



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Efeito do cálcio e da via da Rho cinase (ROCK)
na contractilidade da artéria umbilical
humana (HUA)**

Maria Eduarda Candeias de Lemos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues

Co-Orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Covilhã, Setembro 2012

**A todos aquellos
que Amo.**

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues, por toda a disponibilidade, atenção e paciência que demonstrou durante todo este ano. Também quero agradecer o tempo que dedicou ao meu trabalho e um obrigado por todos os ensinamentos que me transmitiu, decerto serão bastante uteis no meu futuro. Quero também agradecer ao meu orientador, professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños, por ter acreditado nas minhas capacidades e por me transmitir novos conhecimentos. Quero por isso, mostrar a minha gratidão por me dar a oportunidade de pertencer ao grupo de cardiovascular.

A toda a equipa do Centro de Investigação, que se mostraram disponíveis por garantirem as condições necessárias para desenvolver o meu trabalho. Tal como para todos os restantes alunos do centro, que encheram os corredores de vida ao longo deste ano.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, ao Paulo, ao “Zé”, ao Chico, à Élinha, à Joca, e à Melzinha um forte agradecimento pelos dias de trabalho passados ao vosso lado, porque sem vocês seria sem dúvida uma luta brava com a maldita solidão, apesar da companhia das células! Um Beijinho com amizade a todos, com o desejo que a vida vos sorria.

Como os amigos são muito importantes ao longo do percurso chamado “vida”, o meu agradecimento forte e vindo do fundo do meu coração vai ser à minha melhor amiga, Sara. Foi ela que ao longo desta etapa, me ouviu, me aconselhou, me ajudou e me apoiou sem nunca dizer um “não”. Um muito obrigado AMIGA. Para os meus restantes amigos também quero agradecer todo o apoio e um beijinho carinhoso.

Ao Daniel, o homem que esteve sempre ao meu lado, ao longo destes 5 anos e que me viu evoluir. Um agradecimento especial pelo seu companheirismo e sobretudo pelo seu amor. Obrigado também aos seus pais e ao seu irmão, por todo o carinho que sempre mostraram ter por mim e por nunca faltarem com palavras de apoio. Um forte abraço!

Por último e com apreço especial, quero agradecer à minha família. Começo pelos meus pais, o meu irmão, e às minhas avós, que sem elas não seria possível concretizar esta longa caminhada. Também agradeço aos meus tios por também me aconselharem e acreditarem em mim, e às minhas riquezas lindas, as minhas primas Ana Margarida e Maria Joao. Um beijinho para todos.

Resumo

Os mecanismos que regulam a contractilidade das células do músculo liso da artéria umbilical humana são muito importantes para permitir a troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta. Uma vez que a artéria é desprovida de inervação, o controlo do tónus vascular é completamente dependente de alguns iões como o potássio e o cálcio, dos mediadores vasoativos libertados localmente e de substâncias transportadas pelo fluxo sanguíneo, como a histamina e serotonina (5-hidroxiptamina). Vários autores descrevem que o aumento da libertação destes mediadores, assim como a sensibilização da artéria umbilical humana (HUA) aos mesmos, pode levar ao aparecimento da pré-eclampsia. Por outro lado, uma correcta regulação do tónus do músculo liso vascular é fundamental na manutenção de funções biológicas e a desregulação pode resultar em diversas patologias. O mecanismo de contração do músculo liso é iniciado por ativação de um recetor ou de um canal iónico e envolve mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de cálcio (“sensibilização ao cálcio”). A via da Rho-cinase (ROCK) está intrinsicamente envolvida no processo de contração do músculo liso e tem sido envolvida em outros processos celulares. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que a ROCK está envolvida no processo de regulação da contractilidade da artéria umbilical na presença de cálcio. Assim, este projeto pretende determinar o papel desta cinase, assim como analisar a influência do cálcio extracelular nesta via, usando células do músculo liso (SMC) da HUA. Para além disso, pretende também estudar a possível relação entre a via do cGMP/PKG e a ROCK.

Foi utilizada a técnica PCSA (“planar cell surface área”). As SMC foram previamente marcadas com um fluoróforo (fluoresceína) e analisadas com recurso a um microscópio de fluorescência. Inicialmente analisou-se a contractilidade das SMC em meio com diferentes concentrações de cálcio extracelular e na ausência deste. As artérias foram previamente contraídas por 5-HT (1 μ M) e por histamina (10 μ M). Para testar o efeito da via da ROCK foi utilizado um inibidor da ROCK (Y27236) em presença de diferentes concentrações de cálcio extracelular. O possível envolvimento da PKG na via da ROCK foi analisado usando um dador de óxido nítrico (SNP 40 μ M).

Os resultados demonstraram que a diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM), as SMC pré-contraídas por 5-HT apresentaram contrações similares para as diferentes concentrações de cálcio. Pelo contrário, as SMC pré-contraídas pela histamina apresentaram contrações superiores na presença de 0,5 mM e 2 mM de cálcio extracelular. Em meio sem cálcio, a histamina induziu maior efeito contráctil que a 5-HT. Em relação ao papel da ROCK na contractilidade da HUA, verificamos que para ambos os agentes contracteis analisados, a inibição da ROCK não teve influência na contração das SMC. O SNP não alterou o efeito contráctil da 5-HT e da histamina independentemente da concentração de cálcio assim como na ausência deste. Nas células contraídas pela 5-HT a uma concentração de 1 mM de

cálcio extracelular, o inibidor da ROCK, modificou significativamente o efeito relaxante do SNP. No referente à histamina verificou-se que independentemente das concentrações de cálcio utilizadas, o Y27 não modificou o efeito da administração conjunta da histamina e SNP.

Em suma, os nossos resultados evidenciaram que a contractilidade da HUA é muito sensível a diferentes concentrações de cálcio extracelular, o que indica que este ião regula de uma forma dinâmica a contractilidade das SMC vasculares. Os nossos resultados também permitem concluir que a contractilidade da HUA não é regulada pela via da ROCK e que as alterações na concentração de cGMP não intervêm na inibição desta via.

Abstract

The mechanisms regulating the contractility of human umbilical artery (HUA) smooth muscle cells are very important to allow the gas and nutrients exchange between the fetus and placenta. Once the artery is devoid of innervation, control of vascular tone is completely dependent on some ions such as potassium and calcium, vasoactive mediators locally released and substances carried by blood flow, such as histamine and serotonin (5-hidroxiptamina). Several authors have described that the increase in the release of these mediators, as well as sensitization of HUA to these mediators can lead to the onset of pre-eclampsia. Moreover, a good regulation of vascular smooth muscle tonus is crucial for maintaining the biological functions and a misregulation can lead to different pathologies. The smooth muscle contraction can be initiated by the activation of a receptor or an ion channel and can involve calcium-dependent and calcium-independent mechanisms ("calcium sensitization"). The Rho-kinase (ROCK) pathway is involved in the process of smooth muscle contraction and has been involved in the regulation of other cellular processes. Previous studies from our group have shown that ROCK is associated with the regulation of HUA contractility in the presence of calcium. Thus, this project aims to determine the role of this kinase, as well as to analyze the influence of extracellular calcium using HUA smooth muscle cells (SMC). Additionally, we intend to study the possible link between the cGMP / PKG pathway and ROCK.

We use the PCSA ("planar cell surface area") technique. The SMC were previously labeled with a fluorophore (fluorescein) and analyzed using a fluorescence microscope. Experiments were initiated by analyzing the contractility of SMC in medium with different extracellular calcium concentrations and in absence of calcium. In this condition, the arteries were previously contracted by 5-HT (1 mM) and histamine (10 mM). To test the effect of ROCK pathway a ROCK inhibitor (Y27236) was added in presence of different concentrations of extracellular calcium. The possible involvement of PKG in the ROCK pathway was analyzed by using a nitric oxide donor (SNP 40 mM).

The results showed that at different calcium concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 and 3 mM), the SMC pre-contracted by 5-HT exhibited similar contractions. Differently the SMC pre-contracted by histamine were bigger at 0.5 mM and 3 mM of extracellular calcium. In calcium-free medium, histamine induced greater contractile effect than 5-HT. Regarding the role of ROCK in the HUA contractility, we show that for both contractile agents, the ROCK inhibition did not influence the contractile effect. The SNP did not alter the contractile effect of 5-HT or histamine independently of the calcium concentrations as well as in absence of calcium. In smooth muscle cells contracted by 5-HT at a concentration of 1 mM extracellular calcium, the inhibitor of ROCK modified significantly the effect of SNP. Concerning histamine, independently on the calcium concentration used, Y27 did not change the effect of the joint administration of histamine and SNP.

In summary, our results showed that the HUA contractility is very sensitive to different concentrations of extracellular calcium, indicating that this ion dynamically regulates the contractility of vascular SMC. Our results also indicate that the HUA contractility is not regulated by the ROCK pathway and that changes in the concentration of cGMP are not involved in the inhibition of this pathway.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de acrónimos	xv
Capítulo I - Introdução	1
1.1. O músculo liso vascular	1
1.1.1. Estrutura do músculo liso vascular	2
1.1.2. Proteínas participantes no processo contráctil	3
1.1.3. Canais de cálcio.....	7
1.1.4. Canais de potássio.....	11
1.2. Contração do músculo liso vascular	13
1.2.1. Ciclo das “pontes cruzadas”	13
1.2.2. Contração dependente de cálcio	15
1.2.3. Regulação do potencial de membrana	16
1.2.4. Contração independente de cálcio	18
1.3. Relaxação do músculo liso vascular.....	24
1.3.1. Nucleótidos cíclicos	25
1.3.2. Fosfodiesterases (PDEs)	28
1.4. Artéria umbilical humana (HUA)	30
1.4.1. Generalidades.....	30
1.4.2. Mecanismo de regulação da HUA	33
1.5. Hipertensão gestacional e pré-eclampsia	37
A-Pré-eclampsia.....	37
B-Hipertensão na gravidez	38

Capítulo II- Materiais e métodos.....	39
Secção I - Soluções e Materiais.....	39
Subsecção I- Soluções.....	39
Subsecção II- Químicos	40
Subsecção III- Material.....	40
Secção II - Métodos.....	41
Subsecção I- Preparação do tecido	41
Subsecção II- Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana	41
Subsecção III- PCSA (Planar Cell Surface Area).....	42
Subsecção IV- Análise estatística	43
Capítulo III - Objetivos	45
Capítulo IV- Resultados	47
1-Efeito dos agonistas, 5-HT e histamina em meio com e sem cálcio.....	47
2-Efeito da inibição da Rho cinase nas contrações induzidas por 5-HT e histamina nas SMC vasculares da HUA	48
3-Efeito do vasodilatador do dador de óxido nítrico (SNP) nas contrações induzidas por 5-HT e histamina nas SMC vasculares da HUA	50
4-Efeito do SNP e do inibidor Y27 nas contrações induzidas por 5-HT e histamina nas SMC vasculares da HUA	52
Capítulo V- Discussão.....	55
Capítulo VI- Conclusão	61

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Características estruturais das SMC contracteis e sintéticas.	2
Figura 2: Estrutura física do músculo liso.	3
Figura 3: Disposição da tropomiosina ao longo do filamento fino.	4
Figura 4: Representação esquemática da molécula da miosina II.	6
Figura 5: Mecanismo de ativação da MLCK pelo Ca^{2+} .	7
Figura 6: Representação esquemática da árvore filogenética dos canais de cálcio dependentes de voltagem.	10
Figura 7: Mecanismos propostos que mostram o papel da atividade do canal de potássio e vasoconstricção.	14
Figura 8: Vias que levam à interação actina-miosina, a partir do aumento do cálcio citosólico.	16
Figura 9: Contração do músculo liso sensível ao cálcio induzido por agonistas	17
Figura 10: Tônus vascular e canais de cloro.	19
Figura 11: Esquema da regulação da pequena GTPase RhoA.	21
Figura 12: Mecanismos hipotéticos do papel do cGMP (PKG) e da ROCK na preservação da relaxação induzida pelo cGMP em veias pulmonares após hipoxia crônica.	23
Figura 13: Módulo do núcleo da via MAPK composta por três cinases que são sequencialmente ativadas por fosforilação entre si.	24
Figura 14: Esquema representativo dos vários mecanismos que provocam diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular nas SMC vasculares.	25
Figura 15: As proteínas do recetor intracelular de cGMP.	27
Figura 16: Representação esquemática do cordão umbilical apresentando duas artérias e uma veia umbilical.	33
Figura 17: Células do músculo liso vascular da artéria umbilical humana. (A): crescimento após 10 dias; (B): crescimento após 17 dias.	35
Figura 18: Representação esquemática dos dois passos catalisados pela sintetase do óxido nítrico.	38
Figura 19: Microscópio invertido de fluorescência de marca Zeiss Axio Observer Z1.	47
Figura 20: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μ M) e 5-HT (1 μ M) em meio com cálcio.	51
Figura 21: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μ M) e 5-HT (1 μ M) em meio sem cálcio.	52
Figura 22: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela 5-HT (1 μ M) em presença e ausência de inibidor da Rho cinase (Y27) e em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 1 e 3 mM).	53
Figura 23: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μ M) em presença e ausência de inibidor da Rho cinase (Y27) e em soluções com diferentes concentrações de cálcio.	54
Figura 24: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela 5-HT (1 μ M) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e em soluções com diferentes concentrações de cálcio.	55

Figura 25: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μM) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e em soluções com diferentes concentrações de cálcio.	56
Figura 26: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela 5-HT (1 μM) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e do inibidor Y27 em soluções com diferentes concentrações de cálcio.	57
Figura 27: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μM) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e do inibidor Y27 em soluções com diferentes concentrações de cálcio.	58

Lista de acrónimos

AA	Ácido araquidónico (Arachidonic Acid)
AC	Adenilato ciclase (Adenylcyclase or Adenyl cyclase or Adenylate cyclase)
ADP	Difosfato de adenosina ou Adenosina difosfato (Adenosine Diphosphate)
AMP	Monofosfato de adenosina ou Adenosina monofosfato (Adenosine monophosphate)
ATP	Trifosfato de adenosina ou Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)
BKCa	Canal de potássio dependente de cálcio de elevada condutância (Large conductance calcium-activated potassium channel)
$(Ca^{2+})_4/CaM$	Complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -calmodulin complex)
$[Ca^{2+}]_c$	Concentração citosólica de cálcio (Cytosolic calcium concentration)
$[Ca^{2+}]_e$	Concentração extracelular de cálcio (Extracellular calcium concentration)
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração intracelular de cálcio (Intracellular calcium concentration)
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina ou Adenosina monofosfato cíclico (Cyclic Adenosine monophosphate)
CaM	Calmodulina (Calmodulin)
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina ou Guanosina monofosfato cíclico (Cyclic Guanosine monophosphate)
5'AMP	Monofosfato de adenosina ou Adenosina monofosfato (Adenosine monophosphate)
5'GMP	Monofosfato de guanosina ou Guanosina monofosfato (Guanosine monophosphate)
Clca	Canal de cloro dependente de cálcio (calcium-activated chloride calcium)
DAG	Diacilglicerol (Diacylglycerol)
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares (Extracellular signal-regulated Kinases)
GC	Guanilato ciclase (Guanylcyclase or Guanylate cyclase)
GDP	Difosfato de guanosina ou Guanosina difosfato (Guanosine diphosphate)
GPCR	Receptores associados às proteínas-G heterotriméricas (G protein-coupled receptors)
GTP	Trifosfato de guanosina ou Guanosina trifosfato (Guanosine triphosphate)
HUASMC	Células Musculares Lisas da Artéria Umbilical Humana (Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells)
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de Inositol (Inositol-1,4,5-Triphosphate)
IP ₃ R	Receptor do IP ₃ (Inositol-1,4,5-Triphosphate Receptor)
Canais de K ⁺	Canais de potássio (Potassium channels)
K _{ATP}	Canais de K ⁺ Sensíveis a ATP (ATP -Sensitive Potassium Channels)
K _{Ca}	Canais de K ⁺ Activados por Ca ²⁺ (Calcium-Activated Potassium channels)
K _{IR}	Canais de K ⁺ rectificadores internos (Inwardly Rectifying Potassium Channels)
K _V	Canais de K ⁺ Operados por Voltagem (Voltage-Gated Potassium Channels)
LTCC	Canal de cálcio dependente da voltagem do tipo-L (L Type calcium channel)

MAPK	Proteína Cinase Activada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MAPKK	Cinase activadora da MAPK (Mitogen-activated protein Kinase Kinase)
MAPKKK	Cinase activadora da MAPKK (Mitogen-activated protein kinase kinase)
MLC₁₇	Cadeias Leves Essenciais da Miosina (Myosin Essential Light Chains)
MLC₂₀	Cadeias Leves Reguladoras da Miosina (Myosin Regulatory Light Chains)
MLCK	Proteína Cinase das Cadeias Leves da Miosina (Myosin-Light-Chain Kinase)
MLCP	Proteína Fosfatase das Cadeias Leves da Miosina (Myosin-Light-Chain Phosphatase)
MYPT₁	Fosfatase da Miosina-1 (Myosin Phosphatase Target Protein-1)
NCX	Permutador Na ⁺ /Ca ²⁺ (Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger)
NO	Óxido Nítrico (Nitric Oxide)
NOS	Sintetase do Óxido Nítrico (Nitric Oxide Synthase)
NP	Péptidos Natriuréticos (Natriuretic Peptide)
PDE	Fosfodiesterases (Phosphodiesterases)
pGC	Guanilato Ciclase Membranar (Particulate Guanylyl Cyclase)
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α} (Prostaglandin F _{2α})
PIP₂	Fosfatidil Inositol 4,5-Bifosfato (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate)
PKA	Proteína Cinase A (Protein Kinase A or Cyclic AMP-dependent Protein Kinase)
PKC	Proteína Cinase C (Protein Kinase C)
PKG	Proteína Cinase G (protein Kinase G or Cyclic GMP-dependent Protein Kinase)
PLC	Fosfolipase C (Phospholipase C)
PMCA	Ca ²⁺ ATPase da Membrana Plasmática (Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPases)
ROC	Canais Operados por Receptores (Receptor-Operated Channels)
ROCK	Proteína cinase dependente da Rho-A (Rho-activated Kinase)
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmática (Sarco/endoplasmatic reticulum Ca ²⁺ -activated ATPase)
sGC	Guanilato ciclase solúvel (Soluble guanylyl cyclase)
SOC	Canal activado pela depleção sarcoplasmática de cálcio (Store-operated channels)
TRP	Canal catiónico independente da voltagem (Transient receptor potential)
TTCC	Canal de cálcio dependente da voltagem tipo-T (T-type calcium channel)
VDCC	Canal de cálcio dependente da voltagem (Voltage-dependent calcium channel)

Capítulo I - Introdução

Um certo número de sinais extracelulares, incluindo as forças neuronais, humorais e mecânicas induzem contração ou relaxamento do músculo liso vascular. O equilíbrio entre a contração e os sinais de relaxamento determina o tónus deste músculo, o que por sua vez regula o fluxo sanguíneo e pressão sanguínea. Embora a maioria das investigações em curso centrem-se sobretudo nos eventos de sinalização que estão subjacentes à iniciação da contração do músculo liso, ainda existem muitas controvérsias [1]. Neste capítulo vamos caracterizar diferentes constituintes das células responsáveis pelo mecanismo de contractilidade, as células do músculo liso (SMC; “smooth muscle cells”).

1.1. O músculo liso vascular

O músculo liso vascular é um tecido heterogéneo, formado por células fusiformes. As principais funções deste tecido são a contração e regulação do tónus vascular, fluxo sanguíneo e pressão sanguínea. As células responsáveis pela atividade contráctil são as SMC como já foi referido. Na maior parte das vezes é possível distinguir as SMC dos diferentes órgãos segundo características, como dimensões físicas, organização, funções e regulação da sua atividade fisiológica [2].

O tecido muscular liso vascular pode estar presente em diferentes estruturas do corpo humano, disposto em camadas circulares e/ou longitudinais. Na maioria dos vasos sanguíneos, o músculo liso está disposto em camadas circulares. Em vários órgãos como: trato digestivo tubular, ureteres, ductos deferentes, trompas uterinas e intestinos, as camadas presentes são de ambos os tipos, circulares e longitudinais [3].

Nas artérias, as SMC, são altamente especializadas e através da contração e relaxação, alteram o diâmetro luminal dos vasos sanguíneos regulando a pressão arterial. Para além disso, exibem uma baixa taxa de proliferação e atividade sintética, expressando um repertório de proteínas contrácteis, canais iónicos e moléculas sinalizadoras necessárias à função contráctil da célula [4, 5]. Contudo, as SMC podem realizar outras funções, as quais podem ser muito importantes na remodelação de vasos em condições fisiológicas, tal como na gravidez e exercício físico intenso. Nestas situações, as SMC vasculares dos vasos embrionários produzem maiores níveis de fatores de crescimento e são mais sensíveis à estimulação por estes fatores, do que as SMC vasculares dos vasos sanguíneos maduros [6].

Um dos maiores problemas na realização de culturas primárias de SMC vasculares é que estas células podem-se diferenciar em fenotípico sintético, o que representa o espectro oposto das SMC vasculares contrácteis que são responsáveis pelo tónus dos vasos sanguíneos. Isto significa, que no geral, as SMC vasculares em cultura podem apresentar múltiplos fenótipos,

desde o contráctil até ao sintético, contudo Cairrão et al (2009) demonstrou que após 24 horas em meio sem soro, estas células apresentam principalmente o fenótipo contráctil [7]. As células com fenótipo contráctil são alongadas, fusiformes, enquanto as SMC sintéticas são menos alongadas e têm uma morfologia de paralelepípedos que é referido como epitelioides ou romboide, com uma morfologia semelhante à das células endoteliais, como mostra a figura 1. As SMC sintéticas contêm um elevado número de organelos envolvidos na síntese de proteínas, estes são em grande parte substituídos por filamentos contrácteis em SMC contrácteis. As características proliferativas e migratórias são diferentes entre ambos os tipos de SMC, apresentando as sintéticas maiores taxas de crescimento e atividade migratória [8].

O uso destas células é essencial para o estudo de vários processos de sinalização implicados no controlo do metabolismo do cálcio e na modulação da reatividade vascular [9].

