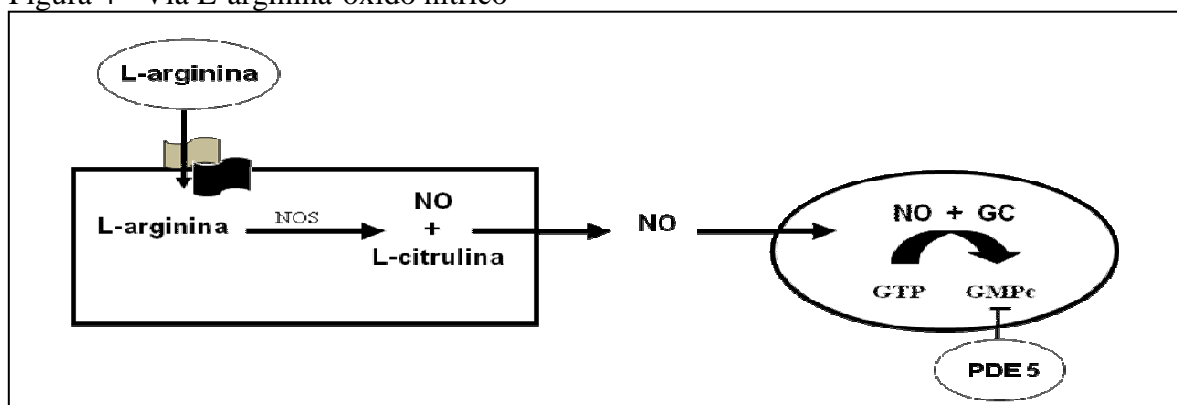
A atividade da eNOS pode ser iniciada ou aumentada através de vários estímulos (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015), entre eles está a interação da eNOS com a calmodulina, interação essa que é mediada pela concentração intracelular de Ca^{++} . Agonistas como Acetilcolina (ACh) e bradicinina (BK), se ligam a seus específicos receptores na membrana da célula endotelial e promovem o aumento da concentração intracelular de Ca^{++} , o qual se liga a calmodulina o que leva a ativação da eNOS (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

A modulação pós translacional, que consiste na fosforilação ou desfosforilação em diferentes sítios da eNOS, também consiste em uma via de ativação / modulação da eNOS, aumentando ou diminuindo sua atividade (VANHOUTTE et al., 2016). A fosforilação de resíduos de serina 1177 do cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) aumenta a atividade da eNOS, enquanto que a adição de um grupo fosfato em resíduos de treonina 495 inibe a atividade da enzima (VANHOUTTE et al., 2016).

Quando ativada, a eNOS converte o aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina em um processo que ocorre em duas etapas: Na primeira ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G-hidroxi-L-arginina (NHA). Nessa fase ocorre atuação dos co-fatores oxigênio molecular (O₂) e Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH). Na segunda etapa o NHA é convertido em NO e L-citrulina, com a atuação dos co-fatores FAD, flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH₄) (STUEHR, 2004). Após ser produzido, o NO adentra as células musculares lisas através da bicamada lipídica, onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC). A GC quando ativada, catalisa a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir de guanosina trifosfato (GTP) (Figura 4). A formação de GMPc induz relaxamento da musculatura lisa vascular por ativar a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que promove a diminuição da concentração citoplasmática de Ca²⁺ através do efluxo de Ca²⁺ para o meio extracelular e/ou armazenamento do Ca²⁺ no retículo sarcoplasmático, resultando na inibição do aparato contrátil da célula do músculo liso vascular (RAPOPORT; MURAD, 1983; WALDMAN; MURAD, 1987; SONNENBURG; BEAVO, 1994; STANKEVIČIUS et al., 2003).

Além do efeito vasodilatador, o NO também tem participação efetiva na inibição da agregação plaquetária e proliferação de células musculares lisas da parede vascular (RAMACHANDRAN et al., 2002).

Figura 4 - Via L-arginina-óxido nítrico



Fonte: Adaptado de Macallister e Vallance (1998)

Outro importante mediador da vasodilatação dependente do endotélio é o EDHF (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010). Evidências demonstram que a vasodilatação dependente de endotélio promovida pelo EDHF se torna predominante quando a via NOS-NO está ausente, como demonstrado em camundongos knockout para eNOS (HUANG et al., 2000). O EDHF parece promover a abertura de canais de K^+ , com consequente efluxo desse íon da célula do músculo liso vascular, promovendo hiperpolarização, reduzindo, dessa forma, a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, o que promove o relaxamento vascular (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010). Estudos apontam para a possível participação do EDHF na resposta vasodilatadora mediada por diferentes agentes, tais como, bradicinina, acetilcolina e angiotensina II (RESENDE; BALLEJO; SALGADO, 1998; BOLZ et al., 1999; MOURA et al., 2004). O EDHF parece ser importante para manter o tônus vascular normal em pequenas artérias de resistência, mas a sua identidade e o exato papel na patogênese da hipertensão, bem como em condições normais, não são completamente compreendidos.

Quando os efeitos vasoconstritores se sobrepõem aos efeitos vasodilatadores, temos um processo chamado de disfunção endotelial, que normalmente ocorre em função de uma redução da biodisponibilidade de NO, com perda da sua ação protetora sobre os vasos (BAHIA et al., 2006).

A disfunção endotelial contribui para a manutenção da resistência vascular periférica elevada e favorece o início prematuro da aterogênese (LOSCALZO; A VITA, 2000). Vários fatores parecem contribuir para a etiologia da disfunção endotelial observada em modelos animais de hipertensão, assim como em pacientes com hipertensão. Dentre eles, destacam-se os produtos vasoconstritores da via das ciclooxigenases, como a liberação excessiva de prostaglandina H_2 (PGH_2) e tromboxano A_2 ; síntese aumentada de Endotelina-1 (ET-1) e Ang II; disponibilidade reduzida de BH_4 para a síntese de NO (HONG et al., 2001) e produção diminuída de NO pela redução da expressão e atividade da eNOS (OEMAR et al., 1998).

Além disso, a produção reduzida de NO está correlacionada com uma produção aumentada de espécies reativas do oxigênio (EROs), principalmente o ânion superóxido (CAI; HARRISON, 2000; LI et al., 2006), sugerindo um papel central de EROs na etiologia da disfunção endotelial.

Na pré-eclâmpsia, fatores anti-angiogênicos e pró-inflamatórios induzidos por uma deficiente perfusão uteroplacentária, promovem uma disfunção no endotélio, diminuindo a produção de vasodilatadores como NO e aumentando a liberação de vasoconstritores como ET-1 (SHAH; KHALIL, 2015). Ainda, um comprometimento do relaxamento dependente de endotélio poderia contribuir para a menor perfusão placentária associada ao RCIU

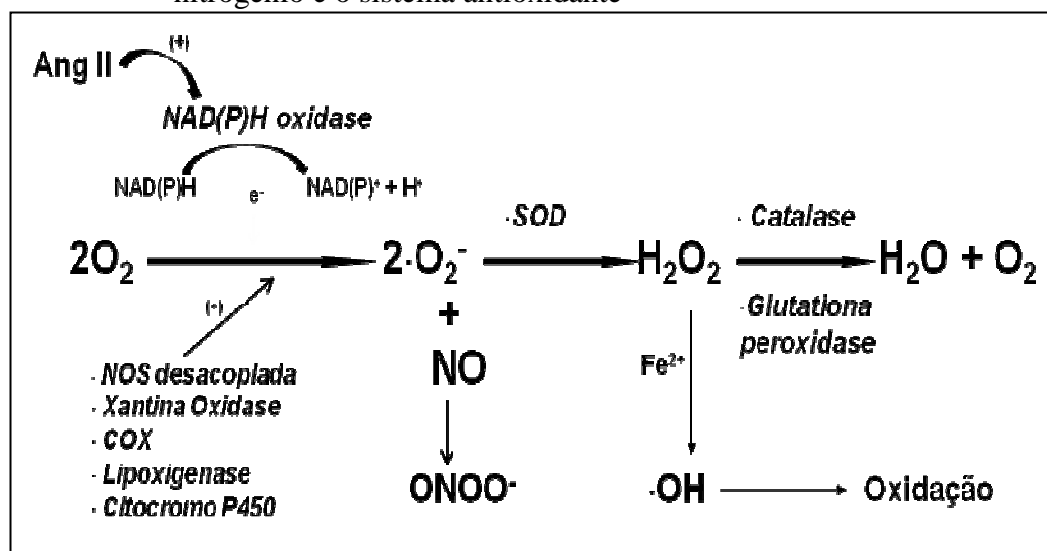
(GILLHAM; KENNY; BAKER, 2003). A disfunção endotelial também parece contribuir para o estado hipertensivo na gestação (RESENDE; PIMENTEL; MOURA, 2004), pois favorece o aumento da resistência vascular periférica. Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo parece ter um papel crucial na disfunção endotelial associada à pré-eclâmpsia (REDMAN; SARGENT, 2005).

Estresse Oxidativo

Um átomo que possui um ou mais elétrons desemparelhados é conhecido como radical livre, e possui grande reatividade química. Os radicais livres cujos elétrons desemparelhados encontram-se centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são chamados de espécie reativa de oxigênio (ERO) ou espécie reativa de nitrogênio (ERN), e são de grande interesse biológico, pois quando em concentrações elevadas, podem causar efeitos deletérios em células e tecidos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As reações de óxido-redução são processos fundamentais do nosso metabolismo, por isso, as EROs são produzidas e neutralizadas naturalmente em diversas condições fisiológicas (Figura 5), e tem sido implicadas como importantes moléculas de sinalização, influenciando a atividade e as funções das células (FORMAN; TORRES; FUKUTO, 2002).

Figura 5 - Vias envolvidas da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante



Fonte: Adaptado de Touyz (2004).

Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução tetravalente resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos como os radicais superóxidos (O_2^-), radical hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A primeira das EROs formada é o O_2^- , que se dá pela redução do oxigênio por um único elétron, e é produzida por várias vias metabólicas (cadeia respiratória na mitocôndria, via da xantina oxidase, via da NADPH-oxidase). É considerado pouco reativo em soluções aquosas e rapidamente sofre reação de dismutação, catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), dando origem ao peróxido de hidrogênio na seguinte reação:



Possui também funções importantes, tais como sinalizador molecular, bactericida e combate a corpos estranhos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O H_2O_2 é oriundo principalmente da dismutação do O_2^- e não é considerado um radical livre por não ter elétrons desemparelhados na última camada, sendo pouco reativo. Porém é um metabólito extremamente deletério por ser capaz de gerar OH em presença de metal de transição, através da reação de Fenton (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Possui também a capacidade de transpor membranas celulares, possibilitando a ocorrência de reações com alvos biológicos em compartimentos distantes do seu local de formação (HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001). O H_2O_2 é eliminado parcialmente por catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), porém com baixa eficiência, o que faz com que o H_2O_2 tenha meia vida mais longa.

O OH^\bullet é o mais reativo e lesivo radical conhecido, e para o qual o organismo não dispõe de mecanismos de defesa (SANDRA et al., 2007). Combina-se rapidamente com metais ou outros radicais no próprio sítio de formação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), causando danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídeos e membranas celulares (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Um importante ERN é o NO, que como vimos anteriormente, é produzido pela enzima NOS e desempenha importantes funções no organismo humano. O NO não é suficientemente reativo para causar danos, porém pode reagir com o O_2^- formando peroxinitrito ($ONOO^-$) que por sua vez é um potente oxidante capaz de causar danos a muitas moléculas biológicas (VANHOUTTE et al., 2016).

As principais fontes de EROs são: NADPH-oxidase, xantina oxidase (XO), citocromo P450, cadeia respiratória mitocondrial, e a enzima NOS desacoplada.

Os radicais livres podem ser considerados moléculas com funções de mensageiros secundários, exercendo papel na regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox, e promovendo alterações da homeostase celular através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (RIBEIRO et al., 2005). Porém, essas espécies reativas também promovem reações com substratos biológicos, podendo causar danos às biomoléculas e afetar a saúde humana, sendo os danos mais graves aqueles causados ao DNA e RNA.

A membrana é um dos componentes celulares mais afetados pela ação das EROs, ela sofre uma reação em cadeia que se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado da membrana celular, e culmina em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O organismo dispõe de proteções que combatem o excesso de radicais livres através de antioxidantes, sejam produzidos pelo organismo (antioxidantes enzimáticos), nos quais destacamos a SOD, a CAT e as enzimas do ciclo redutor da glutathione, ou absorvidos da dieta, com destaque para a vitamina E, pró-vitamina-A, vitamina C e compostos fenólicos.

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas que protegem as células aeróbicas contra a ação do O_2^- . Em meio aquoso, ela catalisa a reação de dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2 com extrema rapidez, aproximadamente 10 milhões de vezes mais rápida que a dismutação espontânea não enzimática (SILVA; GONÇALVES, 2010).

A CAT é uma enzima encontrada predominantemente nos peroxissomas, mas pode ser encontrada também livre no citoplasma, sua função é catalisar a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (SILVA; GONÇALVES, 2010), diminuindo o risco de formação OH^\bullet via reação de Fenton (RIBEIRO et al., 2005).

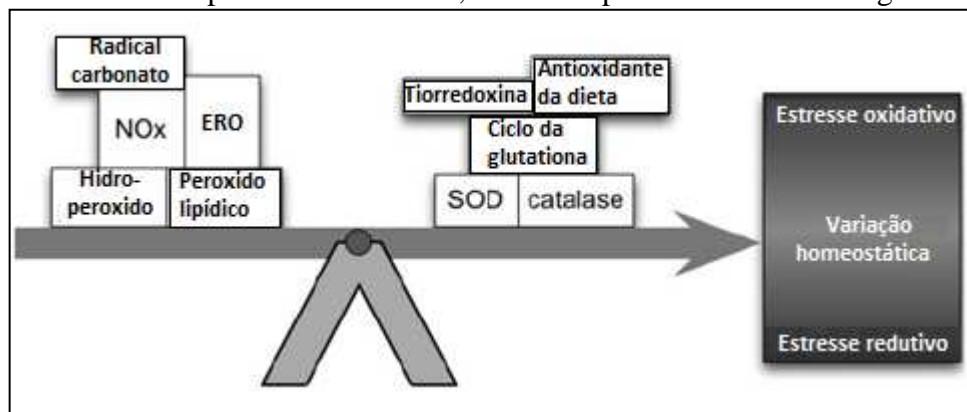


O ciclo redutor da glutathione inclui as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR), e constituem o principal mecanismo de remoção de hidroperóxido, lipoperóxidos, e assim como a CAT, do H_2O_2 (SILVA; GONÇALVES, 2010). A GPx promove a redução dos peróxidos utilizando a glutathione reduzida (GSH) como substrato doador de elétron, transformando-a em glutathione oxidada (GSSG). Uma vez oxidada, a GSSG é convertida em GSH pela ação da GR através da oxidação do NADPH (DAMASCENO, 2002; KINNULA, 2005).



Em situação fisiológica, há um equilíbrio entre a formação de EROs e os mecanismos antioxidantes. Porém, quando uma grande produção de EROS excede a capacidade antioxidante, temos um desequilíbrio onde é verificada a situação de estresse oxidativo (Figura 6), que parece estar presente em diversas doenças, entre elas a pré-eclâmpsia, induzindo a liberação de fatores que levam a uma resposta inflamatória e disfunção endotelial materna (REDMAN; SARGENT, 2005).

Figura 6 - Representação esquemática do equilíbrio entre oxidantes celulares e o sistema de defesa antioxidante. NOx – espécies reativas de nitrogênio derivadas do óxido nítrico; SOD – Superóxido dismutase; ERO – Espécies reativas de oxigênio

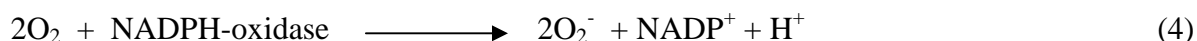


Fonte: Adaptado de Reid (2006).

O estresse oxidativo é um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da PE através de sua contribuição no surgimento da disfunção vascular (MATSUBARA et al., 2015). A hipóxia resultante de uma placentação anormal, promove uma resposta inflamatória que acaba por ativar enzimas produtoras de EROS tais como NADPH-oxidase (QUINN et al., 1995; LEE et al., 2003), XO e eNOS desacoplada (GIELIS et al., 2011), além de ativar a iNOS, uma importante produtora de NO, gerando uma produção excessiva desse ERN (AIRES et al., 2013).

A associação do NO com O_2^- leva a formação de $ONOO^-$ que, entre outras ações, induz o desacoplamento da eNOS pela oxidação de BH_4 em BH_3 , comprometendo a atividade da eNOS (GIELIS et al., 2011). Isso contribui para a redução da biodisponibilidade do NO, prejudicando a sua função vascular.

A NADPH-oxidase está presente em diversos tipos celulares, entre eles neutrófilos e células endoteliais, e forma superóxido no processo de redução do oxigênio molecular na seguinte reação:



Acredita-se que a NADPH-oxidase neutrofílica e vascular seja uma peça chave no processo de estresse oxidativo induzido por substâncias inflamatórias (MATSUBARA et al., 2015).

Para produzir NO, a eNOS precisa do cofator BH₄ para ligação da L-arginina ao domínio oxigenase da eNOS, formando um dímero estabilizado pela BH₄. Nessas condições, o NO é abundante e exerce suas funções. Porém, na ausência do BH₄, esse dímero é desacoplado em dois monômeros, tornando a eNOS ineficiente na formação de NO, e geradora de grandes quantidades de EROs. Esse desacoplamento pode estar associado ao surgimento da hipertensão (GIELIS et al., 2011), bem como da PE (MITCHELL et al., 2007).

O aumento da produção de EROs parece reduzir a expressão e a atividade da eNOS (FARROW et al., 2008), reduzindo a biodisponibilidade de NO e contribuindo para o desenvolvimento da disfunção endotelial.

Extrato do caroço de açaí (ASE)

A palmácea *Euterpe oleracea* Mart, cujo fruto é conhecido como açaí, é amplamente encontrada na região Amazônica, principalmente nos Estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. A casca do fruto do açaí é comumente usada na fabricação de sucos, sorvetes, doces, sendo muito consumida no Brasil. Aproximadamente 10.000 toneladas de extrato aquoso gelado são consumidas no Brasil e 1.000 toneladas são exportadas para muitos países como Japão, Estados Unidos e Itália (Organização Panamericana de Saúde, 2009).

Estudos químicos têm demonstrado que o açaí é rico em polifenóis como (-) epicatequina, (+) catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (BOBBIO et al., 2000; POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; GALLORI et al., 2004). Crescentes evidências, inclusive em estudos epidemiológicos, sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra doença cardiovascular (STOCLET et al., 2004; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005). Este efeito benéfico dos polifenóis pode estar relacionado a diferentes ações como antioxidante (FRANKEL et al., 1993), vasodilatadora (FITZPATRICK et al., 2000) e/ou propriedades anti-hipertensivas (MOURA et al., 2004).

