

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Ricardo Barbelli Feitosa

**Papel do endotélio na reatividade vascular de ratas com
hipertensão espontânea ao término da gestação**

Ribeirão Preto – São Paulo
2006

Ricardo Barbelli Feitosa

Papel do endotélio na reatividade vascular de ratas com hipertensão espontânea ao término da gestação

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Ginecologia e Obstetrícia do Curso de Pós-Graduação da FMRP- USP.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof^a. Dra Maria Cristina O. Salgado

Ribeirão Preto – São Paulo

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Feitosa, Ricardo Barbelli

O papel do endotélio vascular na reatividade vascular de aortas isoladas de ratas shr ao término da gestação/ Feitosa, Ricardo Barbelli; Orientador: Prof^a. Dra Maria Cristina O. Salgado.

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP- USP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação esquemática da invasão placentária.	4
Figura 2 Pressão arterial média de ratas em estro no 19-20 ^o dia de gravidez.	20
Figura 3. Registro típico da resposta vasoconstritora induzida pela adição de fenilefrina em anel de aorta a diferentes tensões passivas basais.	21
Figura 4. Resposta vasoconstritora a fenilefrina (10^{-7} M) nas diferentes tensões passivas em anéis de aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) de ratas grávidas e em estro.	22
Figura 5. Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em anéis de aorta isolada de ratas grávidas e em estro e pré-contraídos com fenilefrina.	23
Figura 6. Registro típico do efeito da fenilefrina administrada de forma em anéis de aorta isolada de rata em estro.	24
FIGURA 7. Curvas concentração-efeito induzido por fenilefrina (10^{-9} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isolada de ratas grávidas e em estro que tiveram o endotélio preservado ou removido	25
Figura 8 – Efeito da acetilcolina em aorta pré-contraída com fenilefrina ou na presença de Nitro-L-Arginina somente ou em combinação com diclofenaco (10 μ M) em preparações com endotélio (A) ou sem endotélio (B) obtidas de ratos machos com hipertensão espontânea.	26
FIGURA 9. Efeito contrátil induzido por acetilcolina na presença de L- Nitro-L-Arginina em anéis de aorta de ratas em estro e grávidas com e sem endotélio.	27

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

FEITOSA, R.B. **Papel do endotélio na reatividade vascular de ratas com hipertensão espontânea ao término da gestação.** 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A gravidez normal está associada a alterações hemodinâmicas como o aumento gradual do volume sanguíneo e o decréscimo da pressão arterial. Tal fato ocorre devido à diminuição da resistência periférica pelo “shunt” placentário e pela diminuição da resposta vasoconstritora nos diferentes territórios vasculares. Este fenômeno é atribuído a uma modulação mediada pelo endotélio vascular. Em circunstâncias patológicas a diminuição da resistência vascular não ocorre, propiciando o aparecimento das síndromes hipertensivas gestacionais.

Avaliamos as alterações da função endotelial ao término da gravidez de ratas espontaneamente hipertensas utilizando anéis de aorta na presença e ausência do endotélio vascular. A pressão arterial média no grupo das grávidas (G, 19^o-20^o dias de gestação) se mostrou marcadamente menor (114±5 mmHg) quando comparadas à de não grávidas na fase estro do ciclo estral (NG, 164±3 mmHg). As respostas constritoras a uma concentração fixa de fenilefrina (FE, 10⁻⁷ M) a diferentes tensões passivas iniciais (0,25 a 2 g) a que o anel de aorta foi submetido foram dependentes do aumento do estiramento do tecido em G e NG e mostraram comportamento semelhante. A adição de concentrações cumulativas de FE em anéis de aorta de G e NG submetidos à tensão passiva de 2,0 g não demonstrou hiporeatividade associada à gestação, diferentemente do que ocorre nas ratas normotensas. No entanto, em aorta sem endotélio, as respostas de G foram menores que as de NG. Na presença de inibidor de sintase de NO, acetilcolina

induziu respostas constritoras significativamente maiores em aorta com endotélio de G que em NG, cuja diferença era abolida pela remoção do endotélio.

Os resultados sugerem que em anéis de aorta de ratas espontaneamente hipertensas não há hiporeatividade à FE ao término da gestação, que só aparece após a remoção do endotélio, sugerindo a participação de fatores contráteis derivados do endotélio associado à gravidez em ratas com hipertensão espontânea.

Palavras-chave: Reatividade vascular. Gravidez. Óxido Nítrico. SHR.

ABSTRACT

FEITOSA, R.B. The role of endothelium on vascular reactivity of late pregnant spontaneous hypertensive rats.

Normal pregnancy is associated with hemodynamic alterations as a gradual increase of blood volume and cardiac output and a decrease of arterial pressure due to a decrease of peripheral resistance. In normotensive rats this phenomenon is associated with decreased pressor responses and hyporeactivity of isolated arteries to vasoconstrictor agents. This change in vascular reactivity has been attributed to an increase in the production of relaxing factors by the endothelium. We examined whether pregnancy influences the vascular reactivity to phenylephrine through endothelium-dependent mechanisms in aortic rings isolated from spontaneously hypertensive rats (SHR). In the present study the role of endothelium in the vascular reactivity to phenylephrine (PE) was investigated in the isolated aorta of non-pregnant (NP, estrous day) and late-pregnant (P, 19-20^o day gestation) SHR. Mean arterial pressure was significantly decreased in P (114 ± 5 mmHg) compared of the NP group (164 ± 3 mmHg). The contractile response to PE (10^{-7} M) augmented with increasing resting tension from 0.25 to 2.0 g in both P and NP group in a similar fashion in aorta with or without endothelium. Concentration-response curves induced by PE were also similar in aortic rings of P compared with those of NP at 2.0 g of resting tension. Endothelium removal potentiated the constrictor responses induced by PE in both P and NP aortas but this potentiation was more intense in the aortic rings of NP group and unmasked a refractoriness to PE-induced vasoconstriction in aorta from P. Although no difference between groups was observed in the vasodilator effect of acetylcholine in pre-constricted aortas, at basal tension and in the presence of a NO synthase inhibitor acetylcholine induced a significantly greater constrictor

effect in aorta with endothelium of P compared to NP that was abolished by endothelium removing.

The results suggest that aorta with endothelium isolated from late pregnant SHR does not show refractoriness to PE due to the augmented release of endothelium derived constrictor factors.

Key words: Vascular reactivity, pregnancy, nitric oxide, SHR.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A gravidez normal está associada a alterações hemodinâmicas como o aumento gradual do volume sanguíneo (que chega a 40% ao termo da gestação), concomitantemente ao aumento da pré-carga e da frequência cardíaca. Estas alterações propiciam sobrecarga de 50% do débito cardíaco promovendo um remodelamento no ventrículo esquerdo elevando a força contrátil para manter a fração de ejeção. A massa eritrocitária eleva-se em aproximadamente 30%, ou seja, menos que o aumento do volume plasmático total, propiciando um estado hemodilucional (GILSON et al., 1997; THORNBURG et al., 2000).

Embora ocorra um aumento da fração de ejeção (devido ao aumento do volume sanguíneo total) acompanhado por aumento da frequência cardíaca, esperar-se-ia um aumento da pressão arterial, durante a gravidez humana; entretanto, observa-se exatamente o inverso. Tal fato se explica por uma queda da resistência periférica não só em territórios naturalmente de baixa resistência, como a circulação útero-placentária, mas também pela redução do tônus da musculatura vascular nos demais territórios.

A circulação útero-placentária é uma das circulações mais afetadas durante a gravidez, sendo responsável pelo aumento de 25% do fluxo cardíaco total (LONGO,1983). Este território é formado por artérias espiraladas que se adaptam sofrendo uma “dilatação fisiológica” e diminuindo sua resistência vascular (BROSENS, 1964; LYALL; GREER,1996). Estas alterações são moduladas por uma série de mecanismos endócrinos e vasculares (WEINER; THOMPSON, 1997; ANUMBA et al.,1999) e entre estes tem sido atribuído um

importante papel a fatores relaxantes derivados do endotélio, como o óxido nítrico (NO), (SELIGMAN et al, 1994; DORUP; SKAJAA; SORENSEN, 1999; XIAO; PEARCE; ZHANG, 2001) e que, em situações patológicas, sua ausência promoveria um decréscimo de perfusão sangüínea placentária (ZYGMUNT et al, 2003). Vários estudos sugerem que, devido à baixa perfusão, a placenta liberaria fatores que provocariam um aumento da resistência periférica no organismo materno, que por sua vez culmina com estados hipertensivos (WULFF et al., 2003; KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003).