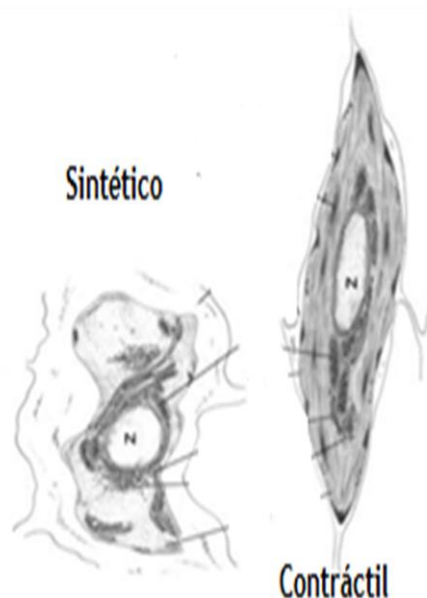


Figura 1: Características estruturais das SMCs contracteis e sintéticas. Adaptado de [5].

1.1.1. Estrutura do músculo liso vascular

O tecido muscular liso é formado por várias células alongadas e mononucleadas, também denominadas por fibras musculares. Cada fibra do músculo liso é uma célula fusiforme com um diâmetro que varia entre 2 a 10 μm , o seu núcleo está localizado no centro da célula e as regiões periféricas e distais estão ocupadas por filamentos contrácteis. Cada fibra tem a capacidade de se dividir durante toda a vida do indivíduo. Podem observar-se no citoplasma destas fibras três tipos de filamentos: delgados, grossos e intermédios. As proteínas participantes no mecanismo contráctil encontram-se agrupadas apenas nos filamentos delgados e nos filamentos grossos (figura 2).

O filamento grosso contém miosina e o filamento delgado contém actina. Estes filamentos não são organizados em miofibrilas, como no músculo esquelético, e não há regularidade do alinhamento desses filamentos em sarcômeros. A contração deste músculo é realizada pelo deslizamento dos dois filamentos [10]. Contudo, segundo alguns autores o músculo liso vascular apresenta ainda um sistema de filamentos intermediário compostos predominantemente por vimentina, que é consideravelmente mais desenvolvido do que no músculo esquelético [11, 12]. As proteínas de miosina dos filamentos grossos são empilhadas verticalmente de modo a que o seu eixo longo, seja perpendicular ao eixo longo do filamento grosso. Desta forma, as cabeças de miosina podem formar “pontes cruzadas” com a actina ao longo do comprimento dos filamentos grossos [3].

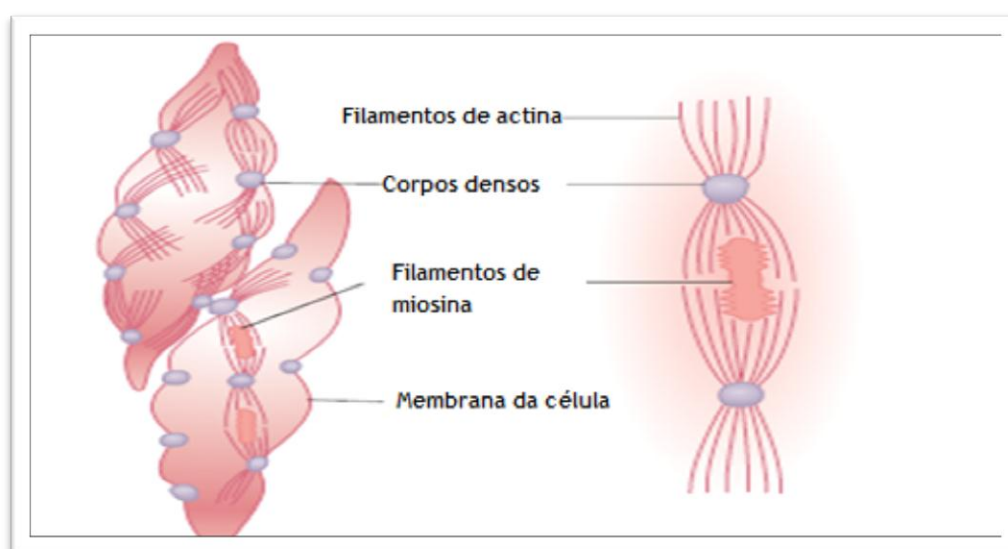


Figura 2: Estrutura física do músculo liso. A fibra superior esquerda mostra filamentos de actina irradiando corpos densos. A fibra superior esquerda e o diagrama da direita demonstram a relação da miosina com os filamentos de actina. Adaptado de [10].

1.1.2. Proteínas participantes no processo contráctil

O conhecimento detalhado da estrutura e função das proteínas contrácteis, combinado com estudos de cinética ultraestruturais, bioquímicos e fisiológicos, conduziu ao estabelecimento de hipóteses sobre como o processo de contractilidade do músculo liso vascular é regulado. As proteínas que participam neste mecanismo encontram-se agrupadas nos filamentos delgados e nos filamentos grossos, como já foi referido.

Proteínas associadas aos filamentos delgados

Os filamentos delgados são compostos principalmente de actina disposta em dupla hélice de forma semelhante à organização estrutural dos filamentos finos do músculo esquelético. O

comprimento deste filamento *in vivo* é aproximadamente de 1,38 μm e apresenta um diâmetro entre 6-8 nm [13].

Segundo Hodgkinson (2000), as proteínas ligadas à actina possuem um papel extremamente importante, quer na variedade de funções celulares, quer na arquitetura e estabilidade de estruturas baseadas na actina. Também é conhecido o seu papel na regulação da contração e em outros eventos celulares [14]. Existem associadas à actina, três proteínas que pertencem também ao filamento delgado: a tropomiosina, a caldesmona e a calponina.



Figura 3: Disposição da tropomiosina ao longo do filamento fino. Adaptado de [13].

A actina ou F-actina é uma proteína *scaffold*, com uma massa molecular de 42 kDa (374 ou 375 aminoácidos). Nas SMC uma extremidade do filamento de actina está ligado a estruturas amorfas denominadas por corpos densos, que estão livres no citosol ou então associados à membrana plasmática. Esta associação fornece a ancoragem final da rede contrátil [13]. A actina possui três propriedades particularmente importantes: (1) tem a capacidade de polimerizar para formar filamentos longos (polimerização da sua forma monomérica denominada por “actina-G”, originando macromoléculas filamentosas conhecidas por actina-F); [14] (2) capacidade de ligar a miosina e ativar a sua atividade de MgATPase; (3) capacidade de se ligar à tropomiosina e proteínas reguladoras [13].

A tropomiosina é uma proteína longa e fina, constituída por duas cadeias polipeptídicas enroladas em forma de hélice, envolvida na regulação da interação actina-miosina (figura 3). A Tm do músculo liso (SmTm) possui predominantemente uma estrutura α -helical *coiled-coil* e existe como um dímero com um comprimento de 42 nm e um diâmetro de 2 nm [15]. Contudo, a função fisiológica da tropomiosina nas SMC ainda é pouco conhecida. Devido à associação da tropomiosina com a actina, foi sugerido que esta proteína está envolvida na estabilização dos filamentos de actina, modelação do citoesqueleto e motilidade celular [16].

A caldesmona apresenta locais de ligação à actina, tropomiosina, miosina e calmodulina e encontra-se localizada nos filamentos delgados, pertencendo ao aparelho contrátil das SMC [17, 18]. Evidências sugerem assim, que esta proteína está envolvida na contração do músculo liso, atuando como uma proteína reguladora. A caldesmona do músculo liso vascular, é uma molécula longa flexível de 793 aminoácidos, com um comprimento de 75 nm [19]. O C-terminal desta proteína, no domínio 4, é responsável pelas propriedades inibitórias da ATPase e contém sequências de ligação à actina.

A calponina é uma proteína (34 KDa) com 297 aminoácidos que interage com a F-actina, tropomiosina e calmodulina. No músculo liso, a Cap está presente na mesma concentração que a tropomiosina, contudo o seu papel na contractilidade ainda é controverso. Porém, já foram propostos dois mecanismos possíveis para a calponina: (1) Inibe diretamente a atividade Mg-ATPase da miosina; (2) Facilita a indução do sinal de transdução do agonista [20].

Proteínas associadas ao filamento grosso

Os filamentos grossos possuem 15-18 nm de diâmetro e são compostos por miosina, mais precisamente por miosina tipo II [21]. A miosina II é um dos principais componentes do aparelho contráctil das células musculares e existe em múltiplas formas. É uma proteína formada por seis cadeias polipeptídicas: um dímero de cadeias pesadas (cada subunidade com aproximadamente 200 KDa) e 2 pares de cadeias leves desiguais de miosina. Cada par das cadeias leves é constituído por uma cadeia reguladora e uma essencial. As cadeias “reguladoras” possuem 20 KDa (MLC_{20}) e as cadeias “essenciais” possuem 17 KDa (MLC_{17}). A cabeça da miosina possui dois domínios distintos: o domínio motor que contém um local catalítico MgATPase e um local de ligação à actina; e um domínio regulador que contém uma cadeia leve e uma cadeia pesada α -helical (figura 4) [13].

No músculo liso, a miosina e os filamentos de actina formam matrizes que se sobrepõem. Contudo, em comparação com o músculo esquelético, esta organização é menos ordenada e mais estável. As cabeças de miosina, que ficam na superfície dos filamentos, realizam a contração cíclica pela interação com a subunidade de actina dos filamentos finos. Estas regiões da cabeça contêm sítios distintos para a ligação à actina, a hidrólise de ATP e a associação da subunidade da cadeia leve. O “ciclo de pontes cruzadas” faz com que os filamentos grossos e finos deslizem uns sobre os outros, produzindo movimento. Deste modo, a presença da miosina é fundamental na contração muscular e motilidade celular [22, 23].

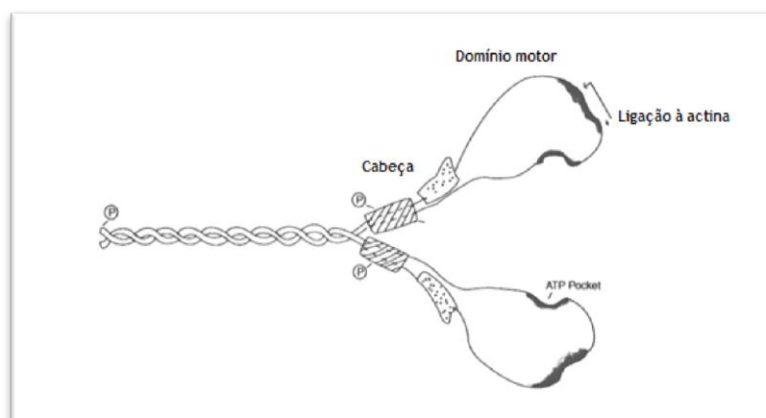


Figura 4: Representação esquemática da molécula da miosina II. As duas cabeças globulares (subfragmento S-1) ligam-se a uma longa cauda, resultante da dimerização e enrolamento de duas hélices α . (ATP Pocket- local de ligação ao ATP) Adaptada de [24].

Proteínas reguladoras presentes no músculo liso

Como já foi referido anteriormente, estão presentes várias proteínas reguladoras associadas aos filamentos finos e grossos, como a cinase da cadeia leve de miosina (MCLK), calmodulina (CaM), fosfatase da cadeia leve de miosina (MCLP), caldesmona e calponina, que realizam diversas funções fundamentais nos processos de contractilidade do músculo liso.

Calmodulina (CaM)

A CaM é uma proteína pequena de ligação ao cálcio, altamente conservada com aproximadamente 148 aminoácidos de comprimento e presente em todas as células eucarióticas [25]. Regula uma ampla variedade de atividades enzimáticas e processos fisiológicos. Atualmente são conhecidas 80 proteínas alvo da CaM. Um destes alvos é a enzima MLCK do músculo liso que se liga à CaM, numa ligação dependente de cálcio [26]. Determinados estímulos externos, como hormonas e neurotransmissores promovem a que proteínas regulatórias respondam a aumentos dos níveis de cálcio. A CaM possui uma estrutura tridimensional em forma de haltere, constituída por três domínios: os domínios globulares amino e carboxil terminais e um domínio bastante flexível que une os dois domínios globulares [27, 28]. Como resultado do aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) por um estímulo extracelular, o Ca^{2+} liga-se aos dois N-terminais da CaM desencadeando uma alteração da conformação da MLCK, resultando na ativação desta [29].

Cinase da cadeia leve de miosina (MLCK)

A MLCK catalisa a transferência do grupo fosforilo do $MgATP^{2+}$ para a serina 19, em cada uma, das duas cadeias de 20 KDa da cadeia leve de miosina [26]. As sequências de aminoácidos das MLCK do músculo liso são altamente conservadas. Esta cinase contém um local de ligação no N-terminal para a actina, que serve para ancorar a cinase ao filamento fino. Deste modo, a MLCK aproxima-se do seu substrato, a miosina. A ativação da cinase ocorre após ligação do Ca^{2+} aos locais N-terminal da CaM, causando uma alteração conformacional que remove o domínio autoinibitório do sítio ativo, permitindo assim o acesso à miosina (figura 5). Esta cinase apresenta um elevado grau de especificidade ao substrato, fosforilando apenas a miosina e os seus fragmentos proteolíticos ou isolados [13].

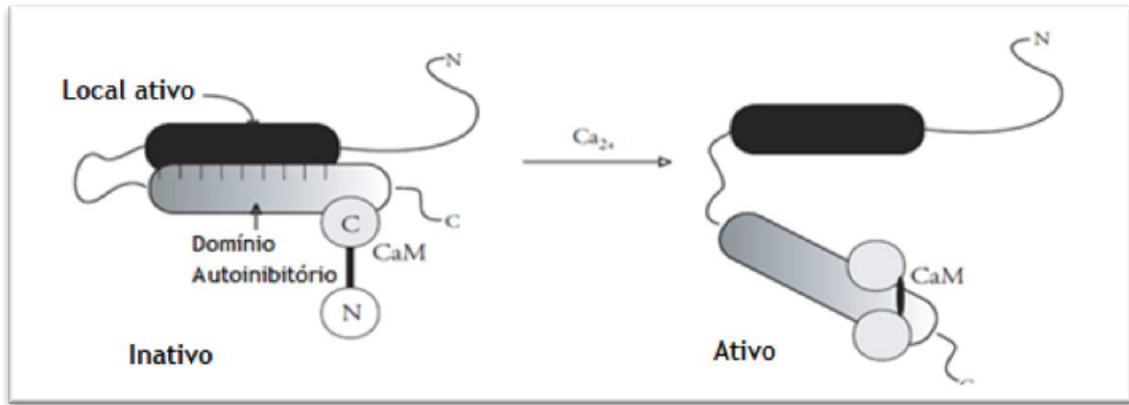


Figura 5: Mecanismo de ativação da MLCK pelo Ca^{2+} (Cam- calmodulina) Adaptado de [13].

Fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP)

A suposição de que a fosforilação da miosina possui um papel central na regulação do músculo liso vascular, conduziu ao isolamento e caracterização da MLCP. A MLCP é um heterodímero composto por três subunidades: uma catalítica (38 kDa), a isoforma da proteína fosfatase-1 (PP1); uma reguladora, a fosfatase da miosina-1 (MYPT1) com 110-133 kDa e uma pequena subunidade, cuja verdadeira função se desconhece, a M20 (20 kDa) [30, 31]. A região N-terminal da subunidade 130 kDa MYPT liga-se à subunidade PP1c, enquanto que a região C-terminal liga-se à subunidade de 20 kDa [30, 32]. Estas interações de subunidades ajudam a formar a holoenzima heterotrimérica da MLCP. A subunidade MYPT também se liga à miosina e tem como função ancorar a fosfatase aos filamentos grossos para promover a ligação à actina [32, 33]. Existem várias isoformas da MYPT, contudo a MYPT1 é a isoforma expressa no músculo liso vascular [34]. Para além, dos filamentos de miosina serem um alvo da MLCP, a MYPT1 é também conhecida por aumentar a especificidade do substrato da MLCP para a miosina e também por regular a atividade enzimática da MLCP [30, 35].

1.1.3. Canais de cálcio

A concentração de cálcio no interior das células musculares lisas é regulada pela interação de vários processos de compensação, que pode ser dividido em mecanismos “on” e “off”, dependendo se eles servem para aumentar ou diminuir a $[\text{Ca}^{2+}]_c$, respetivamente. Os mecanismos “on” incluem canais localizados na membrana plasmática, que regulam o fornecimento de Ca^{2+} citosólico a partir do espaço extracelular e que podem ser dependentes ou independentes de voltagem. O mecanismo “off” é empregue pelas células para remover o cálcio a partir do citoplasma. A remoção deste ião do citoplasma para os depósitos intracelulares é realizada através da Ca^{2+} ATPase do retículo sarco-endoplasmático (SERCA), e/ou para o meio extracelular, através ATPase do Ca^{2+} da membrana plasmática (PMCA) e do permutador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) [36, 37].

Canais de cálcio dependentes de voltagem

A existência dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC; “voltage operated calcium channels”) foi primeiramente relatada por Hagiwara et al. em 1975 [38]. Os VOCC medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares, tais como contração, secreção, neurotransmissão, e expressão de genes, em diversos tipos de células [39].

Dois tipos de canais ativados por voltagem foram identificados no músculo liso vascular e cardíaco. Estes canais foram classificados de acordo com o potencial de membrana, sendo definidos dois grupos: canais de cálcio dependentes de alta voltagem ou de “elevado limiar” (HVA-High Voltage Activated) e os ativados por baixa voltagem ou canais de “baixo limiar” (LVA- Low Voltage Activated). A ativação dos canais HVA ocorre entre -40 mv a -10 mv, enquanto que a ativação dos canais LVA ocorre em potenciais de membrana baixos, a -60 mv a -70 mv. Os canais de Ca^{2+} HVA são divididos em tipo-L, tipo-N, tipo P/Q e canais tipo-R, enquanto que os canais LVA são apenas do tipo-T. Os canais tipo-R são ocasionalmente classificados como canais ativados por uma tensão intermédia [40].

Do ponto de vista molecular, os VOCC são proteínas complexas compostas por quatro subunidades distintas que são codificadas por múltiplos genes. Esta estrutura complexa é formada por uma grande subunidade $\alpha 1$ com 190 a 250 kDa, que está organizada em quatro domínios homólogos (I-IV), com seis segmentos transmembranares (S1-S6) em cada um dos domínios. O *loop* entre os segmentos S5 e S6 em cada domínio, determina a condutância de iões e a sua seletividade. Para além desta grande subunidade, existem ainda as subunidades auxiliares, a subunidade β (53-71 kDa) e $\alpha 2/\delta$ (170 kDa) [41].

Em 2000, foi adotada uma nomenclatura baseada na dos canais de potássio que já estava bem definida [42]. Os canais de cálcio foram nomeados, usando o símbolo químico do ião cálcio (Ca), como o principal regulador fisiológico (voltagem) indicada como um subscrito (Cav). De acordo com esta nomenclatura, a subfamília Cav1 (Cav1.1-Cav 1.4) inclui canais que contém a subunidade $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ e $\alpha 1F$, os canais medeiam as correntes de cálcio tipo-L. A subfamília Cav2 (Cav2.1-Cav2.3) inclui canais contendo as subunidades $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ e $\alpha 1E$, as quais medeiam correntes de cálcio dos canais do tipo-P/Q, tipo-N e tipo-R, respetivamente. A subfamília Cav3 (Cav3.1-Cav3.3) incluem canais que contém subunidade $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ e $\alpha 1I$, as quais medeiam correntes de cálcio tipo-T [41, 43]. A subunidade $\alpha 1C$ (Cav1.2) é a que se encontra expressa nas células do músculo liso e cardíaco. A figura 6 esquematiza as duas classes distintas dos canais de cálcio dependentes da voltagem [44]. Segundo Cairrão et al, os canais dependentes da voltagem do tipo-L (LTCC) e do tipo T (TTCC) têm expressão funcional nas células do músculo liso da artéria umbilical [7].

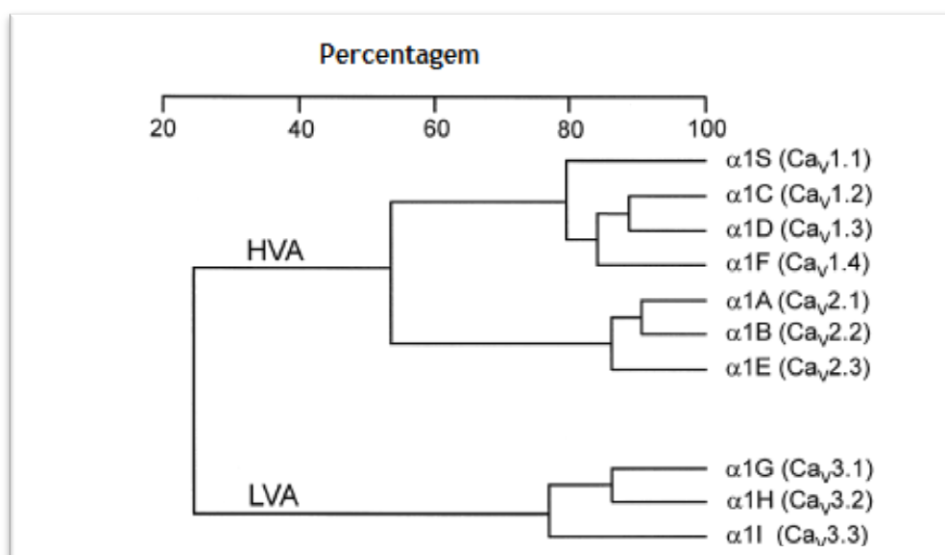


Figura 6: Representação esquemática da árvore filogenética dos canais de cálcio dependentes de voltagem. In [44].

Canais de cálcio do tipo-L (LTCC)

Os canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo-L (LTCC; “L type calcium channels”) são um alvo terapêutico, para uma classe importante de anti-hipertensivos, os bloqueadores de canais de cálcio [45]. Este canal tem sido considerado o principal responsável do aporte de cálcio necessário para a contractilidade vascular. A sua atividade também tem sido associada à hipertensão e a doenças cardiovasculares [46].

No coração e no músculo liso vascular o LTCC é o que fornece o cálcio necessário para a contração. Este tipo de canais requerem uma despolarização forte para a sua ativação e são denominados de longa duração (L=“long-lasting”), uma vez que o seu tempo de abertura é mais prolongado. Outra característica muito importante destes canais é o facto de existirem bloqueadores específicos, que incluem dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas. Em condições fisiológicas, o limiar do potencial de membrana para a ativação deste canal está acima dos -40 mv, com um pico máximo que ronda os 10 mv. A sua condutância unitária é de 25 pS a 30 pS [43, 47].