As catequinas desempenham importante papel na prevenção da disfunção endotelial, eliminando radicais livres de modo a reduzir o dano endotelial, e na manutenção do endotélio saudável, aumentando a atividade da eNOS através da fosforilação de resíduos de serina 633 e 1177 bem como a desfosforilação dos resíduos de treonina 495, promovendo uma maior biodisponibilidade de NO (CHEN et al., 2016).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (Açaí Stone Extract – ASE), cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional de propriedade Industrial (INPI), assim como, no Patent Cooperative Treaty (PCT), é rico em catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas (OLIVEIRA et al., 2015) e apresenta um significativo efeito vasodilatador dependente de endotélio em preparação de leito mesentérico isolado de rato (ROCHA et al., 2007), assim como, efeito anti-hipertensivo e antioxidante (ROCHA et al., 2008). Dados importantes do nosso grupo demonstraram que o ASE possui maior abundância em conteúdo polifenólicos, reforçando assim uma maior potência do extrato do caroço em produzir vasodilatação quando comparada com a ação promovida pela polpa e pela casca do fruto ou pelo extrato aquoso (ROCHA et al., 2007, 2008).

.Além disso, foi observado que o tratamento com o ASE previne o desenvolvimento de intolerância ao exercício, hipertrofia cardíaca, fibrose e disfunção cardíaca em ratos submetidos a infarto do miocárdio (ZAPATA-SUDO et al., 2014), reduz a inflamação pulmonar aguda (MOURA et al., 2012), protege contra componentes da síndrome metabólica como ganho de peso, dislipidemia, e resistência à insulina (OLIVEIRA et al., 2010), previne o desenvolvimento de disfunção endotelial, alterações estruturais vasculares e dano oxidativo em hipertensão renovascular experimental (COSTA et al., 2012). Em adição, foi constatado que o ASE reduz os níveis de renina na hipertensão renovascular (COSTA et al., 2012) e em modelo de programação metabólica (BEM et al., 2014), sugerindo que o ASE pode agir sobre o SRA como mecanismo do seu efeito. Esses resultados evidenciam que o ASE produz efeitos benéficos e possui importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares, no entanto não temos conhecimento dos efeitos do ASE sobre as alterações que ocorrem durante a gestação, bem como em suas complicações.

Tendo em vista as restrições farmacológicas impostas pelo estado de gravidez, o estudo do ASE como uma nova alternativa para tratamento de gestantes hipertensas, como por exemplo na pré-eclâmpsia, é de muita valia, uma vez que pode representar uma nova estratégia terapêutica, capaz de proteger tanto a mãe quanto o feto.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento preventivo com o extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (ASE) sobre as alterações cardiovasculares observadas na pré-eclâmpsia experimental induzida pelo L-NAME.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com ASE sobre os seguintes parâmetros no modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida pelo L-NAME:

- a) Pressão arterial e proteinúria materna;
- b) Número e massa dos fetos vivos e massa total placentária;
- c) Reatividade do leito arterial mesentérico (LAM) materno a substâncias vasoconstritoras (angiotensina II e noradrenalina) e vasodilatadoras (acetilcolina, nitroglicerina, bradicinina e angiotensina II);
- d) Níveis plasmáticos de fatores pró-inflamatórios (TNF-alfa, IL-6 e MCP-1) e anti-angiogênicos (sFLT1);
- e) Dano oxidativo em lipídios e proteínas e atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no plasma e no LAM;
- f) Expressão proteica da eNOS e p-eNO^(Ser 1177) no LAM;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação do extrato hidroalcoólico do caroço do Açaí (*Euterpe oleracea* Mart)

Foram utilizados frutos de açaí, provenientes de Belém, fornecidos pelo nosso colaborador Prof. Pergentino José Cunha Souza da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará. Para a obtenção do extrato, 200 g do fruto do açaí foram lavados e os caroços separados, posteriormente vigorosamente triturados, embebidos em 400 mL de água destilada e fervidos por 5 minutos. Após a fervura foram acrescentados 400 mL de etanol. O extrato hidro-alcoólico foi posto em frasco escuro e acondicionado sob refrigeração (4°C), sendo agitado diariamente por 2 a 4 horas durante aproximadamente 10 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel filtro e submetido à evaporação do etanol a baixa pressão em temperatura de 67°C. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso (ROCHA et al., 2007). Após o preparo, o extrato foi submetido a testes de reatividade vascular em LAM isolado de rato Wistar para certificação de seu potencial vasodilatador, viabilizando o seu uso no tratamento crônico no presente estudo.

2.2 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética para o cuidado e uso de animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA-IBRAG-UERJ/035/2015). Todos os animais foram obtidos 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 claro-escuro 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.

Para este estudo foram utilizadas ratas virgens Wistar, com idade entre 90 e 120 dias, pesando entre 190 e 230 g. As ratas grávidas foram obtidas colocando-se 4 fêmeas com um macho da mesma espécie para acasalar durante a noite e verificando-se a presença de

espermatozoides no canal vaginal na manhã seguinte. O dia zero da gestação foi determinado pela primeira detecção de espermatozóide no canal vaginal, pela manhã.

A pré-eclâmpsia experimental foi induzida nas ratas grávidas pela administração de L-NAME (60mg/Kg/dia), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, do 13° ao 20° dia de gestação (MOURA et al., 2007; AMARAL et al., 2018) em água de beber. Ainda, foi avaliado o efeito do extrato do caroço de açaí (ASE) (200mg/Kg/dia) (COSTA et al., 2012) sobre as alterações cardiovasculares induzidas neste modelo de pré-eclâmpsia. Portanto, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- **Grupo Controle** (n=21): Ratas grávidas que receberam apenas água do 1° ao 20° dia de gestação.
- **Grupo Controle + ASE** (n=23): Ratas grávidas que receberam ASE (200mg/kg/dia) misturado na água de beber do 13° ao 20° dia de gestação.
- **Grupo L-NAME** (n=26): Ratas grávidas que receberam L-NAME (60mg/Kg/dia) misturado na água de beber do 13° ao 20° dia de gestação.
- **Grupo L-NAME + ASE** (n=28): Ratas grávidas que receberam L-NAME (60mg/Kg/dia) e ASE (200mg/kg/dia) misturados na água de beber do 13° ao 20° dia de gestação.

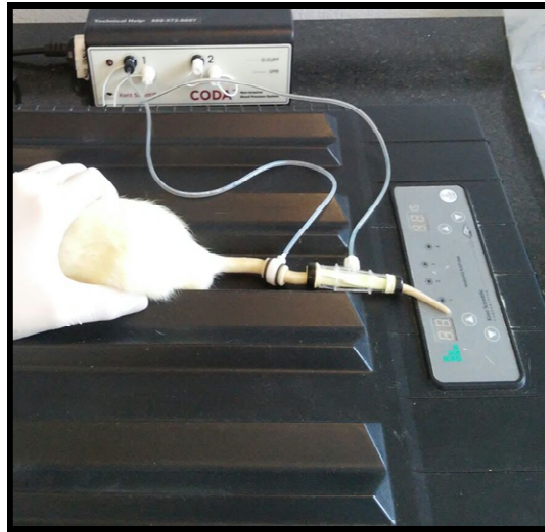
A água foi trocada a cada dois dias, e o volume excedente foi medido, possibilitando assim a verificação da ingestão hídrica dos animais, bem como o consumo do ASE e L-NAME nas suas respectivas doses.

2.3 Medida dos parâmetros hemodinâmicos

As medidas da pressão arterial sistólica, diastólica e média (mm Hg), foram realizadas de modo não invasivo, pela técnica de pletismografia de cauda, por meio do aparelho CODA-HT2 da Kent Scientific. Nesse método, um garrote e um sensor de pulso são colocados em torno da cauda do animal (figura 7), e através do volume de sangue que flui pela cauda, os dados de pressão são registrados. As medidas foram realizadas uma vez por semana durante o período gestacional e imediatamente antes da eutanásia (20° dia de gestação).

Os animais tiveram a pressão medida por 2 semanas antes de acasalar, para adaptação ao procedimento antes do período experimental, minimizando assim o estresse durante a medida da pressão arterial.

Figura 7 - Foto da execução da técnica de pletismografia de cauda



Fonte: O autor, 2017.

2.4 Coleta de urina de 24h e análises bioquímicas

No 19º dia de gestação, as ratas foram alocadas em gaiolas metabólicas para a coleta de urina de 24h, sendo feita a medida do volume excretado e o armazenamento de alíquotas a -80C para análises de creatinina, microalbuminúria e ureia.

As análises de microalbuminúria (resultados expressos em mg/24h) e ureia (g/24h) foram realizadas através de kit comercial da Biotécnica®, enquanto que a creatinina (mg/24h) foi determinada pela utilização do kit comercial da Bioclin®.

2.5 Eutanásia

No 20º dia de gestação, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (70 mg/kg) por via intraperitoneal. Após certificado que o animal estava anestesiado, foi realizada a laparotomia, com posterior coleta de sangue através de punção da artéria aorta abdominal, assim como isolamento do leito arterial mesentérico (LAM). O LAM foi utilizado imediatamente no experimento de reatividade vascular. O número e o peso dos fetos vivos, assim como a massa placentária total também foram avaliados.

2.6 Análises Bioquímicas no plasma

A ureia e a creatinina foram determinadas por método colorimétrico através de kits comerciais (Biotécnica® e Bioclin®, respectivamente). As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

O perfil pró-inflamatório foi determinado analisando os níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6 e MCP-1 através de kits ELISA (Peprotech®), seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações foram expressas em pg/mL.

O fator anti-angiogênico sFLT1 também foi determinado através do kit ELISA (Elabscience®), seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações foram expressas em ng/mL.

2.7 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)

As preparações de LAM foram isoladas de ratas dos 4 grupos experimentais, conforme descrito por McGregor (1965). Os animais foram anestesiados com tiopental (70 mg/Kg) e, em seguida, submetidos 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); CaCl₂.2H₂O (2.5); MgSO₄.6H₂O (1.2); NaHCO₃ (25.0); KH₂PO₄ (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. 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.

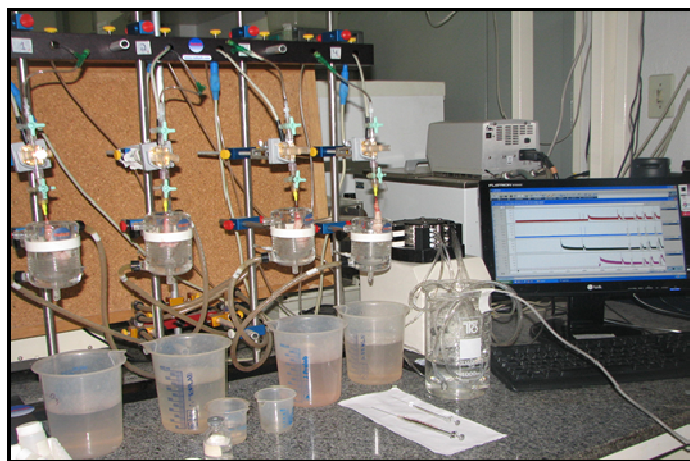
2.8 Reatividades do leito arterial mesentérico às substâncias vasoativas

Após o isolamento, o LAM foi acoplado a um sistema de perfusão de órgãos (Figura 8). 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 (Model MINIPULS 3, Gilson®, LB, França). A solução de Krebs, mantida a 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ /5% CO₂) foi infundida à velocidade constante de 4 mL /min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa LabChart Reader 7 (SP, Brasil), por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30, SA, Austrália).

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação. Em seguida, foi testada a viabilidade dos vasos mesentéricos por meio de injeção “*in bolus*” de 120 µmol de KCl.

A resposta vasoconstritora foi expressa pelo aumento na pressão de perfusão (mm Hg) e a vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela noradrenalina (NOR). As injeções “*in bolus*” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de micro-seringas de 10 e 100 µl (Hamilton®). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 µl.

Figura 8 - Foto do sistema de perfusão de órgãos utilizado no estudo de reatividade vascular



Fonte: O autor, 2017.

2.8.1 Resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (NOR) e angiotensina II (AngII)

Após a obtenção de uma resposta consistente promovida pelo KCl, a resposta pressora induzida pela NOR foi avaliada através da injeção de doses crescentes (1-300 nmol) no LAM ainda em pressão de perfusão basal. Posteriormente, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a NOR foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (1-3 μ M) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 40-60 mm Hg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NOR, testamos a capacidade vasoconstritora induzida por doses crescentes de Ang II (0,001-10 nmol).

2.8.2 Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (ACh), nitroglicerina (NG), angiotensina II (AngII) e bradicinina (BK)

Em LAM isolado em outros animais, foi inicialmente realizado o teste com injeção de KCl (120 μ mol), e posteriormente iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a NOR foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (10-30 μ M) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mm Hg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NOR, testamos a função endotelial vascular, com a injeção de ACh (1-100 pmol), que produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Avaliamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de NG (10 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular, sendo seu efeito independente do endotélio. Posteriormente, avaliamos os efeitos vasodilatadores induzidos por doses crescentes de AngII (10-300 nmol) e BK (10-100 pmol).

2.9 **Ensaio pró-oxidantes**

2.9.1 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 peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao

aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsossomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (comprimento de onda de 532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma, e homogenato de LAM. Foram utilizados 150 μL de homogenato de LAM para 300 μL de ácido tricloroacético (TCA). Para o plasma, foram utilizados 200 μL de amostra, diluídos em 600 μL de TCA. As amostras foram centrifugadas por dez min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 300 μL do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 300 μL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por trinta minutos. Deixou-se esfriar por cinco minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.9.2 Carbonilação de proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos de proteínas (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado por espectrofotometria em 370 nm de comprimento de onda usando um coeficiente 22.0000 molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine et al. (1990).

Foram utilizados 200 μL de homogenato de LAM em duplicata. Foram realizadas lavagens com solução de HCL-acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-acetato de etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min a 600 g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCl 2 M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M a 60°C por trinta minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro (380 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.10 Atividade das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase (CAT) e GPx foi realizada em amostras de plasma e em homogenato de LAM preparado em tampão fosfato (NaCl 5,84 g, NaH₂PO₄ 13,8 g, Na₂HPO₄ 26,8 g, KCl 7,45 g, EDTA 2,28 g) em pH:7,4.

2.10.1 Medida da superóxido dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo ânion superóxido. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister e Calabrese (1987) para a medida no plasma e homogenato de LAM. Foram utilizados 20, 40 e 60 µL de cada amostra de plasma e dos homogenatos em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970 µL tampão glicina (3,75mg/mL de água destilada) e 40 µL de noradrenalina (19 mg/mL de água destilada + 15 µL/mL de HCl fumegante). Também foram adicionados 20 µL da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o peróxido de hidrogênio formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida por espectrofotometria (480 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de cento e oitenta segundos.

2.10.2 Medida da catalase

A catalase é uma heme proteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, formando oxigênio molecular e água. A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação. Foram utilizados 20 µL de amostra de plasma, e 200 µL de amostra de homogenato de LAM em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria

(240 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de sessenta segundos (AEBI, 1984).

2.10.3 Medida da glutathiona peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm. Foram utilizados 200 μ L de amostra de plasma, e 100 μ L de amostra de homogenato de LAM em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800 μ L de tampão fosfato, glutathiona reduzida (2 mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, H_2O_2 (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta 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 e Günzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados.

2.11 **Análise dos níveis de proteínas por *Western Blotting***

As amostras de LAM (200 mg) foram homogeneizadas com tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 μ l de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados (13000 rpm, 4°C por 25 min). A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico do kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-

mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 min. As amostras foram analisadas em condição desnaturante por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram aplicados 20 µg de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em (*Tween 20 + tris-buffered saline*) T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (*overnight*, a 5°C): anti-eNOS e anti-p-eNOS (s1177) IgG policlonais produzidos em cabra (1:500). Posteriormente, foi utilizado um anticorpo secundário conjugado com biotina específico para o anticorpo primário e a revelação foi realizada com o auxílio do reagente de detecção quimioluminescente altamente sensível (Amersham ECL Prime Western Blotting, GE Healthcare, UK). As imagens foram captadas usando o ChemiDoc XRS+ (BIORAD Inc.; CA). As bandas foram analisadas quantitativamente por densitometria no software Adobe Photoshop 6.0. O controle para normalização do conteúdo de proteínas totais em cada amostra foi realizado através do anticorpo anti-β tubulina IgG policlonal produzido em coelho (1:1000). (anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA)

2.12 Análise estatística

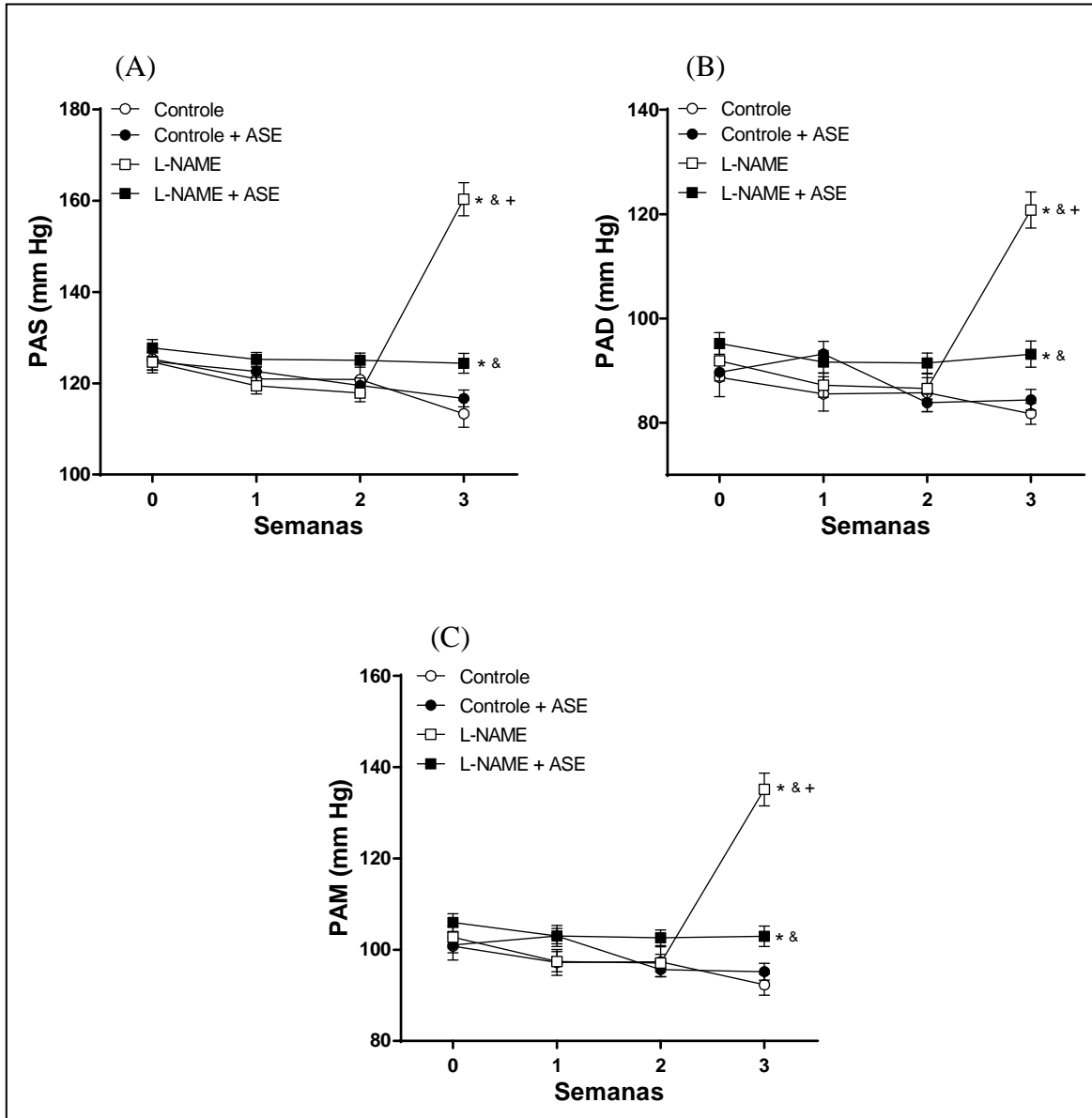
Os resultados foram expressos como média acompanhada do erro padrão da média ($X \pm e.p.m$) e foram analisados por meio de “One-way analysis of variance” (ANOVA), com posterior utilização do teste de Tukey.

