



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeitos Genómicos e Não-genómicos do Estradiol no Músculo Liso Vascular

Adriana Miguel Santos Sousa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños
Co-orientador: Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

Covilhã, Junho de 2018

Dedicatória

*Aos meus avós Zé, João e Isaura,
que vi partir no decorrer desta etapa académica*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños, por me ter dado a oportunidade de fazer parte deste grupo de investigação e por ter acreditado nas minhas capacidades. Agradeço também o seu total apoio e disponibilidade para me esclarecer e ensinar ao longo desta etapa, as suas palavras de incentivo, e o tempo que dedicou ao meu trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira, pela orientação, paciência e disponibilidade para me auxiliar sempre que necessário, e pelos ensinamentos teóricos e práticos.

Um obrigado ao Professor Doutor Cláudio Jorge Maia pela ajuda e tempo dispendido para me ensinar PCR quantitativo.

Aos membros do Centro de Investigação e do grupo de Cardiovascular pela ajuda e partilha de conhecimentos.

Um agradecimento especial à minha família, sem a qual não teria sido possível concretizar esta etapa. Aos meus pais, a quem devo tudo o que sou hoje, e especial à minha mãe por todo o apoio incondicional e compreensão, e pelo constante encorajamento. À minha avó Etelvina pela força que sempre me transmitiu e pela presença assídua no meu percurso. Ao meu irmão por acreditar em mim e me fazer sempre sorrir especialmente nos momentos mais difíceis. Aos meus amigos, em especial à Inês e à Rita, pela amizade, paciência e incentivo.

Resumo

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade nos países ocidentais. No entanto, tem sido demonstrado que a incidência destas patologias em mulheres pré-menopausa é significativamente mais baixa quando comparada com mulheres pós-menopausa e homens de idade comparável. Assim, foi sugerido que os estrogénios, nomeadamente o estradiol (E2), possam exercer um papel cardiovascular protetor, nomeadamente ao serem potentes vasodilatadores. No entanto, os mecanismos subjacentes ao efeito vasodilatador do E2 permanecem por esclarecer. Adicionalmente, o papel desta hormona é controverso em patologias da gravidez, como a diabetes gestacional ou a hipertensão gestacional.

Assim, no presente estudo foram utilizadas artérias umbilicais humanas sem endotélio de grávidas saudáveis (AUHctr), com diabetes gestacional (AUHdge) ou com hipertensão gestacional (AUHhip). As artérias foram incubadas em meio de cultura durante 24h com ou sem adição de E2 para estudar os efeitos genómicos e não genómicos do E2 nas AUHctr, AUHdge e AUHhip, assim como o mecanismo vasodilatador do E2 nas AUHctr. Após a incubação, as artérias foram colocadas em banho de órgãos para registo da tensão isométrica, e foram estimuladas, de forma a contrair, com serotonina (5-HT, 1 μ M) ou Cloreto de Potássio (KCl, 60 mM). Em seguida, as artérias contraídas foram expostas a concentrações crescentes de E2 (1-100 μ M) ou, como controlo, do seu veículo (etanol). Para determinar o mecanismo vasodilatador do E2 foram usados os seguintes fármacos: nifedipina, um inibidor dos canais de cálcio tipo L (LTCC); nitroprussiato de sódio, um estimulador da guanilato ciclase solúvel; péptido natriurético auricular, um estimulador da guanilato ciclase particulada; 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), um inibidor da guanilato ciclase solúvel; e SQ 22536, um inibidor da adenilato ciclase.

Para a análise da expressão genética foram utilizadas as células do músculo liso das AUHctr obtidas após dissecação do cordão umbilical e posterior cultura celular. Estas células foram incubadas durante 24h em meio sem soro, e, de seguida, durante 24h em E2 (10nM e 100nM) ou em veículo. Após extração de RNA e posterior síntese de cDNA, a expressão de genes envolvidos na regulação dos canais LTCC (Ca_v1.2), canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) (K_vB1, K_vB2, K_vB3) e canais de potássio de grande condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}) (BK_{Ca} α , BK_{Ca} β) foi analisada através da técnica de PCR quantitativo (qPCR).

Os resultados obtidos permitem concluir que o E2 provoca um vasorelaxamento rápido e dependente da concentração nas AUHctr, cujo mecanismo está associado à inibição dos LTCC e é independente da ativação das guanilato ciclasas (solúvel e particulada) e da adenilato ciclase. Adicionalmente, a existência de efeitos genómicos do E2 não modificou os efeitos rápidos do próprio E2. Por outro lado, a exposição das células do músculo liso das AUHctr ao

E2 (24h) levou a um aumento da expressão das subunidades $K_v\beta 1$ dos canais K_v , e das subunidades $BK_{Ca\alpha}$ e $BK_{Ca\beta}$ dos canais BK_{Ca} , não tendo sido detetadas alterações significativas na expressão de mRNA da subunidade $Ca_v\alpha 1$ dos canais $Ca_v 1.2$ nem das subunidades $K_v\beta 2$ e $K_v\beta 3$ dos canais K_v .

Verificou-se que as AUHdge apresentam menor capacidade contrátil que as AUHctr e, após incubação com E2, são menos sensíveis aos efeitos rápidos deste fármaco. Concluiu-se também que as AUHhip apresentam maior sensibilidade à 5-HT e menor sensibilidade aos efeitos rápidos do E2 em comparação com as AUHctr.

Palavras-chave

Estradiol, artéria umbilical humana, diabetes gestacional, hipertensão gestacional, banho de órgãos, qPCR

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality in Western countries. However, the incidence of these conditions in premenopausal women is significantly lower when compared to postmenopausal women and men of comparable age. Thus, it has been suggested that estrogens, namely estradiol (E2), may play a cardiovascular protective role, namely as they are potent vasodilators. However, the mechanisms underlying the vasodilatory effect of E2 remain unclear. Additionally, the role of this hormone is controversial in pregnancy conditions, such as gestational diabetes or gestational hypertension.

Thus, in the present study, we used human umbilical arteries without endothelium from pregnant women that were healthy (AUHctr), had gestational diabetes (AUHdge) or had gestational hypertension (AUHhip). To study the genomic and non-genomic effects of E2 in AUHctr, AUHdge and AUHhip, as well as the vasodilator mechanism of E2 in AUHctr, these tissues were incubated in culture medium for 24h with or without E2. After incubation, the arteries were placed in an organ bath for isometric tension recording, and were contracted with serotonin (5-HT, 1 μ M) or Potassium Chloride (KCl, 60mM). They were then exposed to increasing concentrations of E2 (1-100 μ M) or its vehicle (ethanol). To determine the vasodilator mechanism of E2, the following drugs were used: nifedipine, an inhibitor of the L-type calcium channels (LTCC); sodium nitroprusside, a soluble guanylate cyclase stimulator; atrial natriuretic peptide, a particulate guanylate cyclase stimulator; 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), a soluble guanylate cyclase inhibitor; and SQ 22536, an adenylate cyclase inhibitor.

For the analysis of the genetic expression, AUHctr smooth muscle cells obtained after dissection of the umbilical cord and subsequent cell culture were used. These cells were incubated for 24h in serum-free medium, and then for 24h in E2 (10nM and 100nM) or vehicle. After RNA extraction and subsequent cDNA synthesis, expression of genes involved in the regulation of LTCC channels (Ca_v1.2), voltage-dependent potassium channels (K_v) (K_vβ1, K_vβ2, K_vβ3) and large conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) (BK_{Ca}α, BK_{Ca}β) was analyzed by quantitative PCR (qPCR).

In this study, we concluded that E2 causes a rapid concentration-dependent vasorelaxation in AUHctr, associated with the inhibition of the LTCC, independent of the activation of soluble or particulate guanylate cyclase or adenylate cyclase. Furthermore, the existence of genomic effects of E2 did not modify the rapid effects of the same drug. However, the exposure of AUHctr smooth muscle cells to E2 led to an increase in the expression of the K_vβ1 subunits of the K_v channels, and the BK_{Ca}α and BK_{Ca}β subunits of the BK_{Ca} channels, and no significant

changes were detected in mRNA expression of $Ca_v\alpha1$ subunit of $Ca_v1.2$ channels nor of the $K_v\beta2$ and $K_v\beta3$ subunits of the K_v channels.

We found that AUHdge present decreased contractile ability than AUHctr and, after incubation with E2, are less sensitive to the rapid effects of this drug. We also concluded that AUHhip present a higher sensitivity to 5-HT and less sensitivity to the rapid effects of E2 when compared to AUHctr.

Keywords

Estradiol, human umbilical artery, gestational diabetes, gestational hypertension, organ bath, qPCR

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Cordão Umbilical	1
1.1.1.	Artérias Umbilicais Humanas	2
1.2.	Músculo Liso Vascular	3
1.2.1.	Mecanismos de Contração do Músculo Liso	5
1.2.2.	Mecanismos de Relaxamento do Músculo Liso	8
1.3.	Canais iónicos	9
1.3.1.	Canais de Potássio	9
1.3.2.	Canais de Cálcio	14
1.4.	Nucleótidos Cíclicos	17
1.4.1.	Adenosina monofosfato cíclica	18
1.4.2.	Guanosina monofosfato cíclica	18
1.5.	Estrogénios e estradiol	19
1.5.1.	Estrogénios e doenças cardiovasculares	21
1.5.2.	Mecanismo vasodilatador do estradiol	22
1.6.	Patologias na Gravidez	27
1.6.1.	Diabetes gestacional	27
1.6.2.	Hipertensão na gravidez	27
2.	Objetivos	29
3.	Materiais e Métodos	31
3.1.	Preparação das amostras biológicas	31
3.2.	Análise da contratilidade vascular	31
3.3.	Análise da expressão genética	32
3.3.1.	Dissecação do cordão umbilical e cultura celular	32
3.3.2.	Tratamento com estradiol	33
3.3.3.	Extração de RNA	33
3.3.4.	Síntese de cDNA	34
3.3.5.	Análise da expressão genética por qPCR	35
3.4.	Análise estatística	36
4.	Resultados	37
4.1.	Artérias procedentes de grávidas saudáveis (AUHctr)	37
4.1.1.	Efeitos do estradiol na tensão induzida por 5-HT e KCl	37
4.1.2.	Análise simultânea dos efeitos rápidos e genómicos do estradiol	38
4.1.3.	Análise do mecanismo vasorelaxante do estradiol	40
4.1.4.	Efeitos do estradiol na expressão genética	45
4.2.	Artérias procedentes de grávidas com diabetes gestacional (AUHdge)	49
4.2.1.	Comparação da tensão induzida por 5-HT e KCl em AUHdge e em AUHctr	49

4.2.2.	Efeitos vasculares do estradiol em AUHdge	51
4.3.	Artérias procedentes de grávidas hipertensas (AUHhip).....	53
4.3.1.	Comparação da tensão induzida por 5-HT em AUHhip e em AUHctr	53
4.3.2.	Efeitos vasculares do estradiol em AUHhip	53
5.	Discussão	55
5.1.	Efeitos do estradiol em AUHctr	55
5.1.1.	Tensão induzida por 5-HT e KCl e efeitos vasculares do E2	55
5.1.2.	Análise do mecanismo vasorelaxante do estradiol	56
5.1.3.	Efeitos do estradiol na expressão genética	57
5.2.	Função vascular e efeitos do estradiol em AUHdge	59
5.3.	Função vascular e efeitos do estradiol em AUHhip.....	61
6.	Conclusões e perspectivas futuras	63
7.	Trabalhos apresentados em congressos	65
8.	Bibliografia	67

Lista de Figuras

Figura 1 - Corte histológico de um cordão umbilical	1
Figura 2 - Circulação feto-placentar	2
Figura 3 - Artéria umbilical humana.....	3
Figura 4 - Célula muscular lisa	4
Figura 5 - Morfologia de células do músculo liso vascular de fenótipo sintético e contrátil	5
Figura 6 - Regulação da contração do músculo liso.....	6
Figura 7 - Interação entre os miofilamentos na contração e relaxamento	7
Figura 8 - Contração do músculo liso.....	7
Figura 9 - Relaxamento do músculo liso	9
Figura 10 - Expressão e função dos canais de potássio na artéria umbilical humana	11
Figura 11 - Estrutura do canal Kv.	12
Figura 12 - Estrutura dos canais BKCa.....	13
Figura 13 - Estrutura dos canais VOCC	16
Figura 14 - Estrutura dos recetores NPR e recetor da sGC	19
Figura 15 - Estrutura química do estradiol	20
Figura 16 - Biossíntese do estradiol no ovário	21
Figura 17 - Tensões induzidas por 5-HT e KCl em AUHctr incubadas com veículo, E2 100nM e E2 100µM	37
Figura 18 - Efeitos de concentrações crescentes de E2 (1µM-100µM) em AUHctr	39
Figura 19 - Efeito vasorelaxante da NIF (10µM) e E2 em AUHctr incubadas com veículo ou E2 e contraídas com 5-HT	40
Figura 20 - Efeito vasorelaxante da NIF (100nM) e E2 em AUHctr incubadas com veículo ou E2 e contraídas com KCl.....	41
Figura 21 - Efeito vasorelaxante do SNP e E2 em AUHctr incubadas com veículo ou E2	42
Figura 22 - Efeito vasorelaxante do E2 após inibição da sGC, em AUH incubadas em veículo ou E2 contraídas com 5-HT	43
Figura 23 - Efeito vasorelaxante do ANP e E2 em AUH incubadas com veículo ou E2 contraídas com 5-HT	44
Figura 24 - Efeito vasorelaxante do E2 após inibição da AC, em AUH incubadas em veículo ou E2 e contraídas com 5-HT	45
Figura 25 - Expressão do gene $Ca_v1.2$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM	46
Figura 26 - Expressão do gene $K_v\beta1$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM.	46
Figura 27 - Expressão do gene $K_v\beta2$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM	47

Figura 28 - Expressão do gene $K_v\beta 3$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM	47
Figura 29 - Expressão do gene $BK_{Ca}\alpha$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM	48
Figura 30 - Expressão do gene $BK_{Ca}\beta$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM	48
Figura 31 - Tensões induzidas por 5-HT e KCl em AUHctr e AUHdge incubadas em veículo ou E2 100 μ M	50
Figura 32 - Efeitos rápidos do E2 em AUHctr e AUHdge contraídas com 5-HT e KCl.....	52
Figura 33 - Tensões induzidas por 5-HT em AUHctr e AUHhip incubadas em veículo ou E2 100 μ M	53
Figura 34 - Efeitos rápidos do E2 em AUHctr e AUHhip contraídas com 5-HT.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caraterísticas e papeis funcionais dos canais de potássio encontrados no músculo liso vascular.....	11
Tabela 2 - Subunidades dos canais K_v	12
Tabela 3 - Famílias de canais de cálcio	17
Tabela 4 - <i>Primers</i> utilizados para qPCR	35

Lista de Acrónimos

4-AP	4-Aminopiridina
5-HT	5-Hidroxitriptamina ou Serotonina
AC	Adenilato Ciclase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i> (Péptido Natriurético Auricular)
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Trifosfato de Adenosina)
ATPase	<i>Adenosine Triphosphatase</i> (Trifosfatase de Adenosina)
AUH	Artérias Umbilicais Humanas
AUHctr	Artérias Umbilicais Humanas de grávidas saudáveis
AUHdge	Artérias Umbilicais Humanas de grávidas com Diabetes Gestacional
AUHhip	Artérias Umbilicais Humanas de grávidas com Hipertensão Gestacional
Ba ²⁺	Bário
BK _{Ca}	<i>Large conductance calcium activated potassium channels</i> (Canais de Potássio de grande condutância ativados por cálcio)
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i> (Péptido Natriurético Cerebral)
Ca ²⁺	Cálcio
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico Complementar)
Cl ⁻	Cloro
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i> (Desoxirribonucleótido Trifosfatado)
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Endotelial)
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i> (Proteína de troca diretamente ativada pelo AMPc)
ER	<i>Estrogen Receptors</i> (Recetores de Estrogénios)
Fw	<i>Forward</i>
GC	Guanilato Ciclase
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclica
GPÉR	<i>G protein-coupled estrogen recetor 1</i> (Recetor de estrogénios acoplado à

	Proteína G)
GPR30	<i>G protein-coupled receptor 30</i> (Recetor acoplado à proteína G 30)
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i> (Trifosfato de Guanosina)
IK _{Ca}	<i>Intermediate conductance calcium activated potassium channels</i> (Canais de Potássio de intermédia condutância ativados por cálcio)
IP ₃	<i>Inositol trisphosphate</i> (Inositol Trifosfato)
K ⁺	Potássio
K _{2P}	<i>Two-pore domain potassium channels</i> (Canais de potássio com domínios de dois poros)
K _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis ao ATP
K _{IR}	Canais de Potássio Retificadores Internos
K _v	Canais de Potássio dependentes de voltagem
LTCC	<i>L-type Calcium Channel</i> (Canal de Cálcio Tipo L)
Mg ²⁺	Magnésio
ML	Músculo Liso
MLC	<i>Myosin Light-Chain</i> (Cadeia Leve da Miosina)
MLCK	<i>Myosin Light-Chain Kinase</i> (Quinase da Cadeia Leve da Miosina)
MLCP	<i>Myosin Light-Chain Phosphatase</i> (Fosfatase da Cadeia Leve da Miosina)
MLV	Músculo Liso Vascular
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico Mensageiro)
Na ⁺	Sódio
NCX	<i>Sodium-Calcium Exchanger</i> (Permutador de Sódio e Cálcio)
NIF	Nifedipina
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Neuronal)
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase)
NPR	<i>Natriuretic Peptide Recetor</i> (Recetor de Péptido Natriurético)
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDE	<i>Phosphodiesterase</i> (Fosfodiesterase)
pGC	Guanilato Ciclase particulada ou membranar
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (Fosfatidilinositol 3-quinase)
PK	<i>Protein Kinase</i> (Proteína Quinase)
PKA	<i>cAMP-dependent Protein Kinase</i> (Proteína Quinase dependente de AMPc)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína Quinase C)
PKG	<i>cGMP-dependent Protein Kinase</i> (Proteína Quinase dependente de GMPc)
PLC	<i>Phospholipase C</i> (Fosfolipase C)
PMCA	<i>Plasma Membrane ATPase Ca²⁺</i> (Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática)
PSS	<i>Physiologic Saline Solution</i> (Solução Fisiológica Salina)

qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
RhoGEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i> (Fator de Troca do Nucleótido de Guanina)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROCC	<i>Receptor-operated Calcium Channels</i> (Canais de Cálcio Operados por Recetor)
ROCK	<i>Rho-associated Protein Kinase</i> (Proteína Quinase dependente da Rho-A)
Rv	<i>Reverse</i>
SERCA	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i> (Ca ²⁺ -ATPase Sarco/Endoplasmática)
sGC	Guanilato Ciclase solúvel
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i> (Globulina de Ligação às Hormonas Sexuais)
SK _{Ca}	<i>Small conductance calcium activated potassium channels</i> (Canais de Potássio de pequena condutância ativados por cálcio)
SNP	<i>Sodium Nitroprusside</i> (Nitroprussiato de Sódio)
SOCC	<i>Store-operated Calcium Channels</i> (Canais de cálcio operados por armazenamento)
T.A.	Temperatura de <i>Annealing</i>
TEA	Tetraetilamónio
TMD	<i>Transmembrane domain</i> (Domínio transmembranar)
TTCC	<i>T-type calcium channels</i> (Canais de Cálcio Tipo T)
VOCC	<i>Voltage-operated Calcium Channels</i> (Canais de Cálcio Operados por Voltagem)
β2M	β2-microglobulina

1. Introdução

1.1. Cordão Umbilical

O cordão umbilical liga o feto à placenta, permitindo a transferência de nutrientes e gases de e para a circulação materna sem haver mistura direta entre o sangue fetal e materno (1).

O cordão umbilical tem cerca de 50-70 centímetros de comprimento e 2 centímetros de largura no final da gravidez. É composto por 2 artérias (artérias umbilicais) e uma veia (veia umbilical). Estes vasos umbilicais encontram-se rodeados externamente pela geleia de Wharton que lhes confere proteção (Figura 1) (1).



Figura 1 - Corte histológico de um cordão umbilical. A: Artérias; Ve: Veia; W: Geleia de Wharton (2)

A circulação feto-placentar transporta, através das artérias umbilicais, sangue fetal desoxigenado e sem nutrientes do feto até aos vasos fetais das vilosidades coriônicas. Após a troca de oxigênio e nutrientes nas vilosidades terminais, a veia umbilical transporta sangue oxigenado e rico em nutrientes de volta para a circulação fetal (Figura 2) (1).



Figura 2 - Circulação feto-placentar. Adaptado de (1)

A amostra de cordão umbilical é uma excelente fonte de células do músculo liso (ML) vascular (MLV), úteis no estudo de mecanismos e funções celulares (3). Esta amostra é de fácil aquisição pois é frequentemente descartada após o parto, e a sua obtenção não é perigosa para a mãe nem para o recém-nascido (3).

1.1.1. Artérias Umbilicais Humanas

As artérias umbilicais humanas (AUH) são compostas por três túnicas: íntima, média e adventícia (Figura 3) (4). A túnica íntima é a mais interna e consiste numa camada fina de epitélio simples pavimentoso composto por células endoteliais (5, 6). Adjacente a esta túnica está a túnica média, composta por duas camadas de células de MLV: uma camada interna longitudinal, e uma camada externa circular (6). Estas células do MLV das AUH apresentam um papel preponderante no controlo do fluxo sanguíneo feto-placentar, sendo responsáveis pela regulação do tónus vascular em resposta a estímulos hormonais e hemodinâmicos. Assim, a utilização destas células permite analisar vias de sinalização e mecanismos envolvidos na regulação do tónus vascular das AUH (3). A camada mais externa das AUH é a geleia de Wharton, uma forma particular de túnica adventícia, e consiste em tecido conjuntivo mucoso e fibroblastos, rodeando os vasos umbilicais (4).

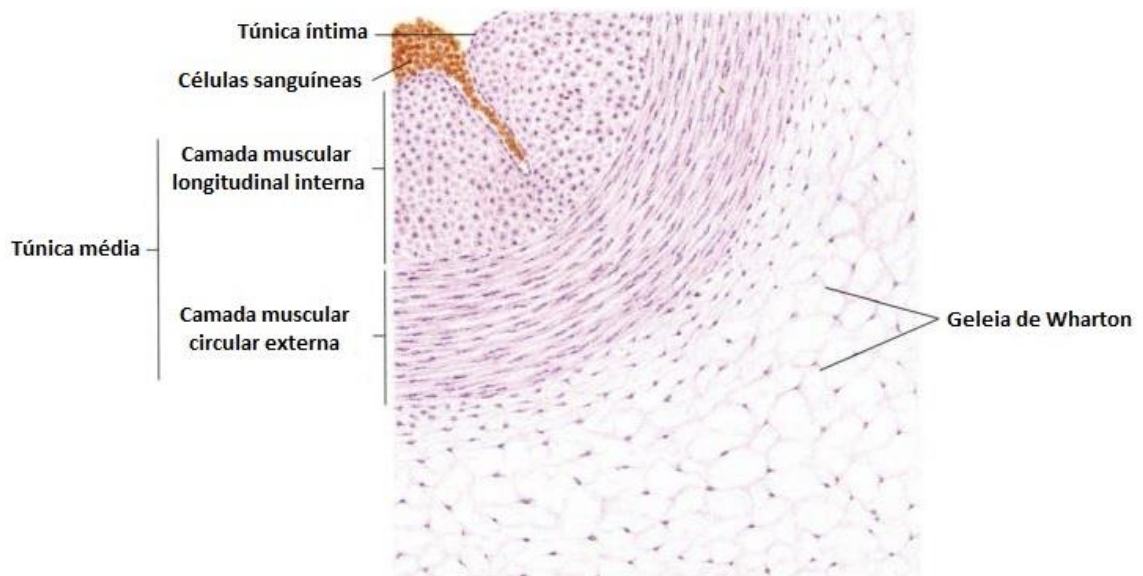


Figura 3 - Artéria umbilical humana. Adaptado de (7)

Como referido, as AUH estão envolvidas na circulação fetoplacentar, e os mecanismos que regulam a sua contratilidade são cruciais para uma troca ótima de nutrientes e gases entre o feto e a placenta. Uma vez que os vasos do cordão umbilical não são inervados a contração e vasodilatação das camadas de ML destes vasos depende de substâncias vasoativas presentes em circulação ou da libertação local de fatores (secretados pelas células endoteliais ou pelas células da adventícia) (4, 8).

Os vasos umbilicais são sensíveis a várias substâncias vasoativas tais como serotonina (5-HT), histamina, angiotensina II, prostaglandinas, oxitocina, entre outras (1).

1.2. Músculo Liso Vascular

O ML apresenta uma ampla distribuição pelo corpo humano, com uma grande variedade de funções. Encontra-se nas paredes dos vasos sanguíneos (MLV), onde regula o fluxo sanguíneo, nas paredes de órgãos e tubos ocios, no interior do olho, entre outros locais (9).

As células do MLV são fusiformes e apresentam um único núcleo localizado no centro da célula (Figura 4). O seu comprimento varia entre 15 a 200 μ m e o seu diâmetro entre 5 a 10 μ m (10). Apresentam filamentos de actina (predominantes), também denominados por miofilamentos finos, e miosina, também denominados por miofilamentos grossos (10). Os filamentos de actina encontram-se ligados a corpos densos, espalhados pelo citoplasma (sarcoplasma), e a áreas densas na membrana plasmática (sarcolema). Filamentos intermediários não contráteis também estão ligados aos corpos densos. As células do MLV encurtam quando os filamentos de actina e miosina deslizam um sobre o outro na contração (10).

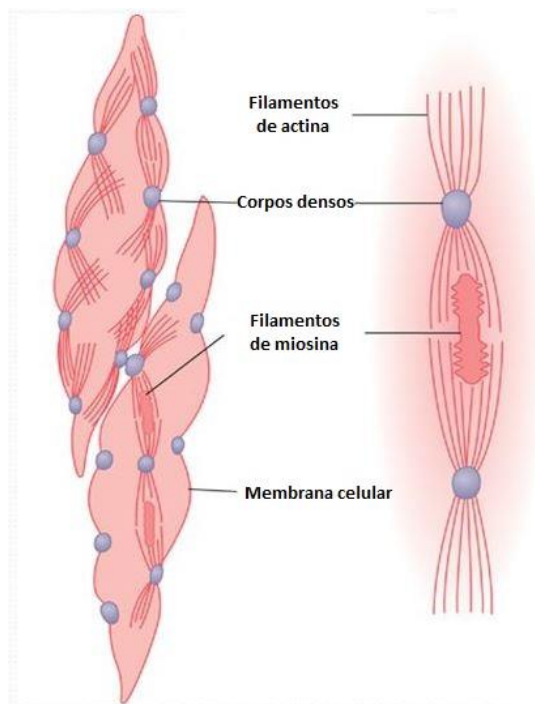


Figura 4 - Célula muscular lisa. Adaptado de (11)

O retículo sarcoplasmático das células do ML é o principal local intracelular de armazenamento de cálcio (Ca^{2+}). Estas células apresentam também cavéolas, que são áreas invaginadas ocas ao longo da superfície da membrana plasmática (10).

