

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

MARIA REGINA MARTINEZ

**INTERAÇÃO ENTRE AS VIAS DE FORMAÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO E PROSTANÓIDES NA HIPOREATIVIDADE VASCULAR
A CONSTRITORES ASSOCIADA AO TÉRMINO DA GESTAÇÃO
EM RATAS**

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA REGINA MARTINEZ

Interação entre as vias de formação de óxido nítrico e prostanóides na hiporeatividade vascular a constritores associada ao término da gestação em ratas

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado

Ribeirão Preto
2008

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

Martinez, Maria Regina

Interação entre as vias de formação de óxido nítrico e prostanóides na hiporeatividade vascular a constritores associada ao término da gestação em ratas./ Maria Regina Martinez; orientadora Maria Cristina de Oliveira Salgado. – Ribeirão Preto, 2008.

83 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Reatividade vascular. 2. Gravidez. 3. Óxido Nítrico. 4. Prostanóides.

Folha de Aprovação

Maria Regina Martinez

Interação entre as vias de formação de óxido nítrico e prostanoídes na hiporeatividade vascular a constritores associada ao término da gestação em ratas.

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

Instituição: ICB – USP Assinatura: _____

Prof. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Instituição: EERP – USP Assinatura: _____

Profa. Dra. Daniella Bonaventura

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

***Dedico este trabalho ao meu filho
Gabriel, criança companheira e
querida que me inspira e me ama
todos os dias.***

Agradeço a todos que, durante esses anos, contribuíram de diferentes formas para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial agradeço:

à Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado pela sua orientação e acolhimento em seu laboratório para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço, ainda, o seu empenho em me motivar no desenvolvimento do meu doutoramento nos momentos difíceis e a sua amizade.

aos Professores Doutores Maria Cristina de Oliveira Salgado, Maria Helena Catelli de Carvalho, Lusiane Maria Bendhack, Carlos Renato Tirapelli e Daniella Bonaventura pela disponibilidade em fazer parte da comissão julgadora dessa tese.

ao Prof. Dr. Gustavo Ballejo Oliveira pela sua colaboração nesse trabalho e pelas discussões desafiadoras que tanto me fizeram crescer cientificamente.

aos técnicos do laboratório, Osmar Vettore e Orlando Mesquita Jr., que dividiram seu conhecimento e habilidade, auxiliando-me nos experimentos e colaborando para o meu crescimento técnico. Agradeço, ainda, sua amizade e convivência.

aos colegas do laboratório e aos colegas de pós-graduação dos Departamentos de Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica que me ensinaram muito sobre ciência e amizade.

à aluna de Iniciação Científica Maria Lúcia Buziqui Piruzeli, a querida Malu, que colaborou com a realização de alguns experimentos constituintes desse trabalho e com a construção do meu aprendizado de orientação em pesquisa.

aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela transmissão de conhecimentos durante o curso de pós-graduação e pela convivência companheira e acolhedora.

aos docentes da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas várias oportunidades de ministrar aulas em seus cursos, contribuindo, assim, para o meu desenvolvimento docente.

aos funcionários da secretaria, Ramon, Sônia e Fátima, e do biotério, Eliana e Inês, pelo constante atenção e disponibilidade.

à Universidade Federal de Alfenas – MG, em especial ao Departamento de Enfermagem, que possibilitou parte da minha formação neste doutoramento através da liberação de parte das minhas atividades docentes, oferecimento de bolsa de incentivo e constante apoio pessoal.

à minha família, em especial meu filho Gabriel, que acompanhou meu trabalho desde os primeiros experimentos até a confecção da tese com muito amor e carinho.

à Fapesp e à Capes, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Adaptações hemodinâmicas durante a gestação.....	13
1.2. Controle do tônus vascular durante a gestação	14
1.2.1. Fatores relacionados ao endotélio vascular.....	16
1.2.1.1. Participação do óxido nítrico	16
1.2.1.2. Participação de prostanóides.....	19
1.2.2. Fatores relacionados à musculatura vascular.....	21
1.3. Interações entre as vias de formação do óxido nítrico e dos prostanóides	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. METODOLOGIA	27
3.1. Animais.....	28
3.2. Reatividade vascular	28
3.3. Protocolos experimentais	30
3.4. Drogas e substâncias utilizadas.....	33
4. ANÁLISE DOS DADOS.....	34
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

Resumo

MARTINEZ, M. R. **Interação entre as vias de formação de óxido nítrico e prostanóides na hiporeatividade vascular a constritores associada ao término da gestação em ratas.** 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O término da gestação em ratas está associado a uma diminuída reatividade a agentes vasoconstritores que pode ser mediada por alterações na produção ou liberação de óxido nítrico (NO) e/ou prostanóides. Este trabalho estuda a contribuição do NO e/ou prostanóides, além de uma possível interação entre os produtos dependentes da atividade NOS e COX, na diminuída resposta a constritores em anéis de aorta de ratas ao término da gestação. Curvas concentração-efeito à fenilefrina (FE) ou cloreto de potássio (KCl) foram construídas em anéis de aorta torácica de ratas não grávidas (NG, na fase estro do ciclo estral) e grávidas (G, 19-20 dias de gestação). Os experimentos foram realizados em vasos com o endotélio preservado ou removido, na ausência ou presença de inibidor de NOS, N^G-nitro-L-arginina (L-NNA, 100 µM), sequestrador de NO, hemoglobina (Hb, 10 µM), de inibidor da COX, diclofenaco de sódio (DF, 10 µM), e de inibidor da sintase de TXA₂, ozagrel (OZ, 1 µM). As respostas contráteis à FE e ao KCl foram diminuídas em anéis de aorta de G. Após remoção da camada endotelial e na presença de L-NNA ou Hb as respostas foram aumentadas e as diferenças entre os grupos diminuíram. DF sozinho não afetou a resposta em anéis de G e NG. A adição de L-NNA ou Hb após a incubação com DF aumentou a reatividade de NG e G, mas não aboliu as diferenças entre os grupos. De modo similar ao DF, OZ não alterou a reatividade à FE e ao KCl, mas afetou o efeito do L-NNA. Surpreendentemente, a adição de L-NNA antes de OZ foi capaz de abolir as diferenças entre G e NG. Estes resultados sugerem que a inibição do NO na aorta de ratas grávidas favorece a formação de tromboxano A₂; contudo, a formação de tromboxano A₂ depende da síntese prévia de NO.

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

Abstract

MARTINEZ, M. R. **Interaction between nitric oxide and prostaglandins formation pathways in the vascular hyporeactivity to constrictors associated to late pregnant rats.** 2008. Thesis (PhD) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Rat late pregnancy is associated with diminished reactivity to vasoconstrictor agents that may be mediated by altered production/release of nitric oxide (NO) and prostaglandins. This study examines the contribution of NO and/or prostaglandins and a possible interaction between the NOS- and COX-dependent products in pregnancy-associated blunted response to constrictors in rat aortic rings. Concentration-responses curves for phenylephrine (PE) or potassium chloride (KCl) were constructed in rings of thoracic aortic of nonpregnant (NP, estrous day) and late-pregnant rats (P, 19-20 day of pregnancy). The experiments were conducted in endothelium or endothelium-denuded vessels in the absence or presence of NOS-inhibitor N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA, 100 μM), NO-scavenger hemoglobin (Hb, 10 μM), COX-inhibitor sodium diclofenac (DF, 10 μM), and TXA₂ synthase-inhibitor ozagrel (OZ, 1 μM). The contractile response to PE and KCl was decreased in aortic rings from P rats. After endothelium-denudation and in the presence of L-NNA or Hb the responses were potentiated and the difference between the two groups was reduced. DF alone did not affect the responses of P and NP aortic rings. Addition of L-NNA or Hb after incubation with DF increased the reactivity of either NP or P but did not abolish the difference between P and NP. Similarly to DF, OZ did not alter the reactivity to FE and KCl but did affect the effect of L-NNA. Surprisingly, L-NNA addition before OZ was able to abolish the differences between P and NP. These results suggest that NO-inhibition in aorta of pregnant rats favors thromboxane formation; nevertheless, thromboxane formation depends on previous NO synthesis.

Keywords: Vascular reactivity. Pregnancy. Nitric oxide. Prostaglandins.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Adaptações hemodinâmicas durante a gestação

A gestação de mulheres é caracterizada por diversas alterações hemodinâmicas. O volume sanguíneo aumenta cerca de 30%, sendo uma adaptação importante para a nutrição e oxigenação do feto e para a perda de cerca de 500 a 1000 ml de sangue que ocorre durante o parto. Há um incremento de 50% do débito cardíaco que está relacionado a um aumento do volume sistólico e da frequência cardíaca. O volume sistólico está aumentado por um aumento do volume diastólico final, acompanhado por uma manutenção da fração de ejeção e por um aumento da força contrátil, mantidos pelo remodelamento do ventrículo esquerdo (Hennessy e cols, 1996; Gilson e cols, 1997; Thornburg e cols, 2000).

Embora o aumento do débito cardíaco acompanhado por aumento da frequência cardíaca devesse levar a um aumento da pressão arterial, durante a gravidez humana observa-se exatamente o inverso. Nos dois primeiros trimestres de gestação há uma queda da pressão arterial média que se deve à diminuída resistência periférica (Chapman e cols, 1998). Adicionalmente, a diminuição da resistência periférica é acompanhada por uma diminuída resposta pressora a constritores como a angiotensina II (Gant e cols, 1973).

Essas adaptações hemodinâmicas durante a gestação também são observadas em outras espécies animais. Em ratas, a diminuição da pressão arterial é progressiva, atingindo seu máximo ao término da gestação e retornando aos níveis de não grávidas após o parto (Teew & De Jong, 1973). Observa-se, também, durante a gestação desses animais, uma diminuída resposta pressora a

vasoconstritores como angiotensina II, vasopressina e noradrenalina (Teew & De Jong, 1973; Paller, 1984; Pan e cols, 1990), assim como hiporeatividade vascular a agentes constritores em vasos isolados (Harrison & Moore, 1989; St-Louis & Sicotte, 1992; Aloamaka e cols, 1993a e 1993b; Cadorette e cols, 2000; Ballejo e cols, 2002).

Essas adaptações hemodinâmicas que acompanham a gravidez permitem que o feto se desenvolva adequadamente e que o sistema cardiovascular materno não sofra sobrecarga pelo aumento do volume sanguíneo circulante. No entanto, uma pequena parcela das mulheres grávidas desenvolve a pré-eclâmpsia, patologia relacionada à alta morbidade e mortalidade da mãe e do feto, caracterizada por aumento da pressão arterial e da resistência vascular periférica, proteinúria, redução do volume plasmático e hiperreatividade a agentes constritores (Visser & Wallenburg, 1991; VanWijk e cols, 2000). Não é completamente compreendida a patofisiologia da pré-eclâmpsia e o seu tratamento consiste no alívio dos sintomas e adiantamento do parto, se necessário; portanto, um melhor entendimento do controle do tônus vascular durante a gestação normal poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para prevenção e controle dessa doença.

1.2. Controle do tônus vascular durante a gestação

Na literatura encontram-se diversos trabalhos investigando alterações de reatividade vascular durante a gestação, sendo que a maioria deles mostra uma hiporeatividade a constritores associada ao término da gestação; em vasos de condutância isolados de cobaias e ratas grávidas, como aorta, observa-se hiporeatividade à fenilefrina, sendo que, alguns trabalhos, mostram diminuição da

resposta máxima (Aloamaka e cols, 1993a e 1993b; Cadorette e cols, 2000) e, outros, deslocamento da curva concentração-efeito para a direita (Harrison & Moore, 1989; St-Louis & Sicotte, 1992; Ballejo e cols, 2002). Esses tecidos também apresentam diminuição da reatividade a outros agentes vasoconstritores, como KCl e vasopressina (Aloamaka e cols, 1993b; Cadorette e cols, 2000). A hiporeatividade durante a gestação também está presente em vasos de pequeno calibre de diferentes espécies animais. Em anéis de artéria mesentérica observa-se diminuição da reatividade a vasoconstritores como fenilefrina, noradrenalina e vasopressina, associada ao término da gestação em ratas e cobaias (Parent e cols, 1990; Davidge & McLaughlin, 1992; St-Louis e cols, 1995). Em leito arterial mesentérico isolado e perfundido, em ratas grávidas observa-se hiporeatividade à fenilefrina, à noradrenalina, à angiotensina II, à vasopressina, à endotelina e à estimulação elétrica perivascular em relação a preparações de ratas não grávidas (Chu & Beilin, 1993; Ralevic & Burnstock, 1996; Coelho e cols, 1997). Artérias uterinas de cobaias grávidas apresentam hiporeatividade à noradrenalina, serotonina e U46619 (um análogo do tromboxano A_2) quando comparadas com artérias de não grávidas (Weiner e cols, 1991 e 1992a). Em coelhas ao término da gestação se observa aumento da condutância de artérias mesentérica e femoral e hiporeatividade à noradrenalina e U46619 em arteríolas isoladas da musculatura esquelética (Brooks e cols, 2001; Ungvari e cols, 2002).

Tem sido proposto que essa hiporeatividade arterial aos vasoconstritores pode ser conseqüência de uma produção aumentada de autacóides vasodilatadores de origem endotelial, já que a retirada do endotélio aumenta a reatividade e iguala as respostas à estimulação com vasoconstritores dos vasos obtidos de grávidas e não-grávidas (Aloamaka e cols, 1993a e 1993b; Ballejo e cols, 2002). Dentre os

autacóides vasodilatadores derivados do endotélio melhor caracterizados estão o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂).

1.2.1. Fatores relacionados ao endotélio vascular

1.2.1.1. Participação do óxido nítrico (NO)

Em 1980, a partir do estudo de Furchgott e Zawadsky, ficou estabelecida a importância do endotélio para o controle do tônus vascular. Neste estudo, os pesquisadores demonstraram que o efeito vasodilatador da acetilcolina, em vasos isolados, dependia da liberação de um fator relaxante derivado do endotélio, o EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*). Inicialmente, foi sugerido que o EDRF fosse um radical livre derivado do metabolismo do ácido araquidônico (Furchgott, 1984). Mais tarde, em 1987, Palmer e colaboradores demonstraram que cultura de células endoteliais de aorta liberava NO, detectável por quimioluminescência, em concentrações suficientes para produzir vasodilatação, mostrando que o EDRF era o NO.

O NO é um radical livre biatômico, instável, que contém um elétron não pareado e que, portanto, pode reagir com qualquer composto oxidante fraco ou com agentes redutores (Kanner e cols, 1991) e pode se difundir livremente através de membranas biológicas (Welch & Loscalzo, 1994). O NO é sintetizado pela enzima sintase de NO (NOS) que utiliza o aminoácido L-arginina como substrato (Palmer e cols, 1988). A síntese do NO pela NOS implica inicialmente na formação do N^o-hidróxi-L-arginina (L-OHArg) pela monooxigenação da L-arginina dependente de NADPH e tetrahidrobipiterina (BH₄). Num segundo passo, a L-OHArg tem a ligação

C=N clivada ocorrendo a formação de citrulina e NO. Em ambos os passos ocorrem o consumo de NADPH e O₂ (Alderton e cols, 2001).

A NOS é uma enzima presente em uma grande variedade de células e que pode se apresentar sob as isoformas constitutivas (NOS neuronal ou endotelial) ou induzível. No vaso podemos encontrar expressas a NOS endotelial (NOSe) na camada endotelial (Knowles & Moncada, 1994) e a NOS neuronal (NOSn) na camada muscular (Papadaki e cols, 1998; Cheah e cols, 2002), além de poder haver expressão de NOS induzível, após um estímulo apropriado, tanto no endotélio como no músculo (Knowles e cols, 1990; Rees e cols, 1990).

As NOS constitutivas, e, portanto, a NOSe, são consideradas enzimas dependentes da ligação do complexo cálcio-calmodulina para serem ativadas. A formação desse complexo ocorre com o aumento da concentração de cálcio intracelular estimulado por agonistas dependentes ou independentes de receptor, como a acetilcolina e o ionóforo de cálcio A-23187, respectivamente. Uma forma de ativar a NOSe, independentemente do aumento intracelular de cálcio, é a fosforilação dessa enzima, que ocorre durante o estresse de cisalhamento (*shear stress*) induzido por fluxo, por exemplo (Ayajiki e cols, 1996; Fleming & Busse, 1999).

O NO gerado pela NOS se difunde pelas membranas e pode atingir a guanilato ciclase (GC) solúvel presente nas células musculares lisas, estimulando essa enzima a converter GTP em GMPc (Ignarro, 1992). 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 quinase da cadeia leve da miosina. A fosforilação da quinase da cadeia leve da miosina causa diminuição da concentração citoplasmática de Ca²⁺ por

promover efluxo de Ca^{2+} para o meio extracelular e/ou armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, resultando em relaxamento (Rapoport & Murad, 1983; Waldman & Murad, 1987; Sonenburg & Beavo, 1994). A formação de GMPc via NO pode causar relaxamento também por ativação de canais para potássio presentes na membrana das células do músculo liso vascular, promovendo aumento do efluxo de potássio e consequente hiperpolarização da membrana (Archer e cols, 1994).

A produção de NO pode ser inibida por análogos da L-arginina como N^{ω} -nitro-L-arginina (L-NNA) e N^{ω} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Moncada e cols, 1991; Chinellato e cols, 1998), que inibem de maneira competitiva a atividade da NOS. Outra maneira de impedir a ação do NO é utilizar inibidores de GC, como o 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalim-1-ona (ODQ; Schrammel e cols, 1995), ou seqüestradores de NO, como a hemoglobina (Gruetter e cols, 1981; Martin e cols, 1985).