3 RESULTADOS

3.1 Pressão arterial sistólica, diastólica e média durante o período gestacional

As pressões arteriais sistólica, diastólica e média foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no grupo L-NAME quando comparado aos demais grupos ao final da gravidez. Por outro lado, o tratamento com ASE foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de pressão nas ratas que receberam concomitantemente o L-NAME. Além disso, o grupo L-NAME + ASE apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controles, devido a uma queda da pressão arterial nesses grupos ao final da gravidez. (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Pressão Arterial Sistólica (A), Diastólica (B) e Média (C) (mm Hg) de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE durante o período de gestação. O tratamento foi iniciado na semana 2

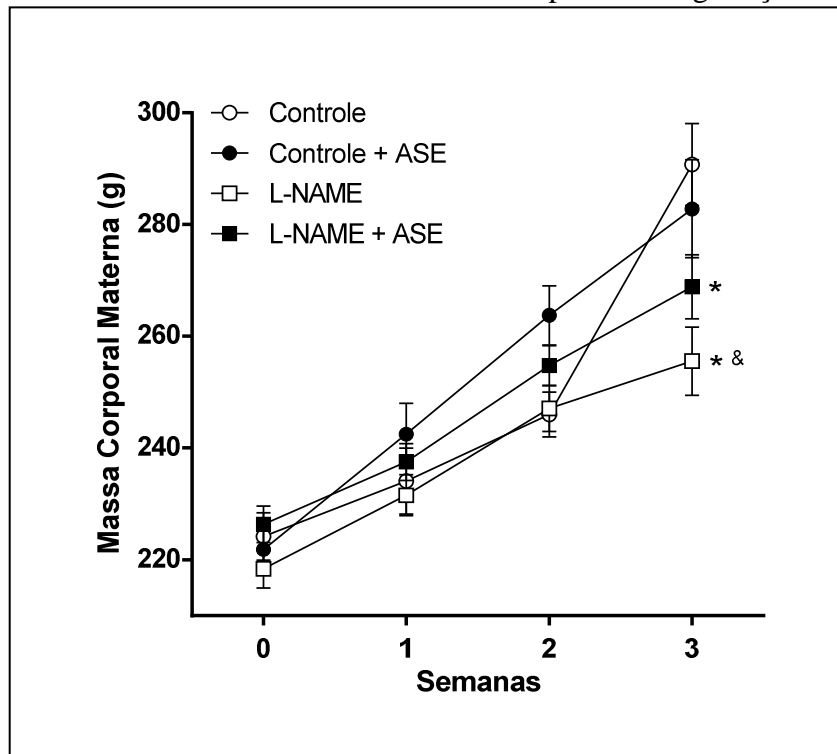


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 10 a 22 animais por grupo. $p < 0,05$ ⁺ vs L-NAME + ASE; [&] vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

3.2 Massa corporal materna no período gestacional

A massa corporal materna foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo L-NAME quando comparado aos grupos controles ao final da gravidez. O grupo L-NAME + ASE apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas em relação ao grupo Controle (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Massa corporal materna dos animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE durante o período de gestação



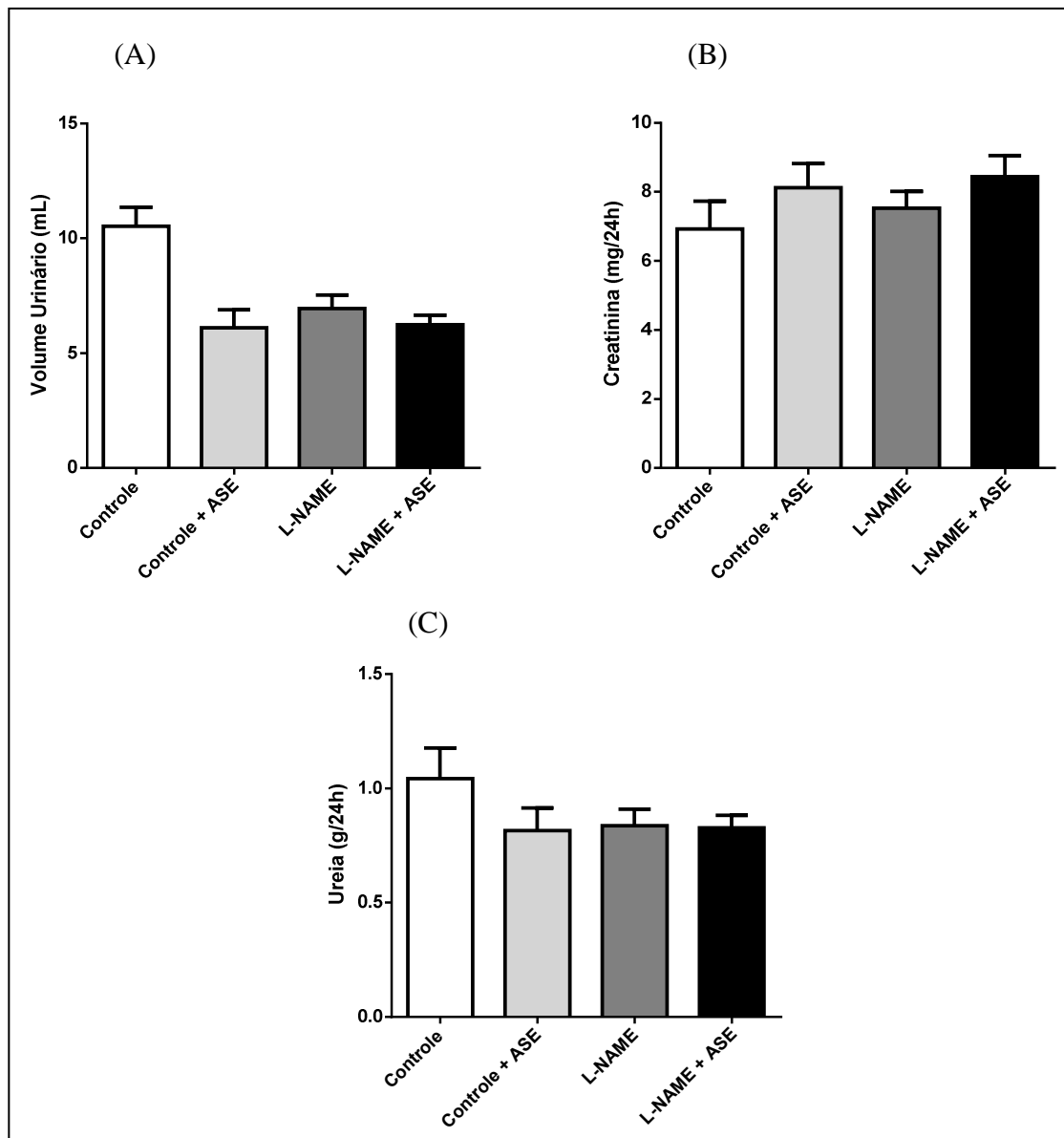
Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 10$ a 22 animais por grupo. $p < 0,05$ & vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

3.3 Análises bioquímicas na urina de 24h no final do período gestacional

3.3.1 Volume urinário, creatinina e ureia

Não foram observadas diferenças significativas quanto ao volume total urinário (Gráfico 3A), excreção de creatinina (Gráfico 3B) e ureia (Gráfico 3C) em coleta de 24 horas.

Gráfico 3 - Volume total urinário (mL) (A), excreção de creatinina (B) e ureia (C) em coleta de 24 horas dos animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE no 20^o dia de gestação

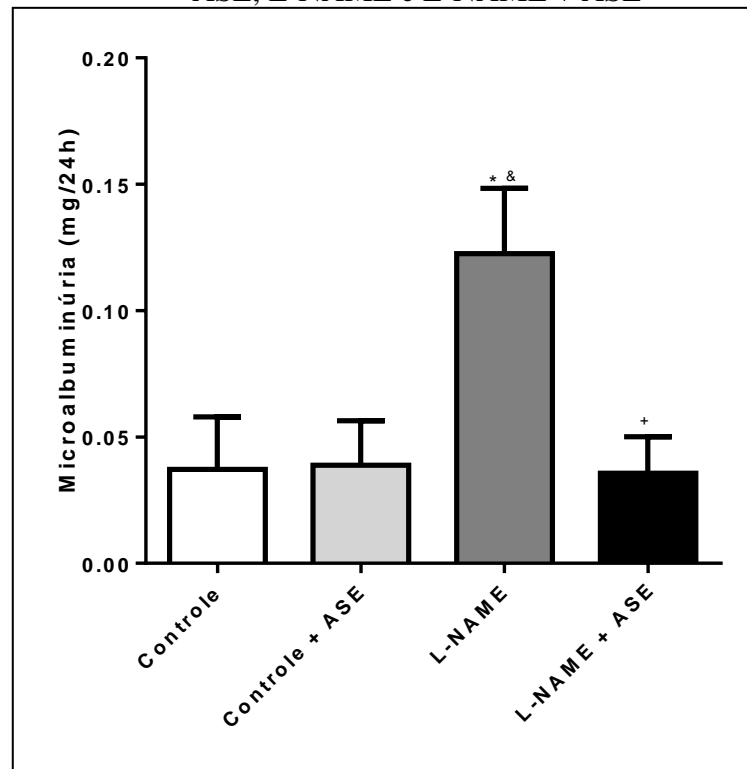


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 10 a 22 animais por grupo.

3.3.2 Microalbuminúria

A microalbuminúria de 24 horas foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo L-NAME em comparação aos grupos Controles. O tratamento com ASE preveniu esse aumento no grupo L-NAME + ASE, apresentando valores comparáveis aos grupos controles (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Microalbuminúria (mg/24h) de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE

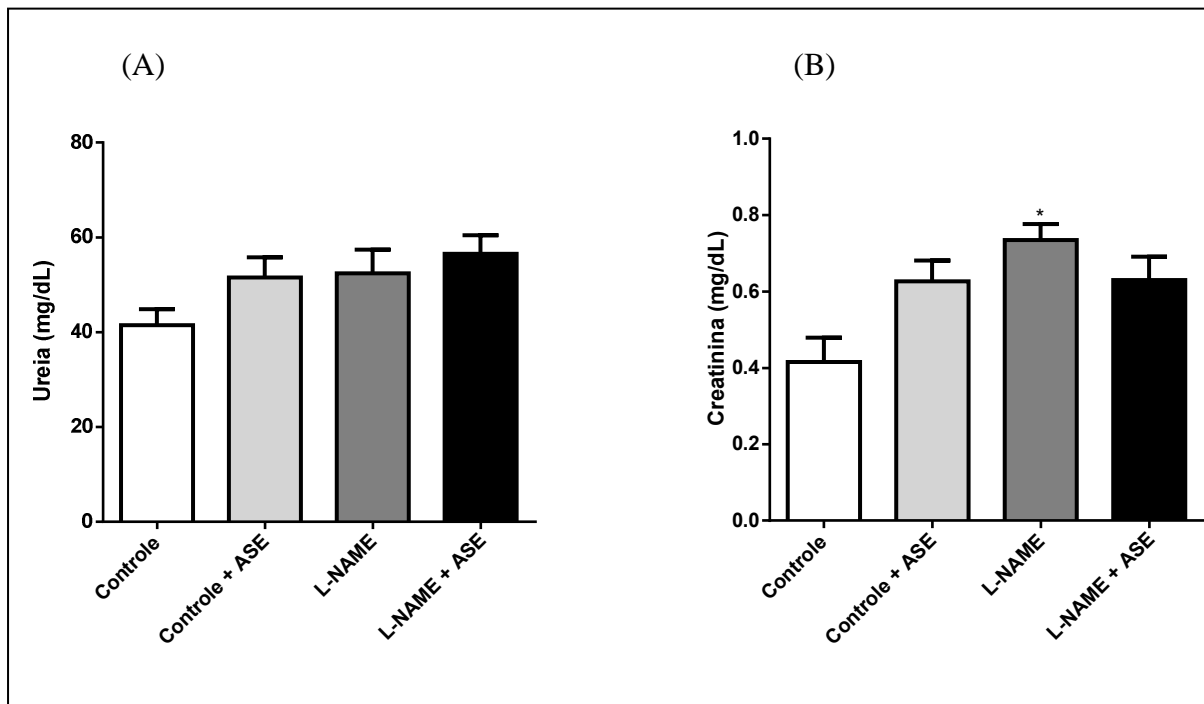


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 7$ a 11 animais por grupo. $p < 0,05$ ⁺ vs L-NAME; [&] vs CONTROLE + ASE; ^{*} vs CONTROLE.

3.4 Níveis plasmáticos de ureia e creatinina

Não foi observada diferença significativa entre os animais dos diferentes grupos estudados quanto à concentração plasmática de ureia (Gráfico 5A). Quanto à concentração de creatinina, o grupo L-NAME apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo Controle, e o tratamento com ASE não interferiu neste parâmetro (Gráfico 5B).

Gráfico 5 - Níveis plasmáticos de ureia (mg/dL) (A), e creatinina (mg/dL) (B) em animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 10$ a 16 animais por grupo em (A) e 7 a 14 animais por grupo em (B). $p < 0,05$ * vs CONTROLE.

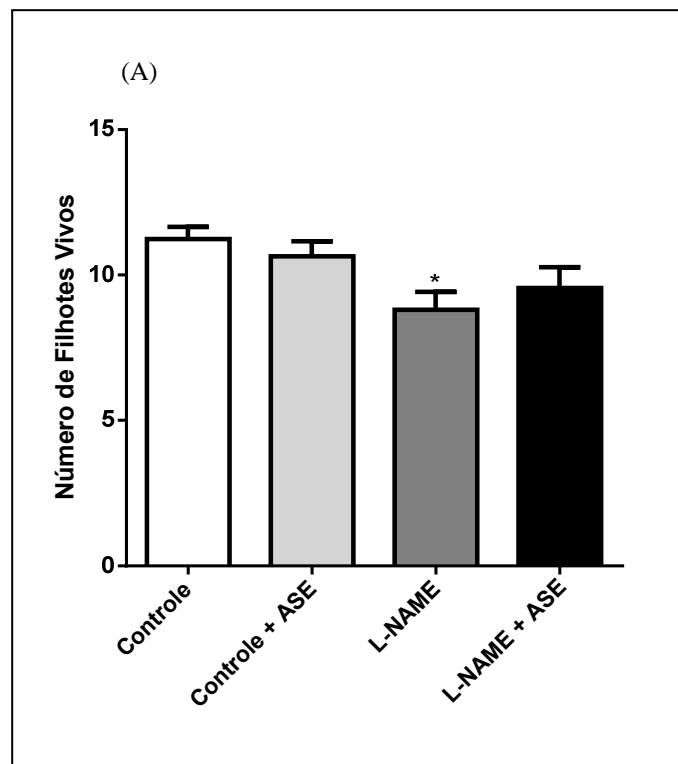
3.5 Número e massa dos filhotes vivos e massa placentária total

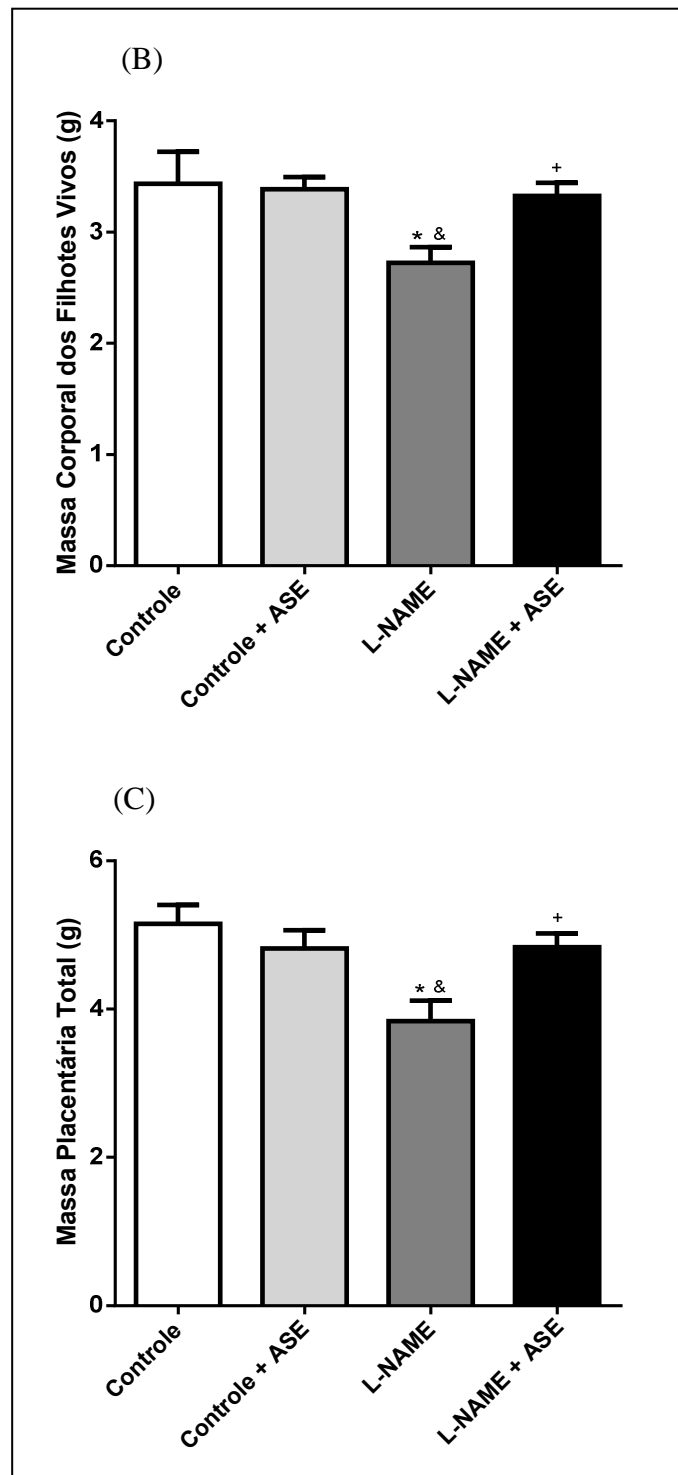
O número total de filhotes vivos por rata grávida ao final da gravidez foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo L-NAME quando comparado ao grupo Controle. Por outro lado, o tratamento com ASE não interferiu neste parâmetro tanto no grupo Controle + ASE quanto no grupo L-NAME + ASE (Gráfico 6A).