As células do MLV apresentam uma plasticidade considerável no seu fenótipo. Em vasos sanguíneos jovens e saudáveis, o fenótipo é predominantemente contrátil (responsável pelo tônus vascular), e a pressão sanguínea autorregulada. No entanto, ao longo da vida, estas células podem mudar o seu fenótipo para sintético, um fenótipo predominantemente não contrátil, em resposta a estímulos pró-inflamatórios, dieta ou outros fatores que resultam no desenvolvimento de aterosclerose ou remodelação vascular (12).

Assim, estas células em cultura podem desenvolver o fenótipo contrátil ou sintético, o que é um dos principais problemas na realização destas culturas, pois cada fenótipo é caracterizado por diferente morfologia, proliferação e expressão genética (4, 13). Em termos morfológicos, as células do ML com fenótipo contrátil são alongadas e fusiformes, enquanto que as células do ML com fenótipo sintético apresentam uma morfologia rombóide (Figura 5) (13). Por outro lado, nas células do ML contráteis exibem baixas taxas de proliferação e de atividade sintética, e expressam diversas proteínas contráteis, tais como α -actina do ML, cadeias pesadas da miosina do ML, assim como diferentes tipos de canais iônicos e recetores membranares, que regulam a função contrátil (13, 14), enquanto que as células do ML sintéticas apresentam um maior número de organelos envolvidos na síntese proteica, e exibem taxas superiores de crescimento e migração (13). No entanto, foi demonstrado que ao

colocar as células durante 24 horas em meio sem soro, estas apresentam predominantemente o fenótipo contrátil (4, 15).

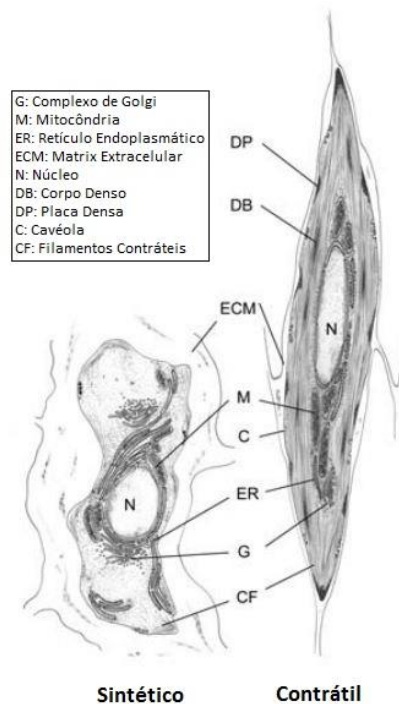


Figura 5 - Morfologia de células do músculo liso vascular de fenótipo sintético e contrátil. Adaptado de (13)

1.2.1. Mecanismos de Contração do Músculo Liso

O tônus basal do MLV é determinado por um equilíbrio entre sinais (neurais, iônicos, humorais ou força mecânica) que provocam contração ou relaxamento (16).

Em condições fisiológicas, a contração das células do MLV é iniciada pela ativação de canais iônicos ou de recetores, e o mecanismo contrátil pode ser dependente ou independente de Ca^{2+} (Figura 6) (16, 17).

O mecanismo dependente do Ca^{2+} ocorre quando aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico, o que pode ocorrer por um influxo de Ca^{2+} do exterior da célula através de canais de Ca^{2+} da membrana plasmática ou pela libertação deste ião a partir do retículo sarcoplasmático (18). Existem vários tipos de canais de Ca^{2+} envolvidos no controlo da contratilidade das células do MLV, como será descrito no capítulo “Canais de Cálcio”. Relativamente à libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, esta ocorre após a ativação de recetores acoplados à proteína G_q por agonistas, tais como a norepinefrina (recetores α_1 -adrenérgicos), angiotensina II (recetores AT_1), endotelina-1 (recetores ET_A) e vasopressina (recetores V_1) (19). A G_q estimula a atividade da Fosfolipase C (PLC), que catalisa a formação de dois segundos mensageiros: o inositol trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 age no retículo sarcoplasmático provocando a libertação de Ca^{2+} para o citosol. O DAG em conjunto com o Ca^{2+} ativa a

proteína quinase C (PKC), que fosforila outras proteínas que podem regular o processo da contração (16, 19).

Ao aumentar a concentração de Ca^{2+} , estes íons combinam-se com a proteína calmodulina formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que vai posteriormente ativar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK fosforila as cabeças das cadeias leves da miosina (MLC), o que permite a interação entre a miosina e a actina, provocando o ciclo das pontes cruzadas entre os dois tipos de filamentos que origina a contração (Figuras 6-8) (19).

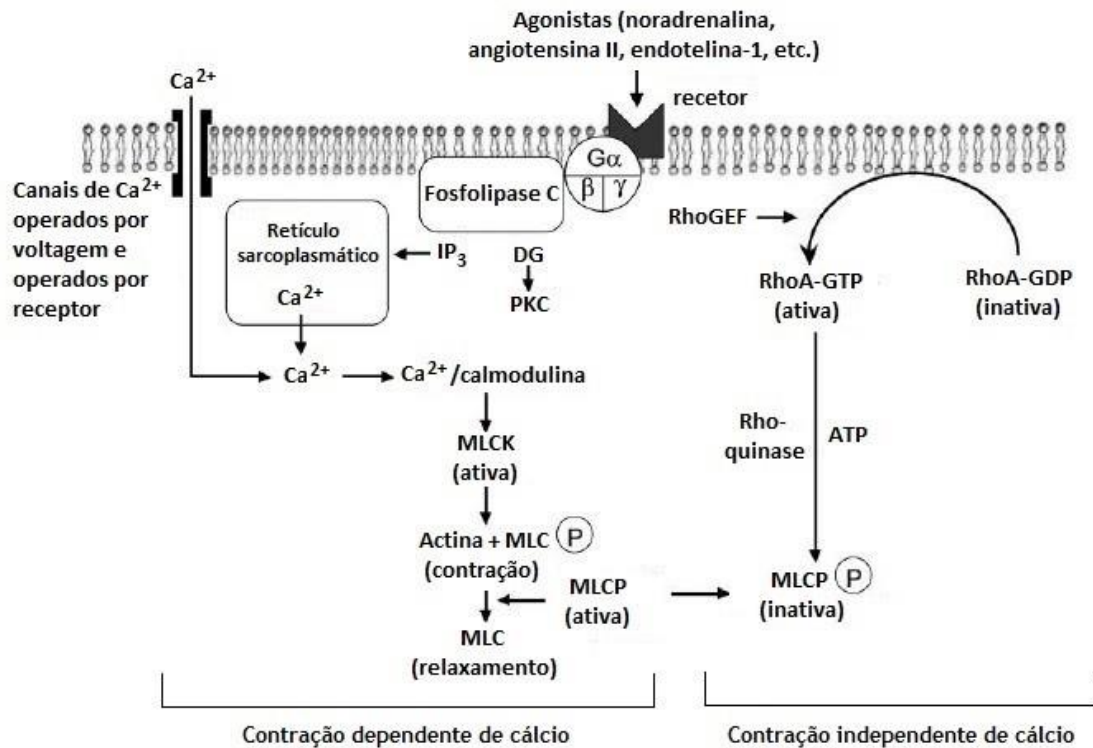


Figura 6 - Regulação da contração do músculo liso. Adaptado de (19)

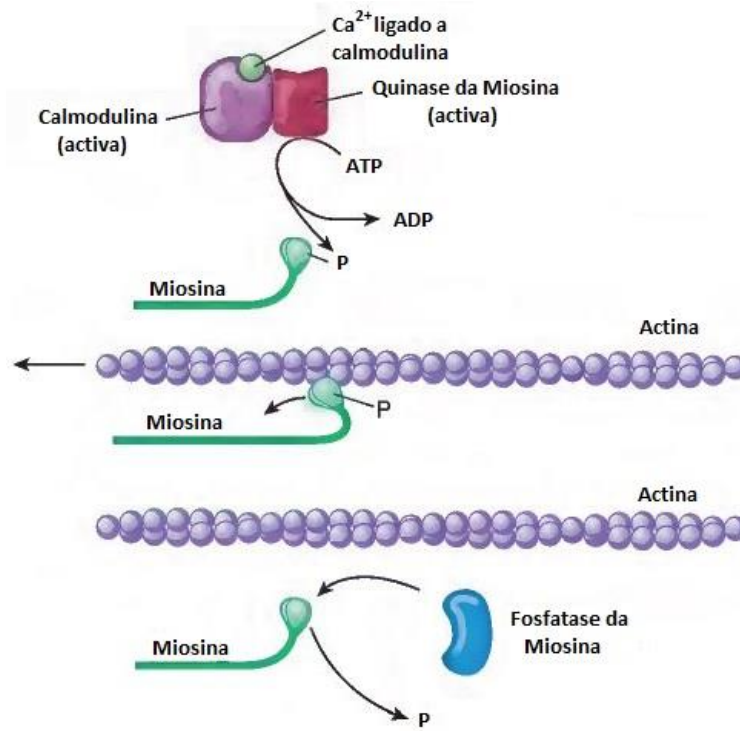


Figura 7 - Interação entre os miofilamentos na contração e relaxamento. Adaptado de (20)

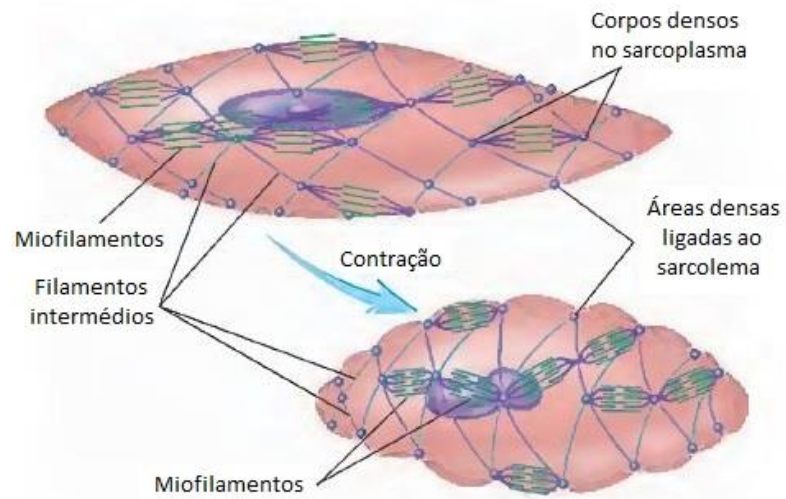


Figura 8 - Contração do músculo liso. Adaptado de (20)

O mecanismo independente de Ca^{2+} envolve a sensibilização ao Ca^{2+} . Este mecanismo pode ser iniciado ao mesmo tempo que a PLC é ativada, e envolve a ativação da proteína RhoA de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP). A ativação desta proteína envolve um fator de troca do nucleótido de guanina (RhoGEF) e a sua migração para a membrana plasmática. A ativação da RhoA leva ao aumento da atividade da proteína quinase dependente da RhoA (ROCK), que inibe a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP). Isto promove a contração das células do MLV, pois as MLC não podem ser desfosforiladas (19). Este efeito parece estar limitado às contrações induzidas pelo Ca^{2+} intracelular, e poderá ser mais importante na manutenção das contrações do que na fase inicial de desenvolvimento de força (17).

A via da ROCK parece apresentar um papel importante na patogénese da hipertensão em modelos animais, humanos, e em várias situações de aumento da resistência vascular periférica observada na hipertensão (21), assim como na vasoconstrição arterial prolongada observada na falência cardíaca (22). Adicionalmente, a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da RhoA parece estar diminuída em AUH de gravidezes com pré-eclâmpsia (23).

1.2.2. Mecanismos de Relaxamento do Músculo Liso

O relaxamento do músculo liso ocorre quando existe uma reduzida fosforilação das MLC. Isto pode resultar de: 1) diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico, 2) inibição da fosforilação das MLC (quer por diminuição da actividade da MLCK ou aumento da actividade da MLCP), ou 3) mecanismo de supressão da força, relacionado com a regulação da interação entre a actina e a miosina (17).

A diminuição de Ca^{2+} citosólico pode decorrer da inibição do influxo de Ca^{2+} , do transporte ativo do Ca^{2+} para o exterior da célula ou para o interior de organelos ou da inibição da saída de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. A inibição do influxo de Ca^{2+} ocorre na repolarização da membrana plasmática e em resposta a antagonistas destes canais (19). O transporte ativo do Ca^{2+} citosólico é realizado para o retículo sarcoplasmático pela ação da Ca^{2+} -Trifosfatase de Adenosina (ATPase) sarco/endoplasmática (SERCA), dependente de magnésio (Mg^{2+}), ou para o exterior da célula através da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e, em menor escala, do permutador de Sódio(Na^+)/ Ca^{2+} (NCX) (19). A diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico reduz a actividade da MLCK (19).

O relaxamento do músculo liso decorre também da ação de segundos mensageiros, como os nucleótidos cíclicos. Estes compostos podem influenciar alguns dos processos anteriormente referidos, como será descrito no capítulo “Nucleótidos Cíclicos”.

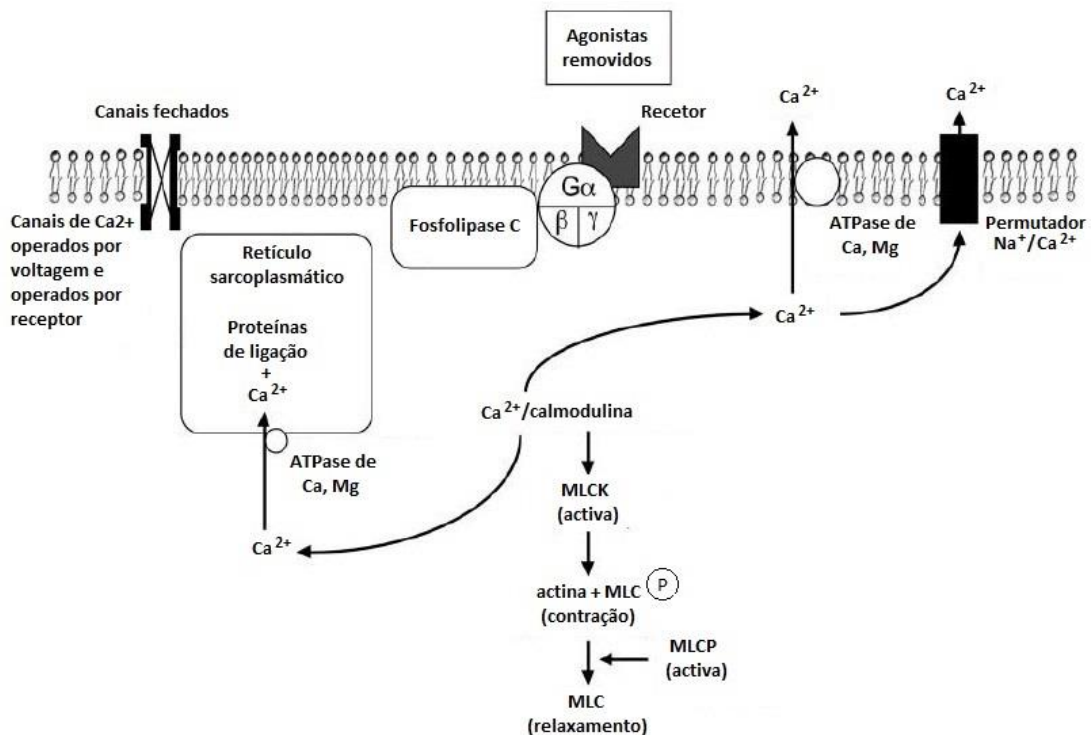


Figura 9 -Relaxamento do músculo liso. Adaptado de (19)

1.3. Canais iônicos

Os canais iônicos são proteínas formadoras de poro que permitem o fluxo de íons através de membranas, como a membrana plasmática ou as membranas dos organelos intracelulares (24). No MLV estão presentes diversos tipos de canais tais como os canais de potássio (K^+), os canais de Ca^{2+} , os canais de cloro (Cl^-), e os canais catiónicos ativados pelo *stress* físico (25). Alguns destes canais, principalmente os canais de K^+ e de Ca^{2+} , apresentam um papel central na regulação do tónus vascular e na pressão arterial (26).

1.3.1. Canais de Potássio

Os canais de K^+ , presentes nas membranas plasmáticas celulares, são proteínas que permitem o fluxo de íons de K^+ através das membranas, e são fundamentais para a sobrevivência celular, regulando diversos processos tais como o controlo do tónus vascular (26).

Quanto à sua estrutura, os canais de K^+ são formados por proteínas homo- ou heterotetraméricas com subunidades α que formam o poro do canal. Existem diferentes subunidades α que apresentam números variáveis de domínios transmembranares (TMD). O número de TMD é a base de um dos sistemas de classificação dos canais de K^+ (27):

1. O grupo com 6 TMD (S1-S6) com domínios de 1 poro pode ser dividido em 3 famílias: canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v), canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de pequena (SK_{Ca}) e intermédia (IK_{Ca}) condutância, e os canais Slo K^+ que incluem os

canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) (com mais um TMD que os previamente mencionados);

2. O grupo com 4 TMD e domínios de 2 poros, denominados canais de K^+ com domínios de dois poros (K_{2p}), que foi recentemente descrito, e é caracterizado por canais com 2 subunidades α de 4 TMD com duas ansas formadoras de poro;
3. O grupo com 2 TMD e domínios de 1 poro, sendo os mais frequentemente observados os canais de K^+ retificadores internos (K_{IR}) e os canais de K^+ sensíveis ao Trifosfato de Adenina (ATP) (K_{ATP}).

Os canais de K^+ são cruciais na regulação da contratilidade vascular pois, através do seu papel na regulação do potencial de membrana em repouso, modulam a atividade dos Canais de Cálcio Operados por Voltagem (VOCC), controlando assim o influxo de Ca^{2+} e a sua concentração intracelular, e, desta forma, o grau de contração vascular (27, 28).

O encerramento dos canais de K^+ conduz à despolarização da membrana, e ativação dos VOCC (conduzindo a um influxo de Ca^{2+}), podendo ocorrer também a libertação do Ca^{2+} dos seus locais de armazenamento intracelulares. Estes eventos resultam num aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , levando à contração das células do MLV, e assim à vasoconstrição (27). Por outro lado, a abertura dos canais de K^+ leva ao efluxo de K^+ e hiperpolarização, fecho dos canais de Ca^{2+} (diminuindo o seu influxo). A ativação dos mecanismos de remoção do cálcio contribui para uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular, conduzindo à vasodilatação (27). Entre estes mecanismos estão a PMCA e o NCX, que transportam o Ca^{2+} para o exterior da célula, e a SERCA e a ATPase mitocondrial, que transportam o Ca^{2+} para os seus reservatórios intracelulares.

Nas células do MLV estão identificados quatro tipos de canais de K^+ : K_v , BK_{Ca} , K_{IR} e K_{ATP} (29-32) (Tabela 1 e Figura 10). Os canais SK_{Ca} e IK_{Ca} são fracamente expressores nas células do MLV, sendo geralmente expressos em células endoteliais (27). Os canais K_{2p} já foram descritos em alguns vasos, mas ainda não há evidências definitivas da sua presença nas AUH pela falta de inibidores específicos destes canais (27).

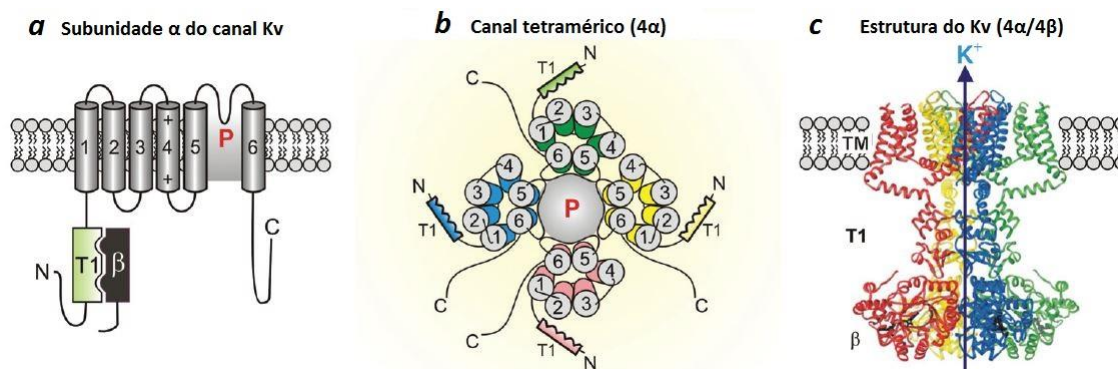


Figura 11 - Estrutura do canal K_v . Adaptado de (35)

Tabela 2 - Subunidades dos canais K_v . Adaptado de (27, 36)

Subunidades α		Subunidades β
$K_v1.1 - K_v1.10$	$K_v7.1 - K_v7.5$	$K_v\beta1$
$K_v2.1 - K_v2.2$	$K_v8.1 - K_v8.2$	$K_v\beta2$
$K_v3.1 - K_v3.4$	$K_v9.1 - K_v9.3$	$K_v\beta3$
$K_v4.1 - K_v4.3$	$K_v10.1$ e $K_v10.2$	
$K_v5.1$	$K_v11.1 - K_v11.3$	
$K_v6.1 - K_v6.4$	$K_v12.1 - K_v12.3$	

Estes canais são cruciais na regulação do tónus vascular, pois, como referido, são ativados em resposta à despolarização, abrindo e permitindo o efluxo de K^+ , conduzindo desta forma à repolarização e ao potencial de membrana em repouso (33). Por outro lado, estes canais são inibidos farmacologicamente pela 4-aminopiridina (4-AP) (37).

Os K_v são altamente expressos na maior parte das células do MLV (37), nomeadamente na AUH (32). No entanto, os canais K_v não parecem estar envolvidos na determinação do tónus basal da AUH (32), mas sim no mecanismo de vasodilatação da testosterona (38). Estudos eletrofisiológicos indicam uma diminuição na atividade destes canais em células do MLV de animais hipertensos, que poderá contribuir para a despolarização e o aumento do tónus vascular em indivíduos com esta patologia (25). Alterações funcionais destes canais estão ainda relacionadas com outras condições fisiopatológicas, como a diabetes (39, 40).

1.3.1.2. Canais de Potássio de grande condutância ativado por cálcio

Os canais BK_{Ca} permitem o efluxo de K^+ em resposta a mudanças na concentração intracelular de Ca^{2+} e à despolarização, pensando-se que contribuem para a manutenção do potencial de membrana em pequenos vasos (41).

Em termos de estrutura, são similares aos canais K_v sendo compostos por 4 subunidades α formadores de poro e 4 subunidades β (Figura 12). Diversos estudos apontam que as subunidades β destes canais são regulatórias, e parecem aumentar a sensibilidade ao cálcio

intracelular a estes canais, o que conduz à inibição dos VOCC (42). Estão descritas 4 famílias distintas das subunidades β : β 1- β 4, sendo que as células do ML expressam exclusivamente as subunidades β 1 (43).

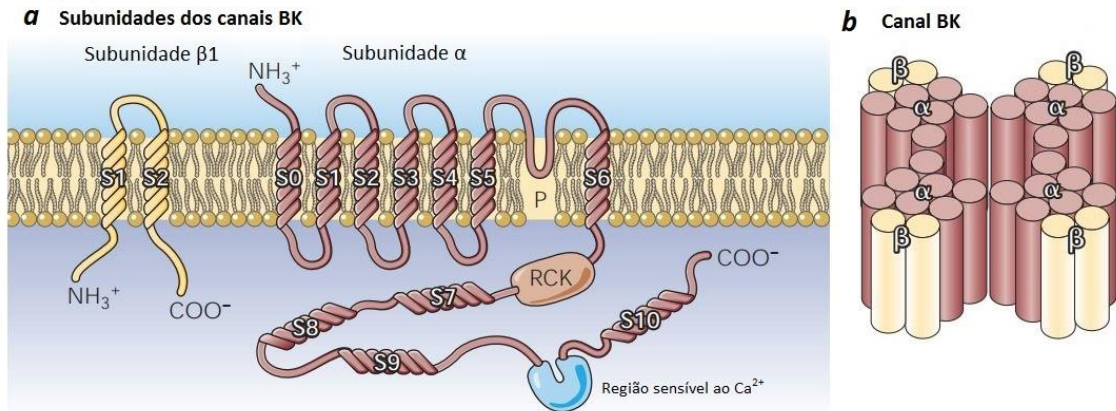


Figura 12 - Estrutura dos canais BK_{Ca} . Adaptado de (44)

Os canais BK_{Ca} podem ser bloqueados por fármacos como o tetraetilamónio (TEA), a iberiotoxina e a caribdotoxina, sendo a iberiotoxina o mais específico, pois tem inibe os canais a baixas concentrações, às quais não ocorre bloqueio de outros canais de K^+ (29, 30). Estes canais não são afetados pela glibenclamida, a apamina, ou o Bário (Ba^{2+}).

Estes canais são caraterísticos das células do MLV. Vários estudos implicam estes canais no controlo do estado contrátil da AUH; por exemplo, a utilização de TEA induz contração vascular destas artérias, enquanto que a utilização de um ativador (floretilina) destes canais induz relaxamento, sugerindo a participação dos BK_{Ca} na regulação do tónus basal da AUH (32).

Adicionalmente, estes canais parecem também estar envolvidos no relaxamento vascular induzido por várias substâncias, como o óxido nítrico (NO) (45), a testosterona (38), e os estrogénios (46, 47). Os estrogénios ativam os canais BK_{Ca} após exposições agudas (46, 47), e, após exposições crónicas estes aumentam a expressão da subunidade β 1 (48).

A função dos canais BK_{Ca} parece encontrar-se alterada em situações fisiopatológicas, como a hipertensão arterial (49), diabetes (50) e na hipertensão gestacional (51).

1.3.1.3. Canais de Potássio retificadores internos

Os canais K_{IR} provocam um maior fluxo de K^+ para o interior do que para o exterior da célula, ao inverso de realizarem extrusão de K^+ prevista pela equação de Nernst (corrente de K^+ para o exterior). Estes canais são assim ativados por hiperpolarização (vs. despolarização) e aumentos na concentração de K^+ extracelular (33). Por outro lado, são inibidos por baixas

concentrações de íons Ba^{2+} , e a sensibilidade a esta inibição aumenta com hiperpolarização (33).