As adaptações hemodinâmicas que acompanham a gravidez normal permitem que o feto e a gestação se desenvolvam adequadamente e o sistema cardiovascular materno não sofra sobrecarga pelo aumento do volume sangüíneo circulante. No entanto, em uma pequena parcela das mulheres grávidas estes mecanismos de adaptação não se desenvolvem, causando os quadros hipertensivos gestacionais. Nestas circunstâncias, ocorre uma alteração patológica nos vasos da decídua do leito placentário, da microvasculatura renal, do fígado, do coração e da circulação cerebral que tem sido atribuída a uma disfunção de origem endotelial (LYALL; GREER, 1996; ZYGMUNT et al., 2003). Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese deste processo ainda são completamente obscuros, contudo há indícios de que uma disfunção endotelial seja a responsável pelas desordens hipertensivas na gravidez (MORRIS; EATON; DEKKER, 1996; VANWIJK et al., 2000; GRANGER et al., 2001) Dentre as teorias propostas que tentam explicar a ocorrência destes quadros de hipertensivos, duas delas têm se sobressaído:

Teoria Imunológica, na qual a presença de anticorpos maternos contra antígenos placentários de origem paterna provocaria uma má adaptação

placentária que, com o decorrer da gestação, levariam a pré-eclâmpsia. (DEKKER; SIBAI, 1999).

Teoria da Lesão Endotelial, na qual uma disfunção endotelial materna causaria uma placentação imperfeita, onde não ocorreria a segunda onda de invasão trofoblástica e, além disto, provocaria aumento súbito da resistência periférica que causariam picos pressóricos. (MORRIS; EATON; DEKKER,1996; LYALL; GREER,1996; WULFF et al., 2003; KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; SVEDAS et al.,2003) (figura 1).

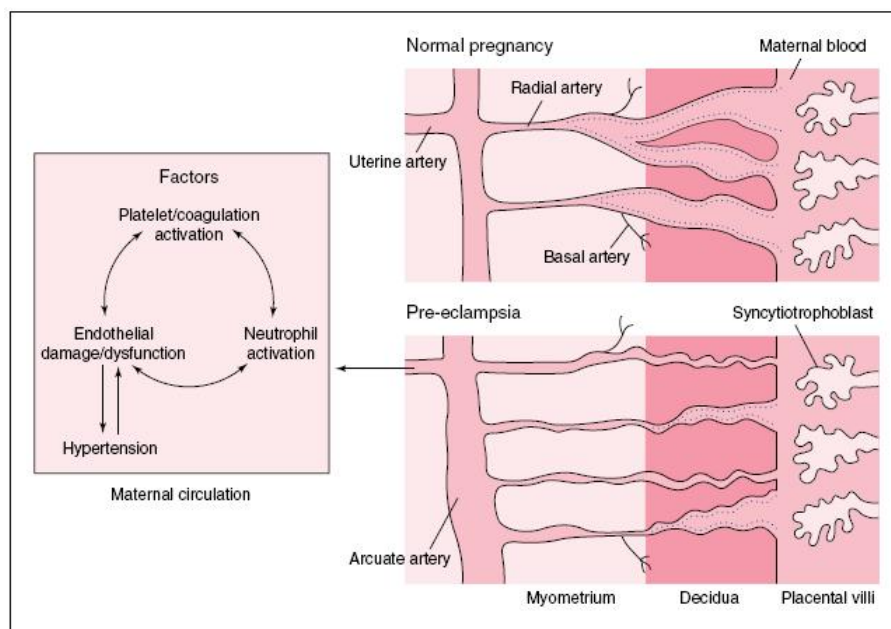


Figura 1 . Representação esquemática da invasão trofoblástica das artérias espiraladas, mostrando a ausência da segunda onda de migração trofoblástica (LYALL; GREER,1996).

Acidentalmente observado em cães hipertensos, ainda na primeira metade o século passado (GOLDBLATT; KAHN; HANZAL, 1939), evidenciou-se que ocorria um decréscimo intenso da pressão arterial ao término da prenhez, a ponto de atingir nível de normotensão (PAGE et al. 1940). Dentre as hipóteses sugeridas para tal fenômeno, causas endocrinológicas e placentárias já foram

estudadas (PAGE; OGDEN; CALIF, 1947; PAGE; CALIF, 1947; MOORE; BILICZKI,1968; SYBULSKI; TOTH; MAUGHAN, 1971). Em seguida, evidenciou-se que várias espécies animais como ratos, coelhos e ovelhas também se comportavam da mesma maneira e desenvolviam tais adaptações hemodinâmicas durante a gestação (MOLNAR; HERTELENDY,1992; COELHO; BALLEJO; SALGADO,1997; THORNBURG et al., 2000) de forma semelhante ao que também acontece na espécie humana. Dentre estes modelos animais que evidenciavam uma queda da pressão arterial nos últimos dias da prenhez, as ratas espontaneamente hipertensas (SHR) tem nos chamado à atenção, pois no período do 18º ao 21º dia sofrem uma brusca queda pressórica (AOI et al., 1976).

Foi demonstrada a diminuição da reatividade a agentes vasoconstritores como angiotensina II, norepinefrina e vasopressina “*in vivo*” (PALLER,1984) e “*in vitro*”. Em estudos utilizando aorta isolada uma hiporeatividade a constritores alfa-adrenérgicos (como a fenilefrina) associada ao término da gestação em vasos de ratas grávidas tem sido consistentemente relatada. (ALOAMAKA et al., 1993; BALLEJO et al., 2002).

A mesma observação foi vista utilizando-se vasos de resistência, como o leito arterial mesentérico perfundido isolado de ratas hipertensas grávidas. Nestes estudos observou-se hiporeatividade a noradrenalina, angiotensina II, vasopressina e à estimulação elétrica perivascular em relação a preparações de ratas não grávidas (CHU; BEILIN, 1993b; COELHO; BALLEJO; SALGADO, 1997). A gravidez normal está também associada a uma menor resposta pressora a agentes vasoconstritores como em ratas normotensas ao final da gravidez, entretanto resultados controversos foram apresentados quanto às

alterações destes vasos a noradrenalina e angiotensina II (CHU; BEILIN, 1993A; BEILIN; CHU, 1993).

A hipótese que haveria aumento da reatividade a agonistas vasodilatadores não se demonstrou efetiva, em leitos mesentéricos isolados de ratas normotensas, já que as respostas a agonistas dependentes ou independentes de endotélio como acetilcolina, bradicinina, nitroprussiato de sódio, isoprenalina, adenosina, forskolina e HOE 234 (um abridor de canal de potássio dependente de ATP) não foram modificadas pela gravidez (BALLEJO et al., 2002).

Controle Do Endotélio Sobre O Tônus

Inicialmente foi sugerido que a queda da resistência vascular periférica observada na gravidez seria decorrente de uma maior liberação de prostanóides vasodilatadores, principalmente prostaciclina (PGI_2) produzida pelas células endoteliais. Ainda, aventou-se a hipótese de que um desbalanço entre a ação da PGI_2 e do tromboxano (TX), um prostanóide vasoconstritor e agregante plaquetário, liberado pela própria plaqueta, poderia representar uma importante alteração fisiopatológica envolvida no desenvolvimento da pré-eclâmpsia (MORRIS; EATON; DEKKER,1996; LYALL; GREER,1996).

Além disto, em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que a resposta relaxante da acetilcolina em aorta isolada de coelhos era dependente da liberação de fatores relaxantes da células endoteliais (FURCHGOTT; ZAWADZKI,1980; FURCHGOTT; VANHOUTTE,1989). Posteriormente, evidenciou-se que tal efeito ocorria principalmente devido à liberação de óxido nítrico (NO). As evidências de que o NO era o principal fator relaxante derivado do endotélio

ganharam força com os trabalhos subseqüentes, utilizando inibidores da formação do NO pela sintase de NO presente no endotélio (NOS III) (PALMER; ASHTON ; MONCADA,1988; KNOWLES; MONCADA, 1994; VANHOUTTE; FELETOU; TADDEI, 2005).

