



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

Taline Anne da Silva Amaral

**Papel do sistema renina-angiotensina e do desequilíbrio redox em
modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME**

Rio de Janeiro

2012

Taline Anne da Silva Amaral

Papel do sistema renina-angiotensina e do desequilíbrio redox em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME

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. Angela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2012

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

A485 Amaral, Taline Anne da Silva

Papel do sistema renina-angiotensina e do desequilíbrio redox em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME.

/ Taline Anne da Silva Amaral. – 2012.

122 f.

Orientadora: Angela de Castro Resende.

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

1. Pré-eclâmpsia - Teses. 2. Sistema renina-angiotensina - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. I. Resende, Angela de Castro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.8-009.24-02:618.3

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

Assinatura

Data

Taline Anne da Silva Amaral

Papel do sistema renina-angiotensina e do desequilíbrio redox em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME

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 fevereiro de 2012.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Samuel do Santos Valença
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Monique Bandeira Moss
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Claudia Lamir M. da S. Amaral e à minha prima Oneide da S. Martins, que são minha força, equilíbrio e porto seguro em todos os momentos de minha vida. Sem vocês, certamente, eu não chegaria aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, por ter me concedido a oportunidade de ingressar e concluir este curso de pós-graduação, por ter me mantido forte diante das dificuldades surgidas e ter-me concedido coragem para lutar pela realização dos meus objetivos.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dr^a. Ângela de Castro Resende, pela orientação, confiança, paciência, correções, explicações, amizade, pelo incansável apoio e pela compreensão e motivação nos momentos difíceis pelos quais passei durante a realização deste trabalho. Muito obrigada pelo aprendizado que me proporcionou durante o mestrado.

Agradeço ao Professor Dr. Roberto Soares de Moura pelo cuidado que tem com cada um de nós, pela disponibilidade em esclarecer eventuais dúvidas e por seu por seu entusiasmo contagiante que nos faz querer investigar cada vez mais e nos mostra o quão fascinante pode ser a pesquisa.

Agradeço especialmente à minha mãe, Claudia Lamir Martins da Silva Amaral e à minha prima Oneide da Silva Martins, que sempre estiveram ao meu lado me proporcionando amor e carinho, pela paciência nos meus momentos de nervosismo, por acreditarem em mim e não me deixarem desistir dos meus objetivos, pelo constante cuidado, por todo apoio e dedicação durante toda minha vida.

Agradeço aos meus “vôzinhos” Claudio e Arminda; tios Zeno, Célia, Fernando e Sonia; primos, demais familiares pelo apoio incondicional que me deram durante a realização do mestrado. Especialmente, à minha avó Odilenes (*in memorian*) e ao meu avô José (*in memorian*), que embora não estejam mais presentes, torceram sempre por minha vitória e, certamente, estariam muito felizes por compartilhar este momento comigo.

Agradeço à Professora Dr^a. Tatiana Brunini pelo carinho, palavras amigas e pela colaboração para a realização desse trabalho.

Agradeço aos membros da banca, Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença, Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz, Prof. Dra. Monique Bandeira Moss e suplentes Prof. Dra.

Ana Paula Machado da Rocha e Prof. Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini, por terem aceitado este convite e por estarem contribuindo para o meu crescimento profissional e melhoria do trabalho realizado.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Lúcia Alves, Andréa Fernandes Emiliano da Silva, Paola Raquel Braz de Oliveira, Dayane Teixeira Ognibene, Cristiane Aguiar da Costa, Michelle Teixeira Teixeira, Grazielle Freitas de Bem, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Ana Paula Machado da Rocha, Marcelo Augusto Vieira de Souza, Carlos Lopes, Rafael Grossi, Lívia Cuesta, Ana Elisa Araújo e Amanda Bastos pela amizade, pela colaboração e pelo apoio durante o mestrado.

Um agradecimento mais que especial as amigas Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, que foi indispensável para a realização desse trabalho, sempre ao meu lado com seu entusiasmo e motivação, mãezona. Dayane Teixeira Ognibene, que apesar da pouca disponibilidade de tempo, sempre se mostrou disposta a compartilhar sua experiência, esclarecer minhas dúvidas e auxiliar no que fosse necessário. Cristiane Aguiar da Costa, que sempre se manteve disposta a esclarecer minhas dúvidas e colaborar no que fosse possível. Paola Raquel Braz de Oliveira e Grazielle Freitas de Bem, por dividirem comigo as angústias e por me fazerem companhia nos momentos difíceis. Muito obrigada pela amizade, por toda ajuda, pelos conselhos, pela paciência e pelo apoio durante o mestrado!!!

Um agradecimento especial aos alunos de Iniciação Científica Pedro Bello, Fabrine e Iveans Christian, que embora não estejam mais conosco no laboratório, também colaboraram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos Mariana Alves de Sá Siqueira, Monique Moss, Cristiane Matsuura, Natália Rodrigues Pereira, Marcela Anjos Martins, Ive Machareth Sab, Márcia Ferraz, Wanda Vianna Mury, Daniel Medeiros, Iara Karise Mendes e ao Professor Antonio Cláudio Mendes Ribeiro, pela amizade e por todo apoio durante o mestrado.

Agradeço aos amigos bioteristas Nelcir Rodrigues, Mariana Magalhães e Cristiane Machado, que contribuíram muito para o bom andamento desse trabalho cuidando dos “meus rarinhos” e por se mostrarem sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário.

Agradeço aos amigos Eliana Lira, Ana Carolina Dias, Luma Lopes, Priscila Portela, Thiago dos Santos, Flávia Rocha, Thiago Arruda, Ivan Cavalcante e demais amigos, pelo carinho, companheirismo e motivação, por compreenderem meus momentos de ausência e por me proporcionarem infinitos momentos de alegria ao longo do mestrado, por mostrarem-se dispostos a ajudar sempre. Um agradecimento mais que especial para a amiga Ellen Paula, pelo carinho, amizade, motivação e por se mostrar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas e auxiliar no que fosse necessário.

Agradeço a toda a equipe de diretores, coordenadores, agentes educadores, estagiários, professores e demais funcionários da Escola Municipal Pedro Aleixo, pelo carinho, por estarem sempre torcendo por meu sucesso, por compreenderem minha necessidade de estar no laboratório em diversos momentos e colaborarem para que isso se tornasse possível.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia por me proporcionarem conhecimento, pela colaboração e apoio em minha formação.

A TODOS, o meu “**MUITO OBRIGADA**”, vocês foram essenciais para que eu pudesse alcançar mais esta importante etapa em minha vida!!!

Cada minuto que passa pode ser tudo que me resta para viver
Mas eu desperdiço o tempo como se ele fosse infinito
Penso, logo sei que existir é uma circunstância
Que a vida acontece num sopro de Deus
E a chama permanece acesa enquanto estamos vivos

Pedro Cassiano Aguillar

RESUMO

AMARAL, Taline Anne da Silva. *Papel do sistema renina-angiotensina e do desequilíbrio redox em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME*. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Pré-eclâmpsia (PE), uma síndrome sistêmica da gestação caracterizada por proteinúria e hipertensão, está associada a uma significativa mortalidade tanto materna quanto fetal. Entretanto, sua fisiopatologia ainda não é totalmente compreendida. Apesar de um expressivo aumento da atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) na gestação normal, a pressão arterial não aumenta. Além disso, a redução da pressão de perfusão intra-uterina promove um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio que podem contribuir para a hipertensão na gestação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel do SRA vascular, assim como, do estresse oxidativo plasmático, cardiorenal e placentário para a regulação cardiovascular materna em ratas normotensas e em modelo de PE induzida por L-NAME. Foi observado um aumento da pressão arterial em animais que receberam L-NAME. As ratas grávidas + L-NAME apresentaram um menor ganho de massa corporal durante a gestação, menor número de filhotes vivos, maior número de abortos, menor massa placentária total e fetos com menor massa corporal. Foi observada uma redução na resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina (ACh) e angiotensina (Ang) II, aumento na resposta vasodilatadora induzida por nitroglicerina (NG) e aumento na resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina (Phe) e Ang II em LAM de ratas grávida e não grávidas que receberam L-NAME. Não foi observada diferença na expressão dos receptores AT1 e AT2 e das enzimas ECA, ECA2 e eNOS. Foi observado um aumento na concentração plasmática de renina e bradicinina (BK) em ratas grávidas + L-NAME e uma redução na concentração de Ang 1-7. As ratas grávidas e grávidas + L-NAME apresentaram um aumento nos níveis séricos de estradiol. Os níveis de malondialdeído e carbonilação de proteínas estava aumentados e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx estavam reduzidas em ratas grávidas e não grávidas que receberam L-NAME. A atividade da CAT não apresentou diferença entre os grupos. Em conclusão, uma redução na vasodilatação induzida pela Ang II associada a um aumento da vasoconstrição promovida por este peptídeo, sugerem uma contribuição do SRA no desenvolvimento das complicações características da PE observadas no modelo experimental de PE induzido por L-NAME. Do mesmo modo, a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas aumentadas, assim como, as atividades enzimáticas antioxidantes reduzidas sugerem a contribuição de uma defesa antioxidante comprometida e um dano oxidativo aumentado para o desenvolvimento da hipertensão e disfunção endotelial, aumento da mortalidade fetal e retardo do crescimento intra-uterino observados no modelo de PE estudado.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia. Sistema renina-angiotensina. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE), a systemic syndrome of pregnancy characterized by proteinuria and hypertension, is associated with significant morbidity and mortality to both mothers and fetuses, however its causes have not been completely clarified. Despite an expressive increase in renin-angiotensin system (RAS) activity in the normal pregnancy, blood pressure does not increase. Nevertheless, the role of RAS in PE is not well known. In PE, the reduction in intrauterine perfusion pressure promotes an increased release of reactive oxygen species, which may contribute to hypertension in pregnancy. In the present study, we investigated the role of the vascular RAS and the plasmatic, cardiorenal and placental oxidative stress to maternal cardiovascular regulation on normal pregnancy and in a animal model of preeclampsia which was induced by L-NAME. The blood pressure was increased in animals which received L-NAME. Pregnant + L-NAME rats had fat loss during pregnancy, increased number of death fetus, decreased number of fetus alive, lower total placental mass and lower pups weight. The vasodilator effect of acetylcholine (Ach) and angiotensin (Ang) II was reduced in pregnant + L-NAME and non-pregnant + L-NAME, otherwise, the vasodilator effect of nitroglycerine (NG) and the vasoconstrictor effect of phenylephrine (Phe) and Ang II were increased. The expression of AT1, AT2, ACE, ACE2 and eNOS were no significantly different among the four groups. The plasma levels of renin and bradykinin (BK) were increased in pregnant + L-NAME rats, while Ang 1-7 was reduced. The serum estradiol was increased in pregnant and pregnant + L-NAME rats. The levels of malondialdehyde and protein carbonyls were increased and activities of antioxidant enzymes SOD and GPx were lower in pregnant + L-NAME and non-pregnant + L-NAME animals, but CAT did not show significant difference among the four groups. In conclusion, the reduced vasodilator response of Ang II associated to increased vasoconstrictor response of this peptide, suggest that RAS contribute to development of preeclampsia-like characteristics in this model of PE. Similarly, the increase of lipid peroxidation and protein oxidation, as the reduction of antioxidant activity suggest the involvement of a deficient mechanism of antioxidant defense and an increased oxidative damage contributing to development of hypertension, endothelial dysfunction, high fetus mortality and intrauterine growth restriction observed in this model of PE.

Keywords: Preeclampsia. Renin-angiotensin system. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da placentação ocorrida na gestação normal e da placentação anormal ocorrida na pré-eclampsia	23
Figura 2 -	Representação esquemática das principais vias envolvidas na geração de peptídeos de Angiotensina	28
Figura 3 -	Representação esquemática do equilíbrio entre oxidantes celulares e o sistema de defesa antioxidante	35
Figura 4 -	Representação esquemática das espécies reativas e a ação das enzimas antioxidantes	43
Figura 5 -	Sistema de perfusão de leito arterial mesentérico utilizado para o estudo da reatividade vascular	48
Figura 6 -	Imagem representativa de um cromatograma demonstrando os picos correspondentes aos peptídeos analisados e seus respectivos tempos de retenção	51
Figura 7 -	Massa corporal de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME durante o período de gestação	57
Figura 8 -	Pressão Arterial Sistólica, Diastólica e Média de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME durante o período de gestação	59
Figura 9 -	Número de filhotes vivos por rata grávida e número de abortos por rata grávida de animais Grávidas e Grávidas + L-NAME com vinte dias de gestação	60
Figura 10 -	Massa corporal dos filhotes vivos e massa placentária total de animais Grávidas e Grávidas + L-NAME com vinte dias de gestação	61
Figura 11 -	Concentração de proteínas em urina de 24 horas e volume urinário coletado em 24 horas de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME durante o 19º dia de gestação	62

Figura 12 -	Níveis séricos de estradiol de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	63
Figura 13 -	Níveis plasmáticos de renina de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	64
Figura 14 -	Concentração plasmática de Angiotensina I, de Angiotensina II e de Angiotensina 1-7 de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	66
Figura 15 -	Concentração plasmática de bradicinina de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	67
Figura 16 -	Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	68
Figura 17 -	Resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	69
Figura 18 -	Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	70
Figura 19 -	Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina 1-7 em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	71
Figura 20 -	Resposta vasoconstritora induzida pela Fenilefrina em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	72
Figura 21 -	Resposta vasoconstritora induzida pela Angiotensina II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	73
Figura 22 -	Expressão do receptor AT1 da Ang II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	74

Figura 23 -	Expressão do receptor AT2 da Ang II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	75
Figura 24 -	Expressão da enzima ECA em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	76
Figura 25 -	Expressão da enzima ECA2 em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	77
Figura 26 -	Expressão da enzima eNOS em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	78
Figura 27 -	Níveis de TBARs em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	80
Figura 28 -	Carbonilação de proteínas em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	82
Figura 29 -	Atividade da enzima SOD em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	84
Figura 30 -	Atividade da enzima CAT em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	85
Figura 31 -	Atividade da enzima GPx em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	87
Figura 32 -	Conteúdo total de nitrito em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- SH	Grupo sulfidril
- SS	Ponte dissulfeto
4-HNE	4-hidroxi-nonenal
ACh	Acetilcolina
AMP	Aminopectidase
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1	Receptor de Ang II tipo 1
AT1-7	Receptor <i>mas</i> de Ang-(1-7)
AT1-AA	Autoanticorpos de AT1
AT2	Receptor de Ang II tipo 2
AVC	Acidente vascular cerebral
B2R	Receptor B2 da Bradicinina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BK	Bradicinina
CAT	Catalase
CuZn-SOD	Superóxido Dismutase Cobre-Zinco
D-Amp	Dipeptidil-aminopectidase
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EC-SOD	Superóxido Dismutase Extracelular
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
EGF	Fator de crscimento epidermal
Enos	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio

FEBRASGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obsterícia
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione s-transferase
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO ₂ [·]	Hidroperoxila
HPLC	Cromatografia Líquida de alto desempenho
iECA	Inibidores da ECA
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina 1
iNOS	Oxido Nítrico Sintase Induzível
IRAP	aminopeptidase regulada por insulina
LAM	Leito arterial mesentérico
L-NAME	Cloridrato de N-ω-nitro-L-arginina metil ester
L-OHArg	N ^ω -hidroxi-L-arginina
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido Dismutase Manganês
NE	Norepinefrina
NED	N-naftil etilenodiamina
NEP	Endopeptidase neutra
NG	Nitroglicerina
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂	Nitrito

NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{·-}	Ânion Superóxido
OH [·]	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCP	Prolilcarboxipeptidase
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PE	Pré-eclâmpsia
PEP	Prolilendopeptidase
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PHE	Fenilefrina
PIGF	Fator de crescimento placentário
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PP	Pressão de perfusão
RCIU	Retardo do Crescimento Intra-uterino
RIA	Radioimunoensaio
ROOH	Hidroperóxidos Orgânicos
sEng	Endoglina solúvel
sFlt-1	Antiangiogênicos soluble fms-like tyrosine kinase I
SHG	Síndromes hipertensivas na gravidez
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido Dismutase
SOD 1	Superóxido Dismutase Cobre-Zinco
SOD 2	Superóxido Dismutase Manganês
SOD 3	Superóxido Dismutase Extracelular
SRA	Sistema renina-angiotensina
sVEGRF-1	<i>Soluble vascular endothelial growth factor receptor- 1</i>

TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloro Acético
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor β1</i>
TGF- β 3	<i>Transforming growth factor β3</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Txr	Tiorredoxina redutase
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VSMC	Célula do Músculo Liso Vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1	Pré-eclâmpsia	21
1.2	Sistema renina-angiotensina	27
1.3	Endotélio e disfunção vascular	31
1.4	Estresse oxidativo	35
1.4.1	<u>Espécies reativas de oxigênio</u>	36
1.4.2	<u>Espécies reativas de nitrogênio</u>	39
1.4.3	<u>Peroxidação lipídica</u>	39
1.4.4	<u>Oxidação de proteínas</u>	40
1.4.5	<u>Sistema de defesa antioxidante</u>	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	METODOLOGIA	45
3.1	Animais utilizados	45
3.2	Coleta de urina e medida de proteína urinária	46
3.3	Medida da pressão arterial por pletismografia de cauda	46
3.4	Isolamento de leito arterial mesentérico de rato	47
3.5	Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas	47
3.5.1	<u>Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina e nitroglicerina</u>	49
3.5.2	<u>Resposta vasodilatadora induzida pela angiotensina II e pela angiotensina 1-7</u>	49
3.5.3	<u>Resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina e pela angiotensina II</u>	49
3.6	Níveis de estradiol sérico	50
3.7	Níveis de renina plasmática	50
3.8	Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)	50

3.9	Atividade das enzimas antioxidantes	51
3.9.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u>	51
3.9.2	<u>Medida da atividade da catalase</u>	52
3.9.3	<u>Medida da atividade da glutaciona peroxidase</u>	52
3.10	Ensaio pró-oxidante	53
3.10.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)</u>	53
3.10.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	54
3.11	Medida de nitrito	54
3.12	Dosagem de proteínas	55
3.13	Western blotting	55
3.14	Análise estatística	56
4	RESULTADOS	57
4.1	Variação da massa corporal durante a gestação	57
4.2	Medida da Pressão Arterial	58
4.3	Nascimento e mortalidade dos filhotes	60
4.4	Medida da massa corporal dos filhotes vivos e da massa placentária total	61
4.5	Dosagem de proteína urinária e volume urinário	62
4.6	Níveis Séricos de Estradiol	63
4.7	Níveis de Renina Plasmática	64
4.8	Concentração plasmática dos peptídeos Angiotensina I, Angiotensina II e Angiotensina 1-7	65
4.9	Concentração de Bradicinina Plasmática	67
4.10	Resposta vasodilatadora induzida pela Acetilcolina	68
4.11	Resposta vasodilatadora induzida pela Nitroglicerina	69
4.12	Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina II	70
4.13	Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina 1-7	71
4.14	Resposta vasoconstritora induzida pela Fenilefrina	72
4.15	Resposta vasoconstritora induzida pela Angiotensina II	73
4.16	Expressão do receptor AT1 da Angiotensina II	74
4.17	Expressão do receptor AT2 da Angiotensina II	75

4.18	Expressão da Enzima Conversora de Angiotensina	76
4.19	Expressão da Enzima Conversora de Angiotensina 2	77
4.20	Expressão da eNOS	78
4.21	Ensaio pró-oxidantes	79
4.21.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</u>	79
4.21.2	<u>Carbonilação de Proteínas</u>	81
4.22	Atividade das enzimas antioxidantes	83
4.22.1	<u>Superóxido Dismutase</u>	83
4.22.2	<u>Catalase</u>	85
4.22.3	<u>Glutathione Peroxidase</u>	86
4.23	Medida da Produção de Nitrito	88
5	DISCUSSÃO	90
6	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101

INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE), uma síndrome específica da gravidez caracterizada por hipertensão e proteinúria diagnosticadas, normalmente após a 20ª semana de gestação, é considerada um problema obstétrico associado a uma significativa morbidade e mortalidade materna e neonatal (GILBERT *et al.*, 2008).

Embora a compreensão da fisiopatologia da PE tenha melhorado, suas causas ainda não foram completamente esclarecidas e não existe, atualmente, um teste preventivo para identificar mulheres em risco de desenvolver essa enfermidade. O tratamento envolve a supervisão da mãe e do feto durante o pré-natal e a interrupção prematura da gestação quando necessária (SIBAI e BARTON, 2007; TURNER, 2010).

A literatura têm demonstrado que o SRA pode ter uma participação importante na regulação cardiovascular durante a gestação. Esses achados nos levaram a questionar se a Ang II, a Ang 1-7 e suas enzimas geradoras, ECA e ECA2 também poderiam contribuir para a regulação cardiovascular na gravidez e se a PE modifica essa regulação.

Estudos têm demonstrado que a Ang 1-7 é capaz de modular negativamente o efeito pró-oxidante da Ang II em ratos e humanos (POLIZIO, 2007; SAMPAIO, 2007). Na gestação normal há aumento dos níveis plasmáticos de Ang 1-7 (BROSNIHAN *et al.*, 2005) e talvez um possível efeito antioxidante do heptapeptídeo possa contribuir para a regulação cardiovascular materna, levando à redução da pressão arterial. Sendo assim, uma possível redução dos níveis deste peptídeo na PE poderia exacerbar a ação pró-oxidante da Ang II. No entanto, nenhuma evidência nesse sentido foi descrita até o momento.

Nesta perspectiva, o estresse oxidativo tem sido proposto como um dos agentes causadores das doenças relacionadas à gravidez, desempenhando um papel fundamental sobre as alterações placentárias, contribuindo com a fisiopatologia da PE e para o RCIU (GUPTA *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que a PE, está associada com a redução das concentrações de vitaminas e glutathione, uma das enzimas do sistema de defesa antioxidante, e com o aumento de biomarcadores do estresse oxidativo (SIKKEMA *et al.*, 2001; MADAZLI *et al.*, 2002; TSUKIMORI *et al.*, 2008).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Pré-eclâmpsia

A hipertensão arterial, caracterizada por uma elevação na pressão arterial a níveis de pressão arterial diastólica igual ou superior a 90 mm Hg e/ou pressão arterial sistólica igual ou superior a 140 mm Hg, é um fator de risco bem estabelecido para todas as doenças cardiovasculares, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica (LEWINGTON *et al.*, 2002; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010). Os limites de pressão arterial considerados normais são arbitrários e, na avaliação dos pacientes, deve-se considerar também a presença de fatores de risco, lesões de órgãos-alvo e doenças associadas. A acurácia do diagnóstico de hipertensão arterial depende fundamentalmente dos cuidados despendidos nas medidas da pressão arterial (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

As doenças hipertensivas complicam 5 a 7 % de todas as gestações (LINDHEIMER e CUNNINGHAM, 2008). Após aprovação pela Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez e ampla revisão das classificações existentes, em 2004, a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) publicou o “Manual de Orientação: Diabetes e Hipertensão na gravidez”, o qual classificou as síndromes hipertensivas na gravidez (SHG) em: Pré-eclâmpsia leve e grave/ eclâmpsia; hipertensão crônica de qualquer etiologia; Pré-eclâmpsia / eclâmpsia superposta à hipertensão crônica; e hipertensão gestacional transitória ou crônica.

Estima-se que a pré-eclâmpsia (PE) tenha uma prevalência entre 3 a 5% no mundo (WANG *et al.*, 2009). No Brasil, a hipertensão arterial na gravidez constitui a primeira causa de morte materna (SOARES *et al.*, 2009). Globalmente, a PE e a eclâmpsia são responsáveis por 10-15% das mortes maternas (DULEY, 2009) e são responsáveis por significativa morbimortalidade perinatal por desencadearem o RCIU e ser uma das principais causas de nascimentos prematuros (TURNER, 2010).

A PE ocorre normalmente após a 20ª semana de gestação, caracterizando-se pelo desenvolvimento de hipertensão com proteinúria significativa ($\geq 0,3\text{g/L}$ em urina de 24h ou 1 g/L , 1+ ou mais, pelo método quantitativo de fita em amostra simples) e/ou edema de mãos e face, que regridem após o delivramento da placenta (TEDOLDI *et al.*, 2009). Há risco aumentado de convulsões, falência renal, edema pulmonar, acidente vascular cerebral (AVC) e morte (SIBBAI *et al.*, 2005). Nessa perspectiva, a eclampsia é diagnosticada quando ocorrem convulsões em uma paciente com hipertensão gestacional ou PE e, neste caso, a convulsão não pode estar associada a outra causa que a justifique como epilepsia e outras doenças convulsivas (LINDHEIMER e CUNNINGHAM, 2008; SIBAI *et al.*, 2003).

Alguns fatores predisponentes para o desenvolvimento de PE são: primigestas, história familiar de PE, história de PE prévia, gestação associada a um aumento da massa trofoblástica, diabetes mellitus, extremos da idade, hipertensão arterial crônica, gestação com parceiro diferente, pouca exposição ao esperma e líquido seminal (FEBRASGO, 2004).

A fisiopatologia da PE envolve tanto fatores maternos quanto fatores fetais/placentários, sendo uma doença complexa e multissistêmica. Na gestação normal, as células citotrofoblásticas invasivas fetais migram através do sítio de implantação da placenta e invadem a túnica média da decídua das artérias espiraladas maternas, substituindo as células epiteliais por endoteliais através da mudança na expressão de moléculas de adesão, em um processo chamado de pseudo-vascularização (ZHOU *et al.*, 1997; FURUYA *et al.*, 2011). Neste processo, ocorre a transformação de pequenas arteríolas musculares em vasos de alta capacitância e baixa resistência com maior capacidade luminal e menor resposta a substâncias vasoativas. Isto permite o aumento do fluxo sanguíneo para a interface materno-fetal. Este remodelamento geralmente se inicia no primeiro trimestre e termina entre 18 a 20 semanas de gestação (KHONG, 1986; FURUYA *et al.*, 2011; Figura 1).

Na PE há uma falha de penetração do trofoblasto na porção muscular das artérias espiraladas, havendo conseqüentemente, falha no desenvolvimento destas artérias, ao invés de canais vasculares largos e tortuosos, característicos das gestações normais, estes permanecem finos, resultando em hipoperfusão e isquemia placentária.

Um defeito na diferenciação do trofoblasto também seria uma possível explicação para a falha de sua invasão nas artérias espiraladas. A sua diferenciação depende de alterações na expressão de inúmeras moléculas como as citocinas, moléculas de adesão, os fatores de crescimento e as metaloproteinases, de modo que na PE o trofoblasto possui uma deficiência na pseudo-vascularização (ZHOU *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2009; HUPPERTZ, 2008; FURUYA *et al.*, 2011).

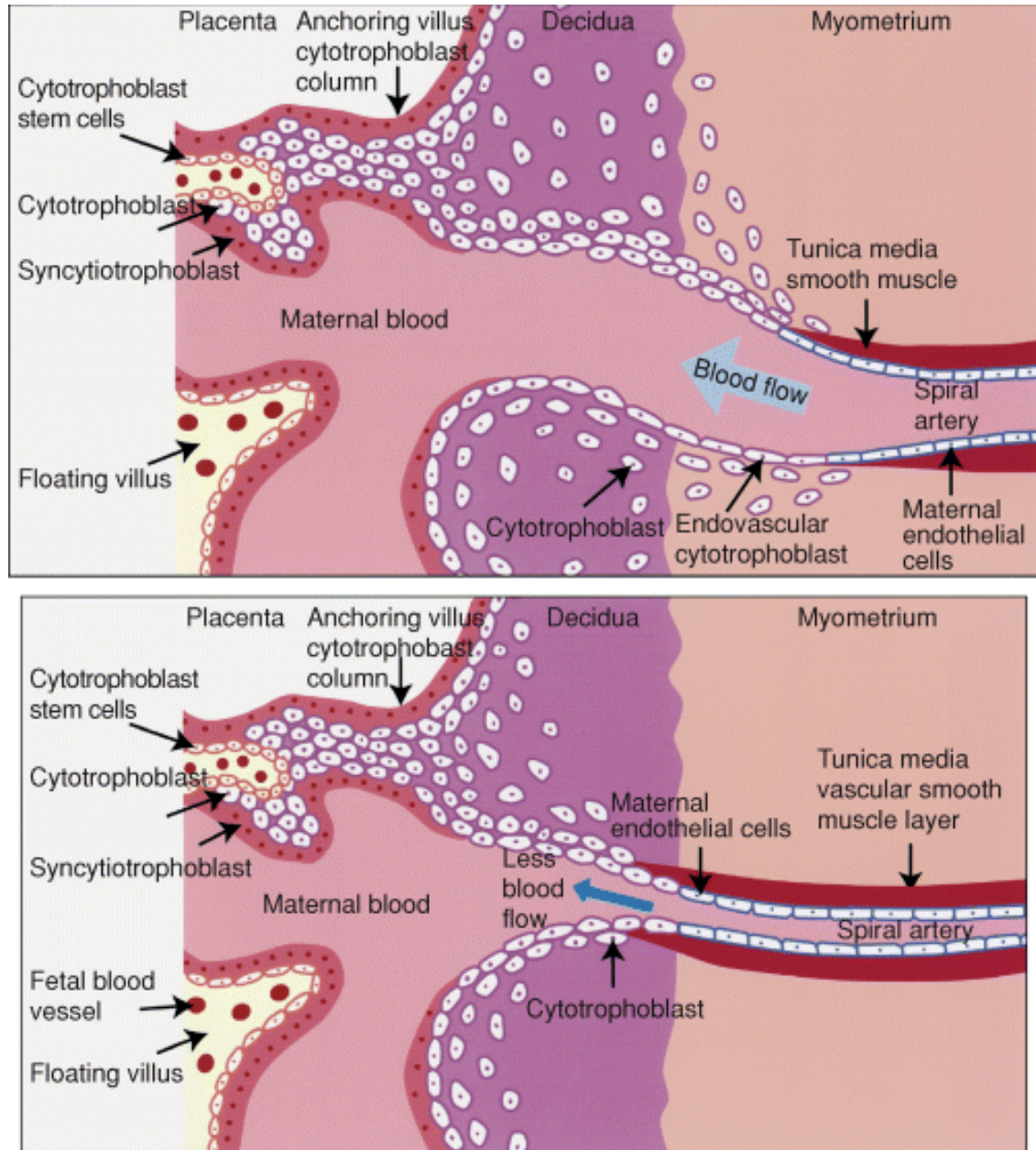


Figura 1: Representação esquemática da placentação ocorrida na gestação normal (imagem superior) e da placentação anormal ocorrida na pré-eclampsia (imagem inferior). Fonte: KARUMANCHI *et al.*, 2005.