O peso dos filhotes vivos ao final da gravidez foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo L-NAME em comparação aos grupos Controles, e foi observado que o tratamento com ASE evitou essa redução no grupo L-NAME + ASE (Gráfico 6B).

A massa placentária total foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo L-NAME em comparação aos grupos Controles, e neste caso também foi observado que o tratamento com ASE atuou prevenindo a redução de massa placentária total, apresentando valores comparáveis aos grupos Controles (Gráfico 6C).

Gráfico 6 - Número de filhotes vivos por rata grávida (A), massa corporal dos filhotes vivos (B) e massa placentária total (C) dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE





Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 13 a 18 animais por grupo. $p < 0,05$ ⁺ vs L-NAME; [&] vs CONTROLE + ASE; ^{*} vs CONTROLE.

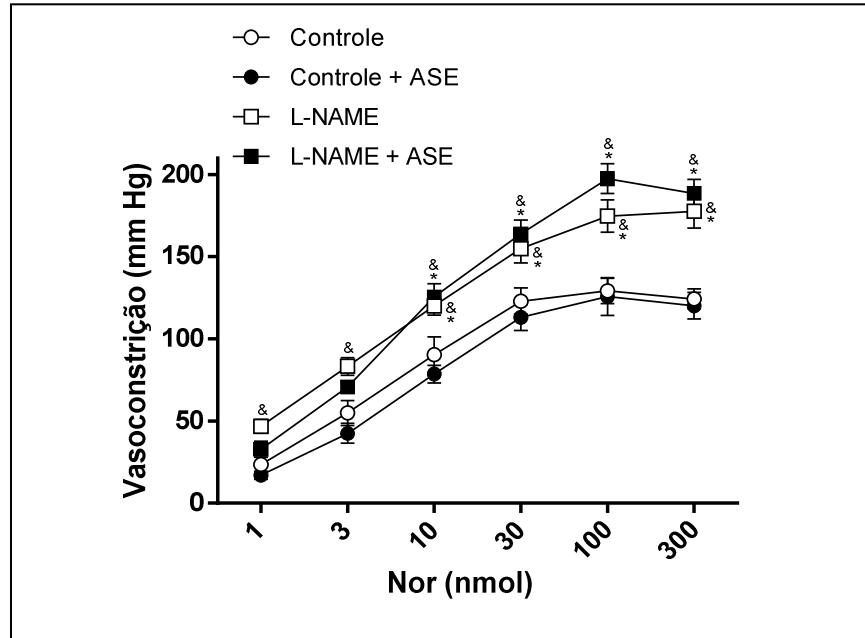
3.6 Reatividade do leito arterial mesentérico a substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras

3.6.1 Resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (NOR) e angiotensina II (Ang II)

A NOR produziu uma resposta vasoconstritora dose-dependente que foi significativamente maior ($p < 0,05$) em LAM dos animais do grupo L-NAME quando comparado aos grupos Controles. O tratamento com ASE não foi capaz de alterar essa resposta no grupo L-NAME + ASE, apresentando valores similares àqueles do grupo L-NAME (Gráfico 7).

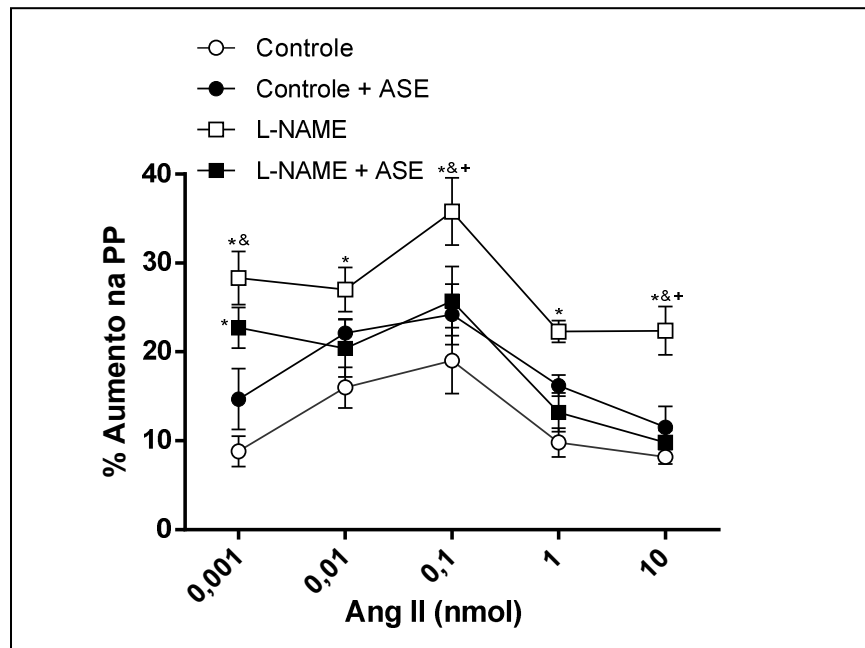
Como esperado, a Ang II produziu uma resposta bifásica, sendo predominantemente vasoconstritora em baixas doses e vasodilatadora em altas doses. Entretanto, a Ang II produziu uma resposta vasoconstritora significativamente maior ($p < 0,05$) em leito arterial mesentérico dos animais dos grupos L-NAME quando comparado aos grupos Controles na maioria das doses administradas. Observamos também que no grupo L-NAME + ASE, a Ang II induziu uma resposta vasoconstritora significativamente menor ($p < 0,05$) nas doses de 0,1 e 10 nmol quando comparado ao grupo L-NAME e somente apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle na menor dose (0,001 nmol) (Gráfico 8).

Gráfico 7 - Resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (NOR) em leito arterial mesentérico de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE.



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 5 a 9 animais por grupo. $p < 0,05$ & vs CONTROLE + ASE; *vs CONTROLE.

Gráfico 8 - Resposta vasoconstritora induzida pela angiotensina II (AngII) em leito arterial mesentérico de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 5 a 8 animais por grupo. $p < 0,05$ + vs L-NAME + ASE; & vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE. PP = Pressão de Perfusão.

3.6.2 Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (ACh), nitroglicerina (NG), bradicinina (BK), e angiotensina II (Ang II)

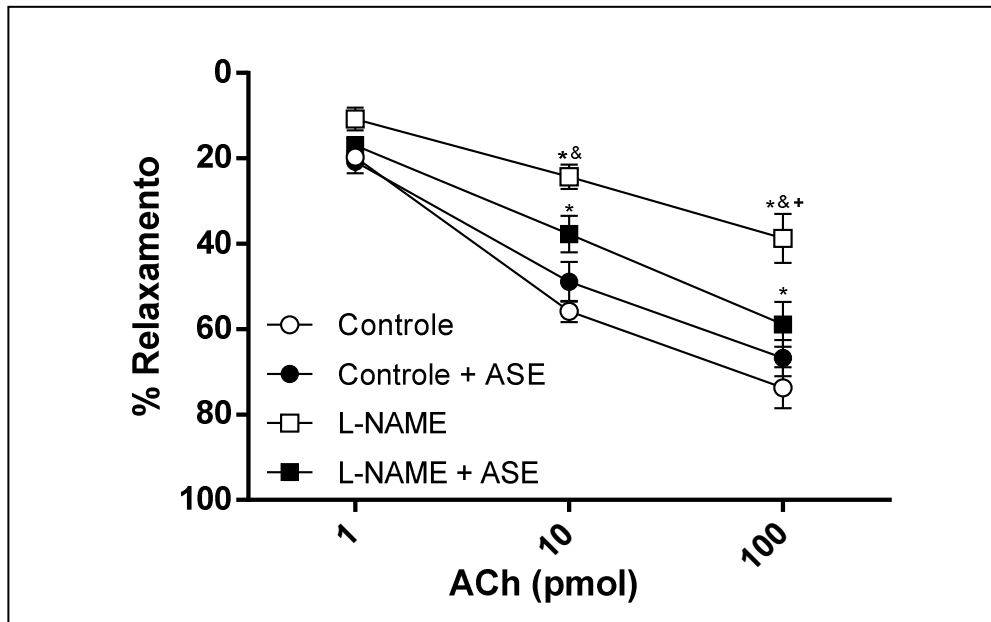
A ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente menor ($p < 0,05$) em leito arterial mesentérico de animais do grupo L-NAME quando comparado aos grupos Controles. O tratamento com ASE foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a resposta vasodilatadora da ACh na dose de 100 pmol no grupo L-NAME + ASE quando comparado ao grupo L-NAME. Apesar dessa resposta ser comparável àquela observada no grupo Controle + ASE, ainda há diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo Controle (Gráfico 9).

A NG produziu uma resposta vasodilatadora no LAM de todos os grupos experimentais na dose de 10 nmol. Essa resposta foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo L-NAME quando comparado aos grupos Controles. Por outro lado, o grupo L-NAME + ASE apresentou uma resposta significativamente menor ($p < 0,05$) do que no grupo L-NAME, sendo similar àquelas observadas nos grupos Controles (Gráfico 10).

A BK produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente menor ($p < 0,05$) em leito arterial mesentérico de animais do grupo L-NAME quando comparado aos grupos Controles. O tratamento com ASE foi capaz de promover um aumento significativo ($p < 0,05$) dessa resposta no grupo L-NAME + ASE quando comparado ao grupo L-NAME, sendo similares aos grupos Controles (Gráfico 11).

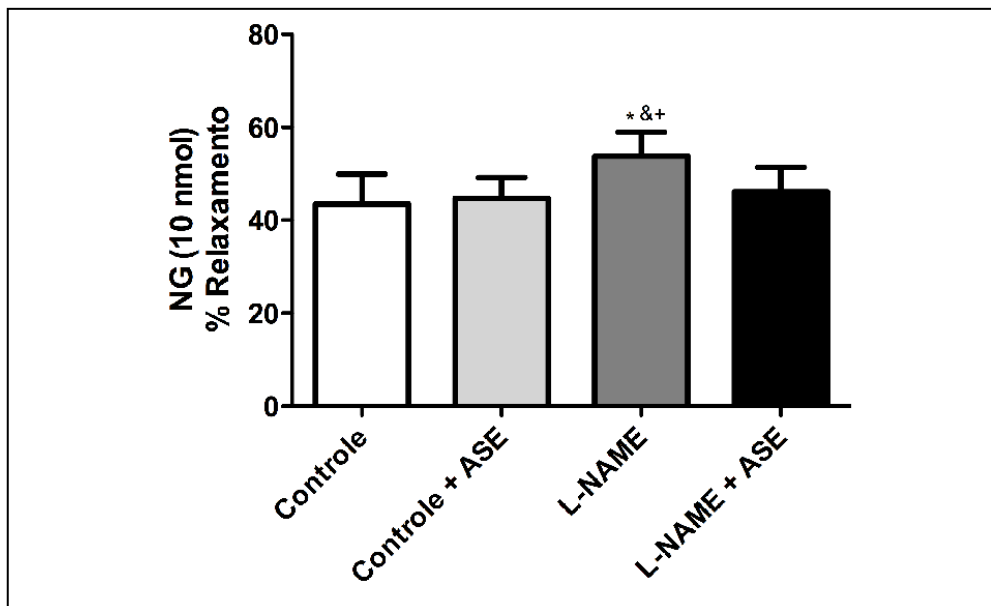
A Ang II produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente menor ($p < 0,05$) em leito arterial mesentérico de animais do grupo L-NAME quando comparado aos grupos Controles. O tratamento com ASE foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) essa resposta no grupo L-NAME + ASE quando comparado ao grupo L-NAME (Gráfico 12).

Gráfico 9 - Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em leito arterial mesentérico de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



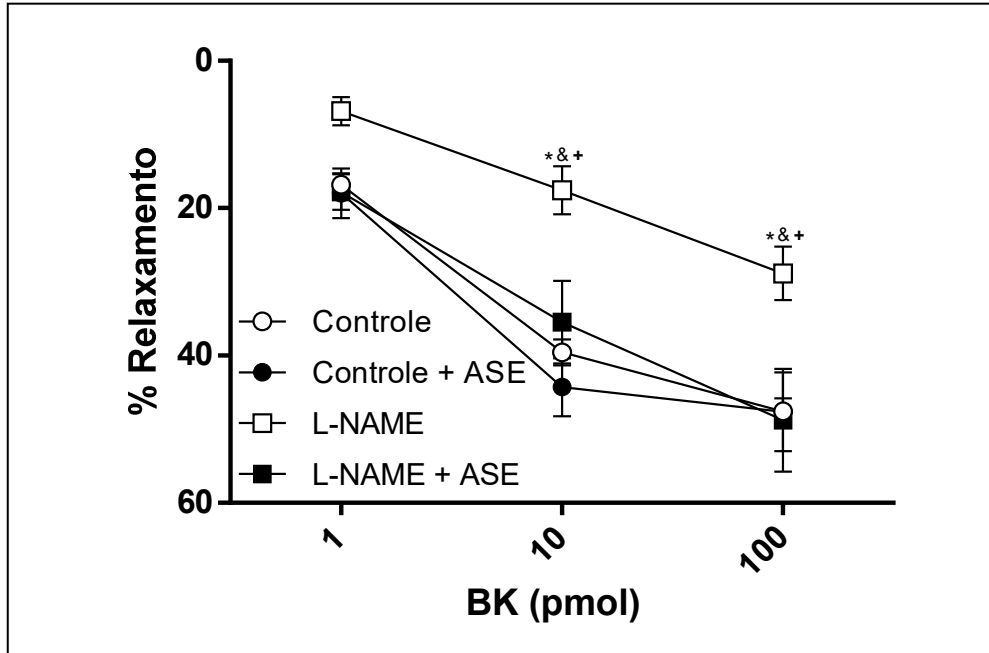
Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6 a 9 animais por grupo. p<0,05 ⁺ vs L-NAME + ASE; [&] vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

Gráfico 10 - Resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina (NG) em leito arterial mesentérico de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



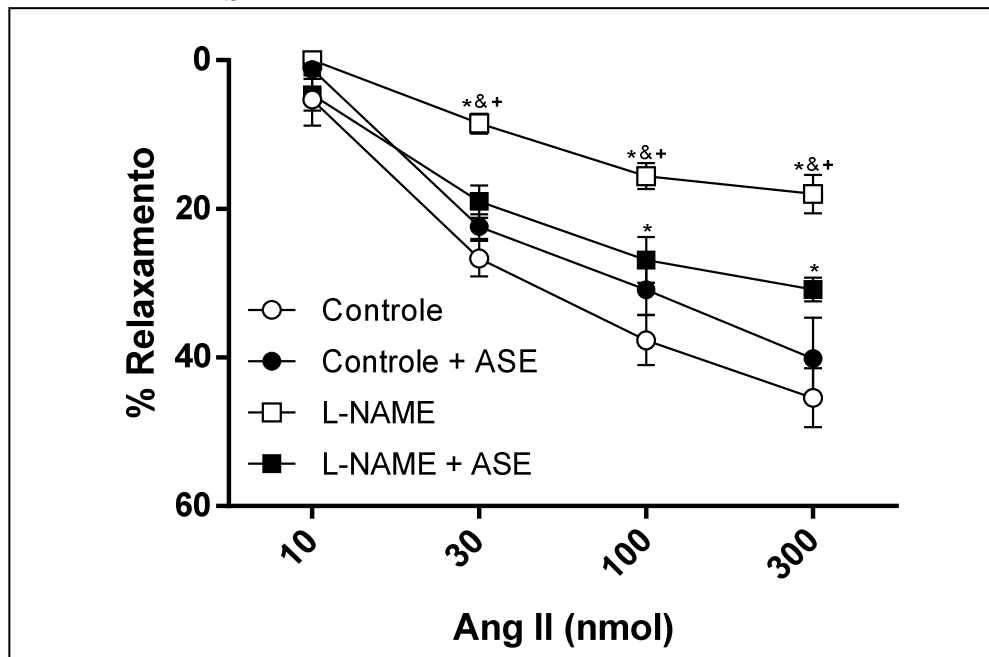
Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6-9 animais por grupo. p<0,05 ⁺ vs L-NAME + ASE; [&] vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

Gráfico 11 - Resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina (BK) em leito arterial mesentérico de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6 a 8 animais por grupo. p<0,05 + vs L-NAME + ASE; & vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

Gráfico 12 - Resposta vasodilatadora induzida pela angiotensina II (AngII) em leito arterial mesentérico de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 7 a 9 animais por grupo. p<0,05 + vs L-NAME + ASE; & vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

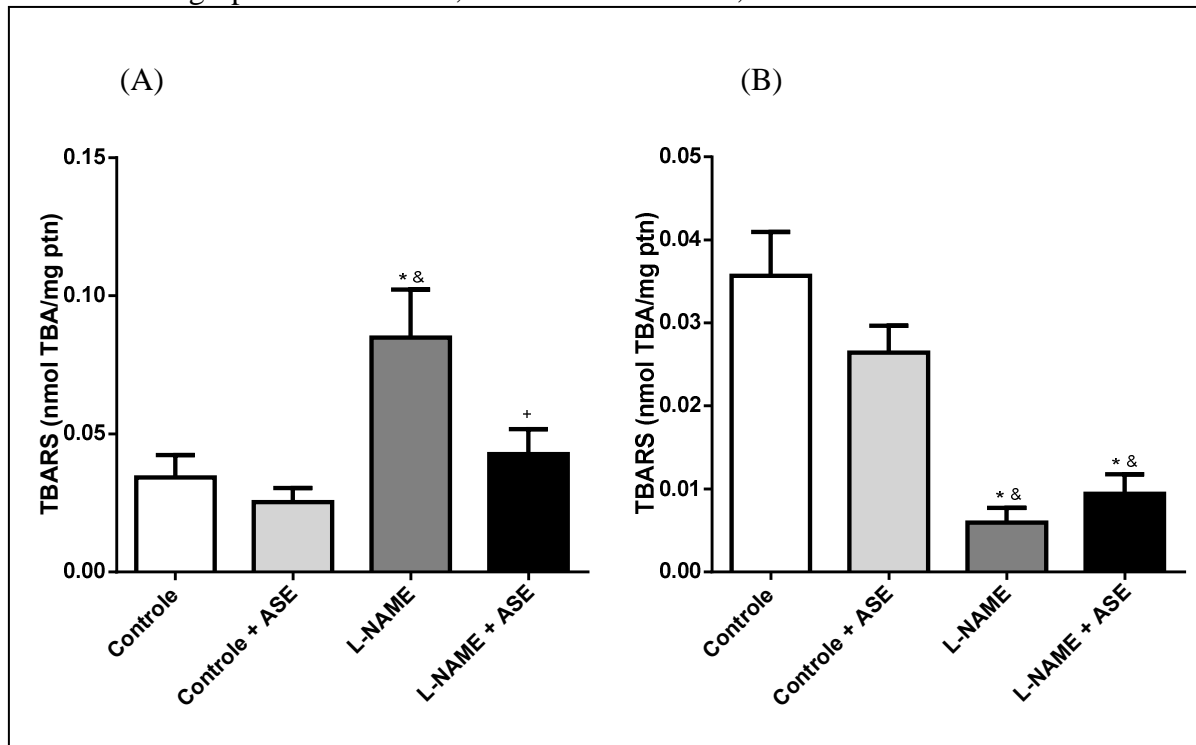
3.7 Dano oxidativo em plasma e leite arterial mesentérico

3.7.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na formação de subprodutos da peroxidação lipídica em amostras de plasma do grupo L-NAME quando comparado aos grupos Controle e Controle + ASE, e o tratamento com ASE foi capaz de prevenir este aumento (Gráfico 13A).