Contudo, nem todo relaxamento dependente de endotélio pode ser completamente explicado pelas ações do NO ou da prostaciclina, de forma que outra(s) substância(s) difusível(is) deve(m) ser considerada(s). Neste sentido, um agente capaz de hiperpolarizar as células musculares lisas dos vasos, cuja natureza química ainda não foi elucidada, tem sido descrito e parece contribuir para o relaxamento vascular principalmente nas artérias de pequeno calibre (vasos de resistência). Este fator tem sido denominado de Fator Hiperpolarizante Derivado de Endotélio (EDHF) (QUIGNARD et al.,2000; BRANDES et al.2000).

Foi demonstrado, também, que o endotélio vascular, além de produzir fatores vasorelaxantes, tinha a capacidade de produzir contração vascular em condições patológicas. Por exemplo, a acetilcolina, agente vasodilatador dependente do endotélio, pode induzir contrações, também dependentes do endotélio, em aorta isoladas de ratos machos espontaneamente hipertensos. Este efeito ocorria pela liberação de fatores endoteliais que eram inibidos por indometacina, um inibidor de ciclooxigenase. (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986; WILLIAMS; DORN; RAPOPORT, 1994; GE et al.,1995). A este fator passou a ser atribuído o nome de Fator Constritor Derivado de Endotélio (ECHF).

Após estes trabalhos, passou-se a ver o endotélio não só como uma simples camada semi-permeável entreposta entre a circulação e a parede vascular e, sim, como um órgão modulador capaz de relaxar e/ou contrair os vasos sanguíneos.

Óxido Nítrico e a Gravidez

Após ter sido bem estabelecido a importância da função endotelial na modulação da resistência vascular periférica, e que esta poderia estar alterada durante o período gestacional, diversos pesquisadores se voltaram para o fato de uma possível correlação entre esses dois achados. Foi demonstrando que a gravidez induz refratariedade do sistema arterial a vasoconstritores que é em parte ou completamente abolido com uso de inibidores da NOS e/ou remoção mecânica do endotélio (MORRIS; EATON; DEKKER,1996; LYALL; GREER,1996; KHALIL et al.,1998; KHALIL; GRANGER,2002).

Estudos realizados no intuito de tentar estabelecer uma correlação entre liberação de NO e gravidez, por meio de dosagem de NO sérico ou urinário, não foram consistentes. (DAVIDGE; STRANKO; ROBERTS, 1996; DI IORIO et al.,1997; SMARASON et al., 1997; HATA et al., 1999). No entanto, estudos moleculares vêm sugerindo que durante a gestação pode haver uma maior produção de NO, pois mostraram aumento da quantidade de RNA mensageiro da NOS III em aorta torácica de ratas grávidas (GOETZ et al., 1994). Também já foi demonstrado um aumento da expressão de NOS III na camada endotelial de artérias uterinas de ovelhas grávidas (MAGNESS et al.,1997). Recentemente observamos, em artérias sistêmicas de condutância (aorta) e em artérias de distribuição (leito mesentérico pré-arteriolar), que a inibição da produção de NO anula a hiporeatividade à fenilefrina e à ativação de nervos adrenérgicos associada à gestação de ratas normotensas (BALLEJO et al., 2002; COELHO; BALLEJO; SALGADO, 1997).

Diante do exposto, pretendemos investigar se ocorre hiporeatividade a fenilefrina em anéis de aorta de ratas espontaneamente hipertensas, como o

verificado em ratas normotensas, e o possível papel do endotélio na modulação da resposta a fenilefrina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Avaliar a contribuição do endotélio na modulação da resposta a fenilefrina em anéis de aorta de ratas espontaneamente hipertensas ao término da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Animais:

Os experimentos foram realizados utilizando ratas espontaneamente hipertensas (SHR), com aproximadamente 200 g de peso corporal, provenientes do biotério do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, em sala com ciclos luz/escuro de 12 horas a 25 ± 2 °C e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Inicialmente, a pressão arterial sistólica de todos animais foi determinada por meio do método pletoisomográfico de cauda. Os animais eram aquecidos previamente e, após contenção, o sinal da pulsação arterial, obtido por um sensor colocado junto à cauda, era amplificado e visualizado na tela de um osciloscópio (Pantec 5210, Brasil), utilizando o sistema MK II (E & M Instrument, CO, Texas, USA). Essa medida era repetida duas vezes e somente foram utilizados, nos experimentos subseqüentes, animais que apresentassem pressão arterial sistólica maior que 170 mmHg.

Os animais foram divididos em 2 grupos; metade destinada a compor o grupo de ratas não grávidas (grupo estro) e a outra parte submetida ao acasalamento (grupo grávida) (MONTES; LUQUE, 1988). As ratas foram utilizadas ou na fase estro do ciclo estral ou no período final da gestação (19^o-20^o dia), sendo o dia "zero" de gestação determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal matinal. Somente foram utilizadas ratas grávidas com mais de 4 filhotes nos seus cornos uterinos(AOI et al.,1976; AHOKAS; SIBAI, 1990). Para acasalamento, foram utilizados ratos machos da mesma cepa (SHR).

Determinação da Pressão Arterial:

No dia do experimento, as ratas foram anestesiadas com tribromoetanol 2,5% (1ml para cada 100 g de peso), administrado por via intraperitoneal, para canulação da artéria carótida esquerda com um cateter de polietileno (PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ). Cerca de 2 horas após, com o animal já recuperado da anestesia, foi registrada a pressão arterial média (PAM) direta, utilizando um polígrafo HP 7754A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) acoplado a um transdutor de pressão.

Isolamento da Aorta Torácica:

Após registro da PAM, as ratas foram anestesiadas com éter etílico e sacrificadas por decapitação. A seguir, a aorta torácica foi removida do animal edissecado o tecido conectivo. A aorta foi cortada em anéis de aproximadamente 4 mm de largura que foram montados em cubas para órgão isolados. Para isso, dois ganchos de metal em “L” foram inseridos no lúmen de cada anel vascular. Um deles foi fixado à base da cuba e o outro conectado a um transdutor de força isométrica (FT 03, Grass Instrument Division, Astro-Med) acoplado a um amplificador (Gould Instrument Systems). Esse sistema foi conectado a um computador para registro da tensão isométrica. Para aquisição e análise dos dados foram utilizados, respectivamente, os softwares Summit for ACQUIRE e Data Viewer (Gould Instrument Systems). O anel de aorta permaneceu em cuba para órgão isolado contendo solução nutriente de Krebs (em mM: NaCl: 118; KCl: 4,7; $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$: 2,5; $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$: 1,64; KH_2PO_4 : 1,18; NaHCO_3 : 24,9; Glicose: 11,1), com pH 7,4, mantida a 37°C e sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O_2 e 5%

CO₂). Os anéis de aorta, após estabilização a uma determinada tensão passiva inicial, foram testados com uma concentração fixa de fenilefrina (10⁻⁷M) até apresentarem respostas vasoconstritoras semelhantes. A presença do endotélio vascular foi verificada pela resposta vasodilatadora à acetilcolina (10⁻⁶ M) em preparações pré-contraídas com fenilefrina. A retirada do endotélio foi feita por meio de uma leve fricção do anel entre os dedos indicador e polegar, antes do início do experimento, seguida de uma leve raspagem da luz do vaso com uma haste de metal. O sucesso do procedimento foi verificado pela ausência de resposta vasodilatadora a acetilcolina (10⁻⁶ M).

Confecção da Curva Tensão-Resposta:

Com o objetivo de estudar a influência da tensão passiva sobre a resposta contrátil nos anéis de aorta, foram realizados experimentos com uma dose fixa de vasoconstritor e alterando a força exercida pelas hastes em “L” sobre os anéis de aorta. Desta forma podemos definir qual o padrão de resposta das ratas SHR virgens em estro e grávidas (19^o e 20^o dia) aos diferentes níveis de tensão, avaliando também o efeito do endotélio sobre esta. Após a colocação dos anéis nas condições supracitadas, aguarda-se um período de repouso para que cada anel se estabilizasse, com uma tensão passiva inicial de 0,25 g. Os anéis de aorta das ratas grávidas e não grávidas foram então estimulados com uma dose de fenilefrina e após lavagem foram submetidos a uma tensão maior; aguardava-se uma nova estabilização e os anéis eram novamente estimulados com a mesma concentração de fenilefrina (este procedimento foi repetido a tensões crescentes) (SPARKS; BOHR, 1962; JACKSON, 1988; FRANCHI-MICHELI et al.,2000).