A infusão de inibidores da NOS em ratas grávidas e não grávidas aumenta e iguala a pressão arterial de ambas, além de restaurar a resposta pressora à angiotensina II, vasopressina e noradrenalina nas primeiras (Molnár & Hertelendy, 1992; Nathan e cols, 1995).

Em leito arterial mesentérico, perfundido *in situ*, observa-se hiporeatividade vascular à noradrenalina, associada ao término da gestação em ratas, que é corrigida após uma infusão de L-NNA 30 min antes da administração do vasoconstritor (Chu & Beilin, 1993). Somado a isso, dados do nosso laboratório demonstram que a presença de L-NNA, na solução de perfusão de leito arterial mesentérico isolado de ratas grávidas, reverte a hiporeatividade à fenilefrina e à estimulação elétrica perivascular observada em relação a de ratas não grávidas (Coelho e cols, 1997; Ballejo e cols, 2002).

A pré-incubação com L-NAME, outro inibidor da NOS, não reverte a hiporeatividade à fenilefrina associada ao término da gestação em anéis de artéria mesentérica isolada de ratas, apesar do aumento da reatividade a esse vasoconstritor observado em grávidas e não grávidas (Davidge & McLaughlin, 1992). No entanto, em nosso laboratório demonstrou-se que a presença de L-NNA em anéis de aorta de ratas é capaz de, além de aumentar a resposta dos vasos de grávidas e não grávidas, abolir as diferenças de reatividade à fenilefrina entre esses grupos (Ballejo e cols, 2002, Martinez e cols, 2004).

Além dos estudos funcionais, estudos moleculares sugerem que, durante a gestação, pode haver uma maior produção de NO. Em artérias aorta, uterina e mesentérica de ratas e ovelhas tem sido demonstrado aumento da quantidade de RNA mensageiro para NOSe, bem como aumento da expressão protéica dessa enzima (Goetz e cols, 1994; Xu e cols, 1996; Magness e cols, 1997; Magness e cols, 2001). Somado a isso, em artéria uterina humana, há aumento da atividade e da expressão da NOSe associado à gestação (Nelson e cols, 2000).

1.2.1.2. Participação de prostanóides

Além do NO, outras substâncias vasoativas, como os prostanóides, são importantes moduladoras do tônus vascular, podendo participar da hiporeatividade a constritores associada à gestação. A produção desses agentes é regulada pela disponibilidade do ácido araquidônico e pela atividade da enzima ciclooxigenase (COX). Essa enzima catalisa, a partir do ácido araquidônico, a formação de endoperóxido cíclico (PGG₂), que sofre redução formando um outro endoperóxido cíclico, PGH₂. Uma vez formado, PGH₂ é convertido por diferentes enzimas a vários

prostanóides, como prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 (TxA_2) (Goodwin e cols, 1999). A PGI_2 é um potente vasodilatador, sendo produzido nas células endoteliais, por outro lado, o TxA_2 , que exerce efeito vasoconstritor, embora seja produzido de maneira mais importante em plaquetas, também pode ser sintetizado por células endoteliais (Davidge, 2001).

Durante a gravidez humana há um aumento progressivo dos níveis plasmáticos de PGI_2 e diminuição progressiva dos níveis de TxA_2 (Wang e cols, 1991). Em ratas, há aumento da excreção de metabólitos urinários de prostanóides (Schafer e cols, 1993 e 1996) e, em artérias uterinas de ovelhas, há aumento da produção de prostaciclina basal e estimulada por angiotensina II (Magness & Rosenfeld, 1993). Adicionalmente, em aortas de ratas e em células endoteliais de artérias uterinas de ovelhas grávidas, foi detectada maior expressão de COX (Davidge e cols, 1993; Janowiak e cols, 1998; Habermehl e cols, 2000).

Em mulheres grávidas, Everett e cols (1978) observaram que o tratamento com indometacina ou aspirina, inibidores da COX, foi capaz de aumentar a resposta da pressão arterial à angiotensina II. De maneira semelhante em ratas, foi demonstrado que o tratamento com outro inibidor da COX, o meclofenamato, foi capaz de aumentar as respostas pressoras a angiotensina II, noradrenalina e vasopressina de grávidas, igualando-as às de não grávidas (Paller, 1984). No entanto, em leito arterial mesentérico de rata perfundido *in situ*, o pré-tratamento com indometacina aumentou a reatividade à noradrenalina e à estimulação elétrica perivascular, mas não alterou as diferenças entre grávidas e não grávidas (Chu & Beilin, 1993). Em artérias mesentéricas e aortas torácicas isoladas de ratas, a presença de meclofenamato não alterou a resposta contrátil à fenilefrina em grávidas e não grávidas (Harrison & Moore, 1989; Davidge & McLaughlin, 1992). No entanto,

em artérias uterinas isoladas de cobaias e arteríolas da musculatura esquelética de ratas grávidas há uma diminuição da potência do tromboxano A₂ (verificada pelo efeito contrátil de concentrações cumulativas do seu análogo estável U46619) (Weiner e cols, 1992b; Ungvari e cols, 2002).

Não há dados na literatura que demonstrem um papel determinante da atividade da COX nas alterações vasculares relacionadas à gestação, no entanto as alterações descritas na produção de prostanóides e os efeitos observados com sua inibição em vasos de grávidas não permitem descartar a hipótese de algum papel coadjuvante pouco esclarecido.

1.2.2. Fatores relacionados à musculatura lisa vascular

Durante a gestação, além do aumento da produção de NO que modula a reatividade vascular, a própria resposta muscular a constritores pode estar modificada. Está bem descrito que a contração do músculo liso vascular, em resposta a vasoconstritores, depende de um aumento na concentração de cálcio citoplasmático que, dependendo do agente constritor, pode ser tanto pelo influxo do meio extracelular quanto pela liberação de estoques intracelulares ou ambos. Esse aumento da concentração intracelular de cálcio propicia a interação entre as proteínas contráteis actina e miosina (Rembold, 1992). Aparentemente, em vasos de grávidas, ocorrem alterações relacionadas ao influxo de cálcio que podem alterar a resposta a constritores.

Ao término da gestação, a musculatura lisa vascular parece menos eficiente na mobilização de cálcio extracelular diante de um estímulo constritor, uma vez que a incubação de nifedipina, um bloqueador de canal para cálcio dependente

de voltagem, em artérias isoladas de ratas grávidas e não grávidas, pouco altera a reatividade à vasopressina e à fenilefrina das primeiras, mas reduz de maneira importante das últimas, igualando as respostas de ambas (St-Louis e cols, 1995; Roy e cols, 1995). Foi demonstrado, ainda, que o tratamento crônico com nifedipina induz uma queda da pressão arterial em ratas virgens, semelhante àquela observada em ratas ao término da gestação (Simaan e cols, 2002).

O aumento da produção de NO pode ser o responsável pela redução na mobilização de cálcio extracelular observado durante a gestação, desde que, em aortas de ratas grávidas, a inibição da NOS aumenta o influxo de cálcio após estímulo com fenilefrina ou cloreto de potássio (KCl) (Crews e cols, 1999).

Esse aumento de NO relacionado à gestação também poderia alterar a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio. Tem sido demonstrado, em artérias despolarizadas com KCl, uma diminuição da reatividade contrátil a concentrações crescentes de cálcio na presença de nitroprussiato de sódio, um doador de NO, que é parcialmente revertida pela inibição da enzima fosfatase da cadeia leve de miosina, indicando mais uma alteração de sensibilidade da musculatura ao cálcio, do que uma modificação na sua concentração citoplasmática (Bolz e cols, 2003).

Adicionalmente, variações nas condições experimentais podem privilegiar a observação das alterações de reatividade a constritores, referentes à gestação, relacionadas ao endotélio, em detrimento daquelas relacionadas à musculatura lisa vascular. Vasos submetidos a tensões passivas iniciais mais baixas (0,5; 0,75 e 1,0 grama) tendem a não apresentar alterações associadas ao término da gestação após a remoção da camada endotelial, como se todas as alterações de reatividade observadas nesses vasos dependessem de produtos endoteliais. No entanto, em anéis de aorta sem o endotélio, submetidos a 2,0 gramas de tensão passiva inicial,

observa-se uma diminuição de reatividade a agonistas α_1 -adrenérgicos associada ao término da gestação (Dièye & Gairard, 2003; Martinez e cols, 2004).

Considerando esses dados, embora essa tese tenha como objetivo buscar entender alguns fenômenos relacionados à modulação endotelial da reatividade vascular ao término da gestação em ratas, não ignora a importância da participação do músculo liso vascular na determinação de algumas alterações de reatividade observadas nesse modelo em certas condições experimentais.

1.3. Interações entre as vias de formação do óxido nítrico e dos prostanóides

Não podemos descartar possíveis interações entre as vias de formação de NO e prostanóides. Os primeiros achados que sugerem a possibilidade dessas interações são da década de 90, quando Salvemini e cols (1993) demonstraram que a adição de inibidores da NOS em cultura de macrófagos estimulados com LPS resulta, não somente na diminuição de formação de nitrito, mas também em uma diminuição da síntese de prostaglandina E_2 , sendo que a adição de indometacina inibe a síntese deste prostanóide sem alterar a formação de nitrito.

Essas interações têm se mostrado complexas e dependentes do modelo experimental utilizado. Em cultura de células endoteliais de coronária bovina a liberação de NO induzida por A23187, um ionóforo de cálcio, aumenta a produção de prostaciclina e tromboxano A_2 (Davidge e cols, 1995) e a adição de doadores de NO é capaz de aumentar a atividade da COX de maneira concentração-dependente (Macarronne e cols, 1997).

Em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana submetida a estresse de cisalhamento (*shear stress*), a inibição da NOS resulta em uma potencialização da liberação de prostaciclina (Osanai e cols, 2000). Por outro lado, em microvasculatura de músculo cremaster de rato, o tratamento com L-NNA, após a inibição da COX, induz um aumento adicional do tônus relacionado à ativação de receptores de tromboxano A_2 e endoperóxido (TXA_2/PGH_2) quando comparado com os animais que receberam somente o inibidor da NOS, sugerindo que a inibição da NOS favoreceu a produção de prostanóides constritores nestes vasos (Laemmel e cols, 2003).

Além da indução e a inibição da produção de NO ser capaz de alterar a atividade da COX e a consequente formação de prostanóides, a inibição da via de síntese desses prostanóides pode alterar também a atividade da NOS. Em cultura de células endoteliais suínas a inibição da NOS induz um aumento da produção basal de tromboxano A_2 e, por outro lado, a inibição da enzima sintase de tromboxano A_2 , com ozagrel, induz um aumento da liberação de NO (Miyamoto e cols, 2007).

Diante desses dados, esse trabalho propôs testar a hipótese de que parte dos fenômenos dependentes do endotélio, relativos à alteração de reatividade a constritores ao término da gestação em ratas, pode envolver interações entre as vias de formação de NO e prostanóides.

2. *Objetivos*

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi investigar a interação entre as vias de formação de NO e prostanóides nas alterações de reatividade vascular a constritores em artéria aorta de ratas grávidas ao término da gestação.

3. Metodologia

3. Metodologia

3.1. Animais:

Os experimentos foram realizados utilizando ratas Wistar (200g) provenientes do biotério Central do Campus 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 foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados respeitaram preceitos éticos da pesquisa com animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto, USP.

Os animais foram divididos de modo que parte deles foi destinada a compor o grupo de ratas não grávidas e a outra parte foi submetida ao acasalamento. As ratas foram utilizadas ou no período final da gestação (19-20° dia), sendo que o dia "zero" de gestação foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal matinal, ou na fase estro do ciclo estral. As fases do ciclo estral foram determinadas pela diferenciação celular observada no esfregaço vaginal das ratas (Montes & Luque, 1988; Marcondes e cols, 2002).

3.2. Reatividade Vascular:

As ratas foram anestesiadas com tribromoetanol 2,5% (1 mL/100g de peso) e, em seguida, sacrificadas por decapitação. A seguir, a aorta torácica foi isolada e dissecada de tecidos conjuntivos e, de sua parte proximal, foram cortados

anéis de aproximadamente 3 mm de largura. Dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen de cada anel. Um destes ganchos estava 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, em gramas, 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 (10 mL) contendo solução nutriente de Krebs (em mmol/L: 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 gaseificação constante com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2).

Antes do início de cada experimento, os anéis de aorta, após um período de estabilização de 45 minutos em uma tensão passiva de 0,5 ou 2,0 gramas, de acordo com o protocolo experimental, foram desafiados, repetidas vezes, com uma concentração fixa de fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$), um agonista α_1 -adrenérgico, até apresentarem respostas vasoconstritoras semelhantes; a presença do endotélio vascular foi verificada pela resposta vasodilatadora à acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$) em preparações pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$), sendo exigido um relaxamento de pelo menos 80% para o endotélio ser considerado íntegro. A tensão passiva de 0,5 grama foi utilizada por ser o estiramento ideal para estudar a participação do NO, e a tensão passiva de 2,0 gramas foi utilizada em alguns experimentos por ser ideal para a visualização da participação da musculatura lisa vascular na determinação da hiporeatividade associada ao término da gestação, segundo dados anteriores do nosso laboratório (Martinez, 2004).

Naqueles protocolos experimentais em que se pretendia verificar a importância da camada endotelial na reatividade vascular, foi realizada a retirada do endotélio, por meio de leve fricção do anel entre os dedos indicador e polegar, antes do início do experimento. O sucesso do procedimento foi verificado pela ausência de resposta vasodilatadora à acetilcolina ($1 \mu\text{mol/L}$) em vasos pré-contraídos com fenilefrina ($0,1 \mu\text{mol/L}$).

3.3. Protocolos experimentais:

Visando demonstrar a participação do endotélio vascular nas alterações de reatividade a constritores ao término da gestação, realizaram-se experimentos onde foram construídas curvas cumulativas para fenilefrina (1 nmol/L a $10 \mu\text{mol/L}$) ou KCl ($2,5$ a 90 mmol/L) em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas, submetidos à tensão passiva de $0,5$ grama, na presença ou ausência do endotélio vascular (FIG. 1).

Durante o período de estabilização de todos os experimentos em que se realizaram curvas cumulativas para KCl os anéis foram submetidos à exposição, por 15 minutos seguida de lavagem, de $1 \mu\text{mol/L}$ de fenoxibenzamina, antagonista α -adrenérgico irreversível. Após esse procedimento os anéis foram desafiados com $0,1 \mu\text{mol/L}$ de fenilefrina com posterior lavagem e, somente naqueles em que não se desenvolvia resposta constritora ao estímulo α_1 -adrenérgico, o experimento se iniciava. Esse procedimento teve como objetivo excluir qualquer efeito constritor dependente da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos que poderia ser desencadeado pela despolarização pelo KCl e consequente esvaziamento de

vesículas noradrenérgicas das terminações nervosas que poderiam ter persistido nos vasos a despeito da manipulação cirúrgica (Aloamaka e cols, 1993b).

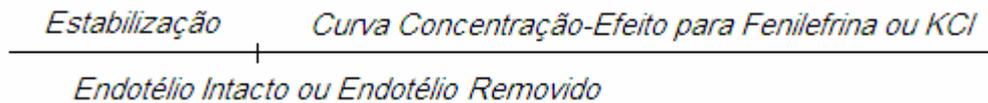


Figura 1. Esquema representativo dos protocolos experimentais que objetivaram estudar a participação do endotélio nas alterações de reatividade vascular a constritores ao término da gestação em ratas.

No intuito de justificar algumas observações realizadas durante a execução das curvas concentração-efeito para KCl, foram realizados alguns experimentos com fenilefrina utilizando-se 2 gramas de tensão passiva na presença ou ausência do endotélio vascular (FIG. 2).

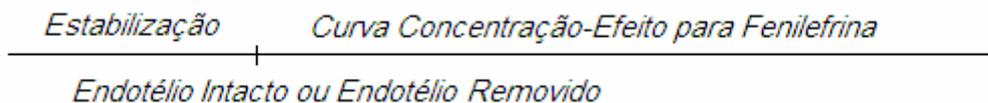


Figura 2. Esquema representativo dos protocolos experimentais que objetivaram estudar a participação do músculo liso vascular nas alterações de reatividade a constritores ao término da gestação em ratas.

Buscando-se verificar a importância da participação do NO e de prostanóides neste fenômeno, foram realizados experimentos com os constritores fenilefrina ou KCl, sob a tensão passiva de 0,5 grama, na presença dos inibidores da NOS (N^o-nitro-L-arginina - L-NNA – 100 µmol/L, diluído em 0,05N de HCl e incubado por 15 minutos) e da COX (diclofenaco de sódio, 10 µmol/L, incubação por 20 minutos), e na presença de droga seqüestradora de NO (hemoglobina, 10 µmol/L, incubação por 20 minutos) (FIG. 3).

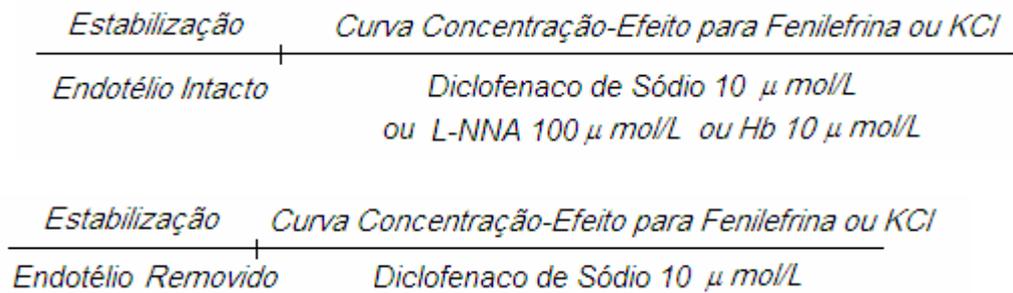


Figura 3. Esquema representativo dos protocolos experimentais que objetivaram estudar a participação do NO e de prostanóides nas alterações de reatividade vascular a constritores ao término da gestação em ratas.