No LAM, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na formação desses subprodutos em amostras dos grupos L-NAME e L-NAME + ASE quando comparado aos grupos controle (Gráfico 13B).

Gráfico 13 - Níveis de TBARS em amostras de plasma (A) e LAM (B) de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE.

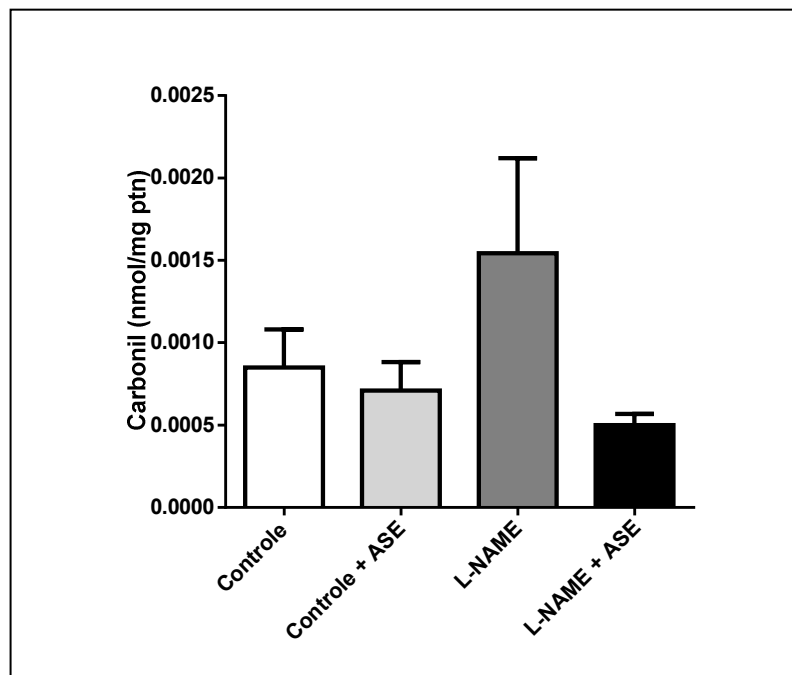


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 7 a 10 animais por grupo em (A) e 6 a 8 animais por grupo em (B). $p < 0,05$ ⁺ vs L-NAME; [&] vs CONTROLE + ASE; ^{*} vs CONTROLE.

3.7.2 Carbonilação de proteínas

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à carbonilação de proteínas em amostras de LAM (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Níveis de carbonil em amostras de LAM de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE



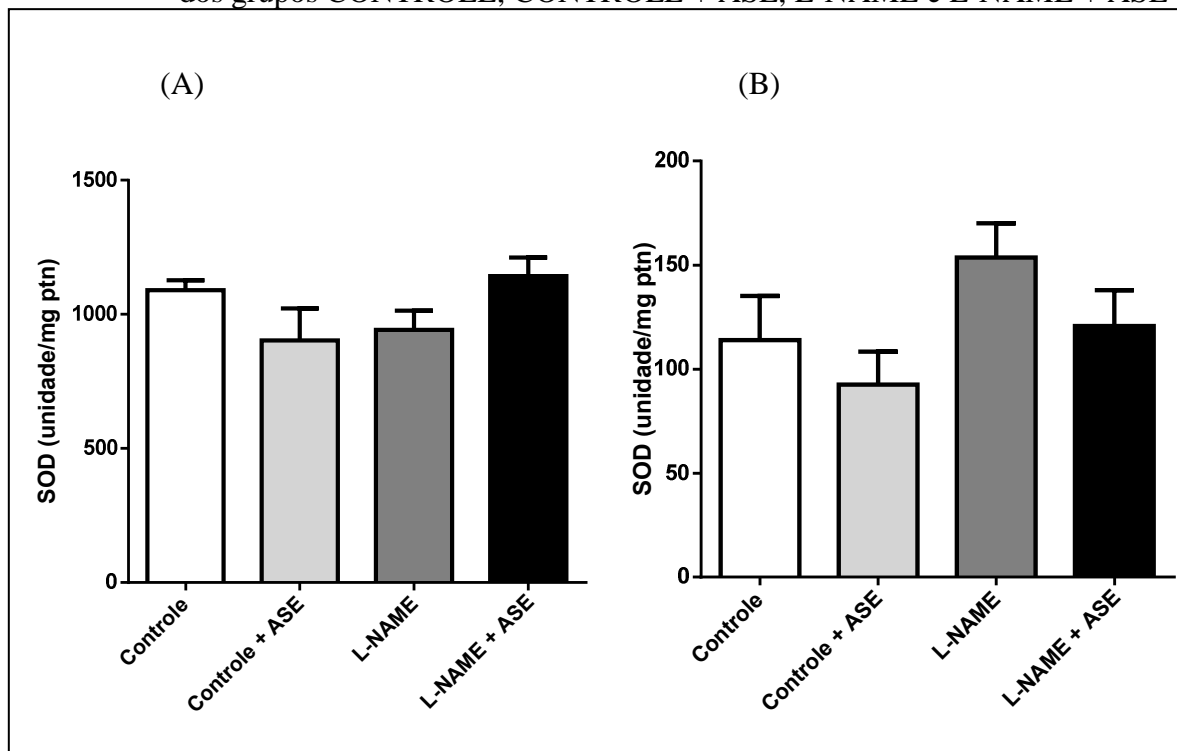
Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 5 a 6 animais por grupo.

3.8 Atividade de enzimas antioxidantes em plasma e leito arterial mesentérico

3.8.1 Superóxido dismutase (SOD)

Não houve diferença significativa nos níveis de atividade da enzima SOD nas amostras de plasma e LAM dos quatro grupos experimentais (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Atividade da enzima SOD em amostras de plasma (A) e LAM (B) de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE

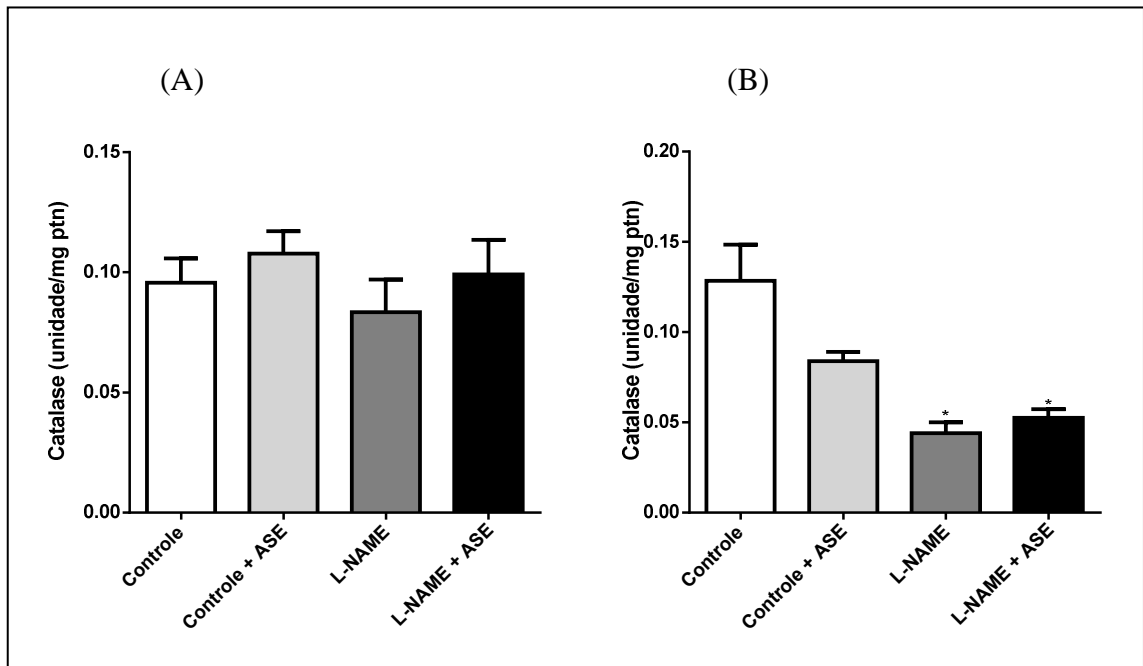


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 9 animais por grupo em (A) e 5 a 7 animais por grupo em (B).

3.8.2 Catalase (CAT)

Foi verificada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade da CAT em amostras de LAM nos grupos L-NAME e L-NAME+ASE quando comparado ao grupo Controle (Gráfico 16B). Em amostras de plasma, não foram observadas diferenças significativa na atividade dessa enzima (Gráfico 16A).

Gráfico 16 - Atividade da enzima CAT em amostras de plasma (A) e LAM (B) de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE

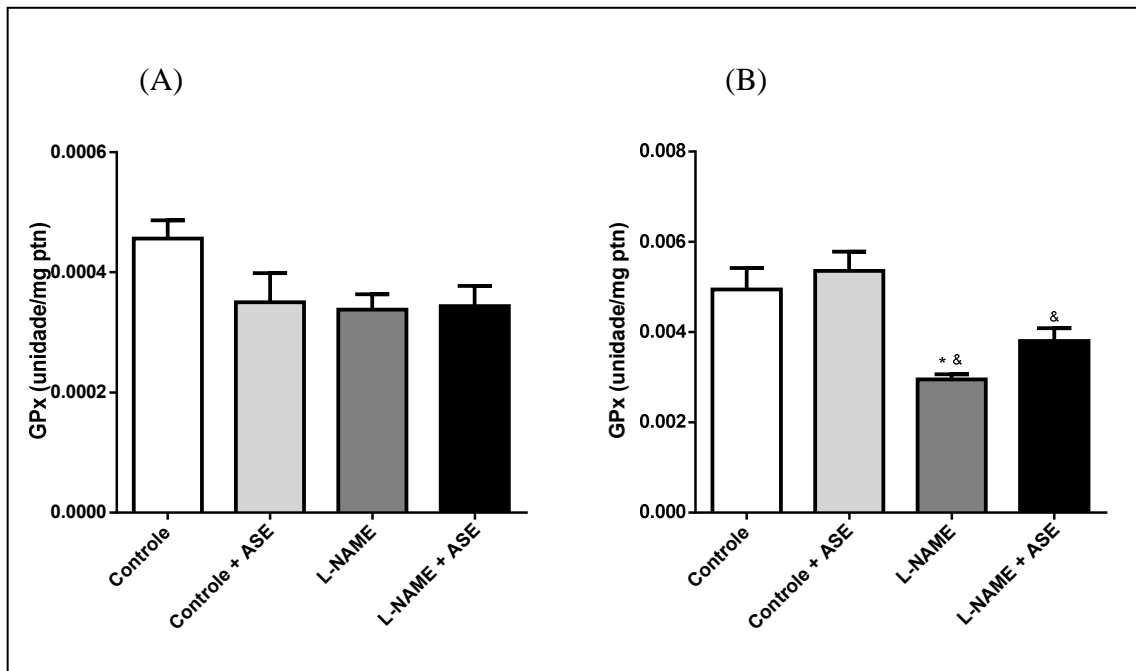


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6$ a 9 animais por grupo em (A) e 5 a 6 animais por grupo em (B). $p < 0,05$ * vs CONTROLE.

3.8.3 Glutationa peroxidase (GPx)

Não houve alteração significativa no nível de atividade da enzima GPx em amostras de plasma dos diferentes grupos estudados (Gráfico 17A). Nas amostras de LAM, a atividade da GPx está significativamente diminuída ($p < 0,05$) no grupo L-NAME em comparação aos grupos controles, e o tratamento com ASE foi capaz de aumentar a atividade a níveis comparáveis ao grupo Controle (Gráfico 17B).

Gráfico 17 - Atividade da enzima GPx em amostras de plasma (A) e LAM (B) de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE

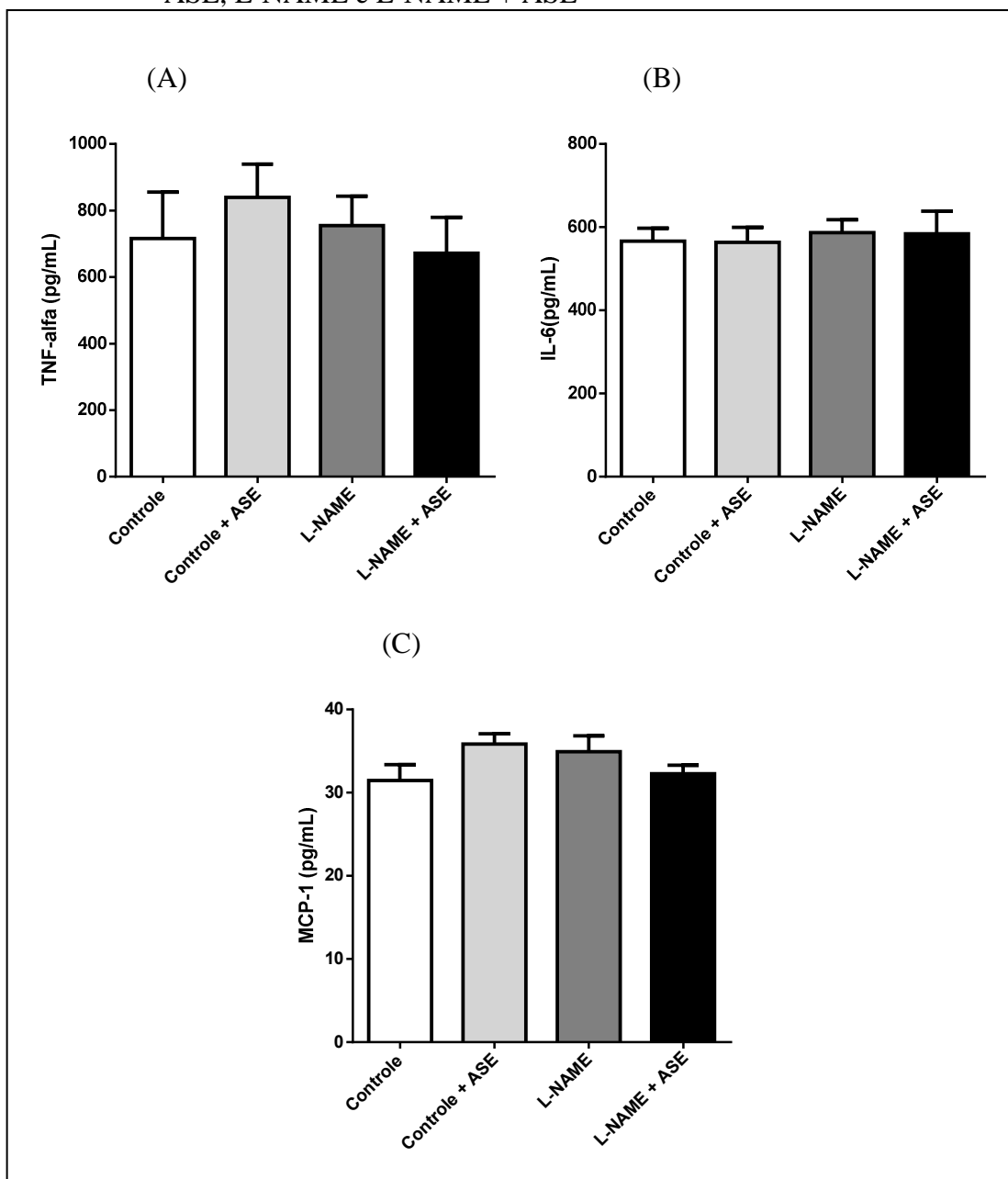


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 8$ a 9 animais por grupo em (A) e 5 animais por grupo em (B). $p < 0,05$ & vs CONTROLE + ASE; * vs CONTROLE.

3.9 Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e MCP-1 nos diferentes grupos estudados (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Níveis plasmáticos das citocinas pró inflamatórias TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C) em animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE

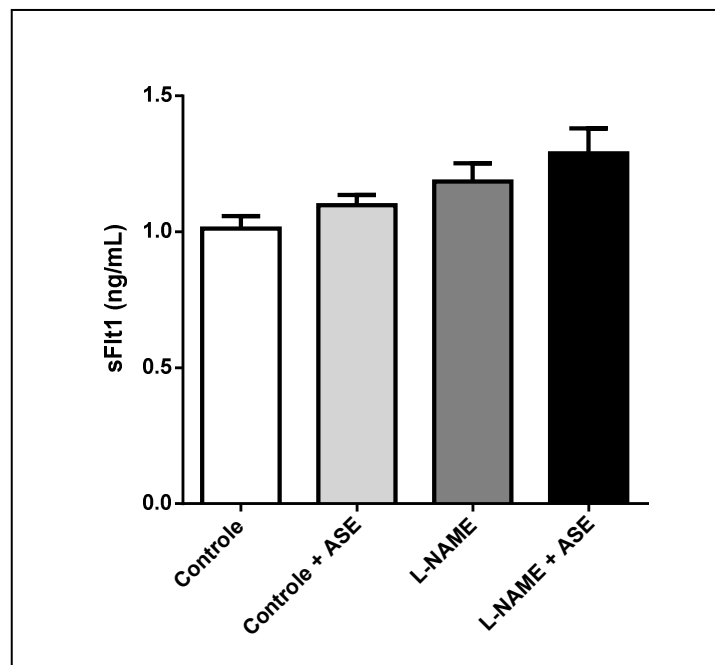


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6 a 8 animais por grupo em (A) e (B) e 7 a 16 animais por grupo em (C)..