Os testes ocorreram utilizando-se a concentração fixa de fenilefrina (10^{-7} M) e verificadas as diferenças de resposta contrátil com as tensões passivas de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, e 2,5 g. Dois anéis de cada vaso foram testados em paralelo sendo um com endotélio e outro sem. Para verificar a presença (ou não) do endotélio, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina e verificado o seu relaxamento (ou não) com acetilcolina na concentração de 10^{-6} M, com tensão passiva de 0,5 g. Uma curva tensão-resposta foi confeccionada pra cada grupo, e o nível de tensão passiva que produziria a maior resposta foi usada como padrão em nosso trabalho.

Curva Concentração Resposta a Fenilefrina

Definida a tensão passiva de 2,0 g para reproduzir as melhores respostas, foi construída uma curva concentração-efeito a fenilefrina, administrada de forma cumulativa, em anéis de aorta torácica com e sem endotélio, isoladas de ratas hipertensas grávida e em estro. A presença ou não de endotélio era testada no início do experimento pela verificação (ou não) da resposta relaxante a acetilcolina em aortas pré-contraídas por fenilefrina. As concentrações de fenilefrina utilizadas foram de 10^{-9} a 10^{-4} M.

Fator Constritor Derivado de Endotélio (EDCF)

Com o intuito de verificar a liberação de fatores constritores de origem endotelial pela ação da acetilcolina, o protocolo descrito a seguir foi realizado, inicialmente, em aorta de ratos machos com hipertensão espontânea, para reproduzir dados da literatura que mostram a presença deste fator em ratos machos desta cepa. O mesmo protocolo foi realizado em anéis de aorta de ratas hipertensas

grávidas ou em estro. Após estabilização das preparações, montadas como descrito acima, as mesmas foram pré-contraídas pela adição de fenilefrina (10^{-5} M) e verificada a presença de endotélio pela resposta relaxante induzida pela adição de acetilcolina (10^{-6} M). Para investigar a presença de fatores contráteis liberados pelo endotélio (EDCF), as preparações foram lavadas várias vezes com solução de Krebs e, em seguida, incubadas com N ω -Nitro-L-Arginina (L-Noarg, 300 μ M), inibidor da NOS por 15 minutos. Após este período, na presença de L-Noarg, verificava-se a resposta contrátil a acetilcolina (10^{-6} M). Ao atingir-se a resposta constritora máxima a preparação foi lavada e incubada com L-Noarg (300 μ M) e diclofenaco de sódio (10 μ M), um inibidor de ciclooxigenase. por 15 minutos. Após, foi acetilcolina foi novamente adicionada à preparação. Este protocolo foi realizado em anéis com ou sem endotélio.

Análise dos dados

As respostas vasoconstritoras são apresentadas como o aumento de tensão em gramas nos anéis de aorta a partir da tensão passiva inicial imposta e as respostas vasodilatadoras são expressas como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração com fenilefrina.

Nos experimentos onde se realizaram curvas relacionando tensão basal ou concentração de fenilefrina ao efeito vasoconstritor, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias para comparação entre as curvas. A partir das curvas concentração-resposta a fenilefrina, foram calculados os valores de pD_2 ($-\log EC_{50}$) e de efeito máximo (E_{max}). Os valores de pD_2 para fenilefrina foram calculados por equação de regressão não-linear de cada curva individualmente.

Quando dados individuais foram comparados, foi utilizado teste T ou ANOVA de uma via, quando apropriado.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 3.0, e foram considerados significativos sempre que $P < 0,05$.

Drogas e substâncias utilizadas:

Fenilefrina e N ω -Nitro-L-Arginina foram obtidos da Sigma; acetilcolina da Merck; diclofenaco de sódio e ODQ da Research Biochemicals International; e tribromoetanol 2,5% da Aldrich Chemical Company.

Dentre os sais que compuseram a solução de Krebs: cloreto de sódio foi obtido de J.T. Baker; cloreto de potássio, cloreto de cálcio, bicarbonato de sódio e glicose da Merck; sulfato de magnésio da Vetec; e fosfato de potássio da Mundial Química.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Medida da Pressão Arterial de Ratas Grávidas e em Estro

O grupo de ratas em estro (N=14) apresentaram PAM entre 150 e 180 mmHg (164 ± 3 mmHg) enquanto que o grupo de ratas ao término da gravidez (N=15) apresentaram PAM significativamente ($P<0,0001$) mais baixa (Figura 1). A PAM das ratas grávidas encontrava-se em níveis de normotensão, entre 75 e 130 mmHg (114 ± 5 mmHg)

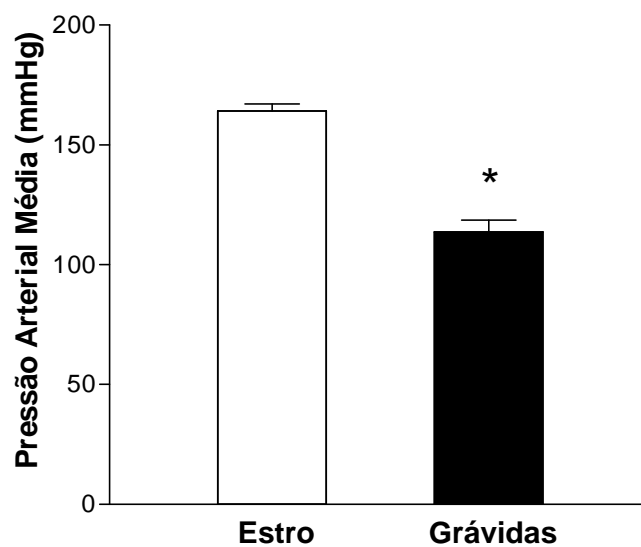


Figura 2. Pressão arterial média de ratas em estro (N=14) e no 19-20º dia de gravidez (N=15). Resultados estão apresentados como média±EPM. * $P<0,0001$ comparado com Estro.

2. Curva Tensão-Resposta

Inicialmente, verificou-se a influência das condições de tensão passiva basal na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio obtidos de ratas grávidas e em estro. Como pode ser observada na Figura 2, a magnitude da resposta contrátil induzida por 10^{-7} M de fenilefrina aumenta quando se aumenta a tensão basal a que o anel foi submetido. Este efeito foi observado tanto em anéis com endotélio como naqueles sem endotélio, estando as respostas amplificadas na ausência do endotélio, verificada pela perda da capacidade relaxante da acetilcolina.

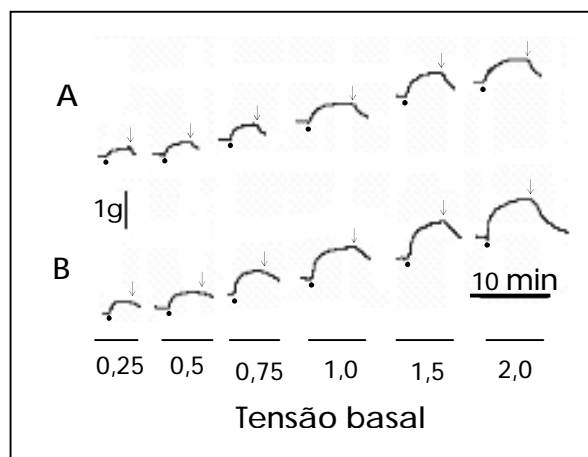


Figura 3. Registro típico da resposta vasoconstritora induzida pela adição de fenilefrina (10^{-7} M, •) em anel de aorta a diferentes tensões passivas basais. Anel de aorta com endotélio (A) e sem endotélio (B) isolada de rata em estro. As setas representam o momento que a fenilefrina foi lavada da cuba.