Os canais K_{IR} foram identificados pela primeira vez no músculo esquelético, tendo sido também descritos posteriormente no MLV, nomeadamente em artérias cerebrais (52) e coronárias (53). Um estudo realizado por Radenković et. al reportou que a utilização de Ba^{2+} em anéis de AUH previamente contraídos por bradiquinina de gravidezes normais não apresentou qualquer efeito, indicando que estes canais não estão envolvidos neste mecanismo (51). No entanto, em anéis de AUH provenientes de gravidezes com diabetes gestacional, a utilização de Ba^{2+} aumentou a tensão induzida pela bradiquinina (51).

1.3.1.4. Canais de Potássio sensíveis ao ATP

Os canais K_{ATP} consistem em complexos octaméricos contendo dois tipos distintos de subunidades proteicas: quatro subunidades de canais de K^+ retificadores internos ($K_{IR6.1}$ ou $K_{IR6.2}$), estando cada subunidade K_{IR} associada a um recetor sulfonilureia regulador (54).

Os canais K_{ATP} são inibidos por concentrações intracelulares de ATP na ordem dos micromolar (54). Os difosfatos de nucleótidos, na presença de Mg^{2+} , ativam os canais K_{ATP} em vários tecidos, incluindo as células do MLV. OS efeitos inibidores do ATP resultam da ligação do ATP à subunidade K_{IR} , enquanto que a ativação por Mg^{2+} -dinucleótidos ocorre pela interação com o recetor sulfonilureia regulador (54). A atividade destes canais é também inibida por sulfonilureias (como a glibenclamida), agentes altamente seletivos para estes canais. Estes canais não são afetados pela iberiotoxina e apamina, e são menos sensíveis ao TEA (54).

Um bloqueio dos canais K_{ATP} leva a vasoconstrição e despolarização membranar em vários tipos de MLV (29). A sua ativação está associada a respostas patofisiológicas, como a dilatação arterial sistémica durante a hipóxia, hiperémia reativa na circulação coronária e cerebral, e vasodilatação induzida por acidose e choque por endotoxina (29). A inibição destes canais leva a uma autorregulação deficiente dos vasos coronários e cerebrais (29).

Os canais K_{ATP} foram identificados pela primeira vez no músculo cardíaco, tendo sido posteriormente descobertos em várias células incluindo as células do MLV (30). Não foram encontradas na literatura evidências do envolvimento dos canais K_{ATP} na contração/relaxamento de anéis de AUH intactos. Adicionalmente, foi já reportado que estes canais não contribuem para as correntes totais de K^+ em células do ML de AUH em cultura (55).

1.3.2. Canais de Cálcio

O Ca^{2+} é um sinalizador intracelular altamente versátil que regula muitas funções celulares tais como a motilidade celular, transcrição genética, contração muscular e a excitose (56). Este segundo mensageiro apresenta as suas funções principais de sinalização, nomeadamente a contração muscular, quando a sua concentração é elevada no citosol (56). Esta

concentração é regulada pela interação de diversos processos, divididos em mecanismos para aumentar ou diminuir a sua concentração (56).

Os mecanismos de remoção do cálcio do citosol incluem a PMCA e o NCX, que transportam o Ca^{2+} para o exterior da célula, e a SERCA e ATPase mitocondrial, que transportam o Ca^{2+} para os seus reservatórios intracelulares (27).

Em relação aos mecanismos que permitem aumentar a concentração citosólica de Ca^{2+} , estes incluem os canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática (56), que são essenciais para a regulação do tónus vascular (57-59), e podem ser classificados consoante o seu mecanismo de ativação.

O MLV possui Canais de Cálcio Operados por Voltagem (VOCC), canais de Ca^{2+} operados por recetor (ROCC), canais de cálcio operados por armazenamento (SOCC) ativados após a depleção dos locais de armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático, e canais catiónicos não seletivos permeáveis ao Ca^{2+} (18). Sendo que os VOCC constituem a principal via de entrada do Ca^{2+} extracelular, serão descritos em maior detalhe.

1.3.2.1. Canais de Cálcio Operados por Voltagem (VOCC)

Os VOCC são canais de Ca^{2+} presentes nas membranas plasmáticas das células eletricamente excitáveis que são ativados pela despolarização da membrana plasmática (57). Estes canais são particularmente importantes em células contráteis, nomeadamente nas células do MLV, pois, como referido, constituem a principal via de influxo de Ca^{2+} , sinalizador crucial para a contração muscular e manutenção da tensão (60).

Quanto à sua estrutura, os VOCC são formados por uma subunidade α_1 , formadora do poro, e por diferentes subunidades reguladoras (como β , γ , e $\alpha_2\delta$) (Figura 14). A subunidade α_1 , que contém o sensor de voltagem, é composta por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um composto por 6 TMD (S1-S6). Os TMD S1-S4 formam o sensor de voltagem, enquanto que os TMD S5-S6 formam a região do poro (59).

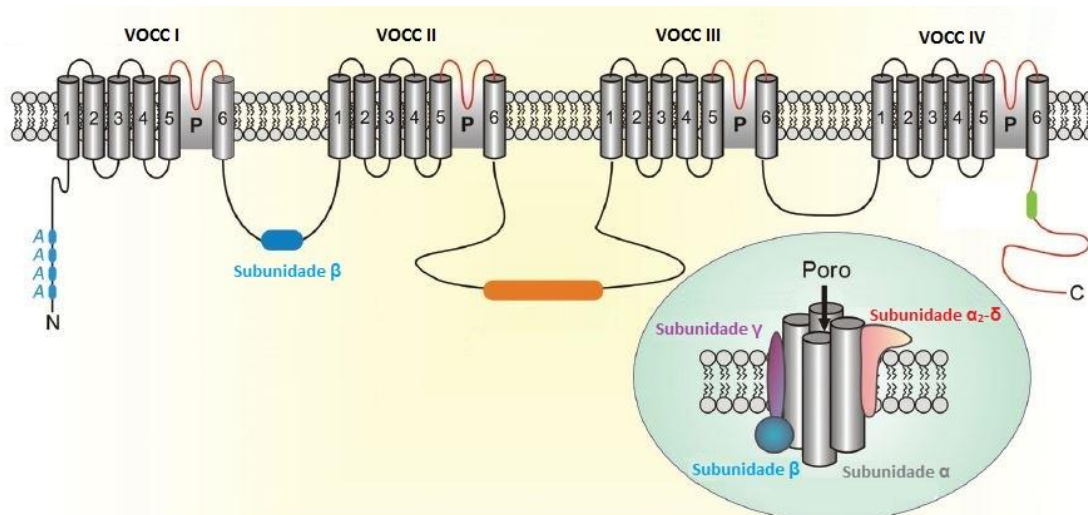


Figura 13 - Estrutura dos canais VOCC. Adaptado de (35)

Os VOCC foram classificados em tipo T, L, N, P, Q e R (Tabela 3), consoante a sua sensibilidade a bloqueadores farmacológicos, à dependência da voltagem, e à cinética de condutância (61). Por outro lado, os diferentes tipos de VOCC apresentam distintos papéis na transdução de sinal celular (57).

Os Canais de Cálcio tipo L (LTCC) (subfamília Ca_v1) são responsáveis pelo início da contração, da secreção, da regulação da expressão genética, entre outras funções (57). Esta subfamília é sensível a diferentes tipos de bloqueadores farmacológicos e é expressa principalmente em tecidos eletricamente excitáveis, tendo sido descrita a sua existência no coração e no ML. A nível cardiovascular são quase exclusivamente do subtipo $Ca_v1.2$ e o seu bloqueio por fármacos, como por exemplo a nifedipina (NIF), é utilizado a nível terapêutico (62). Adicionalmente, existem outras três isoformas de LTCC: $Ca_v1.1$, $Ca_v1.3$, e $Ca_v1.4$. Os canais $Ca_v1.3$ são expressos em conjunto com os $Ca_v1.2$ em diversos tecidos tais como no coração, sistema nervoso, glândulas adrenais e pâncreas. Já os canais $Ca_v1.1$ e $Ca_v1.4$ possuem um padrão de expressão muito mais restrito com expressão quase exclusiva no músculo esquelético e na retina (62).

Os Canais de Cálcio tipo N, P/Q e R (subfamília Ca_v2) são responsáveis pela iniciação da transmissão sináptica em sinapses rápidas, enquanto que os Canais de Cálcio tipo T (TTCC) (subfamília Ca_v3) são importantes para os potenciais de ação repetitivos em miócitos cardíacos e neurónios talâmicos (57).

Tabela 3 - Famílias de canais de cálcio. Adaptado de (57)

Tipo de corrente de Ca ²⁺	Subunidades α 1	Antagonista específico	Principais funções fisiológicas
L	Ca _v 1.1	Dihidropiridinas	Acoplamento excitação-contração no músculo esquelético; regulação da transcrição
	Ca _v 1.2		Acoplamento excitação-contração no músculo liso e cardíaco; secreção endócrina; transiente de Ca ²⁺ neuronal; regulação de atividade enzimática; regulação da transcrição
	Ca _v 1.3		Secreção endócrina; atividade <i>pacemaker</i> cardíaca; transiente de Ca ²⁺ neuronal; transdução auditiva
	Ca _v 1.4		Transdução visual
N	Ca _v 2.1	ω -CTx-GVIA (ω -conotoxina GVIA)	Libertação de neurotransmissores; transientes de Ca ²⁺ dendríticas
P/Q	Ca _v 2.2	ω -Agatoxina	Libertação de neurotransmissores; transientes de Ca ²⁺ dendríticas
R	Ca _v 2.3	SNX-482 (toxina de tarântula <i>Hysterocrates gigas</i>)	Libertação de neurotransmissores; transientes de Ca ²⁺ dendríticas
T	Ca _v 3.1	-	Atividade <i>pacemaker</i> e <i>firing</i> repetitivo
	Ca _v 3.2		
	Ca _v 3.3		

Nas AUH, foram identificados os LTCC, TTCC, e os canais de Cálcio tipo P/Q (58). Os LTCC parecem ser dominantes na regulação da contratilidade das células do MLV pois consistem na principal via de entrada de Ca²⁺ e os inibidores deste canais são potentes vasodilatadores (17). Por outro lado, os TTCC estão principalmente envolvidos na regulação da proliferação celular (17).

A função e expressão dos LTCC parece ser modulada por esteróides sexuais, como a testosterona (63) e os estrogénios (3, 26, 64).

1.4. Nucleótidos Cíclicos

Os nucleótidos cíclicos, adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e guanosina monofosfato cíclica (GMPc), são os principais segundos mensageiros envolvidos na regulação da vasodilatação (17). Os seus níveis intracelulares são o resultado do equilíbrio entre a taxa de síntese, através da Adenilato Ciclase (AC), ou Guanilato Ciclase (GC), e de degradação através das fosfodiesterases (PDE). Estes nucleótidos podem ativar as quinases dependentes deles, a proteína quinase A (PKA) dependente do AMPc, ou proteína quinase G (PKG) dependente do GMPc, que podem fosforilar outras moléculas e provocar um efeito, mas também já foi descrita a ligação direta a proteínas, como as proteínas Epac (proteínas de troca diretamente ativadas pelo cAMP) (17).

Adicionalmente, cada nucleótido pode ativar ambas as quinases (PKA e PKG) (16). A PKG pode ser ativada pelo AMPc, embora em concentrações dez vezes superiores à concentração necessária de GMPc. Da mesma forma, a PKA pode também ser ativada pelo GMPc, embora também em concentrações dez vezes superiores à concentração necessária de AMPc. No entanto, no ML, a concentração citosólica de AMPc é já cerca de dez vezes superior à concentração de GMPc. Desta forma, aumentos da concentração citosólica de AMPc podem potencialmente ativar ambas as quinases, enquanto que aumentos de GMPc apenas ativarão a PKG (16).

Pensa-se que vários mecanismos estejam envolvidos no efeito vasodilatador dos nucleótidos cíclicos nomeadamente: a diminuição dos níveis de Ca^{2+} citosólicos (nomeadamente através da inibição de canais de Ca^{2+}), hiperpolarização membranar (por exemplo, por ativação de canais de K^+), e redução da sensibilidade da maquinaria contrátil por diminuição da fosforilação das MLC (com diminuição da atividade da MLCK ou aumento da atividade da MLCP) ou por processos regulatórios dos filamentos finos (16), contribuição de cada um destes mecanismos e de cada nucleótido depende do tipo de MLV, da espécie e do estímulo contrátil (16).

1.4.1. Adenosina monofosfato cíclica

O AMPc é sintetizado a partir do ATP intracelular pela AC, que é ativada geralmente por um primeiro mensageiro externo que se liga a um recetor acoplado à proteína G_s , como os recetores B_2 adrenérgicos, recetores A_2 purinérgicos, ou recetores IP de prostaciclina (16). Por outro lado, a AC é geralmente inibida por mensageiros que se liguem a recetores acoplados a proteínas G_i , tais como os recetores α_2 adrenérgicos (16).

O aumento dos níveis citosólicos deste nucleótido cíclico ativam a PKA, induzindo um relaxamento de diferentes artérias humanas incluindo a AUH (17), que foi principalmente associado à inibição da MLCK.

Existem distintos tipos de PDE expressas no ML, nomeadamente PDE1, PDE3, PDE4, e PDE5. De entre estes tipos, a PDE4 é a enzima principal na regulação do relaxamento da AUH associada ao AMPc (17).

1.4.2. Guanosina monofosfato cíclica

O GMPc é sintetizado a partir do GTP por dois tipos diferentes de GC, que diferem na sua localização celular e na forma de ativação: a GC particulada (pGC), também denominada por GC membranar, e a GC solúvel (sGC). A pGC é um recetor transmembranar ativado por péptidos natriuréticos, como o Péptido Natriurético Auricular (ANP) e o BNP (Péptido Natriurético Cerebral); estes péptidos são secretados pelas aurículas cardíacas e cérebro, respetivamente, e agem sistemicamente nos recetores ANP (65). Por outro lado, a sGC é um recetor intracelular ativado pelo NO, sendo que os fármacos dadores de NO também podem

provocar a sua ativação (17). O NO atua de forma parácrina, e, no MLV, é secretado pelas células endoteliais em resposta a hipóxia e/ou a estímulos mecânicos, ativando assim as sGC nas células do ML adjacentes (65). A PDE5 é a principal enzima que controla a degradação de GMPc e o relaxamento da AUH associado ao GMPc (17).

Já foi descrito em diversas artérias, nomeadamente na AUH (45) que a vasodilatação induzida por GMPc é mediada pela ativação de canais de K⁺ e a posterior inibição dos LTCC (17). Adicionalmente, a ativação da PKG pelo GMPc conduz à ativação da MLCP contribuindo também para a vasodilatação (17).

Relativamente à estrutura das GC, estas podem-se apresentar como homodímeros (como, GC-A e GC-B, os recetores dos fatores natriutéticos) ou heterodímeros (sGC). A sGC humana é /composta por duas subunidades homólogas: α 1 e β 1.

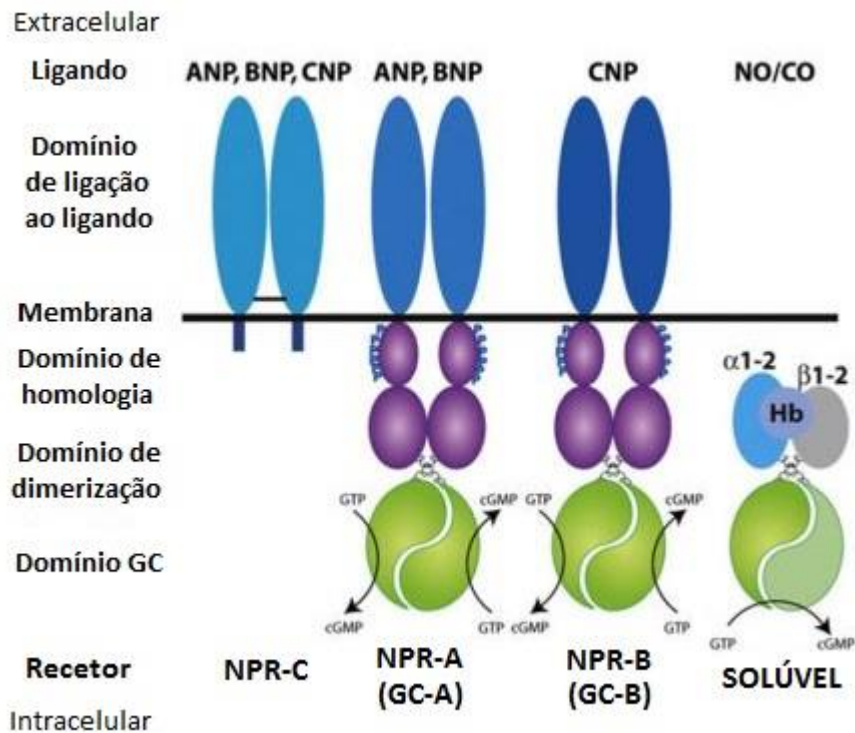


Figura 14 - Estrutura dos recetores NPR e recetor da sGC. Adaptado de (66)

1.5. Estrogénios e estradiol

Os estrogénios são as principais hormonas esteróides do sistema reprodutor feminino. Na mulher pré-menopausa são maioritariamente produzidos nos ovários, pelos folículos e corpo lúteo e, durante a gravidez, na placenta (67). Por outro lado, nas mulheres pós-menopausa e

nos homens os estrogénios são predominantemente produzidos a partir da conversão de esteróides precursores em tecidos periféricos (67).

Existem três principais formas de estrogénios fisiológicos nas mulheres: a estrona (E1), o estradiol (E2), e o estriol (E3). O E2 (Figura 15), também designado de 17 β -Estradiol (isómero 17 β do estradiol, esteróide C18 com grupos hidroxilo nas posições 3- β e 17- β), é o produto predominante e é estrogénio mais potente durante a pré-menopausa. O isómero 17 α do estradiol liga-se fracamente aos recetores de estrogénio, exibindo pouca atividade estrogénica. O E1 tem um papel mais preponderante a partir da menopausa, quando é sintetizado no tecido adiposo a partir da dehidroepiandrosterona (DHEA) adrenal. O E3, o estrogénio menos potente, é um estrogénio com um papel mais relevante durante a gravidez, pois é produzido em grandes quantidades pela placenta.

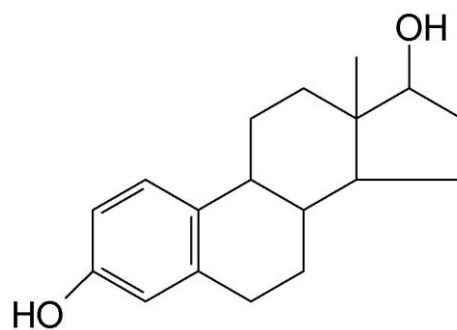


Figura 15 - Estrutura química do estradiol (68)

Os estrogénios derivam do colesterol através de reações enzimáticas (Figura 16). O colesterol procedente das lipoproteínas de baixa densidade ou dos ésteres de colesterol presentes no ovário é convertido em pregnenolona através da enzima P450_{scc} mitocondrial. A pregnenolona formada pode ser convertida em progesterona (pela ação da 3 β hidroxisteróide desidrogenase e Δ 5-4 cetoesteróide isomerase) ou 17 α -hidroxipregnenolona. A progesterona, uma hormona esteróide crucial no sistema reprodutor, é também precursora de androgénios e estrogénios, sendo convertida pela 17 α -hidroxilase/P450_{c17} em 17 α -hidroxiprogesteroa no retículo endoplasmático, e esta última em androgénios pela 17,20-liase/P450_{c17 α} . A 17 α -hidroxipregnenolona é convertida em DHEA pela 17,20-liase/P450_{c17 α} . A DHEA pode ser convertida em androstenediona, o principal androgénio secretado pelo ovário, embora baixas quantidades de DHEA e testosterona sejam também libertados. O E2 deriva dos androgénios através da enzima P450 aromatase (69).

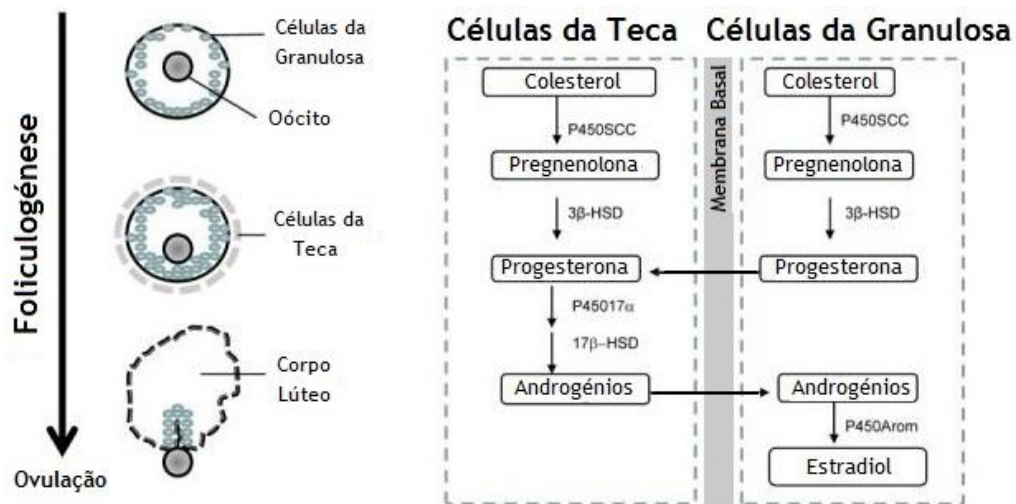


Figura 16 - Biosíntese do estradiol no ovário. Adaptado de (67)

O E2 é crucial para o desenvolvimento e regulação do sistema reprodutor feminino, das características sexuais secundárias femininas, ciclo menstrual e gravidez (64, 70). Esta hormona apresenta também funções noutros tecidos e órgãos: no osso participa na regulação da densidade óssea; no cérebro, contribui para os mecanismos envolvidos na potenciação e memória a longo prazo; e no tecido mamário, estimula a proliferação celular, podendo resultar no desenvolvimento de cancro da mama (64). Adicionalmente, parece apresentar efeitos benéficos a nível do sistema cardiovascular, que serão descritos na secção seguinte.

Durante o ciclo menstrual, o E2 atinge o seu maior pico imediatamente antes da ovulação, encontrando-se níveis circulantes de 110-410pg/mL. Já nas fases folicular e lútea os seus níveis são de cerca de 19-140 e 19-160pg/mL, respetivamente (67). Durante a transição para a menopausa, os níveis séricos de E2 diminuem cerca de 85-90%, apresentando valores abaixo de 35pg/mL durante a menopausa; já os níveis séricos de E1 diminuem 65-71% nesta fase de transição (67).

A maioria do E2 em circulação encontra-se fortemente ligado à albumina (60%) e à *sex hormone binding globulin* (SHBG) (38%), e apenas 2-3% se encontram não ligados (ativos). Devido ao pequeno tamanho e natureza lipofílica destas moléculas, estas distribuem-se rápida e extensivamente. A meia-vida do E2 é de cerca de 3 horas, sendo metabolizado, principalmente pelo fígado, e excretado pela urina e fezes (71).

1.5.1. Estrogénios e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade e morbilidade nos países ocidentais (72). No entanto, tem sido demonstrado que a incidência destas patologias em mulheres pré-menopausa é significativamente mais baixa quando comparada com mulheres pós-menopausa e homens de idade comparável. Adicionalmente, a terapia de substituição com estrogénios diminui o risco de doenças cardiovasculares (72), embora alguns autores

sugiram que esta terapia possa apresentar riscos em pacientes com problemas cardíacos prévios. Assim, tem sido sugerido que os estrogénios possam exercer um papel cardiovascular protetor.

Os efeitos cardioprotetores dos estrogénios têm sido explicados por diversos mecanismos, nomeadamente modificação do metabolismo lipídico e de hidratos de carbono, modificação da composição das lipoproteínas em circulação, mudanças na coagulação sanguínea (73). Os estrogénios apresentam um efeito inotrópico negativo no coração e são ainda potentes vasodilatadores (73). No entanto, os mecanismos subjacentes ao efeito vasodilatador do E2 permanecem por esclarecer e devem ser elucidados. Um melhor entendimento é crucial para avaliar os riscos e benefícios da terapia com estrogénios no sistema cardiovascular.

1.5.2. Mecanismo vasodilatador do estradiol

Os vários efeitos fisiológicos dos estrogénios são mediados através da sua ligação a recetores de estrogénios e dividem-se em efeitos genómicos e não genómicos (72).

Os efeitos genómicos (efeitos longos e prolongados) ocorrem predominantemente devido à interação entre a hormona e os recetores “clássicos” intracelulares (citossólicos e nucleares) de estrogénios (ER alfa (Er α) e ER beta (Er β)). Esta ligação resulta numa dimerização do recetor, translocação para o núcleo, e associação com fatores de transcrição co-ativadores e co-repressores, levando a modificações na expressão genética e síntese proteica (74-77).

Por outro lado, os efeitos não genómicos (efeitos rápidos, reversíveis e de curta duração), tais como a vasodilatação, são caracterizados pela insensibilidade a inibidores da transcrição e síntese proteica (74, 75, 77). Estes efeitos sugerem que os estrogénios exerçam também os seus efeitos através de recetores membranares, e vias de sinalização intracelular rápida (78). A ativação de vias de sinalização rápidas na membrana pode também indiretamente conduzir a mudanças na expressão genética (77).

Interessa salientar que o E2 está presente no organismo ao longo da vida das mulheres, com níveis variáveis em função da idade relacionados com a existência ou não do ciclo menstrual, e com a própria variação de níveis ao longo do ciclo (67). Assim sendo, o E2 que está presente a nível sanguíneo irá provocar simultaneamente efeitos rápidos e a longo prazo (genómicos). Embora o mecanismo destes dois tipos de efeitos seja diferente, os efeitos resultantes coexistem e são indissociáveis. Neste sentido, é preciso sublinhar que a literatura científica existente analisa geralmente os efeitos genómicos ou os efeitos rápidos separadamente, sendo que estes dois efeitos podem coexistir nos diferentes órgãos do corpo humano.

Apesar de ser de consenso geral que o E2 é um potente vasodilatador, o mecanismo responsável por este efeito ainda permanece controverso. Seguem-se alguns dos possíveis mecanismos.

1.5.2.1. Ligação a recetores de estrogénios clássicos

Os estrogénios ligam-se aos ER “clássicos” (ER α e ER β) com elevada afinidade e especificidade, regulando a transcrição genética (71, 77).