3.10 Níveis plasmáticos do fator antiangiogênico sFLT1

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos do fator antiangiogênico sFLT1 nos diferentes grupos estudados (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Níveis plasmáticos do fator antiangiogênico sFLT1 em animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE

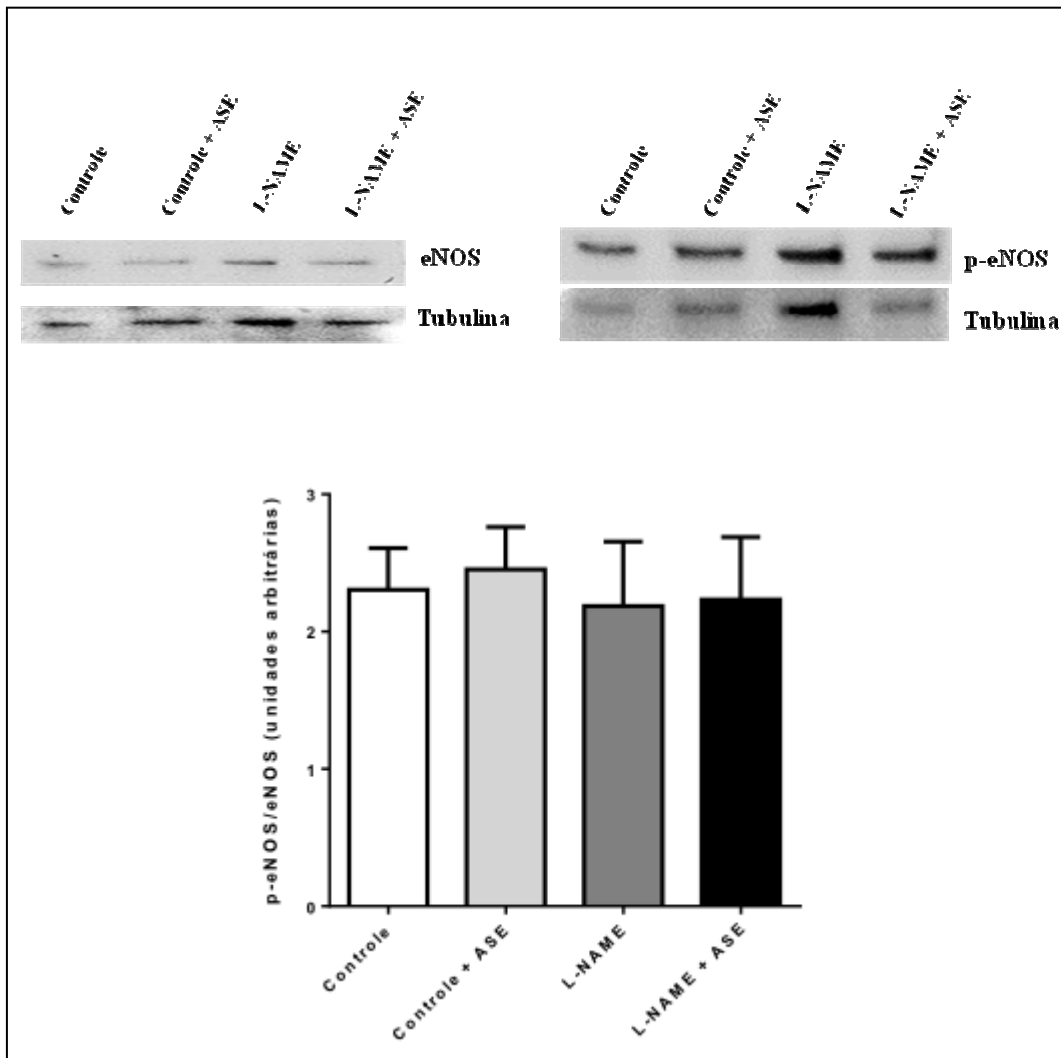


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 6 a 7 animais por grupo.

3.11 Expressão proteica de eNOS e p-eNOS

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de p-eNOS eNOS, assim como na relação entre elas em amostras de LAM dos diferentes grupos experimentais (Gráfico 20).

Gráfico 20 - Relação da expressão proteica de p-eNOS/eNOS em amostras de LAM de animais dos grupos CONTROLE, CONTROLE + ASE, L-NAME e L-NAME + ASE.



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n= 5 a 6 animais por grupo.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos os efeitos do tratamento preventivo com ASE sobre as alterações cardiovasculares maternas e restrição do crescimento fetal em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida pela administração de L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase.

O óxido nítrico é um potente vasodilatador que é sintetizado a partir da L-arginina pela NOS. A inibição crônica desta enzima, com a utilização de L-NAME, em ratas grávidas constitui um modelo farmacológico de PE caracterizado por hipertensão, proteinúria, redução da filtração glomerular, trombocitopenia e restrição do crescimento fetal (MCCARTHY et al., 2011). De acordo com dados prévios da literatura, nosso estudo demonstrou que a administração de L-NAME, na última semana de gestação de ratas Wistar, promoveu complicações características da PE, tais como hipertensão e elevados níveis de microalbuminúria. Ainda, as ratas grávidas que receberam L-NAME apresentaram menor ganho de peso, o que pode estar relacionado a menor massa placentária assim como ao menor número e peso dos filhotes, reproduzindo a restrição do crescimento fetal observado na PE (BROWN et al., 2013; MCCARTHY et al., 2011; AMARAL et al., 2018). Tais condições proporcionadas pelo L-NAME sustentam o envolvimento do NO na fisiopatologia da PE.

Em adição, nosso estudo demonstrou pela primeira vez a capacidade do ASE em prevenir as manifestações características da PE promovidas pela administração do L-NAME. O ASE foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertensão e da microalbuminúria materna, assim como impediu a restrição do crescimento fetal e redução da massa placentária, promovendo proteção tanto para a mãe quanto para os fetos.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o ASE é rico em polifenóis como catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas (OLIVEIRA et al., 2015), induz vasodilatação dependente de endotélio (ROCHA et al., 2007), possui ação anti-hipertensiva nos modelos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e de hipertensão renovascular, com a inserção de clip de prata na artéria renal esquerda (2R1C – 2 rins 1 clip), e apresenta importante efeito antioxidante (ROCHA et al., 2008; COSTA et al., 2012). Rocha et al. (2007) demonstraram que o ASE promove um efeito vasodilatador, que é dependente da ativação da via NO-GMPc e sugerem que o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) poderia participar do efeito vasodilatador do ASE através da abertura de canais de

potássio. Além disso, este extrato também promove a liberação de NO por células endoteliais *in vitro*.

Dados prévios do nosso grupo também demonstraram que o tratamento crônico com ASE foi capaz de aumentar a expressão da eNOS total vascular em dois modelos de hipertensão, SHR e 2R1C (ROCHA et al., 2008; COSTA et al., 2012). Ainda, diversos estudos demonstraram que polifenóis derivados de plantas promovem a ativação da via de sinalização redox-sensível PI3K-Akt, culminando com a fosforilação e ativação da eNOS, promovendo, desta forma, a manutenção da função endotelial e a redução do risco de doenças cardiovasculares (MADEIRA et al., 2009; EDIRISINGHE et al., 2008; 2011).

No presente estudo, apesar de não observarmos uma modificação da expressão da eNOS total e da sua forma fosforilada no resíduo de serina (ser1177) com o tratamento com ASE, sabemos que há outros pontos de fosforilação e desfosforilação da enzima que estão relacionados a sua atividade que não foram investigados. Logo, não podemos descartar a possível modulação da atividade da eNOS exercida pelo ASE neste estudo. Além disso, o efeito benéfico do ASE poderia estar relacionado à liberação de EDHF, o que contribuiria para a hiperpolarização das células musculares lisas vasculares, levando à vasodilatação e melhora da perfusão útero-placentária promovidos pelo extrato, prevenindo o aumento da pressão arterial, o comprometimento renal e a restrição do crescimento fetal neste modelo.

Na gestação normal, há um aumento na produção endotelial de prostaciclina, NO e EDHF (VALDES et al., 2009; GILLHAM; KENNY; BAKER, 2003). Por outro lado, alterações no tônus vascular, influenciadas por fatores hormonais e mecânicos, promovem o aumento na resistência vascular periférica, o que implica no desenvolvimento da hipertensão (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2003; MULVANY, 2005). A disfunção endotelial materna está associada a uma redução de importantes vasodilatadores derivados do endotélio como o NO placentário e prostaciclina e a um aumento da produção de potentes vasoconstritores como endotelina-1 e tromboxano A2 (GRANGER et al., 2001). As modificações vasculares funcionais na pré-eclâmpsia também incluem o aumento da resistência vascular periférica e da sensibilidade a angiotensina II e a noradrenalina (CHESLEY et al., 1965; GANT et al., 1973).

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que há uma redução das respostas vasodilatadoras dependentes de endotélio da Ach e da Ang II em leito arterial mesentérico de ratas grávidas que receberam L-NAME (AMARAL et al., 2018). A reduzida resposta vasodilatadora da Ach também foi descrita em anéis de aorta de diferentes modelos experimentais, incluindo a PE induzida pelo L-NAME (TALEBIANPOOR; MIRKHANI,

2012; CREWS et al., 2000; TAKIUTI et al., 1999). Esses resultados sugerem que a reduzida biodisponibilidade de NO exerce uma influência negativa sobre o relaxamento dependente de endotélio da Ach e da Ang II, o que pode contribuir para o aumento da resistência vascular periférica e da pressão arterial na PE.

Dados do presente estudo também demonstraram uma redução nas respostas vasodilatadoras induzidas por ACh, BK e Ang II, agentes que promovem vasodilatação dependente de endotélio, em LAM isolado de ratas grávidas que receberam L-NAME, reforçando que neste modelo é observada uma disfunção endotelial, assim como ocorre na PE em humanos. Por outro lado, verificamos que os animais do grupo L-NAME apresentaram respostas vasodilatadoras a nitroglicerina aumentadas. A NG é um nitrato orgânico cujo metabolismo gera NO, estimulando a formação de GMPc, que atua no mecanismo de relaxamento da musculatura lisa vascular. Sendo assim, trata-se de um vasodilatador independente do endotélio vascular. Esse resultado encontrado em nosso estudo sugere que ocorram alterações adaptativas em resposta a menor biodisponibilidade de NO causada pela inibição da eNOS. Essas adaptações tornariam o aparato vasodilatador mais sensível ao NO. Este dado reforça o papel da disfunção endotelial, mas não de uma disfunção do músculo liso vascular no comprometimento das respostas vasodilatadoras da Ach, BK e Ang II na PE.

Dados relevantes do presente estudo mostram que o tratamento com ASE é capaz de melhorar as respostas vasodilatadoras dependentes de endotélio induzidas pela ACh, BK e Ang II e normalizar a resposta vasodilatadora independente de endotélio induzida pela NG, revelando uma melhora na função endotelial no modelo de pré-eclâmpsia induzida pelo L-NAME. Dados recentes do nosso grupo também demonstraram que o ASE melhora a disfunção endotelial em modelo de hipertensão renovascular (2R1C) (COSTA et al., 2012), corroborando os dados encontrados no presente estudo.

Uma menor sensibilidade a agonistas adrenérgicos foi observada em artéria aorta e uterina na gravidez normal (HERMSTEINER; ZOLTAN; KÜNZEL, 2001; KHALIL et al., 1998; STENNETT et al., 2009). Por outro lado, na PE em humanos as mudanças funcionais também incluem uma maior sensibilidade a vasoconstritores e aumento da resistência vascular periférica (GANT et a., 1973; CHESLEY et al., 1965). Além disso, na gravidez normal os monômeros de receptores AT1 são inativados por EROs, levando a uma menor sensibilidade a Ang II, enquanto na PE o receptor AT1 forma um heterodímero com receptor B2 da bradicinina, tornando-se resistente à inativação por EROs e hiperresponsivo a Ang II (ALI; A KHALIL, 2015).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o comprometimento da modulação do NO em ratas grávidas que receberam L-NAME aumentou a sensibilidade a noradrenalina e Ang II, o que está de acordo com dados prévios do nosso grupo (AMARAL et al., 2018). Estes dados também estão de acordo com Talebianpoor e Mirkhani (2012), que observaram uma maior sensibilidade aos efeitos vasoconstritores induzidos pela fenilefrina (agonista alfa-1 adrenérgico) em anéis de aorta de ratas com características da PE induzidas pelo L-NAME. Anderson et al. (2006) também demonstraram um aumento das respostas pressoras induzidas por Ang II e fenilefrina em artérias mesentéricas no modelo animal de pré-eclâmpsia induzida pela redução da pressão de perfusão uteroplacentária. O presente estudo também demonstrou que o tratamento com ASE reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela Ang II, mas não alterou a resposta da noradrenalina. O efeito benéfico do ASE sobre a resposta vasoconstritora da Ang II pode estar relacionado a uma melhora da modulação endotelial de maneira geral, como também ao aumento da resposta vasodilatadora deste peptídeo promovida pelo tratamento.

Dentre os fatores que contribuem para a disfunção endotelial, grande importância tem sido atribuída ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação de substâncias oxidantes e a ação de moléculas antioxidantes, prevalecendo uma maior concentração de espécies altamente reativas que ocasionam severos danos a estruturas celulares tais como lipídeos de membranas, proteínas, DNA e RNA. Essa condição pode ser decorrente de uma produção aumentada de EROs e ERNs através das diferentes vias metabólicas que geram essas espécies, ou pela deficiente atividade do sistema de proteção antioxidante (REID, 2006; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Nosso estudo mostrou um aumento significativo na formação de malondialdeído (MDA) em plasma de animais tratados com L-NAME, sugerindo um aumento do dano oxidativo em lipídios em nível sistêmico em ratas com PE, corroborando os dados obtidos por outros grupos de pesquisa (DONG; SHI, 2016; KEMSE; KALE; JOSHI, 2014). Porém, em homogenato de LAM, a carbonilação de proteínas não diferiu entre os grupos experimentais, enquanto a formação de MDA foi significativamente reduzida pelo tratamento com L-NAME, mostrando que não há uma correlação com os dados obtidos no plasma e que, possivelmente, há um mecanismo adaptativo no território vascular. O tratamento com ASE impediu a peroxidação lipídica medida em plasma, enquanto manteve esse parâmetro em níveis reduzidos no LAM.

As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa do organismo contra as espécies reativas com capacidade de promover dano oxidativo, tendo papel de

destaque as enzimas SOD, CAT e GPx. Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na atividade dessas enzimas no plasma dos diferentes grupos. Logo, a redução da peroxidação lipídica observada no plasma poderia estar relacionada a um efeito *scavenger* dos polifenóis presentes no ASE e não pelo aumento dessas enzimas antioxidantes. Por outro lado, em homogenato de LAM, a atividade da SOD, primeira linha de defesa antioxidante, é mantida em níveis normais no grupo L-NAME, enquanto há uma redução da atividade da CAT e da GPx. Ainda, o ASE preveniu parcialmente a reduzida atividade da GPx em ratos que receberam L-NAME, mas não foi capaz de prevenir a reduzida atividade da CAT ou modificar a atividade da SOD neste grupo. Logo, o aumento da atividade da GPx no grupo L-NAME+ASE aliado à manutenção da atividade da SOD poderiam contribuir, pelo menos parcialmente, para os efeitos benéficos observados sobre a função vascular do LAM desses animais. Estudos prévios do nosso grupo já demonstraram o efeito antioxidante do ASE em modelos de hipertensão, obesidade e diabetes (COSTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; BEM et al., 2018).

Atualmente é proposto que o desenvolvimento da PE ocorre em dois estágios (ROBERTS; HUBEL, 2009), onde o primeiro estágio é caracterizado pela condição de hipóxia da circulação placentária, ocasionada pelo anormal desenvolvimento da placenta. Esse processo resulta no aumento da produção e de secreção de fatores, tais como anti-angiogênicos, pró-inflamatórios e pró-oxidativos, que contribuem para o desenvolvimento da disfunção endotelial. Dados de trabalho recente certificam que o modelo de PE induzido por L-NAME não interfere na perfusão placentária (LÉMERY MAGNIN et al., 2018), porém alguns trabalhos mostram a ocorrência de dano oxidativo e aumento da expressão de TNF- α (KEMSE; KALE; JOSHI, 2014), bem como níveis aumentados de sFLT1 e reduzidos de VEGF (DONG; SHI, 2016), caracterizando assim um desequilíbrio angiogênico reproduzido em modelo de PE induzida por L-NAME.

O sFLT1 é um potente anti-angiogênico produzido em abundância pela placenta em condições de PE (MAYNARD et al., 2003), e é atualmente considerado um ator relevante no desenvolvimento da PE (POWE; LEVINE; KARUMANCHI, 2011).

O VEGF age nos seus receptores que estão altamente expressos nas células endoteliais, e sua atuação está diretamente associada a manutenção da homeostase vascular (FONG et al., 1995; SHALABY et al., 1995; POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011). O sFLT1 se liga ao VEGF impedindo sua ação fisiológica. Estudos demonstraram que uma superexpressão de sFLT1 está diretamente relacionada à diminuição da atividade da eNOS (BURKE et al., 2016), o que contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial.

Vários trabalhos relatam que o sFLT1 está aumentado na circulação de pacientes com PE, e que essa alteração na disponibilidade desse fator é detectada antes do surgimento das manifestações clínicas da PE (RANA et al., 2012), sugerindo que seja uma consequência do primeiro estágio do desenvolvimento da PE.

O processo inflamatório também é amplamente discutido como ator no desenvolvimento da PE. Estudos indicam que o processo inflamatório característico da PE tem sua origem na placentação anormal, desencadeando um desequilíbrio na função imune, levando a uma inflamação crônica (REDMAN; SARGENT, 2010) com características de doenças autoimunes (IRANI et al., 2010). As citocinas TNF- α , IL-6 são de natureza pró-inflamatória e estão em níveis aumentados no plasma e na placenta de pacientes acometidas com PE, enquanto que IL-4 e IL-10, que são tipicamente anti-inflamatórias, estão em níveis reduzidos (KEISER et al., 2009; ARRIAGA-PIZANO et al., 2005; HENNESSY et al., 1999), contribuindo para o desenvolvimento da inflamação na PE. No entanto, outros estudos não evidenciaram diferenças significativas nos níveis de TNF- α em paciente com PE (AFSHARI et al., 2005; OZLER et al., 2012). Trabalhos onde o modelo de L-NAME foi usado também mostram um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias (DONG; SHI, 2016).

Nosso estudo não evidenciou diferença significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e MCP-1) e do fator antiangiogênico sFLT1 no plasma dos animais nos diferentes grupos estudados, sugerindo que a hipertensão no nosso estudo esteja mais relacionada à redução da biodisponibilidade de NO. Entretanto não é possível descartar que a expressão de citocinas antiinflamatórias também esteja alterada nesse modelo com L-NAME, uma vez que já foi demonstrada a redução da expressão dessas citocinas (DONG; SHI, 2016).

Nossos dados são diferentes daqueles obtidos por outros grupos de pesquisa (DONG; SHI, 2016; GONÇALVES-RIZZI et al., 2016; POSSOMATO-VIEIRA et al., 2016), sugerindo que a via de administração do L-NAME no nosso estudo pode ter influenciado nas diferenças observadas nestes parâmetros, já que no nosso estudo o L-NAME foi administrado em água de beber, enquanto que nos outros trabalhos a administração foi realizada via gavagem (DONG; SHI, 2016) ou injeções intraperitoneais (GONÇALVES-RIZZI et al., 2016; POSSOMATO-VIEIRA et al., 2016).