Anormalidades no desenvolvimento da vasculatura placentária no início da gestação podem resultar em baixa perfusão, hipóxia, e isquemia placentária que levariam à liberação de fatores anti-angiogênicos, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, dentre outros fatores inflamatórios na circulação materna que alterariam a função endotelial sistêmica e causariam a hipertensão e as outras manifestações da PE, além das manifestações no feto como o RCIU. As bases moleculares para a desregulação placentária continuam incertas e o papel dos mediadores endoteliais, angiogênicos e antiangiogênicos no desenvolvimento vascular placentário precoce estão em intensa investigação (GILBERT *et al.*, 2008; TURNER, 2010; REDMAN *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que na circulação de pacientes com PE, os níveis dos fatores antiangiogênicos *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1) e *soluble endoglin* (sEng), estão significativamente aumentados, havendo um desequilíbrio entre estes fatores antiangiogênicos, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento placentário (PIGF) (FURUYA *et al.*, 2011; GILBERT *et al.*, 2008; LEVINE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2009).

O sFlt-1, também conhecido como *soluble vascular endothelial growth factor receptor- 1* (sVEGRF-1), tem sido apontado como o principal fator na patogênese da pré-eclâmpsia (GILBERT *et al.*, 2008; SHIBATA *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009). O sFlt-1 antagoniza a atividade biológica do VEGF e do PIGF por sua ligação a eles, prevenindo a interação dos mesmos com outros receptores. Em gestações normais, há um aumento de VEGF e PIGF na metade da gestação, enquanto, em mulheres com PE há um aumento de sFlt-1 em comparação com as gestações normais, interferindo nas atividades do VEGF, que promove a fosforilação da enzima formadora de óxido nítrico (NO), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), promovendo um aumento de sua atividade enzimática, e do PIGF, o que pode estar associado ao desenvolvimento da disfunção vascular sistêmica na PE (FELIERS *et al.*, 2005; FURUYA *et al.*, 2011; MOHAUPT, 2007).

A endoglina é um co-receptor do *transforming growth factor $\beta 1$ e $\beta 3$* (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 3$) e está altamente expressa nas membranas celulares do endotélio vascular e do sinciciotrofoblasto. A sua forma solúvel (sEng) é uma proteína antiangiogênica que

inibe o sinal do TGF- β 1 na vasculatura. Juntamente com o sFlt-1, está associada à disfunção endotelial ocorrida na PE, mas operando por mecanismos distintos (LEVINE *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; MOHAUPT, 2007).

A medida direta da concentração de NO é difícil e controversa, visto que as concentrações sistêmicas não representam a sinalização local. De modo semelhante, a aproximação da medida de produção de NO a partir da medida dos metabólitos estáveis nitrito/nitrato excretados na urina, é imprecisa por ser influenciada por fatores ambientais tais como a alimentação. Entretanto, Haller *et al.* (1998) demonstraram que a infusão do substrato endógeno para a formação de NO, o aminoácido L-arginina, em ratas grávidas, resultou em uma diminuição da pressão arterial. Uma infusão, a curto prazo, de L-arginina em mulheres com hipertensão gestacional, resultou em uma redução na pressão arterial sistólica (PAS) e na pressão arterial diastólica (PAD) (NERI *et al.*, 2006) evidenciando a importância do NO no desenvolvimento da PE.

O sistema renina-angiotensina (SRA) também possui importante função na fisiopatologia da PE. Até o momento, tem sido proposto que mulheres grávidas são resistentes ao efeito pressor da Ang II, assim como de outros vasoconstritores, e por isso elas permanecem normotensas, apesar do aumento de 2.7 vezes na concentração plasmática do peptídeo (BROSNIHAN *et al.*, 2004; VALDES *et al.*, 2009). Assim como na gravidez normal, a concentração plasmática de Ang II permanece elevada na PE. Entretanto, a concentração plasmática de Ang 1-7 (Ang 1-7), um peptídeo vasodilatador, está reduzida na PE, em comparação à gestação normal (BROSNIHAN *et al.*, 2004). A redução da Ang 1-7 na presença de uma concentração elevada de Ang II pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão (MERRILL *et al.*, 2002).

A Ang II pode, ainda, promover o remodelamento vascular pela ativação de cascatas de sinalização que promovem vasoconstrição, estresse oxidativo, crescimento vascular e inflamação. Acredita-se que a redução da resposta à Ang II ocorrida na gestação normal seja provocada pela inativação da Ang II por peptidases séricas e placentárias, entretanto a atividade destas enzimas encontra-se reduzida em mulheres com PE grave, o que leva a uma redução na degradação de Ang II e no aumento da sensibilidade à mesma (MIZUTANI e TOMODA, 1996). Nessa perspectiva, os níveis plasmáticos de autoanticorpos AT1 (AT1-AA), que ativam os receptores AT1,

apresentam uma elevação no período correspondente ao aparecimento dos sintomas da PE e diminuem cerca de seis semanas após o parto, sugerindo que os mesmos possam estar associados à vasoconstrição e desenvolvimento da hipertensão (DECHEND *et al.*, 2000).

Um modelo animal ideal de PE seria caracterizado pelo desenvolvimento de hipertensão especificamente oriunda da gravidez materna, proteinúria, disfunção endotelial e um desequilíbrio de fatores angiogênicos. Além disso, essas mudanças deveriam ser revertidas após a remoção da placenta. Para mimetizar a condição humana, tais manifestações deveriam, ainda, ocorrer em consequência a uma invasão inadequada do trofoblasto ocorrida no primeiro trimestre da gestação. Nessa perspectiva, uma variedade de modelos animais tem sido propostos com base nas causas percebidas e mediadores da PE, os quais incluem: hipóxia (modelos de redução da pressão de perfusão uterina), redução do NO (camundongos knockout para a NOS), anormalidades no sistema renina-angiotensina (modelos transgênicos), angiogênese prejudicada (modelos de infusão de sFlt-1) e resposta imune materna exacerbada (infusão de TNF- α) (MCCARTHY *et al.*, 2011). Embora haja controvérsia, acredita-se que a PE seja uma condição que ocorra espontaneamente apenas em humanos e algumas espécies de macacos (THORNTON e ONWUDE, 1992), o que leva a limitações nos modelos experimentais propostos.

O bloqueio da síntese de NO em estudos utilizando coelhos, porquinhos da Índia e ratos têm demonstrado um aumento acentuado na pressão arterial sistêmica nesses animais. Além disso, a inibição crônica da NOS utilizando Cloridrato de N- ω -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) em ratas grávidas levou à valorização deste como um modelo farmacológico de PE, por promover o desenvolvimento de proteinúria, hipertensão, redução da taxa de filtração glomerular, trombocitopenia e RCIU (SALAS *et al.*, 1995; MOLNAR *et al.*, 1994). Não obstante, este modelo tem gerado dados fundamentais relacionados com o papel da biodisponibilidade reduzida de NO na mediação de alguns aspectos da PE. Ramesar *et al.* (2010) demonstrou que o tratamento de ratos submetidos à inibição crônica com sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase-5 o qual inibe a degradação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc),

resultou em uma melhora no quadro hipertensivo induzido por L-NAME, além de reduzir a mortalidade fetal e a excreção protéica.

1.2 Sistema renina-angiotensina

O SRA atua de maneira sinérgica com o sistema nervoso simpático na regulação da pressão arterial. O principal fator determinante da atividade deste sistema é a renina (uma aspartil protease), que é secretada principalmente por células do aparelho justaglomerular. Esta enzima está envolvida no metabolismo do angiotensinogênio, uma α_2 globulina que se origina principalmente no fígado, formando Ang I.

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

Em 2000, a ECA2 foi descoberta e caracterizada como uma enzima similar à ECA (TIPNIS *et al.*, 2000), contendo 805 aminoácidos com significativa homologia. No entanto, ao contrário da ECA, a ECA2 hidrolisa Ang I a Ang 1-9, Ang II a Ang-(1-7), e BK a BK-(1-7) (metabólito inativo). Além disso, a ECA2 não converte Ang I em Ang II, e sua atividade enzimática não é inibida pelos conhecidos inibidores da ECA (Figura 2). Essa enzima foi localizada na membrana de miócitos cardíacos, células endoteliais e tubulares renais e no testículo (DONOGHUE *et al.*, 2000). O RNAm e os níveis de proteína para ECA2 estão diminuídos no rim de modelos de hipertensão em ratos. Além

disso, já foi demonstrado que o aumento da expressão de ECA2 na vasculatura está relacionado à redução da pressão arterial e melhora da função endotelial em ratos hipertensos (RENTZSCH *et al.*, 2008). Os dados encontrados até o presente indicam que a ECA2 provavelmente atue contrabalançando as ações da ECA (CRACKOWER *et al.*, 2002; Figura 2).

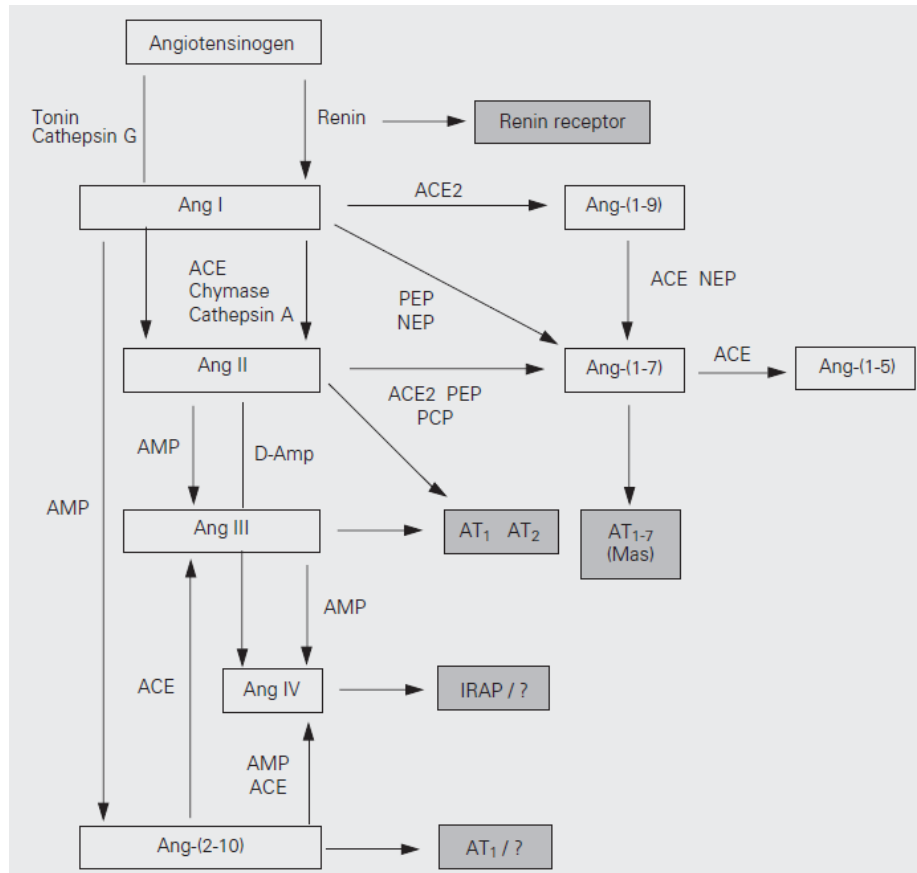


Figura 2: Representação esquemática das principais vias envolvidas na geração de peptídeos de Angiotensina. ACE = Enzima conversora de angiotensina; Ang = Angiotensina; AMP = Aminopeptidase; AT1 = Receptor de Ang II tipo 1; AT2 = Receptor de Ang II tipo 2; AT1-7 = Receptor *mas* de Ang-(1-7); D-Amp = dipeptidil-aminopeptidase; IRAP = aminopeptidase regulada por insulina; PCP = prolilcarboxipeptidase; PEP =prolilendopeptidase; NEP = neutralendopeptidase. Fonte: FERREIRA e SANTOS, 2005.

A Ang II é o principal autacóide do SRA. A sequência de aminoácidos da Ang II, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, é igual em humanos, cavalos e porcos, sendo em bovinos o aminoácido isoleucina na posição 5 do peptídeo trocado pela valina. A Ang II exerce suas ações biológicas através da ligação a distintos receptores de membrana e,

consequentemente, ativa diversas vias intracelulares. Dois principais subtipos de receptores foram identificados e clonados, e são conhecidos como AT₁ e AT₂ (DE GASPARO *et al.*, 2000).

O receptor AT₁ é responsável por mediar a maioria dos efeitos da Ang II. Entre as principais ações mediadas por esse receptor destaca-se a vasoconstrição periférica, liberação de aldosterona, retenção de sódio, sede, ativação simpática, aumento da expressão de pró-oncogenes, aumento dos fatores de crescimento e aumento da síntese de proteína da matriz extracelular. A Ang II promove, portanto, alterações na resistência vascular periférica, na função renal e na estrutura cardiovascular (SCOTT-BURDEN, 1991; MORISHITA *et al.*, 1992; ITO *et al.*, 1995; WOLF *et al.*, 1995; UNGER *et al.*, 1996; STROTH e UNGER, 1999).

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 várias funções como, redução do crescimento celular e tecidual (STOLL *et al.*, 1995; MEFFERT *et al.*, 1996; TSUZUKI *et al.*, 1996), indução da diferenciação celular neuronal (COTE *et al.*, 1999; GENDRON *et al.*, 1999) e apoptose (CHAMOIX *et al.*, 1999; GALLINAT *et al.*, 1999). Além disso, o receptor AT₂ pode mediar efeitos hipotensores (SCHEUER e PERRONE, 1993; ICHIKI *et al.*, 1995) e vasodilatadores (KATADA e MAJIMA, 2002; SOARES DE MOURA *et al.*, 2004; OGNIBENE *et al.*, 2009).

A Ang 1-7 é um heptapeptídeo formado a partir de Ang I ou Ang II por ação de endopeptidases e carboxipeptidases. Além disso, a ECA2 está sendo implicada na formação de Ang 1-7 por três vias diferentes: diretamente de Ang II (VICKERS *et al.*, 2002), diretamente de Ang I (DONOGHUE *et al.*, 2000) ou por hidrólise da Ang 1-9 (FERREIRA e SANTOS, 2005). Santos *et al.* (2003) identificaram a Ang 1-7 como um ligante endógeno de receptor acoplado à proteína G, conhecido como *mas*.

A Ang 1-7 está sendo considerada um importante componente do SRA, com algumas ações similares e outras opostas às desencadeadas pela Ang II (FERRARIO e IYER, 1998; CAREY e SIRAGY, 2003). A Ang 1-7 não possui efeito vasoconstritor, não age na liberação de aldosterona e não produz sede ou aumento da atividade simpática.

Mas, como a Ang II, libera vasopressina, estimula a biossíntese de prostaglandinas e também exerce ação antidiurética no rim (DELLI PIZZI *et al.*, 1994). Estudos mostram que as ações promovidas pela Ang 1-7 contra-regulam àquelas da Ang II (FERRARIO *et al.*, 1991) e contribuem para a regulação da pressão arterial (IYER *et al.*, 2000a). O heptapeptídeo promove relaxamento em preparações de artérias coronárias e mesentéricas (BROSNIHAN *et al.*, 1996; GORELIK *et al.*, 1998), estimula a liberação de NO e prostaglandinas vasodilatadoras (RAJENDRAN *et al.*, 2005), assim como potencializa os efeitos da BK (LI *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 1997; GRECO *et al.*, 2006). Evidências anteriores demonstram que a Ang 1-7 reverte o efeito estimulatório da Ang II na atividade Na^+ -ATPase no túbulo proximal, através de um antagonista do receptor *mas*, conhecido como A779 (LARA *et al.*, 2002). O heptapeptídeo também é capaz de potencializar o efeito anti-agregante plaquetário induzido pelo nitroprussiato de sódio. (RAJENDRAN *et al.*, 2005; FRAGA-SILVA *et al.*, 2008). Além disso, o tratamento crônico com inibidores da ECA (iECA) ou antagonistas de receptor AT_1 aumenta cerca de 25 vezes os níveis plasmáticos de Ang 1-7 (CHAPPELL *et al.*, 1998; IYER *et al.*, 2000b), sugerindo que o heptapeptídeo pode estar envolvido nos efeitos benéficos observados com essas terapias (IYER *et al.*, 2000b; COLLISTER & HENDEL, 2003).

Evidências recentes demonstram uma redução da resposta contrátil em anéis de aorta de ratas grávidas, quando comparada a ratas virgens, envolvendo o aumento da expressão e da atividade de receptores AT_2 e de eNOS, o que pode contribuir para a diminuição da pressão arterial na gravidez (STENNETT *et al.*, 2009). Reforçando estes achados Brosnihan *et al.* (2004) demonstraram que mulheres grávidas são resistentes ao efeito pressor da Ang II, em parte, a uma menor expressão do receptor AT_1 . Além disso, os níveis plasmático e urinário de Ang 1-7 estão aumentados na gestação normal (BROSNIHAN *et al.*, 2005), assim como há um aumento do efeito vasodilatador do heptapeptídeo em artérias de resistência (NEVES *et al.*, 2003).

1.3 Endotélio e disfunção vascular

O endotélio é uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício. O fluxo sanguíneo com a sua força de cisalhamento (*shear stress*), atua sobre as células endoteliais através de uma cascata de eventos que conduzem a produção de NO, pela enzima eNOS (BAHIA *et al.*, 2006).

Acreditou-se durante anos que o endotélio era apenas uma barreira mecânica entre o meio circulante e os demais componentes da parede vascular, porém hoje já se sabe que ele apresenta diversas atividades fisiológicas. A importância do endotélio no processo de controle do tônus vascular foi primeiramente descrito por Furchgott e Zawadzki (1980), que demonstraram que a remoção do endotélio impedia a vasodilatação induzida por ACh em artérias isoladas de coelho, concluindo que o endotélio produzia uma substância vasodilatadora, denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Inicialmente, foi sugerido que o EDRF fosse um radical livre derivado do metabolismo do ácido araquidônico (FURCHGOTT, 1984). Estudos posteriores, realizados com o objetivo de identificar a natureza química do EDRF (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987), constataram que tal fator se tratava do óxido nítrico (NO).

O NO é um radical livre biatômico, instável, que contém um elétron desemparelhado e que, portanto, pode reagir com qualquer composto oxidante fraco ou com agentes redutores (KANNER *et al.*, 1991). Ele apresenta meia-vida de 1 a 10 segundos (CARRERAS *et al.*, 1994), difundindo-se rapidamente através dos tecidos até entrar nas hemácias e podendo reagir com a oxihemoglobina, promovendo sua degradação. O NO persiste em solução em concentrações micromolares, reagindo com oxigênio para formar potentes oxidantes, como nitrito (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

O NO é biossintetizado por três isoformas distintas de NO sintase, em mamíferos. A NO sintase neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III) são constitutivas, sendo predominantemente expressadas em células neuronais e endoteliais, respectivamente, enquanto a NO sintase induzível (iNOS ou NOS II) é usualmente expressa em células envolvidas no processo inflamatório, como

macrófagos, através da estimulação por citocinas e/ou endotoxinas. A atividade da eNOS e nNOS é dependente da concentração intracelular de Ca^{2+} , de modo que a produção de NO em tais células é muito pequena, em condições fisiológicas. Entretanto, a atividade da iNOS é independente de Ca^{2+} , representando uma alta produção de NO, cerca de 1 a 10 μM em macrófagos. A produção excessiva de NO, tem sido relacionada à fisiopatologia de diversas doenças (NAGANO, 2009).

No endotélio, o NO é sintetizado pela eNOS, que utiliza o aminoácido L-arginina como substrato (PALMER *et al.*, 1988). A síntese do NO pela eNOS implica inicialmente na formação do N^{ω} -hidroxi-L-arginina (L-OHArg) pela monooxigenação da L-arginina dependente de NADPH e tetrahidrobiopiterina (BH_4). Sequencialmente, a L-OHArg tem a ligação C=N clivada, ocorrendo a formação de L-citrulina e NO. Em ambos os passos ocorrem o consumo de NADPH e O_2 (ALDERTON *et al.*, 2001; MALINSKI, 2005).

O NO participa da regulação do tônus vascular atuando nas células da musculatura lisa da parede dos vasos produzindo relaxamento vascular (PALMER, 1987) e inibindo a atividade plaquetária, agregação de leucócitos e proliferação das células musculares lisas da parede vascular (RAMACHANDRAN *et al.*, 2002). Nesse âmbito, o NO produzido no endotélio é um potente vasodilatador, o qual desempenha um crítico papel na manutenção da homeostase vascular através de seus efeitos anti-aterogênico e anti-proliferativo na parede dos vasos (POPE *et al.*, 2009).

O NO gerado pela NOS se difunde pelas membranas e pode atingir a guanilato ciclase (GC) solúvel presente nas células musculares lisas vasculares (VSMC), estimulando esta enzima a converter GTP em GMP cíclico (IGNARRO, 1992; VANHOUTTE, 2009). A formação de GMPc induz relaxamento da musculatura lisa vascular por ativar a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que promove a fosforilação de várias proteínas citoplasmáticas, incluindo a cadeia leve da miosina. A fosforilação da quinase de cadeia leve da miosina causa a diminuição da concentração citoplasmática de Ca^{2+} por promover o efluxo de Ca^{2+} para o meio extracelular e/ou armazenamento do Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, resultando na inibição do aparato contrátil da célula do músculo liso vascular (RAPOPPORT e MURAD, 1983; WALDMAN e MURAD, 1987; SONENBURG e BEAVO, 1994; STANKEVICIUS *et al.*, 2003).

A formação de GMPc via NO pode causar relaxamento também por ativação de canais de potássio presentes na membrana das células do músculo liso vascular, promovendo aumento do efluxo de potássio e consequente hiperpolarização da membrana (ARCHER *et al.*, 1994).

A célula endotelial possui diversas funções na vasculatura, sendo uma das mais importantes, a regulação do tônus vascular através do equilíbrio na liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. Por responder a fatores físicos e moleculares na vasculatura, o endotélio modula a contração da musculatura lisa vascular, sendo um crítico determinante vasomotor e, conseqüentemente, do fluxo sanguíneo. Sob condições fisiológicas normais, o endotélio mantém um tônus vascular basal pela produção de fatores de relaxamento, tais como prostaciclina, NO e fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF). Entretanto, o endotélio está alterado em vários estados patológicos, incluindo a hipertensão, levando a um fenômeno chamado “disfunção endotelial”, que é caracterizado por um impedimento na vasodilatação dependente de endotélio (SUZUKI *et al.*, 1995; TADDEI *et al.*, 1996; SOTOMAYOR *et al.*, 1999; FÉLÉTOU *et al.*, 2010).

Existe uma clara discrepância da função endotelial durante as adaptações normais da gestação, já que, as evidências demonstram que as respostas vasodilatadoras dependentes de endotélio induzidas pela acetilcolina (ACh) e BK em anéis de aorta ou artérias mesentéricas podem estar inalteradas (LEARMONT *et al.*, 1996; BALLEJO *et al.*, 2002; RESENDE *et al.*, 2004), aumentadas (HONDA *et al.*, 1996; PASCOAL *et al.*, 1995; GERBER *et al.*, 1998) ou reduzidas (PARENT *et al.*, 1989) em ratas grávidas normais comparadas a ratas virgens. Apesar das discrepâncias, uma resposta aumentada a vasodilatadores poderia contribuir para a redução da pressão arterial observada no meio da gestação em humanos e nos dias que antecedem o parto em ratas, como uma adaptação fisiológica à gravidez normal.

Por outro lado, um relaxamento dependente de endotélio alterado poderia contribuir para a reatividade vascular alterada, observada na PE e para a perfusão placentária reduzida associada ao RCIU (GILLHAM *et al.*, 2003). A disfunção endotelial, parece contribuir para o estado hipertensivo na gestação (RESENDE *et al.*, 2004), pois favorece também o aumento da resistência periférica.

Recentemente demonstramos que a Ang II e Ang 1-7 são capazes de relaxar vasos de resistência de ratas grávidas (OGNIBENE *et al.*, 2012), sugerindo pela primeira vez uma contribuição destes peptídeos para a modulação do tônus vascular na gravidez. Entretanto, não sabemos se as respostas vasodilatadoras à Ang II e Ang 1-7 dependentes de endotélio e mediadas por NO (SOARES DE MOURA *et al.*, 2004) estão alteradas na PE. Além disso, uma possível alteração da expressão de outros componentes do SRA deve ser considerada.

Portanto, para a melhor compreensão da contribuição do SRA para a regulação cardiovascular materna normal e associada à PE, se faz necessário um estudo, das respostas à Ang II (vasoconstrição e vasodilatação) e Ang 1-7 (vasodilatação) em vasos de resistência, na gestação normal e PE e de uma possível correlação com os níveis plasmáticos e expressão vascular das enzimas formadoras destes peptídeos.

A disfunção endotelial contribui para a manutenção da resistência vascular periférica elevada e favorece o início prematuro da aterogênese (DILLON e VILLA, 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, destaca-se a liberação excessiva de prostanóides vasoconstritores como a PGH_2 e a síntese aumentada de produtos vasoconstritores da ciclooxigenase, como tromboxano A_2 ; síntese aumentada de endotelina-1 e Ang II; disponibilidade reduzida do co-fator tetrahydrobiopterina (BH_4) para a síntese de NO (HONG *et al.*, 2001) e produção diminuída de NO pela redução da expressão e atividade da NO-sintase endotelial (OEMAR, 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 e HARRISON, 2000; LI *et al.*, 2006), sugerindo um papel central de EROs na etiologia da disfunção endotelial.

Algumas evidências demonstram que a redução na biodisponibilidade do NO, não está sempre relacionada a uma redução da atividade da NO sintase, que pode estar aumentada em alguns tecidos na hipertensão (VAZIRI *et al.*, 2000), mas sim a um aumento da produção de EROs, particularmente de O_2^- , o qual é capaz de reagir com NO rapidamente, reduzindo sua biodisponibilidade (HAMILTON *et al.*, 2002). Nessa

perspectiva, diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo apresenta um importante papel na etiologia da disfunção endotelial (DAÍ e DAÍ, 2010; TOUYZ, 2011), patogênese e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão (HIGASHI *et al.*, 2009).

1.4 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Uma homeostase redox reflete o equilíbrio entre os oxidantes celulares e o sistema de defesa antioxidante. Mudanças em qualquer das supracitadas categorias podem alterar o equilíbrio redox. Pequenas variações no estado de equilíbrio homeostático podem promover respostas fisiológicas, tais como diferenciação celular, crescimento, adaptação e sinalização celular. Por outro lado, variações maiores neste equilíbrio redox, podem gerar um quadro de estresse oxidativo ou estresse redutivo (REID, 2006; Figura 3). Em condições patológicas, o estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a formação e remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes (TOUYZ, 2004; DURACKOVÁ, 2010).

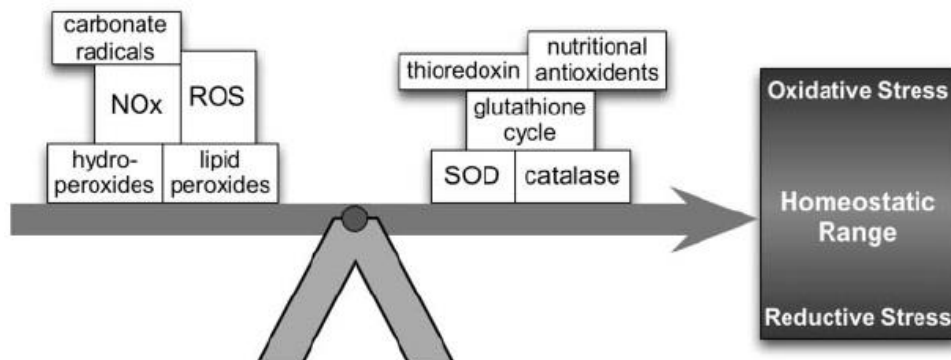


Figura 3: Representação esquemática do equilíbrio entre oxidantes celulares e o sistema de defesa antioxidante. NOx – espécies reativas de nitrogênio derivadas do óxido nítrico; SOD – Superóxido dismutase; ROS – Espécies reativas de oxigênio. Fonte: REID, 2006).

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas no meio celular, ocorrendo devido a uma super produção de agentes oxidantes que sobrecarregam a capacidade antioxidante (GROSSMAN, 2008). Assim, pode promover a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas, DNA, carboidratos, ocorrendo quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (CAI e HARRISON, 2000).

1.4.1 Espécies reativas de oxigênio

Existem diversas definições para o termo radical livre, sendo a mais amplamente utilizada a que define radical livre como “uma espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados”, de modo que tal definição também abrange os átomos de hidrogênio, oxigênio molecular, além de alguns metais de transição (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

O termo Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), engloba não só os radicais livres, como outras que não possuem elétrons desemparelhados, mas apresentam relativa instabilidade, sendo em sua maioria, derivadas do metabolismo do oxigênio (RIBEIRO *et al.*, 2005).

As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos, visto que em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, resultando na formação de água (H_2O). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxil (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BELLÓ, 2002; LOUKIDES *et al.*, 2011). O $O_2^{\cdot-}$ é formado após a primeira redução do O_2 . O radical OH^{\cdot} é considerado a EROs mais reativa em sistemas biológicos, reagindo rapidamente com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, podendo causar lesões no DNA, inativar diversas proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), além de poder iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, participa da reação

que produz o OH^\cdot , tendo um período de meia-vida relativamente longo e sendo capaz de atravessar camadas lipídicas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As EROs podem ser formadas fisiologicamente através de diversas vias metabólicas, tais como a cadeia respiratória mitocondrial, a via da xantina oxidase, a via da NADPH oxidase em células fagocíticas, a via da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso, o sistema NADPH citocromo P-450 redutase microsomal, dentre outros (RIBEIRO *et al.*, 2005).

As EROs podem ser consideradas moléculas com funções de mensageiros secundários, sendo consideradas moléculas de sinalização, uma vez que são produzidas por células quando estimuladas, têm ação na célula onde é produzida ou em células próximas e, quando removidas do meio, revertem o sinal (HANCOCK *et al.*, 2001).

Em condições fisiológicas, as EROs apresentam uma função específica em células vivas. O H_2O_2 , por exemplo, comporta-se como um fator hiperpolarizante derivado de endotélio em humanos e camundongos (SHIMOKAWA e MATOBA, 2004; CAI, 2005), enquanto OH^\cdot apresenta um importante papel como segundo mensageiro na ativação da célula T na resposta imunológica (NAGANO, 2009).

Desse modo, as EROs representam um paradoxo em sua função biológica: por um lado, elas previnem doenças assistindo o sistema imune, mediando sinalização celular e desempenhando um papel essencial na apoptose. Por outro lado, elas podem causar danos a importantes macromoléculas celulares e possivelmente estejam associadas a processos carcinogênicos e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SEIFRIED *et al.*, 2007).

No sistema cardiovascular, as EROs exercem um papel fisiológico essencial, mantendo a integridade cardíaca e vascular e um papel fisiopatológico na disfunção cardiovascular associado com condições como hipertensão, diabetes e aterosclerose (LANDMESSES e HARRISON, 2001; ZALBA *et al.*, 2001; DURACKOVÁ, 2010; TOUYZ e BRIONES, 2011).