Estudos realizados em vasos sanguíneos humanos já verificaram a expressão de ambos os recetores em células endoteliais e nas células do MLV, nomeadamente em artérias coronárias, ilíacas, aorta, e veias safenas (71). No entanto a expressão destes recetores varia com o género, com os vasos sanguíneos em estudo, e varia ao longo do tempo (71). Assim, por exemplo, a expressão de ER β é superior em mulheres relativamente a homens (71).

Adicionalmente, em estudos realizados em ratos, verifica-se também uma diferença na expressão destes recetores, nomeadamente o ER α é expresso principalmente em artérias uterinas, enquanto que o ER β é mais abundante em células endoteliais e nas células do MLV da aorta, cauda, e artérias uterinas (71).

No entanto, o efeito vasodilatador do E2, que é rápido e reversível, não parece ser dependente de mudanças na expressão genética, pois é insensível a inibidores de transcrição e síntese proteica (79-82). Apesar de alguns autores terem reportado uma localização membranar destes recetores e o seu envolvimento nos efeitos rápidos do E2 a nível endotelial (83, 84), a maioria dos estudos demonstram que a vasodilatação induzida pelo E2 é insensível ao inibidor específico dos ER α e ER β (ICI 162,780) (3, 81, 82, 85).

1.5.2.2. Ligação a recetores de estrogénios membranares

Adicionalmente à regulação da transcrição genética induzida pela ligação dos estrogénios a recetores nucleares, existe ainda a sinalização através de recetores membranares, nomeadamente o recetor de estrogénios acoplado à proteína G (GPER) (77, 86).

Este recetor transmembranar, também denominado por recetor acoplado à proteína G 30 (GPR 30), não está relacionado estruturalmente com os ER clássicos, e liga o E2 com elevada afinidade estando associado principalmente aos seus efeitos rápidos (87, 88), apesar de já terem sido descritos também efeitos na expressão genética (89). O GPER é expresso em artérias e veias humanas (90), em células endoteliais e células do MLV (91). A sua distribuição varia consoante o tipo celular, tendo já sido localizado no retículo endoplasmático e na membrana plasmática.

Estudos já demonstraram que este recetor apresenta um papel predominante na vasodilatação induzida pelo estradiol (77, 92), tanto a nível da vasodilatação dependente como independente do endotélio (93), que serão explicados nas próximas secções. Relativamente à vasodilatação dependente do endotélio, a ativação do GPER leva à ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumentando a produção de NO, que ativa a GC (93, 94). Adicionalmente, a ativação deste recetor pelo seu agonista seletivo, G1, relaxa as células do MLV das artérias coronárias humanas e da aorta de suínos de forma independente do

endotélio, possivelmente através da ativação dos canais BK_{Ca}. A especificidade deste último resultado foi confirmada através da utilização do inibidor do GPER, G15 (95). Lindsey et. al sugerem que a este efeito vasorelaxante possa ser mediado pela ativação da AC, com produção de AMPc (93).

1.5.2.3. Efeitos dos estrogénios no endotélio

O E2 pode ativar vias de relaxamento vascular dependentes do endotélio, tais como vias mediadas pelo NO, prostaciclina e fatores hiperpolarizantes (96, 97).

O E2 pode induzir a geração rápida de NO no endotélio através da ativação não-genómica da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt (86, 98, 99). O envolvimento dos ER clássicos e do GPER neste efeito é ainda controverso (86, 94, 98-100). A fosforilação de Akt leva à fosforilação da eNOS aumentando a sua capacidade de gerar NO através da conversão de L-arginina em L-citrulina (99). Adicionalmente a este efeito rápido, o E2 também atua de forma genómica no endotélio levando à sobre-regulação da eNOS levando a aumentos na capacidade de produção de NO a longo prazo (71, 99, 101). O aumento da libertação de NO pelas células endoteliais está associada com a ativação da GC das células do MLV, levando ao aumento do GMPc, ativação da PKG e fosforilação e ativação dos canais BK_{Ca} (102, 103).

A produção e libertação de NO de origem endotelial é superior em mulheres pré-menopausa em relação a homens de idades comparáveis, contribuindo para a diferença na pressão arterial entre os dois géneros (104). Adicionalmente, durante a gravidez em condições normais (normotensão), a síntese de NO total aumenta, podendo contribuir para a adaptação cardiovascular e aumento de síntese GMPc. Da mesma forma, a inibição de NOS aumenta a resistência vascular dos vasos umbilicais *in vitro* e diminui o fluxo umbilical (102); esta inibição, em ratos fêmea durante a gravidez, leva ao desenvolvimento de hipertensão, proteinúria, trombocitopenia, e restrição de crescimento intrauterino (105). Assim, o NO parece contribuir para a manutenção da perfusão dos vasos umbilicais.

Como referido acima, o relaxamento induzido por E2 não envolve o NO exclusivamente. Este aumento da função endotelial é potenciado pelo aumento concomitante na síntese de prostaciclina (75, 99) através da ativação do gene da cicloxigenase nas células endoteliais (104). Adicionalmente, o relaxamento é mediado também por fatores hiperpolarizantes, entre outros.

No entanto, a via dependente do endotélio não parece ser a principal via de relaxamento induzido pelo E2, pois já vários autores demonstraram relaxamentos independentes do endotélio. Este efeito vasodilatador direto nas células do ML, independente do endotélio, já foi observado em diferentes artérias de diferentes espécies, tais como aorta (3, 85, 106), artérias coronárias (73, 96, 107, 108), cerebrais (80), carótidas (79), omentais (109), e mesentéricas (110).

1.5.2.4. Inibição dos canais de cálcio

Como referido anteriormente, o Ca^{2+} é essencial para a contração do MLV (19). Vários autores têm vindo a sugerir que a inibição dos canais de Ca^{2+} , um efeito rápido e independente da ativação dos ER clássicos e de síntese proteica, é o principal mecanismo de vasodilatação induzida pelo E2 (3, 79, 80).

Um estudo realizado por Zhang et al. em 1994 na linha celular A7r5 (células do ML da aorta de rato) verificou que o E2 inibia a corrente de Ca^{2+} dos canais LTCC e TTCC de forma rápida (111). Desde então, alguns estudos, nomeadamente em artérias de miométrio de rato (112) e artérias cerebrais de coelho (79, 80), verificaram a importância da inibição dos canais de Ca^{2+} para esta vasodilatação. Mais recentemente, diversos estudos verificaram que o efeito vasorelaxante não genómico do E2 era, pelo menos parcialmente, mediado pela inibição dos LTCC, nomeadamente na aorta de rato (3, 74) e em artérias cerebrais caninas (81). Relativamente a estudos em células do ML humano, em 2007 Ulrich et al. transfetaram células da linha celular HEK-293 (células embrionárias humanas de rim) com ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) dos canais Cav1.2 e concluíram que o E2 inibia diretamente a corrente de Ca^{2+} em cerca de 50% (64).

Estes estudos sugerem assim que os efeitos vasorelaxantes do E2 são mediados, pelo menos de forma parcial, pela inibição dos LTCC.

1.5.2.5. Efeito nos canais de potássio

Existe alguma controvérsia relativamente ao envolvimento dos canais de K^+ na vasodilatação induzida por E2.

Alguns estudos sugeriram a ativação dos canais de K^+ como mecanismo da vasodilatação induzida pelo E2, pelo menos de forma parcial. No ano 2000, Rosenfeld et al. sugeriram que os canais BK_{Ca} estariam envolvidos no mecanismo vasodilatador do E2 em artérias uterinas de ovelha, sendo ativados provavelmente por vias não genómicas (103). Dois anos mais tarde, White et al. sugeriram também que a ativação destes canais nas células do ML de artérias coronárias humanas está associada com a sua fosforilação dependente de GMPc (46). Em 2003 também Tsang et al. e Tep-Areenan et al. concluíam que o mecanismo independente do endotélio em artérias mesentéricas e em aorta de rato era parcialmente mediado através da ativação não seletiva dos canais de Ca^{2+} (28, 113). Han et al. em 2006 estudaram este mecanismo em artérias coronárias humanas tendo verificado a estimulação dos canais BK_{Ca} pela NOS neuronal (nNOS), pela via PI3/Akt (114).

Em contraste, vários estudos defendem que os canais de K^+ não estão envolvidos na vasodilatação induzida pelo E2. Nomeadamente, Salom et al. indicaram que a ativação dos canais de K^+ não está envolvida neste mecanismo (79). Em 2003, Unemoto et al. estudaram aorta de ratos normotensos e hipertensos, tendo também verificado que os canais de K^+ não estariam envolvidos no mecanismo vasodilatador do E2 em ratos normotensos; no entanto,

estariam envolvidos no mecanismo nos ratos hipertensos, nomeadamente os canais K_V e K_{ATP} (106). Um estudo mais recente realizado por Cairrão et al. em 2012 verificou que os canais de K^+ não estão envolvidos na vasodilatação induzida pelo E2 em aorta de rato (3). Já em 2014 um estudo realizado em artérias cerebrais caninas verificou que os canais de K^+ não estariam envolvidos na vasodilatação induzida pelo E2 nas artérias carótidas internas, mas apresentavam um pequeno papel (K_{ATP}) nas artérias basilares, sugerindo que o envolvimento dos canais dependia do tecido em estudo (81).

1.5.2.6. Envolvimento dos nucleótidos cíclicos

Relativamente às vias intracelulares relacionadas com o efeito vasodilatador do E2, alguns autores demonstram o envolvimento de nucleótidos cíclicos (110), enquanto outros demonstram o oposto (81).

Vários estudos realizados em artérias mesentéricas de rato (93, 110) e em artérias coronárias de suíno (115, 116) concluíram que os efeitos rápidos induzidos pelo E2 envolveriam a via do AMPc, devido à ativação da AC levando a uma ativação cruzada da PKG pelo AMPc (110, 115).

Estudos realizados em artérias humanas também apoiam o envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasodilatação induzida pelo E2. Nomeadamente, em 1993 Mugge et al. verificavam que o E2 produzia um efeito de vasodilatação independente do endotélio em artérias coronárias humanas associado com um aumento de AMPc e GMPc (107). Em 2002 White et al. verificavam que em células do ML de artérias coronárias humanas esta vasodilatação estava associada à fosforilação dos canais BK_{Ca} dependente de GMPc (46). Em 2012, Townsend et al. estudaram os efeitos do E2 em ML das vias aéreas humanas e concluíram que os efeitos envolviam o AMPc e a PKA (117).

Pelo contrário, alguns autores afirmam que os nucleótidos cíclicos não estão envolvidos no mecanismo de relaxamento do E2. Kitazawa et al. em 1997 (118) defendiam que este efeito não envolvia a PKA nem a PKG. Mais recentemente, Ramírez-Rosas et al. 2014, realizaram um estudo em artérias basilares e carótidas internas de cães e verificaram que a utilização de inibidores de sGC (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, ODQ) e AC (SQ 22536) não inibiram o relaxamento induzido pelo E2, sugerindo que o efeito vasodilatador é independente da ativação da AC e sGC (81).

1.6. Patologias na Gravidez

1.6.1. Diabetes gestacional

A diabetes *mellitus* gestacional é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “hiperglicemia primariamente reconhecida durante a gravidez”, e pela Associação Americana de Diabetes como “diabetes diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre de gravidez”, e afeta cerca de 5% das gravidezes na europa desenvolvida (119, 120).

Esta patologia está associada com um aumento do risco materno de desenvolver pré-eclâmpsia, parto prematuro, parto por cesariana, e desenvolvimento de diabetes *mellitus* clássica (119). Os riscos para o recém-nascido incluem aumento na adiposidade, e um aumento do tamanho para a idade gestacional (peso ao nascimento acima do percentil 90). Estes recém-nascidos apresentam um aumento no risco a longo termo de desenvolverem resistência a insulina, obesidade, e diabetes, e desenvolvimento de diabetes gestacional (119).

1.6.2. Hipertensão na gravidez

A hipertensão na gravidez é uma condição importante em relação às causas de morbidade e mortalidade materna em todo o mundo, assim como a infecção e a hemorragia (121). A hipertensão é uma das condições patológicas mais frequentes em gestantes, complicando 5-10% de todas as gravidezes.

Durante a gravidez, a hipertensão é categorizada em: hipertensão gestacional, hipertensão crónica, pré-eclâmpsia (pré-eclâmpsia leve, pré-eclâmpsia superimposta, e pré-eclâmpsia severa) e eclâmpsia (122).

A hipertensão gestacional é definida como um aumento da pressão arterial apenas gestacional, sem proteinúria, e complica aproximadamente 6% das gravidezes (122). Esta pressão arterial gestacional é igual ou superior a 140mm Hg (sistólica) ou 90mm Hg (diastólica) numa gestante normotensa antes das 20 semanas de gestação, e volta à normalidade 12 semanas pós-parto (121, 122). No entanto este grupo envolve uma mistura heterogénea de gestantes, tais como pacientes com hipertensão crónica não diagnosticada, hipertensão da gravidez que deixa de se verificar após o parto, e pacientes que irão desenvolver pré-eclâmpsia (122).

A pré-eclâmpsia é uma síndrome definido como um aumento da pressão arterial acompanhada por proteinúria (excreção urinária diária de proteínas igual ou superior a 300 mg), ocorrendo geralmente após as 20 semanas de gestação (121, 122). A pré-eclâmpsia pode levar a complicações sistémicas tais como da função renal, hematológica, hepática, neurológica, ou pulmonar, podendo também causar retraimento do crescimento fetal ou abrupção placentar (121). Esta patologia complica 5-8% das gravidezes aumentando a morbidade e a mortalidade

materna e neonatal. A mortalidade materna devida a esta forma de hipertensão, apesar de ter vindo a diminuir em países desenvolvidos, em países sem cuidados pré-natais adequados chega a valores de 40-80%. Muitas destas mortes seriam evitadas através de cuidados pré-natais e terapias profiláticas de ataques epiléticos (122).

A eclâmpsia é a ocorrência de ataques epiléticos que não podem ser explicados de outra forma em mulheres com pré-eclâmpsia (122).

A hipertensão crónica ocorre em 3-5% das gravidezes e consiste num aumento da pressão arterial diagnosticado antes das 20 semanas de gestação, ou hipertensão persistente 12 semanas pós-parto (122).

A hipertensão crónica com pré-eclâmpsia superimposta é diagnosticada na presença de aumentos na pressão arterial acima da pressão basal da paciente, uma mudança na proteinúria basal, ou evidência de disfunção orgânica (122).

2. Objetivos

O presente estudo teve com objetivo central avaliar os efeitos genômicos e não-genômicos do E2 a nível vascular em artérias umbilicais humanas de grávidas saudáveis (AUHctr), com diabetes gestacional (AUHdge) ou com hipertensão gestacional (AUHhip). Neste sentido, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- 1) Analisar simultaneamente os efeitos rápidos e genômicos do E2 na contratilidade das AUHctr através da técnica banho de órgãos;
- 2) Determinar o mecanismo de vasorelaxamento do E2 nas AUHctr, através de banho de órgãos, e analisar a influência dos efeitos genômicos do próprio E2 no mecanismo;
- 3) Determinar o efeito do E2 na expressão de mRNA de subunidades dos canais $Ca_v1.2$, K_v e BK_{Ca} em células do ML das AUHctr através de *Polymerase Chain Reaction* quantitativo (qPCR);
- 4) Examinar a capacidade contrátil do ML das AUHhip através de banho de órgãos;
- 5) Analisar os efeitos rápidos e genômicos do E2 na contratilidade das AUHhip através de banho de órgãos;
- 6) Examinar a capacidade contrátil do ML das AUHdge através de banho de órgãos;
- 7) Analisar os efeitos rápidos e genômicos do E2 na contratilidade das AUHdge através de banho de órgãos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação das amostras biológicas

No presente estudo foram utilizadas artérias umbilicais humanas de grávidas saudáveis (AUHctr), com diabetes gestacional (AUHdge) ou com hipertensão gestacional (AUHhip). Estas artérias foram provenientes de cordões umbilicais obtidos de partos vaginais no término da gestação realizados pelo Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. (Covilhã, Portugal). Todos os procedimentos realizados com esta amostra biológica foram aprovados pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira em conformidade com a Declaração de Helsínquia.

Após o parto, os cordões umbilicais foram recolhidos e imediatamente colocados numa solução salina fisiológica (PSS) estéril constituída por (mM); NaCl 110; CaCl₂ 0,15; KCl 5; MgCl₂ 2; HEPES 10; NaHCO₃ 10; KH₂PO₄ 0,5; NaH₂PO₄ 0,5; Glucose 10; EDTA 0,49. A esta solução foi adicionada uma mistura de antibióticos e antimicótico (penicilina 5U/mL, estreptomicina 5µg/mL, e anfotericina B 12,5ng/mL) e antiproteases (leupeptina 0,45mg/L, benzamidina 26mg/L e inibidor de tripsina 10mg/L) de forma a evitar contaminações e degradação dos tecidos. Os cordões umbilicais foram mantidos nesta solução a 4°C e utilizados nas 24-48h seguintes.

3.2. Análise da contratilidade vascular

A partir dos cordões obtiveram-se as artérias, após a remoção da geleia de Wharton e das veias umbilicais. As AUHctr, AUHdge ou AUHhip foram posteriormente colocadas em PSS durante 12h. Seguidamente, as artérias foram cortadas em anéis arteriais de 3-4mm e realizou-se a remoção mecânica do endotélio. Os anéis resultantes foram incubados em meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) / F12 durante 24h, com ou sem adição de E2, constituindo assim diferentes grupos:

- Um grupo de anéis foi incubado apenas em meio DMEM-F12;
- Um grupo de anéis foi incubado em DMEM-F12 com etanol 0,01% (veículo do E2);
- Um grupo de anéis foi incubado com DMEM-F12 com adição de E2 100nM;
- Um grupo de anéis foi incubado em DMEM-F12 com adição de E2 100µM.

Após a incubação de 24h, as artérias foram colocadas no banho de órgãos numa solução modificada de Krebs com a seguinte composição (mM): NaCl 119; KCl 5; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄

1,2; CaCl_2 0,5; MgSO_4 1,2; EDTA 0,03; glicose 11. Esta solução fisiológica foi mantida a 37°C e gaseificada continuamente com carbogénio (95% O_2 e 5% CO_2).

Os anéis arteriais foram suspensos entre dois fios de aço inoxidável paralelos para registo da tensão isométrica; a tensão em gramas (g) foi medida através de um transdutor de força (TRI201, Panlab SA, Espanha), um amplificador (ML118/D Quad Bridge, ADInstruments) e uma *interface* Power-Lab/4SP (ML750, ADInstruments) ligada a um sistema computadorizado com o *software* “PowerLab Chart 5”.

Os anéis arteriais foram submetidos a uma pré-tensão de 1,5g e equilibrados durante cerca de 1h, mudando a solução de Krebs a cada 15 minutos.

Após estabilização da tensão, as artérias foram contraídas com os agentes contráteis 5-HT ($1\mu\text{M}$) ou Cloreto de Potássio (KCl, 60mM). Todos os anéis arteriais contraídos por qualquer um dos agentes contráteis que apresentaram contrações inferiores a 1g foram descartados. Após o estímulo contráctil, as artérias foram expostas a concentrações crescentes de E2 (1-100 μM). Paralelamente, após o estímulo contráctil, foram feitos ensaios de controlo com etanol (concentrações não superiores a 0,01%), o veículo utilizado para dissolução do E2.

De forma a determinar o envolvimento dos LTCC na vasodilatação induzida pelo E2, foi utilizado o fármaco NIF ($10\mu\text{M}$), um inibidor específico destes canais. De forma a analisar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos no mesmo processo, foram utilizados diferentes fármacos com interações a nível das vias dos nucleótidos cíclicos: o nitroprussiato de sódio (SNP, $10\mu\text{M}$), um estimulador da sGC; o ANP ($0,1\mu\text{M}$), um estimulador da pGC; o ODQ ($30\mu\text{M}$), um inibidor da sGC; e o SQ 22536 (SQ, $30\mu\text{M}$), um inibidor da AC. Paralelamente, foram realizados ensaios com os solventes que constituíram os veículos de alguns dos fármacos referidos (etanol no caso da NIF, ODQ e SQ).

3.3. Análise da expressão genética

3.3.1. Dissecção do cordão umbilical e cultura celular

Para a análise da expressão genética foram utilizadas células musculares lisas das AUHctr. A dissecção do cordão umbilical e posterior cultura celular foram realizadas de acordo com os procedimentos de Martin de Llano et al. (1) e Cairrão et al. (2), em câmara de fluxo laminar em condições de esterilidade e em gelo.

Resumidamente, o cordão foi lavado com PSS e antibiótico/antimicótico de forma a evitar a contaminação. De seguida, as AUHctr foram isoladas por remoção da geleia de Wharton envolvente, e segmentadas em pequenos fragmentos. Cada segmento foi então cortado longitudinalmente e o endotélio foi mecanicamente removido com uma leve passagem de um cotonete estéril. Estes segmentos das artérias, foram transferidos para uma caixa de Petri

com uma nova solução de lavagem, onde foram extraídas camadas de MLV da parte interna da artéria, através da utilização de pinças estéreis. As camadas obtidas foram lavadas quatro vezes em solução de PSS sem antibiótico. Após lavagem, as camadas foram colocadas em frascos de cultura de 25cm² previamente revestidas com colagénio (5µg/cm) e colocadas numa incubadora a 37°C numa atmosfera de ar 95% e CO₂ 5%. Cerca de 10 minutos depois foram adicionados 2mL de meio de cultura, contendo DMEM-F12, 5% de soro fetal bovino, fator de crescimento epidérmico (100ng/mL), fator de crescimento de fibroblastos (1µg/mL), heparina (2mg/mL), e insulina (5µg/mL), e os frascos foram novamente colocados na incubadora. Após 24h foram adicionados mais 2mL do meio de cultura referido. O meio de cultura foi mudado a cada 2/3 dias, e cultura confluentes foram obtidas após aproximadamente um mês. Subculturas destas células foram obtidas até à sexta passagem.

3.3.2. Tratamento com estradiol

Placas de 6 poços contendo células do MLV de culturas em confluência foram submetidas a incubação com E2. Inicialmente, após se verificar a confluência plena, as células foram incubadas durante 24h em meio sem soro de forma a apresentarem um fenótipo contrátil. Seguidamente, as células foram expostas a diferentes concentrações de E2 (10nM e 100nM) durante 24h. O E2 (Sigma-Aldrich Química, Portugal) foi inicialmente dissolvido em etanol de forma a obter uma solução *stock*, a partir da qual se realizaram diluições em meio sem soro para obter as concentrações desejadas. Nos poços de controlo foi utilizado o veículo usado na preparação do E2, ou seja, etanol 0,01%.

3.3.3. Extração de RNA

O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído dentro de uma *hotte* utilizando o Reagente TRIzol® (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante, em gelo, com todo o material estéril. Resumidamente, para a extração do RNA total de um poço com células do ML em confluência, adicionou-se aos poços sem meio 200µL de TRIzol® (1mL TRIzol®/100mg de tecido), que consiste numa solução composta por fenol e isotiocianato de guanidina. Este reagente permite a disrupção das células e dissolução dos componentes celulares, com consequente libertação do RNA da célula sem comprometer a sua integridade. De seguida, realizou-se a raspagem dos poços utilizando *cell scrapers* de forma a soltar as células que se encontram aderidas ao fundo dos poços. Após passagem do fluido resultante para *ependorfs* e uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 80µL de clorofórmio e realizou-se homogeneização por inversão, com nova incubação de 2-3 minutos à temperatura ambiente. Os *ependorfs* foram então centrifugados a 12000g a 4°C durante 15 minutos, de forma a separar as diferentes fases: orgânica (no fundo do *ependorf*, que contém as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio), interfase (fase intermédia, onde se encontra o ácido ribonucleico, DNA) e fase aquosa (fase superior, onde se encontra o RNA). A fase aquosa foi transferida para novo *ependorf*, ao qual se juntou 200µL de isopropanol para

precipitação do RNA. Então, agitou-se mecanicamente a solução e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 12000g, a 4°C durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado três vezes com etanol a 75% em água dietilpirocarbonato (DEPC) (a -20°C), agitando no vórtex, centrifugando a 7500g a 4°C durante 5 minutos, e removendo o sobrenadante de etanol. Após as lavagens, incubou-se o *pellet* durante 5 minutos a temperatura ambiente, e hidratou-se em 20µL de água DEPC, sendo armazenado a -80°C para análise posterior.

Analisou-se a pureza e concentração do RNA através da análise em nanoespectrofotômetro (Nanophotometer TM, Implen, Alemanha). Este equipamento calcula automaticamente a concentração de RNA (µg/µL), e o rácio de absorvância A_{260}/A_{280} . Este rácio permite analisar a pureza do RNA, pois 260nm é o comprimento de onda de máxima absorvância dos ácidos nucleicos, e 280nm é o comprimento de onda de máxima absorvância das proteínas. Um RNA de elevada pureza apresenta um rácio A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,1.

Para analisar a integridade do RNA foi também efetuada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com *green safe*. Em eletroforese de amostras de RNA não degradadas devem observar-se duas bandas bem definidas de RNA ribossomal: 28s e 18s.

3.3.4. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA (DNA complementar) a partir do RNA foi realizada através do kit NZY M-MuLV Reverse Transcriptase (NZYTech), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação de síntese de cDNA (volume final de 20µL) adicionou-se um volume equivalente a 1µg de RNA, 2,5µL de *Random hexamer mix* (0,5µg/µL) (mistura de *primers* aleatórios, de forma iniciar a síntese de DNA de sequências inespecíficas), 1µL de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs, 10mM), perfazendo o volume com água estéril sem nucleases. Esta mistura foi então incubada a 65°C durante 5 minutos, e arrefecida em gelo. Juntou-se a esta mistura 2µL de 10x *reaction buffer* e 1µL de M-MuLV, uma transcriptase reversa que realiza a síntese de cDNA a partir de RNA, na presença de *primers* e dNTPs. A mistura obtida foi incubada a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, e a reação foi de seguida inativada a 70°C durante 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C.

De forma a verificar a ocorrência da síntese de cDNA a expressão do gene *housekeeping* da B2-microglobulina (B2M) foi analisada através da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) convencional após transcrição reversa. Resumidamente, foi realizada uma *mix* para n+1 reações, para um volume final de 25µL. Por cada reação adicionou-se 2,5µL de 10x *reaction buffer* (NZYTech), 1,5µL de MgCl₂ (50 mM) (NZYTech), 0,625µL de dNTPs (10 mM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl) (NZY Taq DNA polymerase, NZYTech), 1,2µL de *primer Forward*, 1,2 µL de *primer Reverse* e 16,875µl de água estéril até um volume total de 24µL. A cada reação foi adicionado 1µL de cDNA, à exceção do controlo negativo, ao qual se adicionou água estéril. A amplificação dos genes ocorreu num termociclador T100™ (BioRad), pela seguinte ordem de

condições: 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de diferentes temperaturas (94°C durante 30 segundos para desnaturação, seguidos de 52°C durante 30 segundos para emparelhamento dos *primers*, e 72°C durante 30 segundos para polimerização); e, por último, 72°C durante 5 minutos para alongamento final. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% na presença de *green safe*, utilizando o marcador NZY DNA Ladder V (NZYTech).