Na Figura 4 estão representadas as curvas que relacionam tensão passiva basal e resposta a fenilefrina (10^{-7} M) obtidas em anéis com e sem endotélio

de ratas em estro e ao término da gravidez. A magnitude da resposta contrátil induzida pela fenilefrina depende da tensão basal a que a aorta foi submetida ($P < 0,0001$) em todos os grupos estudados, atingindo efeito máximo em tensões basais maiores que 1 g. Estas respostas sofrem modulação endotelial, já que em aortas sem endotélio as respostas foram potencializadas nos dois grupos de forma semelhante.

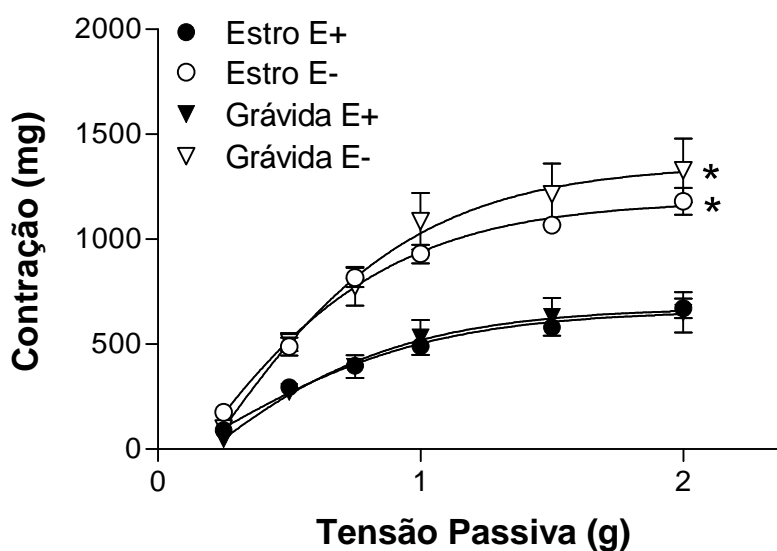


Figura 4. Resposta vasoconstritora a fenilefrina (10^{-7} M) nas diferentes tensões passivas em anéis de aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) de ratas grávidas e em estro. Resultados estão apresentados como média \pm EPM, N=8. * $P < 0,0001$ comparado com o respectivo grupo E+.

Nestas mesmas preparações, verificou-se que a resposta vasodilatadora a acetilcolina foi semelhante nas aortas isoladas de ratas grávidas ou em estro e pré-contraídas com fenilefrina (Figura 5). Estas repostas foram abolidas pela remoção do endotélio nos dois grupos.

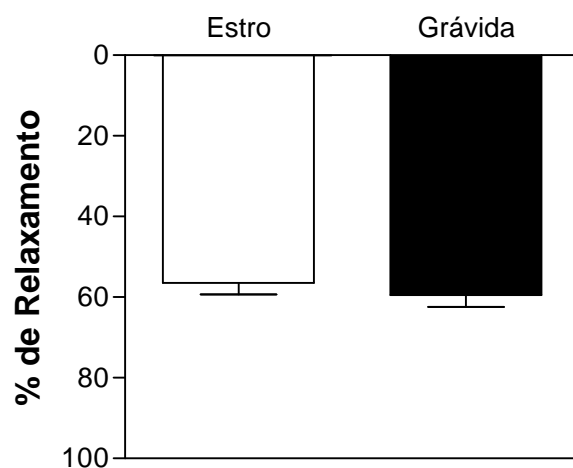


Figura 5. Resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina (10^{-6} M) em anéis de aorta isolada de ratas grávidas e em estro e pré-contraídos com fenilefrina. Resultados estão apresentados como média ± EPM, N=8.

3. Curva Concentração-Resposta a Fenilefrina

A responsividade a fenilefrina (10^{-9} a 10^{-4} M) foi investigada em anéis de aorta, sob uma tensão passiva inicial de 2 g, que tiveram o endotélio preservado ou removido, como pode ser observado pelo traçado de um experimento representativo deste protocolo na Figura 6. As repostas vasodilatadoras a acetilcolina em preparações com endotélio obtidas de ratas grávidas ou em estro foram semelhantes ($54,3 \pm 1,9$ e $58,7 \pm 1,9$ % de relaxamento, N=6, respectivamente)

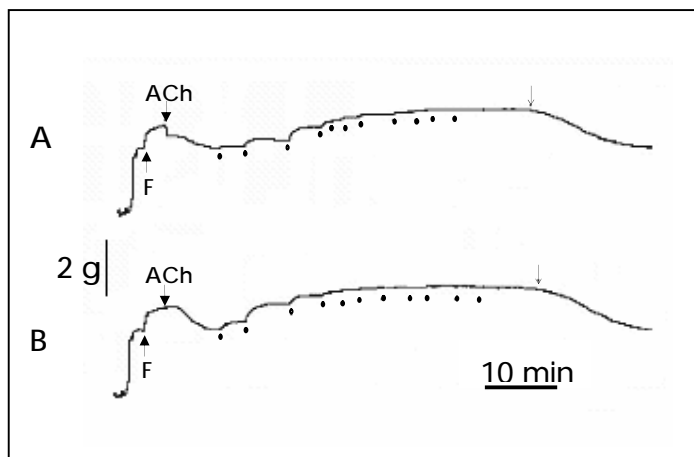


Figura 6. Registro típico do efeito da fenilefrina administrada de forma cumulativa (\bullet , 10^{-9} M a 10^{-4} M) em anéis de aorta isolada de rata em estro. Aorta com endotélio (A) e sem endotélio (B). Acetilcolina (ACh, 10^{-6} M) não induz relaxamento na aorta sem endotélio pré-contraída com fenilefrina (F, 10^{-7} M). As setas ao fim do experimentam mostram o momento que a fenilefrina foi lavada da cuba.

Anéis de aorta isolada de ratas grávidas ou em estro responderam de forma concentração-dependente a fenilefrina. Em preparações com endotélio, as respostas a fenilefrina foram semelhantes nos dois grupos (Figura 7-A e Tabela 1). Em anéis de aorta sem endotélio, verificado pela ausência de resposta vasodilatadora a acetilcolina, as respostas a fenilefrina foram potencializadas (Figura 7-B e Tabela 1). Nestas condições, houve um deslocamento das curvas concentração-resposta a fenilefrina para esquerda, que foi significativo nas aortas de ratas grávidas e aumento da resposta máxima induzida por fenilefrina, que foi mais intenso nas aortas de ratas em estro. Desta forma, a curva concentração-resposta obtida de aortas sem endotélio isoladas de ratas grávidas revelou uma hiporeatividade a fenilefrina quando comparada com a obtida no grupo em estro (Figura 7-B).

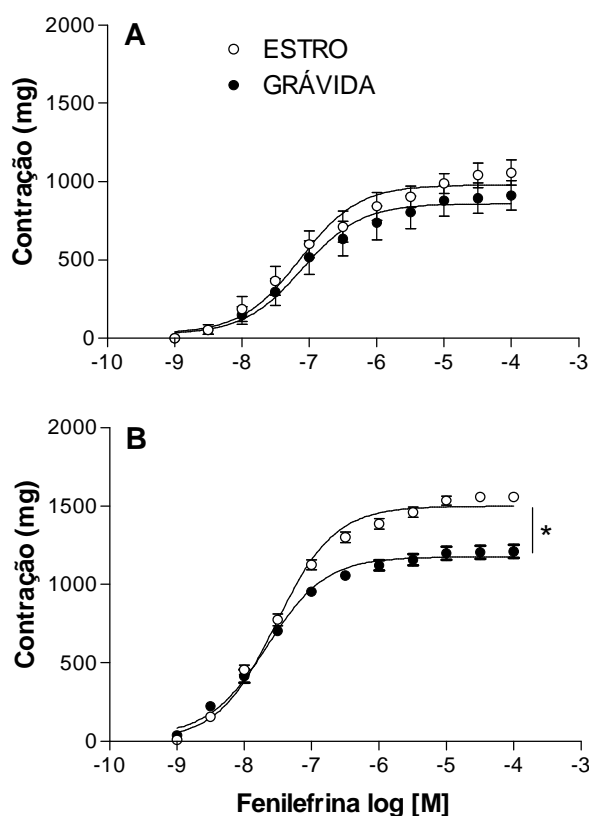


FIGURA 7. Curvas concentração-efeito induzido por fenilefrina (10^{-9} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isolada de ratas grávidas e em estro que tiveram o endotélio preservado (A) ou removido (B). Os pontos representam a média \pm EPM de n=6; *p<0,0001.