Com a finalidade de investigar possíveis interações entre as vias de formação do NO e de prostanóides que pudessem determinar parte das alterações relacionadas à gestação, foram feitos experimentos realizando-se duas curvas cumulativas para os constritores, fenilefrina ou KCl, sob a tensão passiva de 0,5 grama, na presença ou ausência de inibidor da NOS (N^{ω} -nitro-L-arginina - L-NNA – 100 μ mol/L, incubação por 15 minutos) ou da COX (diclofenaco de sódio, 10 μ mol/L, incubação por 20 minutos) ou ambos e na presença de inibidor da enzima sintase de tromboxano A_2 (ozagrel, 1 μ mol/L, incubação por 20 minutos), bem como na presença de droga seqüestradora de NO (hemoglobina, 10 μ mol/L, incubação por 20 minutos). Entre o fim da primeira curva e início da segunda foi permitido um tempo de equilíbrio de 45 minutos. Por vezes, a ordem da adição dos inibidores foi trocada visando observar o efeito do NO sobre a formação de prostanóides e vice-versa. Protocolo semelhante foi realizado previamente, visando identificar possíveis interações entre as vias de formação de NO e prostanóides em arteríolas de músculo cremaster de rato, por Laemmel e cols (2003) (FIG. 4).

<i>Estabilização</i>	<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>		<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>
<i>Endotélio Intacto</i>	<i>Diclofenaco de Sódio 10 μ mol/L</i>	<i>L</i>	<i>Diclofenaco de Sódio 10 μ mol/L L-NNA 100 μ mol/L</i>
<i>Estabilização</i>	<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>		<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>
<i>Endotélio Intacto</i>	<i>Diclofenaco de Sódio 10 μ mol/L</i>	<i>L</i>	<i>Diclofenaco de Sódio 10 μ mol/L Hemoglobina 10 μ mol/L</i>
<i>Estabilização</i>	<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>		<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>
<i>Endotélio Intacto</i>	<i>Ozagrel 1 μ mol/L</i>	<i>L</i>	<i>Ozagrel 1 μ mol/L L-NNA 100 μ mol/L</i>
<i>Estabilização</i>	<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>		<i>Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina ou KCl</i>
<i>Endotélio Intacto</i>	<i>L-NNA 100 μ mol/L</i>	<i>L</i>	<i>L-NNA 100 μ mol/L Ozagrel 1 μ mol/L</i>

Figura 4. Esquema representativo dos protocolos experimentais que objetivaram estudar a interação das vias de produção de NO e de prostanoídes nas alterações de reatividade vascular a constritores ao término da gestação em ratas (L = lavagem).

3.4. Drogas e substâncias utilizadas:

Dentre as drogas: fenilefrina, L-NNA e hemoglobina foram obtidos da Sigma; acetilcolina da Merck; diclofenaco de sódio da Calbiochem; ozagrel da Tocris; e tribromoetanol da Aldrich Chemical Company. Os sais que compuseram a solução de Krebs foram obtidos da Merck.

4. Análise dos dados

4. 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.

Nos experimentos onde se realizaram curvas concentração-efeito, os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) dos valores de pD₂ (-log EC₅₀), EC50 e de efeito máximo (Emax). Os valores de pD₂ para fenilefrina e KCl foram calculados após ajuste dos dados em uma curva sigmoidal obedecendo uma equação de regressão não-linear. Foram comparados os valores de Emax e pD₂ das curvas concentração-efeito obtidas de anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas. Para a análise estatística foi utilizado teste t de Student ou teste de análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, sendo um valor de $P < 0,05$ considerado estatisticamente diferente. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Graph Pad Prism versão 3.0, 1999.

5. Resultados

5. Resultados

Inicialmente confirmou-se, no modelo experimental utilizado, achados preliminares referentes à hiporeatividade a constritores associada ao término da gestação em ratas.

A adição cumulativa de fenilefrina induziu contrações dependentes da concentração em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas. Na presença da camada endotelial, os anéis de aorta obtidos de ratas grávidas apresentaram uma diminuição da reatividade à fenilefrina quando comparados com os obtidos de ratas não grávidas, manifestada por redução do efeito máximo. A remoção do endotélio dos vasos obtidos de grávidas e não grávidas aumentou a resposta máxima e a potência da fenilefrina, abolindo as diferenças entre os grupos (FIG. 5).

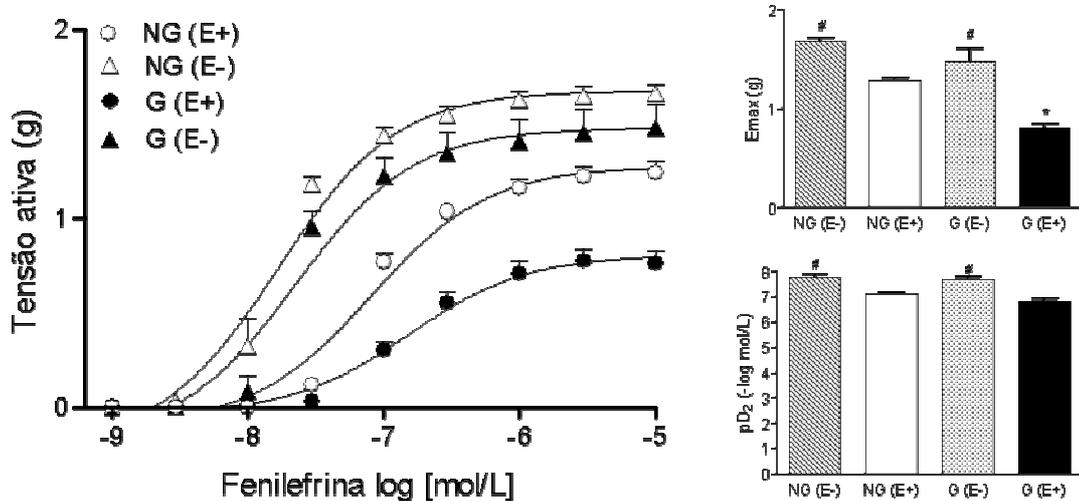


FIGURA 5. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) com o endotélio preservado (E+) ou retirado (E-). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=6-8), sendo # $P<0,05$ em relação a E+ e * $P<0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

A adição de KCl induziu contrações dependentes da concentração em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas. Na presença da camada endotelial as respostas contráteis obtidas em anéis de aorta de ratas grávidas foram menores do que aquelas obtidas em não grávidas (FIG. 6). A remoção do endotélio induziu um aumento da reatividade de anéis de aorta de grávidas e não grávidas ao KCl (FIG. 6). Essa alteração da resposta vascular ao KCl induzida pela remoção da camada endotelial não foi capaz de abolir as diferenças entre os grupos, mantendo a hiporeatividade associada à gestação (FIG. 6).

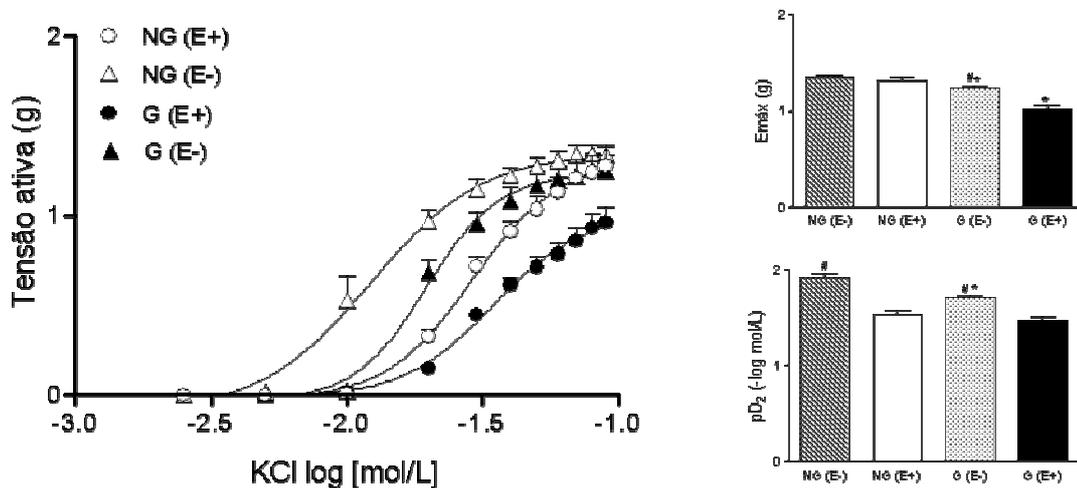


FIGURA 6. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo ($Emax$) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) com o endotélio preservado (E+) ou retirado (E-). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=5-6$), sendo # $P<0,05$ em relação a E+ e * $P<0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

Como a simples retirada do endotélio vascular não foi capaz de abolir completamente as diferenças relacionadas à gestação em vasos estimulados com KCl, pode-se inferir que parte da hiporeatividade vascular observada em anéis de aorta de ratas grávidas deve-se a componentes da musculatura lisa vascular. A condição experimental utilizada (0,5 grama de tensão passiva inicial) pode ser responsável pelo prejuízo da visualização do componente dependente da

musculatura lisa vascular na determinação da hiporeatividade à fenilefrina em anéis de aorta de grávidas. Variações da condição experimental, como o aumento no estiramento inicial a que o vaso é submetido (tensão passiva inicial de 2 gramas), permitem a visualização de uma hiporeatividade à fenilefrina relacionada ao término da gestação que é mantida mesmo após a remoção da camada endotelial (FIG. 7).

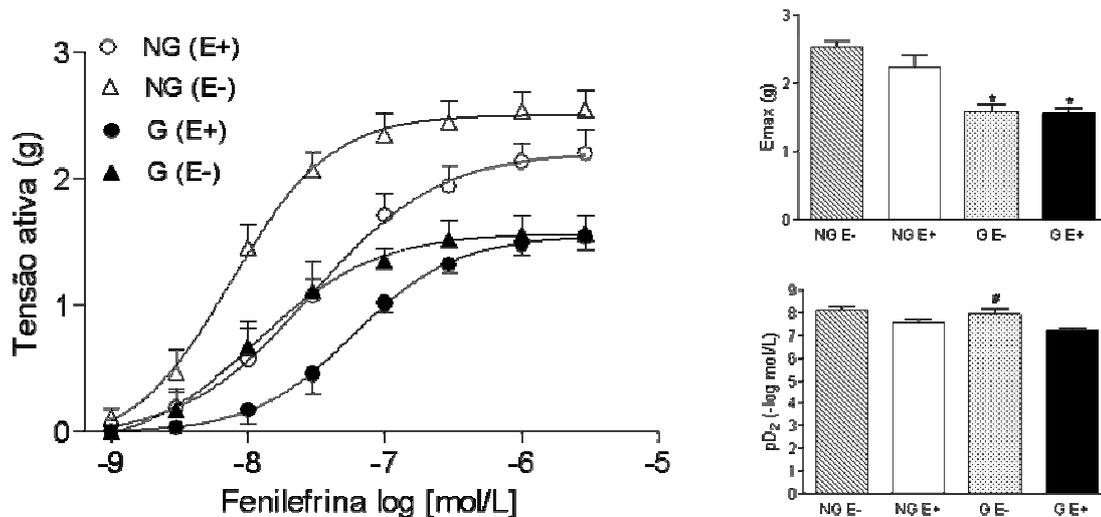


FIGURA 7. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 3 μ mol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) com o endotélio preservado (E+) ou retirado (E-) e submetidos a 2 gramas de tensão passiva inicial. Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=7-8), sendo # $P < 0,05$ em relação a E+ e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

Esses dados mostram que fatores endoteliais e musculares determinam as alterações de reatividade vascular de grávidas e que se pode, a partir de variações na tensão passiva inicial a que o vaso é submetido, dirigir o estudo para os fenômenos relativos ao endotélio ou ao músculo liso vascular.

Como esse trabalho tem o endotélio, bem como os seus produtos, como foco de estudo, nos protocolos subseqüentes optou-se por submeter os vasos a um estiramento inicial de 0,5 grama.

A inibição da produção de NO com 100 $\mu\text{mol/L}$ de L-NNA, inibidor da NOS, em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas, aumentou a potência e a eficácia da fenilefrina, sendo capaz de abolir as diferenças de reatividade entre esses grupos (FIG. 8). A eficácia da concentração utilizada de L-NNA em inibir a NOS foi comprovada pela ausência de relaxamento a 1 $\mu\text{mol/L}$ de acetilcolina. Em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas submetidas a concentrações crescentes de KCl, a pré-incubação de L-NNA induziu um aumento da reatividade ao constritor somente nas artérias obtidas de grávidas igualando a resposta contrátil de ambos os grupos (FIG. 9).

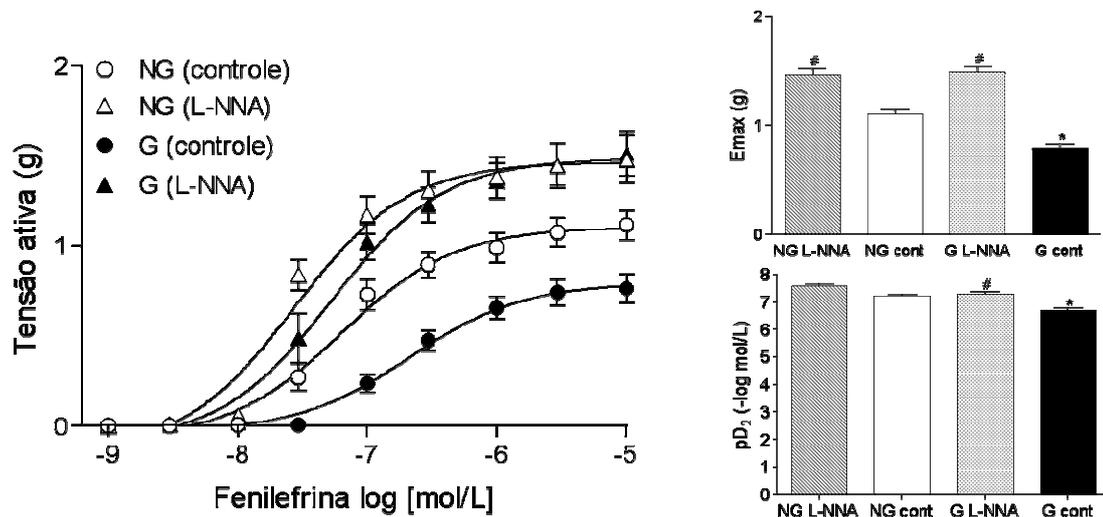


FIGURA 8. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 $\mu\text{mol/L}$) e valores de pD_2 e efeito máximo (Emax) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 100 $\mu\text{mol/L}$ de L-NNA. Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=5-7$), sendo [#] $P < 0,05$ em relação ao controle e ^{*} $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

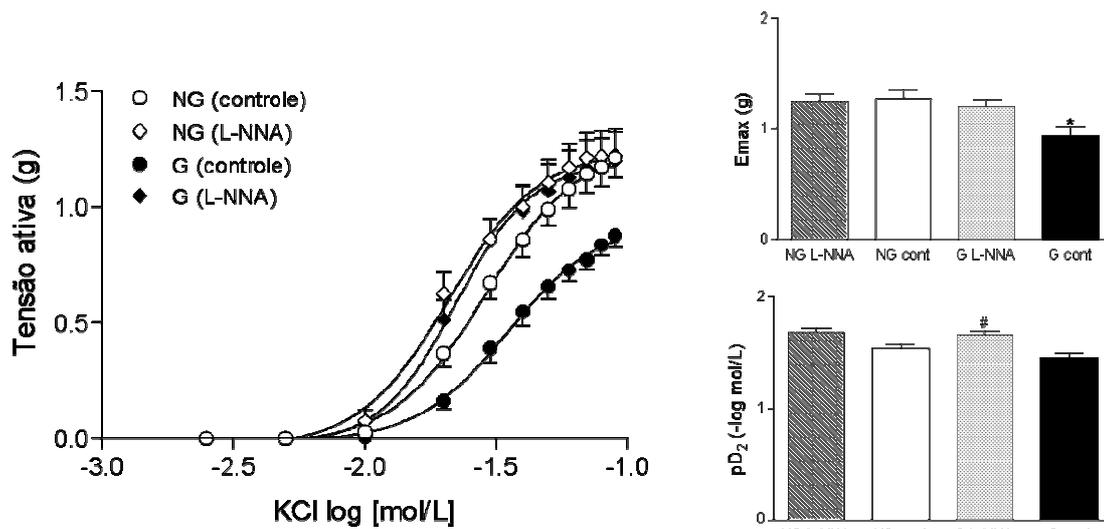


FIGURA 9. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{máx}$) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 100 $\mu\text{mol/L}$ de L-NNA. Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=7-11$), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

A diminuição da biodisponibilidade de NO com a adição de 10 $\mu\text{mol/L}$ de hemoglobina, droga seqüestradora de NO, em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas, aumentou a potência e a eficácia da fenilefrina, sendo capaz de abolir as diferenças de reatividade entre os grupos (FIG. 10). A eficácia da concentração utilizada de hemoglobina em diminuir a biodisponibilidade de NO foi comprovada pela ausência de relaxamento a 1 $\mu\text{mol/L}$ de acetilcolina. Em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas submetidas a concentrações crescentes de KCl, a pré-incubação de hemoglobina também induziu um aumento da reatividade ao constritor igualando a resposta contrátil dos grupos (FIG. 11).