Em condições patológicas, ocorre um aumento da produção de EROS e/ou uma redução da capacidade dos agentes antioxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo, levando à disfunção endotelial, contratilidade aumentada,

crescimento da VSMC, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação, deposição aumentada de proteínas da matriz extracelular, oxidação de proteínas e danos ao DNA, contribuindo para o dano vascular na doença cardiovascular (RAO e BERK, 1992; HARRISON, 1997; LANDMESSER e HARRISON, 2001; ZALBA *et al.*, 2001; TOUYZ e BRIONES, 2011).

A NADPH oxidase é uma enzima que catalisa a reação de produção de O_2^- pela redução de um elétron do O_2 , utilizando NADPH ou NADH como doador de elétron: $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP^+ + H^+$ (BABIOR, 2004; CHABRASHVILI *et al.*, 2002). A NADPH oxidase vascular é a maior fonte enzimática de EROs no sistema cardiovascular, cuja função primária é a produção de EROs (LAMBETH, 2004). Estudos recentes têm reconhecido que as enzimas específicas da família Nox da NADPH oxidase, podem apresentar, como única função, a produção de EROs sob um padrão altamente controlado em condições fisiológicas e, em estados patológicos, a desregulação das Noxes contribui para o estresse oxidativo e consequente dano cardiovascular e renal (SEDEEK *et al.*, 2009).

A NAD(P)H oxidase é regulada por agentes vasoativos (Ang II, endotelina-1, trombina, serotonina), por citocinas (interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF α)), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF) e por forças mecânicas. Dos fatores vasoativos que estimulam a NAD(P)H oxidase, a Ang II parece ser um dos mais importantes (PARAVICINI e TOUYZ, 2008; TOUYZ e BRIONES, 2011).

Nessa perspectiva, crescentes evidências indicam que a Ang II é um potente regulador da NADPH oxidase cardiovascular, induzindo efeitos vasculares através da geração de EROs pela NADPH oxidase, de modo que EROS aparentemente são importantes participantes na sinalização da Ang II em células vasculares. As EROs resultantes medeiam muitas das ações da Ang II, inclusive contração da musculatura lisa vascular, aumento da pressão arterial sistêmica, disfunção endotelial, remodelamento vascular e retenção de sódio (TOUYZ, 2004; WELCH, 2008).

1.4.2 Espécies reativas de nitrogênio

A superprodução de espécies reativas de nitrogênio ocorre quando a geração destas espécies em um sistema excede a habilidade do sistema para neutralizá-las e eliminá-las. Isto pode levar a reações de nitrosilação que podem alterar a estrutura de proteínas e inibir sua função normal (VALKO *et al.*, 2007).

O NO é a única molécula biológica produzida em concentrações suficientes para competir com a enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) por $O_2^{\cdot-}$, gerando o peroxinitrito ($ONOO^-$) pela reação de difusão limitada entre o NO. e $O_2^{\cdot-}$. O $ONOO^-$ é tóxico e um poderoso oxidante de grupos sulfidrilas (-SH), além produzir OH^{\cdot} em seu processo de decomposição (RADI *et al.*, 1990). O $ONOO^-$ reage com os resíduos de tirosina das proteínas, gerando nitrotirosinas, que podem ocasionar danos cardiovasculares (GOLDSTEIN *et al.*, 2000), evidenciados pelo fato de anticorpos para nitrotirosinas terem revelado nitração em aterosclerose humana e isquemia miocárdica (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

A NOS também pode contribuir para a produção de EROs, uma vez que as três isoformas tem se mostrado suscetíveis ao desacoplamento, promovendo a formação de $O_2^{\cdot-}$, em vez de NO (ANDREW e MAYER, 1999). Para a eNOS, esse processo é ativado *in vitro* devido a redução do substrato L-arginina e de cofatores como a BH_4 (VASQUEZ-VIVAR *et al.*, 1998). O aumento de EROs vascular pode induzir ao desacoplamento, como uma conseqüência do aumento da oxidação da BH_4 e inibição da dimetilarginina e dimetilaminohidrolase (WIDDER *et al.*, 2007).

1.4.3 Peroxidação lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, por serem formadas em grande parte por lipídeos insaturados e proteínas, que podem modificar as propriedades da membrana, alterando sua estrutura, permeabilidade, a capacidade de transporte nas membranas celulares e a função dos receptores de membrana (CAI e

HARRISON, 2000; MELO FILHO *et al.*, 1983). Adicionalmente, os produtos da peroxidação lipídica, como aldeídos insaturados e outros metabólitos, possuem efeito citotóxico, culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989).

Algumas EROs são suficientemente reativas para atacar cadeias de ácido graxo, abstraindo um átomo de hidrogênio do grupo metileno, iniciando-se a peroxidação lipídica. As cadeias de ácidos graxos poliinsaturados são particularmente suscetíveis à peroxidação, devido a um maior número de ligações duplas presente. Seqüencialmente, o radical carbônico resultante pode, em células aeróbias, sofrer um rearranjo molecular acompanhado por uma reação com o O₂, produzindo um radical peroxila, que, por sua vez, pode atacar proteínas de membrana ou outras cadeias de ácidos graxos, propagando a reação (HALLIWELL e CHIRICO, 1993).

Muitos biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar o estresse oxidativo, tais como, malondialdeído (MDA), dienos conjugados, gases etano e pentano, isoprostanos, 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), modificações de proteínas e modificações no DNA (ESTERBAUER *et al.*, 1991; FOUCAUD *et al.*, 2010; MOLLER e LOFT, 2010). O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação do malondialdeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES e GUÉRIN, 1992).

1.4.4 Oxidação de proteínas

As EROs também podem levar a destruição de proteínas através da oxidação de grupamentos sulfidril, que podem ser medidos pelo método de carbonilação de proteínas, além de poderem oxidar o DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As proteínas sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EROs, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação, além de maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações das EROs sobre as proteínas (YU, 1994).

1.4.5 Sistema de defesa antioxidante

Ao definir o termo “antioxidante”, Halliwell e Gutteridge (1999), classificaram-no como alguma substância, a qual presente em pequenas concentrações, quando comparadas às do substrato oxidável, reduz significativamente ou inibe a oxidação de tal substrato. De modo que tal definição compreende compostos enzimáticos e não enzimáticos.

As substâncias antioxidantes não enzimáticas são, em sua maioria, exógenas, provenientes da dieta alimentar, vitaminas lipossolúveis (Vitamina A, E e betacarotenos); hidrossolúveis (Vitamina C e Vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O mecanismo antioxidante enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), Glutathione S-transferase (GST), Catalase (CAT), Tiorredoxina reductase (Trx) e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutoras nos compartimentos citosólico e mitocondrial (RIBEIRO *et al.*, 2005). Dentre as quais, destaca-se a ação das enzimas SOD, GPx e CAT, no processo de manutenção das concentrações fisiológicas de EROs no organismo (SIES, 1993; KOJO, 2004; VALKO *et al.*, 2007). Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em sistemas biológicos, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é rapidamente reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD): $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (PARAVICINI e TOUYZ, 2008). Em mamíferos, há três isoformas de SOD produzidas por genes distintos, mas que catalisam a mesma reação. As três isoformas de SOD são: SOD citosólica ou cobre-zinco (CuZn-SOD ou SOD-1); SOD-manganês (Mn-SOD ou SOD-2), localizada na mitocôndria; e a forma extracelular da CuZn-SOD (EC-SOD ou SOD-3). Apesar de sua localização, cada isoforma da SOD é única e apresenta sua importância funcional sob a parede dos vasos sob condições fisiológicas ou patológicas, como nas doenças vasculares (FARACI e DIDION, 2004). Dessas três isoformas, a SOD extracelular é principalmente vascular, sendo produzida e secretada por células do

músculo liso vascular e ligada a glicosaminoglicanos da matriz extracelular vascular sobre o endotélio. Assim, desempenha um importante papel na regulação da condição oxidante no interstício vascular (WASSMANN *et al.*, 2004).

Catalase é uma enzima antioxidante intracelular, principalmente encontrada nos peroxissomos celulares e algumas extensões no citosol, a qual catalisa a reação de redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (CAI, 2005). Sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT *et al.*, 1991). A catalase é muito efetiva em altos níveis de estresse oxidativo, protegendo a célula dos efeitos do H_2O_2 . Além de ser especialmente importante em casos de limitação da quantidade de glutatona ou redução da atividade da GPx (PARAVICINI e TOUYZ, 2008; HECK *et al.*, 2010).

A GPx presente no citosol e na mitocôndria desempenha um papel essencial na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pela SOD (BETTERIDGE, 2000), através da catálise da redução do H_2O_2 e peróxidos lipídicos a água e alcoóis lipídicos, respectivamente, possibilitada pela oxidação da glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG). Este é um sistema importante a baixos níveis de estresse oxidativo, uma vez que a enzima possui alta afinidade pelo substrato H_2O_2 mesmo em concentrações muito baixas do mesmo (PARAVICINI e TOUYZ, 2008; Figura 4).

A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado por glicina, ácido glutâmico e cisteína, possuindo capacidade redutora determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A manutenção dos níveis adequados de GSH é realizada pela atividade da enzima glutatona redutase (GR), a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter a glutatona na forma reduzida, como substrato para GPx e assim manter íntegro o sistema de proteção celular (REMACLE *et al.*, 1992).

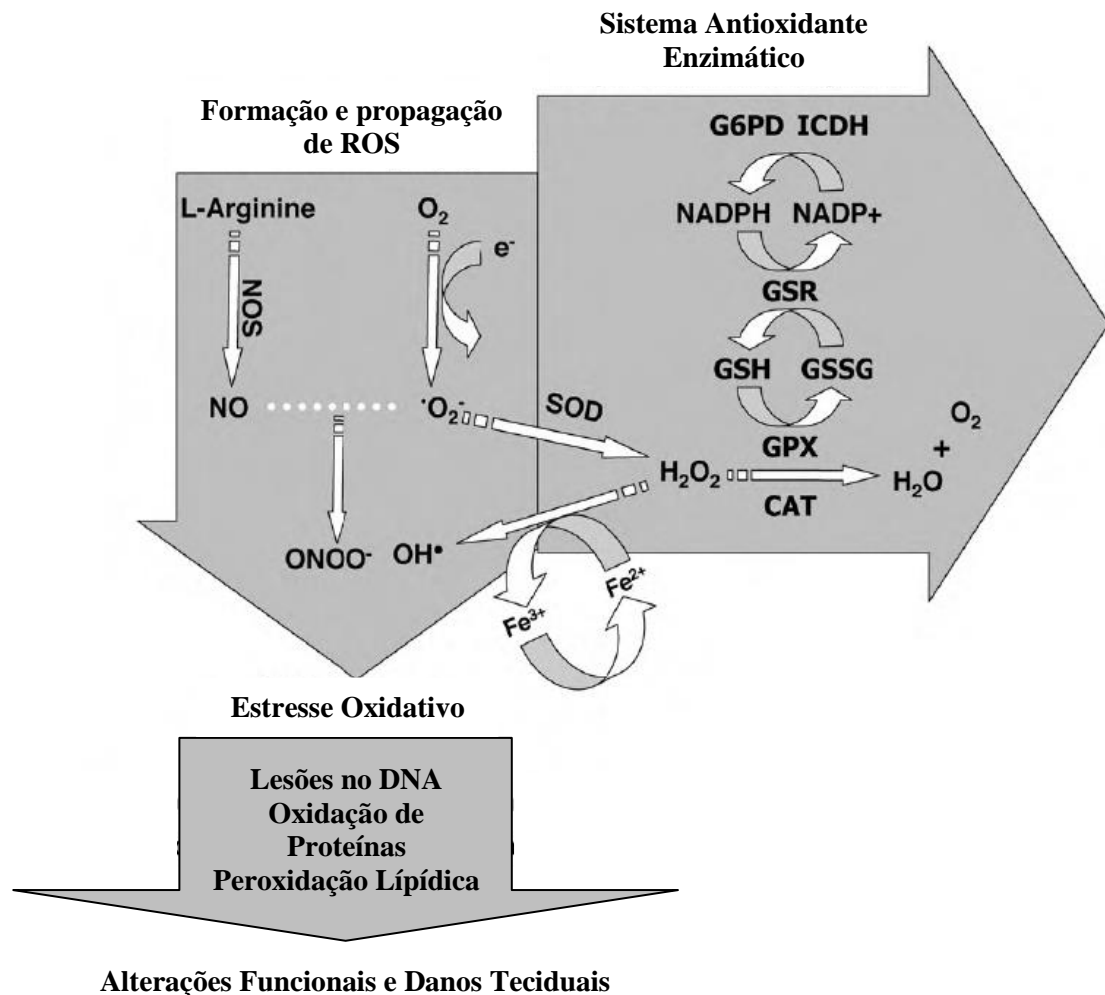


Figura 4: Representação esquemática das espécies reativas e a ação das enzimas antioxidantes SOD – Superóxido Dismutase, CAT – Catalase, GPX – Glutathione Peroxidase, GSR – Glutathione Redutase, GSH – Glutathione, GSSG – Glutathione Dissulfeto, G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase, $O_2^{\cdot -}$ – Ânion Superóxido, H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio, OH^{\cdot} – Radical Hidroxil, $ONOO^{\cdot}$ – Peroxinitrito, NO – Óxido Nítrico, NOS – Óxido Nítrico Sintase, ROS – Espécies Reativas de Oxigênio, H_2O – Água e O_2 - Oxigênio
Fonte: Adaptado de AL-GUBORY *et al.*, 2010.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o papel do Sistema Renina-Angiotensina vascular, assim como, do estresse oxidativo plasmático, cardiorenal e placentário na regulação cardiovascular materna em ratas normotensas e em modelo experimental de pré-eclâmpsia induzida por L-NAME.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar as respostas vasodilatadoras induzidas por Acetilcolina (ACh), Ang II e Ang 1-7 e Nitroglicerina (NG) em leito arterial mesentérico (LAM) isolado;
2. Analisar as respostas vasoconstritoras induzidas por Ang II e fenilefrina (PHE) em LAM isolado;
3. Avaliar a concentração plasmática de Estradiol, Renina, Ang I, Ang II, Ang 1-7 e BK;
4. Averiguar a expressão das enzimas eNOS, ECA e ECA2, assim como dos receptores AT₁ e AT₂ da Ang II no LAM;
5. Avaliar a peroxidação lipídica (MDA), a carbonilação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, utilizando plasma, homogenato de rim, coração e placenta.
6. Investigar a os níveis de nitrito como medida indireta da produção de NO, em plasma, homogenato de rim, coração e placenta.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais utilizados

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Angela de Castro Resende e na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experiências Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Nº CEA/023/2010).

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar fêmeas normotensas, primíparas, com 3 meses de vida, pesando entre 180 - 220g, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, mantidos em temperatura média de 23º C e com ciclo sono-vigília de 12 horas, com a presença de luz a partir das 6h da manhã, sendo os experimentos realizados durante o dia. Os animais tiveram livre acesso à ração industrializada específica para ratos (NUVILAB®).

Posteriormente ao acasalamento, realizado na proporção de três fêmeas para dois machos (da mesma espécie), a gravidez foi detectada por meio da observação de espermatozóides em esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.*, 2002). Após a confirmação da cópula, as fêmeas foram separadas em quatro grupos, contendo no mínimo 10 animais em cada grupo:

- a) Grupo controle: composto por ratas normotensas virgens, que receberam durante sete dias a administração de água por gavagem intragástrica;
- b) Grupo L-NAME: composto por ratas normotensas virgens, que receberam durante sete dias a administração de L-NAME (60 mg/kg/dia) por gavagem intragástrica;

- c) Grupo Grávida: Composto por ratas grávidas que receberam do 13^o ao 20^o dia de gestação a administração de água por gavagem intragástrica;
- d) Grupo Grávida + L-NAME: Composto por ratas grávidas que receberam do 13^o ao 20^o dia de gestação a administração de L-NAME (60 mg/kg/dia) por gavagem intragástrica (SOARES DE MOURA *et al.*, 2007).

3.2 Coleta de urina e medida de proteína urinária

A coleta da urina de 24 horas foi realizada através da utilização da gaiola metabólica, um dia antes do sacrifício dos animais, correspondendo ao 19^o dia de gestação ou período equivalente em ratas virgens, sendo feita a medida do volume excretado e a dosagem do conteúdo de proteínas na urina através do método de Bradford (BRADFORD, 1976; CHEN *et al.*, 2008; RUI-QIONG *et al.*, 2010).

3.3 Medida da pressão arterial por pletismografia de cauda

A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) foi medida pelo método não invasivo de pletismografia de cauda (Letica LE 5000 - Panlab, Comella, Spain), nas ratas de todos os grupos experimentais. Os animais foram treinados durante duas semanas, a fim de adaptar o animal ao procedimento e consequentemente minimizar o estresse durante a manipulação.

As medidas foram realizadas em ratas acordadas no dia imediatamente anterior ao acasalamento, no dia anterior ao início da administração de L-NAME (60mg/kg/dia) ou veículo, no 16^o dia de gestação e no 18^o dia de gestação, ou período equivalente em ratas virgens, por meio de um garrote e de um sensor de pulso posicionados em torno da cauda do animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e desinsufla automaticamente o garrote, detectando o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal, determinando assim a PAS, a PAD e a PAM.

3.4 Isolamento do leito arterial mesentérico de rato

Após o registro da PAS, as ratas foram anestesiadas com tiopental (50 mg/Kg), para coleta de sangue arterial através da aorta abdominal, e em seguida submetidos à laparotomia. O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl (Cloreto de Sódio), KCl (Cloreto de Potássio), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cloreto de Cálcio dihidratado), MgSO_4 (Sulfato de Magnésio), NaHCO_3 (Bicarbonato de Sódio), KH_2PO_4 (Fosfato de Potássio Monobásico) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Glicose). 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), de aproximadamente 4 cm de comprimento 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 modificada.

3.5 Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson[®]). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) foi infundida à velocidade constante de 4mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa Labchart 7 reader, por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30) (MC GREGOR, 1965; Figura 5).

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 e 40 mm Hg (RESENDE *et al.*, 1997) e então foram administradas injeções de

120 μmol de KCl de 10 em 10 minutos até obter uma resposta consistente para a realização do protocolo experimental desejado.

A resposta vasoconstritora foi expressa pelo aumento na pressão de perfusão (PP; mm Hg) e a vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela norepinefrina (NE). 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 .

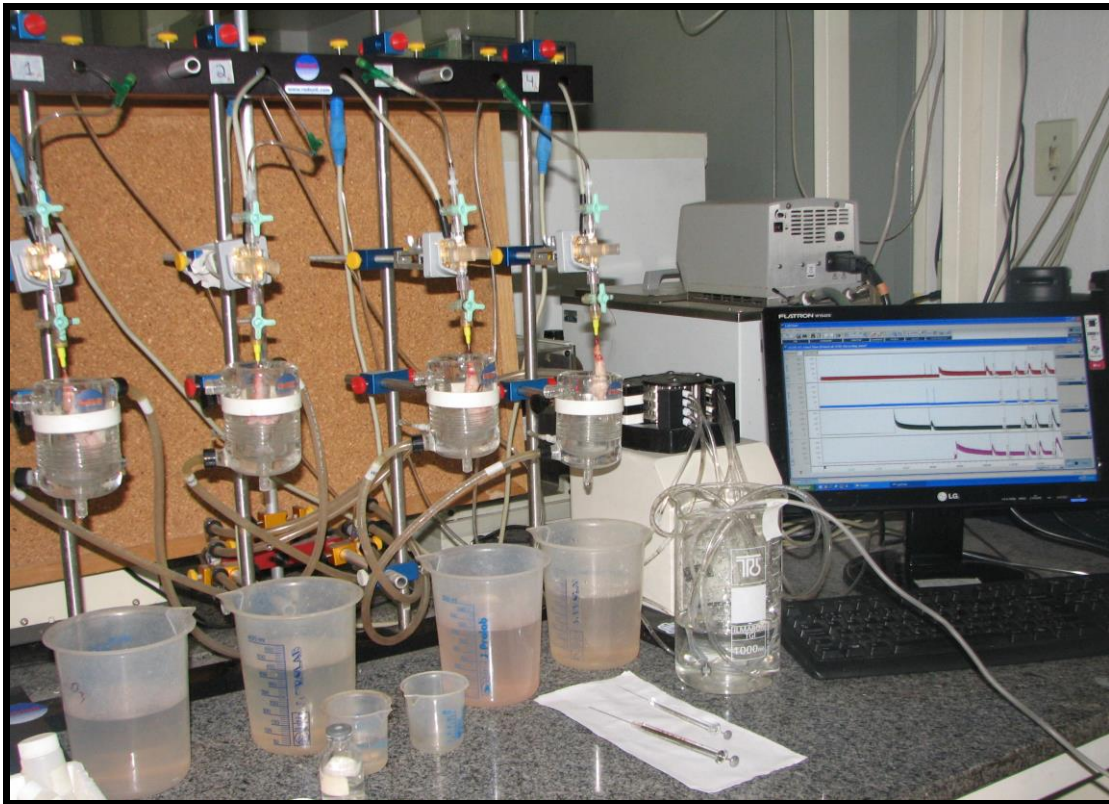


Figura 5: Sistema de perfusão de leito arterial mesentérico utilizado para o estudo da reatividade vascular.

3.5.1 Resposta vasodilatadora induzida pela Acetilcolina e Nitroglicerina

Após a obtenção de uma resposta consistente, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a NE foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (3-10 μM) 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 NE, testamos a função endotelial vascular, com a injeção de ACh (1-1000 pmol), a qual 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 (1-1000 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio.

3.5.2 Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina II e Angiotensina 1-7

Após confirmada a presença do endotélio e do músculo liso vascular funcionantes, foi adicionado Losartan (30 μM) à perfusão com NE e, sequencialmente, foram injetadas doses crescentes de Ang II (10, 30, 100 e 300 nmol) e posteriormente de Ang 1-7 (10, 30, 100 e 300 nmol) a fim de avaliar o efeito vasodilatador promovido pelas mesmas.

3.5.3 Resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina e pela Angiotensina II

Após a obtenção de uma resposta consistente promovida pelo KCl, a resposta pressora induzida pela PHE foi avaliada através da injeção de doses crescentes de PHE (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol). Posteriormente, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a PHE foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (1-3 μM) 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 PHE, testamos a capacidade vasoconstritora induzida pela Ang II com a injeção de doses crescentes de 0,001 nmol a 100 nmol.

3.6 Níveis de Estradiol Sérico

Os níveis de estradiol sérico foram mensurados através do kit 17β -ESTRADIOL 125 I RIA (ICN Pharmaceuticals – CA 92626) por radioimunoensaio.

3.7 Níveis de Renina Plasmática

Os níveis de renina plasmática foram mensurados através do kit ACTIVE RENIN IRMA (Beckman Coulter – Ref DSL25100) por radioimunoensaio.

3.8 Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

Após a anestesia com tiopental (0,42 mg/Kg), o sangue das ratas foi coletado através da aorta abdominal em vacuntainers contendo EDTA e 51 μ L de aprotinina por mL de sangue coletado. Posteriormente, o sangue foi centrifugado durante 10 min a 5000 rpm e 4°C para a retirada do plasma.

A Ang I, Ang II, Ang 1-7 e BK foram extraídas das amostras de plasma, utilizando colunas SEP-Pak Vac C₁₈ para posterior análise no HPLC com detecção na absorbância de 214 nm, com fluxo de 0,7 mL/min. A separação dos peptídeos foi conseguida com coluna C18, 10 μ m e 125 A°, usando-se como fase móvel acetonitrila com 0,1% de TFA (solvente B) no tempo de 64 minutos, nos seguintes gradientes: 5% solvente B (0 – 3 min); 5% a 40% solvente B (3 – 12 minutos); 40% a 65% (12 – 25 min); 65% a 75% (25 – 45 min); 75% a 100% (45 – 64 min). Os peptídeos Ang I, Ang II, Ang 1-7 e BK foram detectados no tempo de retenção de 23,1; 19,0; 22,5; e 22,75 minutos, respectivamente (Figura 6).

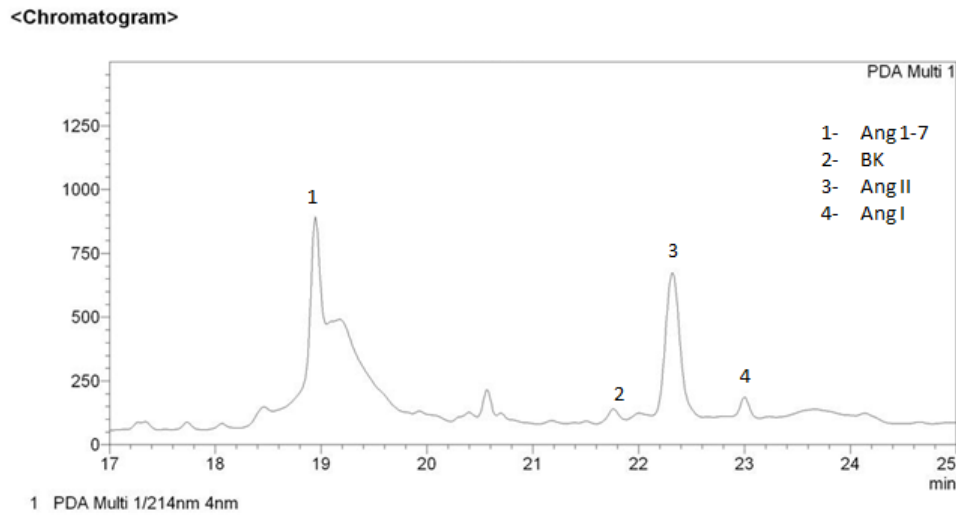


Figura 6: Imagem representativa de um cromatograma demonstrando os picos correspondentes aos peptídeos analisados e seus respectivos tempos de retenção.

3.9 Atividade das enzimas Antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) foi realizada em amostras de plasma, e em homogenato de rim, coração e placenta preparados com tampão fosfato.

3.9.1 Medida da Superóxido Dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ em O_2 e H_2O_2 . A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da norepinefrina pelo $\cdot\text{O}_2^-$. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister & Calabrese (1982) para a medida no plasma, e adaptando-a para amostras de homogenato de rim, coração e placenta.

Foram utilizados 20, 40 e 60 μl de cada amostra (plasma, rim esquerdo, coração e placenta) em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970 μl tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e 40 μl de NE (19 mg/mL de água destilada).

Também foram adicionados 20 μl da enzima catalase (1.2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o H_2O_2 formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) durante 180 segundos, em intervalos de 10 segundos.

3.9.2 Medida da atividade da Catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 , formando oxigênio molecular e H_2O . A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de H_2O_2 pela reação.

Foram utilizados 20 μl de amostras de plasma e 60 μl de homogenato de rim, coração ou placenta em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com volume suficiente para completar 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H_2O_2 (0.16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 60 segundos com intervalos de 30 segundos por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 60 segundos (AEBI, 1984).

3.9.3 Medida da atividade da Glutathiona Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutathiona (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 espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 200 μl plasma e 100 μl de homogenato de rim esquerdo, coração ou placenta em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800 μl de tampão fosfato (PBS), glutathiona reduzida (2 mM), glutathiona redutase (0.11 mg/mL) e azida sódica (0.065 mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH

(10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas leituras durante 180 segundos em intervalos de 10 segundos. Posteriormente, H₂O₂ (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 300 segundos em intervalos de 10 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé & Gunzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados.

3.10 Ensaio pró-oxidante

3.10.1 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 formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper *et al.* (1993) e adaptada para medida em plasma.

Foram utilizados 200 µl de homogenato de rim, coração ou placenta para 400 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 10 min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500 µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionados 500 µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100° C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.10.2 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 proteínas como aminoácidos (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 espectrofotometricamente em 370 nm usando um coeficiente $22.0000 \text{ Molar}^{-1}$ em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foram utilizados 100 μl de plasma, homogenato de rim, coração ou placenta 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 suas respectivas duplicatas incubadas com HCL 2M 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 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotometria (370 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.11 Medida de nitrito

Como o NO possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical é mensurado pela formação do nitrito (NO_2), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED), formando um composto azo estável de coloração púrpura, lido no comprimento de onda de 540 nm (GREEN *et al.*, 1982; SUN *et al.*, 2003).

Para a reação, adicionou-se 100 µl de amostra de plasma ou de amostras de homogenato de rim, coração e placenta diluídas em tampão fosfato na proporção de 1:3 em 50 µl da solução 1 (sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico 2,5%). Após 10 minutos de incubação, adicionou-se 50 µL da solução 2 (N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5%). Em seguida, realizou-se a homogeneização e leitura a 540 nm em espectrofotômetro de microplacas (µQuant BioTek Instruments, INC., Winooski, VT, EUA). O resultado foi dado em µM (ou mMol)/ mg proteína.

3.12 Dosagem de Proteínas

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina sérica bovina (SIGMA®) (BRADFORD, 1976).

3.13 Western Blotting

As artérias mesentéricas isoladas foram lavadas com tampão salina fosfato gelado (PBS) e homogeneizadas com tampão de lise contendo PBS, Tryton X-100 (1 %), NaF (1 M), NaPPi (100 mM), Na₃VO₄ (1 M), pepstatina (10 µg/ mL), leupeptina (10 µg/mL) e aprotinina (10 µg/mL), seguido de centrifugação (13000 rpm por 20 min) a 4°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratórios, Milão, Itália). Após desnaturação a 100 °C por 5 min, 30 µg de proteína foram depositadas em um gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sódio (8-10%), separadas por eletroforese (150V, 50mA por 1 hora) e transferidas para uma membrana de polivinilidina (15 V, 328mA por 1 hora). As membranas foram bloqueadas durante 1 hora com tampão de bloqueio (TBS 0,1% Tween-20, ph 7.5 + 5% albumina) e, em seguida, incubadas “overnight” a 4° C com anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) contra a enzima eNOS (≈140 kDa; diluição 1:1000), receptor AT₁ (≈43 kDa; diluição 1:200) e receptor AT₂ (≈44 kDa; diluição

1:200), ECA (\approx 195 kDa; 1:800) e ECA2 (\approx 90 kDa 1:1500) diluídos em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas em solução de PBS-Tween-20 (0.1%), incubadas com anticorpo secundário (diluição 1:1000 - 1:10000) conjugado a peroxidase durante 1 hora a temperatura ambiente, e novamente lavadas. Posteriormente, as membranas foram reveladas com DAB ou incubadas com ECL (Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK) durante 4 minutos e expostas a um filme auto-radiográfico (Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK). Após a revelação do filme, a densitometria das bandas foi medida por análise de computador, utilizando o programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média do grupo experimental acompanhado de erro padrão da média ($\bar{x} \pm \text{EPM}$).

O teste t de Student para amostras independentes (não-pareado) foi utilizado para a comparação entre dois grupos experimentais. De modo que, para a comparação entre quatro grupos experimentais, aplicou-se ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ diferença significativa. Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EUA). O programa Sigma Plot® 10 (SYSTAT Software, INC.) foi utilizado no preparo dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Variação da massa corporal durante a gestação

A massa corporal foi significativamente ($p < 0.05$) maior no grupo Grávida quando comparado aos grupos Controle e L-NAME a partir do 13º dia de gestação. O grupo Grávida + L-NAME apresentou um aumento da massa corporal em relação aos grupos Controle e L-NAME. Entretanto, ao final da gestação, o grupo Grávida + L-NAME apresentou uma massa corporal significativamente menor que o grupo Grávida (Figura 7).