3.3.5. Análise da expressão genética por qPCR

A expressão de genes de subunidades dos canais LTCC ($Ca_v1.2$), K_v (K_vB1 , K_vB2 , K_vB3) e BK_{Ca} ($BK_{Ca\alpha}$, $BK_{Ca\beta}$) foi analisada através da técnica de qPCR em células do ML provenientes de gravidezes saudáveis. O gene endógeno usado foi *B2M* para normalizar os níveis de expressão genética. As reações de amplificação dos genes foram preparadas para um volume final de 20µL: 10µL de SYBR Green Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 1,2µL de *primer Forward*, 1,2µL de *primer Reverse*, 1µL de cDNA, perfazendo com água estéril. As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de diferentes temperaturas (95°C durante 30 segundos, temperatura de *annealing* (T.A.) ótima de cada *primer* durante 30 segundos, e 72°C durante 20 segundos), e um gradiente 55-95°C para determinação da curva de *melting*. A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das curvas de *melting*. As diferenças na expressão genética relativa entre experiências foram calculadas usando o modelo matemático de Pfaffl usando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (123).

Tabela 4 - *Primers* utilizados para qPCR

Nome do <i>primer</i>	Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Fragm. (pb)	T.A. (°C)	Nº no <i>GenBank</i>
B2M	<i>B2M</i>	Fw 5'-ATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3' Rv 5'-CAAACCTCCATGATGCTGCTTAC-3'	92	60	NM_004048
K_vB1	<i>KCNAB1</i>	Fw 5'-TTGCCTGTGGAATCATCTCA-3' Rv 5'-CCAGGAGCACAGAACTCACA-3'	231	60	NM_003471
K_vB2	<i>KCNAB2</i>	Fw 5'-GCATCCCACCCTACTCAAGA-3' RV 5'-TTCGGAAGGACCTGTATTGC-3'	253	62	NM_001199860
K_vB3	<i>KCNAB3</i>	Fw 5'-TCAGAGGGAGAAGGTGGAGA-3' Rv 5'-GGTCCATGACTTTGGCTTGT-3'	215	58	NM_004732
$BK_{Ca\alpha}$	<i>KCNMA1</i>	Fw 5'-AAGCAACGGAATGGAGGCAT-3' Rv 5'-CCAGTGAAACATCCCAGTAGAGT-3'	147	60	NM_001014797
$BK_{Ca\beta}$	<i>KCNMB1</i>	Fw 5'-CAATGTGGTGAACGCAGCC-3' Rv 5'-TGTGATGCTGAGGCGTGAA-3'	86	60	NM_172159
$Ca_v1.2$	<i>CACNA1C</i>	Fw 5'-TGCCTGGAATACGCCCTCAAGG-3' Rv 5'-ACAGGCAGCTCTGGCCGTAGTGC-3'	175	58	NM_001167625

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão. A análise dos dados foi realizada com o *software* SigmaStat 3.5 (Systat Software, Reino Unido). A comparação estatística entre dois grupos de dados foi realizada utilizando o teste t de *Student*. A comparação entre mais de dois grupos de dados foi realizada utilizando o teste *One-way ANOVA* seguido do teste post-hoc (teste de *Tukey* ou *Dunnnett*), para determinar as diferenças significativas entre as médias. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Artérias procedentes de grávidas saudáveis (AUHctr)

4.1.1. Efeitos do estradiol na tensão induzida por 5-HT e KCl

As AUHctr, após remoção do endotélio, foram incubadas durante 24h com E2 (100nM e 100µM) ou veículo (etanol 0,01%). Usando a técnica banho de órgãos, estes anéis foram contraídos com 5-HT (1 µM) ou KCl (60mM). As tensões induzidas pelos agentes contráteis foram analisadas.

Não se verificaram diferenças nas contrações máximas induzidas por qualquer um dos agentes contráteis entre o grupo de anéis incubado apenas em meio DMEM-F12 e o grupo de anéis incubado em DMEM-F12 com etanol 0,01% (veículo do E2), pelo que se utilizaram todos estes dados para comparação com as incubações com E2.

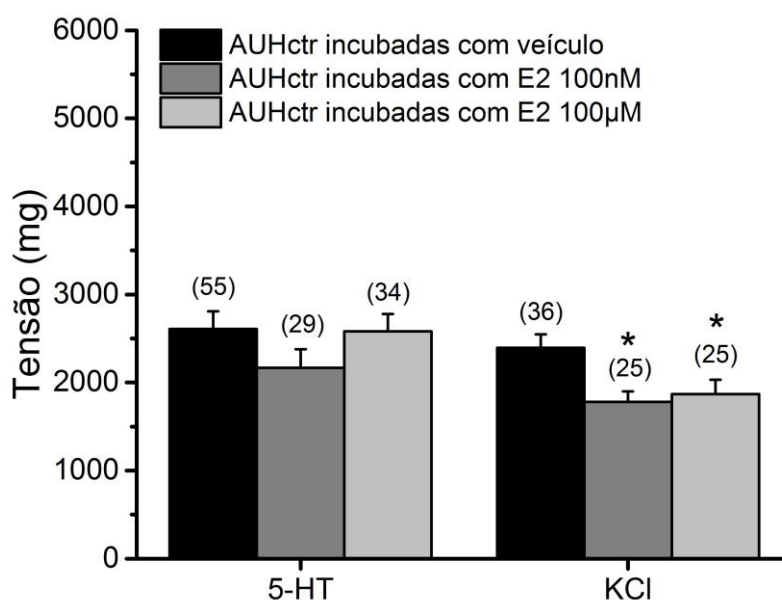


Figura 17 - Tensões induzidas por 5-HT e KCl em AUHctr incubadas com veículo, E2 100nM e E2 100µM (* p<0,05 vs. AUH incubadas com veículo, *One-way ANOVA*)

Não se encontraram diferenças significativas nas contrações máximas induzidas pela 5-HT entre as AUHctr incubadas com veículo e as AUHctr incubadas em qualquer das concentrações de E2 (Fig. 17).

Por outro lado, as contrações induzidas por KCl em AUHctr incubadas com E2 foram significativamente mais baixas em comparação com as AUH incubadas com veículo (Fig. 17).

Compararam-se também as contrações induzidas pela 5-HT em relação às contrações induzidas pelo KCl, não havendo diferenças significativas nas AUHctr incubadas com veículo ou com E2 100nM. Por outro lado, nas AUHctr incubadas com E2 100 μ M verificou-se que as contrações induzidas pelo KCl foram significativamente mais baixas em comparação com as contrações induzidas pela 5-HT.

4.1.2. Análise simultânea dos efeitos rápidos e genómicos do estradiol

Como foi indicado na Introdução, o E2 presente no organismo irá provocar simultaneamente efeitos rápidos e a longo prazo (genómicos). Embora o mecanismo destes dois tipos de efeitos seja diferente, os efeitos resultantes coexistem e são indissociáveis. Neste sentido, no presente trabalho iremos analisar os efeitos rápidos e genómicos do E2 quer separadamente, quer simultaneamente.

Assim, após contração das AUHctr com 5-HT ou KCl, o efeito rápido de concentrações crescentes de E2 (1-100 μ M) foi analisado em artérias incubadas com E2 ou com veículo.

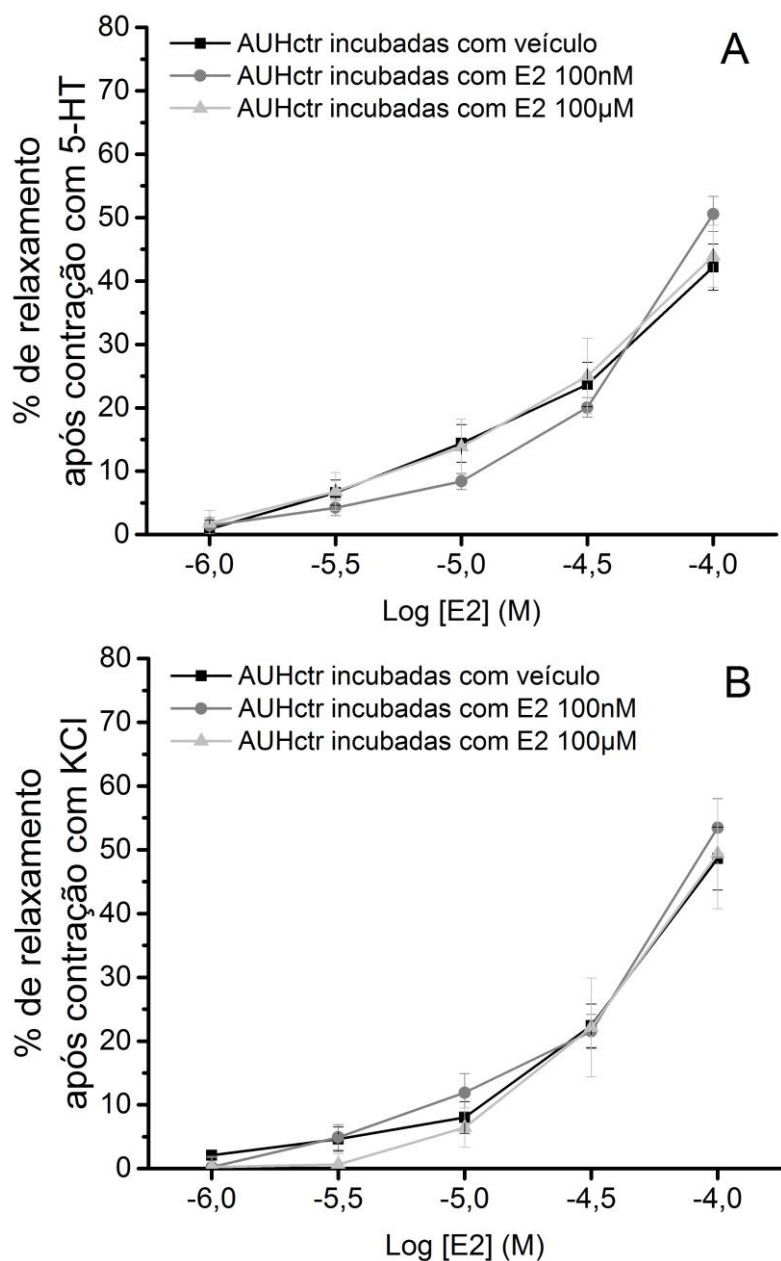


Figura 18 - Efeitos de concentrações crescentes de E2 (1μM-100μM) em AUHctr
 A: AUH contraídas com 5-HT; B: AUH contraídas com KCl

Verificou-se que, após contração com qualquer um dos agentes contráteis, o E2 induziu vasorelaxamento rápido e dose-dependente em todas as artérias, independentemente do tipo de incubação (Fig. 18). Paralelamente foram realizados ensaios apenas com o etanol, não se tendo verificado qualquer efeito relaxante. Ao comparar os efeitos vasorelaxantes do E2 nas AUHctr contraídas com 5-HT em relação aos efeitos do veículo verificaram-se diferenças significativas a partir da concentração de 3μM (incubação com veículo) ou 10μM (incubações com E2) (dados não representados nas figuras). Relativamente às AUHctr contraídas com KCl, as diferenças começaram a verificar-se nas concentrações de 10μM (incubações com veículo e E2 100μM) ou 30μM (incubação com E2 100nM) (dados não representados nas figuras).

Por outro lado, não se verificaram diferenças estatísticas no efeito vasorelaxante do E2 entre as AUHctr incubadas com veículo e as AUHctr incubadas com E2, independentemente do agente contrátil (Fig. 18).

Compararam-se também os efeitos vasorelaxantes do E2 nas AUHctr contraídas pela 5-HT em relação às AUHctr contraídas pelo KCl, não se tendo encontrado diferenças significativas independentemente da incubação.

4.1.3. Análise do mecanismo vasorelaxante do estradiol

De forma similar, usando a técnica de banho de órgãos, anéis de AUHctr sem endotélio incubadas com E2 ou veículo foram contraídas com 5-HT e KCl e o efeito vasodilatador da NIF (inibidor dos LTCC), SNP (estimulador da sGC), ODQ (inibidor da sGC), ANP (estimulador da pGC) e SQ 22536 (inibidor da AC) foram analisados, de forma a determinar o envolvimento dos LTCC, sGC, pGC e AC, respetivamente, no mecanismo de vasorelaxamento do E2. Paralelamente a estes ensaios, foram testados os efeitos isolados do veículo de alguns dos fármacos, o etanol, não se tendo obtido efeitos relaxantes ou contráteis significativos.

4.1.3.1. Análise do envolvimento dos canais de cálcio tipo-L

Para determinar o envolvimento da inibição dos LTCC no vasorelaxamento induzido pelo E2, após contração das AUHctr com 5-HT ou KCl, foi adicionada ao banho de órgãos a NIF (10 μ M), e de seguida E2 (100 μ M).

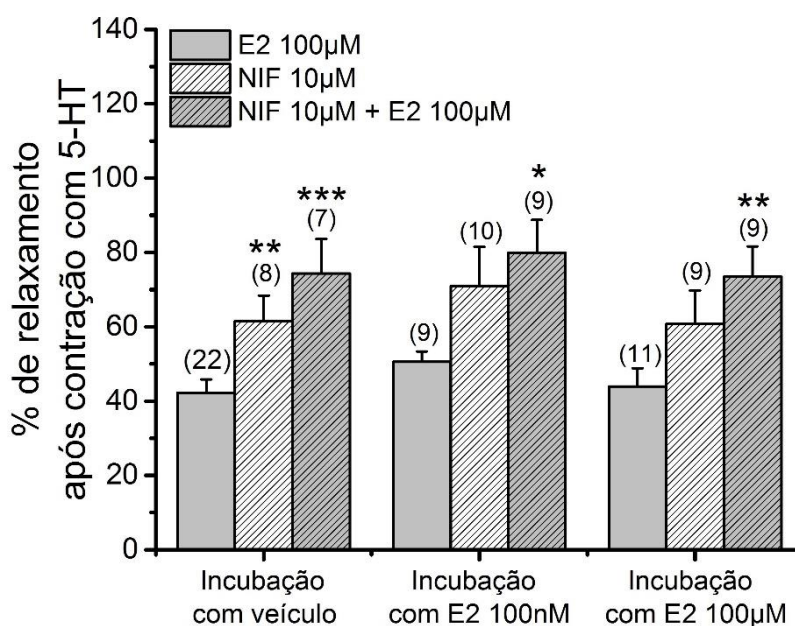


Figura 19 - Efeito vasorelaxante da NIF (10 μ M) e E2 em AUHctr incubadas com veículo ou E2 e contraídas com 5-HT
 (* p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001 vs. E2 100 μ M, t-test)

Nas AUHctr contraídas pela 5-HT não se encontraram diferenças significativas entre o efeito relaxante da NIF em comparação com o efeito da aplicação conjunta da NIF e E2 (Fig. 19). Verificou-se, no entanto, que a NIF parece induzir relaxamentos mais acentuados em comparação com o E2, sendo esta diferença estatisticamente significativa na incubação das AUHctr com veículo (Fig. 19). Em todas as incubações, o efeito vasorelaxante conjunto da NIF e E2 foi significativamente superior ao efeito isolado do E2 (Fig. 19).

Nas AUHctr contraídas pelo KCl o efeito relaxante da NIF foi superior a 100% nas diversas incubações pelo que se testou uma concentração mais baixa deste fármaco (100nM).

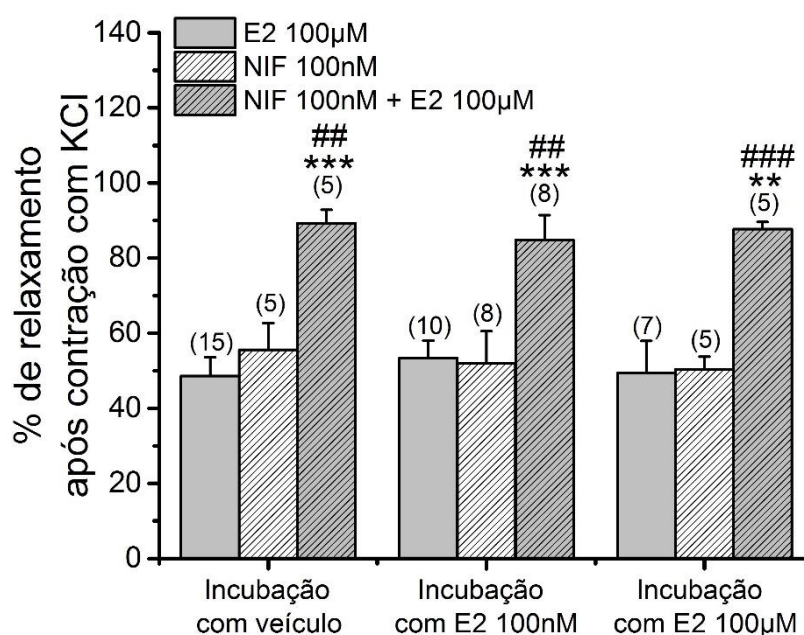


Figura 20 - Efeito vasorelaxante da NIF (100nM) e E2 em AUHctr incubadas com veículo ou E2 e contraídas com KCl (** p<0,01 e *** p<0,001 vs. E2 100µM, t-test; ## p<0,01 e ### p<0,001 vs. NIF 100nM, t-test)

Ao utilizar esta concentração de NIF verificaram-se diferenças significativas entre o vasorelaxamento induzido apenas pela NIF ou pelo E2 em comparação com a aplicação conjunta de NIF com E2 (Fig. 20). Não se encontraram diferenças significativas entre os efeitos de vasorelaxamento induzidos isoladamente pelo E2 e a NIF (Fig. 20).

4.1.3.2. Análise do envolvimento da guanilato ciclase solúvel

Para determinar o envolvimento da sGC no efeito vasorelaxante induzido pelo E2, contraíram-se as AUH com 5-HT ou com KCl e, posteriormente, adicionou-se ao banho de órgãos o SNP (10µM), e de seguida o E2 (100µM).

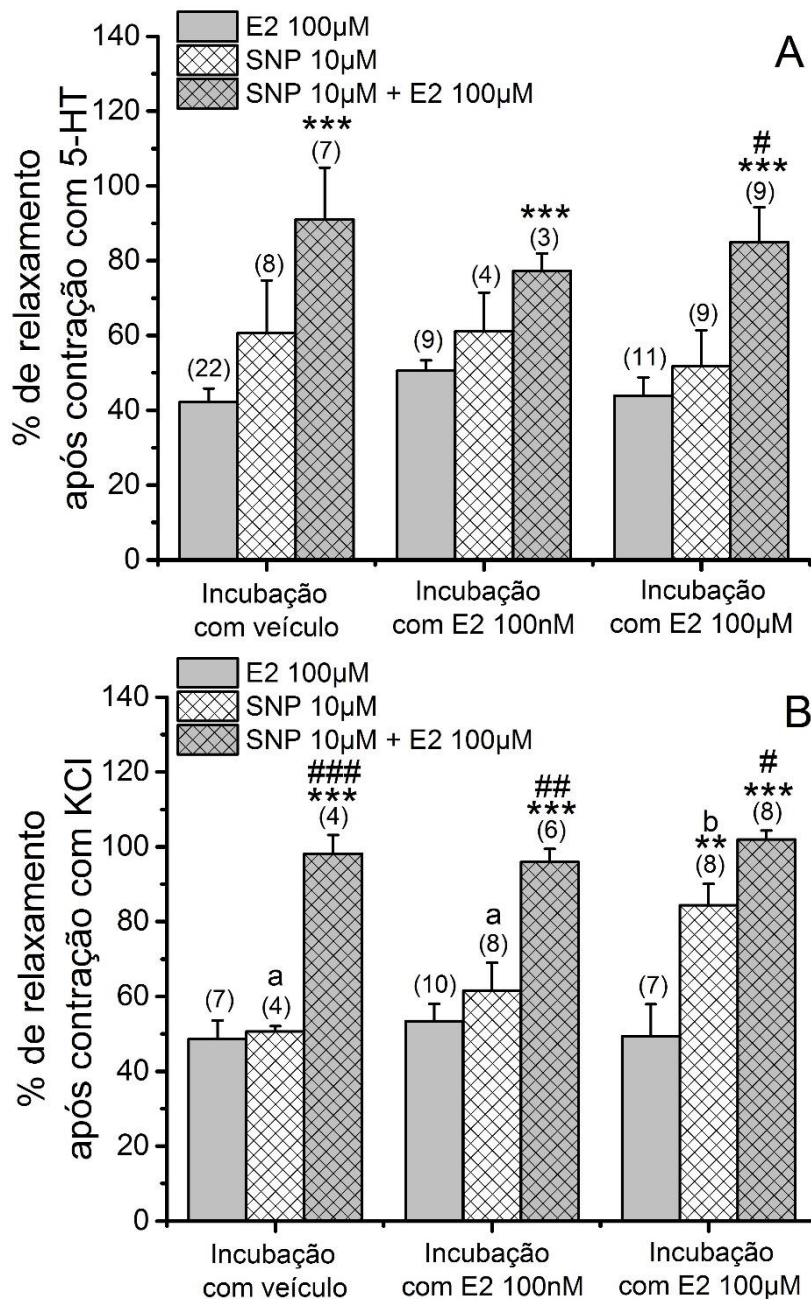


Figura 21 - Efeito vasorelaxante do SNP e E2 em AUHctr incubadas com veículo ou E2. A: AUH contraídas com 5-HT; B: AUH contraídas com KCl (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. E2 100µM, *t-test*; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs. SNP 10µM, *t-test*; b $p < 0,05$ vs, incubação com veículo, *One-way ANOVA*)

Nas AUHctr contraídas com 5-HT verificou-se que os efeitos vasorelaxantes da aplicação conjunta de SNP e E2 eram significativamente superiores aos efeitos do SNP isoladamente (em todas as incubações) e do E2 isoladamente (na incubação com E2 100µM) (Fig. 21A). Não se encontraram diferenças significativas entre o efeito relaxante do SNP e o efeito do E2 (Fig. 21A). Adicionalmente, não se encontraram diferenças significativas entre os efeitos dos fármacos entre as diferentes incubações (Fig. 21A).

Nas AUHctr contraídas com 5-KCl verificou-se que os efeitos vasorelaxantes da aplicação conjunta de SNP e E2 eram significativamente superiores aos efeitos do SNP isoladamente e do E2 isoladamente (em todas as incubações) (Fig. 21B). Não se encontraram diferenças significativas entre o efeito relaxante do SNP e o efeito do E2, à exceção das AUHctr incubadas com 100µM, em que o efeito do SNP foi significativamente superior (Fig. 21B). Adicionalmente, verificou-se que a vasodilatação induzida pelo SNP foi significativamente mais alta nas AUHctr incubadas com E2 100µM em comparação com as restantes incubações (Fig. 21B). No entanto, ao analisar o efeito da aplicação conjunta dos fármacos não se encontraram diferenças significativas entre as incubações (Fig. 21B).

Para complementar estes resultados, utilizou-se também o fármaco ODQ (inibidor da sGC), seguido da aplicação de E2 (100µM).

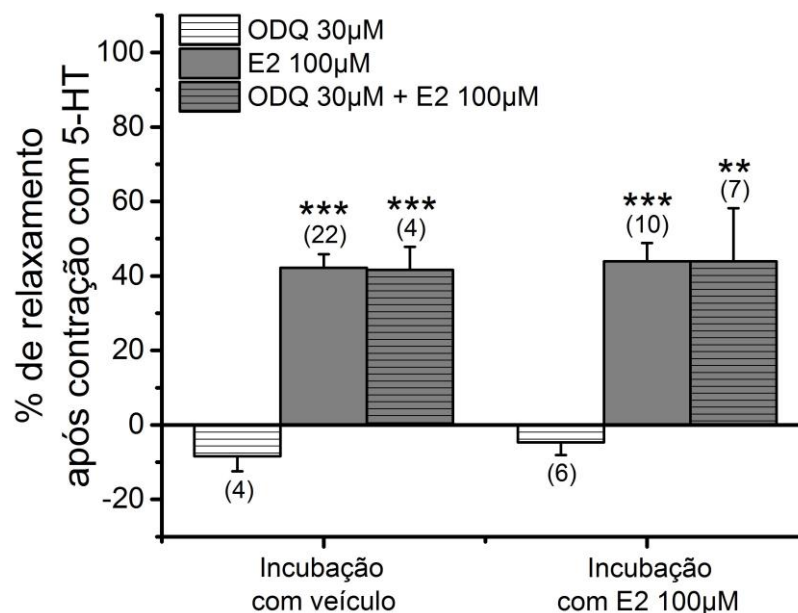


Figura 22 - Efeito vasorelaxante do E2 após inibição da sGC, em AUH incubadas em veículo ou E2 e contraídas com 5-HT (** p<0,01 e *** p<0,001 vs. ODQ 30µM; t-test)

A aplicação isolada do ODQ não induziu vasorelaxamento das AUHctr em qualquer das incubações, e os efeitos do E2 isoladamente e da aplicação conjunta do E2 com ODQ foram significativamente superiores à aplicação do ODQ (Fig. 22). Ao comparar o efeito vasorelaxante isolado do E2 com a aplicação conjunta de ambos os fármacos, em qualquer das incubações, não se encontram diferenças significativas (Fig. 22).

4.1.3.3. Análise do envolvimento da guanilato ciclase particulada

Para determinar o envolvimento da pGC no vasorelaxamento induzido pelo E2, contraíram-se as AUH com 5-HT, e adicionou-se ao banho de órgãos o ANP (100nM), e de seguida o E2 (100µM).