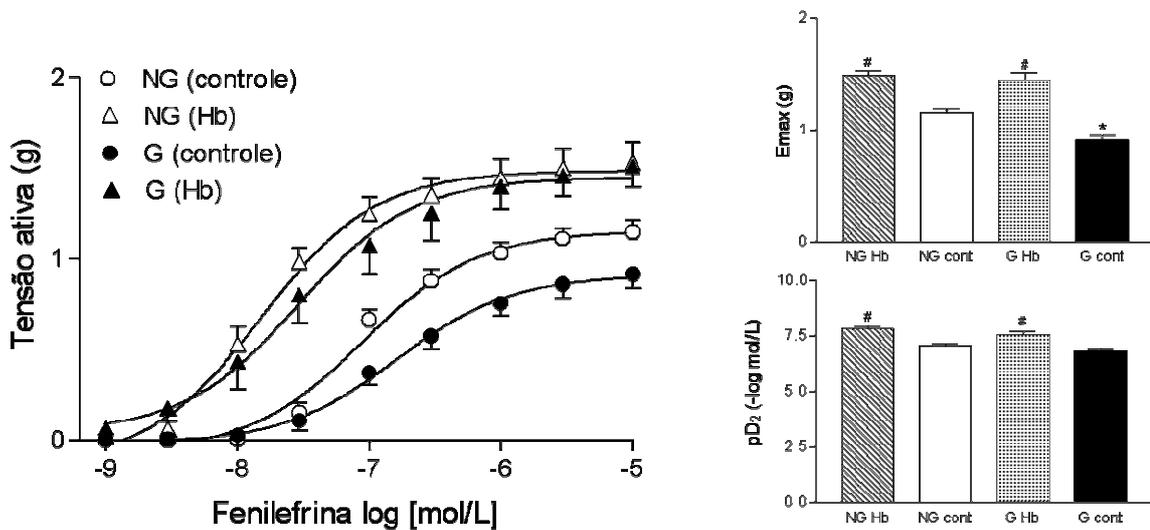


FIGURA 10. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 10 μ mol/L de hemoglobina (Hb). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=6-7), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

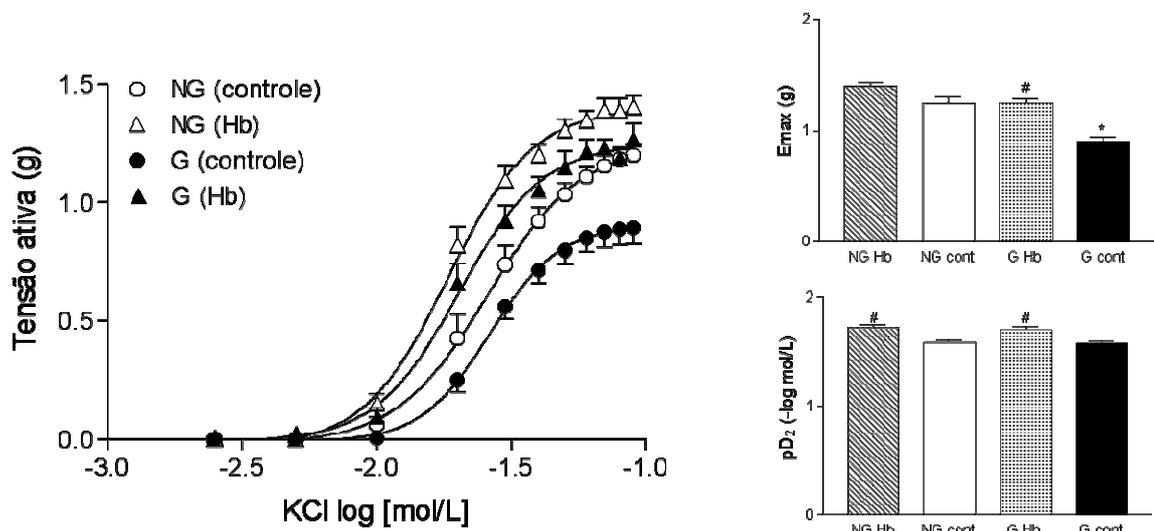


FIGURA 11. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 10 μ mol/L de hemoglobina (Hb). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5-8), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

A inibição da COX com 10 $\mu\text{mol/L}$ de diclofenaco de sódio não foi capaz de alterar a reatividade à fenilefrina e ao KCl de grávidas ou não grávidas de modo significativo, mantendo-se as diferenças de reatividade vascular relativas ao término da gestação (FIG. 12 e 13).

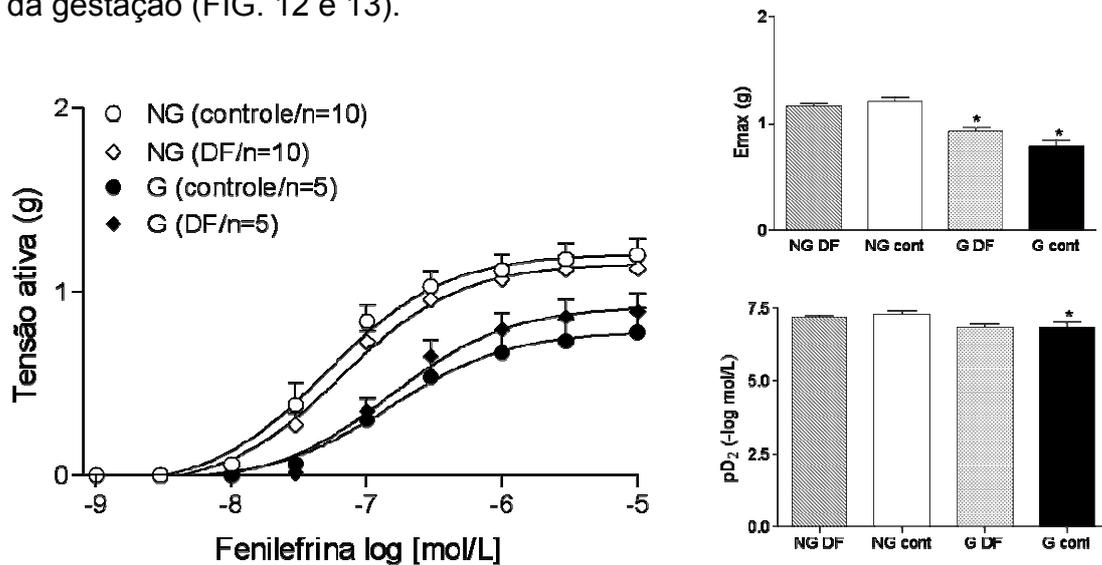


FIGURA 12. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 $\mu\text{mol/L}$) e valores de pD_2 e efeito máximo (Emax) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 10 $\mu\text{mol/L}$ de diclofenaco (DF). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5-10), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

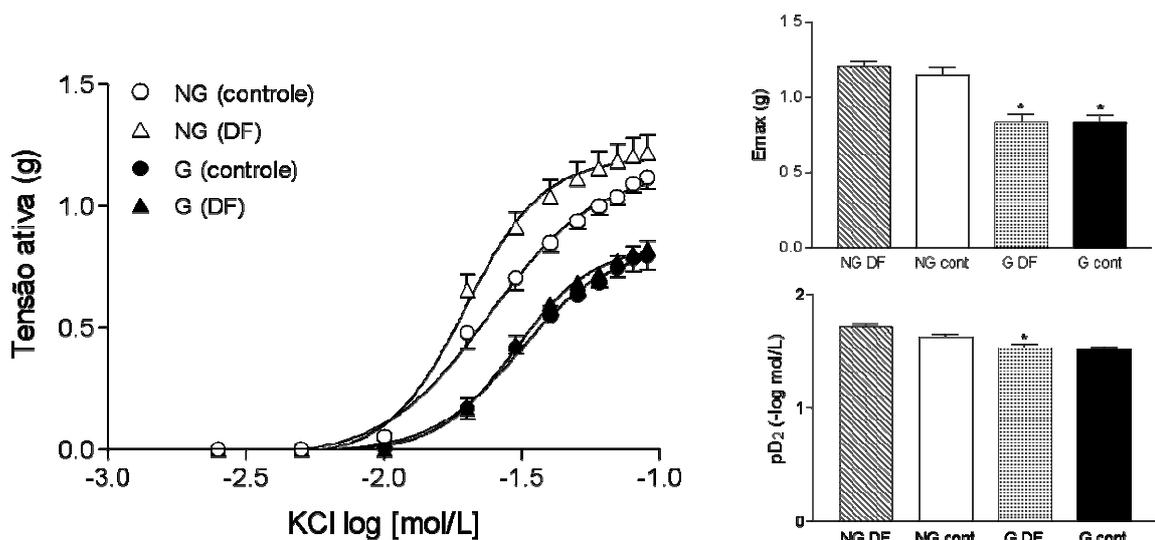


FIGURA 13. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (Emax) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na presença ou ausência de 10 $\mu\text{mol/L}$ de diclofenaco de sódio (DF). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5-9), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

A fim de identificar algum tipo de interação entre as vias de produção de NO e prostanóides, realizaram-se alguns protocolos experimentais utilizando-se inibidores da formação de NO ou prostanóides, onde foram construídas duas curvas cumulativas consecutivas para o agente constritor e os inibidores foram pré-incubados antes do início da primeira ou segunda curva, de modo a variar a ordem da adição das drogas conforme descrito na Metodologia.

A primeira e a segunda curva cumulativa dos anéis obtidos de grávidas ou não grávidas do grupo controle não diferiram, assegurando que a resposta dos vasos à fenilefrina e ao KCl não se alterava durante a realização desse tipo de protocolo experimental e permitia esse tipo de abordagem (FIG. 14 e 15).

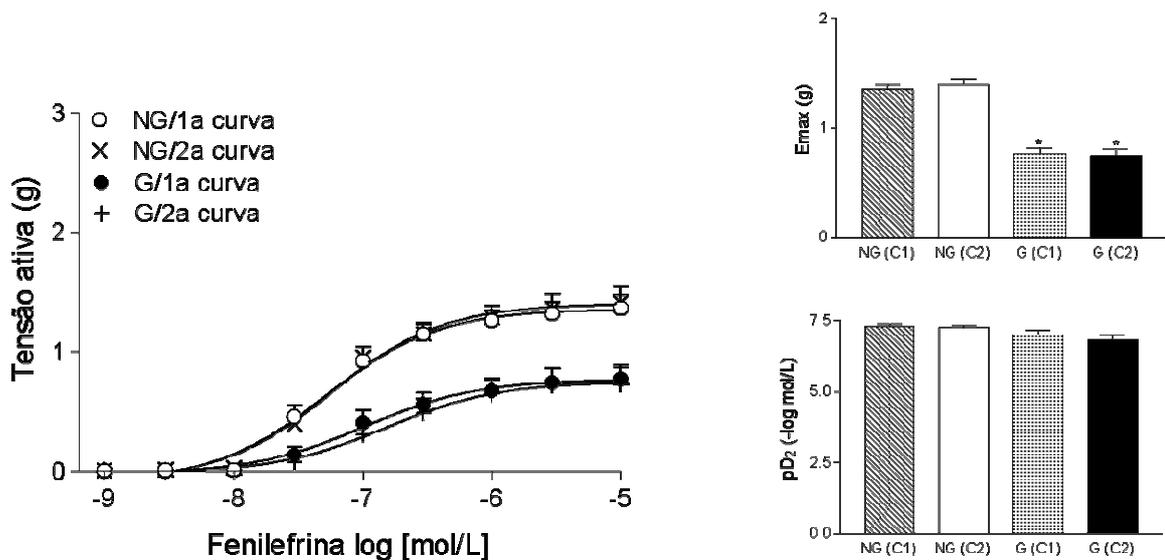


FIGURA 14. Curvas concentração-efeito consecutivas para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=5$), sendo * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

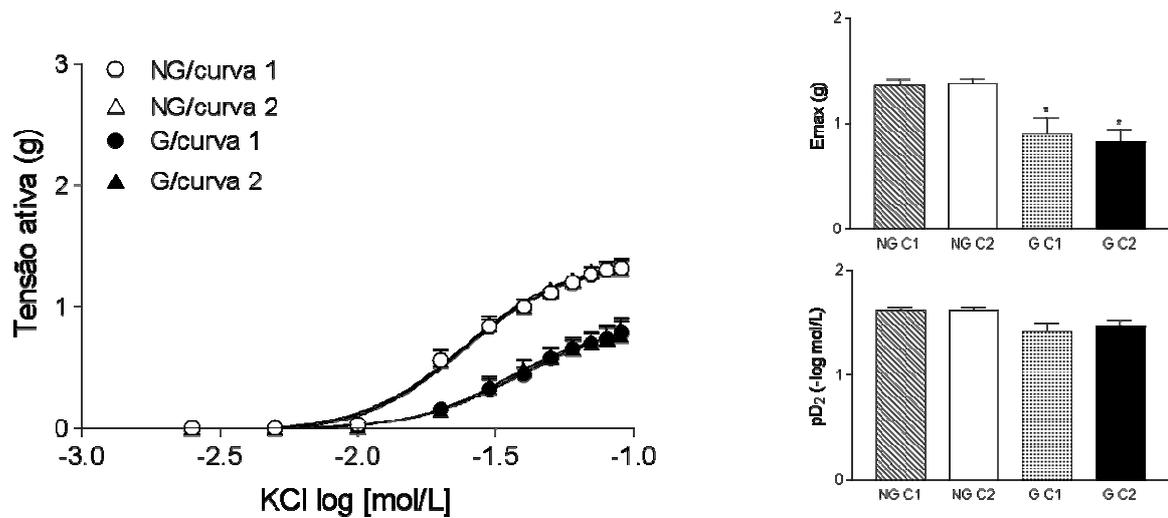


FIGURA 15. Curvas concentração-efeito consecutivas para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{máx}$) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=5$), sendo * $P<0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

Mais uma vez, a inibição da COX com diclofenaco não foi capaz de alterar as diferenças relacionadas ao término da gestação em vasos estimulados com fenilefrina e KCl. No entanto, quando a NOS foi inibida com L-NNA na presença de diclofenaco de sódio, observou-se que, embora houvesse um incremento na resposta à fenilefrina e ao KCl em artérias de grávidas e não grávidas com aumento da eficácia ou da potência dos constritores, as diferenças entre os grupos persistiam, diferentemente do que foi observado com a inibição isolada da NOS (FIG. 16 e 17).

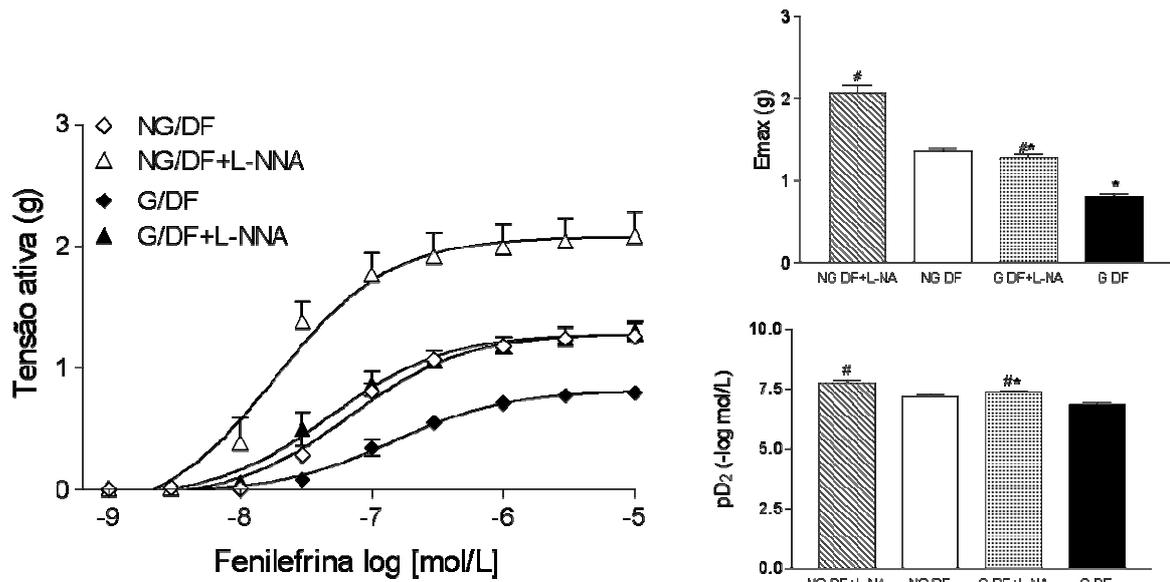


FIGURA 16. Curvas concentração-efeito consecutivas para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 10 μ mol/L de diclofenaco de sódio (DF), sendo que, na segunda, foram adicionados 100 μ mol/L de L-NNA (DF+L-NNA). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5-6), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

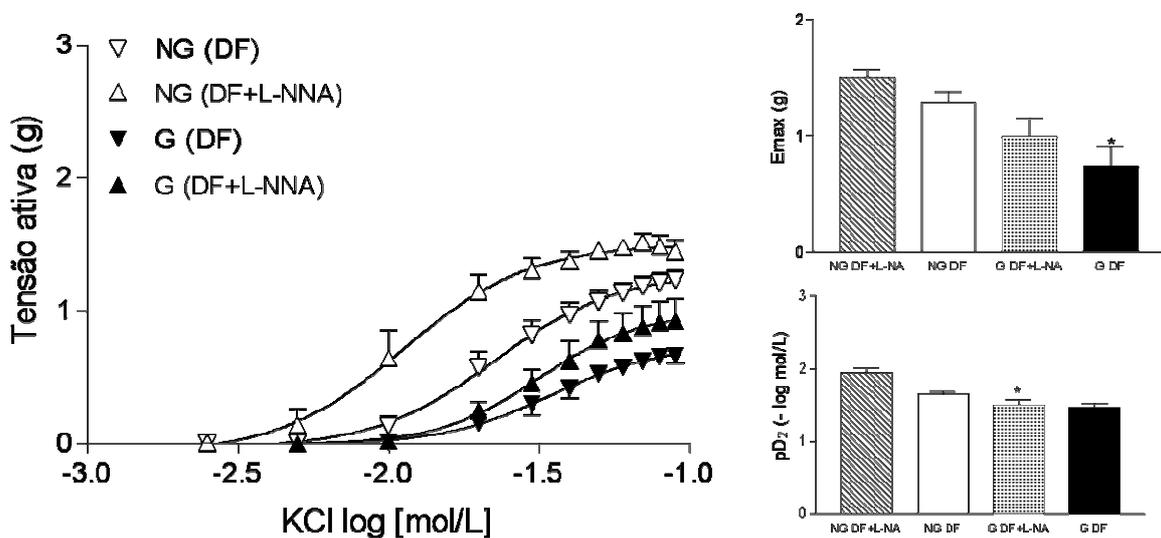


FIGURA 17. Curvas concentração-efeito consecutivas para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 10 μ mol/L de diclofenaco de sódio (DF), sendo que, na segunda, foram adicionados 100 μ mol/L de L-NNA (DF+L-NNA). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=4-5), sendo * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

De modo similar ao observado com a inibição da NOS, a adição de hemoglobina após a inibição da COX com diclofenaco, embora tenha aumentado a reatividade à fenilefrina e ao KCl de vasos de grávidas e não grávidas, foi ineficaz em abolir as diferenças relacionadas à gestação (FIG. 18 e 19).