Canais de cálcio do tipo-T (TTCC)

Os canais de cálcio tipo-T (TTCC, “T-type Calcium Channels) estão presentes nas SMC. Vários estudos mostram que este canal é codificado por genes relacionados, o Cav 1.3, Cav 3.2 e Cav 3.3. Verificou-se ainda que este canal é ativado e inativado em potenciais de membrana baixos. A corrente de cálcio dos TTCC é ativada aproximadamente aos -50 mv e atinge o valor máximo entre -40 mv e -10 mv. A sua condutância, em comparação com os LTCC, é menor [41, 43]. O papel dos TTCC permanece controverso, principalmente porque as correntes que passam

através destes canais são pequenas e transitórias, e os seus perfis de ativação e inativação estão fora dos potenciais normalmente experimentados em vasos fisiologicamente ativos [46].

Canais de cálcio independentes de voltagem

A entrada de cálcio desencadeada pela perda de Ca^{2+} através do retículo endoplasmático nas células do músculo liso, foi descrita por Casteels and Droogmans, há 25 anos atrás [48]. Estudos subsequentes têm mostrado que este é um processo ubíquo, ocorrendo em todas as células eucariotas, a partir de leveduras, até ao ser humano.

Podem existir distintos tipos de canais de cálcio independentes de voltagem: (1) canais de cálcio operados por recetores (ROCC; “Receptor Operated Calcium Channels”) que são ativados pela ligação direta de neurotransmissores ou hormonas, (2) canais de cálcio operados por depósitos intracelulares (SOCC; “Store Operated Calcium Channels) que são ativados pela libertação de Ca^{2+} dos depósitos intracelulares, e (3) canais de cálcio ativados pelo *stress* físico (SACC; “Stress Activated Calcium Channels”) que são ativados por *stress* físico ou por estiramento da membrana. Nos últimos anos, adquiriu consistência a ideia de que as proteínas que codificam os ROCC, SOCC e SACC pertencem à família das proteínas TRP (“transient receptor potential”) [49-51]. Os canais TRP pertencem a uma superfamília de canais catiónicos, que incluem pelo menos 29 genes individuais, divididas em 6 subfamílias com base na sua sequência homóloga. Estes canais são estruturas polipeptídicas formadas por quatro grupos de seis segmentos transmembranários (S1-S6). O poro do canal situa-se entre o segmento S5 e S6. A sua seletividade deve-se em parte, à existência de resíduos de aspartato, em volta do canal, que forma um anel de cargas negativas [52]. Por outro lado, a existência de poucos resíduos de arginina no segmento S4 (que se postula ser o sensor de voltagem para a ativação do canal) faz com que haja neste segmento poucos resíduos carregados positivamente, o que torna explicável porque é que os canais TRP não sejam regulados por voltagem [53]. Embora vários estudos recentes sugerem importantes papéis funcionais na expressão dos canais TRP nas células do músculo liso, até à data ainda não foi examinada qualquer significância nestes complexos. Apesar disso, duas questões se colocam: qual é a abundância relativa destas subunidades do TRP num tipo específico de células? Quais são as regras que regem a combinação entre si? A primeira pergunta foi respondida por Yang et al. que sistematicamente investigou o perfil de expressão do mRNA, dando origem às seguintes conclusões:

Família TRPV (*vanilloid*) composta por seis membros (TRPV1-6); nas células do músculo liso da artéria pulmonar estão apenas expressas 4 dos 6 membros (V1, V2, V3 e V4).

Família TRPM (*melastatin*) composta por oito membros (TRPM1-8), nas células do músculo liso da artéria aorta estão apenas expressas 6 dos 8 membros (M2, M3, M5, M7 e M8).

Família TRPC (*classical/canonical*) composta por sete membros (TRPC1-7), nas células do músculo liso da artéria cerebral estão expressas 5 dos 7 membros (C1, C2, C3, C4 e C6)-observações não publicadas.

Para além da descoberta de Yang et al, outras famílias foram descobertas baseadas nas suas propriedades funcionais e a sua similaridade estrutural, como o TRPN (*no mechanoreceptor potencial C channel*), TRPA (*ankyrin*) composto por um único membro, TRPP (*polycystin*) composto por três membros e TRPML (*muco lipins*) composto por três membros.

1.1.4. Canais de potássio

A atividade dos canais de potássio constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das SMC vasculares, sendo um determinante importante do tônus vascular [54]. A abertura dos canais de K^+ presentes na membrana das SMC vasculares provoca um aumento na saída de iões do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva ($[K^+]_i > [K^+]_e$), causando hiperpolarização da membrana celular [55]. Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e consequente diminuição da entrada de iões Ca^{2+} para o interior da célula, causando relaxamento muscular (vasodilatação) [54, 55]. De forma inversa, o encerramento dos canais de K^+ causa um estado de despolarização, devido à abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, levando a um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e vasoconstrição (figura 7). Nas SMC vasculares foram identificados três tipos de canais de potássio: canais de potássio operados por voltagem, canais de potássio ativados por Ca^{2+} , canais de potássio retificadores internos, dentro dos quais estão incluídos os canais sensíveis ao ATP.

Canal de potássio operados por voltagem (Kv) - Estão presentes nas células do músculo liso e são ativados por despolarização da membrana, num potencial de membrana entre os -35 e os -55 mv. A aminopiridina é amplamente usada como um bloqueador farmacológico destes canais. Vasodilatadores que aumentem os níveis do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), óxido nítrico/ monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) podem ativar estes canais em alguns vasos sanguíneos, e podem ser inibidos por vasoconstritores através da proteína cinase C. Foi descrita a sua participação na regulação do potencial de membrana e tônus vascular [56-59].

Canais de potássio dependentes do Ca^{2+} (BKca) - Estes canais são ativados pelo aumento do Ca^{2+} intracelular e por despolarização da membrana, sendo particularmente abundante nas células do músculo liso vascular [54, 57]. A ativação fisiológica destes canais vasculares pode ser um mecanismo importante para neutralizar a despolarização do vaso e constrição em respostas a alguns vasoconstritores e um aumento da pressão intravascular. Devido à elevada condutância destes canais, a influência sobre o potencial de membrana é maior. Vasodilatadores que aumentem os níveis de cAMP ou cGMP, monóxido de carbono e epóxidos do ácido araquidónico podem ativar estes canais [57, 60]. Deste modo, são referidos por

desempenharem um papel fundamental na regulação do potencial de membrana. Ainda é de referir que a expressão destes canais é aumentada durante a hipertensão [54, 60, 61].

Canais de potássio retificadores internos (Kir) - Estes canais caracterizam-se por apresentarem um influxo de iões de potássio, a potenciais de membrana mais negativos do que o potencial de equilíbrio, e efluxos deste ião a potenciais de membrana mais positivos que o potencial de equilíbrio. A importância destes canais depende do seu grau de retificação, significando esta uma alteração da condutância do canal com a voltagem. Os canais K_{IR} são ativados pela hiperpolarização da membrana celular, ao contrário dos canais K_V e K_{Ca}, que são ativados pela despolarização da membrana. Estes canais permitem assim o influxo de iões K⁺, quando há hiperpolarização, e a saída deste ião, quando o potencial de membrana aumenta [62, 63]. Os canais K_{IR} podem ser modulados por proteínas cinases [62] ou proteínas-G [64]. Recentemente foi descrito que em alguns vasos sanguíneos, demonstraram que o NO pode ativar os canais de K_{IR} [65].

Canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP}) - Após aumento da concentração de ATP, estes canais encerram [66]. Estímulos induzidos por vasodilatadores endógenos, e o aumento dos níveis de ATP intracelular, podem também exercer os seus efeitos vasculares, em parte através da ativação de canais K_{ATP}. Constituem assim canais alvo de uma grande variedade de estímulos vasodilatadores e regulam o potencial de membrana [57, 67].

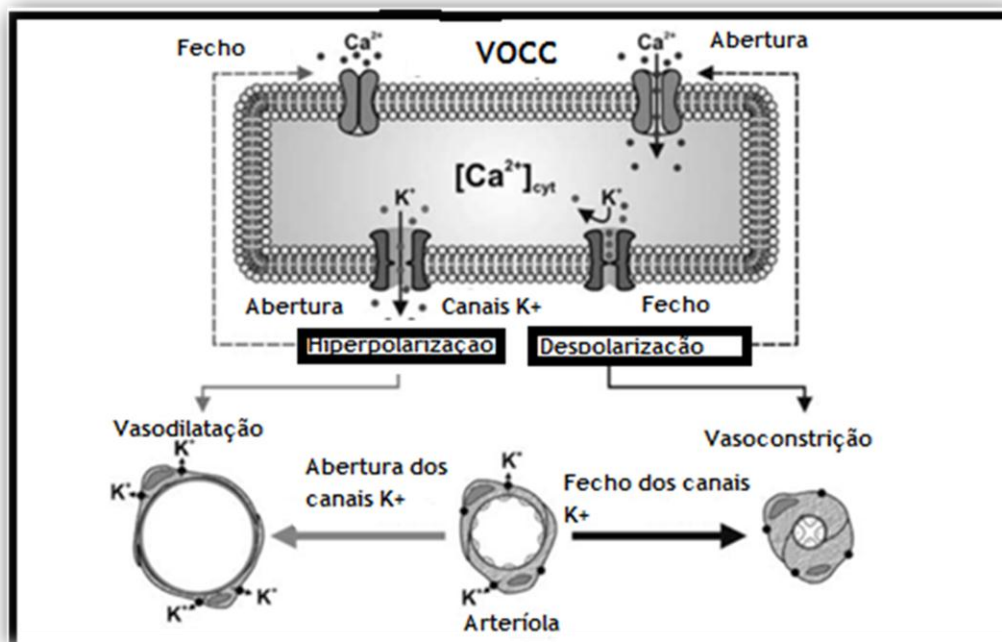


Figura 7: Mecanismos propostos que mostram o papel da atividade do canal de potássio e vasoconstrição. Adaptado de [67].

1.2. Contração do músculo liso vascular

Neste capítulo, serão explicados os principais mecanismos envolvidos na regulação da contractilidade do músculo liso vascular. A contração das SMC é controlada pelo sistema nervoso autónomo, pelo sistema hormonal e por mediadores locais de ação parácrina. O estado contráctil das SMC vasculares é influenciado por numerosas substâncias vasoativas, que podem ser vasodilatadoras ou vasoconstritoras, ou por estímulos físicos. Geralmente, a regulação da contractilidade destas células depende da modificação da concentração intracelular do ião Ca^{2+} e, normalmente, as moléculas vasoconstritoras atuam aumentando os níveis intracelulares de Ca^{2+} citosólico, enquanto que as vasodilatadoras diminuem estes níveis. Contudo, algumas moléculas vasoativas também podem atuar através da sensibilização ou dessensibilização do aparelho contráctil das SMC vasculares. Os níveis da concentração de Ca^{2+} citosólico são regulados através do controle das entradas e saídas de Ca^{2+} da célula e também através da sua libertação e captação pelo retículo endoplasmático (ER), estando estas duas componentes estreitamente relacionadas.

1.2.1. Ciclo das “pontes cruzadas”

Apesar dos estudos de contração do músculo liso, apresentarem um considerável interesse para a compreensão dos processos fisiológicos e patofisiológicos, o processo envolvido na interação das “pontes cruzadas” entre a miosina e a actina não se encontra completamente esclarecido. Conhece-se no entanto, que o modelo contráctil dos “filamentos deslizantes” é, no geral, comum a todos os tipos de músculos e que esta interação cíclica poderá ser responsável, pela produção de força contráctil e encurtamento da célula ativa. Este mecanismo de transformação da energia química em mecânica nos vários tipos de músculos é substancialmente diferente, contudo, é bastante similar ao do músculo esquelético [68, 69]. No músculo esquelético, a contração é regulada por um sistema troponina e pela fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina (MLCK) dos filamentos finos. A troponina é uma proteína dos filamentos finos do músculo estriado composta por três componentes [70]. Toyota et al. demonstraram que esta proteína regula a interação actina-miosina na presença da tropomiosina, na forma dependente de Ca^{2+} [71]. Pelo contrário, o filamento fino do músculo liso não expressa esta proteína. Em vez disso, está presente em grandes quantidades neste músculo, uma outra proteína que apresenta função similar e estrutura semelhante à da troponina, que é denominada por calmodulina. A calmodulina para além do que já foi descrito anteriormente, permite realizar a transdução de sinais de cálcio, através da ligação a este e em seguida, modificar as suas interações com proteínas diferentes [25, 69].

A chave para a ativação do mecanismo contráctil ocorre através da estimulação das SMC devido ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, quer do fluído extracelular, quer a partir de reservas intracelulares, através da ação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O Ca^{2+} liga-se à CaM, alterando a sua conformação, e assim dá origem ao complexo 4Ca^{2+} -CaM. O complexo formado, liga-se e

ativa a MLCK. O complexo cinase ativo $4Ca^{2+}$ -CaM-MLCK, subsequentemente ativa MLC_{20} , permitindo a ativação da miosina adenosina trifosfatase (ATPase; ATP; adenosina trifosfato) pela actina, resultando na contração do músculo pela interação da actina com a miosina (figura 8) [72, 73].

No relaxamento do músculo liso vascular, a miosina deve ser desfosforilada, porque desta forma é incapaz de se ligar à actina. Normalmente, esta desfosforilação é mediada pela enzima MLCP e acontece quando a $[Ca^{2+}]_c$ é baixa [10]. Contudo, a relaxação também pode ocorrer na presença de elevadas $[Ca^{2+}]_c$ e de níveis de fosforilação baixos da MLC_{20} , através de um fenómeno que se centra na interação do complexo actina/miosina com a proteína de choque térmico 20 KDa (HSP20) [69].

Assim, no geral, a fosforilação e desfosforilação da MLC leva à contração e relaxamento do músculo liso, respetivamente, e este processo é mediado pela MLCK e MLCP, respetivamente, num processo altamente regulado [74-76].

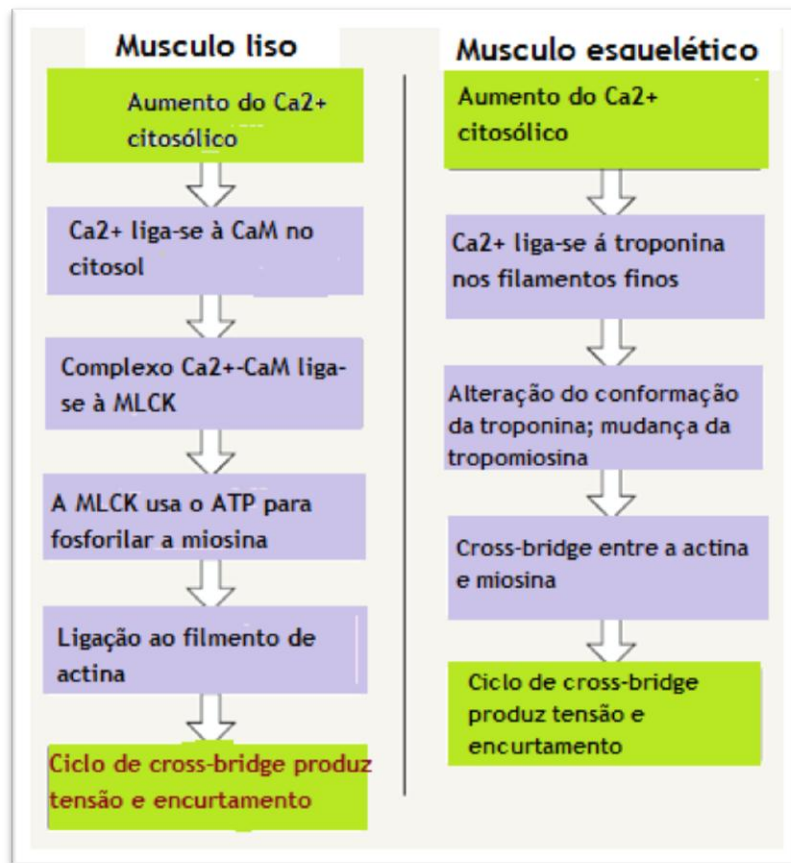


Figura 8: Vias que levam à interação actina-miosina, a partir do aumento do cálcio citosólico. Adaptado de [10].

1.2.2. Contração dependente de cálcio

O autor Sidney Ringer, em 1882, foi o primeiro a reconhecer a relevância do Ca^{2+} , um elemento descoberto em 1908, para a função celular. Até à data, a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tem sido envolvida em inúmeras funções celulares, como crescimento, divisão celular, excitabilidade, contração, regulação do volume e exocitose. Ninguém poderia imaginar a importância que o íon Ca^{2+} iria ter na fisiologia celular. Mas nós hoje podemos seguramente afirmar que a vida tal como a conhecemos não era possível sem o íon Ca^{2+} [69, 77].

No estado de repouso, a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ é muito mais baixa dentro das SMC vasculares (0,1 mM) do que no fluido extracelular (1-2 mM) [78]. Assim, o fenómeno de contração/relaxamento do músculo liso depende do equilíbrio que se estabelece entre os mecanismos que controlam as subidas e descidas da $[\text{Ca}^{2+}]_c$. A entrada e saída do Ca^{2+} do citosol é controlada por dois ciclos de cálcio distintos. Um ciclo extracelular, em que o Ca^{2+} entra e sai do citosol através da membrana plasmática e um segundo ciclo, em que o Ca^{2+} circula entre as organelas intracelulares que armazenam Ca^{2+} e o citosol. Participam no ciclo extracelular de Ca^{2+} , os canais de Ca^{2+} do sarcolema, a PMCA e o permutador NCX. No ciclo intracelular participam a SERCA e o recetor de IP_3 (IP_3R) [69, 72].

Normalmente a fosforilação reversível da MLC_{20} é a chave para a ativação do mecanismo da contração do músculo liso vascular. A fosforilação é catalisada pelo complexo Ca^{2+}/CaM dependente da MLCK na qual é ativada quando a $[Ca^{2+}]_c$ aumenta com a estimulação do músculo liso. O mecanismo inicia-se do seguinte modo: o Ca^{2+} liga-se à CaM, provocando uma alteração da conformação da CaM, de seguida o complexo Ca-CaM, ativa a MLCK. A MLCK ativa e fosforila uma das cadeias leves de miosina, a MLC_{20} , permitindo a interação entre a actina e a miosina e a contração do músculo liso (figura 9). A diminuição da concentração de Ca^{2+} leva a uma dissociação e inativação do complexo Ca^{2+}/CaM [79].

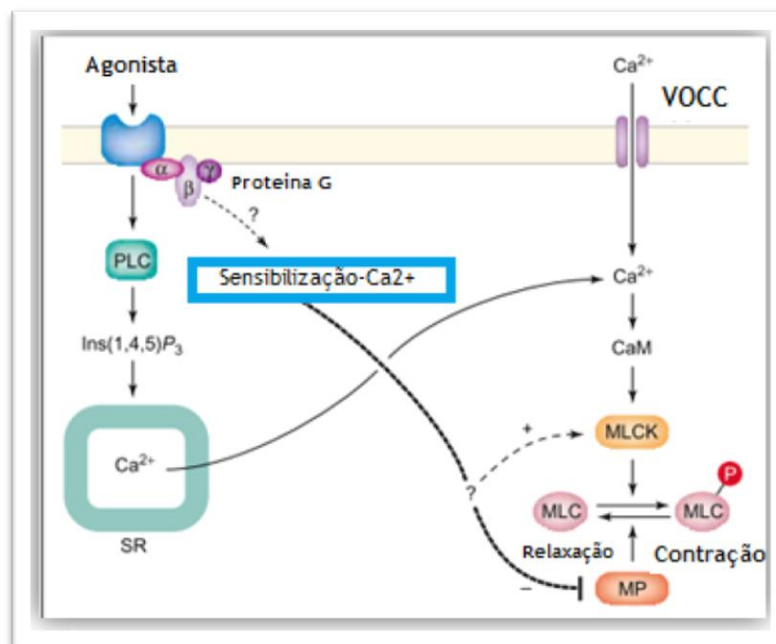


Figura 9: Contração do músculo liso sensível ao cálcio induzido por agonistas (MLCK-cinase da cadeia leve de miosina; MLC- cadeia leve de miosina; MP-fosfatase de miosina; SR- Reticulo sarcoplasmático; PLC- fosfolipase C; Cam-calmodulina). Adaptado de [80].

1.2.3. Regulação do potencial de membrana

Um aumento na $[Ca^{2+}]_c$ livre é o suficiente para a ocorrência de contração em ambos os músculos liso vascular e esquelético. No entanto, a contração do músculo liso vascular, ao contrário do músculo esquelético, é regulado, em grande medida por um mecanismo de potencial de membrana [72, 81].

Existe assim, uma relação muito íntima entre o potencial de membrana do músculo liso e o tónus vascular, de tal forma que uma pequena variação do potencial (poucos milivoltes) causa alterações significativas do diâmetro vascular [55, 57, 67]. As células musculares das artérias e arteríolas apresentam um potencial de membrana entre os -40 mv e os -60 mv quando sujeitas a níveis normais de pressão intravascular [57]. Este potencial regula primariamente a contractilidade muscular mediante alterações da entrada de iões Ca^{2+} para o citosol através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem [54, 57]. O potencial de membrana

pode também regular a concentração de Ca^{2+} citosólico através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, assim como, através da libertação de Ca^{2+} dos depósitos intracelulares [57]. A relação existente entre o influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem e o potencial de membrana, pode ser tal, que variação de 3 mv (despolarização ou hiperpolarização) podem aumentar ou diminuir o influxo deste ião [54, 57].

Os quatro tipos de canais de potássio foram identificados como importantes reguladores do potencial de membrana. Os canais K_V regulam o potencial de membrana em resposta à despolarização da membrana. Os canais K_{Ca} respondem a alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular e parecem ter um papel fundamental na regulação do tónus das artérias de maior resistência. Estes canais auxiliam na regulação da resposta arterial à pressão e aos vasoconstritores. Os canais K_{IR} parecem mediar a vasodilatação provocada pelo K^+ extracelular, sendo activados por hiperpolarização da membrana celular, permitindo assim o influxo de iões K^+ quando a membrana se encontra hiperpolarizada e a saída deste ião quando o potencial de membrana aumenta [67]. Os canais K_{ATP} constituem o alvo de numerosos estímulos vasodilatadores, incluindo a hipoxia e a adenosina [55, 67].