Dias de gestação	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
0	202,3 ± 4	198,2 ± 3	200,1 ± 4,1	198,3 ± 4
4	216 ± 7,2	205,9 ± 4	217,5 ± 5,5	205 ± 5,4
7	212,6 ± 4,2	208,2 ± 3,2	223,5 ± 4	210,9 ± 5,5
13	214,7 ± 4,7	213,2 ± 3,4	241,1 ± 4,6	225,7 ± 5,2
17	216,3 ± 4,1	212,9 ± 3,3	252,5 ± 5,7	231,4 ± 4,7
19	219,8 ± 4,5	212,3 ± 3,6	264,7 ± 7,4	249,3 ± 5,5

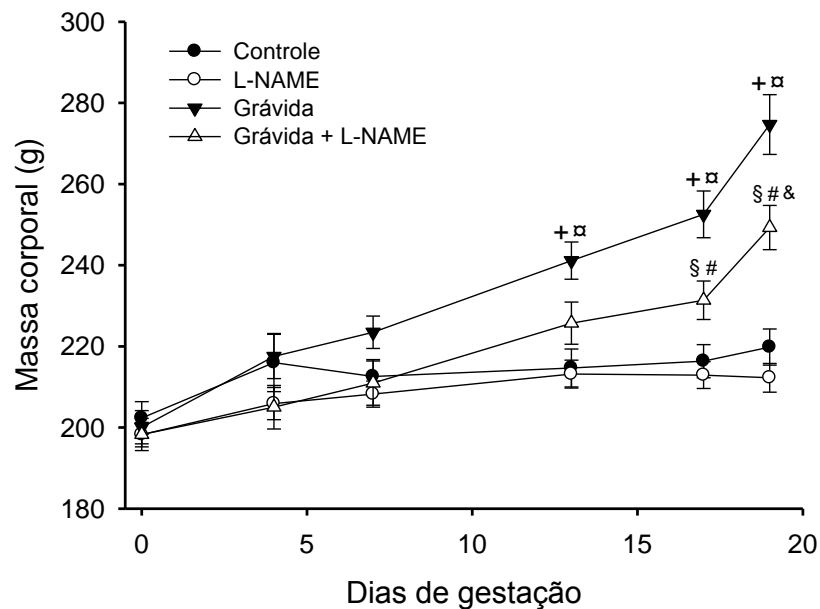


Figura 7: Massa corporal (g) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME durante o período de gestação. Os valores estão expressos em média ± erro padrão, n= 20 a 25 animais por grupo. $p < 0.05$ [□] Grávida vs Controle; ⁺ L-NAME vs Grávida; [§] L-NAME vs Grávida + L-NAME; [#] Grávida vs Grávida + L-NAME; [&] Controle vs Grávida + L-NAME.

4.2 Medida da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica, diastólica e média está significativamente ($p < 0.05$) aumentada em animais L-NAME e grávida + L-NAME, a partir do dia subsequente à administração de tal fármaco, comparada à pressão arterial de animais Controles e Grávidas (**PAS**: Controle: $122,1 \pm 2,2$ mm Hg; L-NAME: $191,2 \pm 3,8$ mm Hg; Grávida: $122,6 \pm 1,1$ mm Hg; Grávida + L-NAME: $194,7 \pm 5,1$ mm Hg; **PAD**: Controle: $89 \pm 4,1$ mm Hg; L-NAME: $144,7 \pm 5,7$ mm Hg; Grávida: $89,5 \pm 4,3$ mm Hg; Grávida + L-NAME: $144,7 \pm 6,3$ mm Hg; **PAM**: Controle: $104,6 \pm 3,2$ mm Hg; L-NAME: $159,3 \pm 5,1$ mm Hg; Grávida: $100,1 \pm 3,1$ mm Hg; Grávida + L-NAME: $162,8 \pm 5$ mm Hg). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Grávida (Figura 8).

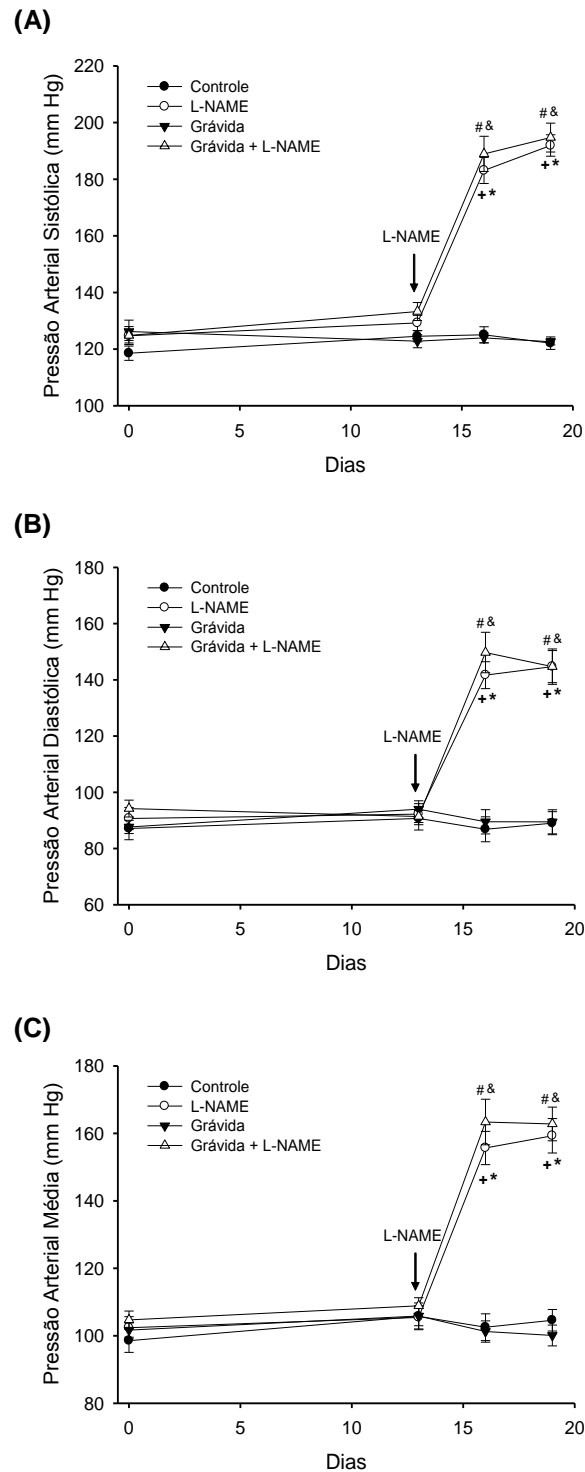


Figura 8: Pressão Arterial Sistólica (A), Diastólica (B) e Média (C, mm Hg) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME durante o período de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 10$ a 13 animais por grupo. $p < 0.05$ + L-NAME vs Grávida; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME; * L-NAME vs Controle.

4.3 Nascimento e mortalidade dos filhotes

O número de filhotes vivos por rata grávida foi significativamente ($p < 0.05$) maior no grupo Grávida ($9,4 \pm 0,8$) em relação ao grupo Grávida + L-NAME ($6,5 \pm 0,9$). Do mesmo modo, o número de abortos por rata grávida foi significativamente maior em ratas Grávidas + L-NAME ($2,4 \pm 0,7$) quando comparado ao grupo Grávida ($0,7 \pm 0,1$; Figura 9).

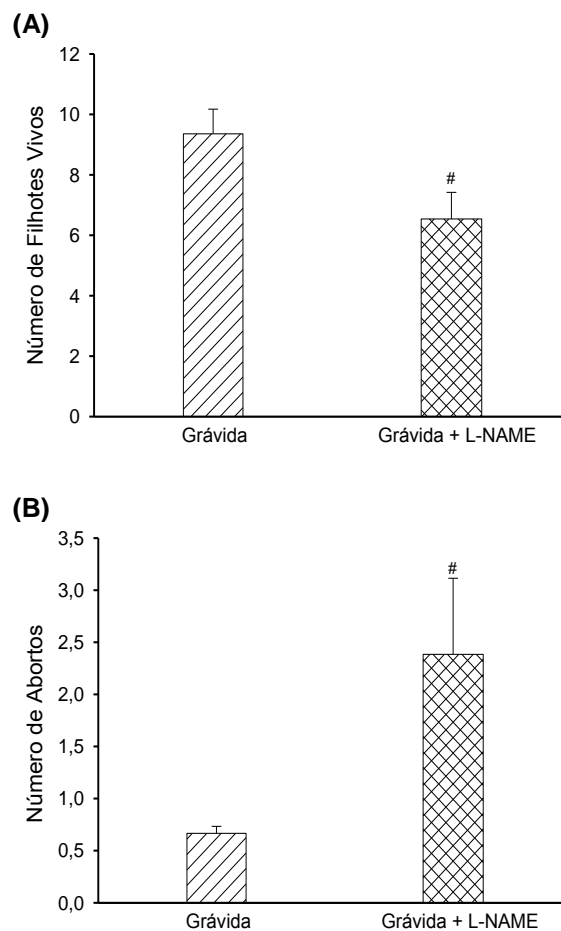


Figura 9: Número de filhotes vivos por rata grávida (A) e número de abortos por rata grávida (B) de animais Grávidas e Grávidas + L-NAME com vinte dias de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 15$ e 13 animais por grupo, respectivamente. $p < 0.05$ # Grávida vs Grávida + L-NAME.

4.4 Medida da massa corporal dos filhotes vivos e da massa placentária total

Foi observada uma redução significativa ($p < 0.05$) na massa corporal dos filhotes oriundos de ratas Grávidas + L-NAME ($3,6 \pm 0,1$ g), quando comparados com os provenientes de ratas Grávidas normotensas ($4,3 \pm 0,1$ g; Figura 10A). Do mesmo modo, a massa placentária total proveniente de ratas Grávidas + L-NAME ($350,5 \pm 13,6$ mg) foi significativamente menor que em ratas Grávidas ($436,3 \pm 7,3$ mg; Figura 10B).

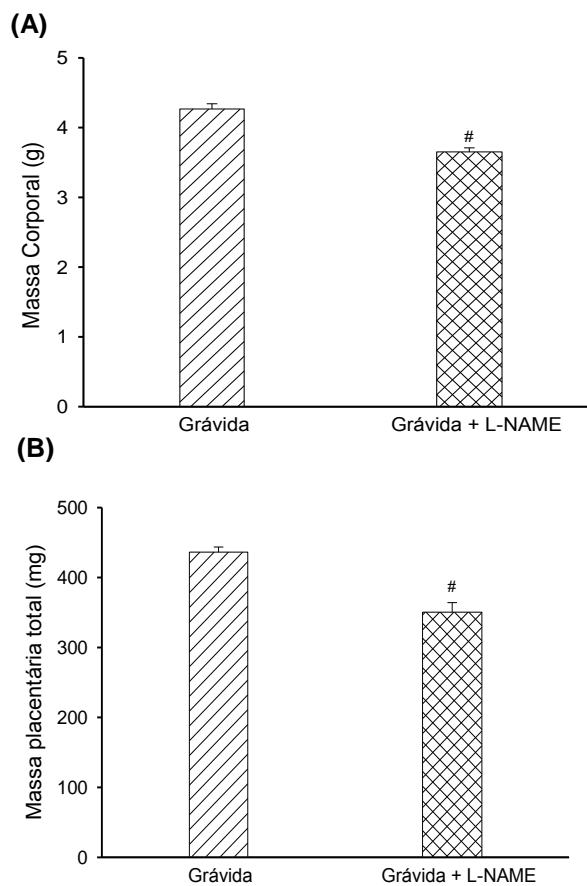


Figura 10: Massa corporal dos filhotes vivos (A) e massa placentária total (B) de animais Grávidas e Grávidas + L-NAME com vinte dias de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 115$ a 133 animais por grupo. $p < 0.05$ # Grávida vs Grávida + L-NAME.

4.5 Dosagem de proteína urinária e volume urinário

A concentração de proteínas na urina coletada em 24 horas foi significativamente ($p < 0.05$) maior em animais Grávidas + L-NAME, quando comparados ao Controle e Grávida (Controle: $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; L-NAME: $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; Grávida: $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; Grávida + L-NAME: $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; Figura 11A). Não houve diferença significativa entre o volume urinário coletado em 24 horas dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle: $7,5 \pm 1,1 \text{ mL}$; L-NAME: $6,2 \pm 1 \text{ mL}$; Grávida: $8,4 \pm 1,3 \text{ mL}$; Grávida + L-NAME: $7 \pm 0,1 \text{ mL}$; Figura 11B).

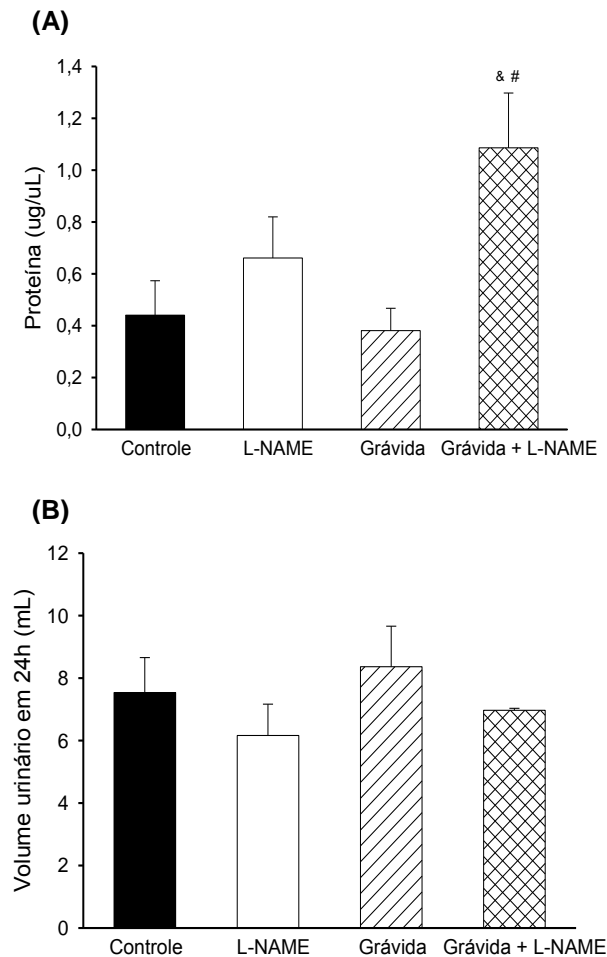


Figura 11: Concentração de proteínas em urina de 24 horas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$; A) e volume urinário coletado em 24 horas (mL; B) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME durante o 19º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 8$ animais por grupo. $p < 0.05$ # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME.

4.6 Níveis Séricos de Estradiol

Os níveis séricos de estradiol foram significativamente ($p < 0.05$) maiores em animais Grávidas ($62 \pm 5,3$ pg/mL) e Grávidas + L-NAME ($65,9 \pm 5$ pg/mL), quando comparados aos grupos Controle ($45,6 \pm 4,5$ pg/mL) e L-NAME ($46,1 \pm 3,1$ pg/mL; Figura 12).

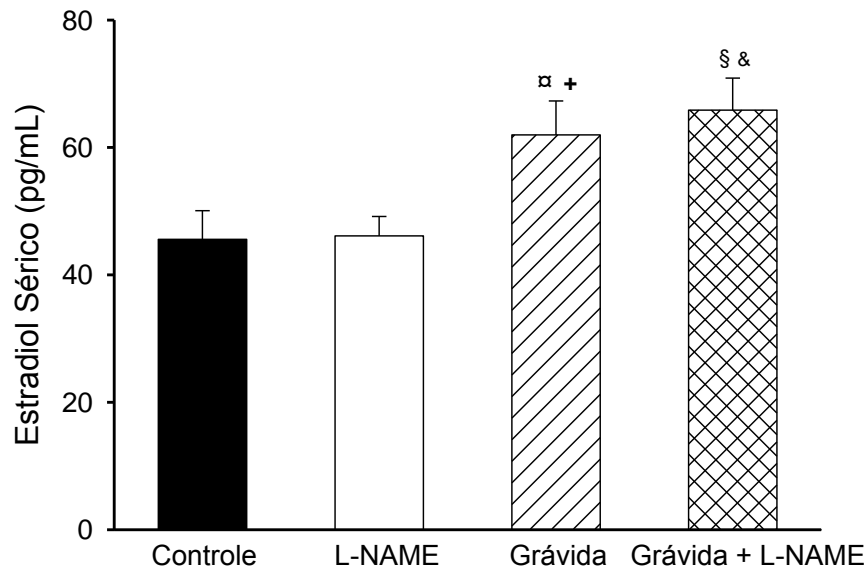


Figura 12: Níveis séricos de estradiol (pg/mL) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 13$ a 20 animais por grupo. $p < 0.05$ ^α Grávida vs Controle; ⁺ L-NAME vs Grávida; [§] L-NAME vs Grávida + L-NAME; [&] Controle vs Grávida + L-NAME.

4.7 Níveis de Renina Plasmática

Os níveis de renina plasmática foram significativamente ($p < 0.05$) maiores em plasma de animais Grávida + L-NAME ($3,6 \pm 0,3$ pg/mL), quando comparados ao Controle ($2,4 \pm 0,3$ pg/mL), L-NAME ($2,3 \pm 0,2$ pg/mL) e Grávida ($1,8 \pm 0,2$ pg/mL; Figura 13).

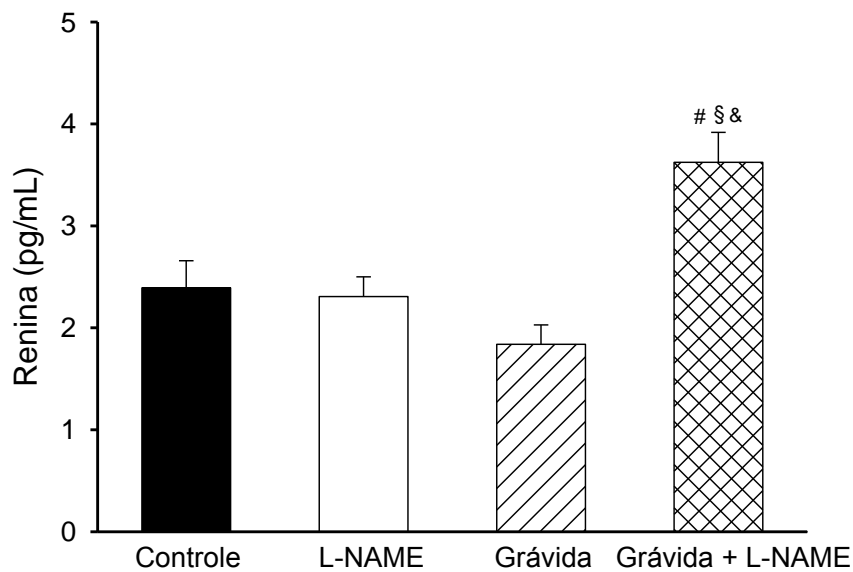


Figura 13: Níveis plasmáticos de renina (pg/mL) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 21$ a 23 animais por grupo. $p < 0.05$ # Grávida vs Grávida + L-NAME; § L-NAME vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME.

4.8 Concentração plasmática dos peptídeos Angiotensina I, Angiotensina II e Angiotensina 1-7

Não houve diferença significativa na concentração de Angiotensina I mensurada em amostras de plasma dos diferentes grupos experimentais (Controle: $5,1 \pm 1,2 \times 10^{-6}$ M; L-NAME: $4,4 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ M; Grávida: $4,4 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ M; Grávida + L-NAME: $4,8 \pm 0,4 \times 10^{-6}$ M; Figura 14A).

Do mesmo modo, não foi encontrada diferença significativa na concentração de Ang II mensurada em amostras de plasma dos diferentes grupos experimentais (Controle: $1,1 \pm 0,3 \times 10^{-8}$ M; L-NAME: $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-8}$ M; Grávida: $1,2 \pm 0,2 \times 10^{-8}$ M; Grávida + L-NAME: $1,2 \pm 0,2 \times 10^{-8}$ M; Figura 14B).

Por outro lado, a concentração de Ang 1-7 foi significativamente menor ($p < 0.05$) em amostras de plasma de Grávidas + L-NAME ($1 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M), quando comparada aos animais Controle ($8,4 \pm 1,3 \times 10^{-7}$ M), L-NAME ($6,9 \pm 1,9 \times 10^{-7}$ M) e Grávida ($7,9 \pm 1,9 \times 10^{-7}$ M; Figura 14C).

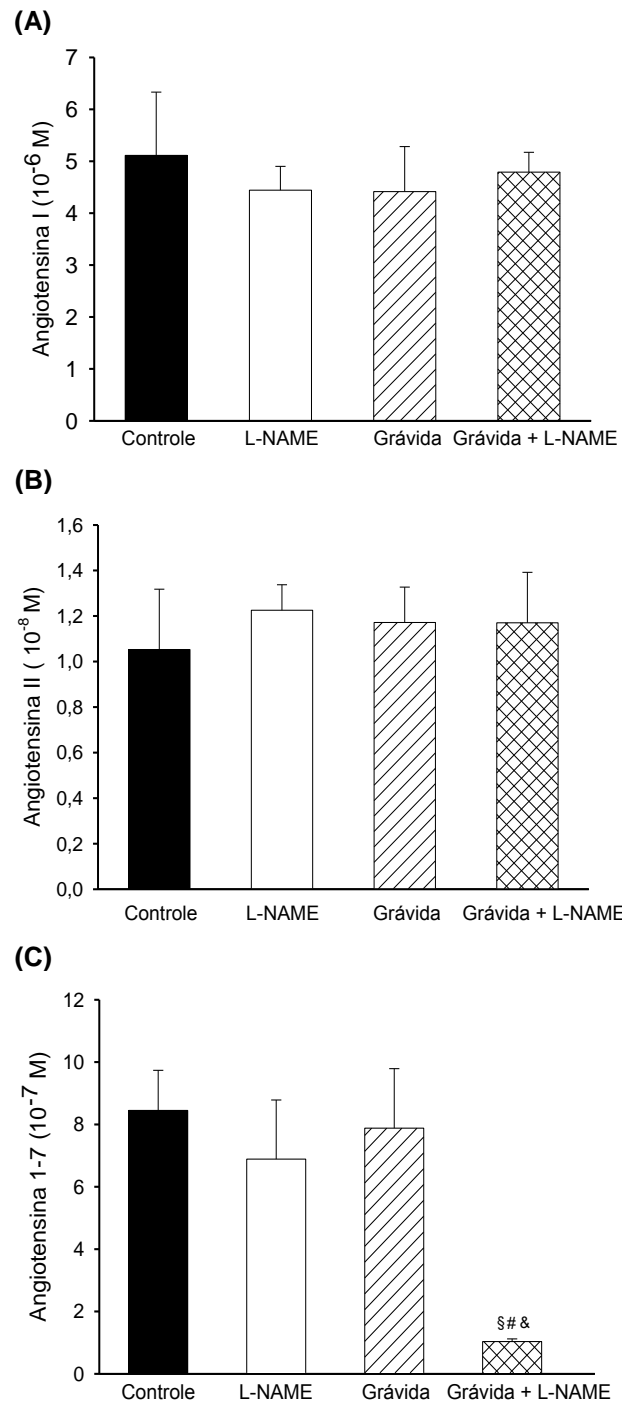


Figura 14: Concentração plasmática de Angiotensina I (10^{-6} M; A), de Angiotensina II (10^{-8} M; B) e de Angiotensina 1-7 (10^{-7} M; C) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n= 5 a 7 animais por grupo. $p < 0.05$ [#] Grávida vs Grávida + L-NAME; [§] L-NAME vs Grávida + L-NAME; [&] Controle vs Grávida + L-NAME.

4.9 Concentração de Bradicinina Plasmática

A concentração de BK foi significativamente maior ($p < 0.05$) em amostras de plasma de Grávidas + L-NAME ($10,3 \pm 1,1 \times 10^{-8}M$), quando comparada aos animais L-NAME ($7 \pm 0,9 \times 10^{-8}M$) e Grávida ($6,3 \pm 0,4 \times 10^{-8}M$). Não houve diferença significativa entre os grupos L-NAME, Grávida e Grávida + L-NAME em relação ao grupo Controle ($8 \pm 0,9 \times 10^{-8}M$; Figura 15).

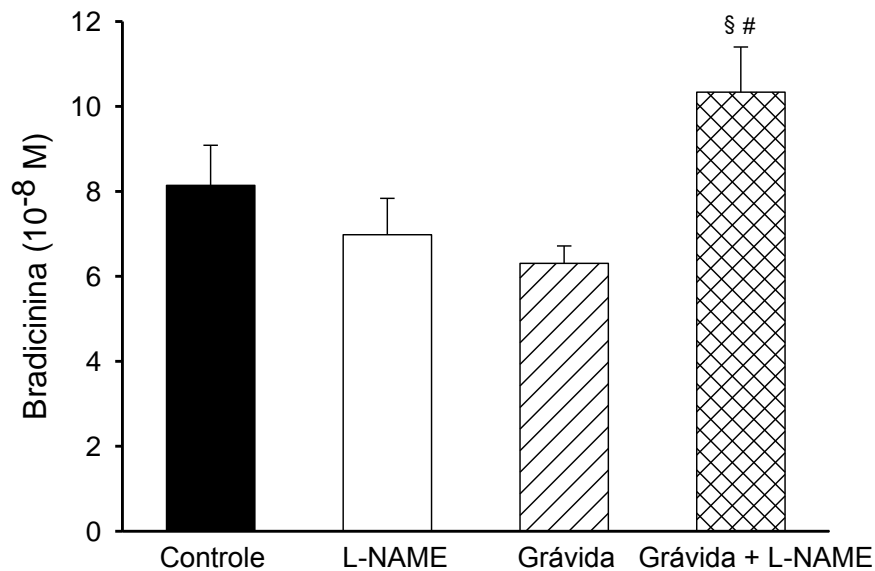


Figura 15: Concentração plasmática de bradicinina ($10^{-8}M$) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 5$ a 6 animais por grupo. $p < 0.05$ # Grávida vs Grávida + L-NAME; § L-NAME vs Grávida + L-NAME.

4.10 Resposta vasodilatadora induzida pela Acetilcolina

A ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente ($p < 0.05$) menor em LAM isolado de animais L-NAME e Grávida + L-NAME quando comparada aos grupos Controle e Grávida (Figura 16). Não houve diferença significativa entre o ID50 dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle: $30,7 \pm 8$ pmol; L-NAME: $23,8 \pm 6,1$ pmol; Grávida: $20,9 \pm 9,7$ pmol; Grávida + L-NAME: $37,2 \pm 10,2$ pmol).

Doses	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
1 pmol	$16,6 \pm 2,8$	$10,2 \pm 1,8$	$13,8 \pm 2,6$	$8,8 \pm 1,7$
10 pmol	$31,1 \pm 5,7$	$21,3 \pm 2,7$	$38,5 \pm 5$	$15,4 \pm 2,6$
100 pmol	$53 \pm 3,8$	$31,7 \pm 2,8$	$48,1 \pm 5,6$	$30 \pm 3,6$
1000 pmol	$60,9 \pm 3,9$	$43,4 \pm 3,3$	$63 \pm 5,9$	$39,1 \pm 5,5$

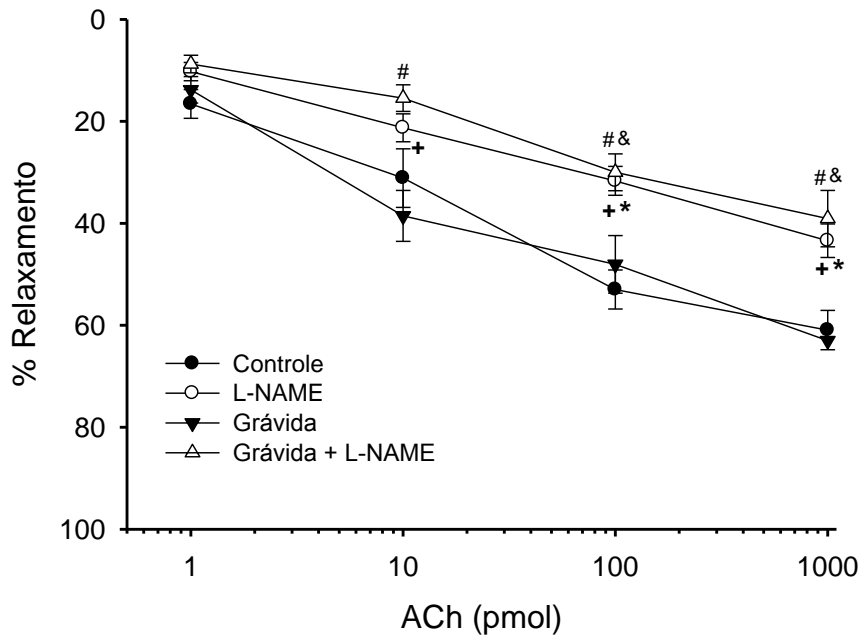


Figura 16: Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 8$ a 11 animais por grupo. $p < 0.05$ + L-NAME vs Grávida; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME; * L-NAME vs Controle.

4.11 Resposta vasodilatadora induzida pela Nitroglicerina

A NG produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente ($p < 0.05$) maior em LAM isolado de animais L-NAME e Grávida + L-NAME quando comparada aos grupos Controle e Grávida (Figura 17).

O ID50 foi significativamente ($p < 0.05$) menor em animais pertencentes aos grupos L-NAME ($36,4 \pm 7,9$ nmol) e Grávida + L-NAME ($32,3 \pm 12,1$ nmol), quando comparado aos grupos Controle ($137,1 \pm 36,9$ nmol) e Grávida ($163,9 \pm 40,1$ nmol).