Tabela 1. Valores de PD₂ e efeito máximo induzido por fenilefrina em anéis de aorta de ratas com hipertensão espontânea ao término da gravidez ou em estro.

	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	Estro	Grávida	Estro	Grávida
pD₂	7,09 \pm 0,24	7,01 \pm 0,18	7,52 \pm 0,12	7,78 \pm 0,14*
Emáx	1057 \pm 82	912 \pm 95	1560 \pm 69**	1211 \pm 99***

Média \pm EPM, N=6. Emáx = Efeito Máximo (mg). *P=0.008 e **P=0.0009 em relação ao seu respectivo grupo com endotélio, ***P<0,02 comparando grupo Grávida sem endotélio com grupo Estro sem endotélio.

4. Fator constritor liberado pelo endotélio

Como na presença de endotélio as respostas induzidas por fenilefrina em aorta de ratas grávidas foram semelhantes às de ratas em estro, investigou-se a hipótese de que haveria fatores constritores atuando de maneira seletiva na gravidez. Inicialmente, reproduzimos protocolo descrito na literatura para ratos machos com hipertensão espontânea para a identificação deste fator (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986). Como representado na figura 8, e confirmando dados da literatura, unicamente na presença de endotélio e na presença de inibidor da NOS, observa-se contração desencadeada por acetilcolina, que por sua vez tem sua resposta abolida na presença de inibidores da ciclooxigenase em aorta de ratos machos com hipertensão espontânea.

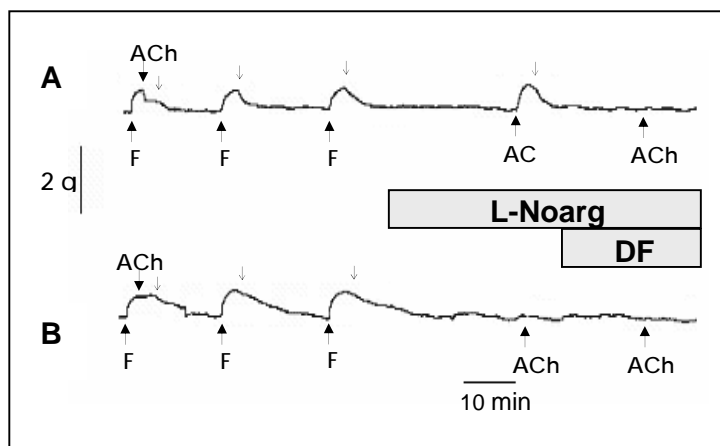


Figura 8 – Efeito da acetilcolina (ACh, 10^{-6} M) em aorta pré-contraída com fenilefrina (F) ou na presença de Nitro-L-Arginina (L-Noarg, 300 μ M) somente ou em combinação com diclofenaco (10 μ M) em preparações com endotélio (A) ou sem endotélio (B) obtidas de ratos machos com hipertensão espontânea.

Como observado nos grupos anteriores, a resposta vasodilatadora endotélio-dependente induzida por acetilcolina em artérias pré-contraídas com fenilefrina obtidas de ratas grávidas ou em estro foram semelhantes ($57 \pm 1,8$ e $56 \pm 1,5$ % de relaxamento, $N=7$, respectivamente). No entanto, a resposta contrátil induzida pela mesma concentração de acetilcolina na presença de L-Noarg foi maior nas preparações obtidas de ratas grávidas (Figura 9). Contrastando com o observado em aortas de ratos machos, verificou-se que a resposta contrátil induzida por acetilcolina ainda persiste nas preparações sem endotélio (Figura 9) e apresenta mesma magnitude nos dois grupos. Tal dado sugere a ativação dos EDCF somente durante a gravidez.

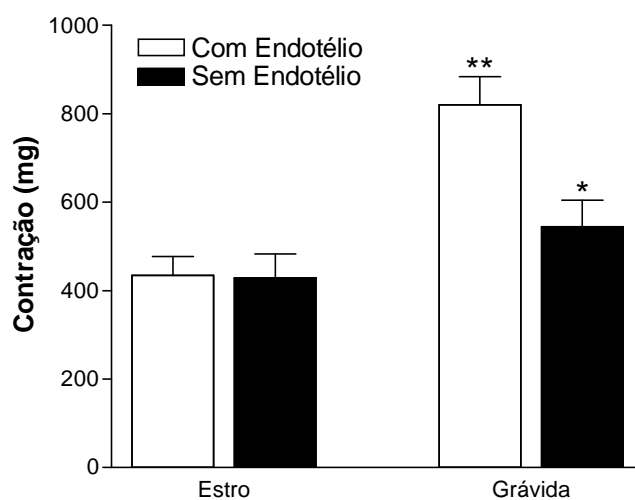


FIGURA 9. Efeito contrátil induzido por acetilcolina ($10^{-7}M$) na presença de L- Nitro-L- Arginina em anéis de aorta de ratas em estro e grávidas com e sem endotélio. Dados apresentados como média \pm EPM de 7 observações. * $P < 0,01$ comparado a com endotélio, ** $P = 0,008$ comparado a Estro.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Em nosso trabalho foi avaliada a reatividade de anéis de aorta de ratas hipertensas espontâneas ao término da gravidez e a possível participação de fatores endoteliais vasorelaxantes ou contráteis na modulação desta resposta.

Avaliação da Queda Pressórica Durante a Gravidez

A literatura tem relatado que a gravidez das ratas espontaneamente hipertensas cursa com aumento de volume sistólico e da frequência cardíaca; contudo, sua pressão arterial ao término da gestação sofre intenso decréscimo (AOI et al.1976). De fato, observamos uma diminuição na pressão arterial média em ratas hipertensas prenhes, as quais apresentaram níveis pressóricos compatível com aqueles que têm sido descritos na literatura para ratas normotensas Wistar (figura 1). Este fenômeno tem sido atribuído em grande parte à queda da resistência vascular periférica a qual poderia ser explicada por: “shunt” artério-venoso placentário; hiporesponsividade a agentes vasoconstritores (incluindo neurotransmissores e hormônios como noradrenalina, adrenalina e angiotensina II), em diversos territórios vasculares.

É importante ressaltar que o decréscimo da pressão arterial também é observado em ratas normotensas durante a gestação. Entretanto, essa queda é menos intensa do que aquele que ocorre em ratas SHR e, mais, é vista somente em gestações com mais de 10 filhotes (ANTONIALLI, 2001 e MARTINEZ, 2004). Por outro lado, em nossos estudo utilizando ratas hipertensas, a queda na pressão arterial já pode ser notada em gestações com mais de 4 filhotes. Uma possível explicação para essa observação seria que pequenas alterações na resistência

vascular periférica, induzidas por qualquer um dos mecanismos acima citados, causariam grandes variações pressóricas nos animais hipertensos quando comparados aos normotensos.

Efeito da Tensão Basal Sobre a Resposta Vascular

Antes de estudarmos o efeito vasoconstritor da fenilefrina sobre as preparações vasculares, avaliamos o padrão de respostas que a tensão basal exerce sobre os anéis de aorta e se este padrão altera durante a gravidez na presença ou ausência de endotélio. Já é sabido que há uma relação direta entre o estiramento do tecido, imprimido pelo aumento da tensão passiva inicial, e a reatividade a agonista contráteis, como a fenilefrina, em anéis de aorta. Essa abordagem é importante já que tem sido observado que a hiporeatividade vascular a agentes vasoconstritores, associada à gestação, só é observada em determinadas condições de tensão passiva em ratas normotensas (SPARKS; BOHR, 1962; JACKSON, 1988; FRANCHI-MICHELI et al.,2000).