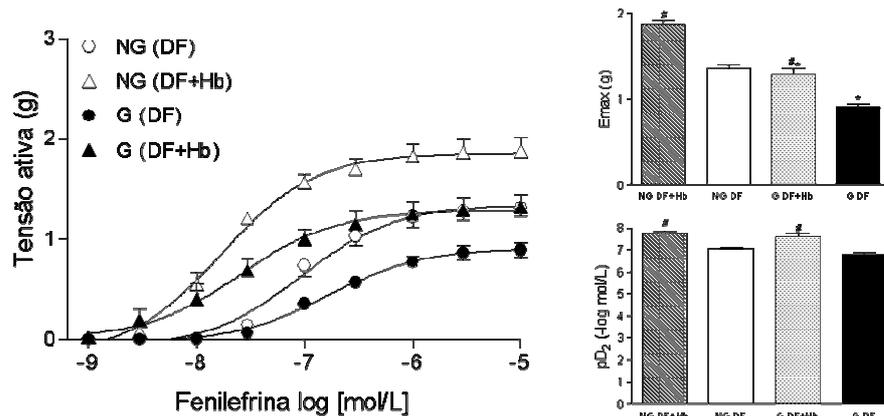


FIGURA 18. Curvas concentração-efeito consecutivas para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 10 μ mol/L de diclofenaco de sódio (DF), sendo que, na segunda, foram adicionados 10 μ mol/L de hemoglobina (DF+Hb). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=4-7), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

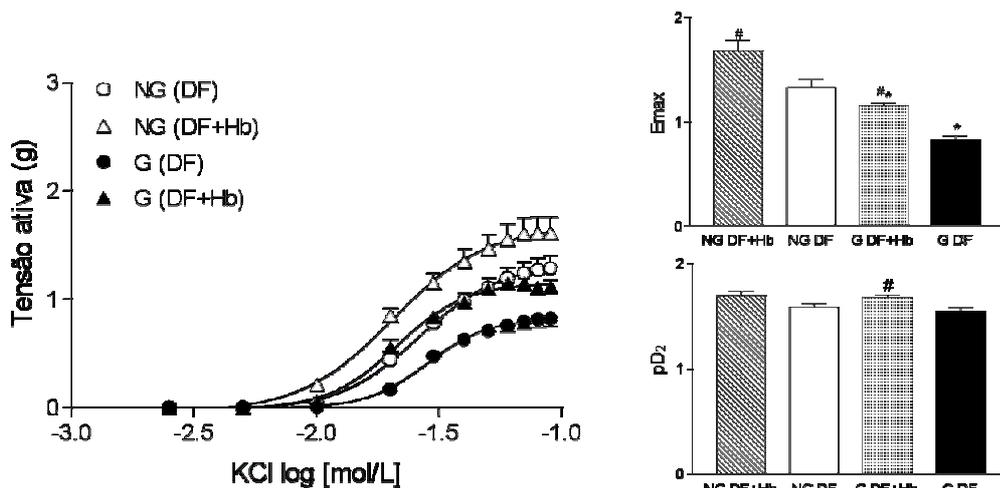


FIGURA 19. Curvas concentração-efeito consecutivas para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 10 μ mol/L de diclofenaco de sódio (DF), sendo que, na segunda, foram adicionados 10 μ mol/L de hemoglobina (DF+Hb). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=6-9), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

A inibição da formação ou efeito do NO na presença de diclofenaco não foi eficiente em abolir as diferenças relacionadas à gestação, sugerindo a existência de um prostanóide constritor nos vasos de ratas grávidas que seria produzido na ausência do NO. Reforçando essa hipótese, quando comparado o efeito da adição de L-NNA na ausência ou presença de diclofenaco, observou-se que a inibição da COX em vasos de ratas grávidas reduziu o aumento da reatividade à fenilefrina e ao KCl induzido pela inibição da NOS (FIG. 20 e 21).

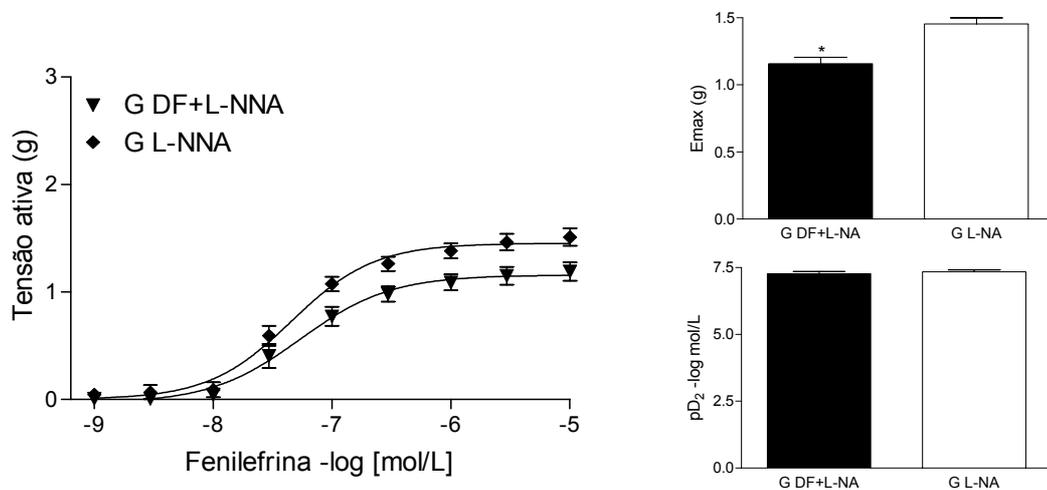


FIGURA 20. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na presença de 100 μ mol/L de L-NNA ou de 100 μ mol/L de L-NNA associado a 10 μ mol/L de diclofenaco de sódio (L-NNA e DF+L-NNA, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=6-11), sendo * $P < 0,05$ em relação à L-NNA (teste t de Student).

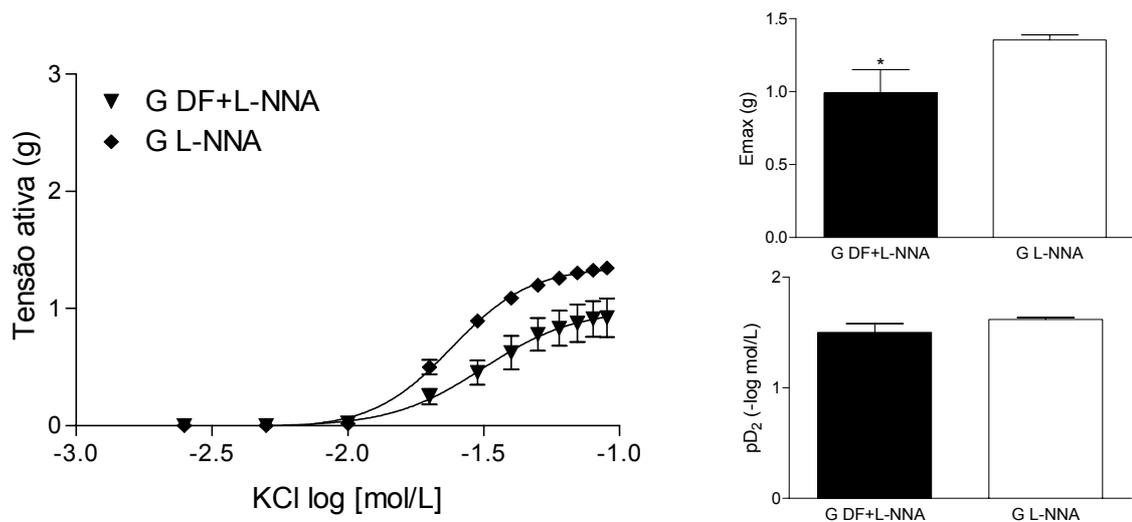


FIGURA 21. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na presença de 100 $\mu\text{mol/L}$ de L-NNA ou de 100 $\mu\text{mol/L}$ de L-NNA associado a 10 $\mu\text{mol/L}$ de diclofenaco de sódio (L-NNA e DF+L-NNA, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=5-10$), sendo * $P<0,05$ em relação à L-NNA (teste t de Student).

Para responder se esse prostanóide constritor poderia ser visualizado também em situações em que as diferenças relativas à gestação eram abolidas pela remoção da camada endotelial, foram realizadas curvas concentração-efeito à fenilefrina e ao KCl, na presença de diclofenaco de sódio, em anéis de aorta de ratas grávidas e não grávidas sem o endotélio vascular, constatando-se que a inibição da COX era incapaz de produzir qualquer alteração de reatividade nesses grupos na referida situação experimental (FIG. 22 e 23).

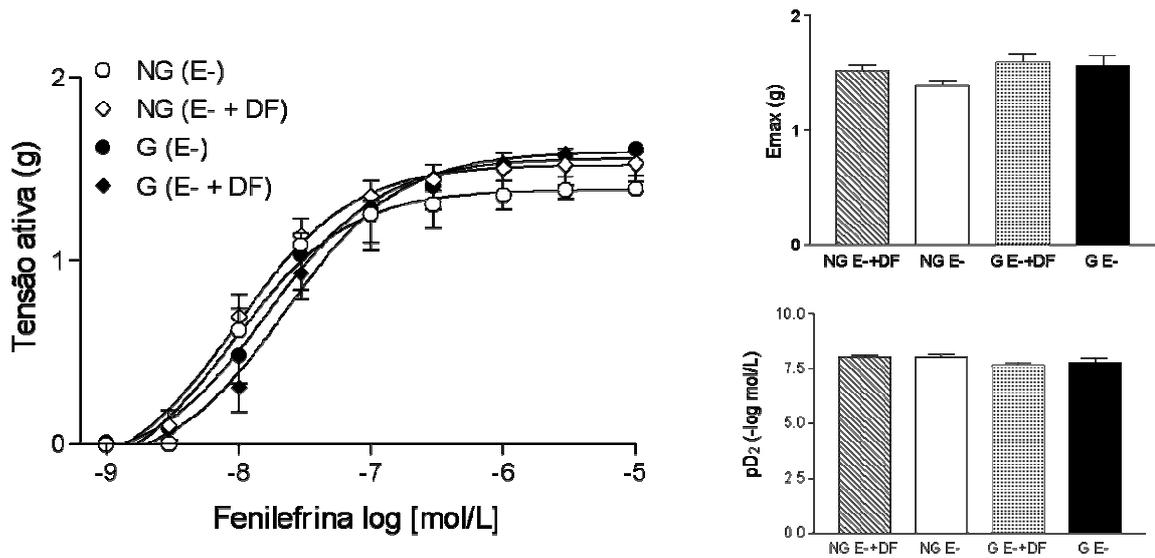


FIGURA 22. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) com o endotélio retirado na ausência ou presença de 10 μ mol/L diclofenaco (E- e E- + DF, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5-10; ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

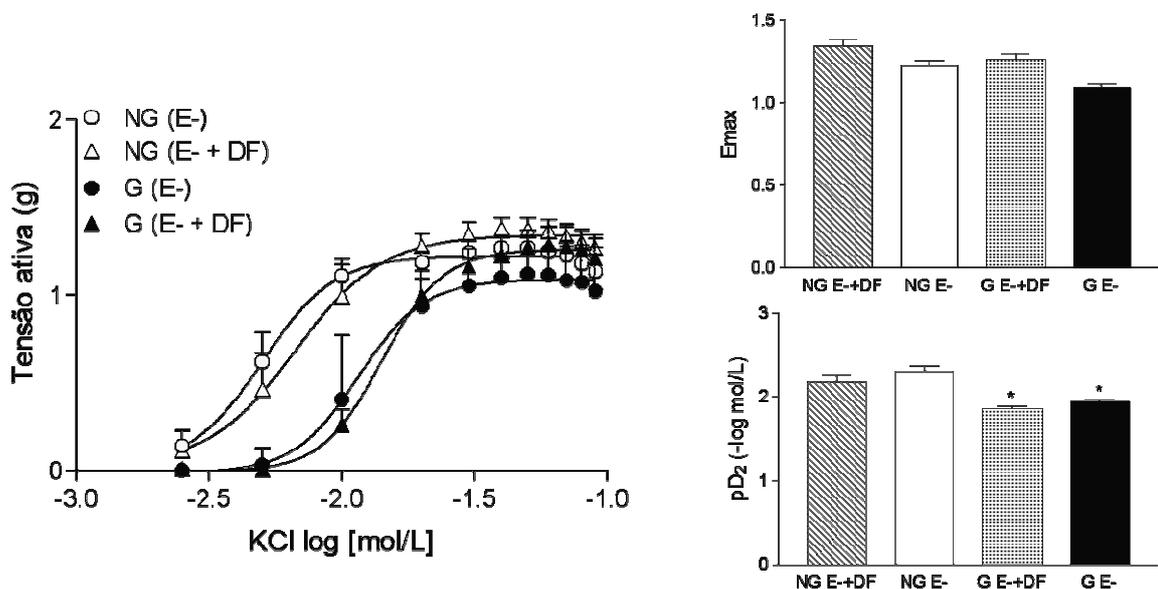


FIGURA 23. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) com o endotélio retirado na ausência ou presença de 10 μ mol/L diclofenaco (E- e E- + DF, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=6), sendo * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

Com a inibição da enzima sintase de tromboxano A_2 a partir da adição da droga ozagrel (1 $\mu\text{mol/L}$; Naito e cols, 1983), buscou-se identificar se o tromboxano A_2 era o prostanóide constritor envolvido nas alterações de reatividade à fenilefrina e ao KCl observadas na ausência de NO.

De modo semelhante ao observado com a inibição da COX a partir da adição de diclofenaco de sódio, ozagrel não alterou a reatividade vascular à fenilefrina e ao KCl de grávidas e não grávidas (FIG. 24 e 25).