Por outro lado, os canais de cloro (Cl^-) também têm sido propostos como reguladores do tónus vascular. Tal como para os iões K^+ , o gradiente eletroquímico promove a abertura dos canais de cloro, resultando na difusão do ião Cl^- para o meio extracelular. A passagem deste ião através do canal de Cl^- dependente de voltagem, resulta na despolarização da membrana plasmática e abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, que são responsáveis pelo aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no citosol. Este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ leva conseqüentemente à vasoconstrição (figura 10) [82-84]. Existem nas células, os seguintes tipos de canais: canais de cloro dependentes de voltagem, canais de cloro ativados pelo cAMP, canais de cloro aniónicos regulados por volume e ainda canais de cloro dependentes de cálcio [69]. Contudo as SMC vasculares expressam apenas dois tipos de canais de Cl^- : canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} (ClCa) [82] e canais de Cl^- regulados pelo volume (Cl_{VR}) [83, 84].

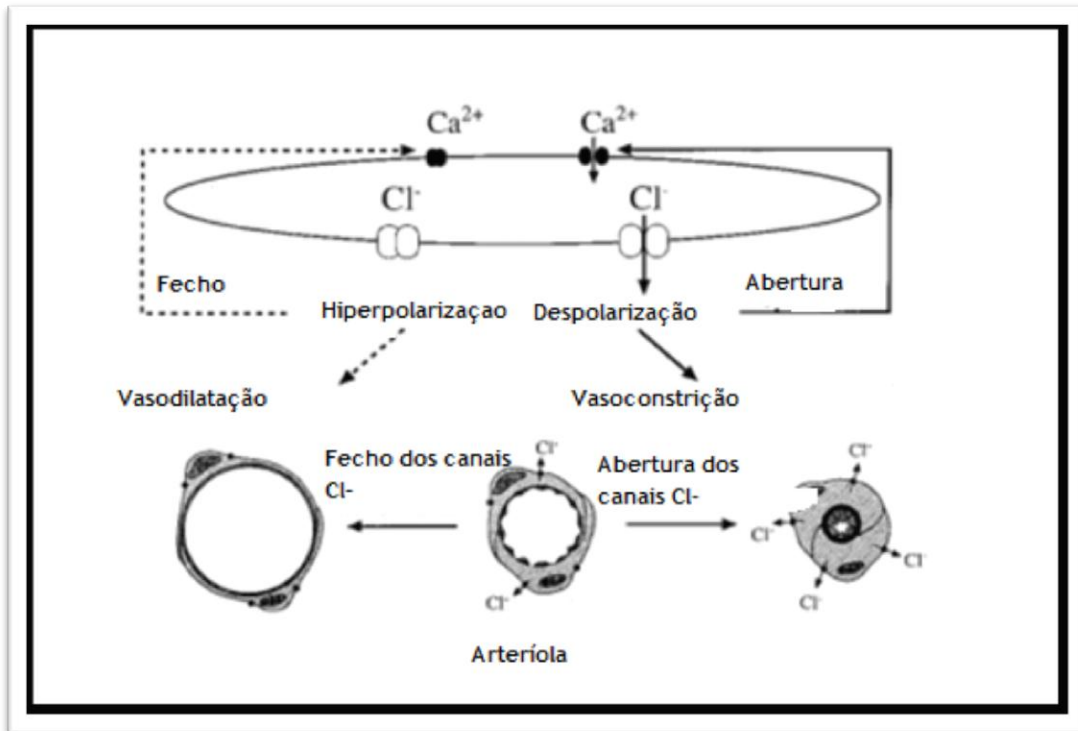


Figura 10: Tónus vascular e canais de cloro. Adaptado de [67].

1.2.4. Contração independente de cálcio

A contração do músculo liso envolve diferentes vias de sinalização. Uma dessas vias é inteiramente dependente da despolarização da membrana plasmática, que regula a difusão de iões Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem. Outra via envolve mudanças na concentração de Ca^{2+} mediado por um *pool* interno de Ca^{2+} o retículo sarcoplasmático [85]. Vários autores descrevem uma terceira via que em vez de influenciar o tónus através de mudanças na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, esta via envolve mudanças na sensibilidade do aparelho contráctil a este ião [86, 87]. Em particular vários agonistas vasculares ativam esta via a partir de dois mecanismos. Um dos mecanismos é designado por “sensibilização ao cálcio” e caracteriza-se por um aumento da fosforilação da MLC_{20} e da força contráctil. O outro mecanismo contráctil, não é regulado nem pela $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nem pela fosforilação da MLC_{20} , mas envolve a fosforilação de proteínas contrácteis, por uma cascata de fosforilações que envolve proteínas da família das MAPK [69].

Sensibilização ao cálcio

A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é o regulador primário da contração do músculo liso, e em condições fisiológicas, a fosforilação do resíduo ser¹⁹ da MLC_{20} pela MLCK é necessária e suficiente para iniciar a contração do músculo liso. Todas as tentativas para compreender as bases moleculares deste fenómeno convergiram para um único caminho: a inibição da atividade da MLCP. Contudo, a força de contração pode ser alterada, em resposta a agonistas, que são capazes de provocar

contrações musculares independentemente da $[Ca^{2+}]_c$. A extensão da fosforilação ou força de contração induzida pela ativação destes agonistas é maior do que a provocada pela despolarização da membrana, induzida pelo aumento da concentração de Ca^{2+} , assim este mecanismo é denominado por “sensibilização ao cálcio” [72]. Vários mecanismos foram propostos para a inibição da MLCP: a fosforilação da MYPT, a fosforilação da proteína CPI-17 e a dissociação da MLCP [69].

A proteína Rho é uma pequena proteína que pertence à superfamília da Ras GTP-ases monoméricas. Estudos recentes sugerem que a Rho está implicada em diversas funções fisiológicas associadas com a actina-miosina, tal como citocinese, motilidade celular e contração do músculo liso [88]. O mecanismo molecular pela qual a Rho regula a contração do músculo liso ainda não foi totalmente esclarecido. No entanto, sabe-se que esta via de sinalização envolve a Rho cinase (ROCK), que desempenha um papel crucial na contração do músculo liso, nomeadamente na regulação da atividade da MLCP [76, 89, 90].

A ROCK fosforila a subunidade de ligação à MLCP, inibindo a sua atividade e assim promove o estado fosforilado da MLC_{20} , ou seja, o estado contraído do músculo liso [91]. Tal como outras proteínas ligadas a GTP, a Rho exibe tanto a atividade de ligação GTP/GDP e a atividade GTPase, e funciona como um interruptor molecular, alternando entre um estado inativo, ligado ao GDP (GDP-Rho) e um estado ativo, ligado GTP (GTP-Rho) [92].

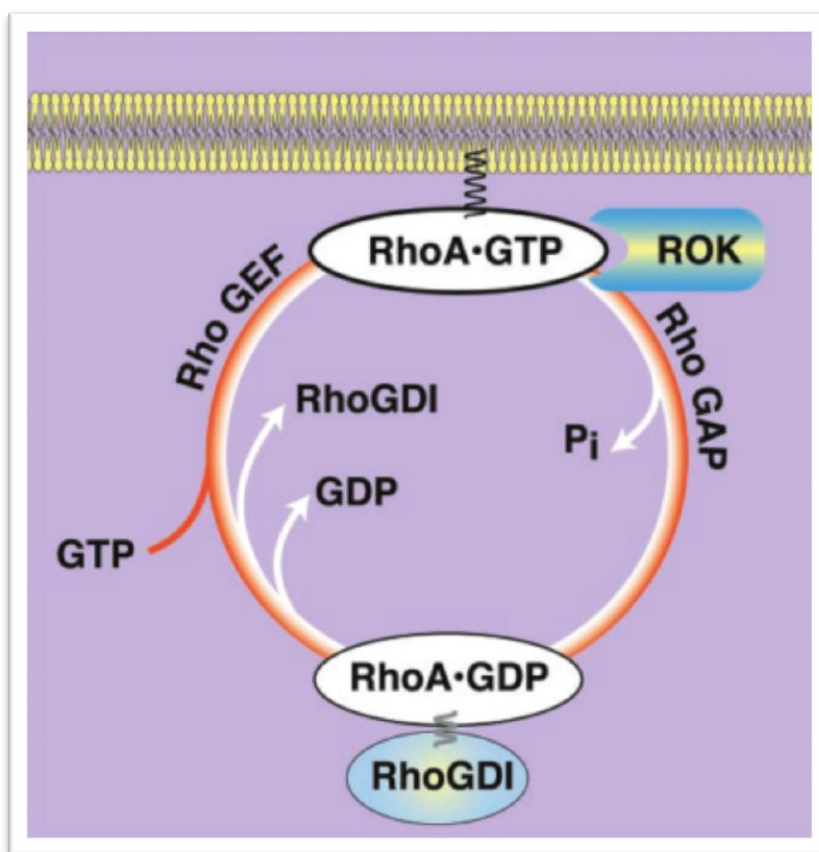


Figura 11: Esquema da regulação da pequena GTPase RhoA. Adaptado de [87].

No estado de repouso, a RhoA-GDP existe no citosol, ligada por uma cauda ao inibidor da dissociação do GDP, a Rho-GDI. Vários agonistas promovem a ativação de certos receptores acoplados à proteína G heterotrimérica e receptores de cinases de tirosina. Esta ligação promove a conversão da Rho-GDP a Rho-GTP através da ação de fatores de troca de nucleótidos guanina (GEFs). A Rho-GDI dissocia-se e a RhoA-GTP associa-se com a membrana, onde interatua com a ROCK, levando à sua ativação para iniciar cascatas de sinalização, como mostra a figura 11 [87]. A ROCK ativada subsequentemente fosforila a MYPT. Quando fosforilada, a MYPT torna-se incapaz de ativar a subunidade catalítica PP1c β/δ , o que tem como primeira consequência a redução da atividade da MLCP e como resultado final o aumento dos níveis de fosforilação da MLC₂₀. A ROCK pode fosforilar a MYPT em vários resíduos, sendo os resíduos Thr⁶⁹⁶ e Thr⁸⁵³, os dois principais locais de fosforilação [31, 93]. Fenge et al. sugeriram que a fosforilação no resíduo Thr⁶⁹⁶, mas não a fosforilação do resíduo Thr⁸⁵³ por ser responsável pela inibição da atividade da MLCP [94]. Estudos posteriores demonstraram que a fosforilação no resíduo Thr⁸⁵³ pode interferir com a ligação da MYPT à miosina. Este efeito da fosforilação no resíduo Thr⁸⁵³, poderia portanto, diminuir a atividade da MLCP para a MLC₂₀. Assim, a razão aparente para a discrepância entre estes dois estudos, permanece desconhecida [94, 95]. Pode-se, no entanto, deduzir que a ROCK pode induzir a inibição da atividade da MLCP pela fosforilação em cada um dos dois resíduos [33]. A inibição da atividade da MLCP também pode ser mediada pela ativação da CPI-17.

A CPI-17 é uma proteína endógena potenciadora do efeito inibidor da PKC sobre MLCP, com 17 kDa, que é expressa nos tecidos do músculo liso. A CPI-17 exerce o seu efeito inibitório quando é fosforilada no resíduo Thr³⁸. Inicialmente foi reconhecida como um substrato da PKC, contudo outras cinases podem catalisar o resíduo Thr³⁸ da proteína CPI-17, como a ROCK, zipper interagindo com proteína cinase (ZIPK), cinase como integrina (ILK), proteína cinase ativada por P21 (PAK) e proteína cinase N (PKN). Mais importante ainda, é que as cinases que fosforilam a CPI-17 em grande parte se sobrepõem com as cinases que catalisam a fosforilação inibitória da MYPT [33]. O terceiro mecanismo proposto para a inibição da MLCP, consiste na dissociação da estrutura da MLCP (separação da MYPT da PP1cδ). Segundo o autor, Gonget al. esta dissociação resulta da ação do ácido araquidónico (AA), que é resultante da atividade da PLA2. Assim, o AA pode sensibilizar o músculo liso para o Ca²⁺, através da inibição da desfosforilação da MLC₂₀, promovendo a dissociação e inibição da MLCP [96].

Como já foi referido, a ROCK inibe a MLCP, promovendo a diminuição da desfosforilação da MLC e consequentemente a vasoconstrição. Porém, uma outra enzima faz parte da regulação da MLCP, a proteína cinase dependente do cGMP (PKG). A estimulação da atividade da MLCP induzida pela PKG ocorre através da interação entre motivos leucina zipper (LZ) da PKG e a MYPT. A PKG pode também estimular a atividade da MLCP independentemente da MYPT através da fosforilação da telokina [87, 97, 98]. Para além disso, a PKG pode ainda, segundo alguns autores, contrariar o efeito inibitório da ROCK na MLCP, por fosforilação da MYPT nos resíduos Thr⁶⁹⁶ e /ou Thr⁸⁵³ causada pela ROCK (figura 12) [87, 99, 100]. Cada vez mais existem provas, de que a via PKG-MYPT desempenha um papel fundamental em efeitos nitrovasodilatadores e que a alternância desta via ocorre em muitas doenças cardiovasculares [87, 99, 101-104].

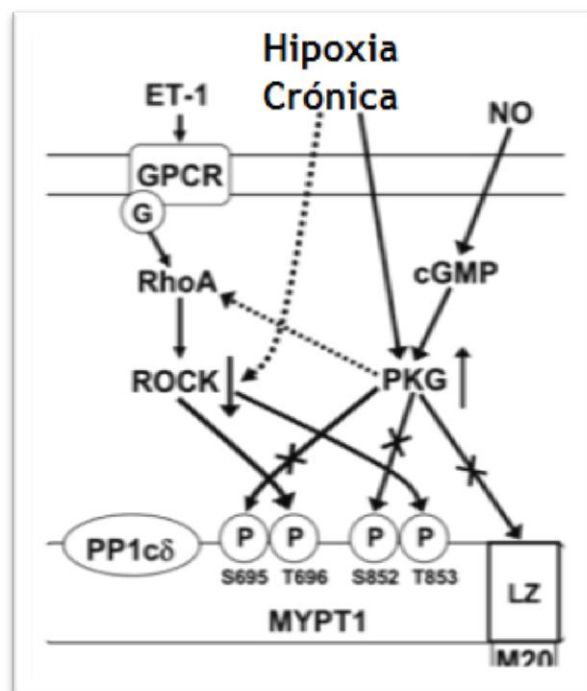


Figura 12: Mecanismos possíveis do papel do cGMP (PKG) e da ROCK na preservação da relaxação induzida pelo cGMP em veias pulmonares após hipoxia crônica (PP1c δ subunidade catalítica; MYPT1-Subunidade reguladora; M20- Função desconhecida; LZ-domínio leucina zipper). Adaptado de [105].

Via das MAPK

Diversos agonistas vasculares provocam contração muscular através da ativação de uma via independente da fosforilação da MLC_{20} e da $[Ca^{2+}]_c$. A via das MAP cinase (MAPK) é uma das vias de sinalização mais estudadas. Esta via desempenha um papel fundamental em muitos processos celulares essenciais, que vão desde o controlo do crescimento em todas as suas variações, diferenciação celular e sobrevivência para adaptação celular a agentes químicos e *stress* físico. Sabe-se hoje, que esta via está também envolvida na contração do músculo liso [69, 106].

O termo “via das MAPK” refere-se a um módulo de três cinases que incluem uma MAPK cinase cinase (MKKK), MAPK cinase (MKK) e MAPK terminal. Estas cinases são ativadas por uma sequência de fosforilações entre si, em resposta a uma gama diversificada de estímulos, tais como citocinas, fatores de crescimento, neurotransmissores, *stress* celular e aderência celular [107-109]. A primeira cinase do módulo de ativação, formada por três componentes, é uma MAPK cinase cinase (MKKK) [110]. Alguns autores sugerem que MKKK específica pode ser fosforilada, quer pela MAPK cinase cinase cinase (MKKKK) ou por interação com uma pequena proteína de ligação ao GTP da família da Ras ou Rho. A MKKK quando ativada por fosforilação, fosforila a cinase seguinte, a MKK [111]. As MKK são cinases que reconhecem e fosforilam o motivo Thr-X-Tyr no *loop* de ativação da MAPK (figura 13).

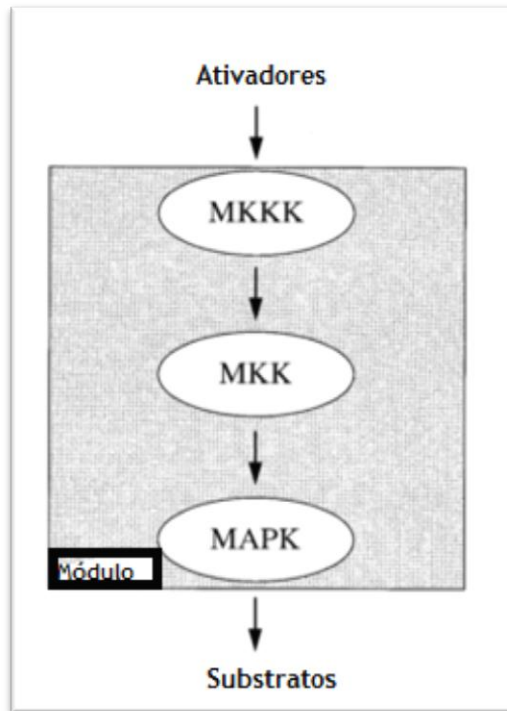


Figura 13: Módulo do núcleo da via MAPK composta por três cinases [MAPK cinase cinase (MKKK), MAPK cinase (MKK) e MAPK] que são sequencialmente ativadas por fosforilação entre si. Adaptado de [108].

Os principais substratos da MAPK são fatores de transcrição. Contudo, as MAPK também podem fosforilar outros substratos, incluindo outras proteínas cinases, fosfolipases e proteínas associadas ao citoesqueleto [112]. Podem ser divididas em diferentes famílias: 1) cinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK), das quais se conhecem duas isoformas, a p44-cinase ou ERK-1 e a p42-cinase ou ERK-2; 2) cinases Jun N-terminal/proteínas cinases ativadas por stress (SAPK/JNK) (Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-terminal activated kinase), sendo formadas por três proteínas JNK1, JNK2 e JNK3; 3) p38MAPK, das quais estão identificadas quatro isoformas, designadas respetivamente por p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ [107].

1.3. Relaxação do músculo liso vascular

O processo de relaxação do músculo liso tem sido descrito como resultado da diminuição da concentração de Ca^{2+} , seguido da perda ou diminuição do estímulo contráctil. No entanto, a relaxação muscular pode também dever-se à redução da sensibilidade do aparelho contráctil ao ião cálcio [113]. Segundo, os autores Carvajal et al. podem-se definir dois tipos de relaxação: o relaxamento passivo, induzido pela remoção de agentes contracteis, e o relaxamento ativo, induzido pela ativação de uma via dependente de nucleótidos cíclicos na presença contínua de agentes contrácteis. Independentemente disto, o processo de relaxação requer uma diminuição do Ca^{2+} intracelular, aumento da atividade da MLC fosfatase e a presença de uma multiplicidade de composto endógenos e exógenos [1, 114, 115].

No geral, a relaxação muscular segue o caminho inverso da sequência de eventos da contração, e termina com o retorno da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ aos valores basais. Quando a concentração de Ca^{2+} é mais baixa do que $1 \mu\text{M}$, o complexo CaM-MLCK é dissociado e a MLCK é inativa. A dissociação do complexo CaM-MLCK tem como resultado a libertação de Ca^{2+} que se encontrava ligado à CaM. A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ regressa aos valores basais através de vários mecanismos, que envolvem o retículo sarcoplasmático (SR) e a membrana plasmática: a PMCA, a SERCA, o permutador NCX e proteínas citosólicas de ligação ao Ca^{2+} , como indica a figura 14. Sob estas condições, a MLCP desfosforila a MLC_{20} e induz a relaxação das SMC vasculares [69, 72].

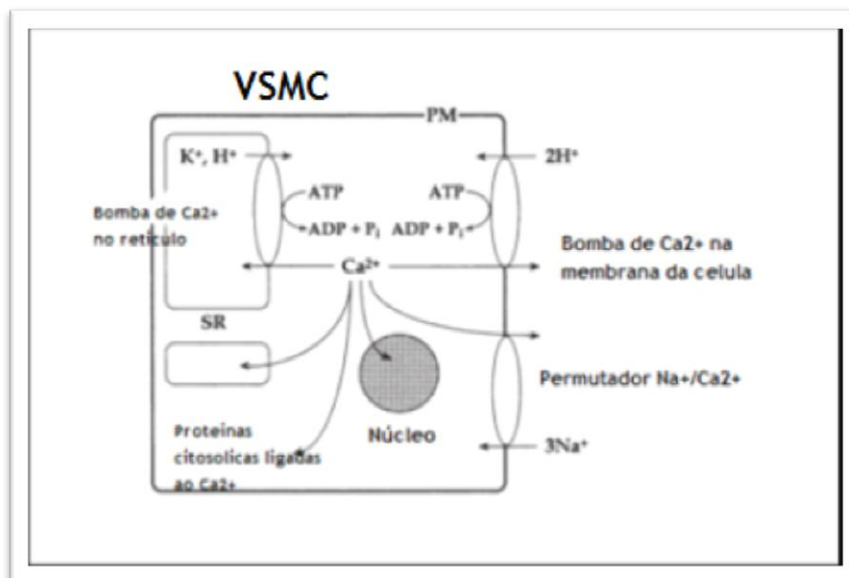


Figura 14: Esquema representativo dos vários mecanismos que provocam diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular nas SMC vasculares (SR-retículo sarcoplasmático; VSMC- células do músculo liso vascular). Adaptada de [78].

A relaxação do músculo liso pode também ser provocada por compostos endógenos e exógenos, que reduzem o tónus do músculo liso a partir de várias vias. Assim a relaxação do músculo por estes compostos pode ocorrer através de diferentes mecanismos, incluindo a activação ou bloqueio de recetores específicos, a inibição da síntese de agonistas contrácteis, bloqueio de recetores mediadores da contração e abertura ou encerramento dos canais iónicos [1, 69].

1.3.1. Nucleótidos cíclicos

Os principais mensageiros intracelulares implicados na relaxação do músculo liso são os nucleótidos cíclicos, cAMP e cGMP. A síntese destes nucleótidos é catalisada pela adenilato ciclase (AC) e pelo guanilato ciclase (GC), respetivamente. Grande parte dos seus efeitos intracelulares resultam da ativação de proteínas cinases específicas: a proteína cinase dependente do cAMP (PKA) e proteína cinase dependente do cGMP (PKG).