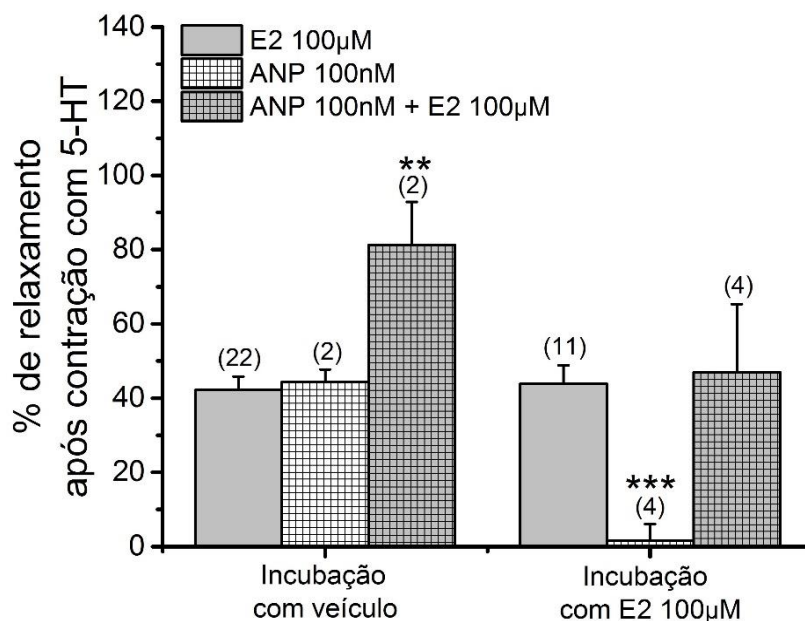


Figura 23 - Efeito vasorelaxante do ANP e E2 em AUH incubadas com veículo ou E2 contraídas com 5-HT (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. E2 100µM; t-test)

Ao analisar os dados obtidos com as AUHctr incubadas com veículo verificou-se que os efeitos relaxantes do E2 e do ANP são similares, não se encontrando diferenças significativas a nível estatístico (Fig. 23). Adicionalmente, o vasorelaxamento induzido pela aplicação conjunta do ANP com o E2 é significativamente superior ao efeito isolado do E2, parecendo também superior ao efeito isolado do ANP mas sem significância estatística ($p=0,093$) (Fig. 23). Nesta incubação, a aplicação conjunta de ambos os fármacos (E2 e ANP) parece aditiva (Fig. 23).

Por outro lado, na incubação com E2 100µM não se obteve efeito relaxante com o ANP, sendo este significativamente inferior ao relaxamento induzido pelo E2 e parecendo também inferior ao efeito isolado do ANP mas sem significância estatística ($p=0,053$) (Fig. 23).

4.1.3.4. Análise do envolvimento da adenilato ciclase

Por último, para determinar o envolvimento da AC no vasorelaxamento induzido pelo E2, contraíram-se as AUH com 5-HT, e adicionou-se ao banho de órgãos o SQ 22536 (100µM), e de seguida o E2 (100µM).

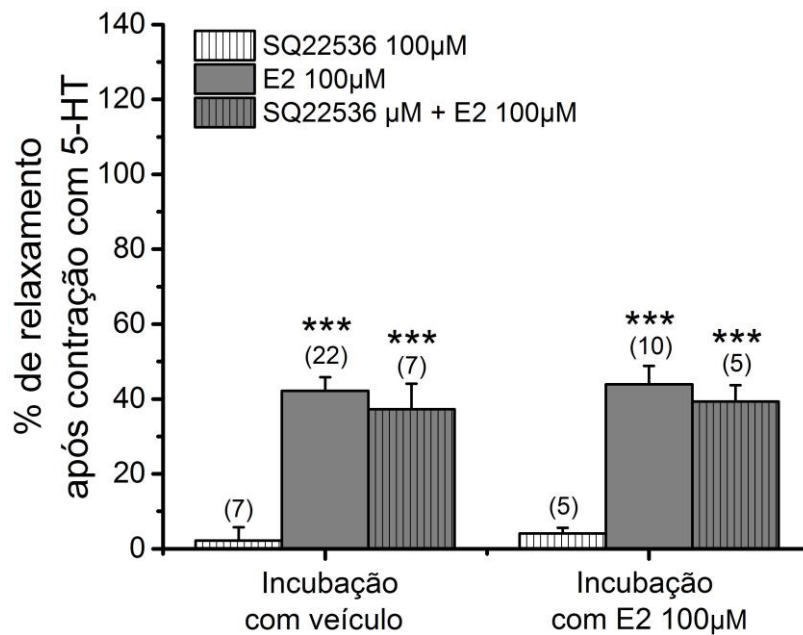


Figura 24 - Efeito vasorelaxante do E2 após inibição da AC, em AUH incubadas em veículo ou E2 e contraídas com 5-HT (***) $p < 0,001$ vs. SQ22536 10µM; t-test

Após contração com 5-HT, verificou-se que, em ambas as incubações, o SQ 22536 não exerceu efeito vasorelaxante das AUHctr, e os efeitos do E2 isoladamente e da aplicação conjunta do E2 com SQ 22536 foram significativamente superiores à aplicação do SQ 22536 (Fig. 24). Ao comparar o efeito vasorelaxante isolado do E2 com a aplicação conjunta de ambos os fármacos, em qualquer das incubações, não se encontram diferenças significativas (Fig. 24).

4.1.4. Efeitos do estradiol na expressão genética

Para estudos de expressão genética, as células do ML das AUH em cultura foram incubadas em meio sem soro durante 24h, e de seguida incubadas durante 24h em meio sem soro com veículo (etanol 0,01%) ou com E2 (10nM e 100nM). Posteriormente, foi realizada a extração de RNA e confirmação da sua pureza e integridade através de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. Após transcrição reversa, o cDNA resultante foi então analisado através de qPCR para comparação da expressão de genes chave na contratilidade vascular, tais como genes de canais de Ca^{2+} (Ca_v 1.2) e de canais de K^+ ($K_v\beta$ 1, $K_v\beta$ 2, $K_v\beta$ 3, $BK_{Ca\alpha}$ e $BK_{Ca\beta}$).

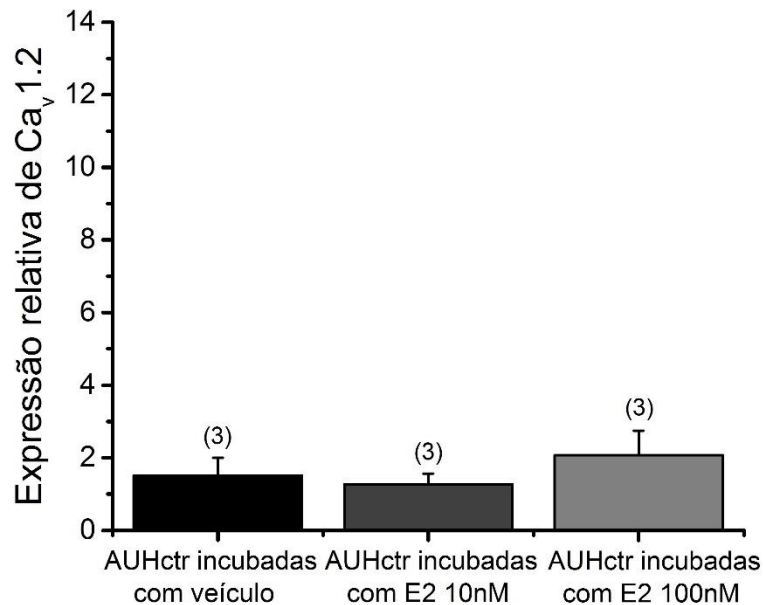


Figura 25 - Expressão do gene Ca_v1.2 em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM

Ao analisar a expressão do gene codificante da subunidade Ca_vα₁ dos canais Ca_v1.2 não se encontraram diferenças significativas entre as células do ML incubadas em veículo em relação às células do ML incubadas em E2 (Fig. 25).

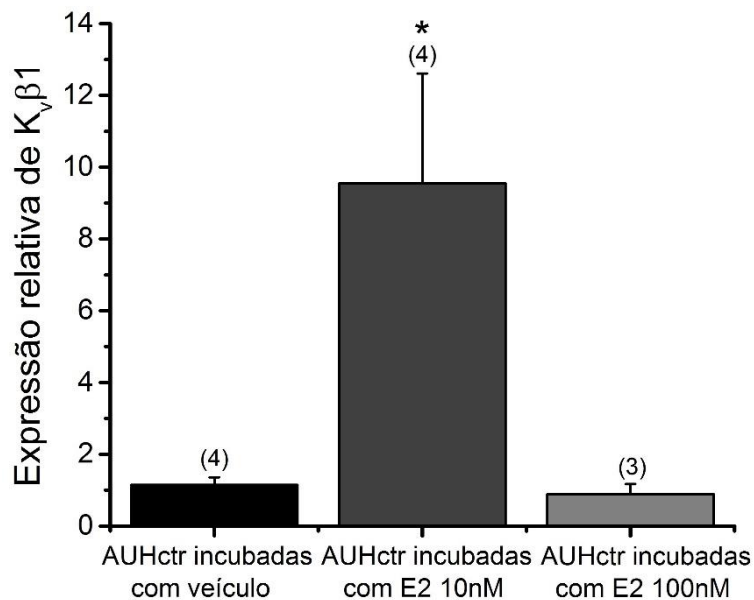


Figura 26 - Expressão do gene K_vβ1 em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM. (* p<0,05 vs. incubação com veículo, *One-way* ANOVA)

Após a análise da expressão do gene codificante para a subunidade K_vβ1 dos canais K_v verificou-se uma sobreexpressão deste gene nas células do ML incubadas com E2 a uma concentração de 10nM em comparação com as células do ML incubadas em veículo. No entanto, não se verificaram diferenças significativas na expressão deste gene entre as células incubadas em E2 100nM e as células incubadas em veículo (Fig. 26).

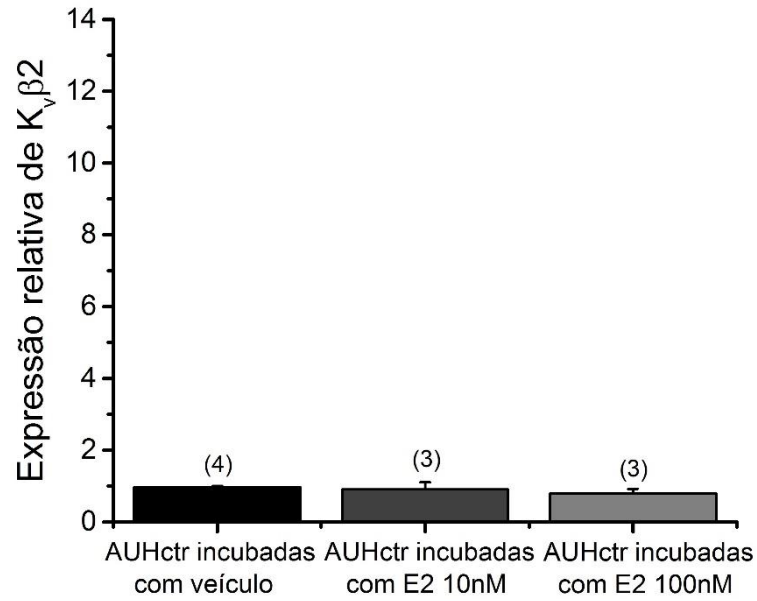


Figura 27 - Expressão do gene $K_v\beta 2$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM

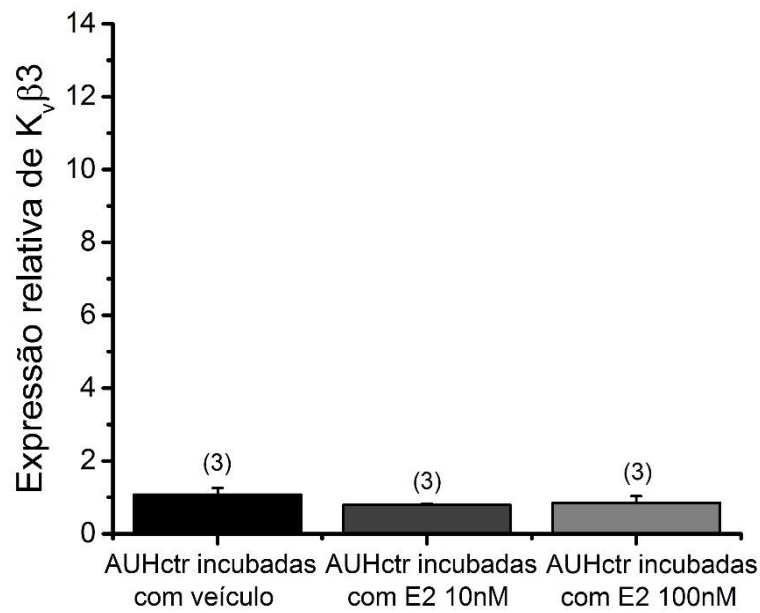


Figura 28 - Expressão do gene $K_v\beta 3$ em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM

Aquando da análise da expressão dos genes codificantes das subunidades $K_v\beta 2$ e $K_v\beta 3$ dos canais K_v não se encontraram diferenças significativas entre as células do ML incubadas com veículo e as células do ML incubadas com E2 (Fig. 27 e 28).

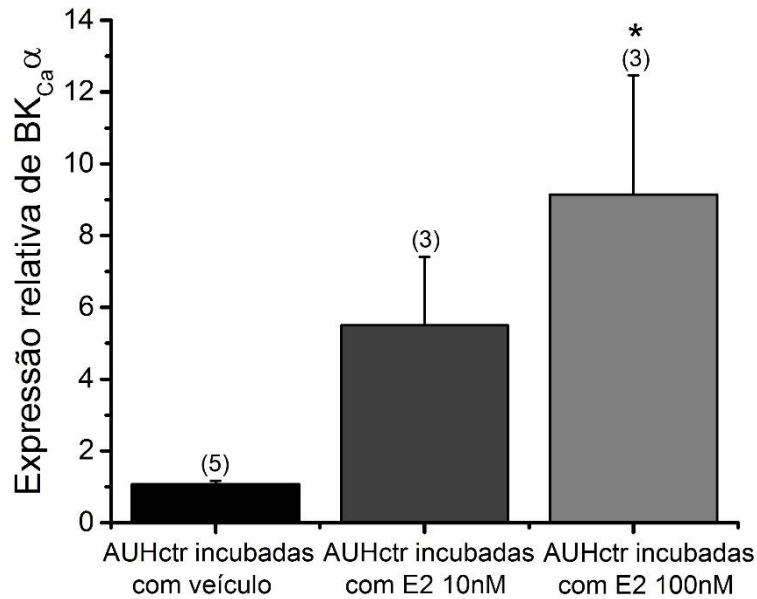


Figura 29 - Expressão do gene BK_{Ca}α em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM (* p<0,05 vs. incubação com veículo, *One-way ANOVA*)

Ao analisar a expressão do gene codificante da subunidade BK_{Ca}α dos canais BK_{Ca} nas células do ML incubadas com E2 10nM pareceu observar-se um aumento de expressão em comparação com as células do ML incubadas com veículo, não se tendo verificado, no entanto, diferenças significativas. Por outro lado, nas células incubadas com E2 100nM verificou-se um aumento da expressão significativo em relação às células incubadas com veículo (Fig. 29).

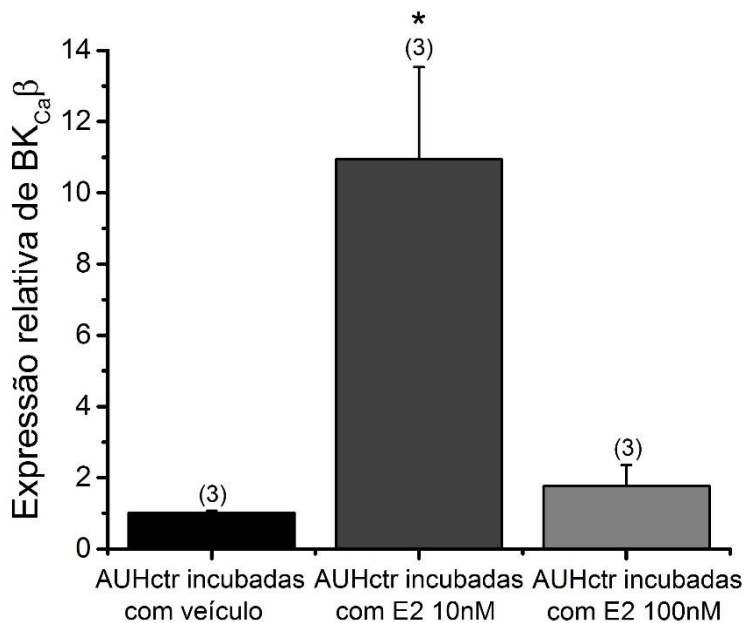


Figura 30 - Expressão do gene BK_{Ca}β em células do músculo liso de AUHctr incubadas em veículo, E2 10nM e E2 100nM (* p<0,05 vs. incubação com veículo, *One-way ANOVA*)

Ao analisar o gene codificante da subunidade BK_{Ca}β dos canais BK_{Ca} verificou-se um aumento significativo na expressão nas células do ML incubadas com E2 10nM em comparação com as células do ML incubadas em veículo. Por outro lado, nas células do ML incubadas com

E2 100nM não se encontraram diferenças significativas em comparação com as células incubadas em veículo (Fig. 30).

4.2. Artérias procedentes de grávidas com diabetes gestacional (AUHdge)

4.2.1. Comparação da tensão induzida por 5-HT e KCl em AUHdge e em AUHctr

Anéis de AUHctr e AUHdge sem endotélio foram incubadas durante 24h com E2 (100 μ M) ou veículo (etanol 0,01%). Usando também a técnica de banho de órgãos, estes anéis foram contraídos usando 5-HT (1 μ M) ou KCl (60mM), e a tensão induzida por estes agentes contráteis foi analisada.

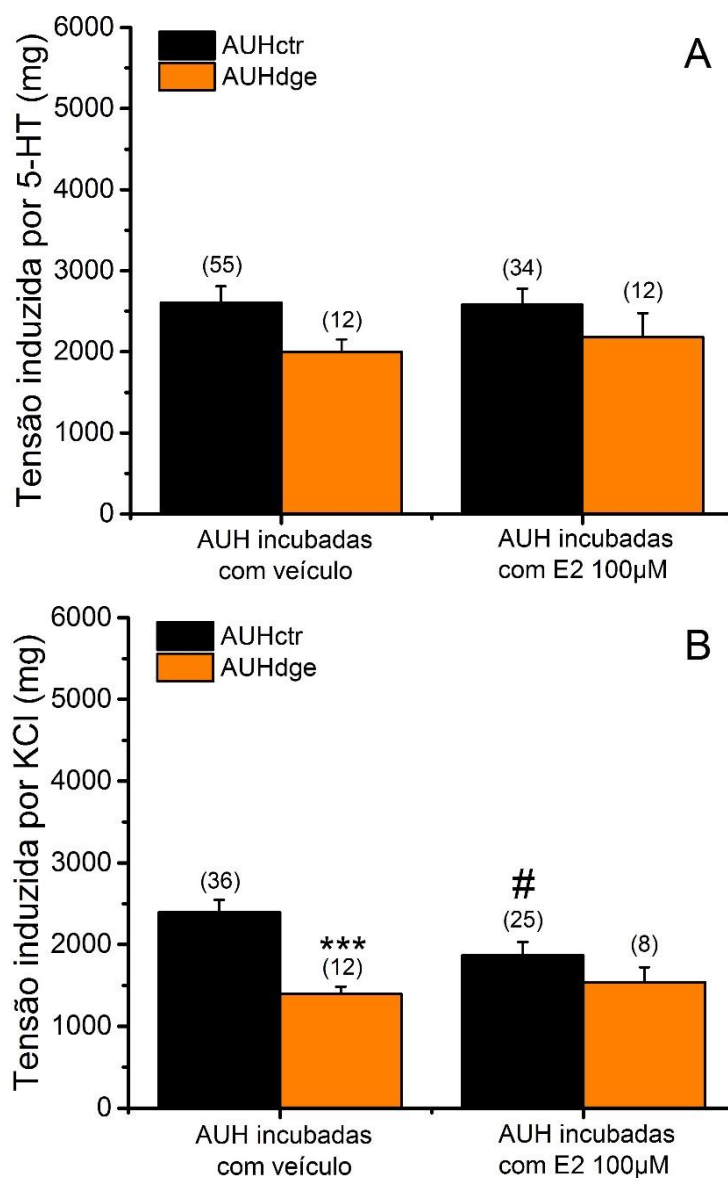


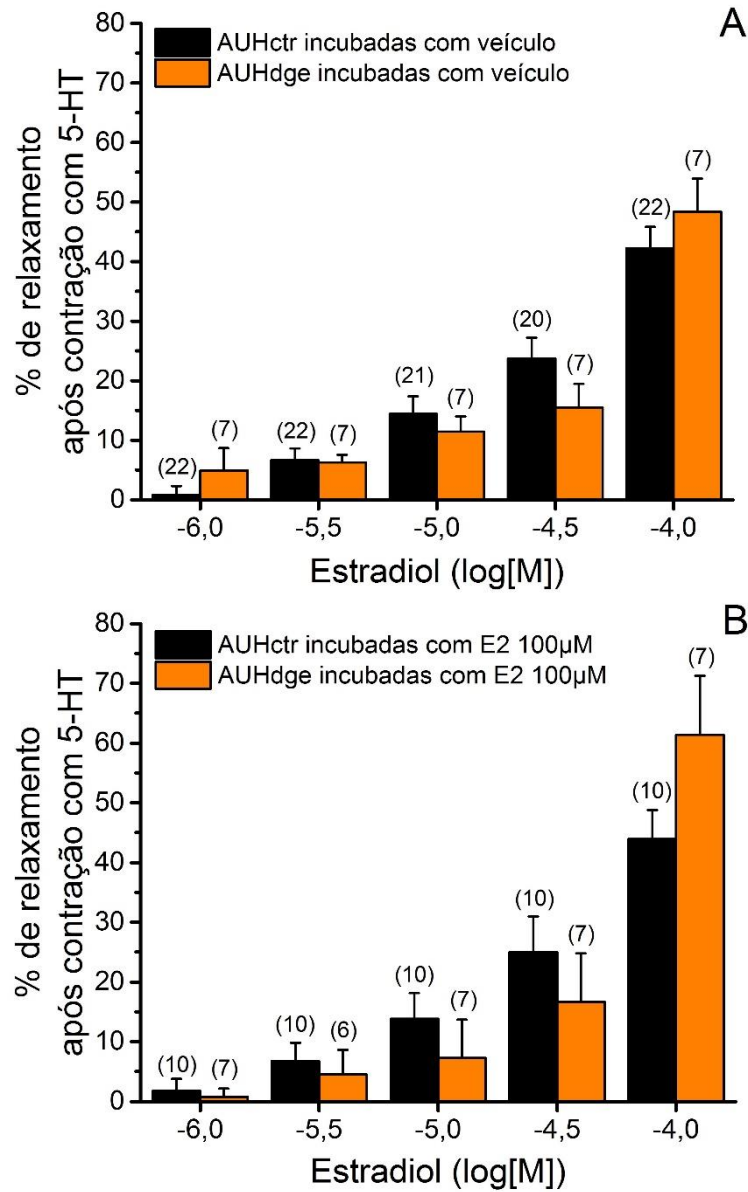
Figura 31 - Tensões induzidas por 5-HT (A) e KCl (B) em AUHctr e AUHdge incubadas em veículo ou E2 100µM (***) $p < 0,001$ vs. AUHctr; # $p < 0,05$ vs. AUH incubadas em veículo; *t-test*)

Não se verificaram diferenças entre as contrações induzidas pela 5-HT entre as AUHctr e as AUHdge, nem entre as AUH incubadas com E2 ou veículo (Fig. 31A).

Por outro lado, as contrações induzidas por KCl foram significativamente mais baixas em AUHdge em comparação com AUHctr. A incubação com E2 diminuiu a tensão nas AUHctr, mas não apresentou o mesmo efeito em AUHdge (Fig. 31B).

4.2.2. Efeitos vasculares do estradiol em AUHdge

Após contração com 5-HT ou KCl, os anéis de AUHctr e de AUHdge (previamente incubados em E2 100 μ M ou veículo) foram expostos a concentrações crescentes de E2 (1-100 μ M), e os seus efeitos rápidos foram analisados.



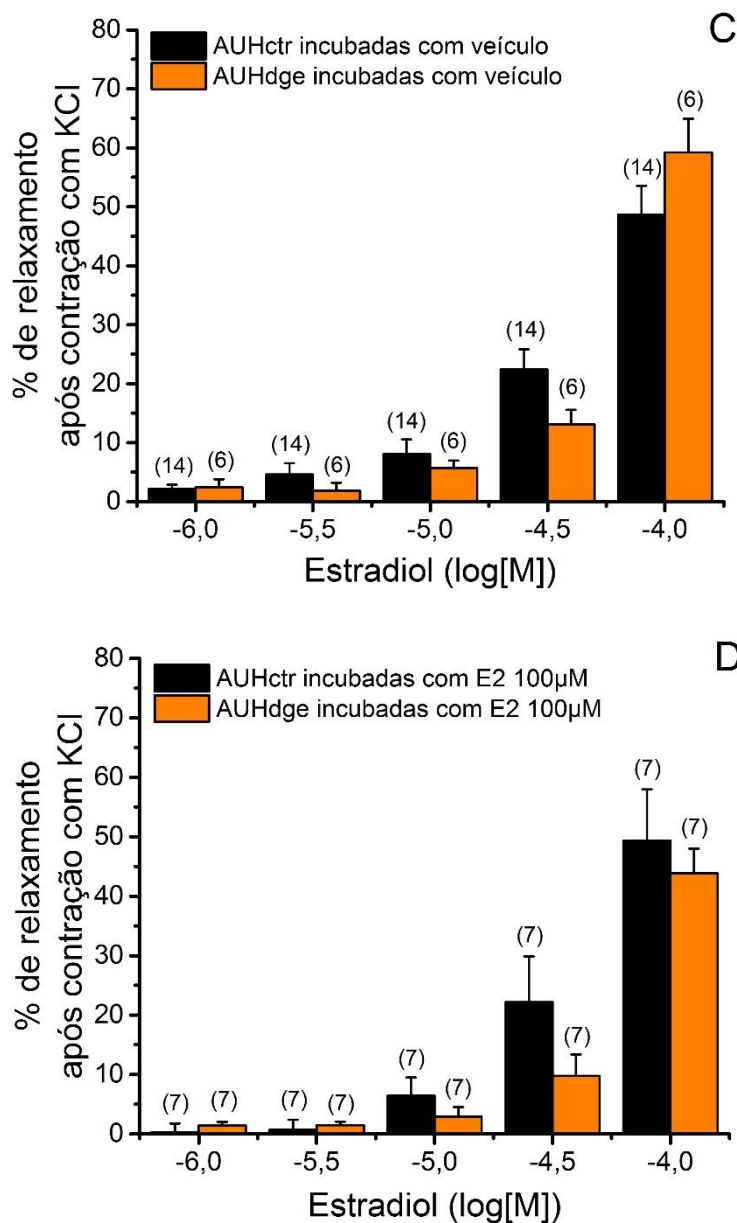


Figura 32 - Efeitos rápidos do E2 (1µM-100µM) em AUHctr e AUHdge contraídas com 5-HT (A e B) e KCl (C e D). A e C: AUH incubadas em veículo; B e D: AUH incubadas em E2 100µM

Nas AUH contraídas com 5-HT verificou-se que o E2 induziu um rápido vasorelaxamento dependente da dose, e este efeito foi similar em AUHctr e AUHdge (Fig. 32A-B).