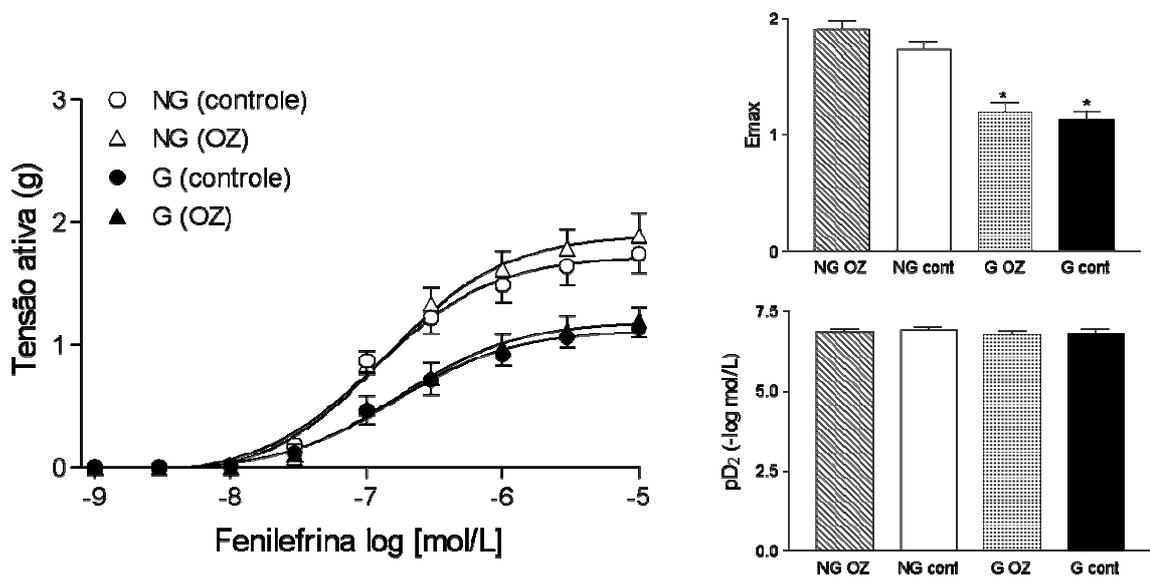


FIGURA 24. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 $\mu\text{mol/L}$) e valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 1 $\mu\text{mol/L}$ ozagrel (controle e OZ, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=7-9), sendo * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

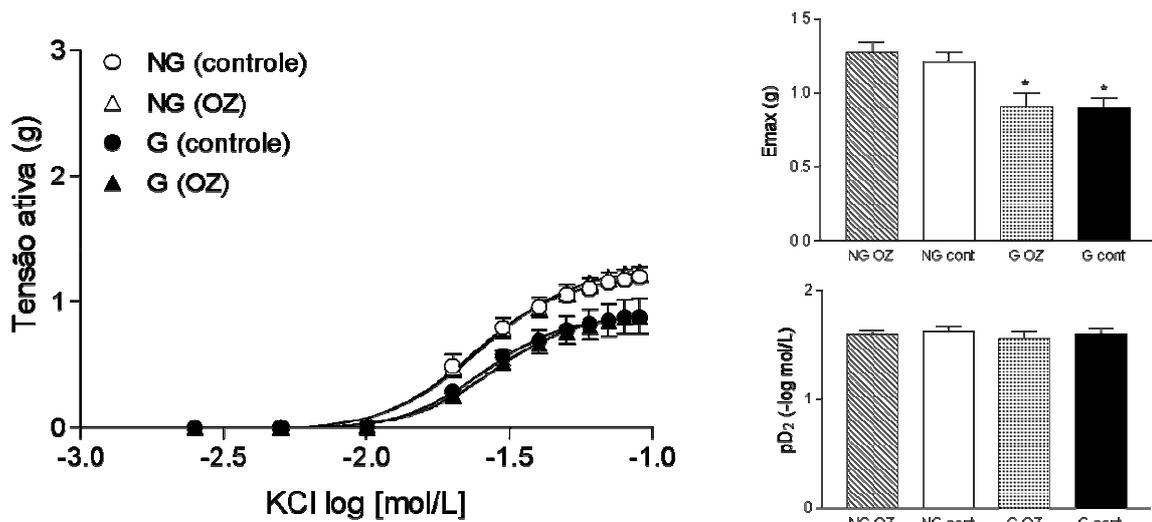


FIGURA 25. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG) na ausência ou presença de 1 $\mu\text{mol/L}$ de ozagrel (controle e OZ, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=6-8$), sendo * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

Como observado nos experimentos que utilizaram diclofenaco de sódio, a inibição prévia da enzima sintase de tromboxano A_2 com ozagrel tornou a inibição da NOS incapaz de abolir as diferenças de reatividade à fenilefrina e ao KCl relacionadas ao término da gestação, embora tenha aumentado significativamente a resposta vascular a esses constritores (FIG. 26 e 27).

Esses experimentos reforçaram a hipótese levantada anteriormente de que, na ausência de NO, a produção de um prostanóide constritor, no caso tromboxano A_2 , tornava-se proeminente e era responsável pela redução das diferenças de reatividade a constritores entre grávidas e não grávidas induzida pelos inibidores da produção ou atividade do NO.

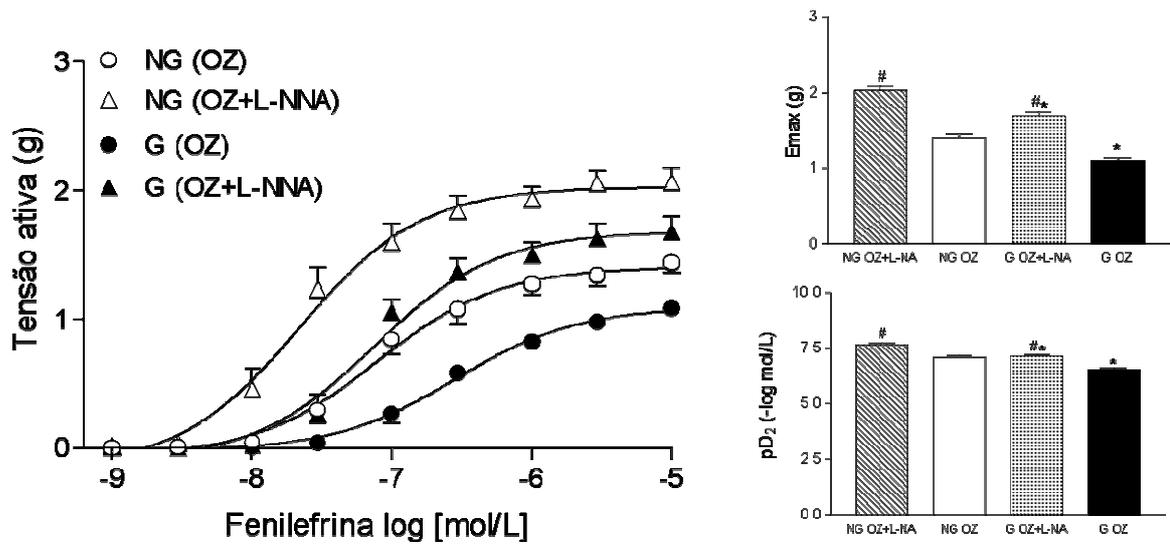


FIGURA 26. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 1 μ mol/L de ozagrel, sendo que, na segunda, foram adicionados 100 μ mol/L de L-NNA (OZ e OZ+L-NNA, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5-7), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

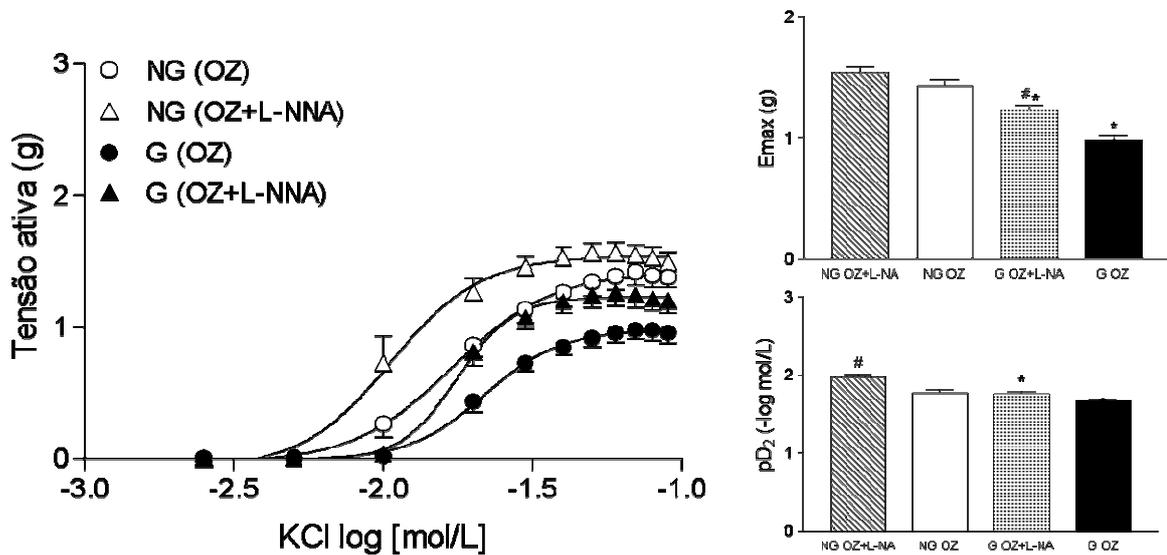


FIGURA 27. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD₂ e efeito máximo (Emáx) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 1 μ mol/L de ozagrel, sendo que, na segunda, foram adicionados 100 μ mol/L de L-NNA (OZ e OZ+L-NNA, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=7-8), sendo # $P < 0,05$ em relação ao controle e * $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

Foi suposto, então, que se o protocolo fosse invertido, isto é, se a primeira curva ao constritor fosse construída somente na presença do inibidor da NOS e na segunda curva fossem associados os inibidores de NOS e sintase de tromboxano A_2 , poderia se observar uma alteração da reatividade vascular em anéis obtidos de ratas grávidas e não grávidas aos constritores de modo a reaparecerem as diferenças relacionadas à gestação somente na segunda curva que, teoricamente, deveriam estar abolidas durante a construção da primeira curva cumulativa.

De acordo com o previsto, a inibição da NOS com a adição de L-NNA antes do início da primeira curva cumulativa à fenilefrina e ao KCl foi capaz de abolir as diferenças relacionadas à gestação. No entanto, a adição posterior de ozagrel pouco alterou a reatividade aos constritores em anéis de aorta de grávidas e não grávidas que passaram previamente pela inibição da NOS, como se a produção de tromboxano A_2 dependesse de um estímulo prévio do NO (FIG. 28 e 29).

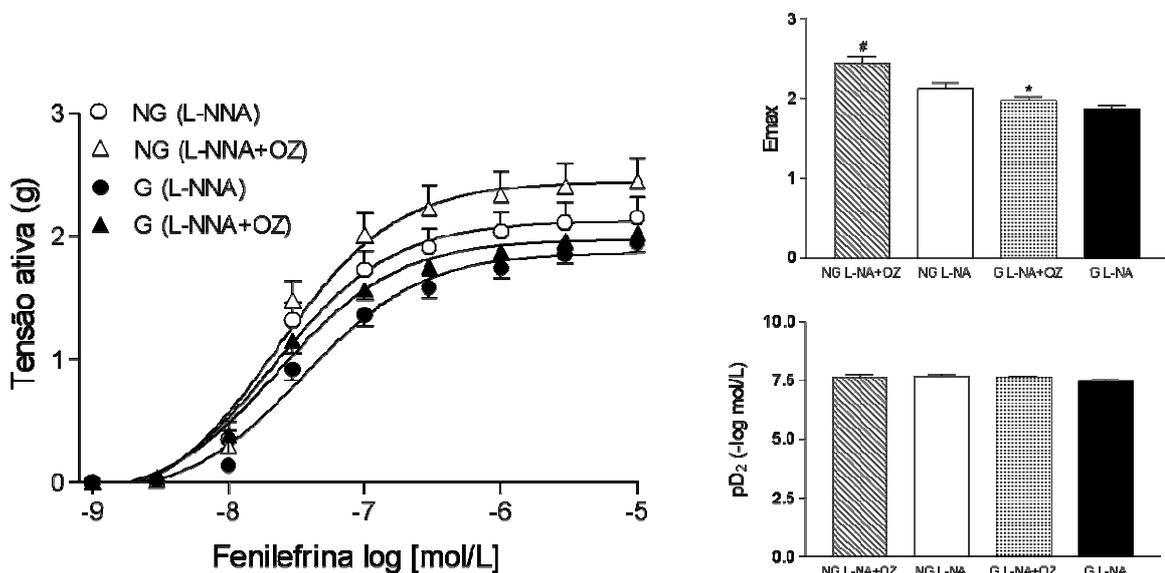


FIGURA 28. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (1 nmol/L a 10 μ mol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 100 μ mol/L de L-NNA, sendo que, na segunda, foram adicionados 1 μ mol/L de ozagrel (L-NNA e L-NNA+OZ, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=7-9), sendo [#] $P < 0,05$ em relação ao controle e ^{*} $P < 0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

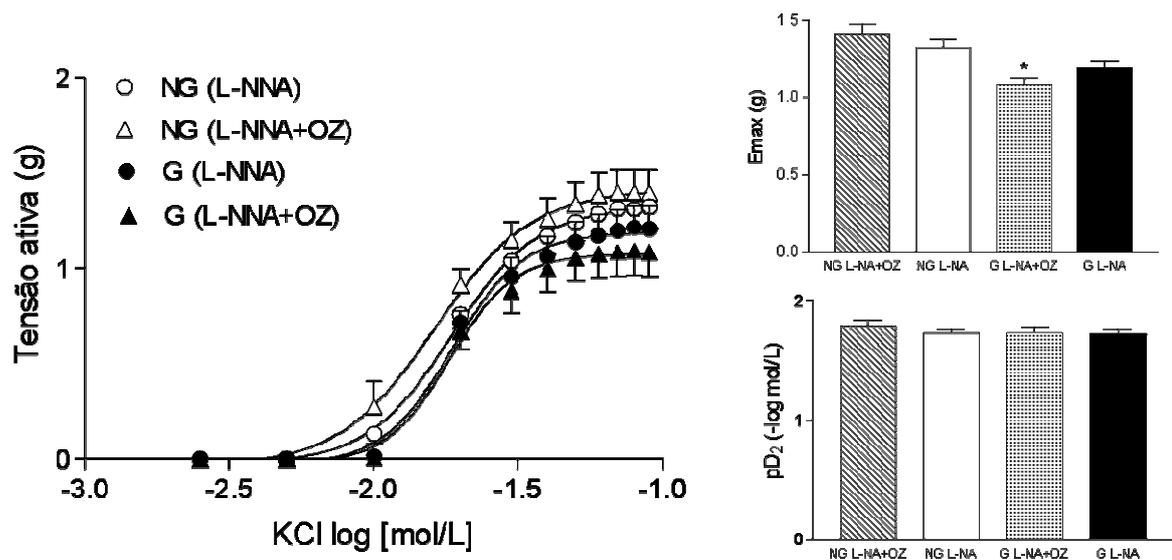


FIGURA 29. Curvas concentração-efeito para KCl (2,5 a 90 mmol/L) e valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) obtidos em anéis de aorta isolados de ratas grávidas (G) e não grávidas (NG). Ambas as curvas foram realizadas na presença de 100 $\mu\text{mol/L}$ de L-NNA, sendo que, na segunda, foram adicionados 1 $\mu\text{mol/L}$ de ozagrel (L-NNA e L-NNA+OZ, respectivamente). Os pontos representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=6-8$), sendo * $P<0,05$ em relação à NG (ANOVA seguido por pós-teste de múltiplas comparações de Tukey).

6. Discussão

6. Discussão

Os experimentos realizados inicialmente tiveram por objetivo confirmar dados anteriores da literatura e do nosso laboratório relacionados ao fenômeno de hiporeatividade a constritores em ratas grávidas, fornecendo embasamento para os experimentos posteriores que visaram identificar interações entre as vias de formação de NO e prostanóides ao término da gestação.

Como esperado, observou-se uma diminuição de reatividade à fenilefrina, em anéis de aorta de ratas grávidas, dependente da presença da camada endotelial. De acordo com demonstrações anteriores, em condições experimentais semelhantes às utilizadas neste trabalho, a remoção do endotélio aboliu as diferenças entre os grupos (Aloamaka e cols, 1993a e 1993b; Cadorette e cols, 2000; St-Louis & Sicotte, 1992; Ballejo e cols, 2002).

Também foi observada uma diminuição de reatividade ao KCl em anéis de aorta de ratas grávidas. No entanto, a remoção da camada endotelial, diferentemente do observado com a utilização da fenilefrina, não foi capaz de igualar a resposta vascular de grávidas e não grávidas. Na ausência do endotélio, vasos obtidos de grávidas ainda se mostraram menos sensíveis ao efeito constritor do KCl em relação aqueles obtidos de não grávidas, mostrando que, além de fatores endoteliais, componentes musculares modulam a diminuída reatividade a constritores durante a gestação.

Alterações nas condições experimentais demonstraram essa participação dos componentes musculares também na modulação da reatividade à fenilefrina. De acordo com os dados obtidos nesta tese e achados anteriores da literatura (Ballejo e cols, 2002; Dièye & Gairard, 2003), enquanto em anéis submetidos a 0,5 grama de

tensão passiva inicial somente são visualizados componentes endoteliais na determinação da hiporeatividade associada à gestação, em vasos submetidos a 2,0 gramas de tensão passiva inicial aparecem componentes musculares não visualizados anteriormente, desde que a retirada do endotélio deixa de ser eficaz em reduzir as alterações de reatividade entre os grupos.

Em estudos do nosso laboratório, quando comparamos grávidas e não grávidas observamos que, embora a inibição da NOS reverta parte da hiporeatividade associada à gestação, o estiramento do segmento vascular permite identificar outros fatores que participam das alterações de reatividade. Sob a tensão inicial de 0,5 grama a adição de L-NNA é abolir as diferenças entre as curvas concentração-efeito para fenilefrina de grávidas e não grávidas e com 1 grama de tensão as diferenças de reatividade associadas à gestação são mantidas (Martinez, 2004).

Existe uma relação entre o estiramento do tecido, imprimido pela tensão passiva inicial, e a reatividade vascular a agonistas. Sparks e Bohr (1962) demonstraram que o aumento do estiramento de tiras helicoidais de ramificações da artéria mesentérica superior de cão aumenta o efeito vasoconstritor induzido por estímulo elétrico ou por agonista como epinefrina. Esse achado foi reproduzido mais tarde por Peipre e cols (1973), em tiras helicoidais de artéria coronária suína, e por Dobrin (1973), em artéria carótida de cão. Toda e cols (1978), além de confirmarem o aumento da tensão ativa desenvolvida a diferentes agentes vasoconstritores em diferentes vasos de cão relacionado ao aumento da tensão passiva, estudaram o relaxamento induzido por adenosina em tiras de artéria cerebral, encontrando um aumento do efeito vasodilatador correspondente ao aumento da tensão passiva.

Em trabalho anterior do nosso laboratório observou-se que o efeito do estiramento sobre a contratilidade induzida por fenilefrina em anéis de aorta está alterado ao final da gestação em ratas. Embora o estiramento do vaso determine um aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina tanto no grupo de não grávidas como de grávidas, observou-se que estas últimas são muito menos reativas ao estímulo vasoconstritor. Vasos de ratas grávidas mostraram-se mais resistentes ao estímulo contrátil mesmo quando expostos a aumentos crescentes do estiramento, demonstrando sua capacidade contrátil limitada em relação a não grávidas (Martinez, 2004).