GMP cíclico

O cGMP pode ser sintetizado através da ativação da guanilato ciclase (GC), que é expressa nas células sob duas formas, uma forma transmembranária ou particular (pGC) e uma forma solúvel ou citosólica (sGC). As duas formas, que convertem o trifosfato de guanosina (GTP) em cGMP na presença de Mg^{2+} , são reguladas diferentemente, sendo a sGC activada pelo NO e a pGC por péptidos natriuréticos (NP). Este nucleótido pode ser hidrolisado por várias fosfodiesterases [116-119].

A família pGC compreende sete membros (pCG-A a pCG-G). A pCG-A é o recetor do peptídeo natriurético auricular (ANP) que pode ser ativado extracelularmente pelo ANP, e também pelos peptídeos natriuréticos cerebrais e C (BNP e CNP). A ativação da pCG-A leva a uma diminuição na pressão arterial, como resultado de uma vasodilatação. A isoforma pGC-B é muito semelhante à pGC-A mas é ativada exclusivamente pelo CNP. A isoforma cGC-C é ativada pelo ANP, BNP e CNP. As isoformas pGC-E e pGC-F são ativadas por proteínas que ligam Ca^{2+} . Não foi ainda descoberto nenhum ligante para as isoformas pGC-D e pGC-G [120-122].

A sGC é uma hemoproteína heterodimérica, composta por duas subunidades (α e β). Ela contém três domínios que são fundamentais para a sua atividade: o domínio “heme”, o domínio de dimerização (DD) e o domínio com atividade catalítica. O domínio “heme” prostético age como domínio recetor para o NO [116, 123] e o CO [124].

Independentemente do cGMP ser gerado por sGC ou pGC, ele pode provocar efeitos em diferentes tipos de canais iônicos, em fosfodiesterases (PDE) que provocam a clivagem da estrutura cíclica do cGMP e ativam a proteína cinase dependente do cGMP (PKG) (Figura 15) [113].

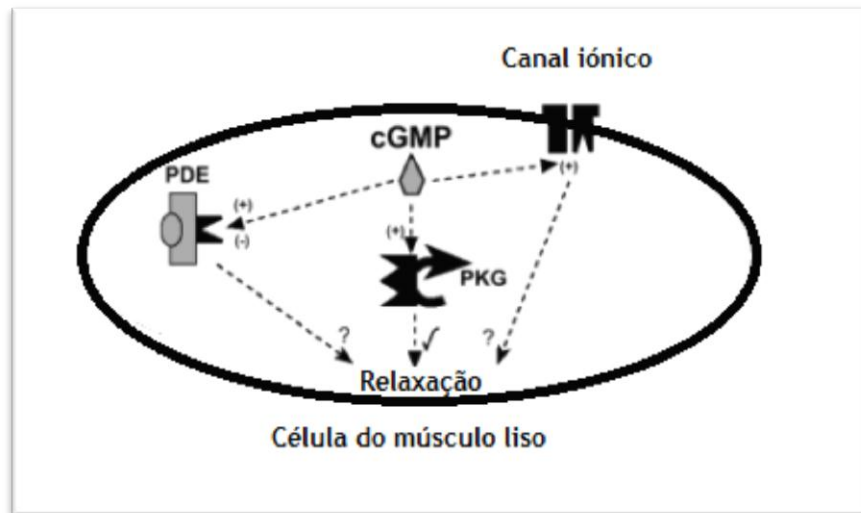


Figura 15: Mecanismo hipotético do efeito do GMPc nas células musculares lisas Adaptado de [113].

A PKG é um homodímero, em que cada subunidade é constituída por dois domínios funcionais, o regulador e o catalítico. O domínio regulador contém dois locais de ligação para o cGMP. Estes dois sítios de ligação possuem cinéticas diferentes para o cGMP, um possuindo elevada afinidade de ligação para o cGMP (sítio de dissociação lenta ou sítio lento) e o outro baixa afinidade de ligação para o cGMP (sítio de dissociação rápida ou sítio rápido). Esta cinase representa assim, o principal mediador intracelular dos sinais do cGMP [125]. Desta proteína foram identificados dois genes diferentes, o da PKG tipo I, que apresenta duas isoformas (PKG1α e PKG1β) e o da PKG II. A isoforma PKG-II não se encontra expressa nas SMC, sendo a PKG-1β a predominantemente expressa nas SMC vasculares.

A PKG I é um dos componentes importantes envolvidos na regulação dos mecanismos de contração do músculo liso. Em geral, a sua ativação reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} das proteínas contrácteis e também promove a diminuição dos níveis de cálcio intracelular por inibição da libertação de cálcio das reservas intracelulares [126]. Múltiplos mecanismos têm sido propostos para explicar o papel da PKG na redução do Ca^{2+} :

- 1) Ativação da entrada de Ca^{2+} para os depósitos intracelulares através da fosforilação do fosfolambam e activação da SERCA; [127].
- 2) Aumento do efluxo de Ca^{2+} , através da estimulação da PMCA e do permutador NCX; [128, 129].

- 3) Inibição da libertação do Ca^{2+} do ER, através da fosforilação mediada pela PKG do IP_3R e/ou inibição da síntese do IP_3 ; [130].
- 4) Hiperpolarização da membrana, através da ativação directa ou indirecta dos canais de potássio; [131].
- 5) Inibição directa dos VOCC, devido à sua desfosforilação, através da proteína fosfatase 2A; [116, 132].
- 6) A redução da sensibilidade do miofilamentos ao Ca^{2+} é presumivelmente devida à diminuição da fosforilação na MLC_{20} , possivelmente via estimulação da desfosforilação da MLC_{20} pela MLCP [130].

AMP cíclico

A síntese do cAMP é catalisada pela AC, uma enzima localizada na membrana plasmática, que converte o trifosfato de adenosina (ATP) em cAMP na presença de Mg^{2+} . O aumento deste nucleótido também pode ocorrer como resultado da ativação de recetores acoplados a uma proteína- G_s e/ou da inibição de recetores acoplados a uma proteína- $\text{G}_{i/o}$, no estado ativado. Tal como para o cGMP, a degradação deste nucleótido cíclico ocorre aquando a ativação de fosfodiesterases [133].

Grande parte dos efeitos do cAMP em células eucariotas resulta da ativação da proteína cinase A (PKA) ou proteína cinase dependente de AMP cíclico. Esta proteína é uma cinase que fosforila as proteínas alvo em resíduos de serina e treonina e altera a atividade destas. A PKA é um complexo heterotrimérico formado por uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias, β e γ [134]. Cada uma destas subunidades apresenta um papel específico na estabilidade e atividade da PKA. Existem várias isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$) que podem formar diferentes combinações nas células do músculo liso predomina a combinação $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ [135].

Os principais efeitos deste nucleótido cíclico consiste na redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , presumivelmente por fosforilação da MLCK e da diminuição da afinidade para o complexo Ca^{2+} -CaM, isto quando os níveis deste nucleótido se encontram elevados [136, 137]. Contudo, o mecanismo pelo qual ocorre um aumento da concentração de cAMP e relaxação ainda permanece pouco claro. Porém tem sido assumido por alguns autores que a ativação da PKA pode representar um dos mecanismos, pelo qual as drogas podem induzir relaxação [133]. Existem vários mecanismos propostos para explicar como é que a PKA promove o relaxamento:

- 1) inibição da PLC e canais de Ca^{2+} ;
- 2) estimulação da bomba Ca^{2+} -ATPase do SR e permutador NCX;

- 3) estimulação da troca de Ca^{2+} para o SR e ativação de canais de K^+ ;
- 4) Redução da fosforilação na MLC_{20} , diminuindo a afinidade para o complexo Ca-CaM [137-139].

Apesar de estar descrito que o cAMP ativa a PKA e que o cGMP ativa a PKG, verificou-se que o cAMP também pode ativar a PKG, processo este denominado por *cross activation*. No entanto, esta ativação requer 10 vezes maior concentração de cAMP do que concentração de cGMP, para ativar a cinase. No músculo liso, o cAMP é cerca de 10 vezes maior do que cGMP [136, 140-142].

Em suma, o aumento do nível citosólico dos dois nucleótidos cíclicos nas SMC vasculares, pode levar ao relaxamento do músculo liso por vários mecanismos diferentes: 1) através da diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]$; (2) através da diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]$ por sensibilidade à fosforilação; (3) desacoplamento da força de fosforilação da miosina [138].

1.3.2. Fosfodiesterases (PDEs)

As fosfodiesterases (PDE) são um grupo de enzimas intracelulares que catalisam a hidrólise 3' do fosfato cíclico ligado a adenosina e/ou guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico, e por este mecanismo inibem o relaxamento das SMC. Até ao momento, foram identificadas 11 famílias de PDE com base na similaridade estrutural, como a homologia, os domínios da proteína e propriedades enzimáticas. Estas famílias são codificadas por 21 genes, que dão origem a cerca de 50 isoformas [143]. As características comuns entre as famílias das PDE incluem um núcleo altamente conservado próximo do terminal carboxil, entre a extremidade amino e o domínio catalítico existem domínios reguladores e uma região amino-terminal única, que confere especificidade. Os domínios reguladores contêm sequências específicas, que são responsáveis pelas diferentes propriedades de cada PDE [144].

Os membros da família das PDE apresentam diferentes especificidades na hidrólise dos substratos cAMP e cGMP. Assim, a PDE da família 4, 7 e 8 hidrolisam cAMP, enquanto que a família 5, 6 e 9 são específicas para o cGMP. As famílias 1, 2, 3, 10 e 11 utilizam ambos os substratos, cAMP e cGMP, apresentado eficácias catalíticas distintas [145]. No músculo liso vascular são expressas vários tipos de PDEs, nomeadamente a PDE1, PDE3, PDE4 e PDE5 [144, 146, 147]. Segundo Santos Silva et al. entre estas famílias a PDE4 e PDE5 são as enzimas chave na regulação da relaxação da artéria umbilical humana, associada ao cAMP e cGMP, respetivamente [148]. As PDE2 e PDE7 foram detetadas apenas no músculo liso da aorta de suínos e na artéria pulmonar humana [149]. A sua regulação é baseada nas concentrações intracelulares de nucleótidos cíclicos, fosforilação, interação com proteínas reguladoras, compartimentalização sub-celular, ligação ao complexo Ca^{2+} -CaM, bem como por alterações na expressão do gene [150] [151].

A- Família das fosfodiesterases 1

As fosfodiesterases pertencentes a esta família são dependentes do cálcio e da CaM e foram umas das primeiras famílias a serem identificadas. A característica distinta desta família é a sua regulação pelo complexo Ca^{2+}/CaM . São expressas em diferentes tipos de células, no interior de tecidos ou regiões dentro de uma célula, e portanto podem ajudar a regular um número muito diversificado de nucleótidos cíclicos em processos dependentes de cálcio. Em humanos, a PDE1A e PDE1B mostra alta afinidade para o cGMP, e pouca afinidade para o cAMP. A PDE1C apresenta alta afinidade para ambos os nucleótidos. Nas células do músculo liso vascular, a isoforma que se expressa maioritariamente encontra-se ligada à regulação da contractilidade da artéria pulmonar humana. Esta família de fosfodiesterases está implicada em vários processos fisiológicos e patológicos [143, 152-155].

B- Família das fosfodiesterases 2

Esta família é expressa numa grande variedade de tecidos e tipos de células, incluindo o coração, cérebro, plaquetas, células endoteliais, células glomerulosas adrenais e macrófagos. Esta fosfodiesterase hidrolisa tanto o cGMP como cAMP com semelhantes taxas máximas e valores de K_m relativamente altos. A PDE2 não foi detetada em células do músculo liso vascular, com exceção de extratos da artéria aorta de porco onde foi encontrada uma atividade muito baixa desta PDE. Para além disso, esta família de fosfodiesterases pode desempenhar um papel na regulação do fluido e extravasamento de células durante condições inflamatórias, uma vez que a PDE2 está localizada em células endoteliais [143, 149, 156, 157].

C- Família das fosfodiesterases 3

Uma característica distintiva desta família é a sua propriedade bioquímica de ser capaz de hidrolisar tanto o cAMP como o cGMP, contudo foi sugerido que *in vivo* a hidrólise de cAMP é inibida pelo cGMP. Assim, esta família também foi designada por “PDE inibida pelo cGMP”. Verificou-se que a ligação do cGMP ao domínio catalítico da PDE3, funciona como “ativador” da inibição da hidrólise do cAMP, daí resultando um aumento da concentração do cAMP. A família das PDE3s também é distinguida pela sua capacidade de serem ativadas por vias de fosforilação, incluindo a PKA ou da via da fosfotidilinositol-3-cinase (PI₃K). A PDE3 foi identificada no músculo liso, plaquetas, tecidos cardíacos adipócitos e fígado. Estas enzimas estão envolvidas na regulação da contractilidade cardíaca e do músculo liso vascular [146, 149, 158, 159].

D- Família das fosfodiesterases 4

Esta família é expressa em vários tipos de tecidos, e tipos de células, nomeadamente as células do músculo liso da artéria umbilical humana, desempenhando um papel importante na regulação da contractilidade. Para além da artéria umbilical, esta fosfodiesterase é expressa na artéria pulmonar humana, mesentérica e femoral. A PDE4 hidrolisa seletivamente o cAMP com

elevada afinidade e especificamente inibida pelo rolipram, não sendo reguladas pelo cGMP [144, 146, 148, 160, 161].

E- Família das fosfodiesterases 5

A PDE5 é a principal família de fosfodiesterases que hidrolisam o cGMP, nas células do músculo liso, uma vez que está em posição para controlar eficazmente a via de sinalização cGMP/PKG, especialmente sobre condições de níveis de cálcio baixo. Para além do músculo liso, também foi identificada e caracterizada a partir de plaquetas e mais tarde no pulmão. No entanto, esta PDE recebeu pouca notoriedade até que se descobriu ser um regulador da contração do músculo liso. A PDE5 é hoje mais conhecida por ser o alvo molecular para várias drogas usadas para tratar a disfunção erétil, e mais recentemente utilizada para o tratamento da hipertensão pulmonar. Esta família é caracterizada por uma especificidade para a hidrólise do cGMP e pela presença de dois locais de ligação com alta afinidade ao cGMP [143, 149].

1.4. Artéria umbilical humana (HUA)

1.4.1. Generalidades

O cordão umbilical realiza a ligação entre a mãe e o filho. Começa a formar-se simultaneamente com a placenta na primeira semana de gestação e tem como função distribuir o sangue aos tecidos e os nutrientes e o oxigénio ao feto, atuando assim como uma “linha de vida”. Esta é uma amostra biológica ideal para o estudo de patologias, como por exemplo, a hipertensão induzida pela gravidez (PIH). Logo após o nascimento, esta amostra biológica pode ser recolhida, não implicando riscos adicionais nem para a mãe, nem para o feto [162].

Este anexo fetal tem origem no mesmo zigoto do feto, sendo desenvolvido durante a quinta semana de gestação. Normalmente, este pesa aproximadamente 40 g, e o seu comprimento pode chegar até aos 65 cm, com um diâmetro médio de 1,5 cm. Porém, podem existir cordões umbilicais curtos ou longos, não sendo a sua ocorrência comum. Os cordões muito longos têm tendência ao prolapso, a enrolarem-se no feto, a formarem nós, sendo a sua identificação de vital importância, de forma a evitar uma possível hipóxia fetal ou anóxia. Os cordões demasiado curtos podem provocar a separação prematura da placenta da parede do útero durante o parto, sendo tal como no caso anterior, vital a sua identificação [162, 163]. O cordão umbilical apresenta uma forma helicoidal, devido ao típico enrolamento em espiral dos seus vasos sanguíneos [163]. É bastante forte, flexível, de cor branca opaca e de aspeto gelatinoso, pois encontra-se coberto por um epitélio simples, derivado do âmnio [163-165]. Normalmente, é composto por três vasos sanguíneos com estrutura e função diferentes. Uma veia, a qual transporta o sangue oxigenado e nutrientes a partir da placenta para o feto, e duas artérias, que transportam o sangue desoxigenado e os resíduos metabólicos do feto para a placenta (figura 16) [166].



Figura 16: Representação esquemática do cordão umbilical apresentando duas artérias e uma veia umbilical (UA- artéria umbilical e UV- veia umbilical) Adaptada de [167].

Os vasos umbilicais, são rodeados por uma geleia de Wharton (GW), que constitui a maior parte do cordão umbilical humano e age como uma camada protetora, afetando positivamente a nutrição e crescimento fetal. Alguns estudos, indicam que existe uma relação paralela entre a quantidade de GW e o peso fetal, desse modo a quantidade de GW é considerada um fator que determina o crescimento do feto. Para além disso, desempenha igualmente um papel importante no armazenamento de alguns compostos, tais como fatores de crescimento [168]. A GW apresenta um aspeto gelatinoso sendo constituída por células do tecido conjuntivo que estão dispersas numa superfície amorfa de substâncias compostas por proteoglicanos (ácido hialurónico e condroitina sulfato) e diferentes tipos de colagénio. Estas macromoléculas são necessárias para as propriedades estruturais e funcionais da parede dos vasos [169].

A artéria umbilical humana (HUA) é um componente principal da circulação fetoplacentária, e o mecanismo que regula o estado contráctil desta artéria é muito importante para otimizar a troca de produtos, como nutrientes, oxigénio e resíduos metabólicos entre o feto e a placenta [148, 170].

A estrutura trilamelar da HUA possui características morfológicas específicas. A seguir à monocamada de células endoteliais, possui não uma, mas duas camadas de células musculares lisas (figura 17) [69]. As duas camadas médias encontram-se envolvidas pela geleia de Wharton, muito rica em água. A membrana interna elástica a seguir à camada endotelial não está

presente neste tipo de artéria e contém pouca elastina, ao contrário da veia umbilical que possui uma camada subíntima elástica [171]. A elastina é altamente extensível quando submetida a forças mecânicas elevadas, ao contrário do colagénio, que normalmente serve para limitar a extensão vascular a forças mecânicas baixas. Portanto, esta macromolécula tem como função fornecer a extensibilidade recuperável e posterior contração nas artérias durante o fluxo sanguíneo [171]. Na camada média mais externa, as SMC presentes apresentam um aspeto estrutural típico (disposição circular). Na camada média mais interna, a maioria das células musculares lisas aparece disposta longitudinalmente em relação ao eixo da artéria e dispersas numa abundante substância fundamental amorfa pobre em fibras elásticas, mas muito plástica. Esta plasticidade da camada muscular interna da média é a grande responsável pela oclusão fisiológica da HUA no pós parto. A contração das fibras musculares dispostas circularmente empurram a substância fundamental amorfa para dentro do lúmen da artéria, ocluindo-a. A grande diferença fisiológica entre as células musculares lisas das duas camadas, é que a camada mais externa, ao contrário da camada mais interna, é muito rica em miofilamentos. Estes miofilamentos são fibras que agrupadas formam a miofibrila, são de natureza proteica, designadas por actina e miosina. A falta da elastina é compensada pela presença de SMC vasculares [7, 172, 173].

Uma vez que as SMC vasculares regulam o tónus vascular, estas são altamente especializadas, expressando vários tipos de canais iónicos, tal como LTCC e TTCC, e diferentes tipos de recetores membranares. Além disso, os vasos sanguíneos umbilicais como são desprovidos de inervação simpática e *vasa vasorum*, o controlo do tónus vascular é regulado por mediadores vasoativos libertados localmente, por substâncias transportadas pelo fluxo sanguíneo e por alguns iões, como o potássio e o cálcio. Diversas situações patológicas resultam da alteração de um ou mais destes fatores que são responsáveis por uma diminuição do fluxo sanguíneo materno-fetal [148].

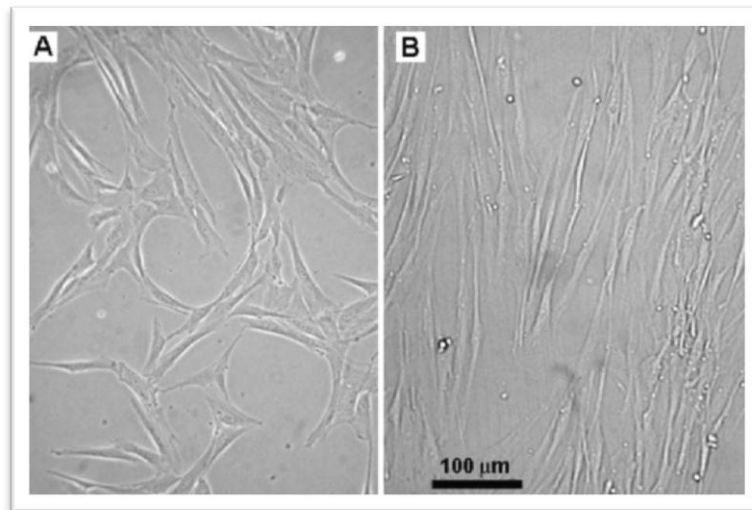


Figura 17: Células do músculo liso vascular da artéria umbilical humana. (A): crescimento após 10 dias; (B): crescimento após 17 dias. Adaptado de [7].

Diversos estudos associam o aumento de contrações espontâneas da artéria umbilical à alteração de vários fatores, relacionados com a atividade contráctil desta artéria. Assim, Asmussen (1980) relacionou o fumo do tabaco com o desenvolvimento da hipertensão arterial e doença cardíaca. A exposição a baixos valores de NO provoca danos ao nível arterial. Assim, os estudos para avaliar os danos vasculares provocados pelo fumo do tabaco demonstraram que a superfície endotelial das artérias umbilicais de mulheres não fumadoras apresentam um padrão regular de células fusiformes. O endotélio que reveste a superfície luminal corresponde ao tipo contínuo, com junções intercelulares fechadas. O citoplasma é rico em organelos altamente desenvolvidos como: retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexos de Golgi. Os núcleos estão presentes, assim como os nucléolos, centríolos e lisossomas. Foi também descrita a ausência de membrana elástica, uma vez que não houve demarcação nítida entre a camada íntima e média. Apenas se observou entre estas 2 camadas uma fina membrana basal. Em mulheres fumadoras a constatação mais notável foi o aparecimento de células endoteliais irregulares com uma aparência de paralelepípedos. O retículo endoplasmático rugoso apareceu dilatado e dois tipos de lisossomas foram vistos [174, 175].