Nas AUH contraídas com KCl verificou-se também que o E2 induziu um rápido vasorelaxamento dependente da dose, similar entre AUHctr e AUHdge (Fig. 32C-D). No entanto, a vasodilatação induzida pelo E2 a 100µM foi mais baixa em AUHdge quando incubadas em E2 em comparação com as AUH incubadas com veículo ($p < 0,05$, *t-test*).

4.3. Artérias procedentes de grávidas hipertensas (AUHhip)

4.3.1. Comparação da tensão induzida por 5-HT em AUHhip e em AUHctr

Anéis de AUHctr e AUHhip sem endotélio foram incubadas durante 24h com E2 (100 μ M) ou com veículo (etanol 0,01%). Também se utilizou a técnica de banho de órgãos para analisar a contractilidade provocada pela 5-HT (1 μ M) em diferentes condições.

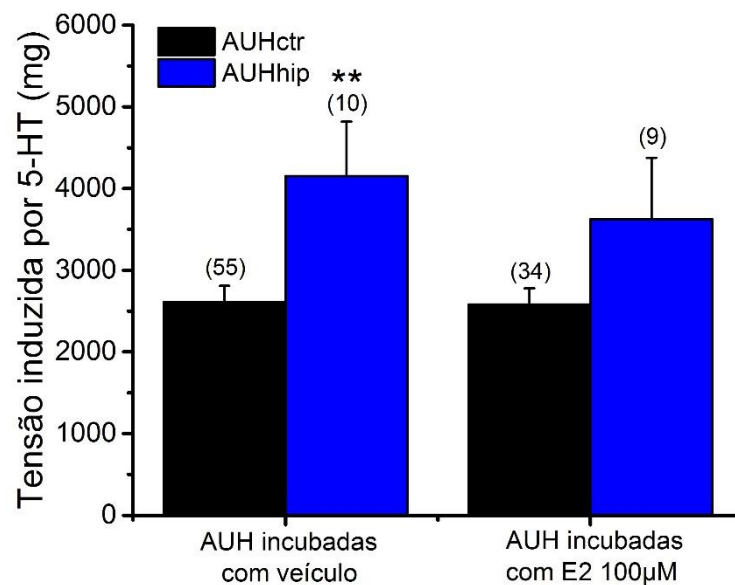


Figura 33 - Tensões induzidas por 5-HT em AUHctr e AUHhip incubadas em veículo ou E2 100 μ M (** $p < 0,01$ vs. AUHctr, t-test)

A contração induzida pela 5-HT foi significativamente superior em anéis de AUHhip em comparação com anéis de AUHctr, sugerindo um aumento da sensibilidade dos anéis hipertensos à 5-HT (Fig. 33). O aumento desta sensibilidade foi mitigado nos anéis incubados com E2 (Fig. 33).

4.3.2. Efeitos vasculares do estradiol em AUHhip

Após contração com 5-HT, os anéis de AUHhip e AUHctr (previamente incubados em E2 100 μ M ou veículo) foram expostos a concentrações crescentes de E2 (1-100 μ M), e os seus efeitos rápidos foram analisados.

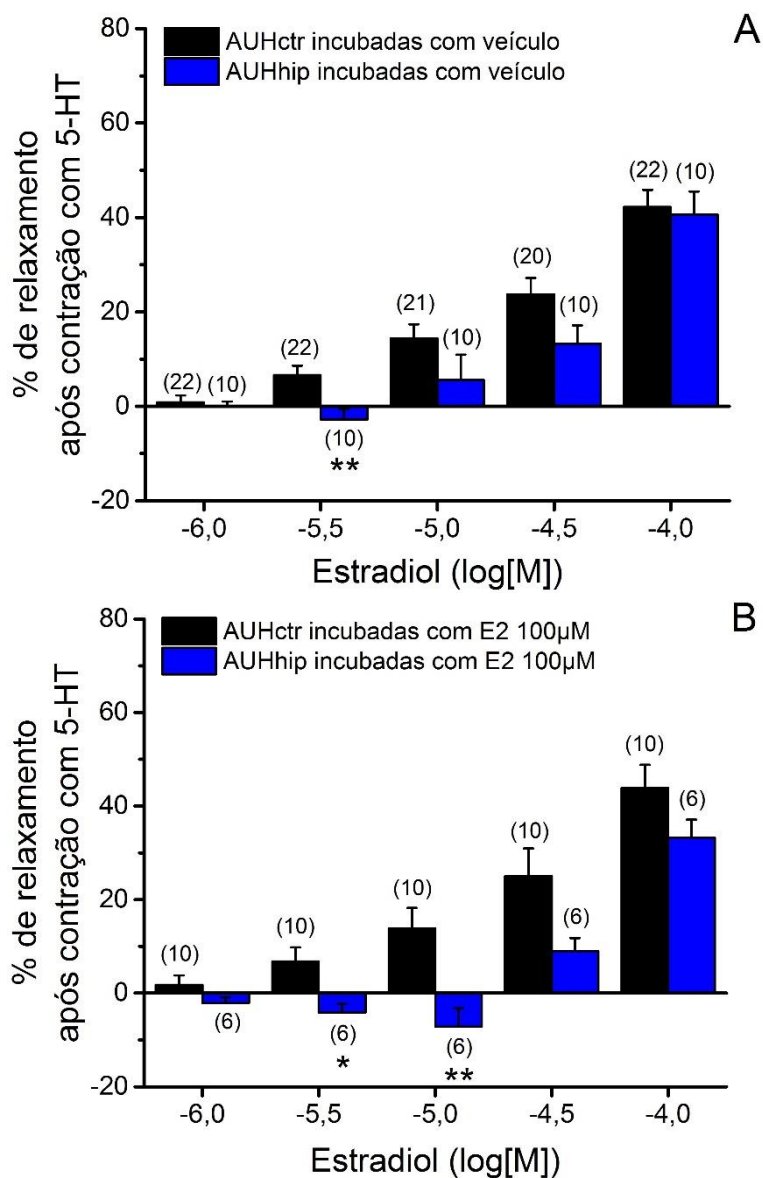


Figura 34 - Efeitos rápidos do E2 (1µM-100µM) em AUHctr e AUHhip contraídas com 5-HT.
 A: AUH incubadas em veículo; B: AUH incubadas em E2 100µM (* p<0,05 e ** p<0,01 vs. AUHctr, t-test)

O E2 induziu vasorelaxamento rápido dependente da dose nas AUHhip incubadas em veículo e em E2 100µM (Fig. 34).

Ao comparar o efeito vasorelaxante do E2 entre as AUHctr e as AUHhip incubadas em veículo verificou-se que este era significativamente superior nas AUHctr numa concentração de 3µM (Fig. 34A). Nas restantes concentrações de E2 utilizadas não se encontraram diferenças significativas entre os grupos de AUH (Fig. 34A).

Relativamente às AUH incubadas em E2 100µM verificou-se também que o efeito vasorelaxante do E2 era significativamente superior nas AUHctr relativamente às AUHhip nas contrações de 3 e 10µM (Fig. 34B). Nas restantes concentrações de E2 utilizadas não se encontraram diferenças significativas entre os grupos de AUH (Fig. 34B).

5. Discussão

5.1. Efeitos do estradiol em AUHctr

5.1.1. Tensão induzida por 5-HT e KCl e efeitos vasculares do E2

Como mostrado nos resultados obtidos em AUHctr, a incubação com E2 (24h) não alterou os efeitos contráteis máximos induzidos pela 5-HT. Por outro lado, a incubação das AUHctr com E2 100nM ou 100µM levaram à diminuição das contrações máximas induzidas pelo KCl.

A diferença de resultados obtidos entre os dois agentes contráteis pode ser devida aos diferentes mecanismos implicados no efeito contrátil destes agentes (38, 124). Nomeadamente, as contrações induzidas pela 5-HT são mediadas pelos recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1B/1D}: a ativação dos recetores 5-HT_{2A} leva à estimulação da PLC, aumentando os níveis de IP₃, enquanto que a ativação dos recetores 5-HT_{1B/1D} leva à inibição da AC (124, 125). Por outro lado, a contração vascular induzida pelo KCl nas AUH é devida principalmente ao influxo de Ca²⁺ extracelular mediado pelos LTCC (126). Assim, é possível que a exposição prolongada ao E2 provoque alterações genómicas ou pós-transcricionais destes canais. Neste sentido, recentemente, Hill et. al demonstraram que a exposição de artérias coronárias de porcos fêmea ao E2 atenua a contração induzida pelo KCl e que está associada a uma diminuição da abundância dos canais Ca_v1.2 através de um processo pós-transcricional (127). Tharp et. al também já haviam demonstrado que a sensibilidade ao KCl no mesmo modelo animal era superior quando estes animais eram ovariectomizados em comparação com animais controlo (26).

Quanto aos efeitos rápidos do E2, este induz um vasorelaxamento dependente da concentração, e que é observado segundos ou minutos após a exposição ao E2. Estes dados sugerem que o mecanismo responsável por este efeito não é genómico, pois o intervalo de tempo é demasiado curto para o efeito ser mediado por mecanismos clássicos envolvendo a ativação da transcrição genética (81). Estes resultados estão em concordância com estudos realizados noutros vasos e noutras espécies, nomeadamente em aorta de rato (3, 106), artérias mesentéricas de rato (104, 113), artérias coronárias de suíno (47), artérias carótidas e basilares caninas (81), artérias carótidas de coelho (79), artérias coronárias de coelho (108), artérias uterinas e placentares humanas (128), entre outras. Não se verificaram diferenças neste efeito entre AUH incubadas com veículo em comparação com AUH incubadas com E2, sugerindo que a existência dos efeitos genómicos do E2 não modifica os efeitos rápidos do próprio E2.

5.1.2. Análise do mecanismo vasorelaxante do estradiol

Relativamente ao mecanismo vasorelaxante do E2, analisou-se a possibilidade de envolvimento dos LTCC, sGC, pGC e AC.

Quanto à análise do envolvimento dos LTCC, os resultados obtidos nas AUHctr contraídas com 5-HT sugerem que o E2 possa partilhar o mesmo mecanismo de ação que a NIF, agindo através da inibição dos LTCC, uma vez que não existem diferenças significativas entre o efeito vasorelaxante isolado da NIF em relação ao efeito da aplicação conjunta da NIF com E2. Nas AUH contraídas com KCl, a aplicação isolada da NIF levou a um relaxamento total das artérias (100%), pelo que foi testada uma concentração dez vezes mais baixa deste fármaco, que levou a relaxamentos na ordem dos 50%, similares aos relaxamentos obtidos pelo E2. O efeito vasorelaxante da aplicação conjunta de NIF com E2 foi sempre significativamente superior aos efeitos isolados de qualquer um dos fármacos. No entanto, estes resultados podem dever-se ao facto de se estar a utilizar uma concentração demasiado baixa de NIF para esta exercer o seu efeito de forma eficaz. Em suma, os resultados sugerem que o mecanismo vasorelaxante do E2 possa estar associado à inibição dos LTCC, estando em concordância com diversos estudos realizados em linhas celulares animais (74, 111), em células do ML humano (64), e em artérias de rato (3), de coelho (79, 80), e de cão (81).

Quanto à análise do envolvimento da sGC, os resultados sugerem que os mecanismos que levam aos efeitos vasorelaxantes do E2 e do SNP são diferentes, uma vez que a utilização do ODQ não modificou o efeito relaxante do E2 nas AUHctr contraídas com 5-HT ou KCl. Adicionalmente, o efeito vasorelaxante isolado do SNP foi similar ao efeito vasorelaxante do E2, e o efeito vasorelaxante após aplicação conjunta de SNP e E2 pareceu aditivo (à excepção das AUH contraídas com KCl e incubadas em E2 100µM). Estes resultados estão em concordância com estudos efetuados por outros autores em artérias coronárias de porco (115), artérias mesentéricas de rato (110) e artérias basilares e carótidas internas de cães (81) sem endotélio, que demonstraram que a utilização de ODQ não inibia o vasorelaxamento induzido pelo E2. Adicionalmente, verificou-se também que os efeitos induzidos isoladamente pelo E2, pelo SNP (neste caso apenas em AUH contraídas com 5-HT), ou pela aplicação conjunta foram similares entre todas as incubações. Por outro lado, os efeitos induzidos isoladamente pelo SNP nas AUHctr contraídas com KCl foram significativamente superiores nas AUHctr incubadas com E2 100µM comparativamente com as AUHctr incubadas com veículo ou com E2 100nM, sugerindo que a o E2 em altas concentrações poderá, a longo prazo, modular a expressão genética da sGC ou da PKG.

Relativamente à pGC, os resultados mostram que esta molécula não está envolvida no mecanismo vasorelaxante do E2 uma vez que, nas AUHctr incubadas com veículo, o efeito da aplicação conjunta de ANP e E2 pareceu aditivo. Por outro lado, nas AUHctr incubadas com E2 100µM, o ANP não exerceu efeito relaxante.

Os resultados também sugerem que o efeito vasorelaxante do E2 nas AUHctr não passa pela estimulação da AC uma vez que, em ambas as incubações utilizadas (veículo e E2 100 μ M), a utilização de SQ 22536 não modificou o efeito relaxante do E2. Tal como referido na Introdução, existe alguma controvérsia acerca do envolvimento dos nucleótidos cíclicos no mecanismo vasorelaxante do E2. Estudos realizados por Keung et al. em artérias coronárias de porco (115) e artérias mesentéricas de rato (110) verificaram que o efeito vasorelaxante do E2 era abolido parcialmente pela utilização de SQ 22536. Por outro lado, Ramírez-Rosas realizaram um estudo similar em artérias basílicas e carótidas internas de cães, onde verificaram que a utilização deste fármaco não alterava o vasorelaxamento induzido pelo E2 (81). Esta disparidade de resultados pode resultar do facto de as artérias em estudo serem distintas, pois artérias apresentando localizações fisiológicas e estruturas membranares diferentes podem apresentar mecanismos modificados (81). Nomeadamente, as células do MLV de diferentes artérias podem apresentar diferente distribuição de canais iónicos e propriedades eletrofisiológicas que poderão modificar a resposta final.

Em suma, os resultados sugerem que o mecanismo vasorelaxante do E2 nas AUHctr envolve a inibição dos LTCC, mas é independente da ativação da sGC, pGC ou AC. Adicionalmente, os efeitos genómicos do E2 não alteram, qualitativa ou quantitativamente, o mecanismo de ação vasorelaxante do próprio E2.

5.1.3. Efeitos do estradiol na expressão genética

São diversos os artigos que demonstram os efeitos rápidos do E2, nomeadamente a inibição das correntes de Ca²⁺ nas células do ML (3, 64, 74, 81, 111). No entanto, estudos com altas doses farmacológicas de E2 administrado durante tempos de exposição curtos (<1h) não representam os efeitos *in vivo* do E2 no tónus vascular, que parece resultar de mecanismos crónicos de modulação de contratilidade vascular com concentrações mais baixas da hormona em circulação (127). Assim, neste projeto analisaram-se também as expressões de mRNA de subunidades de canais de Ca²⁺ e K⁺ através de qPCR.

Não se encontraram diferenças significativas na expressão de mRNA da subunidade Ca_v α ₁ dos canais Ca_v1.2 entre as células do ML incubadas em veículo em relação às células incubadas em E2. Estes resultados vão ao encontro de estudos realizados anteriormente. Um estudo realizado em porcos fêmea demonstrou que nos animais ovariectomizados se verificava um aumento das correntes de Ca²⁺ nas células do ML das suas artérias coronárias (26). No entanto, ao analisar a expressão de mRNA e proteína das subunidades Ca_v α ₁, Ca_vB2a, Ca_vB3, e Ca_vB4 dos canais Ca_v1.2 nas células das respetivas artérias não se encontraram diferenças significativas em relação aos animais não ovariectomizados (26). Por outro lado, nos animais ovariectomizados verificou-se uma diminuição na expressão proteica da subunidade Ca_vB1 (26). Assim, este estudo levantou a hipótese de que o E2 pode inibir os LTCC aumentando a expressão da subunidade reguladora Ca_vB1 (26). Mais recentemente, um estudo realizado também em artérias coronárias de porcos fêmea, revelou que o E2 (1nM) diminuía a expressão

proteica da subunidade $Ca_v\alpha 1$ do canal Cav1.2 na ordem dos 30% (127). Este efeito foi dependente dos ER clássicos e independente do GPER. No entanto, a mesma concentração de E2 não afetava a expressão do transcrito da mesma subunidade, sugerindo que o E2 reduz a abundância dos canais $Ca_v 1.2$ através de um processo pós-transcricional (127).

Ao analisar a expressão das subunidades dos canais K_v , não se encontraram diferenças significativas na expressão de mRNA das subunidades $K_v\beta 2$ e $K_v\beta 3$ entre as células incubadas em veículo e as células incubadas com E2. Por outro lado, a expressão de mRNA da subunidade $K_v\beta 1$ foi superior nas células incubadas com E2 a 10nM em comparação com as células incubadas com veículo ou com E2 100nM. Do nosso conhecimento, não existem estudos prévios que tenham analisado a influência do E2 na expressão destas subunidades.

A expressão da subunidade $BK_{Ca}\alpha$ dos canais BK_{Ca} foi significativamente aumentada nas células incubadas com E2. Quanto à subunidade $BK_{Ca}\beta$, verificou-se também uma sobre-expressão significativa nas células incubadas com E2 10nM em comparação com as células incubadas em veículo, não se observando diferenças significativas entre as células incubadas em E2 100nM e as células incubadas em veículo.

Existem diversos estudos realizados em animais do sexo feminino ovariectomizados sobre o efeito da substituição com E2 na expressão de mRNA ou proteína dos canais BK_{Ca} e verificam quer sobre-expressão, quer inalteração da mesma. Nomeadamente, Jamali et. al verificaram que, em células da aorta de porquinhos-da-Índia, a subunidade $BK_{Ca}\alpha$ nos animais tratados com E2 era significativamente sobre-expressa em relação aos animais tratados com veículo, o que não ocorreu com a expressão das subunidades $BK_{Ca}\beta 1$ (129). Por outro lado, Tsang et. al analisaram e não encontraram alterações significativas na expressão das subunidades $BK_{Ca}\alpha$ e $BK_{Ca}\beta$ entre aortas de ratos não ovariectomizados, ovariectomizados e ovariectomizados tratados com E2 durante 5 semanas (130). Nagar et. al analisaram os efeitos da substituição aguda (uma única administração) ou diária (durante seis dias) de E2 em ovelhas, e, na substituição aguda não encontraram diferenças significativas na expressão de nenhuma das subunidades destes canais nas artérias uterina, mesentérica e mamária entre animais ovariectomizados e tratados (48). Na substituição diária também não verificaram diferenças na expressão de mRNA ou proteína da subunidade α das artérias uterina, mesentérica e mamária. Já na expressão da subunidade $\beta 1$ os resultados foram diferentes consoante o tecido, tendo verificado que o tratamento diário com E2 não alterou a expressão de mRNA nem proteína nas artérias mesentéricas, mas levou a um aumento na expressão de mRNA nas artérias mamárias, de proteína no miométrio, e de mRNA e proteína nas artérias uterinas (48). Assim, estes autores sugerem que a exposição prolongada ao E2 pode alterar a função dos canais BK_{Ca} , o tónus vascular basal e reatividade das artérias mencionadas (48). Relativamente a estudos realizados em tecidos humanos, Chandran et. al verificaram através da técnica de *microarray* que a incubação de linhas celulares do ML uterino em E2 10nM durante 72h não produzia alterações significativas na expressão de mRNA das subunidades $BK_{Ca}\alpha$. No entanto, através da técnica de qPCR, verificaram que esta incubação levava à

diminuição da expressão desta subunidade (70). Korovkina et. al também verificaram que a incubação de células do músculo liso da artéria coronária humana com E2 diminuía a expressão da proteína BK_{Ca}α (131). Verificam-se assim diferenças nos efeitos do E2 na expressão dos transcritos e proteínas das subunidades dos canais BK_{Ca} consoante a espécie e tecido em estudo.

Em suma, os resultados indicam que a exposição das células do ML das AUHctr ao E2 não leva a alterações na expressão de mRNA da subunidade Ca_vα₁ dos canais Ca_v1.2 nem das subunidades K_vB2 e K_vB3 dos canais K_v. Por outro lado, a exposição a E2 levou a um aumento da expressão das subunidades K_vB1 dos canais K_v (E2 10nM) e das subunidades BK_{Ca}α (E2 10 e 100nM) e BK_{Ca}β (E2 10nM) dos canais BK_{Ca}.

5.2. Função vascular e efeitos do estradiol em AUHdge

Para analisar a função vascular das AUHdge foi comparada a sua capacidade contrátil após exposição a agentes contráteis com as AUHctr. Após a análise da tensão induzida pela 5-HT em AUHdge em comparação com AUHctr, verificou-se que esta pareceu mais baixa nas AUH com patologia, não se tendo verificado diferenças significativas. Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado por Mulhern et al. em aorta de ratos com e sem diabetes *mellitus* (132). Por outro lado, Head et. al (133) e Radenkovik et al. (134) reportaram valores significativamente mais baixos em aorta de rato com diabetes *mellitus* e AUH de mulheres com diabetes gestacional, respetivamente, em comparação com os controlos (sem patologia). A tensão induzida pelo KCl foi significativamente mais baixa em AUHdge em comparação com as AUHctr. Estes resultados estão em concordância com estudos realizados por outros autores em aorta de rato (133, 135, 136) e em miométrio humano (137). Verificaram-se valores mais baixos de tensão em artérias de indivíduos com diabetes em comparação com artérias normais, e estes autores sugerem que esta perda da capacidade contrátil das células musculares em resposta a estes agentes possa estar associada com a degeneração das células do ML e/ou com uma diminuição da expressão dos canais de Ca²⁺ e uma reduzida sinalização de Ca²⁺ (136, 137).

De forma a compreender melhor a origem da perda desta capacidade contrátil seriam bastante úteis estudos a nível da expressão genética e proteómica de proteínas-chave neste processo. De facto, um estudo de 2015 demonstrou que nos cordões umbilicais de mulheres grávidas com diabetes tipo 1 existem alterações morfológicas a nível das camadas dos vasos umbilicais e também alterações genéticas a nível da função vascular (nomeadamente nos genes das proteínas PDE5A e NPR-B) (138). Adicionalmente, um estudo realizado em mulheres grávidas obesas com e sem diabetes gestacional demonstrou também a existência de

alterações a nível de proteínas envolvidas na sinalização do Ca^{2+} no músculo esquelético no primeiro grupo (139).

De seguida, de forma a compreender o papel do E2 analisaram-se os efeitos genómicos e não genómicos do E2 nas AUH. Assim, comparou-se a tensão induzida pelos agentes contráteis entre as AUH incubadas com veículo e as artérias incubadas com E2. As AUH contraídas com 5-HT previamente incubadas com E2 apresentaram valores de tensão que não foram significativamente diferentes das AUH incubadas com veículo. Por outro lado, a incubação com E2 diminuiu a contração induzida pelo KCl nas AUHctr, em concordância com outros estudos (140). Estes autores sugerem que esta diminuição na contratilidade possa ser devida à inibição dos canais de Ca^{2+} (140). Por outro lado, a incubação com E2 não apresentou o mesmo efeito nas AUHdge.

Após a exposição rápida (15 minutos) a concentrações crescentes de E2, verificou-se uma vasodilatação dependente da dose, similar entre as AUHctr e as AUHdge, e também entre incubações. No entanto, as AUHdge incubadas com E2 foram menos sensíveis aos seus efeitos rápidos de vasorelaxamento.

Relativamente à sensibilidade aos efeitos do E2 seria também útil realizar estudos a nível genético, nomeadamente a níveis dos recetores citosólicos e membranas do E2, assim como das proteínas potencialmente envolvidas no seu mecanismo de vasorelaxamento. Kleiblova et. al demonstraram que a expressão dos recetores ER α e ER β se encontrava significativamente reduzida no tecido subcutâneo de grávidas com diabetes gestacional em comparação com grávidas saudáveis (141).

O papel do E2 na diabetes gestacional é ainda controverso. Diversos estudos sugerem que o E2 em níveis fisiológicos apresenta um papel na regulação do metabolismo energético e homeostase da glucose. Nomeadamente, esta hormona parece aumentar a replicação e melhorar a sobrevivência e a função das células β secretoras da insulina durante a gravidez (142, 143). Estudos realizadas em ratos *knockout* para a aromatase verificaram que estes apresentam não só baixos níveis de E2 como também resistência à insulina (144). Adicionalmente, nestes ratos o tratamento com E2 leva a uma reversão da resistência à insulina (145). Por outro lado, estudos sugerem que os níveis fisiologicamente elevados desta hormona durante a gravidez (146) ou não fisiológicos (excessivamente elevados ou baixos) (147) podem promover a resistência à insulina e o desenvolvimento de diabetes gestacional. Alonso et. al defendem ainda que o E2 não está envolvido na resistência fisiológica à insulina que ocorre na gravidez (148).

Existe também discrepância em relação aos níveis plasmáticos de E2 durante a gravidez com diabetes gestacional em comparação com gravidez saudável. Um estudo realizado em 2016 analisou os níveis de esteróides sexuais durante o segundo trimestre em grávidas saudáveis com fetos do género feminino, grávidas com DG, e grávidas com diabetes *mellitus* tipo 2, e verificou que os níveis de E2 eram mais baixos nas grávidas com qualquer uma das patologias

referidas em relação às grávidas saudáveis (149). Adicionalmente, verificaram também um menor rácio E2/testosterona nestes mesmos grupos, sugerindo que ambas as alterações se poderiam dever a uma menor atividade da aromatase (149). Um estudo de 2017 indicou também que os níveis de E2 do cordão umbilical de grávidas com diabetes gestacional eram mais baixos em comparação com grávidas saudáveis (142). Em contraste, outros autores indicaram que em grávidas com diabetes gestacional os valores de E2 se encontram significativamente mais elevados em comparação a grávidas saudáveis (150, 151).

Em suma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que as AUHdge apresentam menor capacidade contrátil e são menos sensíveis aos efeitos do E2 em comparação com as AUHctr.

5.3. Função vascular e efeitos do estradiol em AUHhip

Como referido anteriormente, as AUH não são inervadas, pelo que a contração das camadas de MLV depende de substâncias vasoativas presentes em circulação tais como a 5-HT (1, 4). Nestas artérias, as contrações induzidas por este agente são mediadas pelos recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1B/1D} (124, 125).