CONCLUSÃO

Os resultados do nosso trabalho demonstraram que o tratamento crônico com o ASE previne o desenvolvimento da hipertensão, da disfunção endotelial e do comprometimento renal materno, bem como a restrição do crescimento fetal no modelo de pré-eclâmpsia induzida pelo L-NAME. Assim, o ASE foi capaz de promover proteção tanto para as gestantes quanto aos fetos neste modelo experimental de pré-eclâmpsia, abrindo uma possibilidade do seu uso na pré-eclâmpsia humana.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-KARIM, R.; ASSALI, N.s.. Pressor response to angiotonin in pregnant and nonpregnant women. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 82, n. 2, p.246-251, ago. 1961. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(61\)90053-9](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(61)90053-9).
- AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.121-126, 1984. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
- AFSHARI, J Tavakkol et al. Determination of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. **Bmc Pregnancy And Childbirth**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.5-14, 1 nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2393-5-14>.
- AIRES, Rosária D. et al. Paraquat Poisoning Induces TNF- α -Dependent iNOS/NO Mediated Hyporesponsiveness of the Aorta to Vasoconstrictors in Rats. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.73562-73575, 9 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073562>.
- AL-JAMEIL. A Brief Overview of Preeclampsia. **Journal Of Clinical Medicine Research**, [s.l.], p.1-7, 2014. Elmer Press, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4021/jocmr1682w>.
- ALI, Sajjadh Mj; A KHALIL, Raouf. Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.1495-1515, 17 ago. 2015. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2015.1067684>.
- ALLEN, Rebecca E. et al. Abnormal blood biomarkers in early pregnancy are associated with preeclampsia: a meta-analysis. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [s.l.], v. 182, p.194-201, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.09.027>.
- AMARAL, Taline A. S. et al. Differential responses of mesenteric arterial bed to vasoactive substances in L-NAME-induced preeclampsia: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction. **Clinical And Experimental Hypertension**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.126-135, 20 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641963.2017.1339073>.
- American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122(5):1122-31.
- AOUACHE, Rajaa et al. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.1-29, 17 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19051496>.
- ANDERSON, Cindy M. et al. Mesenteric Vascular Responsiveness in a Rat Model of Pregnancy-Induced Hypertension. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 231, n. 8, p.1398-1402, set. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/153537020623100813>.

ARRIAGA-PIZANO, L. et al. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. **J Soc Gynecol Investig**, Sl, v. 12, n. 5, p.335-342, jul. 2005.

BAHIA, Luciana et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 50, n. 2, p.291-303, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302006000200015>.

BANNISTER, Joe V.; CALABRESE, Lilia. Assays for Superoxide Dismutase. **Methods Of Biochemical Analysis**, [s.l.], p.279-312, out. 1987. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.113-123, fev. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>.

BATENBURG, W. W. et al. Angiotensin II-aldosterone interaction in human coronary microarteries involves GPR30, EGFR, and endothelial NO synthase. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.136-143, 18 jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs016>

BAYLIS, C et al. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. **Seminars In Nephrology**, Sl, v. 18, n. 2, p.208-230, mar. 1998.

BEM, Grazielle Freitas de et al. Protective effect of Euterpe oleracea Mart (açai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 66, n. 9, p.1328-1338, 14 abr. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12258>.

BEM, Grazielle Freitas de et al. Antidiabetic effect of Euterpe oleracea Mart. (açai) extract and exercise training on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats: A positive interaction. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.1-19, 19 jun. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0199207>

BOBBIO, Florinda O. et al. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açazeiro (Euterpe oleracea) Mart. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.388-390, dez. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612000000300018>.

BROSNIHAN, K. Bridget; NEVES, Liomar A.a.; CHAPPELL, Mark C.. Does the Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)/ACE2 Balance Contribute to the Fate of Angiotensin Peptides in Programmed Hypertension? **Hypertension**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.1097-1099, nov. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000185149.56516.0a>.

BURKE, Suzanne D. et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 126, n. 7, p.2561-2574, 6 jun. 2016. American Society for Clinical Investigation.
<http://dx.doi.org/10.1172/jci83918>.

CAI, Hua; HARRISON, David G.. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, Sl, v. 87, n. 1, p.840-844, nov. 2000

CELIK, H.; AVCI, B.; IŞIK, Y.. Vascular endothelial growth factor and endothelin-1 levels in normal pregnant women and pregnant women with pre-eclampsia. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.355-358, maio 2013. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.3109/01443615.2013.769944>

CHAMOUX, Estelle et al. Involvement of the Angiotensin II Type 2 Receptor in Apoptosis during Human Fetal Adrenal Gland Development1. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 84, n. 12, p.4722-4730, dez. 1999. The Endocrine Society.
<http://dx.doi.org/10.1210/jcem.84.12.6223>.

CHEIFETZ, S et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **J Biol Chem.**, Sl, v. 267, n. 27, p.19027-19030, set. 1992.

CHEN, Guifa; SUZUKI, Hikaru; WESTON, Arthur H.. Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **Br. J. Pharmacol.**, Sl, v. 95, n. 4, p.1165-1174, dez. 1988.

CHEN, Xiao-qiang et al. Preventive Effects of Catechins on Cardiovascular Disease. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1-7, 21 dez. 2016. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules21121759>.

CHESLEY, Leon C.. Vascular reactivity in normal and toxemic pregnancy. **Clin Obstet Gynecol.**, Sl, v. 9, n. 4, p.871-881, dez. 1966.

CHESLEY, Leon C. et al. Vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in pregnant and nonpregnant women. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 91, n. 6, p.837-842, mar. 1965. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(65\)90462-x](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(65)90462-x).

CHOI, Jong Weon; IM, Moon Whan; PAI, Soo Hwan. Nitric Oxide Production Increases during Normal Pregnancy and Decreases in Preeclampsia. **Ann Clin Lab Sci Summer**, Sl, v. 32, n. 3, p.257-263, jun. 2002.

CINDROVA-DAVIES, Tereza. The therapeutic potential of antioxidants, ER chaperones, NO and H2S donors, and statins for treatment of preeclampsia. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 5, p.1-13, 27 maio 2014. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00119>.

CONRAD, K P et al. Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 7, n. 13, p.1269-1276, out. 1993. FASEB.
<http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.7.13.7691671>

CONRAD, K P et al. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.566-571, abr. 1993. FASEB. <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.7.6.7682524>.

COSTA, Cristiane Aguiar da et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 385, n. 12, p.1199-1209, 9 out. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0798-z>

CÔTÉ, Frédéric et al. Activation of the AT2Receptor of Angiotensin II Induces Neurite Outgrowth and Cell Migration in Microexplant Cultures of the Cerebellum. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 274, n. 44, p.31686-31692, 29 out. 1999. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.44.31686>.

COX, Brian et al. Translational Analysis of Mouse and Human Placental Protein and mRNA Reveals Distinct Molecular Pathologies in Human Preeclampsia. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.1-15, 10 out. 2011. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.m111.012526>.

CRACKOWER, Michael A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, [s.l.], v. 417, n. 6891, p.822-828, jun. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00786>

CREWS, Janice K. et al. Decreased Endothelium-Dependent Vascular Relaxation During Reduction of Uterine Perfusion Pressure in Pregnant Rat. **Hypertension**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.367-372, jan. 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.35.1.367>.

DAMASCENO, D.C.. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. **Diabetes Clínica**, Sl, v. 5, n. 5, p.355-361, jan. 2002.

DIMMELER, Stefanie; DERNBACH, Elisabeth; ZEIHNER, Andreas M. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. **Febs Letters**, [s.l.], v. 477, n. 3, p.258-262, 18 jul. 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01657-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01657-4).

DONG, Xiujuan; SHI, Dandan. Simvastatin Alleviates Pathology in a Rat Model of Preeclampsia Involving ERK/MAPK Pathway. **Reproductive Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 7, p.1053-1061, 16 nov. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1933719116678693>.

DONOGHUE, Mary et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circulation Research**, [s.l.], v. 87, n. 5, p.1-9, set. 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>.

DÖTSCH, Jörg et al. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.163-167, ago. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115\(00\)00532-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115(00)00532-7).

DRAPER, H.h.; HADLEY, M.. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods In Enzymology: Oxygen Radicals and Antioxidants**, [s.l.], v. 186, p.421-431, 1990. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i).

DRAPER, H.h. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.353-363, out. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90035-s](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(93)90035-s).

ECHEVERRI, Isabella et al. Relationship between maternal and newborn endothelial function and oxidative stress. **American Journal Of Human Biology**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.822-831, 6 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajhb.22733>.

EDIRISINGHE, Indika et al. Strawberry Extract Caused Endothelium-Dependent Relaxation through the Activation of PI3 Kinase/Akt. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 20, p.9383-9390, 22 out. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf801864t>.

EDIRISINGHE, Indika et al. Effect of Black Currant Anthocyanins on the Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Vitro in Human Endothelial Cells. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 16, p.8616-8624, 24 ago. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf201116y>.

ERDÖS, Ervin G.. Some Old and Some New Ideas on Kinin Metabolism. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 15, n. , p.20-24, 1990. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00005344-199015061-00005>.

FARROW, Kathryn N. et al. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. **American Journal Of Physiology-lung Cellular And Molecular Physiology**, [s.l.], v. 295, n. 6, p.979-987, dez. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.90238.2008>.

FÉLÉTOU, Michel; KÖHLER, Ralf; VANHOUTTE, Paul M.. Endothelium-derived Vasoactive Factors and Hypertension: Possible Roles in Pathogenesis and as Treatment Targets. **Current Hypertension Reports**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.267-275, 8 jun. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-010-0118-2>.

FERRARIO, Carlos M. et al. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. **Hypertension.**, Sl, v. 18, n. 5, p.126-133, nov. 1991.

FERRARIO, Carlos M.; IYER, Shridhar N.. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. **Regulatory Peptides**, [s.l.], v. 78, n. 1-3, p.13-18, nov. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-0115\(98\)00134-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-0115(98)00134-7).

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Sl, v. 43, n. 1, p.61-68, jan. 1997.

FISHER, Susan J.. Why is placentation abnormal in preeclampsia? **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 213, n. 4, p.115-122, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.042>.

FITZPATRICK, David F. et al. Isolation and Characterization of Endothelium-Dependent Vasorelaxing Compounds from Grape Seeds. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.6384-6390, dez. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0009347>.

FLEMING, Ingrid et al. Phosphorylation of Thr 495 Regulates Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. **Circulation Research**, [s.l.], v. 88, n. 11, p.68-75, 8 jun. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hh1101.092677>.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A.. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, Sl, p.114-121, 1984.

FONG, Guo-hua et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, [s.l.], v. 376, n. 6535, p.66-70, jul. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/376066a0>

FORMAN, H J; TORRES, M; FUKUTO, J. Redox signaling. **Mol Cell Biochem**, Sl, p.49-62, jun. 2002.

FOX, Karin A. et al. Effects of pravastatin on mediators of vascular function in a mouse model of soluble Fms-like tyrosine kinase-1–induced preeclampsia. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 205, n. 4, p.1-5, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2011.06.083>.

FRANKEL, E.n et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **The Lancet**, [s.l.], v. 341, n. 8843, p.454-457, fev. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90206-v](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)90206-v).

FURUYA, Mitsuko et al. Disrupted Balance of Angiogenic and Antiangiogenic Signalings in Preeclampsia. **Journal Of Pregnancy**, [s.l.], v. 2011, p.1-10, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/123717>.

GADONSKI, Giovanni et al. Hypertension Produced by Reductions in Uterine Perfusion in the Pregnant Rat. **Hypertension**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.711-716, out. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000238442.33463.94>.

GALLINAT, Stefan et al. AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. **Febs Letters**, [s.l.], v. 443, n. 1, p.75-79, 22 jan. 1999. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01675-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01675-5).

GALLORI, S. et al. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, [s.l.], v. 59, n. 11-12, p.739-743, jun. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-004-0305-x>.

GANT, Norman F. et al. A Study of Angiotensin II Pressor Response throughout Primigravid Pregnancy. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 52, n. 11, p.2682-2689, 1 nov. 1973. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci107462>.

GASPARO, Marc de et al. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. **Pharmacological Reviews**, Sl, v. 52, n. 3, p.415-472, out. 2000

GENDRON*, Louis et al. Signals from the AT₂(Angiotensin Type 2) Receptor of Angiotensin II Inhibit p21ras and Activate MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) to Induce Morphological Neuronal Differentiation in NG108–15 Cells. **Molecular Endocrinology**, [s.l.], v. 13, n. 9, p.1615-1626, set. 1999. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/mend.13.9.0344>.

GEORGE, Eric M.; GRANGER, Joey P.. Mechanisms and Potential Therapies for Preeclampsia. **Current Hypertension Reports**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.269-275, 5 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-011-0204-0>.

GIELIS, Jan F. et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 50, n. 7, p.765-776, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.018>.

GILLHAM, J.c; KENNY, L.c; BAKER, P.n. An overview of endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF) in normal and compromised pregnancies. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.2-7, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115\(03\)00044-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00044-7).

GONÇALVES-RIZZI, Victor Hugo et al. Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 57, p.71-78, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2016.05.004>.

GRAAF, Anne Marijn van Der et al. Endothelium-Dependent Relaxation and Angiotensin II Sensitivity in Experimental Preeclampsia. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 11, p.1-15, 6 nov. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079884>

GRANGER, J.p. et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **Hypertension**, Sl, v. 38, n. 3, p.718-722, set. 2001.

GROESCH, K.a. et al. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. **Placenta**, [s.l.], v. 32, n. 12, p.926-931, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.008>.

HANSSON, Lennart et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. **The Lancet**, [s.l.], v. 353, n. 9153, p.611-616, fev. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)05012-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(98)05012-0).

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S.j.. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.345-349, maio 2001. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0290345>.

KHALIL, Raouf A. et al. Enhanced Vascular Reactivity During Inhibition of Nitric Oxide Synthesis in Pregnant Rats. **Hypertension**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1065-1069, maio 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.31.5.1065>.

HENNESSY, A. et al. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. **J Immunol.**, Sl, v. 163, n. 6, p.3491-3495, set. 1999.

HERMSTEINER, Markus; ZOLTAN, Dorina R.; KÜNZEL, Wolfgang. The vasoconstrictor response of uterine and mesenteric resistance arteries is differentially altered in the course of pregnancy. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.29-35, dez. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115\(01\)00428-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115(01)00428-6)

HIGUCHI, Sadaharu et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clinical Science**, [s.l.], v. 112, n. 8, p.417-428, 1 abr. 2007. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20060342>.

HONG, Hong-jye et al. Supplementation With Tetrahydrobiopterin Suppresses the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, [s.l.], v. 38, n. 5, p.1044-1048, nov. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hy1101.095331>.

HUNG, Tai-ho; BURTON, Graham J.. Hypoxia and Reoxygenation: a Possible Mechanism for Placental Oxidative Stress in Preeclampsia. **Taiwanese Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.189-200, set. 2006. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1028-4559\(09\)60224-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1028-4559(09)60224-2).

HUPPERTZ, Berthold. Placental Origins of Preeclampsia. **Hypertension**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.970-975, abr. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.107.107607>.

ICHIKI, Toshihiro; KAMBAYASHI, Yoshikazu; INAGAMI, Tadashi. Multiple Growth Factors Modulate mRNA Expression of Angiotensin II Type-2 Receptor in R3T3 Cells. **Circulation Research**, [s.l.], v. 77, n. 6, p.1070-1076, dez. 1995. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.77.6.1070>.

IRANI, Roxanna A. et al. Autoantibody-Mediated Angiotensin Receptor Activation Contributes to Preeclampsia Through Tumor Necrosis Factor- α Signaling. **Hypertension**, [s.l.], v. 55, n. 5, p.1246-1253, maio 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.110.150540>.

ITO, Masaki et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Sl, v. 92, n. 8, p.3521-3525, abr. 1995

JEBBINK, Jiska et al. Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome — A review. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1822, n. 12, p.1960-1969, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.004>.

JOYNER, J. et al. Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 293, n. 1, p.169-177, jul. 2007. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00387.2006>.

KARAKUS, Savas et al. Serum levels of ET-1, M30, and angiopoietins-1 and -2 in HELLP syndrome and preeclampsia compared to controls. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, [s.l.], v. 293, n. 2, p.351-359, 3 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-015-3803-1>.

KARUMANCHI, S. Ananth et al. Preeclampsia: A renal perspective. **Kidney International**, [s.l.], v. 67, n. 6, p.2101-2113, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00316.x>

KARUMANCHI, S.a.; EPSTEIN, F.h.. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: Cause or consequence of preeclampsia?. **Kidney International**, [s.l.], v. 71, n. 10, p.959-961, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002281>.

KATADA, Jun; MAJIMA, Masataka. AT2receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 136, n. 4, p.484-491, jun. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704731>.

KEISER, S. D. et al. Effects of 17-Hydroxyprogesterone on Tumor Necrosis Factor- -Induced Hypertension During Pregnancy. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1120-1125, 1 out. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2009.149>.

KEMSE, Nisha G.; KALE, Anvita A.; JOSHI, Sadhana R.. A Combined Supplementation of Omega-3 Fatty Acids and Micronutrients (Folic Acid, Vitamin B12) Reduces Oxidative Stress Markers in a Rat Model of Pregnancy Induced Hypertension. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.1-13, 18 nov. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111902>

KHONG, T. Y. et al. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **Bjog: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s.l.], v. 93, n. 10, p.1049-1059, out. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.1986.tb07830.x>.

KINNULA, V L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, [s.l.], v. 60, n. 8, p.693-700, 1 ago. 2005. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/thx.2004.037473>.

KRAUSE, B.j.; HANSON, M.a.; CASANELLO, P.. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. **Placenta**, [s.l.], v. 32, n. 11, p.797-805, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.025>.

- KUMASAWA, K. et al. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 4, p.1451-1455, 27 dez. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1011293108>.
- LAM, Chun; LIM, Kee-hak; KARUMANCHI, S. Ananth. Circulating Angiogenic Factors in the Pathogenesis and Prediction of Preeclampsia. **Hypertension**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.1077-1085, nov. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000187899.34379.b0>.
- LANDMESSER, Ulf; HARRISON, David G.. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Coronary Artery Disease**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.455-461, set. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00019501-200109000-00004>.
- LANGER, Bruno et al. Plasma Active Renin, Angiotensin I, and Angiotensin II During Pregnancy and in Preeclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, [s.l.], v. 91, n. 2, p.196-202, fev. 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0029-7844\(97\)00660-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0029-7844(97)00660-1).
- LARESGOITI-SERVITJE, Estibalitz. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 94, n. 2, p.247-257, 30 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1112603>.
- LEE, Virginia M et al. Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. **Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.395-402, fev. 2003. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00004872-200302000-00032>.
- LEEMAN, L.; FONTAINE, P.. Hypertensive disorders of pregnancy. **Am Fam Physician.**, SI, v. 78, n. 1, p.93-100, jul. 2008.
- LÉMERY MAGNIN, Marie et al. Assessment of Placental Perfusion in the Preeclampsia L-NAME Rat Model with High-Field Dynamic Contrast-Enhanced MRI. **Fetal Diagnosis And Therapy**, [s.l.], p.1-8, 24 abr. 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000484314>
- LEVINE, Rodney L. et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods In Enzymology: Oxygen Radicals and Antioxidants**, [s.l.], v. 186, p.464-478, 1990. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h).
- LEVY, Anat et al. ACE2 expression and activity are enhanced during pregnancy. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 295, n. 6, p.1953-1961, dez. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.90592.2008>
- LI, Huige et al. Reversal of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Up-Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Lowers Blood Pressure in Hypertensive Rats. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s.l.], v. 47, n. 12, p.2536-2544, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.01.071>.