Doses	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
1 nmol	$9,3 \pm 0,9$	$17,8 \pm 2,4$	$8,3 \pm 1,9$	$18 \pm 1,5$
10 nmol	$17 \pm 1,6$	$33,9 \pm 3,8$	$14 \pm 2,9$	$34,8 \pm 3,3$
100 nmol	$37,8 \pm 4,1$	$59,1 \pm 4,4$	$34,5 \pm 5$	$51,3 \pm 3,5$
1000 nmol	$68 \pm 3,4$	$79,9 \pm 3,9$	$59,6 \pm 5,6$	$73,2 \pm 3,2$

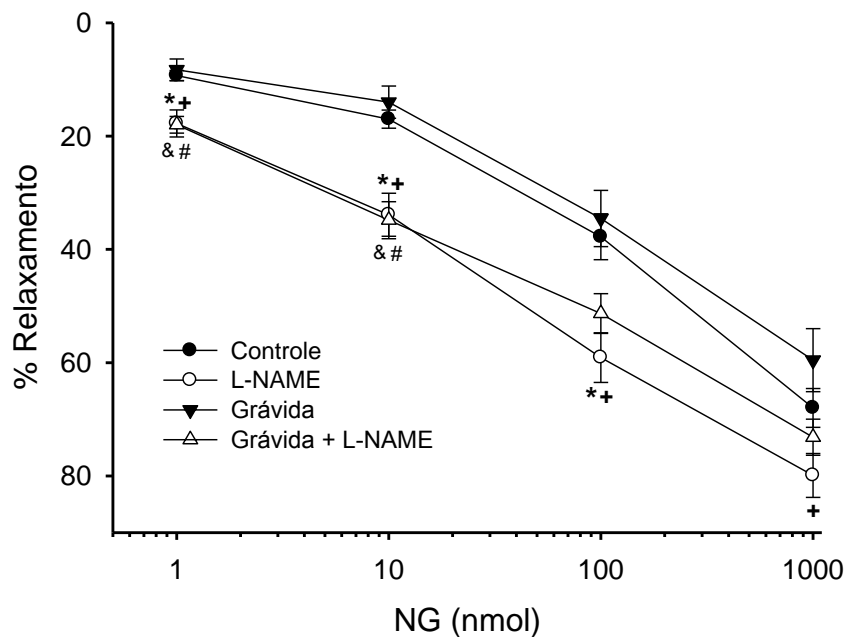


Figura 17: Resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 8$ a 11 animais por grupo. $p < 0.05$ * L-NAME vs Grávida; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME; + L-NAME vs Controle.

4.12 Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina II

A Ang II produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente ($p < 0.05$) menor em LAM isolado de animais L-NAME e Grávida + L-NAME quando comparada aos grupos Controle e Grávida (Figura 18).

Doses	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
10 nmol	5,2 ± 0,4	2 ± 0,5	4,6 ± 1,3	3,4 ± 0,1
30 nmol	7,6 ± 0,5	4,5 ± 0,7	8,2 ± 1,3	3,6 ± 1,1
100 nmol	13,2 ± 0,8	8,5 ± 1	14,6 ± 1,5	9,2 ± 2,4
300 nmol	25,8 ± 1,5	17 ± 1,4	28,6 ± 4,2	16,4 ± 1,9

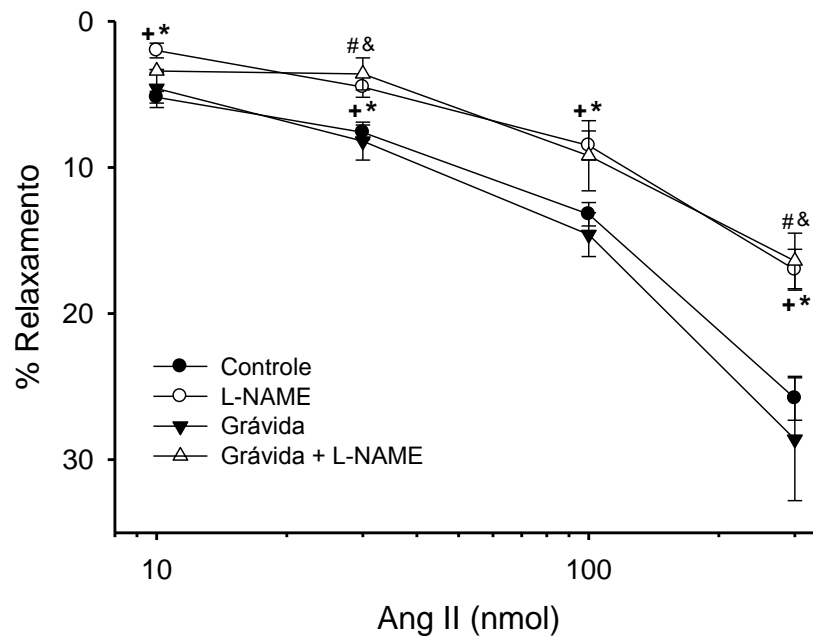


Figura 18: Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média ± erro padrão, n= 7 a 10 animais por grupo. $p < 0.05$ + L-NAME vs Grávida; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME; ° L-NAME vs Controle.

4.13 Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina 1-7

Não houve alteração na resposta vasodilatadora induzida pela Ang 1-7 em LAM dos animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 19).

Doses	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
10 nmol	6,6 ± 0,8	6,5 ± 0,4	6,6 ± 1	4,9 ± 0,7
30 nmol	8,4 ± 1	7,3 ± 0,8	8,6 ± 1,5	6,4 ± 0,7
100 nmol	12,9 ± 1,3	12,9 ± 2,4	12,5 ± 1,9	11,5 ± 1,3
300 nmol	25 ± 2,3	23,6 ± 5,3	25,5 ± 2,2	21,4 ± 3,6

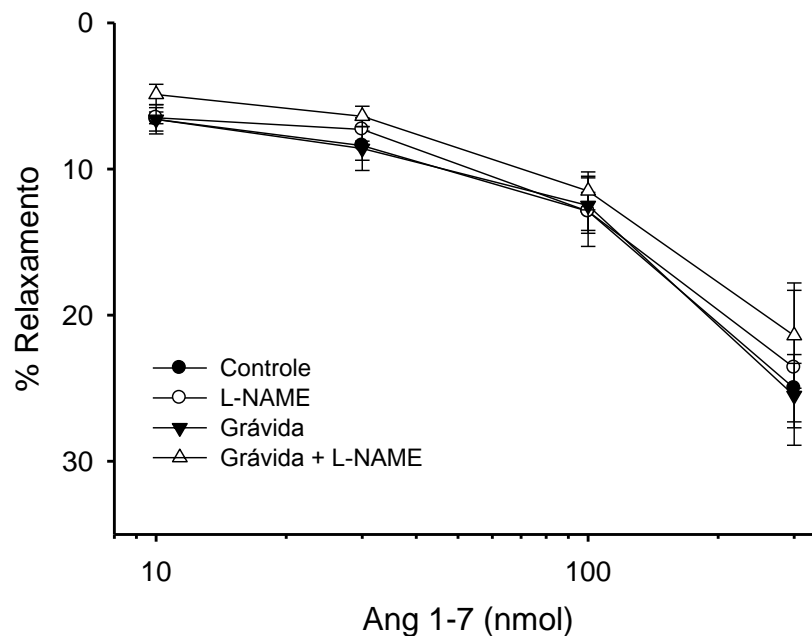


Figura 19: Resposta vasodilatadora induzida pela Angiotensina 1-7 em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média ± erro padrão, n= 7 a 10 animais por grupo.

4.14 Resposta vasoconstritora induzida pela Fenilefrina

A PHE produziu uma resposta vasoconstritora dose-dependente que foi significativamente ($p < 0.05$) maior em LAM isolado de animais L-NAME, quando comparada aos grupos Controle, Grávida e Grávida + L-NAME em doses inferiores a 100 nmol (Figura 20). O ID 50 foi significativamente menor em animais pertencentes ao grupo L-NAME, quando comparado ao grupo Grávida + L-NAME, não havendo diferença em relação aos demais grupos experimentais (Controle: $22,6 \pm 4,1$ nmol; L-NAME: $11,7 \pm 2,1$ nmol; Grávida: $24,1 \pm 4,8$ nmol; Grávida + L-NAME: $30,3 \pm 6,1$ nmol).

Doses	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
0,1 nmol	$1,7 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	$1 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,8$
1 nmol	$11,6 \pm 2,4$	$25,7 \pm 3,8$	$7,1 \pm 1,2$	$11,7 \pm 2,2$
10 nmol	$65,3 \pm 7,6$	$117,9 \pm 9,2$	$63,1 \pm 4,9$	$73 \pm 9,1$
100 nmol	$222,7 \pm 13,4$	$213,8 \pm 13,2$	$131,9 \pm 9,3$	$168,2 \pm 18,3$
1000 nmol	$133,1 \pm 13,5$	$218,1 \pm 12,6$	$140 \pm 9,4$	$177 \pm 14,5$

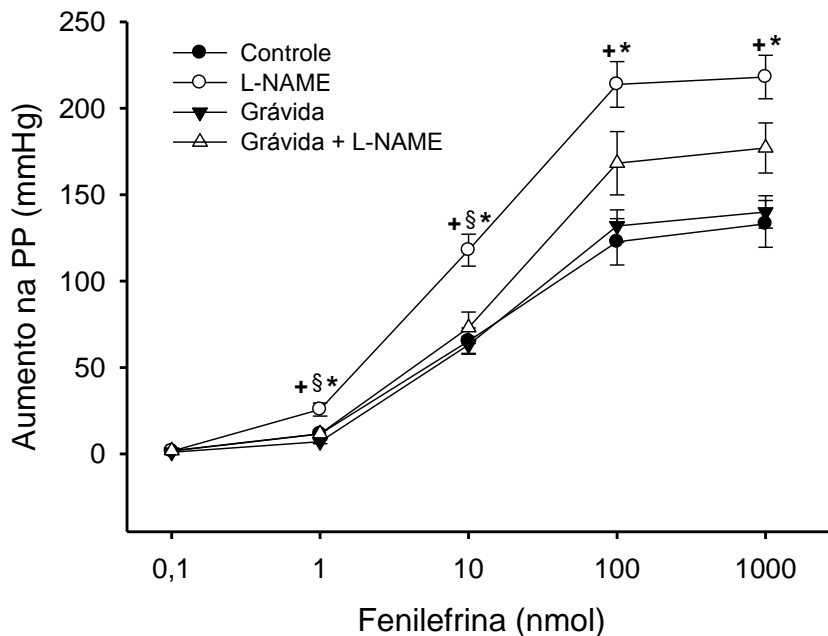


Figura 20: Resposta vasoconstritora induzida pela Fenilefrina em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 9$ a 12 animais por grupo. $p < 0.05$ + L-NAME vs Grávida; § L-NAME vs Grávida + L-NAME; * L-NAME vs Controle.

4.15 Resposta vasoconstritora induzida pela Angiotensina II

AAng II produziu uma resposta bifásica, sendo predominantemente vasoconstritora em baixas doses e vasodilatadora em altas doses. Nessa perspectiva, a Ang II produziu uma resposta vasoconstritora significativamente ($p < 0.05$) maior em LAM isolado de animais Grávida + L-NAME, quando comparada aos grupos Controle e Grávida. Do mesmo modo, o grupo L-NAME apresentou uma maior resposta vasoconstritora induzida pela Ang II em relação ao controle (Figura 21). Não houve diferença significativa entre o ID50 dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle: 13 ± 4 pmol; L-NAME: $17,4 \pm 6$ pmol; Grávida: $13 \pm 3,4$ pmol; Grávida + L-NAME: $14,8 \pm 3,2$ pmol).

Doses	Controle	L-NAME	Grávida	Grávida + L-NAME
0,001 nmol	$5,6 \pm 1$	$16,6 \pm 2,4$	$9,2 \pm 1,2$	$14,4 \pm 1,7$
0,01 nmol	$11,3 \pm 2,4$	$38,2 \pm 4,4$	$23,4 \pm 3,1$	$52,1 \pm 12,3$
0,1 nmol	$21,1 \pm 3,6$	$48,5 \pm 6,5$	$36,7 \pm 4,1$	$70,6 \pm 11,3$
1 nmol	$20,3 \pm 3$	$53 \pm 7,3$	$35,9 \pm 4$	$63,9 \pm 10,8$
10 nmol	$11,1 \pm 2,8$	$31,6 \pm 3,7$	$26,3 \pm 4,3$	$26,2 \pm 6,1$
100 nmol	$11,7 \pm 3,5$	$25,6 \pm 4,8$	$24,8 \pm 4,3$	$14,9 \pm 5,8$

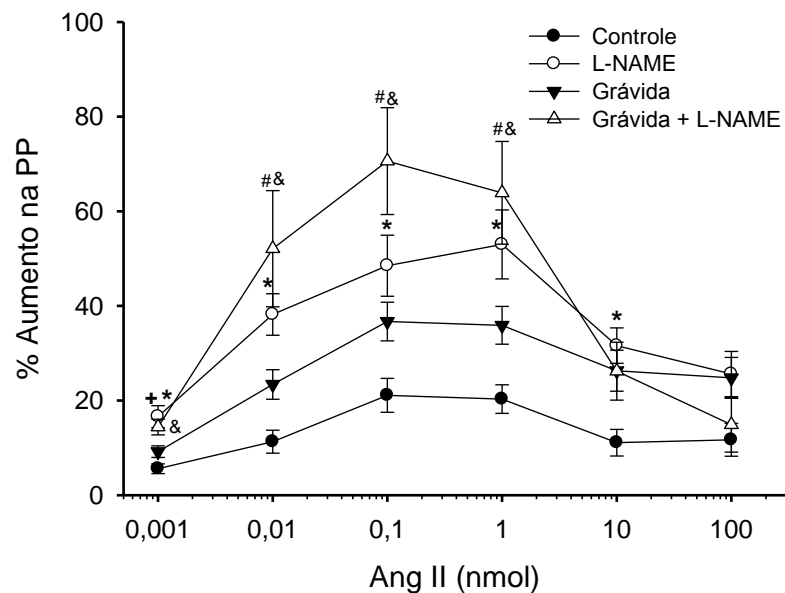


Figura 21: Resposta vasoconstritora induzida pela Angiotensina II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n = 9$ a 12 animais por grupo. $p < 0.05$ + L-NAME vs Grávida; * L-NAME vs Controle; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME.

4.16 Expressão do receptor AT1 da Angiotensina II

Não houve diferença significativa na expressão do receptor AT1 da Ang II em amostras de LAM isolado dos diferentes grupos experimentais (Controle: $0,94 \pm 0,21$; L-NAME: $0,82 \pm 0,21$; Grávida: $0,99 \pm 0,11$; Grávida + L-NAME: $0,46 \pm 0,1$; Figura 22).

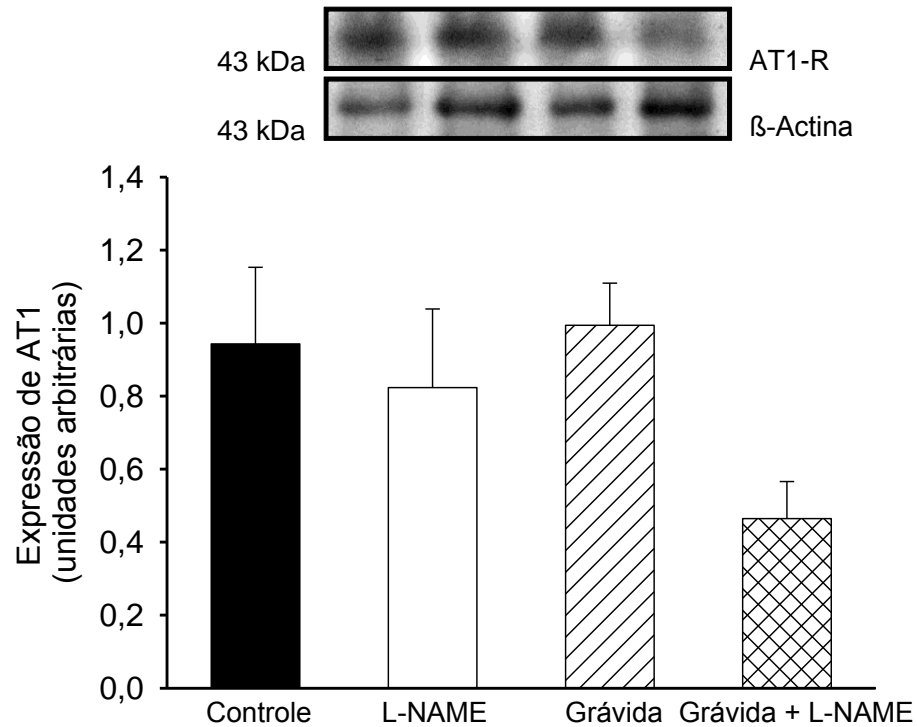


Figura 22: Expressão do receptor AT1 da Ang II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n=3 animais por grupo.

4.17 Expressão do receptor AT2 da Angiotensina II

Não houve diferença significativa na expressão do receptor AT2 da Ang II em amostras de LAM isolado dos diferentes grupos experimentais (Controle: $0,33 \pm 0,06$; L-NAME: $0,34 \pm 0,08$; Grávida: $0,25 \pm 0,09$; Grávida + L-NAME: $0,15 \pm 0,03$; Figura 23).

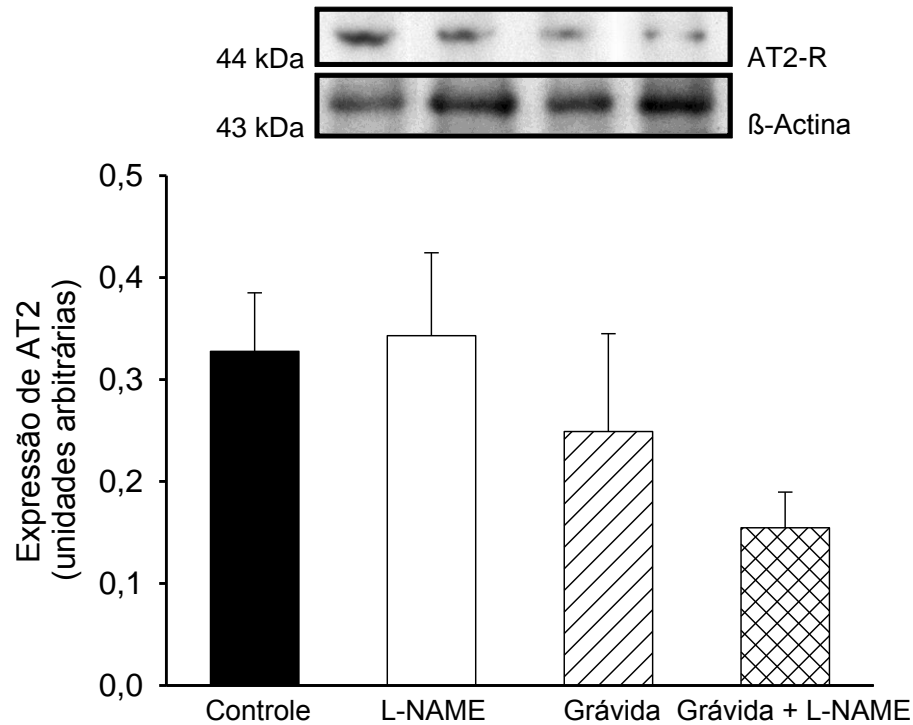


Figura 23: Expressão do receptor AT2 da Ang II em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n=3 animais por grupo.

4.18 Expressão da Enzima Conversora de Angiotensina

Não houve diferença significativa na expressão da ECA em amostras de LAM isolado dos diferentes grupos experimentais (Controle: $0,9 \pm 0,32$; L-NAME: $1,31 \pm 0,3$; Grávida: $1,26 \pm 0,62$; Grávida + L-NAME: $0,75 \pm 0,27$; Figura 24).

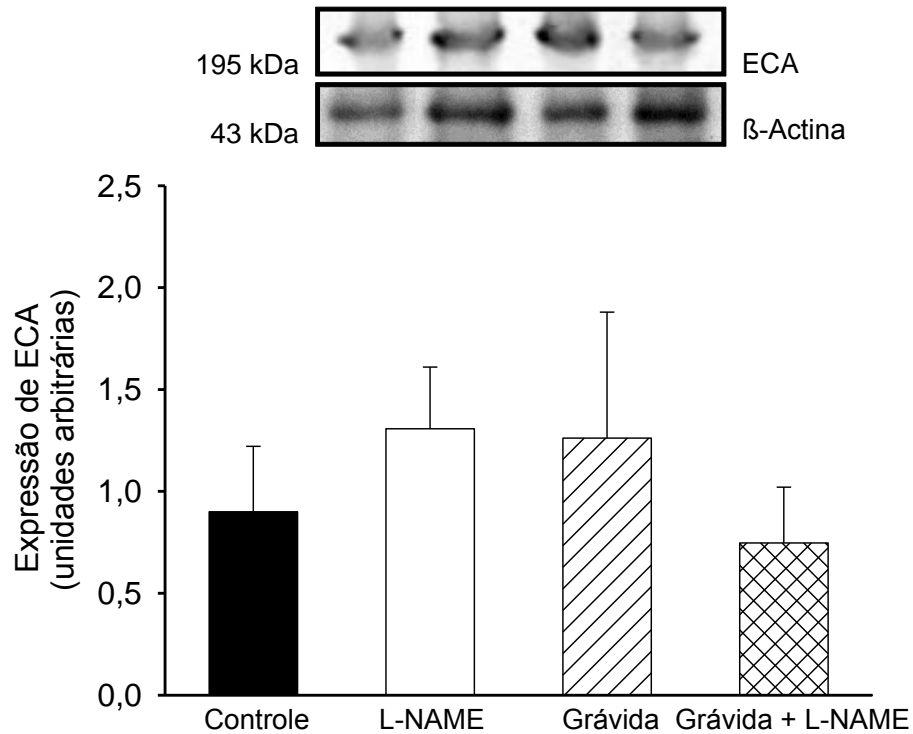


Figura 24: Expressão da enzima ECA em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n=3 animais por grupo.

4.19 Expressão da Enzima Conversora de Angiotensina 2

Não houve diferença significativa na expressão da ECA 2 em amostras de LAM isolado dos diferentes grupos experimentais (Controle: $0,79 \pm 0,16$; L-NAME: $0,64 \pm 0,08$; Grávida: $0,57 \pm 0,14$; Grávida + L-NAME: $0,7 \pm 0,02$; Figura 25).

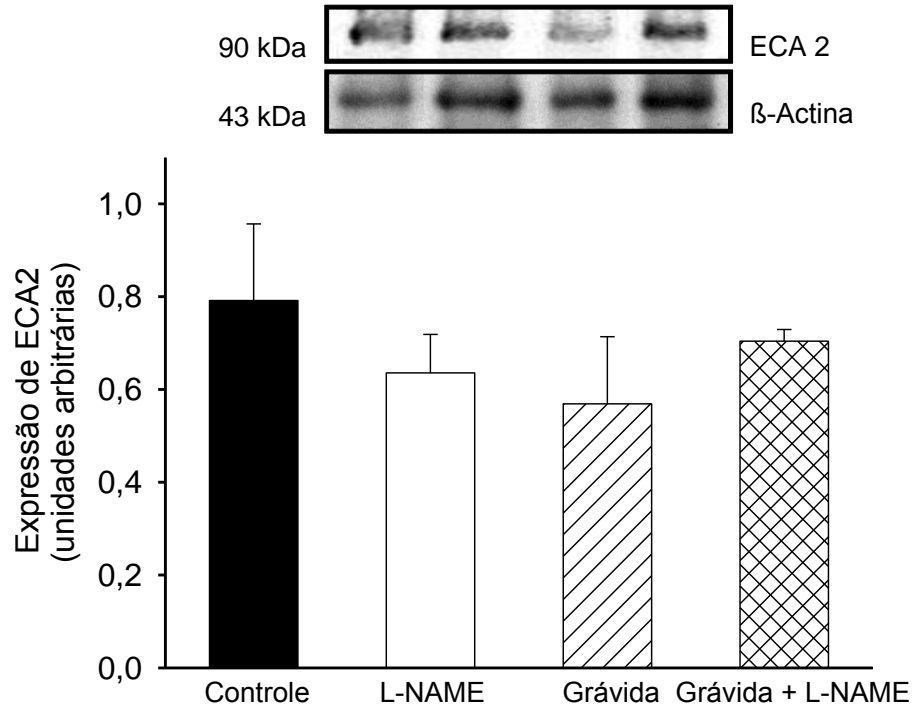


Figura 25: Expressão da enzima ECA em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n=3 animais por grupo.

4.20 Expressão da eNOS

Não houve diferença significativa na expressão da enzima eNOS em amostras de LAM isolado dos diferentes grupos experimentais (Controle: $0,18 \pm 0,03$; L-NAME: $0,12 \pm 0,04$; Grávida: $0,25 \pm 0,07$; Grávida + L-NAME: $0,18 \pm 0,02$; Figura 26).

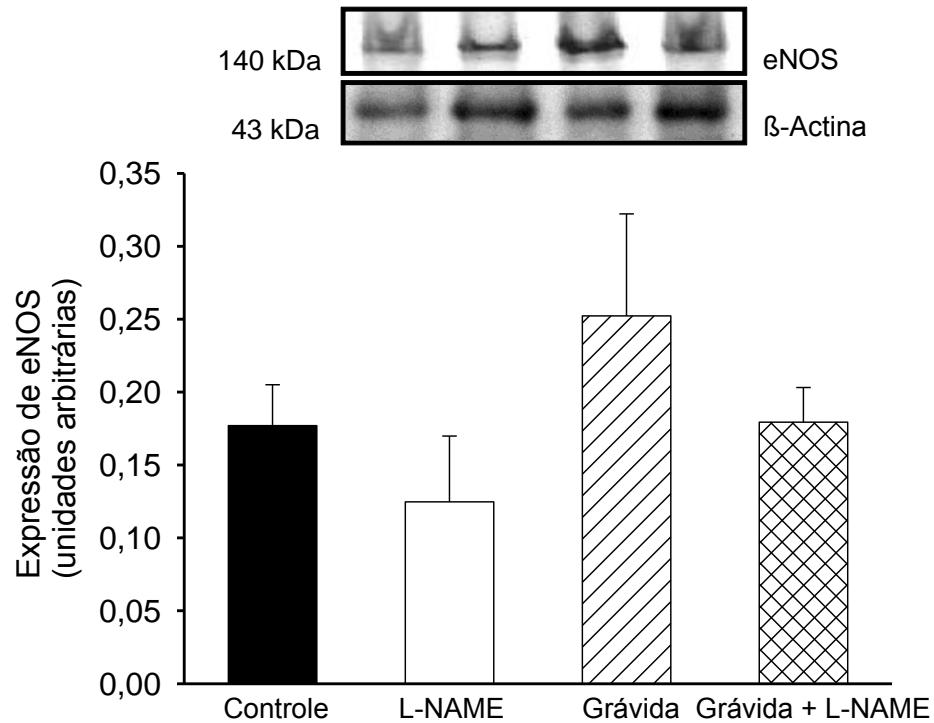


Figura 26: Expressão da enzima eNOS em leito arterial mesentérico de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n=3 animais por grupo.

4.21 Ensaio pró-oxidantes

4.21.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) na formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica em amostras de plasma, rim esquerdo e coração de animais L-NAME e Grávida + L-NAME, quando comparados com os animais Controles e Grávidas (**Plasma:** Controle: $0,09 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; L-NAME: $0,15 \pm 0,02$ nmol TBA/mg ptn; Grávida: $0,09 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,16 \pm 0,02$ nmol TBA/mg ptn; **Rim Esquerdo:** Controle: $0,2 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; L-NAME: $0,4 \pm 0,04$ nmol TBA/mg ptn; Grávida: $0,2 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,3 \pm 0,02$ nmol TBA/mg ptn; **Coração:** Controle: $0,06 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; L-NAME: $0,17 \pm 0,02$ nmol TBA/mg ptn; Grávida: $0,07 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,14 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn).

Do mesmo modo, amostras de placenta provenientes de animais Grávida + L-NAME ($0,07 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn) apresentam um aumento significativo da formação de MDA em relação às amostras do grupo Grávida ($0,05 \pm 0,01$ nmol TBA/mg ptn; Figura 27).

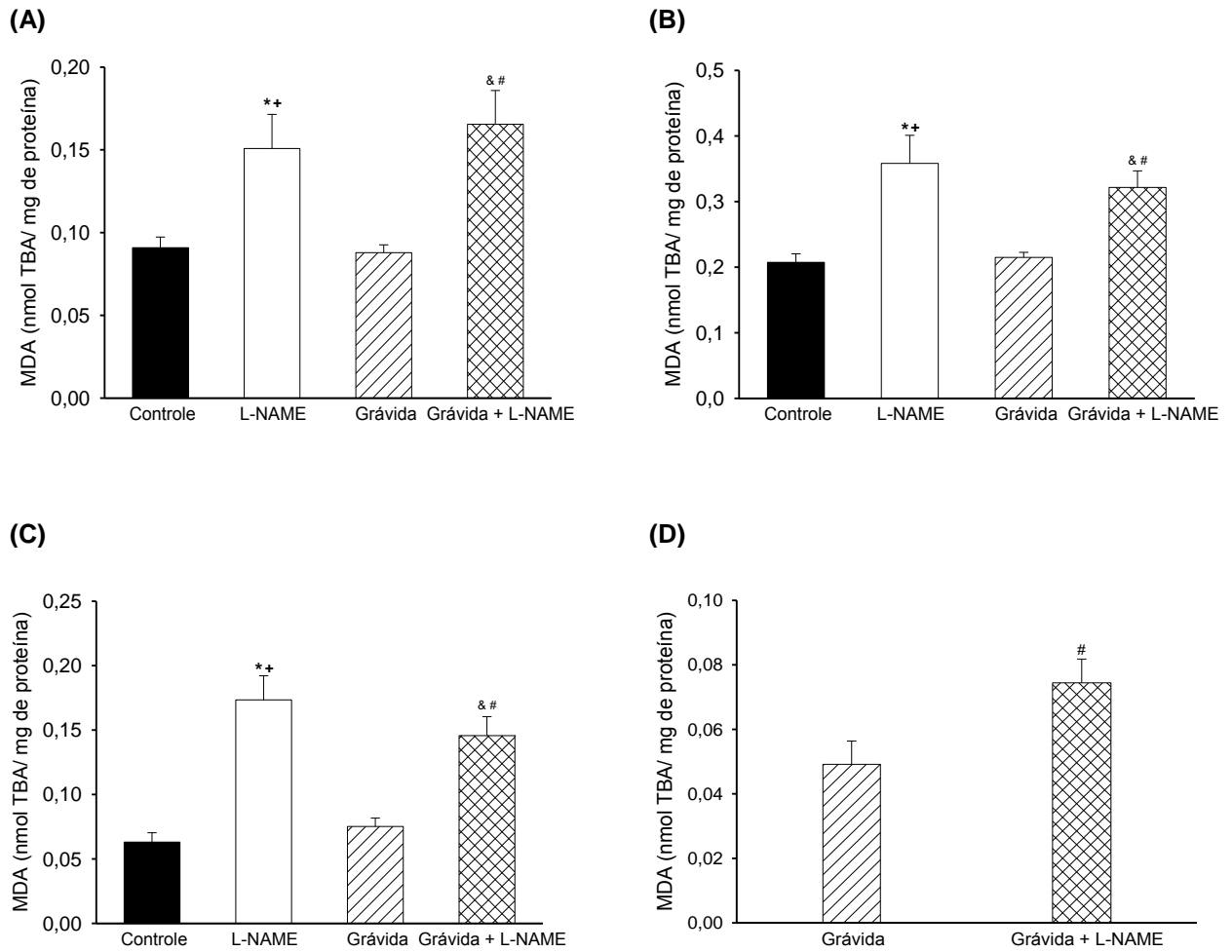


Figura 27: Níveis de TBARS em amostras de plasma (A), rim esquerdo (B), coração (C) e placenta (D) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n= 15 animais por grupo. $p < 0.05$ ⁺ L-NAME vs Grávida; ⁺ L-NAME vs Controle; [#] Grávida vs Grávida + L-NAME; [&] Controle vs Grávida + L-NAME.