Está bem descrito que a contração do músculo liso vascular, em resposta a vasoconstritores, depende de um aumento na concentração de cálcio citoplasmático que, dependendo do agente constritor, pode ser tanto pelo influxo do meio extracelular quanto pela liberação de estoques intracelulares ou ambos. Esse aumento da concentração intracelular de cálcio propicia a interação entre as proteínas contráteis actina e miosina, promovendo a contração da musculatura lisa vascular (Rembold, 1992). Aparentemente, em vasos de grávidas, ocorrem alterações relacionadas ao influxo de cálcio que podem alterar a resposta a constritores.

Ao término da gestação, a musculatura lisa vascular parece menos eficiente na mobilização de cálcio extracelular diante de um estímulo constritor, desde que a incubação com nifedipina, um bloqueador de canal para cálcio dependente de voltagem, de artérias isoladas de ratas grávidas e não grávidas, pouco altera a reatividade à vasopressina e à fenilefrina das primeiras, mas reduz de maneira importante das últimas, igualando as respostas de ambas (St-Louis e cols, 1995; Roy e cols, 1995). Foi demonstrado, ainda, que o tratamento crônico com

nifedipina induz uma queda da pressão arterial em ratas virgens semelhante àquela observada em ratas ao término da gestação (Simaan e cols, 2002).

Portanto, considerando que aumentos na tensão passiva inicial modificam o padrão de resposta vascular a constritores, encobrendo a visualização dos fatores endoteliais e amplificando a participação dos fatores musculares, e que o interesse desse estudo está voltado para a modulação endotelial da reatividade a constritores em ratas grávidas, optou-se, no restante dos experimentos desenvolvidos, pela utilização de 0,5 grama de tensão passiva inicial.

Como, em vasos submetidos a 0,5 grama de tensão passiva, as diferenças de reatividade à fenilefrina e ao KCl relacionadas à gestação foram reduzidas após a remoção da camada endotelial, foram realizados experimentos inibindo-se a produção ou biodisponibilidade de óxido nítrico, com a adição de L-NNA e hemoglobina, respectivamente.

A adição de L-NNA ou hemoglobina aumentou a reatividade vascular à fenilefrina e ao KCl de vasos obtidos de ratas grávidas e não grávidas. Esse dado corresponde aos achados da literatura que demonstram que a inibição da NOS ou da sua biodisponibilidade aumenta a reatividade vascular a diferentes agonistas (Joly e cols, 1994; Kim e cols, 2001; Srivastava e cols, 2002).

A hemoglobina, embora seja incapaz de atuar no espaço intracelular, é uma droga seqüestradora de NO eficiente, desde que tende a criar um gradiente de saída de NO para o espaço extracelular (Lancaster, 1994). A formulação utilizada, obtida da Sigma, contém uma mistura de oxi-hemoglobina e seu derivado oxidado meta-hemoglobina, sendo que o fabricante alerta que a forma predominante é a oxidada, desde que a hemoglobina se oxida rapidamente em contato com o ar. Estudos prévios relatam que meta-hemoglobina e oxi-hemoglobina são capazes de

inibir o relaxamento vascular induzido pela liberação NO (Gruetter e cols, 1981; Martin e cols, 1985; Simonsen e cols, 1999). Nos experimentos realizados neste trabalho sua eficiência foi comprovada pela ausência de relaxamento estimulado pela acetilcolina.

A diminuição da produção ou biodisponibilidade de NO foi eficaz em abolir as diferenças de reatividade à fenilefrina e ao KCl relacionadas ao término da gestação, sugerindo que, nesta condição experimental, uma maior produção vascular de NO poderia ser um fator determinante da hiporeatividade a constritores observada em grávidas. Dados descritos na literatura, previamente citados, oferecem suporte a esta inferência (Molnár & Hertelendy, 1992; Chu & Beilin, 1993; Nathan e cols, 1995; Coelho e cols, 1997; Ballejo e cols, 2002; Martinez e cols, 2004).

A liberação de NO capaz de modular o efeito desses constritores pode se dar de maneira espontânea ou estimulada pelo próprio agonista ou, ainda, pela contração *per se* (Martin e cols, 1986; Fleming e cols, 1999; Tuttle & Falcone, 2001). Como o modelo experimental utilizado não permite a visualização de qualquer efeito relaxante sem a prévia pré-contração do vaso, não é possível afirmar a existência de uma produção espontânea de NO, embora seja uma hipótese pertinente.

No que se refere à contração estimulada com KCl, é interessante notar, ainda, que, diferentemente do observado nos experimentos em que houve somente a remoção endotelial, as diferenças foram abolidas na presença de L-NNA ou hemoglobina, mascarando as diferenças relacionadas a fatores musculares e reforçando a importância da via NOS/NO na determinação da hiporeatividade associada ao término da gestação nesses vasos.

Embora a diminuição da produção e biodisponibilidade de NO pudesse explicar o aumento de reatividade à fenilefrina e ao KCl em vasos de grávidas e não

grávidas na presença de L-NNA ou Hb, e uma produção aumentada de NO em grávidas possa justificar o aumento de reatividade proporcionalmente superior nos vasos destes animais em relação a não grávidas, de modo a abolir as diferenças relacionadas à gestação, não se pode excluir a hipótese do aparecimento de um elemento constritor que somente seria visualizado após a inibição do NO.

Durante a inibição do principal sistema de controle do tônus vascular em grávidas, outros sistemas poderiam ser visualizados, como aqueles dependentes da ativação da COX. Pensando-se neste sentido, parte do aumento da reatividade a constritores observado nos vasos obtidos de grávidas poderia estar relacionado a um aumento da produção de prostanóides constritores. No entanto, quando se inibiu a formação de prostanóides com diclofenaco de sódio não houve alteração na reatividade à fenilefrina ou ao KCl nos vasos obtidos de não grávidas e grávidas.

A literatura tem apresentado dados variados referentes à participação dos prostanóides na hiporeatividade vascular a constritores associada à gestação, sendo que alterações experimentais, como variações no tipo de vaso estudado, abordagem técnica (*in vivo* ou *in vitro*) e espécie animal, têm gerado resultados que tornam esses autacóides relevantes ou irrelevantes dependendo do modelo utilizado.

Como citado anteriormente, em humanos tem sido observado aumento dos níveis plasmáticos de PGI₂ associado à restauração da responsividade pressora a constritores após a inibição sistêmica da COX durante a gestação normal (Everett e cols, 1978; Wang e cols, 1991). Em artérias uterinas de ovelhas grávidas, comparadas com de não grávidas, há um aumento da produção basal e estimulada por constritor de PGI₂ associado a maior expressão da COX em células endoteliais (Magness & Rosenfeld, 1993; Davidge e cols, 1993; Janowiak e cols, 1998; Habermehl e cols, 2000). Finalmente, em ratas grávidas, enquanto há um aumento

da excreção de metabólitos urinários de prostanóides associado à restauração de resposta pressora a constritores após tratamento sistêmico com inibidor da COX, esses mesmos inibidores são ineficazes em provocar alterações consistentes nas diferenças de reatividade vascular associadas à gestação em artérias isoladas de diferentes leitos (Paller, 1984; Harrison & Moore, 1989; Davidge & McLaughlin, 1992; Schafer e cols, 1993 e 1996).

Embora a inibição da COX com diclofenaco, bem como a inibição da enzima sintase de tromboxano A_2 com ozagrel, não tenham sido eficazes em alterar as diferenças de reatividade à fenilefrina e ao KCl no modelo experimental estudado, foram capazes de comprometer o efeito das drogas L-NNA e hemoglobina; isto é, enquanto, isoladamente, a inibição da NOS ou a diminuição da biodisponibilidade do NO aumentavam a reatividade vascular de não grávidas e grávidas de modo a abolir as diferenças relacionadas à gestação, quando a COX, ou a enzima sintase de tromboxano A_2 , foram inibidas previamente à adição dos inibidores da via de formação e de efeito do NO, embora ainda fossem observadas alterações de reatividade vascular em ambos os grupos, as diferenças entre grávidas e não grávidas se mantiveram. Esses dados permitem elaborar a hipótese de que, na ausência de NO, as diferenças de reatividade dos vasos de grávidas e não grávidas são abolidas graças à falta do efeito relaxante do próprio NO e o aparecimento de um efeito constritor dependente da atividade da enzima sintase de tromboxano A_2 em grávidas.

Nos últimos anos, vários trabalhos têm tentado entender quais implicações fisiológicas, patológicas e farmacológicas dependem da síntese e liberação simultâneas de NO e prostanóides nos mais diferentes tecidos e modelos experimentais. Frequentemente tem sido demonstrada uma “conversa” entre as vias de formação de

NO e prostaglandinas, desde que as reações intermediárias e os produtos envolvidos parecem exercer modulação das enzimas NOS e COX (Mollace e cols, 2005).

Dependendo do tipo celular e das condições experimentais utilizadas, o NO pode tanto estimular (Franchi e cols, 1994; Davidge e cols, 1995; Sautebin e cols, 1995; Tetsuka e cols, 1996; Watkins e cols, 1997; Ahmad e cols, 2002; Aisemberg e cols, 2007), inibir (Stadler e cols, 1993; Amin e cols, 1997; Patel e cols, 1999; Tanaka e cols, 2001; Miceli e cols, 2003) ou não influenciar (Tsai e cols, 1994; Curtis e cols, 1996; Kosonen e cols, 1998; Boquet e cols, 1998; Uno e cols, 2004) a síntese de prostanóides. Os efeitos finais dessas interações ainda não são claros, permanecendo por serem elucidados em diferentes modelos experimentais, incluindo-se a gestação normal em ratas.

Os primeiros achados relacionando a modulação da produção de prostanóides por NO foram de Salvemini e cols (1993) que observaram um aumento da produção de prostaglandinas dependente do aumento de NO, estimulado por LPS, em cultura de macrófagos. Posteriormente, outros grupos confirmaram esses achados, demonstrando que a produção de NO induzida por LPS era capaz de estimular a produção de prostanóides e aumentar a expressão de COX em diferentes tipos celulares, bem como em variados modelos experimentais (Mei e cols, 2000; Ahmad e cols, 2002). Corroborando esses dados, em cultura de macrófagos obtidos de animais *knockout* para enzima NOSi, há uma diminuição na produção de prostanóides estimulada por LPS associada, *in vivo*, a uma diminuição da formação de metabólitos urinários de PGI₂ e PGE₂ (Marnett e cols, 2000a).

A ativação da NOS, independentemente de estímulos inflamatórios como aquele induzido por LPS, ou o próprio oferecimento de NO a partir de doadores, mostrou-se capaz de estimular a produção de prostanóides em diversos modelos

experimentais, dentre estes tiras de útero de animais tratados com estrogênio ou no início da gestação e células endoteliais ou de retina em cultura. (Franchi e cols, 1994; Davidge e cols, 1995; Macarrone e cols, 1997; Vassale e cols, 2003; Du e cols, 2004; Aisemberg e cols, 2007).

A ativação da enzima COX por NO tem sido atribuída à formação de peroxinitrito, desde que, sendo um hidroperóxido inorgânico capaz de se ligar ao grupamento heme da enzima, poderia servir como substrato para a atividade peroxidase da COX, além de estimular sua atividade cicloxigenase sobre o ácido araquidônico (Landino e cols, 1996; Marnett, 2000b).

A inibição da COX-2 não altera a formação de nitrito e a expressão de NOSi em cultura de macrófagos estimulados com LPS (Ahmad e cols, 2002). Por outro lado, em cultura de células da musculatura lisa vascular estimuladas por citocinas, a adição de PGD₂ diminui o acúmulo induzido de nitrito de maneira dose-dependente via supressão da indução da NOSi (Nagoshi e cols, 1998). Animais estimulados com LPS, em modelo de sepse, apresentam redução dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato quando recebem concomitantemente U46619, um análogo estável do TXA₂. Adicionalmente, cultura de células da musculatura lisa vascular, obtidas de animais que não expressam o receptor TP de TXA₂ e estimuladas com citocinas, apresentam um aumento da expressão de NOSi acompanhado por aumento do acúmulo de nitrito e nitrato (Yamada e cols, 2003).

Em nossos experimentos, embora, em condições basais, a formação de prostanóides pareça não ser determinante da hiporeatividade a constritores associada à gestação, na ausência de NO parece haver um aumento na produção de tromboxano A₂, como se o excesso de produção de NO associado à gestação pudesse inibir as enzimas responsáveis pela síntese desse prostanóide constritor.

Alguns trabalhos têm demonstrado que o NO pode alterar a formação de prostanoídes constritores. Em artérias cerebrais foi mostrado que o NO endógeno pode manter o tônus basal desses vasos a partir da inibição da formação ou liberação de tromboxano A_2 , desde que o aumento do tônus vascular desencadeado pela inibição da NOS foi dependente da ativação de receptores de TXA_2/PGH_2 , bem como da enzima sintase de tromboxano A_2 (Benyó e cols, 1998). Em vasos de resistência, na presença de inibidores da NOS, também foi observado um aumento do tônus dependente da ativação de receptores de TXA_2/PGH_2 (Laemmel e cols, 2003). Finalmente, em células endoteliais em cultura, observou-se acúmulo de metabólitos estáveis de tromboxano A_2 na presença de L-NNA no meio de cultura (Miyamoto e cols, 2007).

Diante disso, imaginou-se que, após a inibição prévia da produção de NO com L-NNA, a inibição da enzima sintase de tromboxano A_2 , com ozagrel, pudesse alterar a reatividade vascular de grávidas aos constritores utilizados; isto é, se em vasos obtidos de grávidas há um aumento de reatividade induzido por L-NNA, parte desse incremento deveria ser reduzido pela inibição da formação de tromboxano A_2 .

No entanto, para surpresa dos pesquisadores, a inibição prévia da produção de NO implicou em fracasso na indução da resposta anteriormente observada com a inibição da enzima sintase de tromboxano A_2 .

Aparentemente, embora a formação e/ou efeito do tromboxano A_2 em aortas de ratas ao término da gestação estimuladas com constritores só possa ser visualizada na ausência da formação e/ou efeito do NO, a produção ou efeito desse prostanoíde constritor depende da presença da camada endotelial (visto que na ausência do endotélio o diclofenaco não altera a reatividade aos constritores), bem como de uma produção pré-existente de NO.

7. Conclusões

7. Conclusões

Os dados apresentados nessa tese permitem concluir:

- Anéis de aorta obtidos de ratas ao término da gestação apresentam hiporeatividade vascular aos constritores fenilefrina e KCl em relação a anéis de não grávidas;
- Um aumento na produção ou efeito do óxido nítrico (NO) determina as diferenças de reatividade a constritores entre grávidas e não grávidas no modelo experimental utilizado;
- O NO produzido nos vasos pode ser um fator de inibição da síntese endotelial de tromboxano A_2 durante a gestação normal em ratas.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J** 357:593-615, 2001.

AHMAD N, CHEN LC, GORDON MA, LASKIN JD, LASKIN DL. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. **J Leukoc Biol** 71:1005-11, 2002.

AISEMBERG J, VERCELLI C, BILLI S, RIBEIRO ML, OGANDO D, MEISS R, MCCANN SM, RETTORI V, FRANCHI AM. Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. **PNAS** 104:7534-9, 2007.

ALOAMAKA CP, EZIMOKHAI M, CHERIAN T, MORRISON J. Mechanism of pregnancy-induced attenuation of contraction to phenylephrine in rat aorta. **Exp Physiol** 78:403-10, 1993a.

ALOAMAKA CP, EZIMOKHAI M, MORRISON J. The role of endothelium in phenylephrine- and potassium-induced contractions of the rat aorta during pregnancy. **Res Exp Med** 193:407-17, 1993b.

AMIN AR, ATTUR M, PATEL RN, THAKKER GD, MARSHALL PJ, REDISKE J, STUCHIN SA, PATEL IR, ABRAMSON SB. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. **J Clin Invest** 99:1231-7, 1997.

ARCHER SL, HUANG JMC, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:7583-7, 1994.

AYAJIKI K, KINDERMANN M, HECKER M, FLEMING I, BUSSE R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Circ Res** 78:750-8, 1996.

BALLEJO G, BARBOSA TA, COELHO EB, ANTONIALI C, SALGADO MCO. Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilatator. **Life Sci** 70:3131-42, 2002.

BENYÓ Z, GÖRLACH C, WAHL M. Involvement of thromboxane A2 in the mediation of the contractile effect induced by inhibition of nitric oxide synthesis in isolated rat middle cerebral arteries. **J Cereb Blood Flow Metab** 18:616-8, 1998.

BOLZ S, VOGEL L, SOLLINGER D, DERWAND R, WIT C, LOIRAND G, POHL U. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. **Circulation** 107:3081-7, 2003.

BOQUET M, CEBRAL E, MOTTA A, BÉRON DE ASTRADA M, GIMENO MAF. Relationship between mouse uterine contractility, nitric oxide and prostaglandin production in early pregnancy. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 59:163-7, 1998.

BROOKS VL, CLOW KA, WELCH LS, GIRAUD GD. Does nitric oxide contribute to the basal vasodilation of pregnancy in conscious rabbits? **Am J Physiol** 281:R1624-32, 2001.

CADORETTE C, SICOTTE B, BROCHU M, ST-LOUIS J. Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. **Am J Physiol** 278:H567-76, 2000.

CHAPMAN AB, ABRAHAM WT, ZAMUDIO S, COFFIN C, MEROUANI A, YOUNG D, JOHNSON A, OSORIO F, GOLDBERG C, MOORE LG, DAHMS T, SCHIER RW. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. **Kidney Int** 54:2056-63, 1998.