LOSCALZO, Joseph; A VITA, Joseph. **Nitric Oxide and the Cardiovascular System**. Sl: Humana Press, 2000.

MACALLISTER, R.J.; VALLANCE, P.. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis: how important are they? **Exp Nephrol.**, Sl, v. 6, n. 3, p.195-199, maio 1998.

MADEIRA, Socorro Vanesca Frota et al. ENOS Activation Induced by a Polyphenol-Rich Grape Skin Extract in Porcine Coronary Arteries. **Journal Of Vascular Research**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.406-416, 2009. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000194271>.

MALACHIAS, Mvb et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], v. 107, n. 3, p.1-83, 2016.

MANACH, Claudine; MAZUR, Andrzej; SCALBERT, Augustin. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion In Lipidology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.77-84, fev. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00041433-200502000-00013>

MARLETTA, M.a.. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem.**, Sl, v. 268, n. 17, p.12231-12234, jun. 1993.

MATSUBARA, Keiichi et al. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.4600-4614, 2 mar. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16034600>.

MAYNARD, Sharon E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 111, n. 5, p.649-658, 1 mar. 2003. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci17189>.

MAYR, Andreas J. et al. Morphologic Changes of the Uteroplacental Unit in Preeclampsia-Like Syndrome in Rats. **Hypertension In Pregnancy**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.29-37, jan. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/prg-45770>.

MCCARTHY, F.p. et al. Animal models of preeclampsia; uses and limitations. **Placenta**, [s.l.], v. 32, n. 6, p.413-419, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.03.010>.

MEFFERT, Simone et al. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 122, n. 1, p.59-67, ago. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207\(96\)03873-7](http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207(96)03873-7).

MERRILL, David C et al. Angiotensin-(1-7) in Normal and Preeclamptic Pregnancy. **Endocrine**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.239-246, 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1385/endo:18:3:239>.

MITCHELL, B et al. Uncoupled Endothelial Nitric Oxide Synthase and Oxidative Stress in a Rat Model of Pregnancy-Induced Hypertension. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 20, n. 12, p.1297-1304, dez. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjhyper.2007.08.007>.

- MONCADA, S; PALMER, R. M.; HIGGS, E.a.. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, Sl, v. 43, n. 2, p.109-142, jun. 1991.
- MORISHITA, R. et al. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. **Hypertension.**, Sl, v. 19, n. 2, p.162-167, fev. 1992
- MOTTA, C et al. Effect of Sildenafil on Pre-Eclampsia-Like Mouse Model Induced By L-Name. **Reproduction In Domestic Animals**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.611-616, 8 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12536>.
- MOURA, R Soares de et al. The role of bradykinin, AT2and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 141, n. 5, p.860-866, mar. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705669>.
- MOURA, Roberto Soares de et al. Mechanism of the Endothelium-Dependent Vasodilation and the Antihypertensive Effect of Brazilian Red wine. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.302-309, set. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.fjc.0000133060.10597.3c>.
- MOURA, Roberto Soares de et al. Protective Action of a Hydroalcoholic Extract of a Vinifera Grape Skin on Experimental Preeclampsia in Rats. **Hypertension In Pregnancy**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.89-100, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641950601147960>.
- MOURA, Roberto Soares de et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 19, n. 3-4, p.262-269, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.004>.
- MOZAFFARIAN, Dariush et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. **Circulation**, [s.l.], v. 131, n. 4, p.29-322, 27 jan. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/cir.0000000000000152>.
- MISTRY, H.d.; KURLAK, L.o.; PIPKIN, F. Broughton. The placental renin–angiotensin system and oxidative stress in pre-eclampsia. **Placenta**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.182-186, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.11.027>.
- MULVANY, Michael J.. Modeling the Vasculature. **Hypertension**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.652-653, out. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000184390.27545.40>.
- MUTLU-TÜRKOGLU, Ü. et al. Plasma Nitric Oxide Metabolites and Lipid Peroxide Levels in Preeclamptic Pregnant Women before and after Delivery. **Gynecologic And Obstetric Investigation**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.247-250, 1999. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000010192>.

NAIKER, S. et al. Immunolocalisation and endothelin-1 values In pre-eclampsia: an immunocytochemical study. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.39-45, jan. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01443610020022104>.

NAGANO, Tetsuo. Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species. **Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.111-124, 2009. The Society for Free Radical Research Japan. <http://dx.doi.org/10.3164/jcbrn.r09-66>.

NAKAJIMA, Masatoshi et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: Gain-of-function study using gene transfer. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Sl, v. 92, n. 23, p.10663-10667, 07 nov. 1995

NELSON, S.h. et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. **Circ Res**, Sl, v. 87, n. 5, p.406-411, 1 set. 2000.

NERI, Isabella et al. Effect of l-arginine on blood pressure in pregnancy-induced hypertension: A randomized placebo-controlled trial. **The Journal Of Maternal-fetal & Neonatal Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.277-281, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14767050600587983>.

NOVARO, Virginia et al. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. **Reprod Fertil Dev.**, Sl, v. 13, n. 5, p.411-420, dez. 2001.

OEMAR, Barry S. et al. Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Production in Human Atherosclerosis. **Circulation**, [s.l.], v. 97, n. 25, p.2494-2498, 30 jun. 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.97.25.2494>.

OGNIBENE, Dt et al. angiotensin II mediated vasodilation is reduced in adult spontaneously hypertensive rats despite enhanced expression of at2receptors. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.12-19, jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05054.x>

OGNIBENE, Dayane T. et al. Role of renin–angiotensin system and oxidative status on the maternal cardiovascular regulation in spontaneously hypertensive rats. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.498-504, abr. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2011.253>.

OLIVEIRA, Paola Raquel Braz de et al. Effects of an Extract Obtained From Fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the Components of Metabolic Syndrome Induced in C57BL/6J Mice Fed a High-fat Diet. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 56, n. 6, p.619-626, dez. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/fjc.0b013e3181f78da4>.

OLIVEIRA, Paola Raquel B. de et al. *Euterpe oleracea* Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.1-16, 2 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143721>.

OZLER, A. et al. Serum levels of neopterin, tumor necrosis factor-alpha and Interleukin-6 in preeclampsia: relationship with disease severity. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, Sl, v. 16, n. 12, p.1707-1712, 2012.

PALLER, Mark S.. Decreased Pressor Responsiveness in Pregnancy: Studies in Experimental Animals. **American Journal Of Kidney Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.308-311, abr. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0272-6386\(87\)80127-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0272-6386(87)80127-0).

PESSÔA, Bruno Sevá et al. Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. **Nature Reviews Nephrology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.26-36, 20 nov. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.249>

PICON, R. V. et al. Prevalence of Hypertension Among Elderly Persons in Urban Brazil: A Systematic Review With Meta-Analysis. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.541-548, 29 jan. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajh/hps076>.

PONIEDZIALEK-CZAJKOWSKA, Elzbieta et al. Nitric Oxide in Normal and Preeclamptic Pregnancy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.743-749, 1 maio 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138920111795470921>.

POSSOMATO-VIEIRA, Jose Sergio et al. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 389, n. 12, p.1325-1332, 12 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-016-1296-5>.

POSTON, L.; MCCARTHY, A.I.; RITTER, J.m.. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.215-239, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)00064-a](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(94)00064-a).

POTENTE, Michael; GERHARDT, Holger; CARMELIET, Peter. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. **Cell**, [s.l.], v. 146, n. 6, p.873-887, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>.

POWE, Camille E.; LEVINE, Richard J.; KARUMANCHI, S. Ananth. Preeclampsia, a Disease of the Maternal Endothelium. **Circulation**, [s.l.], v. 123, n. 24, p.2856-2869, 21 jun. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.109.853127>.

POZO-INSFRAN, David del; BRENES, Carmen H.; TALCOTT, Stephen T.. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea*Mart.). **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 6, p.1539-1545, mar. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf035189n>.

PRICK, Babette W. et al. Determinants of health-related quality of life in the postpartum period after obstetric complications. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [s.l.], v. 185, p.88-95, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.11.038>.

QUINN, Mark T. et al. Immunocytochemical detection of lipid peroxidation in phagosomes of human neutrophils: correlation with expression of flavocytochrome b. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.415-421, mar. 1995. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/jlb.57.3.415>.

RAMACHANDRAN, Anup et al. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 33, n. 11, p.1465-1474, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01142-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01142-5).

RAMESAR, S. V. et al. The Effect of Kraussianone-2 (Kr2), a Natural Pyrano-isoflavone from *Eriosema kraussianum*, in an L-NAME- induced Pre-eclamptic Rat Model. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 26, n. 9, p.1375-1380, 6 fev. 2012. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3697>.

RANA, Sarosh et al. Angiogenic Factors and the Risk of Adverse Outcomes in Women With Suspected Preeclampsia. **Circulation**, [s.l.], v. 125, n. 7, p.911-919, 21 fev. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.111.054361>.

RANA, Sarosh; KARUMANCHI, S. Ananth; LINDHEIMER, Marshall D.. Angiogenic Factors in Diagnosis, Management, and Research in Preeclampsia. **Hypertension**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.198-202, fev. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.113.02293>.

RAPOPORT, Rm; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.**, Sl, p.281-296, set. 1983.

RAPSOMANIKI, Eleni et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people. **The Lancet**, [s.l.], v. 383, n. 9932, p.1899-1911, maio 2014. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60685-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60685-1).

REDMAN, Christopher W. G.; SARGENT, Ian L.. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. **Science**, [s.l.], v. 308, n. 5728, p.1592-1594, 10 jun. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1111726>.

REDMAN, Christopher W. G.; SARGENT, Ian L.. Immunology of Pre-Eclampsia. **American Journal Of Reproductive Immunology**, [s.l.], v. 63, n. 6, p.534-543, 23 mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x>

REDMAN, Christopher W. G.; SARGENT, I.I.; STAFF, A.c.. IFPA Senior Award Lecture: Making sense of pre-eclampsia – Two placental causes of preeclampsia?. **Placenta**, [s.l.], v. 35, p.20-25, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.008>.

REDMAN, Christopher W. G.; STAFF, Anne Cathrine. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 213, n. 4, p.9-11, out. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.003>.

REID, Michael B.. Of balance and unbalance. **Journal Of Applied Physiology**, [s.l.], v. 101, n. 4, p.1011-1012, out. 2006. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00539.2006>.

RENTZSCH, Brit et al. Transgenic Angiotensin-Converting Enzyme 2 Overexpression in Vessels of SHRSP Rats Reduces Blood Pressure and Improves Endothelial Function. **Hypertension**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.967-973, nov. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.108.114322>.

RESENDE, A.c.; BALLEJO, G.; SALGADO, M.c.o.. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 31, n. 9, p.1229-1235, set. 1998. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x1998000900017>.

RESENDE, A.c; PIMENTEL, Aml; MOURA, R Soares de. CAPTOPRIL REVERSES THE REDUCED VASODILATOR RESPONSE TO BRADYKININ IN HYPERTENSIVE PREGNANT RATS. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.756-761, nov. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04089.x>

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al. A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p.133-144, 2005

ROBERTS, J.m.; HUBEL, C.a.. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. **Placenta**, [s.l.], v. 30, p.32-37, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.009>.

ROCHA, A.p.m. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.97-104, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.411>.

ROCHA, A.p.m. et al. Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of Euterpe oleracea Mart. (Acai). **Journal Of Pharmacology And Toxicology**, Sl, v. 3, n. 6, p.435-448, jun. 2008.

ROMERO, Roberto et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. **The Journal Of Maternal-fetal & Neonatal Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.9-23, jan. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14767050701830480>.

SALEEM, Sarah et al. A prospective study of maternal, fetal and neonatal deaths in low- and middle-income countries. **Bulletin Of The World Health Organization**, [s.l.], v. 92, n. 8, p.605-612, 5 jun. 2014. WHO Press. <http://dx.doi.org/10.2471/blt.13.127464>.

SAY, Lale et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. **The Lancet Global Health**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.323-333, jun. 2014. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x\(14\)70227-x](http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x(14)70227-x).

- SCALA, L.c.; MAGALHÃES, L.b.; MACHADO, A.. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. **Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2^a. ed. São Paulo**, p.780-785, 2015.
- SCHEUER, D. A.; PERRONE, M. H.. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 264, n. 5, p.917-923, maio 1993. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1993.264.5.r917>.
- SCHIESSL, Barbara et al. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosine monophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, [s.l.], v. 274, n. 3, p.150-154, 11 mar. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-006-0149-8>.
- SCOTT-BURDEN, Timothy et al. Induction of Endothelin Secretion by Angiotensin II. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 17, p.96-100, 1991. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00005344-199100177-00025>.
- SHAH, Dania A.; KHALIL, Raouf A.. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 95, n. 4, p.211-226, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.012>.
- SHALABY, Fouad et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, [s.l.], v. 376, n. 6535, p.62-66, jul. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/376062a0>.
- SHENNAN, A. H. Review: antiplatelet agents (particularly aspirin) reduce the incidence of pre-eclampsia in women at risk. **Evidence-based Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.49-49, 1 abr. 2005. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/ebm.10.2.49>.
- SIBAI, Baha; DEKKER, Gus; KUPFERMINC, Michael. Pre-eclampsia. **The Lancet**, [s.l.], v. 365, n. 9461, p.785-799, fev. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)17987-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)17987-2).
- SILVA, Andreza Amaral da; GONÇALVES, Roberto Calderon. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p.994-1002, abr. 2010.
- SONNENBURG, William K.; BEAVO, Joseph A.. Cyclic GMP and Regulation of Cyclic Nucleotide Hydrolysis. **Advances In Pharmacology**, [s.l.], p.87-114, 1994. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)60052-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589(08)60052-6).
- STANKEVIČIUS, Edgaras et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina**, Sl, v. 39, n. 4, p.333-340, 2003.
- STENNETT, Amanda K. et al. Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 296, n. 3, p.745-755, mar. 2009. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00861.2008>.

STOCLET, Jean-claude et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 500, n. 1-3, p.299-313, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.034>.

STOLL, M et al. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.651-657, 1 fev. 1995. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci117710>

STROTH, Ursula; UNGER, Thomas. The Renin-Angiotensin System and Its Receptors. **J Cardiovasc Pharmacol.**, Sl, v. 33, p.41-43, 1999.

STUEHR, Dennis J.. Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 134, n. 10, p.2748-2751, 1 out. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/134.10.2748s>.

TALEBIANPOOR, Mohammad Sharif; MIRKHANI, Hossein. The Effect of Tempol Administration on the Aortic Contractile Responses in Rat Preeclampsia Model. **Isrn Pharmacology**, [s.l.], v. 2012, p.1-8, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/187208>.

TALLEDO, O. Eduardo. Renin-angiotensin system in normal and toxemic pregnancies. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 97, n. 4, p.571-572, fev. 1967. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(67\)90572-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(67)90572-8)

TAN, Jian Liang; THAKUR, Kshitij. Hypertension, Systolic. **Statpearls - Ncbi Bookshelf**, Sl, p.1-8, jan. 2018.

TAKIUTI, Nilton Hideto et al. The effect of chronic nitric oxide inhibition on vascular reactivity and blood pressure in pregnant rats. **Sao Paulo Medical Journal**, [s.l.], v. 117, n. 5, p.197-204, 2 set. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-31801999000500004>.

THORNBURG, Kent L. et al. Hemodynamic changes in pregnancy. **Seminars In Perinatology**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.11-14, fev. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0146-0005\(00\)80047-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0146-0005(00)80047-6).

TOUYZ, Rhian M; SCHIFFRIN, Ernesto L. Role of endothelin in human hypertension. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s.l.], v. 81, n. 6, p.533-541, jun. 2003. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/y03-009>.

TOUYZ, R.m.. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.1263-1273, ago. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2004000800018>.

TOUYZ, Rhian M; BRIONES, Ana M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.5-14, 28 out. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2010.201>.

TSUZUKI, S. et al. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. **Hypertension**, SI, v. 28, n. 5, p.916-918, nov. 1996.

UNGER, T. et al. Angiotensin receptors. **J Hypertens Suppl.**, SI, v. 14, n. 5, p.95-103, dez. 1996.

VALDES, Gloria et al. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [s.l.], v. 79, n. 7, p.1-20, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-7-79>.

VALDES, Gloria; CORTHORN, J.. Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. **Placenta**, [s.l.], v. 32, p.170-175, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.008>.

VANHOUTTE, Paul M. et al. Thirty Years of Saying NO. **Circulation Research**, [s.l.], v. 119, n. 2, p.375-396, 8 jul. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.116.306531>.

VENKATESHA, Shivalingappa et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.642-649, jun. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1429>.

VEST, Amanda R.; CHO, Leslie S.. Hypertension in Pregnancy. **Current Atherosclerosis Reports**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.395-406, 30 jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-013-0395-8>

WALDMAN, A. S; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacological Reviews**, SI, v. 39, n. 3, p.163-196, set. 1987.

WALSH, Scott. Maternal-Placental Interactions of Oxidative Stress and Antioxidants in Preeclampsia. **Seminars In Reproductive Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 01, p.93-104, mar. 1998. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1016256>.

WANG, Alice; RANA, Sarosh; KARUMANCHI, S. Ananth. Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. **Physiology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.147-158, jun. 2009. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00043.2008>.

WHELTON, Paul K. et al. 2017

ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. **Journal Of The American Society Of Hypertension**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.1-73, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2018.06.010>.

WINN, Virginia D.; GORMLEY, Matthew; FISHER, Susan J.. The impact of preeclampsia on gene expression at the maternal–fetal interface. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.100-108, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2010.12.001>.

WOLF, G. et al. ANG II is a mitogen for a murine cell line isolated from medullary thick ascending limb of Henle's loop. **American Journal Of Physiology-renal Physiology**, [s.l.], v. 268, n. 5, p.940-947, maio 1995. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.1995.268.5.f940>.

YOUNG, Brett C.; LEVINE, Richard J.; KARUMANCHI, S. Ananth. Pathogenesis of Preeclampsia. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.173-192, jan. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102149>.

ZALBA, Guillermo et al. Oxidative Stress in Arterial Hypertension. **Hypertension**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.1395-1399, dez. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hy1201.099611>.

ZAPATA-SUDO, Gisele et al. Oral treatment with Euterpe oleracea Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.2-6, 8 jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-227>.

ZHAO, Yingzi; VANHOUTTE, Paul M.; LEUNG, Susan W.s.. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal Of Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 129, n. 2, p.83-94, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.

ZHOU, y et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 99, n. 9, p.2139-2151, 1 maio 1997. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci119387>.

ZHOU, Yan et al. Vascular Endothelial Growth Factor Ligands and Receptors That Regulate Human Cytotrophoblast Survival Are Dysregulated in Severe Preeclampsia and Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelets Syndrome. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 160, n. 4, p.1405-1423, abr. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62567-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62567-9)