1.4.2. Mecanismo de regulação da HUA

Os mecanismos de regulação da contractilidade da HUA são muito importantes para a troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta, como já foi referido. Vários autores descrevem que o aumento da resistência vascular em algumas patologias, como na pré-eclâmpsia e no atraso do crescimento intrauterino, está associado ao aumento da libertação de vários agentes vasodilatadores. Estudos recentes, têm indicado que o sistema umbilical arterial tem uma pobre resposta para agentes relaxantes, tais como acetilcolina, nitrito de sódio e adenosina, embora estes agentes apresentem respostas eficazes no sistema arterial sistémico [176]. Deste modo, torna-se importante o estudo de dilatadores eficazes, para melhorar o fluxo feto-placentário, assim como a elucidação dos mecanismos precisos que regulam a

contractilidade da HUA. A união destes estudos pode ser um ponto fulcral na procura de novos alvos terapêuticos em patologias associadas à gravidez [76].

A reatividade umbilical vascular é essencial para manter um sistema dilatado, de forma a manter uma baixa resistência ao fluxo sanguíneo que é transportado para a placenta, durante a gravidez [3]. Uma vez que os vasos do cordão umbilical não são enervados, o controlo do fluxo do sangue umbilical depende inteiramente de mediadores locais, tal como prostaglandinas, 5-HT e histamina, quer libertados localmente, ou existentes na circulação, ou alguns iões tal como potássio ou cálcio, como já foi referido [177, 178].

Em vasos umbilicais humanos, em concreto na HUA, vários estudos demonstraram a ação de várias substâncias vasoativas, como a serotonina (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) [173, 179, 180], histamina [179], bradicinina [181], KCl [176, 182] entre outros, induzem a vasoconstrição na HUA. A variação nestes agentes vasoconstritores pode afetar as respostas a diferentes vasodilatadores [176, 183]. Apesar da 5-HT e da histamina induzirem significantes contrações na HUA, a 5-HT é o agente mais potente e que tem maior eficácia como agonista vasoconstritor em vasos sanguíneos umbilicais possuindo uma extrema importância na regulação da resistência sistémica fetal [148, 184]. Além disso, Weiner et al. (1984a, 1984b) observou que os níveis da concentração de 5-HT no plasma e na placenta em mulheres com pré-eclampsia eram mais elevados do que em gestações normais. Estes autores sugeriram que este agente pode estar envolvido nesta patologia [185, 186].

A contração da HUA induzida pela 5-HT pode envolver 3 subtipos de recetores: 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}. Estes recetores podem estar envolvidos em respostas contrácteis, em casos de pré-eclampsia ou hipertensão [187-189]. Lovren et al. mostraram que os recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A} são expressos na HUA, mas eles não encontraram a expressão do recetor 5-HT_{1D} nesta artéria. Portanto, o efeito contráctil da 5-HT na HUA sem endotélio é devido à ativação de 2 recetores: 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}. O recetor 5-HT_{1B} é acoplado à proteína G_i/G_o, a qual inibe a adenilato ciclase. O recetor 5-HT_{2A} é positivamente acoplado à proteína G_q, cuja ativação aumenta aos níveis de IP₃. Outros dados sugerem ainda, que o recetor que induz a resposta contráctil na HUA é o recetor 5-HT_{2A}, sendo que nos casos de ativação dos recetores 5-HT_{1B/1D} esta resposta é apenas bifásica [179]. Além disso, dados recentes mostram a expressão dos recetores 5-HT₇ na artéria pulmonar de porco. Quando ativados, estes recetores interagem com a proteína G_s, estimulando a adenilato ciclase, mediando deste modo uma vasodilatação muito ligeira [179].

A histamina é uma amina vasoativa considerada como mediador de várias condições fisiológicas. Também é uma substância vasoativa que pode ativar diferentes recetores (H₁ a H₄). Em geral, os recetores H₁ estão acoplados à proteína G_q e causam a mobilização do cálcio intracelular. O recetor H₂ causa aumento da [cAMP] devido à ativação da proteína G_s. O recetor H₃ pode ser positivamente acoplado à proteína G_{i/o}. O recetor H₄, pode ser funcionalmente acoplado à proteína G_{i/o}, causando quer a mobilização do cálcio intracelular, quer inibição da atividade da adenilato ciclase [179]. Consequentemente, a contração da HUA pela histamina é

devido à ativação do recetor H_1 , a qual induz o aumento dos níveis de IP_3 [179]. Qualquer mudança na localização ou expressão destes recetores pode contribuir para alterar o efeito da histamina neste tecido. Por este motivo, estes recetores são potenciais alvos para desenvolver estratégias para o tratamento de algumas doenças, como a pré-eclampsia [179].

No referente ao endotélio, este controla o tónus do músculo liso vascular pela produção de mediadores que podem provocar vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes e antiplaquetários derivados do endotélio são o NO, a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF). Quanto às substâncias vasoconstritoras e ativadoras da agregação plaquetária podem citar-se: endotelina-1 (ET-1), angiotensina-II (ANG-II), os endoperóxidos (prostaglandina H_2 e tromboxano A_2), leucotrienos e espécies reativas de oxigénio [190, 191]. Apesar da importância do endotélio na regulação do tónus vascular, o presente estudo, consiste na observação dos mecanismos na ausência deste. Desta forma, vai ser possível determinar com mais clareza os mecanismos que regulam a contractilidade da HUA.

Em relação aos mecanismos de relaxação da HUA, pensa-se que as células endoteliais possuam um papel importante neste mecanismo. Num estudo clássico realizado por Furchgott and Zawadski, foi demonstrado que as células endoteliais que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos desempenham um papel importante no efeito vasoativo da acetilcolina [192]. O mecanismo pelo qual as células endoteliais exercem a sua influência, é devido à libertação de uma substância que interage com as células do músculo liso na parede dos vasos sanguíneos. Esta substância foi chamada originalmente de fator relaxante derivado do endotélio, que foi posteriormente identificado como o NO. O NO é um modulador parácrino de muitos processos fisiológicos no sistema cardiovascular, nervoso e imune [123]. A síntese do NO a partir do aminoácido L-arginina, necessita da ação da enzima, a sintetase do óxido nítrico (NOS). Esta enzima catalisa a formação de NO a partir do oxigénio e a L-arginina. Estão identificadas três isoformas da NOS, sendo duas constitutivas, a neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), e ainda uma indutível (iNOS). Todas as três isoformas são diméricas. Cada subunidade do dímero contém dois domínios: um domínio reductase e um domínio oxigenase. O dinucleotido de flavina e adenina (FAD), os cofactores mononucleotido de flavina (FMN) e dinucleotido de nicotinamida e adenina fosfato na forma reduzida (NADPH) ligam-se ao domínio reductase e os cofactores heme e tetrahydro-biopterina (BH4) ligam-se ao domínio oxigenase. A ativação da eNOS necessita da interação entre os dois domínios oxigenase e da ligação do complexo CaM-MLCK. A união deste complexo à enzima dá início ao processo catalítico. Este ocorre no heme do domínio oxigenase e envolve a transferência de eletrões entre os vários cofactores do domínio reductase (FAD, FMN e NADPH) para o heme do domínio oxigenase. Este complexo mecanismo molecular, que necessita de oxigénio molecular, tem como resultado a formação de L-citrulina mais o radical gasoso altamente lipofílico NO, como mostra a figura 18 [69, 193, 194].

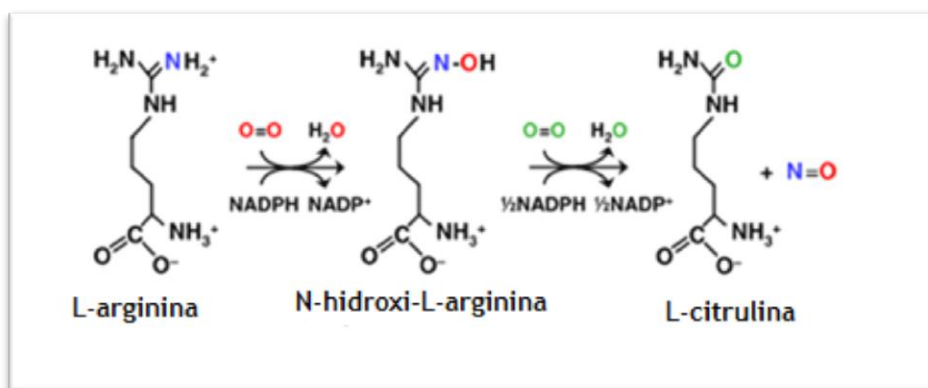


Figura 18: Representação esquemática dos dois passos catalisados pela sintetase do óxido nítrico [195].

O NO atravessa com facilidade a membrana, liga-se ao domínio “heme”, promovendo uma alteração conformacional na molécula sGC, aumentando a sua atividade entre 100 e 400 vezes. A ativação da sGC estimula a conversão da guanosina-5'-trifosfato (GTP) em cGMP, aumentando a sua concentração intracelular. O cGMP é considerado o principal mediador dos efeitos celulares produzidos pelo NO [195-199]. A acumulação de cGMP intracelular vai dar origem a uma cascata de acontecimentos, cujo resultado final é a diminuição do Ca²⁺ livre, intracelular e conseqüente relaxamento. Esta via NO-cGMP é responsável, pelo menos em parte, pelo relaxamento do SMC produzido por muitos agentes, incluindo nitrovasodilatadores, histaminas, estrogénios e insulina [113]. Estes agentes estimulam a célula endotelial a produzir e libertar o NO, que por sua vez atua sobre as células do músculo liso para aumentar a produção do cGMP [195, 200-203]. Atualmente está bem descrito o papel relevante do NO na regulação do tónus vascular da HUA. Os tecidos feto-placentários expressam a sintetase do NO endotelial e libertam o NO. Estudos realizados por Myatt et al. (1993) demonstraram que este vasodilatador, uma vez libertado, vai aumentar a relaxação da HUA durante a gravidez e inibir a contractilidade uterina [204, 205]. Esta ação biológica do NO pode ser atribuída à estimulação da GCs e subsequente produção de cGMP [189].

Outro estudo realizado por Leung et al. demonstrou que o nitroprussiato de sódio (SNP), um dador exógeno de NO, induziu uma pequena relaxação na HUA, *in vivo*. Outros dois outros vasodilatadores usados na indução da relaxação, a levromakalin e amlodipine, que não estão envolvidos na via de sinalização do NO, mostraram ser mais efetivos na relaxação do músculo liso da HUA, do que o SNP. Este facto comprova que o músculo liso da HUA possui baixa sensibilidade ao NO, o que pode contribuir para as complicações na gravidez, como a pré-eclampsia. Devido à baixa sensibilidade da HUA ao NO, os aumentos dos níveis deste vasodilatador, não pode por isso, compensar o aumento patológico do tónus arterial. No entanto, os nitrovasodilatadores são benéficos em relação a fármacos anti-hipertensivos, em condições patológicas em que há necessidade de diminuir a pressão do sangue materno, sem afetar o fluxo do sangue do cordão umbilical. Uma resposta excessiva ou inadequada a qualquer um destes vasodilatadores, pode aumentar o fluxo de sangue umbilical à placenta e, portanto,

pode provocar o desvio do sangue para fora do corpo fetal. Isto significa, que toda a manutenção do tónus vasomotor a vasodilatadores é também importante para a manutenção da circulação fetoplacentário do lado fetal [206].

1.5. Hipertensão gestacional e pré-eclampsia

Durante a gestação normal ocorrem alterações dramáticas no sistema cardiovascular materno que começam logo após a concepção, aumentando o fluxo e a oferta de nutrientes para a placenta e para o feto. O volume sanguíneo e o débito cardíaco aumentam 40 a 50% no primeiro semestre gestacional, há uma queda simultânea da pressão arterial, que começa no primeiro trimestre, e retorna ao nível pré-gestacional próximo do parto. Esta queda na pressão sanguínea ocorre através de vários eventos como: vasodilatação sistémica materna e baixa resistência na circulação feto-placentária. Contudo, quando estas condições se alteram podem dar origem a patologias, que podem levar à morte do feto e da mãe [207, 208].

Existem várias patologias associadas à gravidez, como é o caso da hipertensão e pré-eclampsia. Devido à elevada incidência deste tipo de doenças, torna-se preponderante o conhecimento mais profundo destas patologias, assim como a identificação dos riscos que estas mulheres possuem, para assim aumentar a vigilância e a criação de métodos de prevenção e farmacológicos de modo a diminuir a incidência das CVD durante a gravidez.

A-Pré-eclampsia

A pré-eclampsia é definida como um síndrome específico da gravidez observada após a 20ª semana de gestação com pressões iguais ou superiores que 140 x 90 mmHg, acompanhada de edema e a proteinúria. O edema pode estar em alguns casos, oculto. A proteinúria pode ser de aparecimento tardio e está associada a uma lesão renal, em que as células endoteliais do glomérulo são perdidas [209, 210]. O aparecimento desta patologia, pode afectar vários órgãos, tal como o fígado e o cérebro das mães. No caso de afetar a placenta, esta é o único órgão que ao ser removido pode suprimir a doença [211, 212].

Existem vários fatores de risco e específicos desta patologia, dentro dos quais temos os fatores genéticos. Há um risco sete vezes maior de ocorrência da doença para as mulheres que tiveram a doença em gestações anteriores. Outros fatores de risco clássicos que estão associados à pré-eclampsia são: idade materna superior a 40 anos, gravidez múltipla, resistência à insulina, obesidade, inflamação sistémica, pré-existência de hipertensão, diabetes ou doença renal [213, 214]. Vários estudos indicam que os fatores que aumentam o risco cardiovascular antes da gravidez, podem prever o aparecimento de pré-eclampsia. Este facto, sugere que a pré-eclampsia e as doenças cardiovasculares podem partilhar fatores de risco comuns [215].

Em suma, a pré-eclampsia é definida como uma doença multifactorial, sendo necessário desenvolver novas abordagens, nomeadamente estudar os mecanismos implicados nesta patologia de forma a combater eficazmente esta doença complexa e devastadora.

B-Hipertensão na gravidez

A hipertensão é a principal complicação na gravidez e a maior causa de morbimortalidade. Atinge várias camadas sociais, ocorre em torno de 12 a 22 % das gestações e é responsável por 17,6 % de mortes maternas nos Estados Unidos.

Quando a hipertensão se instala na segunda metade do período gestacional sem proteinúria e os níveis de pressão arterial diminuem cerca de 15 mgHg nas pressões diastólica e sistólica, ocorre a indução da hipertensão induzida pela gravidez (PIH) que apresenta fisiopatologia diferente da hipertensão crónica.

Geralmente, a PIH está associada a uma alteração na estrutura e composição dos vasos sanguíneos. Junek et al. relatou um aumento da espessura da túnica média e da íntima das artérias do cordão umbilical [216]. Por outro lado, Inan et al. relataram reduzidas áreas luminais e espessura da parede nas artérias e veia umbilicais, em comparação com gravidez normais e com hipertensão crónica [217]. A hipertensão afeta 10% das gestações, estando associada à elevada morbidade e mortalidade materna, bem como mortalidade peri-natal, restrição do crescimento intrauterino, prematuridade e complicações associadas a esta [218].

Capítulo II- Materiais e métodos

Secção I - Soluções e Materiais

Subsecção I- Soluções

Na tabela 1 seguinte, estão descritas as várias soluções utilizadas nos procedimentos experimentais deste estudo, assim como a sua composição.

Tabela 1. Soluções utilizadas na realização do estudo.

Soluções	Composição
Solução salina fisiológica (PSS)	NaCl 110 mM; CaCl ₂ 0,15 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 2 mM; HEPES 10 mM; NaHCO ₃ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 0,5 mM; NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM; glicose 10 mM e EDTA 0.49 mM pH 7,4
Solução antibiótico- antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000 U); estreptomicina (10 mg) e anfotericina (25 mg).
Solução de Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 Liofilizado, NaHCO ₃ (1,2 g/L) e ácido L-ascorbico (20 mg/L). pH 7,4
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS); Albumina de soro bovino (BSA -0,5%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5 µg/ml); fator de crescimento fibroblástico (FGF 0,5 ng/ml); heparina (2 µg/ml) e insulina (5 µg/ml) pH 7,4.
Solução <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) ou solução fosfato-salino diluído	NaCl; KCl; Na ₂ HPO ₄ e KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Solução de tripsina-EDTA	0,5 g de tripsina de porco e 0,2 g de EDTA
Solução fisiológica "planar cell surface área" (PCSA)	HEPES 5 mM; Glucose 6 mM; NaCl 135 mM e KCl 5,4 mM pH 7,4

Subsecção II- Químicos

Durante a realização do procedimento experimental, foi utilizado um fluoróforo denominado “fluorescein sodium salt” da marca Sigma-Aldrich, para marcação das células do músculo liso vascular. A histamina, a serotonina e o nitroprussiato de sódio (SNP) foram adquiridas por Sigma- Aldrich. O inibidor da ROCK, Y-27632 foi adquirido pela Tocris. Todas as drogas foram dissolvidas em água destilada. Todos os químicos usados na realização das soluções usadas no procedimento experimental foram adquiridos por Sigma-Aldrich, com exceção do KCl, NaCl, CaCl₂, KH₂PO₄, NaH₂PO₄ da marca Panreac, e a heparina da marca Applichem.

Subsecção III- Material

Durante a realização do trabalho experimental foram usados alguns equipamentos e materiais de laboratório. Na tabela seguinte, apenas estão descritos os que foram mais relevantes para a realização do presente trabalho.

Tabela 2. Material usado durante a realização do procedimento experimental.

Material	Marca
Balança digital	Sartorius
Medidor de Ph	Metrohm
Material cirúrgico específica	Tekno; FST; Dumostar; Stainless; Tekno
Caixas de petri específicas para o microscópio de fluorescência	Sarstedt
Frascos de cultura e multiwells (6 poçetos)	Orange scientific
Microscópio de fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
Sistema de incubação	Pecon
Software específico do microscópio de fluorescência	Axio Vision program 4,8

Secção II - Métodos

Subsecção I- Preparação do tecido

Os cordões umbilicais procederam de partos vaginais no término da gestação realizados no Bloco de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira. Os pais deram o seu consentimento informado para a utilização desta amostra biológica. Todos os procedimentos destas amostras foram aprovados pelo “Comité de Ética” do Centro Hospitalar da Cova da Beira, EPE (Covilhã, Portugal).

Os cordões umbilicais são recolhidos dentro de intervalos de tempo não superiores a 15 minutos após os partos, foram imediatamente colocados numa solução salina fisiológica (PSS). Como forma de evitar contaminações e degradação dos tecidos, uma mistura de antibióticos (penicilina, anfotericina, estreptomicina) e antiproteases (leupeptina 0,45 mg/l, benzamidina 26 mg/l e inibidor de tripsina 10 mg/l) foi adicionada ao PSS. As amostras foram sempre mantidas a 4°C. São excluídos os cordões umbilicais cujas mães apresentaram patologias durante a gravidez.

Subsecção II- Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana

A dissecação do cordão umbilical e cultura celular do mesmo foi obtida usando os procedimentos descritos por Martin et al e por Cairrão et al.

A dissecação das artérias do cordão umbilical foi realizada na sala de cultura, numa câmara de fluxo laminar, com todos os procedimentos de assepsia, nomeadamente o uso de material estéril, instrumentos e soluções. Inicialmente, o cordão umbilical foi colocado dentro de uma caixa de Petri com cerca de 35 mL de PSS e antibiótico, a 4° C e as artérias foram isoladas por dissecação da geleia de Wharton envolvente, utilizando material cirúrgico específico.

Após o isolamento da HUA, os segmentos da artéria foram cortados em rectângulos, e a túnica íntima (endotélio) foi mecânicamente removida com uma leve passagem de um cotonete estéril sobre a mesma. As artérias sem endotélio foram transferidas para uma nova caixa de petri com 3 ml de PSS e antibiótico. As camadas de músculo liso vascular foram extraídas, usando para o efeito pinça e bisturi cirúrgico [7, 219].

Posteriormente, recorreu-se à lavagem das camadas utilizando 5 ml de PSS sem antibiótico, e o mesmo procedimento foi realizado quatro vezes seguidas. As camadas foram transferidas para frascos de cultura, previamente revestidos com colagénio (5 µg/cm²) e colocadas a 37° C numa atmosfera de ar de 95% e CO₂ a 5%. Cerca de 15 minutos depois de permanecerem nas condições anteriores, foram adicionados 3 ml de meio de cultura. Após 24 horas de estabilização, a 37° C numa atmosfera de ar de 95% e CO₂, foram adicionados mais 2 ml de meio. O meio de cultura foi mudado cada 2-3 dias.

As culturas confluentes foram obtidas entre 20-30 dias. Quando as células apresentaram uma confluência entre 90-95% na superfície do frasco de cultura, foram passando por sucessivas tripsinizções. Subculturas destas células foram obtidas até ao máximo de 10 passagens [7, 220].

Subsecção III- PCSA (Planar Cell Surface Area)

- ***Procedimentos para experiências de microfotografia***

As células foram cultivadas em frascos de cultura e multiwells de 6 poços a uma temperatura de 37°C, numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Quando as culturas apresentaram confluência plena (95-98%), foram tripsinizadas e colocadas em caixas de petri com um vidro específico incorporado para fluorescência. Durante duas horas, as células foram colocadas na incubadora, a uma temperatura de 37° C, numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Para a marcação das células, foram preparadas soluções com quantidades distintas de fluoresceína, as quais se juntou meio sem soro. Deste modo, diferentes concentrações de fluoresceína foram testadas (entre 1 mM e 5 mM), até se obter a concentração ideal (1,5 mg/ml). Todo o procedimento a seguir foi realizado na ausência de luz. Após as 2 horas de estabilização, referidas anteriormente o meio HAUSMC (meio de cultura completo) foi removido e colocou-se a solução constituída pela fluoresceína e meio sem soro, cerca de 20 minutos. Após o período de incubação, foi removido a solução de fluoresceína e realizou-se no mínimo 2 lavagens com a solução de PCSA, para remoção do excesso do fluoróforo. Foram analisadas duas situações distintas: na presença e na ausência do ião cálcio. Para analisar a contractilidade das SMC na presença de cálcio, foi adicionado à caixa de petri 1 ml da solução de PCSA com diferentes concentrações de cálcio (previamente preparada), no segundo caso, não foi adicionada qualquer concentração de cálcio à solução de PCSA. As células foram observadas através do microscópio invertido de fluorescência de marca Zeiss Axio Observer Z1, com um sistema de incubação incorporado. O Axio Observer Z1 é um microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática. O sistema de incubação permitiu o controlo da temperatura, determinante para a manutenção das células. Antes da adição do agente contráctil [histamina (10 µM) ou serotonina (1 µM)], foi realizada uma primeira fotografia e adicionado posteriormente o agente. Passados 15/20 minutos após adição do agente, foi realizada uma segunda fotografia. Para analisar apenas o efeito do inibidor da ROCK (Y-27632, 40 µM), foi unicamente adicionado o Y27 após a indução da contração e realizada a foto 15 minutos depois. Por último, foi adicionado o SNP (10 µM) e o inibidor da ROCK e realizada a fotografia 15-20 minutos após a adição de cada vasodilatador. As imagens foram adquiridas com uma câmara digital de alta velocidade (Axio Cam Hsm). O campo de visualização apresentou no máximo 6 células, e foi utilizada a objetiva 20X e 40X. A análise e tratamento das imagens foram realizados pelo programa Axionvision 4.8 software, através do suplemento “Automatic measurementen programs”, que permitiu medir a diferença de área das células após a contração e posterior relaxamento.