4.21.2 Carbonilação de Proteínas

Foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) na carbonilação de proteínas em amostras de plasma e rim esquerdo de animais L-NAME e Grávida + L-NAME quando comparado com os animais Controles e Grávidas (**Plasma:** Controle: $1,6 \pm 0,2$ nmol Carbonil/mg ptn; L-NAME: $8,4 \pm 1$ nmol Carbonil/mg ptn; Grávida: $1,4 \pm 0,1$ nmol Carbonil/mg ptn; Grávida + L-NAME: $10,2 \pm 0,8$ nmol Carbonil/mg ptn; **Rim esquerdo:** Controle: $0,1 \pm 0,03$ nmol Carbonil/mg ptn; L-NAME: $0,5 \pm 0,11$ nmol Carbonil/mg ptn; Grávida: $0,2 \pm 0,07$ nmol Carbonil/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,9 \pm 0,12$ nmol Carbonil/mg ptn).

Em amostras de coração, foi observado um aumento na carbonilação de proteínas em animais Grávida + L-NAME quando comparados ao grupo Controle, entretanto não foi observada diferença significativa em relação aos demais grupos experimentais (Controle: $0,1 \pm 0,03$ nmol Carbonil/mg ptn; L-NAME: $0,4 \pm 0,1$ nmol Carbonil/mg ptn; Grávida: $0,3 \pm 0,06$ nmol Carbonil/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,5 \pm 0,07$ nmol Carbonil/mg ptn).

De modo semelhante, amostras de placenta provenientes de animais Grávida + L-NAME ($0,8 \pm 0,17$ nmol Carbonil/mg ptn) apresentaram um aumento significativo da carbonilação de proteínas em relação às amostras do grupo Grávida ($0,4 \pm 0,06$ nmol Carbonil/mg ptn; Figura 28).

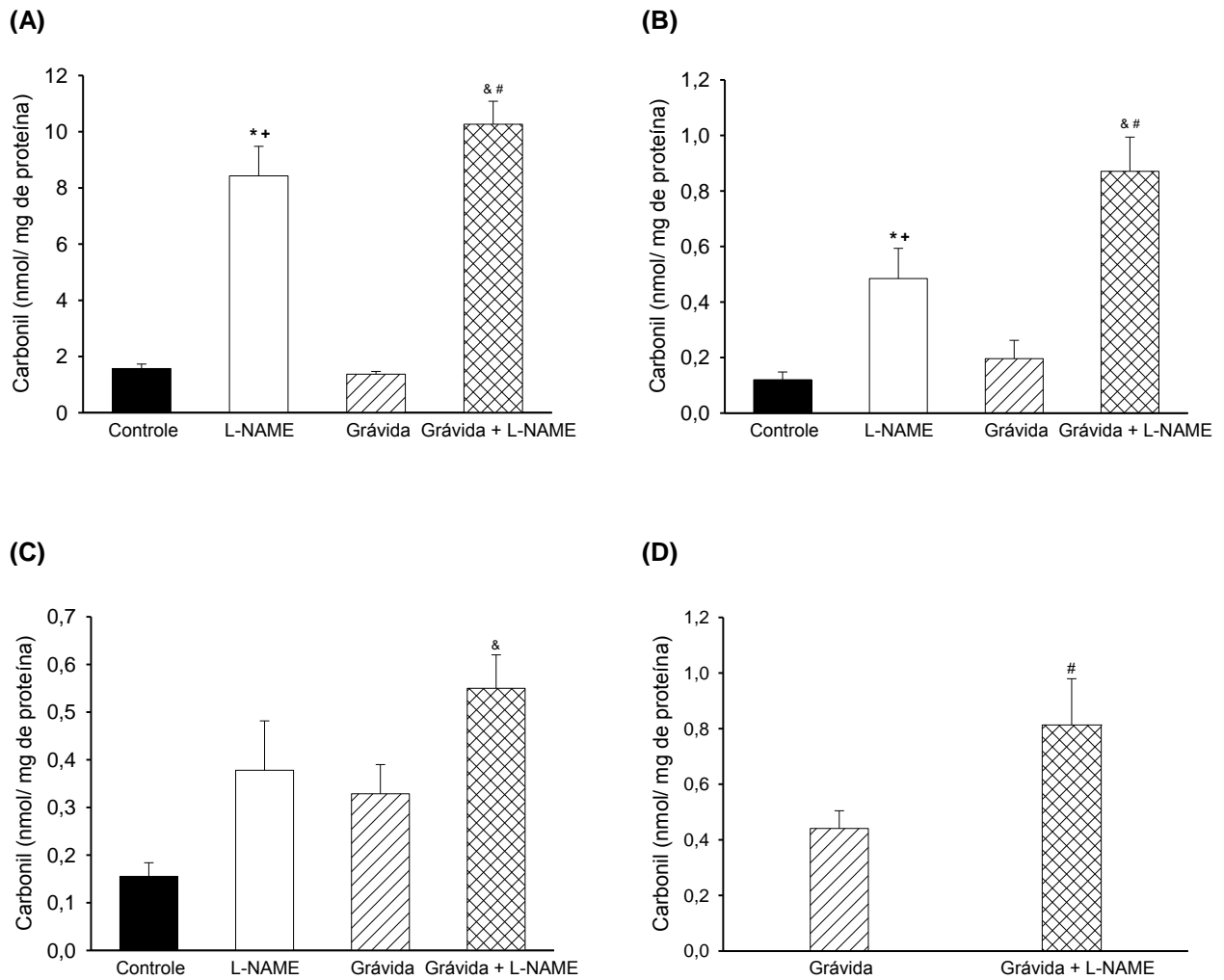


Figura 28: Carbonilação de proteínas em amostras de plasma (A), rim esquerdo (B), coração (C) e placenta (D) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n=15$ animais por grupo. $p<0.05$ + L-NAME vs Grávida; * L-NAME vs Controle; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME.

4.22 Atividade das enzimas antioxidantes

4.22.1 Superóxido Dismutase

A atividade da enzima SOD foi significativamente ($p < 0.05$) menor em amostras de plasma de animais Grávida + L-NAME, quando comparada às de animais Controles e Grávidas. De modo semelhante, a atividade da enzima SOD foi significativamente menor em animais L-NAME em relação ao controle (Controle: $197,1 \pm 36,3$ U/mg ptn; L-NAME: $122,8 \pm 10,2$ U/mg ptn; Grávida: $236 \pm 53,6$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $89,1 \pm 11,4$ U/mg ptn).

Não houve alteração na atividade da enzima SOD em amostras de rim esquerdo e coração dos diferentes grupos experimentais estudados (**Rim esquerdo:** Controle: $34,4 \pm 8,6$ U/mg ptn; L-NAME: $26,2 \pm 7,8$ U/mg ptn; Grávida: $28,1 \pm 6$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $26,4 \pm 5,9$ U/mg ptn; **Coração:** Controle: $86,7 \pm 4,7$ U/mg ptn; L-NAME: $82,8 \pm 8,3$ U/mg ptn; Grávida: $88,7 \pm 25,3$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $84,5 \pm 10,8$ U/mg ptn).

Por outro lado, a atividade da enzima SOD foi significativamente ($p < 0.05$) menor em amostras de placenta de animais Grávida + L-NAME ($35,7 \pm 11,1$ U/mg ptn), quando comparada às de animais Grávidas ($185,3 \pm 48,5$ U/mg ptn; Figura 29).

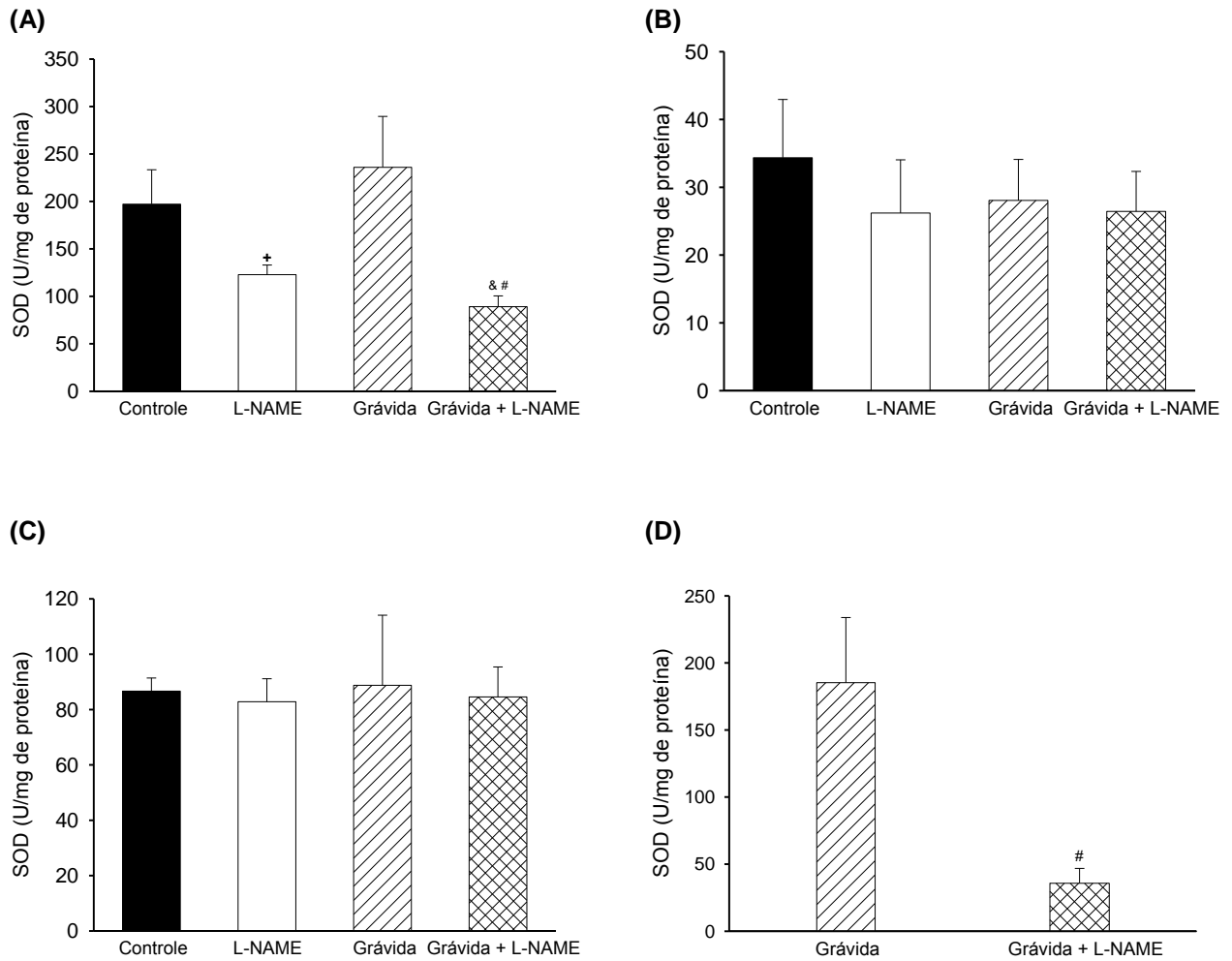


Figura 29: Atividade da enzima SOD em amostras de plasma (A), rim esquerdo (B), coração (C) e placenta (D) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, $n=15$ animais por grupo. $p<0.05$ [†] L-NAME vs Grávida; [#] Grávida vs Grávida + L-NAME; [&] Controle vs Grávida + L-NAME.

4.22.2 Catalase

Não houve alteração na atividade da enzima catalase em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta dos animais dos diferentes grupos experimentais estudados (**Plasma:** Controle: $0,48 \pm 0,07$ U/mg ptn; L-NAME: $0,59 \pm 0,06$ U/mg ptn; Grávida: $0,42 \pm 0,08$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,43 \pm 0,07$ U/mg ptn; **Rim esquerdo:** Controle: $1,3 \pm 0,05$ U/mg ptn; L-NAME: $1,5 \pm 0,06$ U/mg ptn; Grávida: $1,4 \pm 0,08$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $1,5 \pm 0,06$ U/mg ptn; **Coração:** Controle: $0,5 \pm 0,08$ U/mg ptn; L-NAME: $0,45 \pm 0,05$ U/mg ptn; Grávida: $0,37 \pm 0,05$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,35 \pm 0,06$ U/mg ptn; **Placenta:** Grávida: $0,92 \pm 0,1$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,88 \pm 0,09$ U/mg ptn; Figura 30).

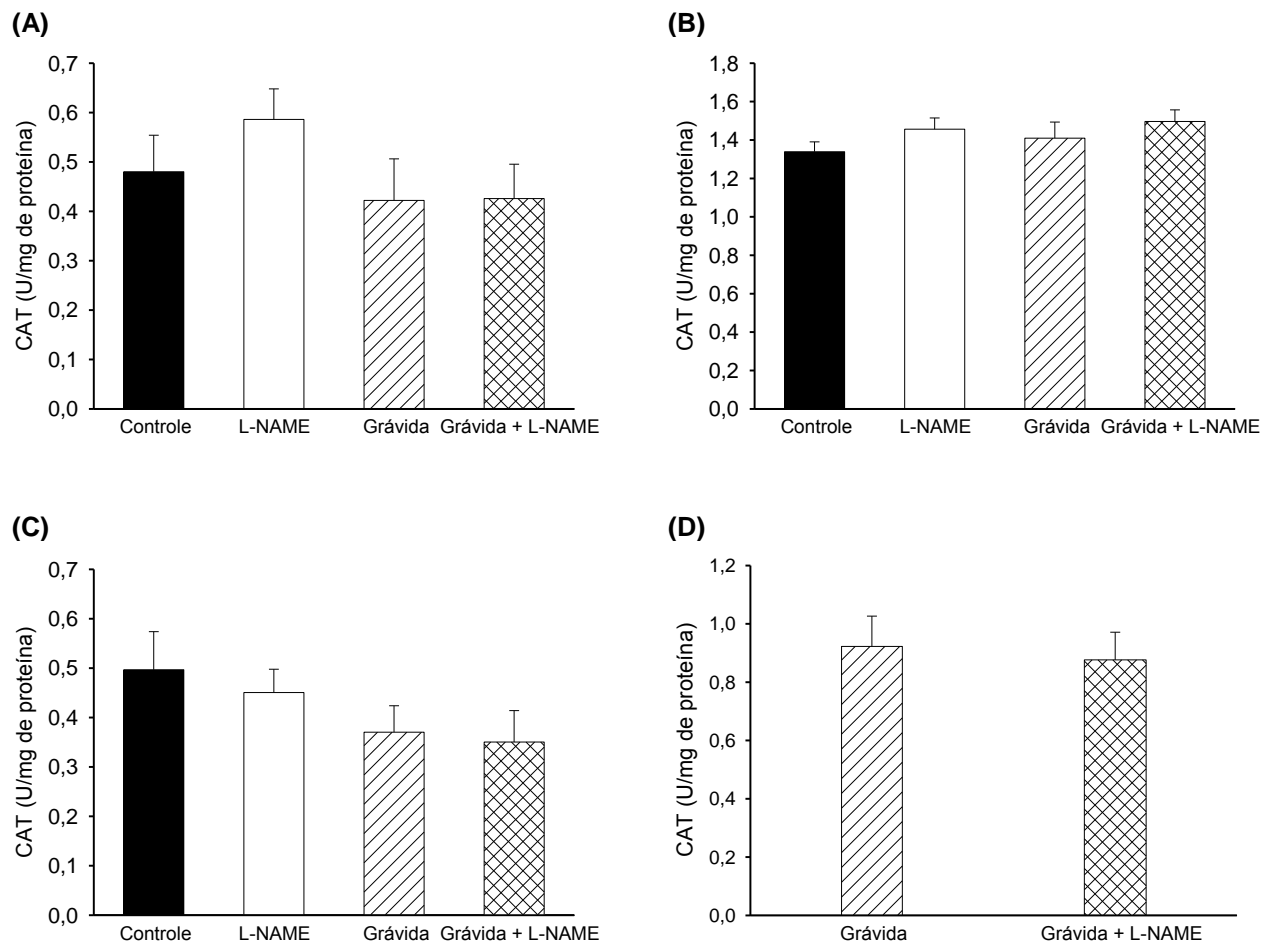


Figura 30: Atividade da enzima CAT em amostras de plasma (A), rim esquerdo (B), coração (C) e placenta (D) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n= 15 animais por grupo.

4.22.3 Glutationa Peroxidase

A atividade da enzima GPx foi significativamente ($p < 0.05$) menor em amostras de plasma de animais Grávida + L-NAME, quando comparadas às do Controle. De modo semelhante, o grupo L-NAME apresentou uma atividade da GPx reduzida em relação aos grupos Controle e Grávida (Controle: $0,005 \pm 0,0002$ U/mg ptn; L-NAME: $0,002 \pm 0,0005$ U/mg ptn; Grávida: $0,004 \pm 0,0005$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,003 \pm 0,0007$ U/mg ptn).

Em amostras de rim esquerdo, a atividade da enzima GPx foi significativamente menor nos grupos L-NAME e Grávida + L-NAME, quando comparadas ao Controle e às Grávidas (Controle: $0,025 \pm 0,0007$ U/mg ptn; L-NAME: $0,019 \pm 0,0006$ U/mg ptn; Grávida: $0,023 \pm 0,0007$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,017 \pm 0,0012$ U/mg ptn).

Nesta perspectiva, em amostras de coração, o grupo Grávida + L-NAME apresentou uma atividade da enzima GPx significativamente menor que os demais grupos experimentais estudados. Assim como o grupo L-NAME apresentou uma atividade da enzima GPx reduzida em relação ao Controle (Controle: $0,018 \pm 0,0008$ U/mg ptn; L-NAME: $0,015 \pm 0,0005$ U/mg ptn; Grávida: $0,016 \pm 0,0004$ U/mg ptn; Grávida + L-NAME: $0,01 \pm 0,001$ U/mg ptn).

As análises realizadas em amostras de placenta, demonstraram uma menor atividade da enzima GPx em animais Grávidas + L-NAME ($0,04 \pm 0,001$ U/mg ptn), quando comparadas às grávidas ($0,054 \pm 0,003$ U/mg ptn; Figura 31).

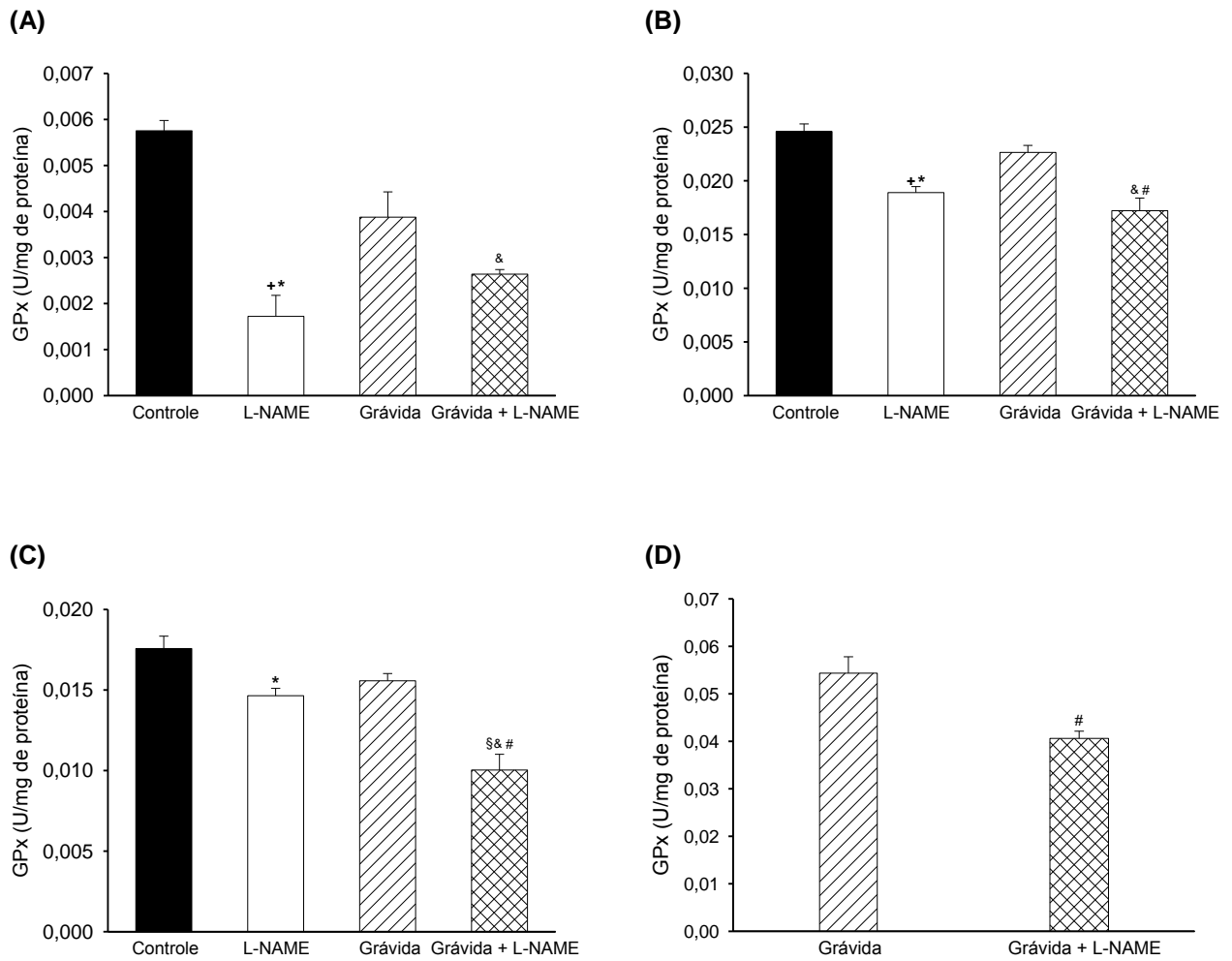


Figura 31: Atividade da enzima GPx em amostras de plasma (A), rim esquerdo (B), coração (C) e placenta (D) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n= 15 animais por grupo. $p < 0.05$ + L-NAME vs Grávida; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME; L-NAME vs Controle; § L-NAME vs Grávida + L-NAME.

4.23 Medida da Produção de Nitrito

Não houve alteração nos níveis de nitrito nas amostras de rim esquerdo e coração dos animais dos diferentes grupos experimentais estudados (**Rim esquerdo:** Controle: $153,8 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; L-NAME: $148 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Grávida: $155,4 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Grávida + L-NAME: $160,2 \pm 4,2$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; **Coração:** Controle: $108,4 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; L-NAME: $104,4 \pm 3,9$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Grávida: $105,7 \pm 4,1$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Grávida + L-NAME: $98,4 \pm 3,7$ $\mu\text{mol/mg ptn}$). Entretanto, os níveis de nitrito no plasma de animais Grávidas e Grávidas + L-NAME foram significativamente ($p < 0.05$) maiores que nos pertencentes aos grupos Controle e L-NAME (Controle: $17,6 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; L-NAME: $19,7 \pm 2,2$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Grávida: $54,8 \pm 8$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Grávida + L-NAME: $59,7 \pm 9,3$ $\mu\text{mol/mg ptn}$).

Em amostras de placenta, foram constatados menores níveis de nitrito em ratas Grávidas + L-NAME ($221,4 \pm 8,6$ $\mu\text{mol/mg ptn}$), quando comparados às Grávidas ($253,6 \pm 10,8$ $\mu\text{mol/mg ptn}$; Figura 32).

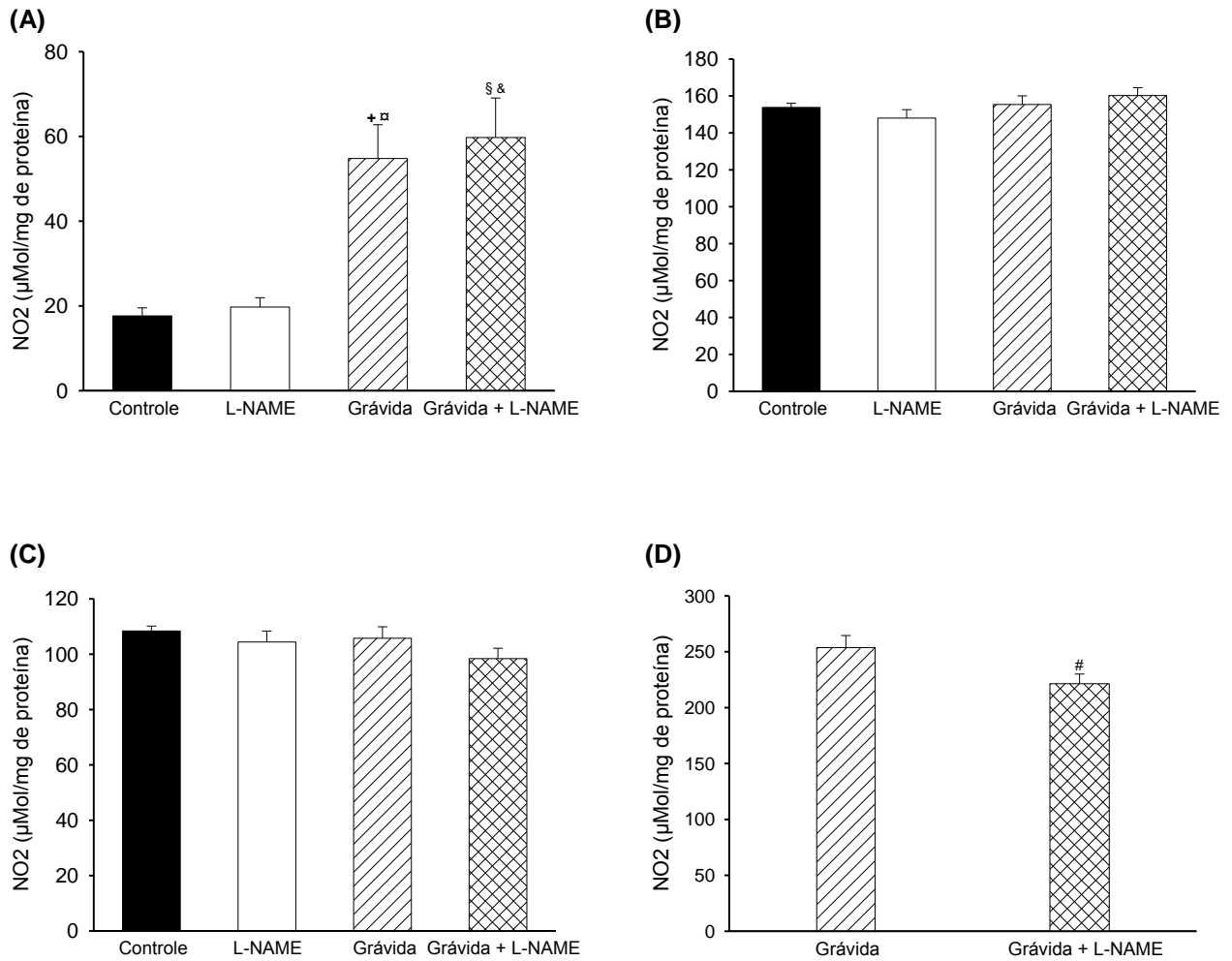


Figura 32: Conteúdo total de nitrito em amostras de plasma (A), rim esquerdo (B), coração (C) e placenta (D) de animais controles, L-NAME, Grávidas e Grávidas + L-NAME no 20º dia de gestação. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão, n= 15 animais por grupo. $p < 0.05$ □ Grávida vs Controle; + L-NAME vs Grávida; # Grávida vs Grávida + L-NAME; & Controle vs Grávida + L-NAME; § L-NAME vs Grávida + L-NAME.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos o papel do SRA vascular e do estresse oxidativo cardíaco, placentário, renal e plasmático para a regulação cardiovascular materna no final da gravidez em ratas normotensas e em modelo de PE induzido por L-NAME.

No presente estudo, pudemos verificar que as ratas grávidas apresentam um aumento da massa corporal em relação às ratas não grávidas ao longo do período de gestação, entretanto este aumento é significativamente menor em ratas grávidas que receberam a administração de L-NAME, o que possivelmente esteja associado ao maior número de abortos, menor número de filhotes vivos, menor massa placentária total e menor massa corporal dos fetos vivos, verificados nesse grupo experimental, reproduzindo, assim, o RCIU e aumento da taxa de mortalidade fetal característicos da PE.

Intervenções para induzir estados de PE em modelos animais são geralmente aplicadas após o período crítico do desenvolvimento da placenta, que parece ser um momento crucial no desenvolvimento de PE em humanos (MC CARTY *et al.*, 2011), visto que a placentação é diferente entre ratos e humanos. Os ratos, assim como camundongos, apresentam uma invasão rasa do trofoblasto, um período de gestação de aproximadamente três semanas e uma placenta hemotricordial, com três camadas de sinciotrofoblasto, enquanto seres humanos apresentam apenas uma camada (MALASSINE *et al.*, 2003; GEORGIADES *et al.*, 2002). Tais diferenças fisiológicas levam a uma limitação nos modelos animais, entretanto nossos resultados demonstram que com a administração de L-NAME, ocorre um aumento na pressão arterial em ratas grávidas e um aumento na excreção de proteínas na urina quando comparado ao controle, refletindo características comuns à PE.

Na gestação normal, o estrogênio e/ou progesterona promovem um aumento na atividade do SRA pelo aumento dos níveis circulantes e teciduais de angiotensinogênio (TEWKSBURY, 1990; ANTON *et al.*, 2008) e renina (CHEN *et al.*, 1992; OELKERS, 1996; ANTON *et al.*, 2008). Conseqüentemente ocorre um aumento da Ang II plasmática associado ao aumento do angiotensinogênio e da atividade da renina plasmática observada durante a gestação (BROWN *et al.*, 1997; BAKER *et al.*, 1990).

Em nosso estudo, foi verificado um aumento nos níveis de estradiol em ratas grávidas normotensas e ratas grávidas que receberam a administração de L-NAME. Foi verificado um aumento significativo dos níveis de renina plasmática em ratas do modelo de PE, entretanto não foi verificada uma diferença significativa nos níveis plasmáticos de Ang I e Ang II em ratas grávidas, o que pode estar ocorrendo devido a um aumento na atividade de outras peptidases envolvidas no metabolismo de peptídeos de angiotensina, fazendo com que tais níveis não permaneçam elevados.

Nossos achados demonstram uma redução nos níveis plasmáticos de Ang 1-7 em ratas que receberam a administração de L-NAME, corroborando os dados de Brosnihan *et al.* (2004) que demonstraram um aumento na concentração plasmática de Ang 1-7 na gestação normal em humanos e uma redução na concentração plasmática de Ang 1-7 na PE.