CHEAH LS, GWEE MCE, DAS R, BALLARD H, YANG YF, DANIEL EE, KWAN CY. Evidence for the existence of a constitutive nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 29:725-27, 2002.

CHINELLATO A, FROLDI G, CAPARROTTA L, RAGAZZI E. Pharmacological characterization of endothelial cell nitric oxide synthase inhibitors in isolated rabbit aorta. **Life Sci** 62:479-90, 1998.

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** 109:322-9, 1993.

COELHO EB, BALLEJO G, SALGADO MCO. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. **Hypertension** 30:585-8, 1997.

CREWS JK, NOVAK J, GRANGER JP, KHALIL RA. Stimulated mechanisms of Ca^{2+} entry into vascular smooth muscle during NO synthesis inhibition in pregnant rats. **Am J Physiol** 276:R530-8, 1999.

CURTIS JF, REDDY NG, MASON RP, KALYANARAMAN B, ELING TE. Nitric oxide: a prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate cyclooxygenase activity or prostaglandin H synthase expression in murine macrophages. **Arch Biochem Biophys** 335:369-76, 1996.

DAVIDGE ST & MCLAUGHLIN MK. Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat. **Am J Obstet Gynecol** 167:1691-8, 1992.

DAVIDGE ST, EVERSON WV, PARISI VM, MCLAUGHLIN MK. Pregnancy and lipid peroxide-induced alterations of eicosanoid-metabolizing enzymes in the aorta of the rat. **Am J Obstet Gynecol** 169:1338-44, 1993.

DAVIDGE ST, BAKER PN, MCLAUGHLIN MK, ROBERTS JM. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. **Circ Res** 77:274-83, 1995.

DAVIDGE ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circ Res** 89:650-60, 2001.

DIÈYE AM & GAIRARD A. Extracellular calcium level is crucial for aortic contractile response in pregnant rat. **Fund Clin Pharmacol** 17:429-32, 2003.

DOBRIN PB. Influence of initial length on length-tension relationship of vascular smooth muscle. **Am J Physiol** 225:664-70, 1973.

DU, Y.; SARTHY, V.P.; KERN, T.S. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. **Am J Physiol** 287:R735-41, 2004.

EVERETT RB, WORLEY RJ, MACDONALD PC, GANT NF. Effect of prostaglandin synthetase inhibitors on pressor response to angiotensin II in human pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab** 46:1007-10, 1978.

FLEMING I, BAUERSACHS J, SCHÄFER A, SCHOLZ D, BUSSE R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci** 96:1123-8, 1999.

FLEMING I & BUSSE R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res** 43:532-41, 1999.

FRANCHI AM, CHAUD M, RETTORI V, SUBURO A, MCCANN SM, GIMENO M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. **Proc Natl Acad Sci** 91:539-43, 1994.

FURCHGOTT RF & ZAWADZKI J. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 228:373-6, 1980.

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

GANT NF, DALEY GL, CHAND S, WHALLEY PJ, MACDONALD. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. **J Clin Invest** 52: 2682, 1973.

GILSON JG, SAMAAAN S, CRAWFORD MH, QUALLS CR, CURET LB. Changes in hemodynamics, ventricular remodeling, and ventricular contractility during normal pregnancy: a longitudinal study. **Obstet Gynecol** 89:957-62, 1997.

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** 30:905-10, 1994.

GOODWIN DC, LANDINO LM, LAWRENCE JM. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. **FASEB J** 13:1121-36, 1999.

GRUETTER CA, GRUETTER DY, LYON JE, KADOWITZ PJ, IGNARRO LJ. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceril trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. **J Pharmacol Exp Ther** 219:181-6, 1981.

HABERMEHL DA, JANOWIAK MA, VAGNONI KE, BIRD IM, MAGNESS RR. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. IV. Cyclooxygenase isoform expression during the ovarian cycle and pregnancy in sheep. **Biol Reprod** 62:781-88, 2000.

HARRISON GL & MOORE LG. Blunted vasoreactivity in pregnant guinea pigs is not restored by meclofenamate. **Am J Obstet Gynecol** 160:258-64, 1989.

HENNESSY TG, MACDONALD D, HENNESSY MS, MAGUIRE M, BLAKE S, MCCANN HA, SUGRUE DD. Serial changes in cardiac output during normal pregnancy: a Doppler ultrasound study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 70:117-22, 1996.

IGNARRO LJ. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. **Biochem Soc Trans** 20:465-9, 1992.

JANOWIAK MA, MAGNESS RR, HABERMEHL DA, BIRD IM. Pregnancy increases ovine uterine artery endothelial cyclooxygenase-1 expression. **Endocrinology** 139:765-71, 1998.

JOLY GA, AYRES M, CHELLY F, KILBOURN RG. Effects of N^G-methyl-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. **Biochem Biophys Res Commun** 199:147-54, 1994.

KANNER J, HAREL S, GRANIT R. Nitric oxide as a antioxidant. **Arch Biochem Biophys** 289:130-6, 1991.

KIM HW, GREENBURG AG. Contraction coupled endothelial nitric oxide release: a new paradigm for local vascular function? **J Surg Res** 100:93-8, 2001.

KNOWLES RG & MONCADA S. Nitric oxide synthase in mammals. **Biochem J** 298:249-58, 1994.

KNOWLES RG, SALTER M, BROOKS SL, MONCADA S. Antiinflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in lung, liver and aorta of the rat. **Biochem Biophys Res Commun** 172:1042-8, 1990.

KOSONEN O, KANKAANRANTA H, MALO-RANTA U, RISTIMÄKI A, MOILANEN E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of prostacyclin production in human endothelial cells. **Br J Pharmacol** 125:247-54, 1998.

LAEMMEL E, BONNARDEL-PHU E., HOU X, SEROR J, VICAUT E. Interaction between nitric oxide and prostanoids in arterioles of rat cremaster muscle in vivo. **Am J Physiol** 285:H1254-60, 2003.

LANCASTER JR JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 91(17):8137-41, 1994.

LANDINO LM, CREWS BC, TIMMONS MD, MORROW JD, MARNETT LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci** 93:15069-74, 1996.

MACARRONNE M, PUTTI S, AGRÒ AF. Nitric oxide donors activate the cyclo-oxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. **FEBS Let** 410:470-6, 1997.

MAGNESS RR & ROSENFELD CR. Calcium modulation of endothelium-derived prostacyclin production in ovine pregnancy. **Endocrinology** 132:2445-52, 1993.

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** 272:H1730-40, 1997.

MAGNESS RR, SULLIVAN JA, LI Y, PHERNETTON TM, BIRD IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NOx. **Am J Physiol** 280:H1692-8, 2001.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol** 62:609-14, 2002.

MARNETT LJ, WRIGHT TL, CREWS BC, TANNENBAUM SR, MORROW JD. Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. **J Biol Chem** 275:13427-30, 2000a.

MARNETT LJ. Cyclooxygenase mechanisms. **Cur Opin Chem Biol** 4:545-52, 2000b.

MARTIN W, VILLANI GM, JOTHIANADAN D, FURCHGOTT RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. **J Pharmacol Exp Ther** 232:708-16, 1985.

MARTIN W, FURCHGOTT RF, VILLANI GM, JOTHIANADAN D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. **J Pharmacol Exp Ther** 237:529-38, 1986.

MARTINEZ, M. R. **Reatividade vascular de aortas isoladas de ratas ao término da gestação:** participação de óxido nítrico e prostanóides. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004. 83f.

MEI JM, HORD NG, WINTERSTEIN DF, DONALD SP, PHANG JM. Expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induced by nitric oxide in conditionally immortalized murine colonic epithelial cells. **FASEB J** 14:1188-201, 2000.

MICELI F, TRINGALI G, TROPEA A, MINICI F, ORLANDO MT, LANZONE A, NAVARRA P, APA R. The effects of nitric oxide on prostanoid production and release by human umbilical vein endothelial cells. **Life Sci** 73:2533-42, 2003.

MIYAMOTO A., HASHIGUCHI Y., OBI T, ISHIGURO S, NISHIO A. Ibuprofen or ozagrel increases NO release and L-nitro arginine induces TXA2 release from cultured porcine basilar arterial endothelial cells. **Vascular Pharmacology** 46:85-90, 2007.

MOLLACE V, MUSCOLI C, MASINI E, CUZZOCREA S, SALVEMINI D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol Rev**, 57:217-52, 2005.

MOLNÁR M, HERTELENDY F. N^o-Nitro-L-arginina, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. **Am J Obstet Gynecol** 166:1560-7, 1992.

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43:109-42, 1991.

MONTES GS, LUQUE EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. **Acta Anat** 133:192-9, 1988.

NAITO J, KOMATSU H, UJIIE A, HAMANO S, KUBOTA T, TSUBOSHIMA M. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on aggregation of rabbit platelets. **Eur J Pharmacol** 91:41-8, 1983.

NATHAN L, CUEVAS J, CHAUDHURI G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. **Br J Pharmacol** 114:955-60, 1995.

NAGOSHI H, UEHARA Y, KANAI F, MAEDA S, OGURA T, GOTO A, TOYO-OKA T, ESUMI H, SHIMIZU T, OMATA M. Prostaglandin D2 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells. **Circ Res** 82:204-9, 1998.

NELSON SH, STEINSLAND OS, WANG Y, YALLAMPALLI C, DONG YL, SANCHEZ JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. **Circ Res** 87:406-11, 2000.

OSANAI T, FUJITA N, FUJIWARA N, NAKANO T, TAKAHASHI K, GUAN W, OKUMURA K. Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells. **Am J Physiol** 278:H233-238, 2000.

PALLER MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. **Am J Physiol** 247: H100-8, 1984.

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327:524-6, 1987.

PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature** 333:664-6, 1988.

PAN Z, LINDHEIMER MD, BARRON WM. Regulation of blood pressure in pregnancy: pressor system blockage and stimulation. **Am J Physiol** 258:H1559-72, 1990.

PAPADAKI M, TILTON RG, ESKIN SG, MCINTIRE LV. Nitric oxide production by culture human aortic smooth muscle cells: stimulation by fluid flow. **Am J Physiol** 274:H616-26, 1998.

PARENT A, SCHIFFRIN EL, ST-LOUIS J. Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. **Am J Obstet Gynecol** 163:229-34, 1990.

PATEL R, ATTUR MG, DAVE M, ABRAMSON SB, AMIN AR. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. **J Immunol** 162:4191-7, 1999.

PEIPER U, SCHMIDT E, LAVEN R, GRIEBEL L. Length-tension relationships in resting and activated vascular smooth muscle fibers. **Pflügers Arch** 340:113-22, 1973.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Mesenteric arterial function in the rat in pregnancy: role of sympathetic and sensory-motor perivascular nerves, endothelium, smooth muscle, nitric oxide and prostaglandins. **Br J Pharmacol** 117:1463-70, 1996.

RAPOPORT RM, MURAD F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ Res** 52:352-57, 1983.

REES DD, CELLEK S, PALMER RMJ, MONCADA S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem Biophys Res Commun** 173:541-7, 1990

REMBOLD CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension** 20:129-37, 1992.

ROY B, SICOTTE B, BROCHU M, ST-LOUIS J. Effects of Nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. **Eur J Pharmacol** 280:1-9, 1995.

SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci** 90:7240-44, 1993.

SAUTEBIN L, IALENTI A, IANARO A, DI ROSA M. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema. **Eur J Pharmacol** 286:219-22, 1995.

SCHAFFER W, TIELSCH J, CASPER FW, SEUFERT RJ, ZAHRADNIK HP. Urinary excretion of 6-keto-PGF₁ α TxB₂ and PGE₂ in a rat animal model for preeclampsia-like syndrome. **Prostaglandins** 46:167-75, 1993.

SCHAFFER WR, SEUFERT RJ, CASPER FW, ZAHRADNIK HP. Urinary excretion of 2,3-dinor-6-keto-PGF₁ α and 11-dehydro-TxB₂ by the gravid spontaneously hypertensive rat. **Prostaglandins** 52:1-11, 1996.

SCHRAMMEL A, BEHREND S, SCHMIDT K, KOESLING D, MAYER B. Characterization of 1H-[1,2,4]Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol Pharmacol** 48:184-8, 1995.

SIMAAN M, CADORETTE C, POTEREK M, ST-LOUIS J, BROCHU M. Calcium channels contribute to the decrease in blood pressure of pregnant rats. **Am J Physiol** 282(2):H665-H671, 2002.

SIMONSEN U, WADSWORTH RM, BUUS NH, MULVANY MJ. In vitro simultaneous measurements of relaxation and nitric oxide concentration in rat superior mesenteric artery. **J Physiol** 516(1):271-282, 1999.

SONNENBURG WK, BEAVO JA. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. **Adv Pharmacol** 26:87-114, 1994.

SPARKS HV & BOHR DF. Effect of stretch on passive tension and contractility of isolated vascular smooth muscle. **Am J Physiol** 202:835-40, 1962.

SRIVASTAVA P, RAJANIKANTH M, RAGHAVAN SAV, DIKSHIT M. Role of endogenous reactive oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. **Pharmacol Res** 45:375-82, 2002.

STADLER J, HARBRECH BG, DI SILVIO M, CURRAN RD, JORDAN ML, SIMMONS RL, BILLIAR TR. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat kupffer cells. **J Leukoc Biol** 53:165-72, 1993.

ST-LOUIS J & SICOTTE B. Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilatation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. **Am J Obstet Gynecol** 166:684-92, 1992.

ST-LOUIS J, PARÉ H, ROY B, BROCHU M. Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and bay K 8644. **J Soc Gynecol Invest** 2:516-22, 1995.

TANAKA Y, IGIMI S, AMANO F. Inhibition of prostaglandin synthesis by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. **Arch Biochem Biophys** 391:207-17, 2001.

TEEUW AH, DE JONG W. Time course of decrease in blood pressure and in blood pressure response to vasopressor agents during pregnancy in the rat. **Pflügers Arch** 341:197-208, 1973.

TETSUKA T, DAPHNA-IKEN D, MILLER BW, GUAN Z, BAIER LD, MORRISON AR. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. **J Clin Invest** 97:2051-56, 1996.

THORNBURG KL, JACOBSON SL, GIRAUD GD, MORTON MJ. Hemodynamic changes in pregnancy. **Sem Perinatol** 24:11-4, 2000.

TODA N, HATANO Y, HAYASHI S. Modifications by stretches of the mechanical response of isolated cerebral and extracerebral arteries to vasoactive agents. **Pflügers Arch** 374:73-7, 1978.

TSAI A, WEI C, KULMACZ RJ. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. **Arch Biochem Biophys** 313:367-72, 1994.

TUTTLE JL, FALCONE JC. Nitric oxide release during α 1-adrenoceptor-mediated constriction of arterioles. **Am J Physiol** 281:H873-81, 2001.

UNGVARI Z, BROWN G, VENUTO R, KOLLER A, LOSONCZY G. Increased NO-mediated and reduced TxA₂-dependent responses in skeletal muscle arterioles in pregnancy. **Hypertens Pregnancy** 21:135-146, 2002.

UNO K, IUCHI Y, FUJII J, SUGATA H, IJIMA K, KATO K, SHIMOSEGAWA T, YOSHIMURA T. In vivo study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. **JPET** 309:995-1002, 2004.

VANWIJK MJ, KUBLICKIENE KR, BOER K, VANBAVEL E. Vascular function in preeclampsia. **Cardiovasc Res** 47:38-48, 2000.

VASSALE C, DOMENICI C, LUBRANO V, L'ABBATE A. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways in endothelial cells. **J Vasc Res** 40:491-9, 2003.

VISSER W, WALLENBURG HC. Central hemodynamic observations in untreated preeclamptic patients. **Hypertension** 17:1072-7, 1991.

XU D, MARTIN PY, JOHN JS, TSAI P, SUMMER SN, OHARA M, KIM JK, SCHRIER RW. Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. **Am J Physiol** 271:R1739-45, 1996.

YAMADA T, FUJINO T, YUHKI K, HARA A, KARIBE H, TAKAHATA O, OKADA Y, XIAO C, TAKAYAMA K, KURIYAMA S, TANIGUCHI T, SHIOKOSHI T, OHSAKI Y, KIKUCHI K, NARUMIYA S, USHIKUBI F. Thromboxane A₂ regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Circulation** 108:2381-6, 2003.

WALDMAN SA, MURAD F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev** 39:163-208, 1987.

WANG YP, WALSH SW, GUO JD, ZHANG JY. Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, vitamin E, and lipid peroxides throughout normal pregnancy. **Am J Physiol** 165:1690-4, 1991.

WATKINS DN, GARLEPP MJ, THOMPSON PJ. Regulation of the inducible cyclo-oxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. **Br J Pharmacol** 121:1482-8, 1997.

WEINER CP, LIU KZ, THOMPSON L, HERRIG J, CHESTNUT D. Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: their role in reduced adrenergic sensitivity. **Am J Obst Gynecol** 261:H1275-83, 1991.

WEINER CP, THOMPSON LP, LIU KZ, HERRIG JE. Pregnancy reduces serotonin-induced contraction of guinea pig uterine and carotid arteries. **Am J Physiol** 263:H1764-69, 1992a.

WEINER CP, THOMPSON LP, LIU KZ, HERRIG JE. Endothelium-derived relaxing factor and indomethacin-sensitive contracting factor alter arterial contractile responses to thromboxane during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 166:1171-81, 1992b.

WELCH G, LOSCALZO J. Nitric oxide and the cardiovascular system. **J Cardiac Surg** 9:361-71, 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)