Figura 19: Microscópio invertido de fluorescência de marca Zeiss Axio Observer Z1.

Subsecção IV- Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando segundo um programa estatístico SigmaStat Statistical Analysis System, versão 3.5 (2007). Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M. de n experiência. A significância estatística entre dois grupos de dados foi analisada utilizando o teste t-Student's. A comparação entre mais de dois grupos de dados foi analisada segundo o método ANOVA (one-way) e o teste Kruskal-Wallis One Way (teste não paramétrico), seguindo do teste post-hoc, teste de Tukey, para determinar as diferenças significativas entre as médias. Os níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos ($P < 0,05$).

Capítulo III - Objetivos

A artéria umbilical humana é o componente principal da circulação fetoplacentária e os mecanismos parácrinos e endócrinos que regulam o estado contráctil das células do músculo liso desta artéria são extremamente importantes para permitir a troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta, uma vez que estes vasos não são inervados. O controlo do tónus vascular é completamente dependente dos mediadores vasoativos libertados localmente, de substâncias transportadas pelo fluxo sanguíneo e de alguns iões como o potássio e o cálcio. Apesar do ião cálcio ser referido em vários estudos, como mediador da contractilidade muscular, na última década, têm surgido evidências de que além da via de contração do músculo liso vascular dependente do sinal de cálcio, existem outras vias adicionais independentes da concentração deste ião. Torna-se assim, importante analisar o(s) mecanismo(s) que funcionam de forma independente do influxo de cálcio. Deste modo, o mecanismo proposto neste estudo, consiste na ativação da via da Rho cinase e a possível interligação com a via da PKG.

O objetivo central deste trabalho foi tentar estabelecer a variação da capacidade contráctil das células musculares da artéria umbilical em função de diferentes concentrações de cálcio. E assim demonstrar uma possível relação entre a presença de diferentes concentrações intracelulares de cálcio, o efeito dos agonistas e a ativação da via da ROCK, assim como a possível ativação da via do cGMP/PKG.

Diferentes objetivos específicos foram definidos para atingir a correta resolução do objetivo central:

- 1- Isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana.
- 2- Otimização da técnica PCSA, utilizando o fluoróforo fluoresceína.
- 3- Análise do efeito contráctil da serotonina e histamina, nas células do músculo liso vascular a diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM), tal como na ausência deste.
- 4- Análise do efeito do inibidor específico da ROCK e do nitroprussiato de sódio nas células do músculo liso vascular, na presença de diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM).

Capítulo IV- Resultados

1-Efeito dos agonistas, 5-HT e histamina em meio com e sem cálcio

Foi analisado o efeito da ausência e de diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM) nas contrações induzidas pela histamina e a 5-HT na HUA. Quando as células foram contraídas pela 5-HT verificou-se que as contrações obtidas com diferentes concentrações de cálcio foram semelhantes ($p > 0,05$). Quando as células foram contraídas pela histamina, verificou-se que em presença de concentrações de 0,5 e 2 mM de Ca^{2+} , este agonista induziu contrações significativamente superiores ($p < 0,05$) às obtidas nas outras concentrações de cálcio. (figura 20).

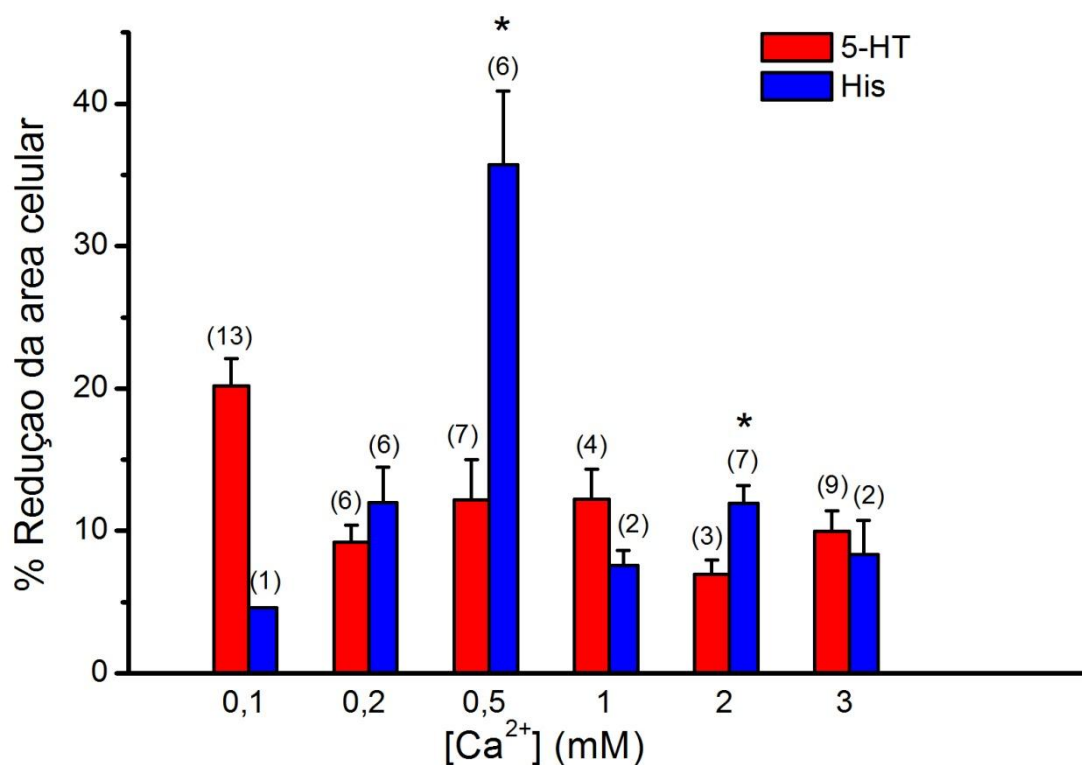


Figura 20: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μ M) e 5-HT (1 μ M) em meio com cálcio (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. * $P < 0,05$ versus o efeito em presença de 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste t-student's e Mann-Whitney (teste não paramétrico).

Por outro lado, em meio sem cálcio a histamina induziu maior efeito contráctil ($p < 0,05$) do que a 5-HT nestas condições (Figura 21).

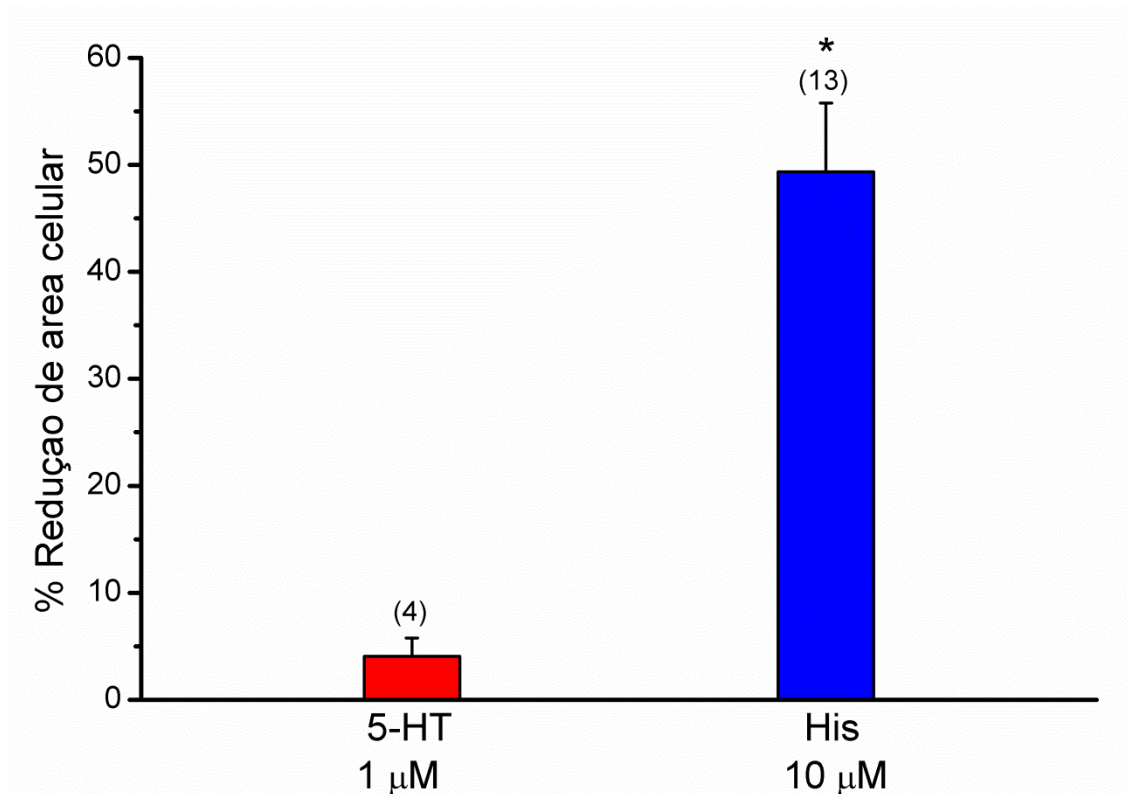


Figura 21: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μ M) e 5-HT (1 μ M) em meio sem cálcio. Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. *P < 0,05 versus o efeito em presença de 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste t-student's.

2-Efeito da inibição da Rho cinase nas contrações induzidas por 5-HT e histamina nas SMC vasculares da HUA

Neste estudo, foi analisado o envolvimento da Rho-cinase na regulação da contractilidade da HUA. Para tal, foi utilizado um inibidor específico desta cinase, o Y-27632 (Y27, 10 μ M). Primeiramente, o efeito deste inibidor foi analisado em meio fisiológico PCSA com quatro concentrações diferentes de cálcio (0,1; 0,2; 1 e 3 mM).

Em meio fisiológico com diferentes concentrações de cálcio as SMC foram contraídas com 5-HT (1 μ M) e histamina (10 μ M). Após estabilização das contrações, foi adicionado o inibidor e foi analisado o efeito na contração. Nestas condições, o Y27 não induziu efeitos significativos na contractilidade máxima provocada pela 5-HT (figura 22) e pela histamina (figura 23) ($p > 0,05$). Assim, a inibição da ROCK não afecta a contração induzida quer por 5-HT, quer por histamina.

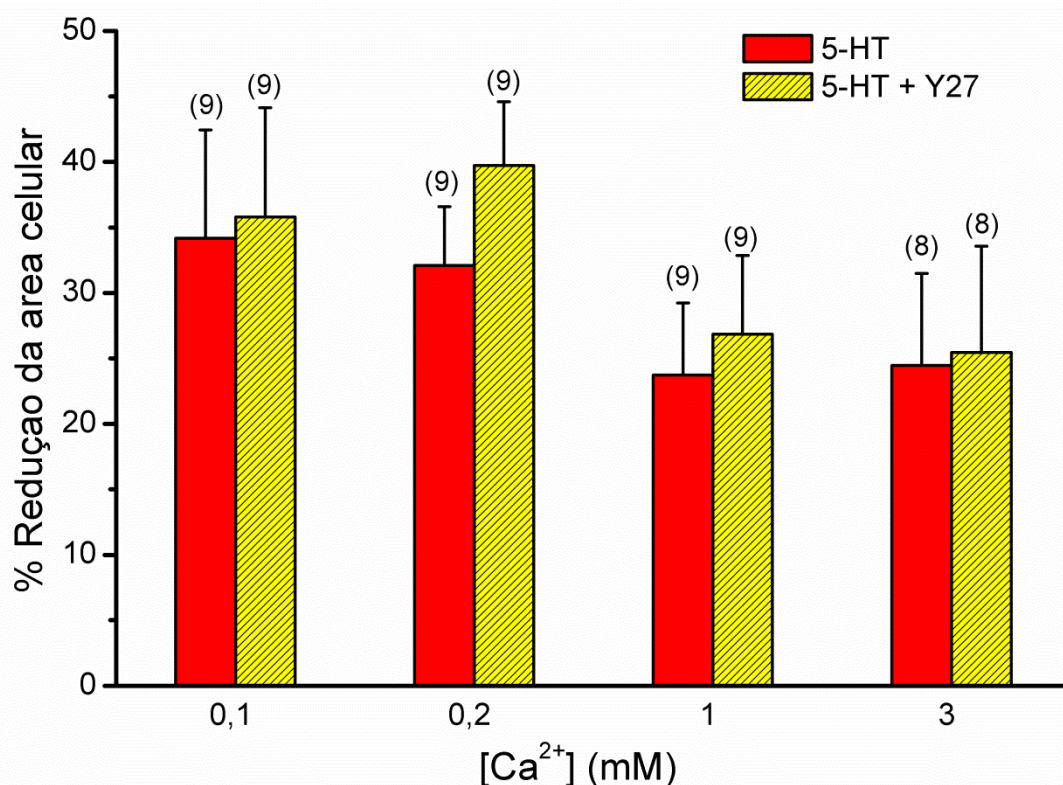


Figura 22: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela 5-HT (1 μ M) em presença e ausência de inibidor da Rho cinase (Y27) e em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 1 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. * $P < 0,05$ versus o efeito em presença de Y27. A análise estatística foi realizada pelo teste t-student's e Mann-Whitney (teste não paramétrico).

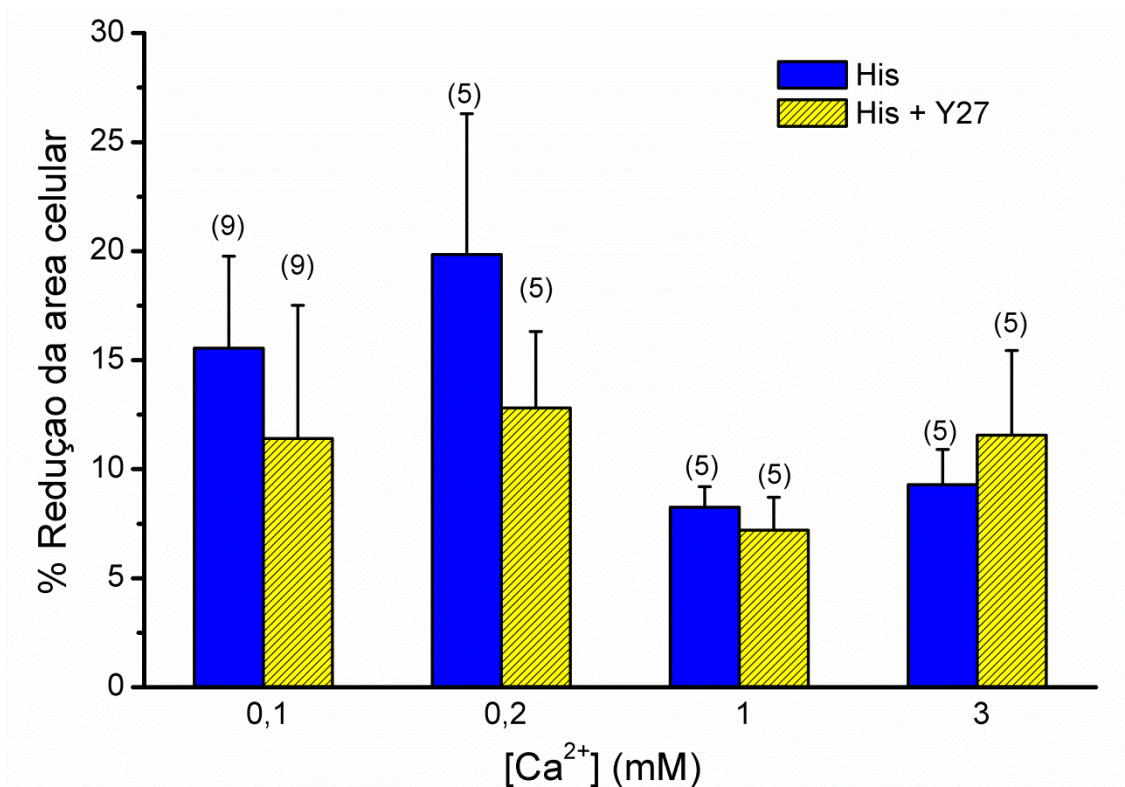


Figura 23: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μM) em presença e ausência do inibidor da Rho cinase (Y27) e em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 1 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. *P <0,05 versus o efeito em presença de Y27. A análise estatística foi realizada pelo teste t-student's.

3-Efeito do vasodilatador do dador de óxido nítrico (SNP) nas contrações induzidas por 5-HT e histamina nas SMC vasculares da HUA

O nitroprussiato de sódio (SNP) é num dador de óxido nítrico e um potente vasodilatador de artérias e veias. Para determinar o seu efeito nas SMC vasculares da HUA, primeiramente as células foram colocadas na solução fisiológica do PCSA a diferentes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; e 3 mM) e também na ausência deste. Posteriormente as células foram contraídas pela adição da 5-HT (1 μM) ou a histamina (10 μM) e posteriormente foi analisado o efeito do SNP nestas contrações.

A administração do SNP às SMC vasculares contraídas por 5-HT e histamina não modificou significativamente a percentagem da área celular independentemente da concentração de cálcio ou da ausência deste ião na solução fisiológica (figura 24 e 25).

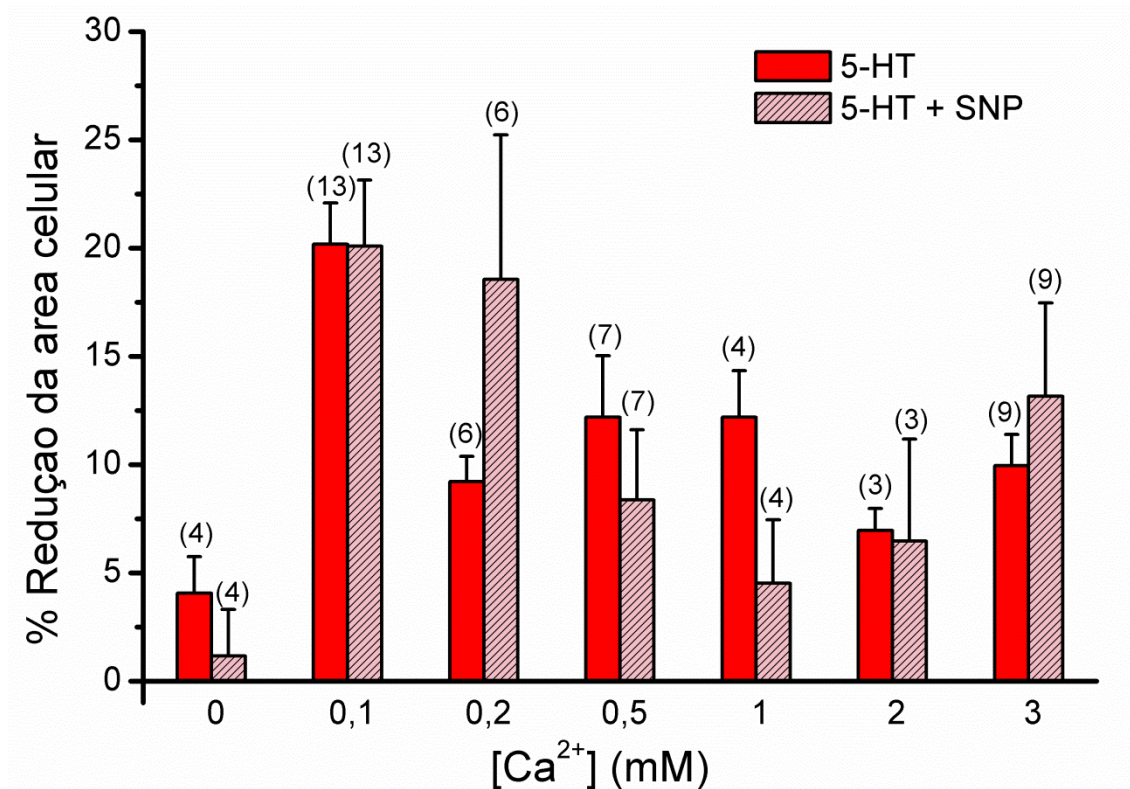


Figura 24: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela 5-HT (1 μ M) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. *P <0,05 versus o efeito em presença de SNP. A análise estatística foi realizada pelo teste t-student's.

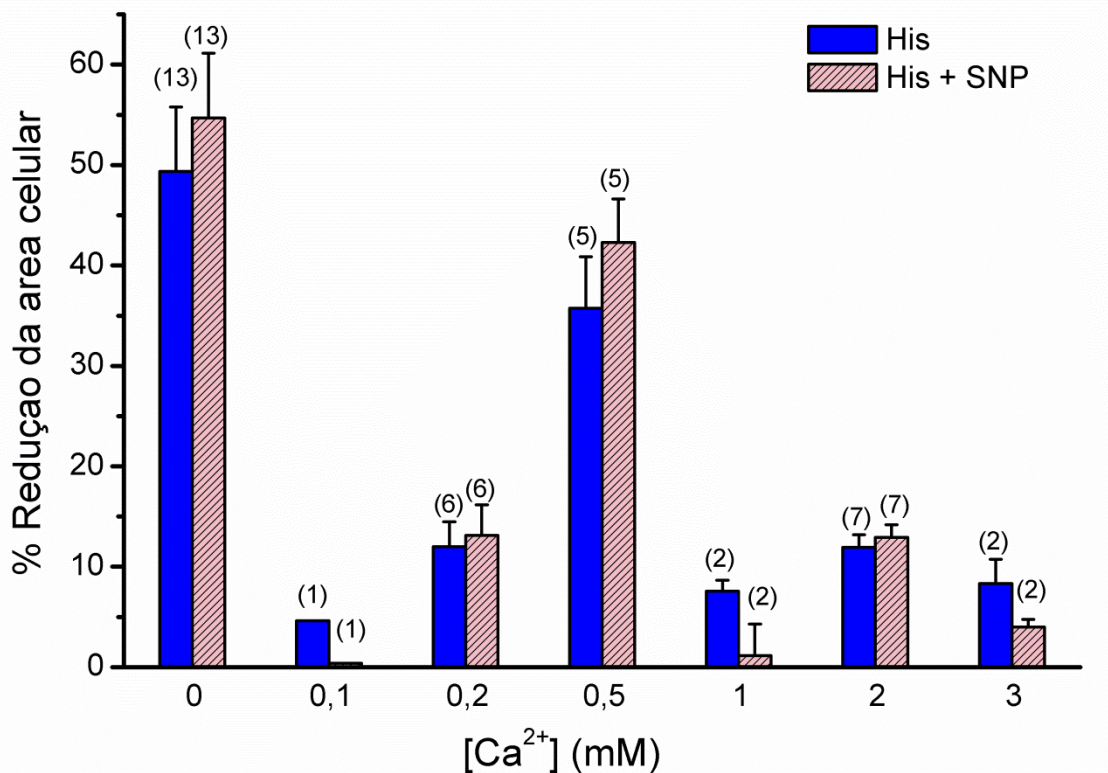


Figura 25: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μM) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. *P <0,05 versus o efeito em presença de SNP. A análise estatística foi realizada pelo teste t-student's.