Verificamos que em tensões superiores a 1,0 g as respostas induzidas em aorta de animais hipertensos atingiram um platô, onde o aumento da tensão basal não altera de maneira significativa as respostas dos anéis vasculares. Além disto, observou-se um comportamento idêntico entre preparações com endotélio intacto de ratas não grávidas e grávidas e a remoção do endotélio potencializou a resposta dos dois grupos de forma semelhante. Esse dado contrasta com aquele obtido em aorta de ratas normotensas ao término da gestação que apresentavam curva tensão-resposta a fenilefrina deprimida quando comparada àquela obtida de ratas em estro (MATINEZ, 2004). Evidenciou-se, desta forma, que a tensão passiva modifica a

intensidade da resposta ao estímulo α_1 -adrenérgico; contudo, a gravidez não modifica o padrão das respostas em aorta de ratas hipertensas.

Comportamento da Curva Concentração-Resposta

Ao se verificar a expressiva queda pressórica que ocorre ao final da gestação das ratas hipertensas seria de se imaginar que seus vasos tanto de resistência quanto de condução fossem menos responsivos a agentes vasoconstritores α -adrenérgicos como a fenilefrina (ALOAMAKA et al., 1993; KHALIL et al., 1998; BALLEJO et al., 2002). Entretanto, comparando as curvas concentração-resposta a fenilefrina obtidas em aorta com endotélio de ratas hipertensas grávidas e em estro não observamos tal efeito, diferentemente do observado em animais normotensos (KHALIL et al., 1998; BALLEJO et al., 2002). Tal dado é semelhante ao encontrado por Gompf et al. (2002) em preparações de aorta abdominal isolada de ratas da cepa SHR Stroke-Prone logo após o parto. Contudo, uma diferença de comportamento entre os anéis de aorta de ratas grávidas e em estro em resposta a fenilefrina aparece ao retirarmos a camada endotelial. Nestas condições, as respostas de ambos os grupos foram potencializadas; no entanto, os anéis das ratas grávidas apresentaram efeito máximo significativamente menor que os das ratas em estro, sugerindo hiporeatividade da parede muscular a fenilefrina associada à gravidez. Este achado também contrasta com o descrito para preparações obtidas de ratas normotensas (BALLEJO et al., 2002). Neste estudo, a hiporesponsividade a fenilefrina observada em aorta de ratas grávidas é abolida pela remoção do endotélio ou inibição da NOS, indicando a participação de NO de origem endotelial na modulação da resposta constritora a fenilefrina em aorta de ratas normotensas. Uma possível explicação para estas diferenças seria que, ao contrário

do observado em vasos de ratas normotensas grávidas, em aorta de ratas hipertensas ocorreria uma diminuição do papel modulatório do NO endotelial na resposta contrátil induzida por fenilefrina. É interessante notar, todavia, que a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em artérias pré-contraídas com fenilefrina, que nesta preparação é dependente da liberação de NO endotelial, não foi modificada pela gravidez. Por outro lado, uma importante alteração na função endotelial foi descrita nesta cepa de animais hipertensos (SHR) que está relacionada à liberação de fatores constritores de origem endotelial; estes fatores têm sido descritos como prostanóides, produto da ação da ciclooxigenase (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986; YANG et al.,2002; VANHOUTTE; FELETOU; TADDEI, 2005). Assim, uma outra possibilidade para explicar as diferenças observadas na reatividade a fenilefrina em aorta de ratas hipertensas quando comparadas à de ratas normotensas seria uma maior liberação de fatores constritores endoteliais associada a uma menor reatividade muscular à fenilefrina.

Poucos trabalhos têm abordado a presença destes fatores constritores derivado de endotélio em ratas e nenhum que investiga a ocorrência de alterações de seu papel durante a gravidez. Já foi descrito que fêmeas da cepa SHR produzem menos fatores constritores derivado de endotélio quando comparado a machos, e que isto seria decorrente de menor resposta muscular ou por apresentarem menos receptores (KHALIL et al.,1998). Há estudos que mostram que em ratas normotensas 25 a 30% da resposta contrátil das fêmeas é secundária a ação de endoperóxidos (FULTON; STALLONE, 2002). Também tem sido estudado que os esteróides ovarianos modulam a ação destas substâncias na aorta de ratas. Em aorta de camundongos que não expressam a ciclooxigenase-2, as respostas vasoconstritoras (EDCF) a acetilcolina foram semelhantes em machos e fêmeas;

contudo, nenhum EDCF foi evidenciado em animais que não expressavam ciclooxigenase-1 (TANG et al.,2005).

Em nosso estudo, ao analisamos os efeitos contráteis produzidos pela acetilcolina em aortas isoladas, na presença de um bloqueador de NOS (L-Noarg), em fêmeas da cepa SHR em estro e ao final da gravidez. Os resultados encontrados foram iguais em anéis de aorta com e sem endotélio no grupo estro; assim, não evidenciamos, nas condições utilizadas, a presença de um fator constritor derivado de endotélio diferindo do encontrado na literatura (KHALIL et al.,1998). Além disto, observamos uma resposta a acetilcolina independente de endotélio sugerindo, portanto uma ação muscular direta da droga, confirmando que acetilcolina em altas concentrações apresenta efeito vasoconstritor por ação direta na musculatura lisa (FURCHGOTT; ZAWADZKI,1980). Interessantemente, um achado inédito em nosso estudo foi que anéis de aorta isolada de ratas grávidas apresentaram resposta contrátil a acetilcolina aumentada quando o endotélio estava integro. Este dado nos permite afirmar que só evidenciamos fatores constritores derivados de endotélio durante a gravidez em ratas com hipertensão espontânea. Tal achado é condizente com o que observamos nas curvas concentração-resposta quando não observamos alterações entre as ratas grávidas e em estro na presença de endotélio e que, na ausência de endotélio, estas respostas estavam menores nas preparações de ratas grávidas.

Este surpreendente resultado mostra um comportamento diferenciado entre os machos e as fêmeas da cepa SHR, já que esses não apresentam resposta independente de endotélio. Nestas circunstâncias, podemos especular que alterações endocrinológicas possam estar atuando nos diversos órgãos e sistemas, incluindo os vasos sangüíneos de todo o organismo. A atuação de hormônios como

o estrogênio (FULTON; STALLONE, 2002; RUBANYI; JOHNS; KAUSER, 2002), um conhecido vasodilatador, seja pela sua atuação endotelial ou por mecanismos ainda desconhecidos, poderia prover uma explicação pelo diferente comportamento entre os diferentes gêneros dos SHR. Outra explicação endocrinológica para o observado, poderia se dar pela presença de substâncias de origem placentária que alteraria a função vascular com o decorrer da gravidez.

Ainda é sabido que a placa arterosclerótica produz substâncias constritoras sobre os vasos, e que animais com aterosclerose (como os SHR) têm, também, uma alteração funcional da sua camada muscular lisa (HADJIISKY; PEYRI, 1982; HADJIISKY; PEYRI; GROSGOGEAT, 1987). Entretanto, tal suposição não contempla o fato de que fêmeas apresentam resposta independente de endotélio (ação direta sobre a musculatura lisa vascular) enquanto os machos não exibem tal efeito.

Recentemente, foi publicado um artigo que demonstrava que a resposta de EDCF sofre interferência na presença de altas concentrações de acetilcolina e/ou de agonistas α -adrenérgicos (TANG et al., 2005). Em nossos experimentos padronizamos tais concentrações e mesmo assim conseguimos evidenciar fenômenos contráteis provocados pela acetilcolina, na presença ou ausência de endotélio vascular. Isto nos chama a atenção para que, em outras circunstâncias experimentais, diferentes resultados podem ser encontrados e que estudos utilizando concentrações diferentes devem ser planejados com a intenção de elucidar melhor estes mecanismos de controle do tônus vascular.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados permitem concluir que diferenças nas condições basais do anel de aorta não afetam a qualidade dos dados obtidos de preparações de ratas grávidas ou em estro com hipertensão espontânea, já que o aumento da tensão passiva determina aumento da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas de modo e intensidades semelhantes. E mais importante, nossos dados mostram que anéis de aorta com endotélio obtidos de ratas com hipertensão espontânea ao término da gravidez não apresentam hiporeatividade a fenilefrina, provavelmente por uma maior participação de fatores contráteis liberados pelo endotélio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahokas RA, Sibai BM. The relationship between experimentally determined litter size and maternal blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Mar;162(3):841-7.

Aloamaka CP, Ezimokhai M, Cherian T, Morrison J. Mechanism of pregnancy-induced attenuation of contraction to phenylephrine in rat aorta. *Exp Physiol.* 1993 May;78(3):403-10.