O nonapeptídeo BK tem importantes efeitos fisiológicos sobre os vasos sanguíneos, coração e rins, promovendo uma hipotensão transitória quando administrado na circulação sistêmica (HADDY *et al.*, 1970). Este efeito resulta da dilatação de diversos leitos de vasos de resistência após a ativação de receptores B2 (RESENDE *et al.*, 1998). A meia vida da BK é muito curta, o que tem sido atribuído à rápida degradação enzimática por diversas peptidases coletivamente conhecidas como “cininases” presentes em plasma ou nos tecidos. As cininases que degradam a BK predominantes na maioria dos tecidos são a cininase II (ECA), a cininase I (carboxipeptidase M e N) e a endopeptidase neutra 24.11 (NEP) (ERDÖS e SKIDGEL, 1997; SKIDGEL *et al.*, 1989; ROQUES *et al.*, 1993; SKIDGEL 1992; SIVIERI *et al.*, 2007). Estima-se que a afinidade da ECA pela BK seja 100 vezes maior que pela Ang I (ERDÖS, 1990) e que, enquanto em seres humanos apenas 10% da atividade cininásica plasmática total seja atribuída à cininase II, em ratos, essa atribuição é de cerca de 47% (ISHIDA *et al.*, 1989). Nessa perspectiva, nossos resultados demonstram um aumento da concentração plasmática de BK em modelo de PE, o que pode estar sendo promovido por uma redução na atividade cininásica de alguma das supracitadas cininases.

Apesar de a BK promover vasodilatação e efeito hipotensor sistemicamente, na placenta, a BK atua promovendo vasoconstrição (SOARES DE MOURA *et al.*, 2010).

Logo, um aumento na concentração de BK associado à redução da concentração de Ang-1-7, que contrapõe os efeitos vasoconstritores da Ang II, poderia estar contribuindo para o aumento da mortalidade fetal e RCIU observados neste modelo de PE.

A gravidez normal é caracterizada por importantes modificações hemodinâmicas. Há redução da resistência vascular periférica, podendo ocorrer uma queda da pressão arterial, enquanto há aumento do débito cardíaco e da contratilidade cardíaca (ROBSON *et al.*, 1989). Os mecanismos responsáveis pela vasodilatação durante a gravidez não são completamente entendidos, mas alguns dados sugerem que o NO é o principal mediador na queda da resistência vascular (DORUP *et al.*, 1999). As alterações vasculares durante a gestação normal têm sido atribuídas, parcialmente, a um aumento na síntese de NO por diversos tipos celulares maternos, incluindo as células endoteliais vasculares (ANUMBA *et al.*, 1999). Em nosso estudo, foi verificada uma tendência ao aumento da expressão da eNOS em amostras de LAM de ratas grávidas normotensas, que poderia estar contribuindo para um aumento na produção de NO na vasculatura, o que foi recentemente demonstrado por nosso grupo (OGNIBENE *et al.*, 2012). A expressão e a atividade da NOS está aumentada em artérias uterinas durante a gestação normal (NELSON *et al.*, 2000). Do mesmo modo, a concentração plasmática e excreção urinária de GMPc, um segundo mensageiro do NO e um mediador da vasodilatação da musculatura lisa vascular, está aumentado na gestação normal. Entretanto, curiosamente, a produção de GMPc está significativamente aumentada durante o primeiro trimestre quando a circulação materna está rapidamente vasodilatando, enquanto a produção de NO por todo o corpo não se encontra proporcionalmente elevada, sugerindo uma fonte adicional de GMPc (CONRAD *et al.*, 1999).

Medidas da produção total de NO durante a hipertensão associada à gestação não produziram resultados consistentes até o momento. Alguns estudos têm mostrado que a concentração de nitrito/nitrato, subprodutos estáveis do NO é reduzida em soro de mulheres com PE (MUTLU-TURKOGLU *et al.*, 1999), enquanto outros estudos tem mostrado níveis aumentados (SCHIESSL *et al.*, 2006). A diferença nos níveis de nitrito/nitrato durante a PE pode estar relacionada com a ingestão de nitratos na dieta. No entanto, um estudo de mulheres com PE, durante a qual a ingestão de nitrito/ nitrato

na dieta foi cuidadosamente controlada não demonstrou redução na produção de NO em relação às gestantes normotensas (CONRAD *et al.*, 1999).

Nossos resultados demonstram um aumento na produção de nitrito em amostras de plasma de ratas grávidas normotensas e em modelo de PE, e uma redução na produção de nitrito em amostras de placenta de ratas com PE em relação às ratas grávidas normotensas, além de não ter sido verificada alteração nos níveis de nitrito em amostras de rim e coração dos diferentes grupos experimentais estudados. Tais achados sugerem uma aparente diferença tecido-específica na expressão de NOS e na biodisponibilidade do NO ocorrendo durante a gestação e em modelo de PE. Conrad e Davis (1995) demonstraram que não há diferença significativa na expressão de NOS em placentas de mulheres gestantes normotensas e com PE. Entretanto, no final do período de gestação, ratas grávidas apresentam uma redução de 39% na expressão de eNOS em tecido renal, enquanto ocorre um aumento de 31% na expressão de iNOS e de 25% na de nNOS (ALEXANDER *et al.*, 1999). Cabe ressaltar que o estrogênio também aumenta a expressão de importantes enzimas relacionadas à vasodilatação como a eNOS (WEINER *et al.*, 1994a,b). Estudos em culturas de células demonstraram que concentrações fisiológicas de estrogênio promovem a liberação de NO através da ativação direta de eNOS, sem envolver alteração da expressão gênica (HISAMOTO *et al.*, 2001).

Fatores locais estimulados pela hipóxia placentária na PE são liberados na circulação sanguínea, promovendo o desenvolvimento de hiper-reatividade vascular e disfunção endotelial (ROBERTS *et al.*, 1989; ROBERTS e COOPER, 2001). Alterações no tônus vascular, influenciados por fatores hormonais e mecânicos, promovem o aumento na resistência vascular periférica, o que implica no desenvolvimento da hipertensão (TOUYZ, 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). Em nosso estudo, observamos uma redução na resposta vasodilatadora induzida pela ACh, um vasodilatador dependente de endotélio, em LAM isolado de ratas grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME, sugerindo que neste modelo é

observada uma disfunção endotelial, assim como ocorre na PE. Tais achados estão de acordo com os de Anderson *et al.* (2006) em modelo animal de redução da pressão de perfusão uteroplacentária (RUPP). Por outro lado, a resposta vasodilatadora induzida pela NG, um nitrato orgânico que vai levar à formação de NO, encontra-se aumentada em LAM de ratas grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME, o que pode estar relacionado a um mecanismo compensatório visto que o L-NAME, ao inibir a NOS, promove uma redução na liberação de NO pelas células endoteliais. Nossos resultados revelam, ainda, um aumento da resposta pressora induzida pela PHE em LAM de ratas não grávidas que receberam administração de L-NAME, o que não é observado em ratas grávidas que receberam L-NAME.

O SRA parece desempenhar um papel importante nas alterações vasculares associadas à gravidez. Nossos resultados demonstraram que em preparações de LAM pré-contraídas, a Ang II e a Ang 1-7 produziram respostas vasodilatadoras em ratas virgens e grávidas normotensas. Estes dados estão de acordo com os achados recentes de Ognibene *et al.* (2012) que demonstraram uma resposta vasodilatadora induzida por Ang II e Ang 1-7 em LAM isolado de ratas grávidas e não grávidas normotensas. Neste âmbito, Soares de Moura *et al.* (2004) demonstraram, ainda, em LAM de ratos normotensos adultos, que a resposta vasodilatadora da Ang II é dependente de endotélio e da ativação da via NO-GMPc .

No presente estudo foi demonstrado que as respostas vasodilatadoras induzidas por Ang II ou Ang 1-7 foram similares em LAM de ratas normotensas não grávidas e grávidas. Esta observação confirma os dados de diferentes grupos, que não observaram diferença entre as respostas induzidas por agentes vasodilatadores dependentes do endotélio, como BK e ACh (RESENDE *et al.*, 2004; BALLEJO *et al.*, 2002), sugerindo que a função endotelial não é alterada durante a adaptação normal da gravidez.

Diversos estudos demonstraram que o heptapeptídeo Ang1-7 promove relaxamento em preparações de artérias coronárias e mesentéricas de animais normotensos (GORELIK *et al.*, 1998; BROSNIHAN *et al.*, 2004) e estimula a liberação de NO e prostaglandinas (RAJENDRAN *et al.*, 2005). Os estudos de Brosnihan *et al.* (2004) demonstraram que há um aumento dos níveis plasmáticos e urinários de Ang 1-

7 e um aumento da resposta vasodilatadora promovida pelo heptapeptídeo em artérias mesentéricas isoladas de ratas normotensas grávidas. Em nosso estudo não foi observado o aumento da resposta vasodilatadora da Ang1-7 em LAM perfundido, na gravidez de ratas normotensas, mas a utilização de condições técnicas distintas pode justificar a diferença de resultados.

Da mesma forma, o efeito vasodilatador induzido pela Ang II associado a uma expressão aumentada de receptores AT_2 , e mantida com a idade, foi demonstrado recentemente por nosso grupo em LAM de ratos espontaneamente hipertensos (OGNIBENE *et al.*, 2009), sugerindo um benefício adicional para os efeitos hemodinâmicos dos antagonistas AT_1 utilizados como terapia anti-hipertensiva. Este efeito vasodilatador dependente de endotélio também foi demonstrado em arteríola aferente de coelho (ARIMA *et al.*, 1997) e em artéria mesentérica isolada de rato (KATADA E MAJIMA, 2002).

Ognibene *et al.* (2012) demonstraram que ratas espontaneamente hipertensas (SHR) que apresentavam pressão arterial elevada antes da gestação, e que se normalizava ao final desta, apresentaram uma resposta vasodilatadora aumentada à Ang II e Ang 1-7, o que poderia contribuir para a redução da pressão arterial observada nesses animais, no final da gestação. No presente estudo, demonstramos que ratas grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME e portanto, com níveis elevados de pressão arterial no final da gestação, apresentaram uma redução na resposta vasodilatadora induzida pela Ang II e inalterada para Ang 1-7. Este achado pode sugerir, que a redução da resposta vasodilatadora induzida por Ang II pode contribuir para uma modulação prejudicada do tônus vascular, na PE experimental.

Na gestação normal, os níveis circulatórios de renina e Ang II encontram-se elevados, mas a hipertensão não ocorre devido a uma redução na sensibilidade dos receptores AT_1 (ZHENG *et al.*, 2005). Por outro lado, na PE, os níveis de Ang II não se encontram elevados, mas a sinalização mediada por receptores AT_1 encontra-se aumentada, o que parece ocorrer por dois mecanismos, a formação de heterodímeros de AT_1 - B_2R (ABDALLA *et al.*, 2001) e aumento de autoanticorpos AT_1 (AT_1 -AA; WALLUKAT *et al.*, 1999). Nossos resultados mostram que a Ang II produz uma resposta bifásica, sendo predominantemente vasoconstritora em baixas doses e

vasodilatadora em altas doses. Foi verificado um aumento da resposta vasoconstritora induzida pela Ang II em LAM do modelo de PE em relação às ratas grávidas e não grávidas normotensas. Em ratas não grávidas que receberam administração de L-NAME, o aumento da resposta vasoconstritora da Ang II ocorreu de forma mais branda que observada em modelo de PE, o que sugere que um aumento da resposta vasoconstritora e uma redução na resposta vasodilatadora induzida pela Ang II, podem, em conjunto, estar contribuindo para a elevação da pressão arterial observada neste modelo de PE.

As ações da Ang II são mediadas pela ativação de dois subtipos de receptores, AT₁ e AT₂. O receptor AT₁ é amplamente distribuído nos adultos, enquanto o receptor AT₂ é altamente expresso durante o desenvolvimento fetal, mas reduz progressivamente após o nascimento (DE GASPARO *et al.*, 2000). Os resultados do presente estudo demonstraram que não houve uma alteração significativa na expressão de receptores AT₁ e AT₂ em LAM de ratas normotensas grávidas e não grávidas o que corrobora os dados de Ognibene *et al.*, 2012. E a administração de L-NAME às ratas grávidas e não grávidas durante o período de 7 dias, correspondentes ao 13^o ao 20^o dias de gestação, não modificou a expressão desses receptores.

O SRA é um regulador central dos eventos cardiovasculares. Enquanto a atividade do eixo vasoconstritor e proliferativo ECA/AngII/AT₁ tem sido relacionada a complicações cardiovasculares como a trombose, a atividade do eixo ECA2/Ang 1-7/*mas* parece atuar de maneira contra-regulatória, estando envolvida em ações protetoras do SRA, como vasodilatação e efeito antitrombogênico (SANTOS *et al.*, 2008; FRAGA-SILVA *et al.*, 2010). Diversas observações e evidências experimentais sugerem um papel benéfico da ECA2 sobre a função cardiovascular. Evidências demonstram que a expressão de ECA2 já se encontra elevada nos estágios iniciais da hipertensão, o que pode indicar um papel protetor da ECA2 (SANTOS *et al.*, 2005). Além disso, estudos indicam um aumento da expressão de receptores *mas* em animais adultos, enquanto a expressão dos receptores AT₂ é reduzida (ALENINA *et al.*, 2002; DE GASPARO *et al.*, 2000), sugerindo que a ação contra-regulatória exercida pelos receptores AT₂ nas fases iniciais do desenvolvimento é progressivamente substituída pelo eixo ECA2/Ang 1-7/*mas* em fases posteriores. Os resultados do presente estudo

demonstraram que não houve uma alteração significativa na expressão de receptores ECA e ECA2 em LAM de ratas normotensas grávidas e não grávidas. E a administração de L-NAME às ratas grávidas e não grávidas durante o período de 7 dias, correspondentes ao 13^o ao 20^o dias de gestação, não modificou a expressão desses receptores, o que possivelmente esteja relacionado ao curto período de administração do fármaco.

Na PE, a invasão trofoblástica deficiente implica em um mau controle da oxigenação do espaço interviloso na fase inicial da gravidez e na persistência das características primárias das artérias uterinas espiraladas, que mantêm sua elevada resistência. Nesses casos, o sangue banha as vilosidades coriônicas na forma de “jatos intermitentes” e de alta pressão. Assim, o fluxo sanguíneo útero-placentário simula o que acontece em casos de lesão por isquemia-reperusão (BURTON *et al.*, 2009; CINDROVA-DAVIES, 2009). Entre outras alterações, esse tipo de lesão é marcado por produção exagerada de EROS e ERN sempre que as moléculas de oxigênio são reintroduzidas no tecido após o momento isquêmico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo leva a produção placentária de grande quantidade de fatores antiangiogênicos como o sFlt-1 e a s-Eng (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). O sFlt-1 se liga às moléculas de VEGF e PlGF circulantes e impede que esses fatores angiogênicos se liguem aos seus receptores comuns na membrana celular (WANG *et al.*, 2009). Maynard *et al.* (2003) demonstraram que a injeção de sFlt-1 em camundongos grávidas determina hipertensão arterial e proteinúria nesses animais, simulando a expressão clínica da PE. Outros trabalhos mostram que o VEGF é responsável pela manutenção das fenestras do endotélio glomerular e que a presença do sFlt-1 impede a função do VEGF no glomérulo e leva à glomeruloendoteliose e à proteinúria (ESSER *et al.*, 1998). Já foi demonstrada a presença de elevadas concentrações de sFlt-1 no sangue de pacientes com PE e que elevações nos níveis séricos de sFlt-1 podem ser identificadas cerca de 5 semanas antes das manifestações clínicas da PE (LEVINE *et al.*, 2004).

Portanto, as EROs e outros compostos ativos podem estar envolvidos em vários processos biológicos. Um desequilíbrio entre a geração de EROs e proteção antioxidante resulta na biodisponibilidade destas espécies, gerando um estado pró-

oxidante. Este processo favorece a ocorrência de ataques dessas EROs a componentes celulares, principalmente os lipídeos. Desta forma, a peroxidação lipídica provoca dano tecidual, que está relacionado com a patogênese de várias doenças, entre elas a hipertensão e PE.

Nossos resultados mostram um aumento significativo nos níveis de malondialdeído em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta das ratas grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica neste modelo de PE. O aumento da concentração plasmática de marcadores da peroxidação lipídica também foi verificado por Parra *et al.* (2005) e Noyan *et al.* (2006) em amostras de plasma de mulheres com PE.

As EROs também podem levar a destruição de proteínas através da oxidação de grupamentos sulfidril (Halliwell e Gutteridge, 1999). As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EROs, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Nesta perspectiva, nossos resultados mostram um aumento significativo na carbonilação de proteínas em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de animais grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME, caracterizando um aumento na oxidação de proteínas neste modelo de PE.

Acredita-se que haja várias fontes de O_2^- na placenta incluindo a cadeia respiratória mitocondrial (MADAMANCHI *et al.*, 2005), a xantina oxidase (MANY *et al.*, 1996) e a NADPH oxidase (MATSUBARA e SATO, 2001), o que, associado a uma menor atividade enzimática antioxidante observada em nosso estudo, pode estar contribuindo para o aumento do dano oxidativo no modelo de PE.

As enzimas antioxidantes constituem a principal barreira de defesa contra o dano oxidativo. As enzimas antioxidantes mais importantes são a SOD, Catalase e Glutathione Peroxidase. A SOD é o maior sistema de defesa da célula vascular. Ela age catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, já a catalase e a glutathione peroxidase transformam o H_2O_2 em água e oxigênio (CAI, 2005). Aparentemente, tais enzimas do sistema de defesa antioxidante apresentam distinção em sua atividade nos diferentes tecidos estudados, sugerindo uma atividade tecido-específica.

A atividade da enzima antioxidante CAT não apresentou diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais estudados. Por outro lado, em nosso estudo foi verificada uma diminuição significativa na atividade da SOD em amostras de plasma de animais grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME, assim como, em amostras de placenta de animais que receberam L-NAME. Não foi verificada diferença significativa na atividade de tal enzima em amostras de rim e coração dos diferentes grupos experimentais estudados. Foi observada, também uma redução na atividade antioxidante da enzima GPx em amostras de plasma, rim esquerdo, coração e placenta de ratas grávidas e não grávidas que receberam a administração de L-NAME, evidenciando um comprometimento do sistema de defesa antioxidante neste modelo de PE.

Anton *et al.* (2008) demonstraram que os principais componentes do SRA: angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2, NEP, Ang I, Ang II, Ang-(1-7), receptores AT1 e receptores *mas* são encontrados nas vilosidades coriônicas de gestantes normotensas e com PE, de modo que a Ang II é o peptídeo mais predominante no vilo coriônico, possuindo uma concentração duas vezes maior na PE, quando comparado a gestantes normotensas, o que indica que o SRA placentário local pode desempenhar um importante papel na regulação da interface materno-fetal do vilo coriônico. Considerando que a Ang II representa um dos principais estímulos endógenos para a produção de ânion O_2^- na hipertensão (Touyz e Briones, 2011), e que a produção de ânion O_2^- pela placenta está aumentada na PE (MYATT, 2010), acreditamos que ao lado de um sistema antioxidante deficiente, este peptídeo, possa contribuir para o dano oxidativo aumentado no sistema cardiorenal e placenta, observado no modelo de PE. Deste modo, esses dados podem contribuir com o estudo sobre os mecanismos envolvidos na complexa fisiopatologia da PE.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que uma redução na vasodilatação induzida pela Ang II associada a um aumento da vasoconstrição promovida por este peptídeo, assim como, a redução da concentração plasmática de Ang-1-7, que contrapõe os efeitos vasoconstritores da Ang II, sugerem uma contribuição do SRA no desenvolvimento das complicações características da PE observadas no modelo experimental de PE induzido por L-NAME.

Nesta perspectiva, a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas aumentadas, assim como, as atividades enzimáticas antioxidantes reduzidas sugerem a contribuição de uma defesa antioxidante comprometida e um dano oxidativo aumentado para o desenvolvimento da hipertensão e disfunção endotelial, aumento da mortalidade fetal e RCIU observados no modelo de PE estudado.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; EL MASSIERY, A.; QUITTERER, U. Increased AT receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature Medicine*, v. 7, n. 9, p.1003–1009, 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALENINA, N.; BARANOVA, T.; SMIRNOW, E.; BADER, M.; LIPPOLDT, A.; PATKIN, E.; WALTHER T. Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem. Cytochem.*, v. 50, n. 5, p. 691-6, May 2002.

ALEXANDER, B.T.; MILLER, M.T.; KASSAB, S.; NOVAK, J.; RECKELHOFF, J.F.; KRUCKEBERG, W. C.; GRANGER, J. P. Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension*. v. 33, n.1 Pt 2, p. 435–439, 1999.

AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 42, n. 10, p. 1634-50, 2010.

ANDERSON, C.M.; LOPEZ, F.; ZHANG, H.Y.; SHIRASAWA, Y.; PAVLISH, K.; BENOIT, J.N. Mesenteric vascular responsiveness in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 231, n. 8, p. 1398-402, Sep 2006.

ANDREW, P.J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.*, v. 43, p. 521–531, 1999.

ANTON, L.; MERRILL, D.C.; NEVES, L.A.; STOVALL, K.; GALLAGHER, P.E.; DIZ, D.I.; MOOREFIELD, C.; GRUVER, C.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but not angiotensin (1-7) in preeclampsia. *Hypertension.*, v. 51, n. 4, p. 1066-72, Apr 2008.

ANUMBA, D.O.; ROBSON, S.C.; BOYS, R.J.; FORD, G.A. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol.*, v. 277, p. H848–H854, 1999.

ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.C; HAMPL, V.; NELSON, D.P.; SHULTZ, P.J.; WEIR, E.K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 91, p. 7583-7, 1994.

ARIMA, S.; ENDO, Y.; YAOITA, H.; OMATA, K.; OGAWA, S.; TSUNODA, K.; ABE, M.; TAKEUCHI, K.; ABE, K.; ITO, S. Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest.*, v. 100, n. 11, p. 2816-2823, 1997.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* v. 16, p. 42– 47, 2004.

BAHIA, L.; DE AGUIAR, L.G.; VILLELA, N.R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006.

BAKER, P.N.; PIPKIN, F.B.; SYMONDS, E.M. Platelet angiotensin II binding and plasma renin concentration, plasma renin substrate and plasma angiotensin II in human pregnancy. *Clin Sci (Lond)*, v. 79, p. 403–408, 1990.

BALLEJO, G.; BARBOSA, T.A.; COELHO, E.B.; ANTONIALI, C.; SALGADO, M.C. Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. *Life Sci.*, v.70, n. 26, p. 3131-42, May 2002.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.*, v. 32, p. 131-138, 1982.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.

BELLÓ, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. *In: Marroni NP et al. Estresse Oxidativo e Antioxidantes.* Porto Alegre: Editora Ulbra. p.15-19, 2002.

BETTERIDGE, D.J. What Is Oxidative Stress? *Metabolism.*, v. 49, n. 2, Suppl1, p. 3-8, 2000.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

BROSNIHAN, K.B.; LI, P.; FERRARIO, C.M. Angiotensin (1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension.*, v. 27, p.523-528, 1996.

BROSNIHAN, K.B.; NEVES, L.A.A.; CHAPPELL, M.C. Does the angiotensin-converting enzyme (ACE)/ACE2 balance contribute to the fate of angiotensin peptides in programmed hypertension? *Hypertension.*, v. 46, p. 1097-1099, 2005.

BROSNIHAN, K.B.; NEVES, L.A.; ANTON, L.; JOYNER, J.; VALDES, G.; MERRILL, D.C. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol Res.* v.37, n.8, p.1255-62, Aug 2004.

BROWN, M.A.; WANG, J.; WHITWORTH, J.A. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens.*, v.19, p.713–726, 1997.

BURTON, G.J.; CHARNOCK-JONES, D.S.; JAUNIAUX, E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction.*, v.138, n.6, p.895-902, 2009.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.*, v. 87, p. 840–844, 2000.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research.*, v. 68, p. 26–36, 2005.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.*, v. 24, p.261-271, 2003.

CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G.A.; CATZ, S.D.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Letters*, v. 341, n.1, p. 65, 1994.

CHABRASHVILI, T.; TOJO, A.; ONOZATO, M.L.; KITIYAKARA, C.; QUINN, M.T.; FUJITA, T.; WELCH, W.J.; WILCOX, C.S. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension.*, v. 39, p.269 –274, 2002.

CHAMOUX, E.; BREault, L.; LEHOUX, J.G.; GALLO-PAYER, N. Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development. *J Clin Endocrinol Soc.*, v. 84, p. 4722-4730, 1999.

CHAPPELL, M.C.; PIRRO, N.T.; SYKES, A.; FERRARIO, C.M. Metabolism of angiotensin (1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.*, v. 31, n. pt2, p. 362-367, 1998.

CHEN, D.; WANG, H.; HUANG, H.; DONG, M. Vascular endothelial growth factor attenuates N- ω -nitro L-arginina methyl ester induced preeclampsia-like manifestations in rats. *Clinical and experimental hypertension.*, v.30, p. 606-615, 2008.

CHEN, Y.; NAFTILAN, A.J.; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension.* v.19, p.456–463, 1992.

- CINDROVA-DAVIES, T. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia 25. – from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta*, v.30, Suppl A, p.S55-65, 2009.
- COLLISTER, J.P.; HENDEL, M.D. The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J Renin Angioten Aldost Syst.*, v. 4, p.176-179, 2003.
- CONRAD, K.P.; DAVIS, A.K. Nitric oxide synthase activity in placentae from women with pre-eclampsia. *Placenta*.v.16, p.691–699, 1995.
- CONRAD, K.P.; KERCHNER, L.J.; MOSHER, M.D. Plasma and 24-h NO(x) and cGMP during normal pregnancy and preeclampsia in women on a reduced NO(x) diet. *Am J Physiol.*, v. 277, p. F48–F57, 1999.
- COTE, F.; DO, T.H.; LAFLAMME, L.; GALLO, J.M.; GALLO-PAYER, N. Activation of the AT2 receptor of the angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *J Biol Chem.*, v. 274, p. 31686-31692, 1999.
- CRACKOWER, M.A.; SARAO, R.; OUDIT, G.Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S.E.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J.; DA COSTA, J.; ZHANG, L.; PEL, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C.M.; MANOUKIAN, A.S.; CHAPPELL, M.C.; BACKX, P.M.; YAGIL, Y.; PENNINGER, J.M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.*, v. 417, p. 822-828, 2002.
- DAI, D.Z.; DAI, Y. Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Vasc Health Risk Manag.*, v.6, p.787-94, Sep 2010.
- DE GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, I.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T.H. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Res.*, v. 52, p. 415-472, 2000.
- DE OLIVEIRA, L.G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 32, n.12, p.609-16, Dec 2010.
- DECHEND, R.; HOMUTH, V.; WALLUKAT, G.; KREUZER, J.; PARK, J.K.; THEUER, J.; JUEPNER, A.; GULBA, D.C.; MACKMAN, N.; HALLER, H.; LUFT FC. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation.*, v. 101, n. 20, p.2382–2387, 2000.
- DELLI PIZZI, A.M.; HILCHEY, S.D; BELL-QUILLEY, C.P. Natriuretic action of angiotensin (1-7). *Br J Pharmacol.*, v. 111, p. 1-3, 1994.
- FEBRASGO. *Diabete e hipertensão na gravidez: manual de orientação*; Editores: RUDGE, M.V.C.; VASCONCELLOS, M.J.A. São Paulo: Ponto, 2004. 99p.

DILLON, G.A.; VILLA, J.A. *Nitric Oxide and Cardiovas System* (eds. Loscalzo J, Villa J.A). Editora Humana Press. p. 207-226, 2000.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R.E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxipeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Res.* v. 87, p. e1-e9, 2000.

DORUP, I.; SKAJAA, K.; SORENSEN, K. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 276, p. 821-825, 1999.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M.A. Comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med.*, v.15, n.4, p.353-363, 1993.

DULEY L. The global impact of preeclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.*, v.33, p.130-137, 2009.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.*, v. 59, n.4, p.459-69, 2010.

ERDÖS, E.G.; SKIDGEL, R.A. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: Farmer SG, ed. *The Kinin System*. San Diego, CA: Academic; p.111–141, 1997.

ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v. 15, Suppl 6, p.S20-4, 1990.

ESSER, S.; WOLBURG, K.; WOLBURG, H.; BREIER, G.; KURZCHALIA, T.; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol.*, v.140, n. 4, p.947-59, 1998.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biol Med.*, v.11, n.1, p.81-128, 1991.

FARACI, F.M.; DIDION, S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 24, p. 1367–1373, 2004.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.*, v. 12, n.4, p.267-75, 2010.

FELIERS, D.; CHEN, X.; AKIS, N.; *et al.* VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. *Kidney Int.*, v. 68, p. 1648–1659, 2005.

FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I.; JAISWAL, N.; KHOSLA, M.C.; MILSTED, A.; TALLANT, E.A. Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension.*, v.18, p. III126-III133, 1991.

FERRARIO, C.M.; IYER, S.N. Angiotensin (1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept.*; v.78, p. 13-18, 1998.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.*, v.38, n.4, p.499-507, Apr 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Méd.*, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. *Assays of glutathione peroxidase.* In: SIES H. (Ed). *Methods in Enzimology.* New York, Academic. p. 114-121, 1984.

FOUCAUD, L.; GOULAOUIC, S.; BENNASROUNE, A.; LAVAL-GILLY, P.; BROWN, D.; STONE, V.; FALLA, J. Oxidative stress induction by nanoparticles in THP-1 cells with 4-HNE production: stress biomarker or oxidative stress signalling molecule? *Toxicol In Vitro.*, v.24, n.6, p.1512-20, Sep 2010.

FRAGA-SILVA, R.A.; PINHEIRO, S.V.B.; GONÇALVES, A.C.C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R.A.S. The antithrombotic effect of angiotensin 1-7 involves Mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.*, v. 14, n.1-2, p. 28-35, 2008.

FRAGA-SILVA, R.A.; SORG, B.S.; WANKHEDE, M.; DEUGD, C. *et al.* ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Mol Med.*, v.16, p. 210-215, 2010.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* v. 288, n. 5789, p.373-6, 1980.

FURCHGOTT, R.F. The role of the endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, v. 24, p.175-97, 1984.

FURUYA, M.; KURUSAWA, K.; NAGAHAMA, K.; KAWACHI, K.; NOZAWA, A. TAKAHASHI, T.; AOKI, I. Disrupted balance of angiogenic and antiangiogenic signalings in preeclampsia. *J Pregnancy.*, v. 2011, p.123717, 2011.

GALLINAT, S.; BURCHE, S.; SCHUTZE, S.; KRONKE, M.; UNGER, T. AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett.*, v.443, p. 75-79, 1999.

GENDRON, L.; LAFLAMME, L.; RIVARD, N.; ASSELIN, C.; PAYET, M.D.; GALLO-PAYET, N. Signals from the AT₂ receptor of angiotensin II inhibit p21^{ras} and activate MAPK to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells. *Mol Endocrinol.*, v. 13, p. 1615-1626, 1999.

GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A.C.; BURTON, G.J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*. v.23, n.1, p. 3 e19, 2002.

GERBER, R.T.; ANWAR, M.A.; POSTON, L. Enhanced acetylcholine induced relaxation in small mesenteric arteries from pregnant rats: an important role for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). *Br J Pharmacol.*, v.125, n.3, p.455-60, Oct 1998.

GILBERT, J.S.; RYAN, M.J.; LAMARCA, B.B.; SEDEEK, M.; MURPHY, S.R.; GRANGER, J.P. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 294, p.541-550, 2008.

GILLHAM, J.C.; KENNY, L.C.; BAKER, P.N. An overview of endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF) in normal and compromised pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v.109, n.1, p.2-7, Jul 2003.

GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G.; LIND, J.; MERÉNYI, G. Tyrosine Nitration by Simultaneous Generation of NO and O₂ under Physiological Conditions – How the radicals do the job. *The Journal or Biological Chemistry.*, v. 275, n.5, p. 3031–3036, 2000.

GORELIK, G.; CARBINI, L.A.; SCICLI, A.G. Angiotensin (1-7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 286, p. 403-410, 1998.

GRANGER, J.P.; ALEXANDER, B.T.; LLINAS, M.T.; BENNETT, W.A.; KHALIL, R.A. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension.*, v.38, p.718–722, 2001.

GRECO, A.J.; MASTER, R.G.; FOKIN, J.R.A; BABER, S.R.; KADOWITZ, P.J. Angiotensin 1-7 potentiates responses to bradykinin but does not change responses to angiotensin I. *Can J Physiol Pharmacol.*, v. 84, n.11, p.1163-1175.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S. Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.*, v.126, p.131-138, 1982.

GROSSMAN, E. Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? *Diabetes Care.* v. 31, n. Suppl2, p.S185–S189, 2008.

- GUPTA, S.; AGARWAL, A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Survey.*, v.62, p.335–47, 2007.
- HADDY, F.J.; EMERSON, T.E. JR.; SCOTT, J.B.; DAUGHERTY, R.M. JR. *The effect of kinins on the cardiovascular system*. In: Ersod EG, ed. Bradykinin, kallidin and kallikrein (Handbook of experimental pharmacology; vol 25). Berlin: Springer-Verlag, p. 362- 384, 1970.
- HALLER, H.; HEMPEL, A.; HOMUTH, V., *et al.* Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet.*, v.351, p. 945–949, 1998.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition.*, v.57, n. suppl, p.715S-725S, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). Oxford University Press. 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, v.186, p.1-85, 1990.
- HAMILTON, C.A.; BROSNAN, J.; AL-BENNA, S.; BERG, G.; DOMINICZAK, A.F. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension.*, v. 40, p.755-762, 2002.
- HANCOCK, J.T.; DESIKAN, R.; NEIL, S.J. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemical Society Transactions.*, v. 29, n. 2, p. 345-350, 2001.
- HANSSON, L.; LINDHOLN, L.H.; NISKANEN, L.; LANKE, J.; HEDNER, T.; NIKLASON, A.; LUOMANMAKI, K.; DAHLOF, B.; DE FAIRE, U.; MORLIN, C.; KARLBERG, B.E.; WESTER, P.O.; BJORCK, J.E. Effect of angiotensin converting – enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet.*, v. 353, n. 9153, p.611-616, 1999.
- HARRISON, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.*, p. 2153-2157, 1997.
- HECK, D.E.; SHAKARJIAN, M.; KIM, H.D.; LASKIN, J.D.; VETRANO, A.M. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1203, p.120-125, 2010.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.*, v. 26, p. 277-85, 1989.
- HIGASHI, Y.; NOMA, K.; YOSHIZUMI, M.; KIHARA, Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J.*, v. 73, p. 411 – 418, 2009.

HISAMOTO, K.; MASAHIDE, O.; KURACHI, H.; HAYAKAWA, J.; KANDA, Y.; NISHIO, Y.; ADACHI, K.; TAsAKA, K.; MIYOSHI, E.; FUJIWARA, N.; TANIGUCHI, N.; MURATA, Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.*, v. 276, n.5, p. 3459-3467, 2001.

HONDA, H.; KANEKO, H.; KONDO, M.; KOGO, H. Comparison of endothelium-derived relaxing factor activity between nonpregnant and pregnant rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, v. 114, n.3, p.193-6, Jul 1996.

HONG, H.J.; HSIAO, G.; CHENG, T.H.; YEN, M.H. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.*, v.38, n.5, p.1044-8, 2001.

HUNSAIN, A. The chymase angiotensin system in humans. Editorial review. *J Hypert.*, v.11, p. 1155-1159, 1993.

HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.*, v. 51, p.970-75, 2008.

ICHIKI, T.; KAMBAYASHI, Y.; INAGAMI, T. Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type 2 receptor in R3T3 cells. *Cir Res.*, v. 77, p. 1070-1076, 1995.

IGNARRO, L.J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transductions mechanism. *Biochem Soc Trans.*, v. 20, p.465-9, 1992.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 84, n.24, p.9265-9269, 1987.

ISHIDA, H.; SCICLI, A.G.; CARRETERO, O.A. Contributions of various rat plasma peptidases to kinin hydrolysis. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 251, n.3, p.817-20, Dec 1989.

ITO, M.; OLIVERIO, M.I.; MANNON, P.J.; BEST, C.F.; MAEDA, N.; SMITHIES, O.; COFFMAN, T.M. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 92, n.8, p. 3521-3525, 1995.

IYER, S.N.; AVERILL, D.B.; CHAPPEL, M.C.; YAMADA, K.; ALLRED, A.J.; FERRARIO, C.M. Contribution of Angiotensin 1-7 to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension.*, v.36, n.3, p. 417-422, 2000a.

IYER, S.N.; FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C. Angiotensin (1-7): an update. *Reg Pept.*, v. 91, p. 45-62, 2000b.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.*, v. 289, p.130-6, 1991.

KARUMANCHI, S.A.; MAYNARD, S.E.; STILLMAN, I.E.; EPSTEIN, F.H.; SUKHATME, V.P. Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int.* v.67, n.6, p.2101-13, Jun 2005.

KATADA, J.; MAJIMA, M. AT2 receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol.*, v.136, p.484-491, 2002.

KHONG, T.Y.; DE WOLF, F.; ROBERTSON, W.B.; BROSENS, I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.*, v. 93, n.10, p. 1049-59, Oct 1986.

KOJO, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem.*, v. 11, n.8, p.1041-64, Apr 2004.

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.*, v.4, p.181-9, 2004.

LANDMESSER, U.; HARRISON, D.G. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coronary Artery Disease.*, v.12, p. 455-461, 2001.

LARA, L.S.; BICA, R.B.; SENA, S.L.; CORREA, J.S.; MARQUES-FERNANDES, M.F.; LOPES, A.G.; CARUSO-NEVES, C. Angiotensin (1-7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na (+)-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. *Regul Pept.*, v. 103, n.1, p. 17-22, 2002.

LEARMONT, J.G.; COCKELL, A.P.; KNOCK, G.A.; POSTON, L. Myogenic and flow-mediated responses in isolated mesenteric small arteries from pregnant and nonpregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.*, v.174, n.5, p.1631-6, May 1996.

LEVINE, R.J.; MAYNARD, S.E.; QIAN, C.; LIM, K.H.; ENGLAND, L.J.; YU, K.F.; *et al.* Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.*, v.350, n.7, p.672-83, 2004.

LEVINE, R.J.; LAM, C.; QIAN, C.; YU, K.F.; MAYNARD, S.E.; SACHS, B.P.; SIBAI, B.M.; EPSTEIN, F.H.; ROMERO, R.; THADHANI, R.; KARUMANCHI, S.A.; CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006 Sep 7;355(10):992-1005. *Erratum in: N Engl J Med.*, v. 355, n.17, p.1840, Oct 2006.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.*, v.186, p. 464-478, 1990.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet.*, v. 360, p.1903–13, 2002.

LI, H.; WITTE, K.; AUGUST, M.; BRAUSCH, I.; GÖDTEL-ARMBRUST, U.; HABERMEIER, A.; CLOSS, E.I.; OELZE, M.; MÜNDEL, T.; FÖRSTERMANN, U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.*, v.47, n.12, p.2536-44, 2006.

LI, P.; CAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Angiotensin 1-7 augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension.*, v. 29, p. 394-400, 1997.

LIMA, C.V.; PAULA, R.D.; RESENDE, F.L.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. Potentiation of hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin 1-7 in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.*, v. 30, p. 542-548, 1997.

LINDHEIMER, M.D.; CUNNINGHAM, F.G. Hypertension in pregnancy. *J Am Soc Hypertens.*, v.2, p.484-494, 2008.

LOUKIDES, S.; BAKAKOS, P.; KOSTIKAS, K. Oxidative stress in patients with COPD. *Curr Drug Targets.*, v.12, n.4, p. 469-477, 2011.

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.25, n.1, p.29–38, 2005.

MADAZLI, R.; BENIAN, A.; AYDIN, S.; UZUN, H. TOLUN, N. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol.*, v.22, p.477–480, 2002.

MALASSINE, A.; FRENDON, J.L.; EVAÏN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update.*, v.9, n.6, p.531e9, 2003.

MALINSKI, T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol.*, v.96, n.Suppl 1, p.13-24, 2005.

MANY, A.; WESTERHAUSEN-LARSON, A.; KANBOUR-SHAKIR, A.; ROBERTS, J.M. Xanthine oxidase/dehydrogenase is present in human placenta. *Placenta.*, v.17, n. 5–6, p.361–5, 1996.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phase of rats some helpful -614 considerations. *Braz J Biol.*, v. 62, n.4A, p. 609, 2002.

MATSUBARA, S.; SATO, I. Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy. *Histochem Cell Biol.*, v.116, n.1, p.1–7, 2001.

MAYNARD, S.E.; MIN, J.Y.; MERCHAN, J.; LIM, K.H.; LI, J.; MONDAL, S., *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.*, v.111, n.5, p.649-58, 2003.

MC CARTHY, F.P.; KINGDOM, J.C.; KENNY, L.C.; WALSH, S.K. Animal models of preeclampsia: uses and limitations. *Placenta.*, v.32, n.6, p.413-9, Jun2011.

MC GREGOR, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.*, v. 177, p.21-30, 1965.

MEFFERT, S.; STOLL, M.; STECKELINGS, U.M.; BOTTARI, S.P.; UNGER, T. The angiotensin AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 122, p. 59-67, 1996.

MELO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J.*, v. 218, p. 273-275, 1983.

MERRILL, D.C.; KAROLY, M.; CHEN, K.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Angiotensin-(1–7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine.*, v. 18, p.239–245, 2002.

MIZUTANI, S.; TOMODA, Y. Effects of placental proteases on maternal and fetal blood pressure in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens.*, v. 9, n.6, p.591–597, 1996.

MOHAUPT, M. Molecular aspects of preeclampsia. *Mol Aspects Med.*, v. 28, n.2, p.169-91, Apr 2007.

MOLLER, P.; LOFT, S. Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. *Environ Health Perspect.*, v.118, n.8, p.1126-36, Apr 2010.

MOLNAR, M.; SUTO, T.; TOTH, T.; HERTELENDY, F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.*, v.170, n.5 Pt 1, p.1458-66, 1994.

MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; MIYAZAKI, M.; OGIHARA, T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension.*, v.19, n.2 Suppl, p. II62-II67, 1992.

MULVANY, M.J. Abnormalities of resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. *Pharmacol Rep.*, v. 57, n.Suppl, p.144–150, 2005.

MUTLU-TURKOGLU, U.; AYKAC-TOKER, G.; IBRAHIMOGLU, L.; ADEMOGLU, E.; UYSAL, M. Plasma nitric oxide metabolites and lipid peroxide levels in preeclamptic pregnant women before and after delivery. *Gynecol Obstet Invest.*, v.48, p.247–250, 1999.

MYATT, L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta.*, v.31, n. Suppl, p.S66-9, Mar 2010.

NAGANO, T. Bioimaging probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species. *J Clin Biochem Nutr.*, v. 45, p. 111–124, 2009.

NAKAJIMA, M.; HUTCHINSON, H.G.; FUJINAGA, M.; HAYASHIDA, W.; MORISHITA, R.; ZHANG, L.; HORICHI, M.; PRATT, R.; DZAU, V.J. The angiotensin II (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor. Gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Sci USA.*, v. 92, p. 10663-10667, 1995.

NELSON, S.H.; STEINSLAND, O.S.; WANG, Y.; YALLAMPALLI, C.; DONG, Y.L.; SANCHEZ, J.M. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res.*, v.87, p.406–411, 2000.

NERI, I.; JASONNI, V.M.; GORI, G.F.; *et al.* Effect of L-arginine on blood pressure in pregnancy-induced hypertension: a randomized placebo-controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, v.19, p.277–281, 2006.

NEVES, L.A.; WILLIAMS, A.F.; AVERILL, D.B.; FERRARIO, C.M.; WALKUP, M.P.; BROSNIHAN, K.B. Pregnancy enhances the angiotensin (Ang)-(1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of Ang-(1-7). *Endocrinology.*, v.144, n.8, p. 3338-3343, 2003.

NOYAN, T.; GÜLER, A.; SEKEROĞLU, M.R.; KAMACI, M. Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in pre-eclampsia and eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, v.46, n.6, p.486-91, Dec 2006.

OELKERS, W.K.H. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids.*, v. 61, p. 166-171, 1996.

OEMAR, B.S.; TSCHUDI, M.R.; GODOY, N.; BROYKOVICH, V.; MALINSKI, T.; LÜSCHER, T.F. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.*, v. 97, n.25, p.2494-8, 1998.

OGNIBENE, D.T.; OLIVEIRA, P.R.; MARINS DE CARVALHO, L.R.; COSTA, C.A.; ESPINOZA, L.A.; CRIDDLE, D.N.; TANO, T.; SOARES DE MOURA, R.; RESENDE, A.C. Angiotensin II-mediated vasodilation is reduced in adult spontaneously

hypertensive rats despite enhanced expression of AT₂ receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v. 36, p. 12-19, 2009.

OGNIBENE, D.T.; CARVALHO, L.C.; COSTA, C.A.; ROCHA, A.P.; DE MOURA, R.S.; CASTRO RESENDE, A. Role of Renin-Angiotensin System and Oxidative Status on the Maternal Cardiovascular Regulation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.*, v.25, n.4, p. 498-504, Apr 2012.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.*, v.333, p.664-6, 1988.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MENDONÇA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.*, v. 327, n.6122, p.524-6, 1987.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension - Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.*, v.31, n.2, p. 170S-180S, 2008.

PARENT, A.; ST-LOUIS, J.; SCHIFFRIN, E.L. Vascular effects of bradykinin and sodium nitropruside during pregnancy in the rat. *Clin. Exp. Hypert. In Pregnancy.*, v.B8, p.561-582, 1989.

PARRA, M.; RODRIGO, R.; BARJA, P.; BOSCO, C.; FERNÁNDEZ, V.; MUÑOZ, H.; SOTO-CHACÓN, E. Screening test for preeclampsia through assessment of uteroplacental blood flow and biochemical markers of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol.*, v.193, n.4, p.1486–1491, 2005.

PASCOAL, I.F.; LINDHEIMER, M.D.; NALBANTIAN-BRANDT, C.; UMANS, J.G. Contraction and endothelium-dependent relaxation in mesenteric microvessels from pregnant rats. *Am J Physiol.*, v.269, n.6 Pt 2, p.H1899-904, Dec 1995.

POLIZIO, A.H.; GIRONACCI, M.M.; TOMARO, M.L.; PEÑA, C. Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. *Pharmacol Res.*, v.56, n.1, p.86-90, Jul 2007.

POPE, A.J.; KARUPPIAH, K.; KEARNS, P.N.; XIA, Y.; CARDOUNEAL, A.J. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. *The Journal of Biological Chemistry.* 33 p. Disponível em: <<http://www.jbc.org>>. Acesso em 16 de outubro de 2009.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls - The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.*, v. 266, p.4244-50, 1990.

RAJENDRAN, S.; CHIRCOV, Y.Y.; CAMPBELL, D.J.; HOROWITZ, J.D. Angiotensin 1-7 enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v.46, n.4, p. 459-463, 2005.

RAMACHANDRAN, A.; LEVONEN, A.L.; BROOKES, P.S.; CEASER, E.; SHIVA, S.; BARONE, M.C.; DARLEY-USMAR, V. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Rad Biol Med.*, v. 33, n.11, p.1465-34, 2002.

RAMESAR, S.V.; MACKRAJ, I.; GATHIRAM, P.; MOODLEY, J. Sildenafil citrate improves fetal outcomes in pregnant, L-NAME treated, Sprague-Dawley rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v.149, n.1, p.22-6, 2010.

RAO, G.N.; BERK, B.C. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.*, v. 70, p. 593-599, 1992.

RAPOPPORT, R.M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.*, v.9, n.4-5, p.281-296, 1983.

REDDY, A.; SURI, S.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W.; MUTTUKRISHNA, S. Maternal circulating levels of activin A, inhibin A, sFlt-1 and endoglin at parturition in normal pregnancy and pre-eclampsia. *PLoS One.*, v.4, n.2, p.e4453.

REDMAN, C.W.; SACKS, G.P.; SARGENT, I.L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response a pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, v.180, p.499-506, 1999.

REID, M.B. Of balance and unbalance. *J Appl Physiol.*, v.101, n.4, p.1011-2, Oct 2006.

REMACLE, J.; LAMBERT, D.; RAES, M.; PIGEOLET, E.; MICHIELS, C.; TOUSSAINT, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability - Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem J.*, v.286, p. 41-46, 1992.

RENTZSCH, B.; TODIRAS, M.; ILIEUSCU, R.; POPOVA, E.; CAMPOS, L.A.; OLIVEIRA, M.L.; BALTATU, O.C.; SANTOS, R.A.S.; BADER, M. Transgenic ACE2 overexpression in vessels of SHR-SP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension.*, v. 52950, p. 967-973, 2008.

RESENDE, A.C.; BALLEJO, G.; LEITE, R.; SALGADO, C.O.M. Role of NO-dependent mechanisms in bradykinin-induced vasodilation in the rat mesenteric bed. *Pharmacol Rev Commun.*, v. 9, p. 269-78, 1997.

RESENDE, A.C.; BALLEJO, G.; SALGADO, M.C. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation. *Braz J Med Biol Res.*, v.31, p.1229 –1235, 1998.

- RESENDE, A.C.; PIMENTEL, A.M.; DE MOURA, R.S. Captopril reverses the reduced vasodilator response to bradykinin in hypertensive pregnant rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v.31, n.11, p.756-61, Nov 2004.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J.*, v.21, n.3, p. 133-149, 2005.
- ROBERTS, J.M.; COOPER, D.W. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet.*, v. 357, p.53–56, 2001.
- ROBERTS, J.M.; TAYLOR, R.N.; MUSCI, T.J.; RODGERS, G.M.; HUBEL, C.A.; MCLAUGHLIN, M.K. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol.*, v.161, p.1200–1204, 1989.
- ROBSON, S.C.; HUNTER, S.; BOYS, R.J.; DUNLOP, W. Hemodynamic changes during twin pregnancy. A Doppler and M-mode echocardiographic study. *Am J Obstet Gynecol.*, v.161, n.5, p.1273-8, Nov 1989.
- ROMERO, R.; NIEN, J.K.; ESPINOZA, J.; TODEM, D.; FU, W.; CHUNG, H.; KUSANOVIC, J.P.; GOTSCH, F.; EREZ, O.; MAZAKI-TOVI, S.; GOMEZ, R.; EDWIN, S.; CHAIWORAPONGSA, T.; LEVINE, R.J.; KARUMANCHI, S.A. 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. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, v.21, n.1, p.9-23, Jan 2008.
- ROQUES, B.P.; NOBLE, F.; DAUGE´, V.; FOURNIE´-ZALUSKI, M-C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.*, v.45, p.87–146, 1993.
- RUI-QUIONG, MA; MIN-NA, SUN; ZI, YANG. Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestacionam stage on feto-placental outcomes in a mouse model. *Chinese Medical Journal.*, v.123, n.6, p.707-712, 2010.
- SALAS, S.P.; ALTERMATT, F.; CAMPOS, M.; GIACAMAN, A.; ROSSO, P. Effects of long-term nitric oxide synthesis inhibition on plasma volume expansion and fetal growth in the pregnant rat. *Hypertension.*, v. 26, n.6 Pt 2, p.1019-23, 1995.
- SAMPAIO, W.O.; HENRIQUE DE CASTRO, C; SANTOS, R.A.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension.*, v.50, n.6, p.1093-8, Dec 2007.
- SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.; SAMPAIO, W.O.; TOUYZ, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets

for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.*, v. 14, n.8, p. 1019-1031, 2005.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; SIMÕES E SILVA, A.C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme2-angiotensin 1-7-Mas axis. *Exp Physiol.*, v. 93, p. 519-527, 2008.

SANTOS, R.A.S; SIMOES E SIVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.R.; MACHADO, R.P.; BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S.V.B.; LOPES, M.T.; BADER, M.; MENDES, E.P.; LEMOS, V.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SCHULTHEISS, H.P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 100, p. 8258-8263, 2003.

SCHEUER, D.A.; PERRONE, M.H. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol.*, v. 264, p. R917-923, 1993.

SCHIESSL, B.; STRASBURGER, C.; BIDLINGMAIER, M.; MYLONAS, I.; JESCHKE, U.; KAINER, F; FRIESE, K. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.*, v.274, n.3, p.150–154, 2006.

SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med.*, v.118, p. 7-16, 1991.

SCOTT-BURDEN, T.; RESINK, T.J.; HAHN, A.W.; VANHOUTTE, P.M. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* v.17, n.Suppl 7, p.S96-100, 1991.

SEDEEK, M.; HÉBERT, R.L.; KENNEDY, C.R.; BURNS, K.D.; TOUYZ, R.M. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.*, v.18, p.122–127, 2009.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry.*, v. 18, p. 567–579, 2007.

SHIBATA, E.; RAJAKUMAR, A.; POWERS, R.W.; LARKIN, R.W.; GILMOUR, C.; BODNAR, L.M.; CROMBLEHOLME, W.R.; NESS, R.B.; ROBERTS, J.M.; HUBEL, C.A. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.90, n.8, p.4895-903, Aug 2005.

SHIMOKAWA, H.; MATOBA, T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacological Research.*, v. 49, p. 543–549, 2004.

SIBAI, B.M.; BARTON, J.R. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: patient selection treatment and delivery indications. *Am J Obstet Gynecol.*, v.196, n.6, p.514-19, 2007.

SIBAI, B.M.; CARITIS, S.; HAUTH, J. What we have learned about preeclampsia. *Sem Perinatol.*, v.27, p.239-46, 2003.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINEC, M. Pre-eclampsia. *Lancet.*, v.365, n.9461, p.785-99, Mar 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry.*, v.215, n.2, p. 213-219, 1993.

SIKKEMA, J.M.; VAN RIJN, B.B.; FRANX, A.; BRUINSE, H.W.; DE ROOS, R.; STROES, E.S., *et al.* Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. *Placenta.*, v.22, p.304–308, 2001.

SIVIERI, D.O. JR.; BISPO-DA-SILVA, L.B.; OLIVEIRA, E.B.; RESENDE, A.C.; SALGADO, M.C. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. *Hypertension.* v.50, n.1, p.110-5, 2007.

SKEGGS, L. JR. *Historical overview of the renin-angiotensin system.* In: Hypertension and the angiotensin system: Therapeutic Approachs. New York (Doyle AE and Bearn AG eds) Raven. Press. p. 31-45, 1984.

SKIDGEL, R.A.; DAVIS, R.M.; TAN, F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membrane-bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones. *J Biol Chem.*, v.264, p.2236 –2241, 1989.

SKIDGEL, R.A. Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v.20, n. Suppl 9, p.S4 –S9, 1992.

SOARES DE MOURA, R.; RESENDE, A.C.; EMILIANO, A.F.; TANO, T.; MENDES-RIBEIRO, A.C.; CORREIA, M.L.; DE CARVALHO, L.C. The role of bradykinin, AT₂ and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol.*, v.141, n.5, p. 860-866, 2004.

SOARES DE MOURA, R.; RESENDE, A.C.; MOURA, A.S.; MARADEI, M.F. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertension in Pregnancy.*, v.26, p. 89-100, 2007.

SOARES DE MOURA, R.; SILVA, G.A.; TANO, T.; RESENDE, A.C. Effect of propofol on human fetal placental circulation. *Int J Obstet Anesth.*, v.19, n.1, p.71-6, Jan 2010.

SOARES, V.M.N.; SOUZA, K.V.; FREYGANG, T.C.; CORREA, V.; SAITO, M.R. Mortalidade materna por pré-eclâmpsia/eclâmpsia em um estado do Sul do Brasil. *Ver Bras Ginecol Obstet.*, v. 31, p.566-73, 2009.

SONNENBURG, W.K.; BEAVO, J.A. Cyclic GMP and a regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol.*, v. 26, p.87-114, 1994.

SOTOMAYOR, M.A.; PEREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M.D.; MARHUENDA, E. Effects of chronic treatment with simvastatin on endotelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, v.17, p.769-779, 1999.

STANKEVICIUS, E.; KEVEKAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina.*, v.39, n.4, p.333-341, 2003.

STENNETT, A.K.; QIAO, X.; FALONE, A.E.; KOLEDOROV, V.V.; KHALIL, R.A. Increased vascular angiotensin type II receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 296, n.3, p. H745-H755, 2009.

STOLL, M.; STECKELINGS, U.M.; PAUL, M.; BOTTARI, S.P.; METZGER, R.; UNGER, T. The angiotensin AT2 receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.*, v.95, p.651-657, 1995.

STROTH, U.; UNGER, T. The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v. 33, n. Suppl, p. S21-28, 1999.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors.*, v.3, p.276-284, 2003.

SUZUKI, H.; SWEI, A.; ZWEIFACH, B.W.; SCHIMID-SCHONBEIN, G.W. In vitro evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension.*, v. 25, p. 1083- 1089, 1995.

TADDEI, S.; VIEDIS, A.A.; MATTEI, P.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Deffective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation.*, v.84, p.1298-1303, 1996.

TEDOLDI, C. L. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia para Gravidez na Mulher Portadora de Cardiopatia. *Arq Bras Cardiol.*, v.93,n. 6 supl.1, p. e110-e178, 2009.

TEWKSBURY, D.A. *Angiotensinogen – biochemistry and molecular biology*. In: Laragh, JH.; Brenner, BM., editors. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York, NY: Raven Press; p. 1197-1216, 1990.

THORNTON, J.G.; ONWUDE, J.L. Convulsions in pregnancy in related gorillas. *Am J Obstet Gynecol.*, v.167, n.1, p.240-1, 1992.

TIPNIS, S.R.; HOOPER, N.M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G. TURNER, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxipeptidase. *J Biol Chem.*, v. 275, p. 33238-33243, 2000.

TOUYZ, R.; BRIONES, A.M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Res.*, v.34, p.5-14, 2011.

TOUYZ, R.M. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, v.12, p.165–174, 2003.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v.37, p.1263-1273., 2004.

TSUKIMORI, K.; YOSHITOMI, T.; MOROKUMA, S.; FUKUSHIMA, K.; WAKE, N. Serum uric acid levels correlate with plasma hydrogen peroxide and protein carbonyl levels in preeclampsia. *Am J Hypertens.*, v. 21, p.1343–1346, 2008.

TSUZUKI, S.; MATOBA, T.; EGUCHI, S.; INAGAMI, T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension.*, v. 28, p.916-918, 1996.

TURNER, J.A. Diagnosis and management of preeclampsia: an update. *International Journal of Women Health.*; v. 2, p.327-337, 2010.

UNGER, T.; CHUNG, O.; CSIKOS, T.; CULMAN, J.; GALLINAY, S.; GOHLKE, P.J. Angiotensin receptors. *J Hypertension.*, v. 14, n. Suppl, p. S95-103, 1996.

VALDES, G.; KAUFMANN, P.; CORTHORN, J.; ERICES, R.; BROSNIHAN, K.B.; JOYNER-GRANTHAM, J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.*, v.7, p.79, Jul 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, v.39, p.44-84, 2007.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial Dysfunction - The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. *Circ J.*, v.73, p.595 – 601, 2009.

VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B.S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD, K.A.Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci.*, v.95, p.9220–9225, 1998.

VAZIRI, N.D.; NI, Z.; OVEISI, F.; TRNAVSKY-HOBBS, D.L. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension.*, v.36, p.957–964, 2000.

VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol.*, v. 95, n. 1 Suppl, p.1-51, 2010.

VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; DICK, L.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A.; TUMMINO, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme –related carboxipeptidase. *J Biol Chem.*, v. 277, p.14838-14843, 2002.

WALDMAN, S.A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.*, v.39, p.163-208, 1987.

WALLUKAT, G.; HOMUTH, V.; FISCHER, T., *et al.* Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT receptor. *Journal of Clinical Investigation.*, v.103, n.7, p.945–952, 1999.

WANG, A.; RANA, S.; KARUMANCHI, S.A. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda).*, v.24, p.147-58, Jun 2009.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.*, v. 44, p. 381–386, 2004.

WEINER, C.P.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, v.171, p. 838-843, 1994a.

WEINER, C.P.; LIZASOAIN, I.; BAYLIS, S.A.; LNOWLES, R.G.; CHARLES, I.G.; MONCADA, S. Induction of calcium dependent nitric oxide synthase by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 91, p. 5212-5216, 1994b.

WELCH, W.J. Angiotensin II-dependent superoxide: Efectos on hypertension and vascular disfunction. *Hypertension.*, v. 52, p. 51-56, 2008.

WIDDER, J.D.; GUZIK, T.J.; MUELLER, C.F.; CLEMPUS, R.E.; SCHIMIDT, H.H.; DIKALOV, S.I.; GRIENDLING, K.K.; JONES, D.P.; HARRISON, D.G. Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 27, p.762–768, 2007.

WOLF, D.; ZIYADEH, F.N.; HELMCHEN, U.; ZAHNER, G.; SCHROEDER, R.; STAHL, R.A. ANG II is a mitogen for a murine cell line isolated from medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol.*, v. 268, n.5 Pt 2, n. F940-947, 1995.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews.*, v. 74, n.1, p. 139-162, 1994.

ZALBA, G.; SAN JOSE, G.; MORENO, M.U.; FORTUNO, M.A.; BEAUMONT, F.J.; DIEZ, J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.*, v. 38, p. 1395–1399, 2001.

ZHENG, J.; BIRD, I.M.; CHEN, D.B.; MAGNESS, R.R. angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial functions: interactions with nitric oxide. *Journal of Physiology.*, v. 565, n.1, p. 59–69, 2005.

ZHOU, Y.; FISHER, S.J.; JANATPOUR, M.; GENBACEV, O.; DEJANA, E.; WHEELOCK, M.; DAMSKY, C.H. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.*, v.99, n.9, p.2139-51, May 1997.