Assim, para analisar a função vascular das AUHhip, a sua capacidade contrátil após exposição a 5-HT foi comparada com a obtida em AUHctr. Quando se analisou a tensão induzida por este agente contrátil, verificou-se que esta era significativamente superior em AUHhip em comparação com AUHctr ($p < 0,01$). Isto sugere uma hipersensibilidade das AUHhip à 5-HT, em concordância com diversos estudos realizados em artérias animais nomeadamente aorta de rato (152, 153), artérias mesentéricas de rato (154, 155), e artérias basílicas de rato (156), assim como artérias humanas tais como artérias mamárias (157) e artérias císticas (158, 159). Este aumento da sensibilidade foi mitigado nas AUH incubadas com E2. Um estudo realizado em aorta de ratos fêmea ovariectomizados normotensos ou hipertensos também verificou que os animais tratados com terapia de substituição com E2 apresentavam contrações induzidas pela 5-HT mais baixas em relação aos animais não tratados (153).

A origem desta hipersensibilidade à 5-HT é desconhecida, podendo dever-se a alterações na expressão dos diferentes tipos de recetores da 5-HT, ou ao aumento dos níveis plasmáticos de 5-HT (125). De facto, os níveis plasmáticos de 5-HT livre encontram-se elevados na hipertensão humana e experimental (159), assim como na pré-eclâmpsia (125). No entanto, desconhece-se se a elevação destes níveis plasmáticos provoca um aumento na pressão arterial ou se é uma resposta adaptativa à hipertensão. Relativamente aos recetores de 5-HT, um estudo realizado em aorta de rato demonstrou a sobre-expressão de dois recetores de 5-HT em ratos hipertensos (160). Adicionalmente, em 2005 Gupta et. al sugeriram que em AUH

de gravidezes com pré-eclâmpsia possam ocorrer alterações no desenvolvimento normal dos recetores 5-HT_{1B/1D} podendo haver uma maior sensibilidade dos mesmos à 5-HT desde uma idade gestacional mais precoce em comparação com AUH de gravidezes controlo (125).

Ao analisar os efeitos rápidos do E2 nestas artérias verificou-se uma vasodilatação rápida dependente da concentração. A vasodilatação induzida pelo E2 foi significativamente superior em AUHctr em comparação com AUHhip. Isto sugere uma modificação na resposta vascular ao E2, e possivelmente a existência de um diferente mecanismo de vasodilatação nos anéis hipertensos (106). Os resultados obtidos em estudos realizados por outros autores são controversos. Unemoto et. al verificaram que, em aorta de rato contraída com noradrenalina, o vasorelaxamento induzido pelo E2 era superior nos ratos hipertensos em comparação com ratos normotensos (106). Por outro lado, Kocic et. al analisaram artérias da cauda de rato e verificaram que em artérias de ratos normotensos sem endotélio o E2 exercia um efeito vasorelaxante, mas que em ratos com hipertensão pulmonar este efeito não ocorria (161).

Em suma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que as AUHhip apresentam maior sensibilidade à 5-HT e menor sensibilidade aos efeitos rápidos do E2 em comparação com as AUHctr.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Com a realização deste trabalho foi possível demonstrar que o E2 provoca um vasorelaxamento rápido dependente da concentração nas AUHctr. Os dados sugerem que este vasorelaxamento envolva a inibição dos LTCC, sendo independente da ativação da sGC, pGC ou AC. Adicionalmente, os efeitos genómicos do E2 não alteraram, qualitativa ou quantitativamente, o mecanismo de ação vasorelaxante do próprio E2. No futuro será importante esclarecer se existe envolvimento dos canais de K^+ no mecanismo de vasorelaxamento desta hormona. A incubação das AUHctr com E2 levou a uma diminuição do efeito contrátil do KCl sugerindo que a exposição prolongada a este fármaco provoque alterações genómicas ou pós-transcripcionais dos canais LTCC.

Por outro lado, a exposição das células do ML das AUHctr ao E2 levou a um aumento da expressão das subunidades $K_v\beta 1$ dos canais K_v , e das subunidades $BK_{Ca}\alpha$ e $BK_{Ca}\beta$ dos canais BK_{Ca} , não tendo sido detetadas alterações significativas na expressão de mRNA da subunidade $Ca_v\alpha_1$ dos canais $Ca_v1.2$ nem das subunidades $K_v\beta 2$ e $K_v\beta 3$ dos canais K_v . No futuro seria interessante analisar a influência da exposição ao E2 na expressão proteica das várias subunidades dos canais estudados, assim como na expressão de outras proteínas envolvidas na contratilidade vascular.

Este estudo concluiu também que as AUHdge apresentam menor capacidade contrátil que as AUHctr e, após incubação com E2, são menos sensíveis aos efeitos rápidos deste fármaco em comparação com as AUH não incubadas. De forma a compreender melhor estes resultados seria útil a realização de estudos a nível da expressão de proteínas-chave no processo da contratilidade vascular destas artérias, assim como dos recetores citosólicos e membranares do E2.

Por último, concluiu-se que as AUHhip apresentam maior sensibilidade à 5-HT e menor sensibilidade aos efeitos rápidos do E2 em comparação com as AUHctr. No futuro, será importante avaliar se existem diferenças a nível da expressão dos recetores de 5-HT nas células do ML das AUHdge comparativamente a AUHctr, assim como determinar se existem diferenças no mecanismo de vasorelaxamento do E2 nas AUHdge comparativamente às AUHctr.

7. Trabalhos apresentados em congressos

Comunicações orais

- Sousa A, Cairrão E, Verde I. Gestational diabetes: implications in Human Umbilical Artery function and its modulation by Estradiol. II Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais, Castelo Branco. 21-22/Out/2017.

Posters

- Sousa A, Cairrão E, Verde I. Vascular function in pregnancy hypertensive Human Umbilical Arteries and its modulation by Estradiol. II Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais, Castelo Branco. 21-22/Out/2017.
- Sousa A, Cairrão E, Verde I. Mechanisms of the Vascular Effects of Estradiol in Human Umbilical Arteries. UBI II International Congress in Health Sciences Research, Covilhã. 17-20/Maio/2017
- Sousa A, Cairrão E, Verde I. Vascular Effects of Estradiol in Human Umbilical Arteries. XI Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã. 1/Jul/2016

8. Bibliografia

1. Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA)2010.
2. Young B, O'Dowd G, Woodford P. *Wheater's functional histology : a text and colour atlas* 2006. Disponível em: <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20090600258>.
3. Cairrao E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I. Non-genomic vasorelaxant effects of 17beta-estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(5):615-24.
4. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Alvarez E, Correia I, Verde I. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*. 2009;45(3):175-84.
5. Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R. Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol*. 2013;28(10):1235-44.
6. Meyer WW, Rumpelt HJ, Yao AC, Lind J. Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *Eur J Pediatr*. 1978;128(4):247-59.
7. Zhang S-X. *An Atlas of Histology*. 1ST ed. New York, USA: Springer; 1999 Feb. 426 p.
8. Leung SW, Quan A, Lao TT, Man RY. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early Hum Dev*. 2006;82(7):457-62.
9. Woodrum DA, Brophy CM. The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;177(1-2):135-43.
10. Gabella G. Morphology of smooth muscle. In: Kao CY, Carsten ME, editors. *Cellular aspects of smooth muscle function*. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. p. 1-47.
11. Hall J, Guyton A. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 13th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2006.
12. Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev*. 2016;68(2):476-532.
13. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007;15(3):100-8.
14. Owens GK, Vernon SM, Madsen CS. Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl*. 1996;14(5):S55-64.
15. Li S, Sims S, Jiao Y, Chow LH, Pickering JG. Evidence from a novel human cell clone that adult vascular smooth muscle cells can convert reversibly between noncontractile and contractile phenotypes. *Circ Res*. 1999;85(4):338-48.

16. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(2):247-66.
17. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Verde I. Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. *Health.* 2010;2(4):321-31.
18. McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2002;135(1):1-13.
19. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003;27(1-4):201-6.
20. Seeley RR, Tate P, Stephens TD. *Anatomia e Fisiologia.* 2011.
21. Chitale K, Weber DS, Webb RC. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2001;3(2):139-44.
22. Hisaoka T, Yano M, Ohkusa T, Suetsugu M, Ono K, Kohno M, et al. Enhancement of Rho/Rho-kinase system in regulation of vascular smooth muscle contraction in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2001;49(2):319-29.
23. Friel AM, Sexton DJ, O'Reilly M W, Smith TJ, Morrison JJ. Rho A/Rho kinase: human umbilical artery mRNA expression in normal and pre eclamptic pregnancies and functional role in isoprostane-induced vasoconstriction. *Reproduction.* 2006;132(1):169-76.
24. Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Ion channels. *Br J Pharmacol.* 2005;144 Suppl 1:S73-94.
25. Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension.* 2000;35(1 Pt 2):173-8.
26. Tharp DL, Ivey JR, Shaw RL, Bowles DK. Ovariectomy increases L-type Ca²⁺ channel activity in porcine coronary smooth muscle. *Menopause.* 2014;21(6):661-8.
27. Martin P, Rebolledo A, Palomo AR, Moncada M, Piccinini L, Milesi V. Diversity of Potassium Channels in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells: A Review of Their Roles in Human Umbilical Artery Contraction. *Reprod Sci.* 2013.
28. Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CL, et al. Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17beta-estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(1):4-13.
29. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(2):65-81.
30. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
31. Standen NB, Quayle JM. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand.* 1998;164(4):549-57.
32. Milesi V, Raingo J, Rebolledo A, Grassi de Gende AO. Potassium channels in human umbilical artery cells. *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10(6):339-46.
33. Brayden JE. Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:1069-76.
34. Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, et al. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol.* 2012;2(3):2087-149.

35. Makino A, Firth A, Yuan J. Endothelial and Smooth Muscle Cell Ion Channels in Pulmonary Vasoconstriction and Vascular Remodeling. 2011;1(3):1555-602.
36. Wareing M, Greenwood SL. Review: Potassium channels in the human fetoplacental vasculature. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S203-6.
37. Ko EA, Park WS, Firth AL, Kim N, Yuan JX, Han J. Pathophysiology of voltage-gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: modulation by protein kinases. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010;103(1):95-101.
38. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2008;376(5):375-83.
39. Bubolz AH, Li H, Wu Q, Liu Y. Enhanced oxidative stress impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H1873-80.
40. Liu Y, Terata K, Rusch NJ, Gutterman DD. High glucose impairs voltage-gated K⁽⁺⁾ channel current in rat small coronary arteries. *Circ Res*. 2001;89(2):146-52.
41. Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(2):180-4.
42. Yang Y, Murphy TV, Ella SR, Grayson TH, Haddock R, Hwang YT, et al. Heterogeneity in function of small artery smooth muscle BKCa: involvement of the beta1-subunit. *J Physiol*. 2009;587(Pt 12):3025-44.
43. Wu RS, Marx SO. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: alpha- and beta-subunits. *Kidney Int*. 2010;78(10):963-74.
44. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:69-78.
45. Lovren F, Triggle C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):521-9.
46. White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, et al. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca²⁺-activated K⁺ channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2002;53(3):650-61.
47. White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res*. 1995;77(5):936-42.
48. Nagar D, Liu XT, Rosenfeld CR. Estrogen regulates beta1-subunit expression in Ca²⁺-activated K⁺ channels in arteries from reproductive tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(4):H1417-27.
49. Cox RH. Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(1):13-23.
50. Lu T, He T, Katusic ZS, Lee HC. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by high glucose. *Circ Res*. 2006;99(6):607-16.

51. Radenkovic M, Grbovic L, Radunovic N, Momcilov P. Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep.* 2007;59(1):64-73.
52. Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1993;265(5 Pt 1):C1363-70.
53. Robertson BE, Bonev AD, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg²⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 2):H696-705.
54. Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29(4):312-6.
55. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol.* 2010;640:94-101.
56. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling -an overview. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12(1):3-10.
57. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8):a003947.
58. Salemme S, Rebolledo A, Speroni F, Petrucci S, Milesi V. L, P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(1-4):55-64.
59. Ghosh D, Syed AU, Prada MP, Nystoriak MA, Santana LF, Nieves-Cintrón M, et al. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Adv Pharmacol.* 2017;78:49-87.
60. Cribbs LL. Vascular smooth muscle calcium channels: could "T" be a target? *Circ Res.* 2001;89(7):560-2.
61. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.
62. Striessnig J, Bolz HJ, Koschak A. Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch.* 2010;460(2):361-74.
63. Bowles DK, Maddali KK, Ganjam VK, Rubin LJ, Tharp DL, Turk JR, et al. Endogenous testosterone increases L-type Ca²⁺ channel expression in porcine coronary smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(5):H2091-H8.
64. Ullrich ND, Koschak A, MacLeod KT. Oestrogen directly inhibits the cardiovascular L-type Ca²⁺ channel Cav1.2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361(2):522-7.
65. Gileadi O. Structures of soluble guanylate cyclase: implications for regulatory mechanisms and drug development. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(1):108-13.
66. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* 2006;27(1):47-72.
67. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 2013;19(3):197-209.

68. Siiteri PK, Macdonald PC. Placental Estrogen Biosynthesis During Human Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1966;26(7):751-61.
69. Barbieri RL. The Endocrinology of the Menstrual Cycle. In: Rosenwaks; Z, Wassarman PM, editors. *Human Fertility: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* 1154. 2014/05/02 ed: Humana Press; 2014. p. 145-69.
70. Chandran S, Cairns MT, O'Brien M, Smith TJ. Transcriptomic effects of estradiol treatment on cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;393(1):16-23.
71. Khalil RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(12):1627-42.
72. Miller VM. Sex-based differences in vascular function. *Womens Health (Lond Engl).* 2010;6(5):737-52.
73. Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 b-Estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):1034-40.
74. Cairrao E, Carvas J, Santos-Silva AJ, Alvarez E, Verde I. 17beta-Estradiol and progesterone inhibit L-type Ca²⁺ current of rat aorta smooth muscle cells. *Portugaliae Electrochimica Acta.* 2006;24:241-55.
75. Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(9):1143-58.
76. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276(40):36869-72.
77. Menazza S, Murphy E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2016;118(6):994-1007.
78. Wu Q, Chambliss K, Umetani M, Mineo C, Shaul PW. Non-nuclear estrogen receptor signaling in the endothelium. *J Biol Chem.* 2011;286(17):14737-43.
79. Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. Acute relaxant effects of 17-beta-Estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. *Steroids.* 2002;67(5):339-46.
80. Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E. Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca²⁺ entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(4):422-9.
81. Ramirez-Rosas MB, Cobos-Puc LE, Sanchez-Lopez A, Gutierrez-Lara EJ, Centurion D. Pharmacological characterization of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by progesterone and 17beta-estradiol on isolated canine basilar and internal carotid arteries. *Steroids.* 2014;89:33-40.
82. Shaw L, Taggart MJ, Austin C. Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br J Pharmacol.* 2000;129(3):555-65.

83. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 β -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} mobilization. *Circ Res*. 1997;81(5):885-92.
84. Traupe T, Stettler CD, Li H, Haas E, Bhattacharya I, Minotti R, et al. Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. *Hypertension*. 2007;49(6):1364-70.
85. Castillo C, Ceballos G, Rodriguez D, Villanueva C, Medina R, Lopez J, et al. Effects of estradiol on phenylephrine contractility associated with intracellular calcium release in rat aorta. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(6):C1388-94.
86. Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M. GPER/GPR30 and Regulation of Vascular Tone and Blood Pressure. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*. 2011;11(4):255-61.
87. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:165-90.
88. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.
89. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;308(1-2):32-8.
90. Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, et al. Differential effects of 17 β -estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension*. 2007;49(6):1358-63.
91. Han G, Li F, Yu X, White RE. GPER: A novel target for non-genomic estrogen action in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*. 2013;71:53-60.
92. Lindsey SH, Chappell MC. Evidence That the G Protein-Coupled Membrane Receptor GPR30 Contributes to the Cardiovascular Actions of Estrogen. *Gend Med*. 2011;8(6):343-54.
93. Lindsey SH, Liu L, Chappell MC. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. *Steroids*. 2014;81:99-102.
94. Fredette NC, Meyer MR, Prossnitz ER. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017.
95. Yu X, Zhang Q, Zhao Y, Schwarz BJ, Stallone JN, Heaps CL, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor 1 induces coronary artery relaxation via Epac/Rap1-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase pathway in parallel with PKA. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173085.
96. Santos RL, Marin EB, Goncalves WL, Bissoli NS, Abreu GR, Moyses MR. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;200(3):203-10.

97. Lekontseva O, Chakrabarti S, Jiang Y, Cheung CC, Davidge ST. Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Estrogen-Induced Relaxation in Rat Resistance Arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011.
98. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000;87(8):677-82.
99. Chakrabarti S, Morton JS, Davidge ST. Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview. *Can J Cardiol.* 2014;30(7):705-12.
100. Ding Q, Hussain Y, Chorazyczewski J, Gros R, Feldman RD. GPER-independent effects of estrogen in rat aortic vascular endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;399(Supplement C):60-8.
101. Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 1995;360(3):291-3.
102. Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW. Fetal and neonatal physiology 2017. Disponível em: <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20131004337>.
103. Rosenfeld CR, White RE, Roy T, Cox BE. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(1):H319-28.
104. Keung W, Vanhoutte PM, Man RY. Nongenomic responses to 17beta-estradiol in male rat mesenteric arteries abolish intrinsic gender differences in vascular responses. *Br J Pharmacol.* 2005;146(8):1148-55.
105. Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(5 Pt 1):1458-66.
106. Unemoto T, Honda H, Kogo H. Differences in the mechanisms for relaxation of aorta induced by 17beta-Estradiol or progesterone between normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2003;472(1-2):119-26.
107. Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res.* 1993;27(11):1939-42.
108. Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17beta-oestradiol in vitro. *B J Pharmacol.* 1991;104(4):1033-7.
109. Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Vedernikov YP. Effects of estradiol-17 beta and progesterone on isolated human omental artery from premenopausal nonpregnant women and from normotensive and preeclamptic pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174(1 Pt 1):246-53.

- 110.* Keung W, Chan ML, Ho EY, Vanhoutte PM, Man RY. Non-genomic activation of adenylyl cyclase and protein kinase G by 17beta-estradiol in vascular smooth muscle of the rat superior mesenteric artery. *Pharmacol Res.* 2011.
111. Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. 17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol.* 1994;266(4 Pt 1):C975-80.
112. Okabe K, Inoue Y, Soeda H. Estradiol inhibits Ca²⁺ and K⁺ channels in smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Eur J Pharmacol.* 1999;376(1-2):101-8.
113. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to 17beta-oestradiol in rat arteries. *Eur J Pharmacol.* 2003;476(1-2):139-49.
114. Han G, Yu X, Lu L, Li S, Ma H, Zhu S, et al. Estrogen receptor alpha mediates acute potassium channel stimulation in human coronary artery smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(3):1025-30.
115. Keung W, Vanhoutte PM, Man RY. Acute impairment of contractile responses by 17beta-estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.* 2005;144(1):71-9.
116. Teoh H, Man RY. Enhanced relaxation of porcine coronary arteries after acute exposure to a physiological level of 17beta-estradiol involves non-genomic mechanisms and the cyclic AMP cascade. *Br J Pharmacol.* 2000;129(8):1739-47.
117. Townsend EA, Sathish V, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS. Estrogen effects on human airway smooth muscle involve cAMP and protein kinase A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(10):L923-L8.
118. Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol.* 1997;499(Pt 2):497-511.
119. Piper LK, Stewart Z, Murphy HR. Gestational diabetes. *Obstet Gynaecol Reprod Med.* 2017;27(6):171-6.
120. Eades CE, Cameron DM, Evans JMM. Prevalence of gestational diabetes mellitus in Europe: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;129:173-81.
121. Lo JO, Mission JF, Caughey AB. Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013;25(2):124-32.
122. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA.* 2002;287(24):3183-6.
123. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
124. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Marques B, Verde I. Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reprod Sci.* 2009;16(12):1175-85.
125. Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EA, Saxena PR, Vulto AG, et al. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens.* 2006;24(7):1345-53.

126. Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Oğus E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci.* 2003;72(12):1321-9.
127. Hill BJF, Dalton RJ, Joseph BK, Thakali KM, Rusch NJ. 17 β -estradiol reduces Ca(v)1.2 channel abundance and attenuates Ca(2+)-dependent contractions in coronary arteries. *Pharmacol Res Perspect.* 2017;5(5):e00358.
128. Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M, et al. Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17 β -estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(5):433-41.
129. Jamali K, Naylor BR, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Effect of 17 β -estradiol on mRNA expression of large-conductance, voltage-dependent, and calcium-activated potassium channel α and β subunits in guinea pig. *Endocrine.* 2003;20(3):227-37.
130. Tsang SY, Yao X, Wong CM, Chan FL, Chen ZY, Huang Y. Differential regulation of K⁺ and Ca²⁺ channel gene expression by chronic treatment with estrogen and tamoxifen in rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2004;483(2-3):155-62.
131. Korovkina VP, Brainard AM, Ismail P, Schmidt TJ, England SK. Estradiol binding to maxi-K channels induces their down-regulation via proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 2004;279(2):1217-23.
132. Mulhern M, Docherty JR. Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. *B J Pharmacol.* 1989;97(4):1007-12.
133. Head RJ, Longhurst PA, Panek RL, Stitzel RE. A Contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *B J Pharmacol.* 1987;91(2):275-86.
134. Radenkovic M, Radunovic N, Momcilov P, Grbovic L. Altered response of human umbilical artery to 5-HT in gestational diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep.* 2009;61(3):520-8.
135. Fulton DR, Hodgson WC, Sikorski BW, King RG. Attenuated responses to endothelin-1, KCl and CaCl₂, but not noradrenaline, of aortae from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *B J Pharmacol.* 1991;104(4):928-32.
136. Mahmoudian M, Behnaz F, Rezaei E. Diabetes-induced changes in the contractility of the aorta and pA₂ of nifedipine in the rat. *Acta Diabetol.* 1996;33(2):114-7.
137. Al-Qahtani S, Heath A, Quenby S, Dawood F, Floyd R, Burdyga T, et al. Diabetes is associated with impairment of uterine contractility and high Caesarean section rate. *Diabetologia.* 2012;55(2):489-98.
138. Koskinen A, Lehtoranta L, Laiho A, Laine J, Kääpä P, Soukka H. Maternal diabetes induces changes in the umbilical cord gene expression. *Placenta.* 2015;36(7):767-74.
139. Boyle KE, Hwang H, Janssen RC, DeVente JM, Barbour LA, Hernandez TL, et al. Gestational Diabetes Is Characterized by Reduced Mitochondrial Protein Expression and Altered Calcium Signaling Proteins in Skeletal Muscle. *PLOS ONE.* 2014;9(9):e106872.

140. Ma Y, Qiao X, Falone AE, Reslan OM, Sheppard SJ, Khalil RA. Gender-Specific Reduction in Contraction is Associated with Increased Estrogen Receptor Expression in Single Vascular Smooth Muscle Cells of Female Rat. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(3):457-70.
141. Kleiblova P, Dostalova I, Bartlova M, Lacinova Z, Ticha I, Krejci V, et al. Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314(1):150-6.
142. Qi X, Gong B, Yu J, Shen L, Jin W, Wu Z, et al. Decreased cord blood estradiol levels in related to mothers with gestational diabetes. *Medicine*. 2017;96(21):e6962.
143. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB. The pancreatic β -cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;304(1):63-8.
144. Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12735-40.
145. Takeda K, Toda K, Saibara T, Nakagawa M, Saika K, Onishi T, et al. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol*. 2003;176(2):237-46.
146. Barros RPD, Morani A, Moriscot A, Machado UF. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;295(1):24-31.
147. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol*. 2009;587(21):5031-7.
148. Alonso A, Ordóñez P, Fernández R, Moreno M, Llana P, Patterson ÁM, et al. 17 β -Estradiol treatment is unable to reproduce p85 α redistribution associated with gestational insulin resistance in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;116(3):160-70.
149. Villarreal C, Salinas A, López P, Kohen P, Rencoret G, Devoto L, et al. Pregestational type 2 diabetes and gestational diabetes exhibit different sexual steroid profiles during pregnancy. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(3):212-7.
150. Shi Z, Zhao C, Guo X, Ding H, Cui Y, Shen R, et al. Differential Expression of MicroRNAs in Omental Adipose Tissue From Gestational Diabetes Mellitus Subjects Reveals miR-222 as a Regulator of ER α Expression in Estrogen-Induced Insulin Resistance. *Endocrinology*. 2014;155(5):1982-90.
151. Ngala RA, Fondjo LA, Gmagna P, Gharthey FN, Awe MA. Placental peptides metabolism and maternal factors as predictors of risk of gestational diabetes in pregnant women. A case-control study. *PLOS ONE*. 2017;12(7):e0181613.
152. Huzoor-Akbar, Chen NY, Douglas VF, Wallace D. Increased vascular contractile sensitivity to serotonin in SHR is linked with increased turnover of phosphoinositide. *Life Sci*. 1989;45:577-85.
153. Brosnihan KB, Li P, Figueroa JP, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen, nitric oxide, and hypertension differentially modulate agonist-induced contractile responses in female

- transgenic (mRen2)27 hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(5):H1995-H2001.
154. Cummings SA, Groszmann RJ, Kaumann AJ. Hypersensitivity of mesenteric veins to 5-hydroxytryptamine- and ketanserin-induced reduction of portal pressure in portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1986;89(3):501-13.
155. Banes AKL, Watts SW. Enhanced Contraction to 5-Hydroxytryptamine Is Not Due to "Unmasking" of 5-Hydroxytryptamine_{1B} Receptors in the Mesenteric Artery of the Deoxycorticosterone Acetate-Salt Rat. *Hypertension*. 2001;38(4):891-5.
156. Nishimura Y. Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating contractions in basilar arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1996;117(6):1325-33.
157. Yildiz O, Cicek S, Ay I, Demirkilic U, Tuncer M. Hypertension increases the contractions to sumatriptan in the human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg*. 1996;62(5):1392-5; discussion 6.
158. Wyse DG. Relationship of blood pressure to the responsiveness of an isolated human artery to selected agonists and to electrical stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984;6(6):1083-91.
159. Watts SW. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin Sci (Lond)*. 2005;108(5):399-412.
160. Banes AKL, Watts SW. Upregulation of Arterial Serotonin 1B and 2B Receptors in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension. *Hypertension*. 2002;39(2):394-8.
161. Kocic I, Szczepanska R, Wapniarska I. Estrogen-induced relaxation of the rat tail artery is attenuated in rats with pulmonary hypertension. *Pharmacol Rep*. 2010;62(1):95-9.