Antoniali C. Influencia do óxido nítrico na reatividade de aortas isoladas de ratas no final da gravidez [doutorado - tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2004.

Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 2):H848-54.

Aoi W, Gable D, Cleary RE, Young PC, Weinberger MH. The antihypertensive effect of pregnancy in spontaneously hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1976 Oct;153(1):13-5.

Ballejo G, Barbosa TA, Coelho EB, Antoniali C, Salgado MC. Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses. *Life Sci.* 2002 May 17;70(26):3131-42.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9747-52.

- Brosens IA. Study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1964 Apr;71:222-30.
- Coelho EB, Ballejo G, Salgado MC. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. *Hypertension*. 1997 Sep;30(3 Pt 2):585-8.
- Chu ZM, Beilin LJ. Mechanisms of vasodilatation in pregnancy: studies of the role of prostaglandins and nitric-oxide in changes of vascular reactivity in the in situ blood perfused mesentery of pregnant rats. *Br J Pharmacol*. 1993 Jun;109(2):322-9.
- Chu ZM, Beilin LJ. Nitric oxide-mediated changes in vascular reactivity in pregnancy in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1993 Nov;110(3):1184-8.
- Beilin LJ, Chu ZM. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms of vasodilation in pregnancy. *J Hypertens Suppl*. 1993 Dec;11(5):S148-9.
- Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Mar;174(3):1008-13.
- Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol*. 1999 Feb;23(1):24-33.
- Di Iorio R, Marinoni E, Coacci F, La Torre R, Cosmi EV. Amniotic fluid nitric oxide and uteroplacental blood flow in pregnancy complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997 Oct;104(10):1134-9.
- Dorup I, Skajaa K, Sorensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 2):H821-5.

Franchi-Micheli S, Failli P, Mazzetti L, Bani D, Ciuffi M, Zilletti L. Mechanical stretch reveals different components of endothelial-mediated vascular tone in rat aortic strips. *Br J Pharmacol*. 2000 Dec;131(7):1355-62.

Fulton CT, Stallone JN. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Nov;283(5):H2062-73.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989 Jul;3(9):2007-18. Review.

Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res*. 1995 Jun;76(6):1003-10.

Gilson GJ, Samaan S, Crawford MH, Qualls CR, Curet LB. Changes in hemodynamics, ventricular remodeling, and ventricular contractility during normal pregnancy: a longitudinal study. *Obstet Gynecol*. 1997 Jun;89(6):957-62.

Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Nov 30;205(1):905-10.

Goldblatt H, Kahn JR, Hanzal RF. The effect on blood pressure of constriction of the abdominal aorta above and below the site of origin of both main renal arteries. *Hypertension due to constriction of aorta*. 649-73. Received for publication, January 19, 1939.

Gompf H, Luft FC, Morano I. Nitric oxide synthase upregulation and the predelivery blood pressure decrease in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2002 Feb;20(2):255-61

Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2001 Jun;14(6 Pt 2):178S-185S. Review.

Hadjiisky P, Peyri N. Hypertensive arterial disease and atherogenesis. Part. 1. Intimal changes in the old, spontaneously hypertensive rat (SHR). *Atherosclerosis*. 1982 Aug;44(2):181-99.

Hadjiisky P, Peyri N, Grosgeat Y. Tunica media changes in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Atherosclerosis*. 1987 May;65(1-2):125-37.

Hata T, Hashimoto M, Kanenishi K, Akiyama M, Yanagihara T, Masumura S. Maternal circulating nitrite levels are decreased in both normal normotensive pregnancies and pregnancies with preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 1999;48(2):93-7.

Jackson WF. Oscillations in active tension in hamster aortas: role of the endothelium. *Blood Vessels*. 1988;25(3):144-56

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003 Jul;69(1):1-7. Epub 2003 Mar 5. Review.

Kauser K, Rubanyi GM. Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995 Apr;25(4 Pt 1):517-23.

Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, Granger JP. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension*. 1998 May;31(5):1065-9.

Khalil RA, Granger JP. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Jul;283(1):R29-45.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 (Pt 2):249-58. Review.

Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol.* 1983 Nov;245(5 Pt 1):R720-9. Review.

Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1986 Apr;8(4):344-8.

Lyall F, Young A, Greer IA. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Sep;173(3 Pt 1):714-8.

Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 2):H1730-40.

Martinez MR. Reatividade vascular de aortas isoladas de ratas ao término da gestação: participação de óxido nítrico e prostanóides [mestrado - dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2004.

Molnar M, Hertelendy F. N omega-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 May;166(5):1560-7.

- Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*. 1988;133(3):192-9.
- Moore HC, Biliczki FP. Failure to maintain steroid hypertension during pregnancy in the rat. *J Pathol Bacteriol*. 1968 Jan;95(1):281-7.
- Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996 Jan;103(1):4-15.
- Nathan L, Cuevas J, Chaudhuri G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. *Br J Pharmacol*. 1995 Mar;114(5):955-60.
- Page EW, Calif B, Patton HS, Calif O, Ogden E, Calif B. The effect of pregnancy on experimental hypertension. *Am J Obstet Gynecol*. 1940 Jun 14, 53-60.
- Page EW, Calif SF. Relation the fetus and placenta to the decline of hypertension in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1947. Feb. 275-8.
- Page EW, Ogden E, Calif SF. Endocrine influences upon the blood pressure of normal and hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1947 Jan 1;53:150-4.
- Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol*. 1984 Jul;247(1 Pt 2):H100-8.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
- Pascoal IF, Lindheimer MD, Nalbantian-Brandt C, Umans JG. Preeclampsia selectively impairs endothelium-dependent relaxation and leads to oscillatory activity in small omental arteries. *J Clin Invest*. 1998 Jan 15;101(2):464-70.
- Quignard JF, Feletou M, Edwards G, Duhault J, Weston AH, Vanhoutte PM. Role of endothelial cell hyperpolarization in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol*. 2000 Mar;129(6):1103-12.

Rabelo FA, Russo EM, Salgado MC, Coelho EB. Nonendothelial NO blunts sympathetic response of normotensive rats but not of SHR. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3 Pt 2):565-8.

Rubanyi GM, Johns A, Kauser K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2002 Feb;38(2):89-98. Review.

Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1994 Oct;171(4):944-8.

Smarason AK, Allman KG, Young D, Redman CW. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997 May;104(5):538-43.

Sparks HV Jr, Bohr DF. Effect of stretch on passive tension and contractility of isolated vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1962 May;202:835-40.

Svedas E, Islam KB, Nisell H, Kublickiene KR. Vascular endothelial growth factor induced functional and morphologic signs of endothelial dysfunction in isolated arteries from normal pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Jan;188(1):168-76.

Sybulski S, Toth A, Maughan GB. The influence of experimental renal hypertension on pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol*. 1971 Jun 1;110(3):314-7

Tang EH, Feletou M, Huang Y, Man RY, Vanhoutte PM. Acetylcholine and sodium nitroprusside cause long-term inhibition of EDCF-mediated contractions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Dec;289(6):H2434-40.

- Tang EH, Ku DD, Tipoe GL, Feletou M, Man RY, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions occur in the aorta of wild-type and COX2-/- knockout but not COX1-/- knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 Dec;46(6):761-5.
- Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD, Morton MJ. Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol*. 2000 Feb;24(1):11-4.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005 Feb;144(4):449-58. Review.
- VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res*. 2000 Jul;47(1):38-48. Review.
- Weiner CP, Thompson LP. Nitric oxide and pregnancy. *Semin Perinatol*. 1997 Oct;21(5):367-80. Review.
- Williams SP, Dorn GW 2nd, Rapoport RM. Prostaglandin I2 mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994 Aug;267(2 Pt 2):H796-803.
- Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction*. 2003 Nov;126(5):569-77. Review.
- Xiao D, Pearce WJ, Zhang L. Pregnancy enhances endothelium-dependent relaxation of ovine uterine artery: role of NO and intracellular Ca(2+). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jul;281(1):H183-90.
- Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2002 May;136(1):104-10.

Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension*. 2003 Jan;41(1):143-8.

Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, Feletou M. Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Jun;43(6):815-20.

Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S10-8.