4-Efeito do SNP e do inibidor Y27 nas contrações induzidas por 5-HT e histamina nas SMC vasculares da HUA

Para analisar a possível interligação da via PKG/cGMP com a via da ROCK, foi utilizado o SNP juntamente com o Y27. No nosso estudo, primeiramente, as SMC vasculares foram contraídas com 5-HT ou com histamina numa solução fisiológica de PCSA a diferentes concentrações de cálcio (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; e 3 mM). Posteriormente foram adicionados ambos os vasodilatadores sequencialmente, ou seja, primeiro foi adicionado o SNP e de seguida o Y27.

Os nossos resultados mostram que a uma concentração de 1 mM de cálcio extracelular a inibição da ROCK modificou significativamente o efeito do SNP ($p < 0,05$) em SMC contraídas por 5-HT (figura 26).

No referente à histamina, verificou-se que não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) na percentagem de redução da área celular, independentemente das concentrações de cálcio extracelular utilizadas, ou seja, o Y27 não modificou o efeito da administração conjunta de histamina e SNP (figura 27).

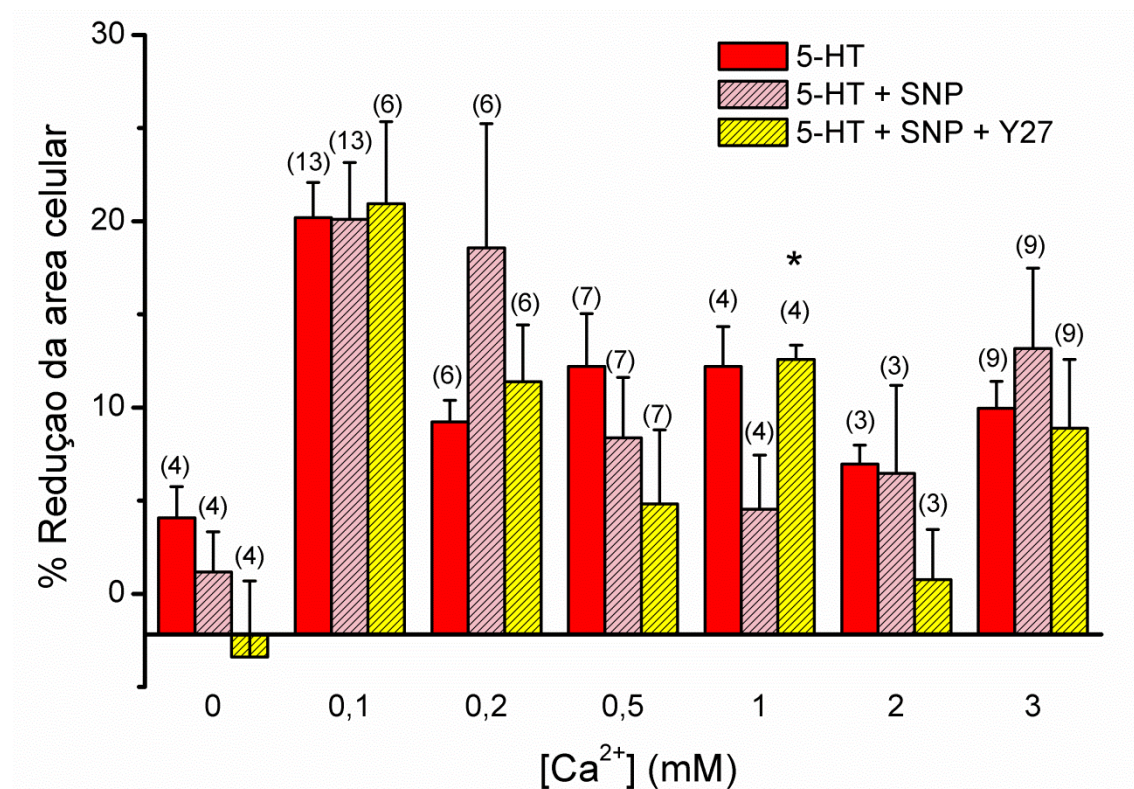


Figura 26: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela 5-HT (1 μ M) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e do inibidor Y27 em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. *P < 0,05 versus o efeito em presença de SNP e efeito conjunto do SNP e Y27. A análise estatística foi realizada pelo teste Anova one-way, seguido do teste post-hoc, teste tuckey.

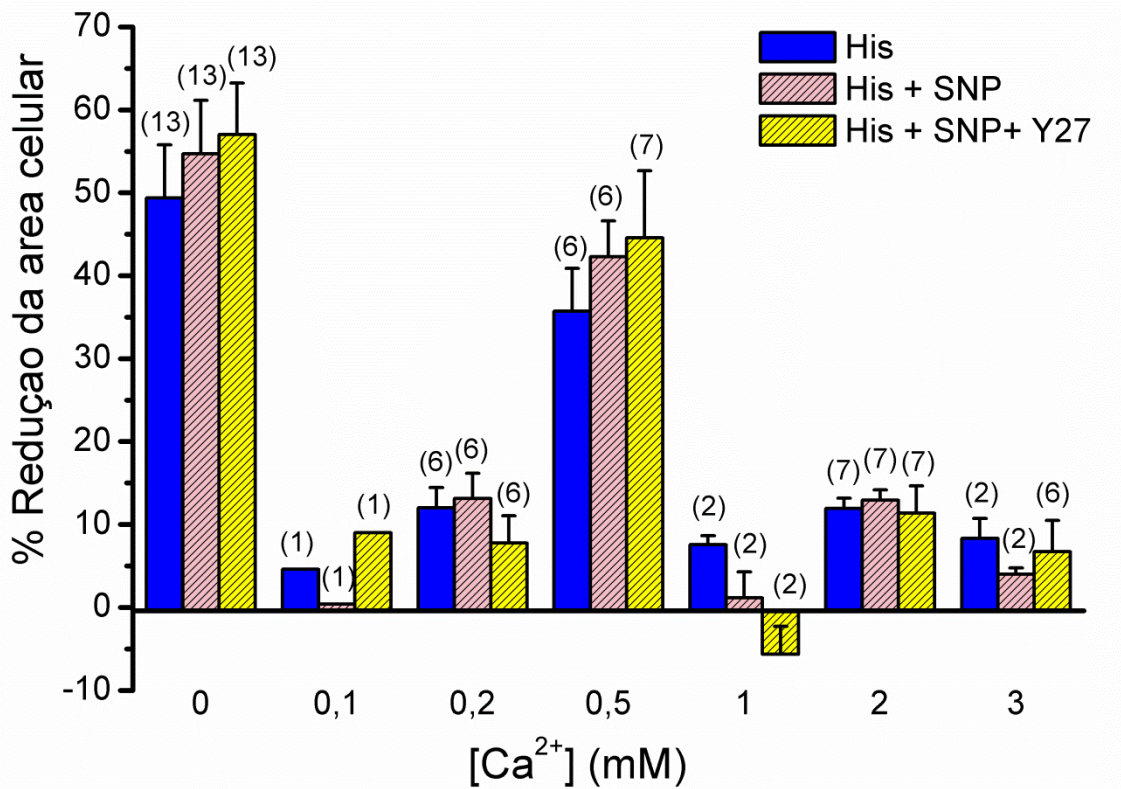


Figura 27: Contração das SMC vasculares da HUA induzidas pela histamina (10 μM) em presença e ausência do vasodilatador, SNP e do inibidor Y27 em soluções com diferentes concentrações de cálcio (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mM). Os dados foram expressos em % de redução da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. *P <0,05 versus o efeito em presença de SNP e efeito conjunto do SNP e Y27. A análise estatística foi realizada pelo teste Anova one-way, seguido do teste post-hoc, teste tuckey.

Capítulo V- Discussão

O cordão umbilical não é mais do que uma extensão do sistema cardiovascular fetal e por conseguinte, tem um grande potencial para ser utilizado em estudos de alterações nos tecidos fetais vasculares [171]. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo, utilizando a artéria umbilical humana e recorrendo ao banho de órgãos sugeriram que a regulação da contractilidade desta artéria envolvia a ativação da Rho-cinase e que dependia das concentrações de cálcio extracelulares do meio [2]. A elucidação do exato mecanismo que regula o estado contráctil desta artéria pode ser muito importante para detetar potenciais alvos no tratamento de várias patologias, como a pré-eclampsia.

O primeiro passo deste trabalho foi a obtenção de culturas puras de SMC da HUA. Um dos maiores problemas na realização de culturas primárias destas células é que estas podem-se diferenciar em fenotípico sintético, o que representa o espectro oposto das SMC vasculares contrácteis. Contudo, Cairrão et al. (2009) demonstraram que quando a cultura está em confluência plena e após 24 horas em meio sem soro, estas células apresentam principalmente o fenótipo contráctil [7]. De acordo com o nosso protocolo apenas se usou o meio sem soro aquando da marcação das células com fluoresceína, ou seja, cerca de 20 minutos, contudo a confluência plena foi sempre utilizada. Neste sentido, o tempo poderá não ter garantido em todas as situações o fenótipo contráctil das células. Deste modo, este ponto deverá ser tido em conta em experiências futuras.

Após a obtenção com sucesso de culturas puras de SMC da HUA, o passo seguinte foi a otimização da técnica PCSA (“planar cell surface area”). Primeiramente foi otimizada a concentração de fluoresceína, a qual se mostrou mais eficiente a uma concentração de 4 mM (dados não mostrados). Outro ponto muito importante foi a otimização da solução externa das células, a qual depois de testarmos várias, entre elas o PBS, a solução PCSA foi a mais eficiente. Uma desvantagem deste método é o uso da fluorescência para análise das amostras, uma vez que esta promove o aparecimento de um processo denominado por *fotobleaching*. O *fotobleaching* é caracterizado por um processo dinâmico no qual as moléculas de fluórocromo sofrem uma destruição química após a exposição da luz de excitação e assim vão perdendo a sua capacidade de fluorescência. Contudo, o fenómeno de fotobleaching tem sido a base de muitas técnicas de medição de fluorescência desenvolvida e aplicado com sucesso desde 1970 [221]. Neste sentido, para minimizar o efeito deste fenómeno neste estudo, cada experiência foi realizada no máximo entre 55-60 minutos e apenas foram tiradas no máximo 4 fotos em cada experiência.

O efeito de dois agentes contrácteis (5-HT e histamina) a diferentes concentrações de cálcio foi também analisado. Os nossos resultados mostraram que quando as SMC da HUA são contraídas pela 5-HT, o efeito contráctil foi similar independentemente da concentração de

cálcio. Pelo contrário, segundo Lam et al. (2007) a adição crescente de cálcio entre 0,01 e 4,44 mM induz um aumento significativo do tónus da artéria aorta de rato, pré contraída com 5-HT. Outros autores indicam ainda que contrações induzidas por 5-HT na HUA são dependentes do cálcio extracelular, verificando-se que estas contrações foram atenuadas pela adição de cálcio à solução fisiológica [222]. Em relação às contrações induzidas por histamina, observámos que quando a concentração de cálcio extracelular foi de 0,5 ou 3 mM as contrações foram superiores em relação às restantes concentrações de cálcio (0,1; 0,2; 1 e 2 mM). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo com artérias umbilicais, mostraram que as contrações provocadas pela 5-HT foram maiores em presença de concentrações de cálcio mais elevadas. Pelo contrário, quando em presença de concentrações de Ca^{2+} extracelulares elevadas (2,0 e 3,0 mM) as contrações induzidas pela histamina são menores que em presença de concentrações de cálcio mais baixas [2]. Em suma, os nossos resultados com células musculares lisas da artéria umbilical parecem não ser concordantes com os resultados obtidos na HUA por Feiteiro et al. e pelos restantes autores mencionados anteriormente.

Relativamente ao efeito contráctil induzido por estes agonistas em meio sem cálcio, podemos referir que os nossos dados demonstraram que a histamina induziu maior força contráctil, do que a 5-HT. Segundo Santos-Silva et al. (2010) na ausência de cálcio extracelular, a histamina e 5-HT provocaram contrações bifásicas na HUA, com uma componente fásica rápida (2-3 minutos) e uma componente tónica caracterizada por uma descida lenta (15-20 minutos) até à sua estabilização. A componente inicial foi associada com a libertação de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, enquanto que a componente tónica é dependente do aumento de cálcio extracelular. Verificou-se que as contrações induzidas pela 5-HT e pela histamina eram similares em meio sem cálcio, ao contrário dos dados obtidos com células musculares lisas [223]. Com o uso da técnica PCSA, a observação de ambas as componentes não é possível, porém as microfotografias são tiradas 15 minutos após adição da 5-HT, e 20 minutos após a adição da histamina, o que poderá indicar que estamos a visualizar apenas a componente tónica. Em suma, nas SMC da HUA diferentes concentrações de cálcio extracelular induzem diferentes efeitos dos agentes contracteis.

O passo seguinte deste estudo foi analisar o envolvimento da ROCK na regulação das SMC da HUA. Para tal, foi utilizado um inibidor específico desta cinase (Y27632). Oehata et al. desenvolveram o inibidor Y27, descrevendo-o como potente relaxante e inibidor das contrações induzidas por agonistas. Dos cinco inibidores testados por estes autores (Y-27632; Y-30141; Y-30964; HA107727 e H-7²⁸), o Y27 foi o que apresentou melhor seletividade: a sua afinidade para a ROCK foi 200 vezes maior, do que para a PKC, PKA ou para a cinase da cadeia leve de miosina a partir do cérebro de rato. Verificaram que a uma concentração entre 0,1 e 10 μ M, ocorria inibição da actividade da ROCK, sendo que a 100 μ M este já não é selectivo, inibindo a PKC e PKA, na aorta de coelho. Os mesmos autores, testaram o efeito do inibidor da ROCK em dois grupos de ratos, um grupo de ratos hipertensos e um segundo grupo de ratos controlo (sem hipertensão). Os resultados indicaram que a administração do inibidor nos modelos de ratos

hipertensos, diminuiu significativamente a pressão arterial, ao contrário dos ratos controle em que apenas foi observada uma ligeira e transitória descida na pressão sanguínea. Estes resultados sugeriram que a via da Rho/ROCK contribui para a regulação da pressão sanguínea *in vivo*. O Y27236 é portanto uma ferramenta valiosa para investigar as funções da ROCK e as suas implicações fisiopatológicas, podendo ser deste modo clinicamente importante [89].

Após definirmos o inibidor a usar no presente estudo, as SMC vasculares pré-contraídas pelos dois agonistas, foram sujeitas à presença deste e foi analisado o seu efeito a diferentes concentrações de cálcio extracelular (0,1; 0,2; 1 e 3 mM). Os nossos resultados mostraram que quando as SMC vasculares foram contraídas quer por 5-HT, quer por histamina o Y27 não provocou relaxações significativas independentemente da concentração de cálcio testada. Estudos prévios realizados por Santos-Silva et al. (2010) mostram que em presença de 0,5 mM de cálcio extracelular a inibição da ROCK não induz relaxações significativas na HUA contraída por 5-HT, histamina ou KCl (60 mM). Isto sugere que nas contrações induzidas tanto pela histamina, como pela 5-HT na presença de Ca^{2+} não há envolvimento desta via [223]. Estes dados estão assim de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo. Pelo contrário, outros autores mostraram que o Y27 relaxa a HUA contraída pela 5-HT em presença de 2,5 mM de Ca^{2+} extracelular, mas estes autores usaram concentrações do inibidor muito elevadas (100 μ M) [224]. Assim, estes autores usaram uma concentração de inibidor 10 vezes superior à nossa, o que poderá indicar que este inibidor poderá estar a inibir outra cinase, deixando de ser selectivo. Outros estudos realizados por Sakurada et al. (2003) mostraram que a ativação da Rho induzida pelo KCl (60 mM) e pela noradrenalina é fortemente dependente da presença de cálcio (1.5 mM) [225]. Por outro lado, estudos prévios realizados pelo nosso grupo sugerem que em presença de 0,5 mM de Ca^{2+} extracelular, o Y-27 não produz nenhum efeito nas contrações mediadas quer pela 5-HT quer pela histamina. Contudo, quando a concentração de Ca^{2+} extracelular foi de 3 mM o Y-27 provoca relaxamento das artérias contraídas pela 5-HT e pela histamina [2]. Assim, de acordo com os dados obtidos com células musculares lisas parece que a da ROCK não está envolvida no mecanismo de regulação da HUA, no entanto, é necessário aprofundar esta falta de coerência entre células e artérias.

O passo seguinte consistiu em investigar a possível influência da via cGMP/PKG na via da ROCK. Alguns autores descreveram que a PKG pode atenuar o aumento da atividade da ROCK, mediando relaxação através de ações antagonistas na MYPT1. Segundo Somlyo et al. (2003) os locais Thr696 e Thr853 encontrados na MYPT1 são identificados como os maiores locais de fosforilação inibitórios pela ROCK. A fosforilação do local Thr696 tem sido detetado em várias células, incluindo plaquetas, músculo liso, em células endoteliais humanas e células cancerígenas da próstata. A PKG pode estimular a atividade da MLCP através da interação com os motivos leucina zipper ou então com a MYPT1 nos resíduos Ser695 e Ser852 (sequência humana) da MLCP [87]. Desta forma, a PKG pode antagonizar a fosforilação induzida pela ROCK da MYPT1, por fosforilação dos resíduos Ser695 e Ser852, que são locais imediatamente adjacentes aos resíduos Thr696 e Thr853 [87]. Sendo assim, a MLCP é um alvo fundamental para

a regulação da sensibilidade dos miofilamentos contrácteis ao cálcio [99]. Para testar esta hipótese, no nosso estudo foi utilizado o nitroprussiato de sódio (SNP), um dador exógeno do óxido nítrico. O NO estimula o aumento do cGMP por ativação da guanilato ciclase solúvel. Este nucleótido é considerado o principal mediador dos efeitos celulares produzidos pelo NO e um dos seus principais efeitos é a ativação da PKG [113]. Em geral, a ativação da PKG reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} das proteínas contrácteis e também promove a diminuição dos níveis de cálcio intracelular por inibição da libertação de cálcio das reservas intracelulares [126].

Os resultados demonstraram que em SMC vasculares contraídas quer por 5-HT, quer por histamina o SNP não induziu qualquer efeito sobre a percentagem da área das células. Contrariamente, Santos-Silva et al. (2008) observaram que em presença de 0,5 mM de Ca^{2+} extracelular o SNP provoca maior relaxação em HUA contraídas com histamina do que em artérias contraídas com 5-HT. O tempo para atingir o efeito relaxante do SNP foi entre 4-15 minutos [148]. Já Lovren and Tiggler mostraram que as relaxações induzidas pelo SNP (0.01 - 10 mM) na HUA pré-contraída com 5-HT eram menores quando comparadas, com um análogo do tromboxano (U46619) numa solução contendo 2,5 mM de Ca^{2+} extracelular. Neste estudo, foi também demonstrado que quando se aumenta os níveis de oxigénio há um aumento da potência vasodilatadora do SNP [226]. Os resultados obtidos por Lovren et al. sugerem que a presença de oxigénio é fulcral. Assim, a ausência de oxigénio nas experiências realizadas no nosso estudo poderá ter interferido os resultados finais. Em suma, e contrariamente ao descrito pelos autores mencionados, os nossos dados sugerem que o SNP não induz relaxação nas SMC vasculares isoladas.

Por último, depois de observar o efeito do SNP foi adicionado o Y27 para observar se havia mudanças no efeito observado previamente, analisando assim o efeito conjunto do SNP e do Y27. Em células em presença de 1 mM de Ca^{2+} extracelular e pré-contraídas pela 5-HT o inibidor modificou o efeito do SNP. Isto não ocorreu em presença de outras concentrações de extracelulares de cálcio. Estes resultados sugerem que a ROCK poderá ser activada na presença de um dador de óxido nítrico. Neste sentido são necessários mais estudos para analisar esta interligação entre a via cGMP e a ROCK. Já nas células contraídas pela histamina, o inibidor não produziu qualquer efeito na administração conjunta da histamina e SNP. Em pulmões do feto e de recém-nascidos a PKG é o principal caminho para a vasodilatação induzida por agentes que elevam o cGMP como os derivados do óxido nítrico e nitrovasodilatadores exógenos. O estudo realizado por Gao et al., consistiu na estimulação da actividade da ROCK pelo ácido araquidónico, em artérias pulmonares com hipoxia crónica pré-contraídas com 100 mM de KCl, utilizando a técnica do banho de órgãos. A inibição pelo Y27 (100 μ M) foi substancialmente maior do que em artérias controlo (o efeito do inibidor apenas foi medido 30 minutos após a sua adição). Segundo os mesmos autores, a activação da PKG pelo óxido nítrico e pelo cGMP pode interferir com a activação da Rho A e ainda sugerem que a PKG pode fosforilar a MYPT1 nos resíduos Ser⁶⁹⁵ e Ser⁸⁵², o qual resulta na diminuição da fosforilação dos resíduos Thr⁶⁹⁶ e

Thr⁸⁵³ pela ROCK, na MYPT1. Ou então, a PKG pode fosforilar diretamente a atividade da MLCP [99]. Os nossos dados sugerem que via cGMP/PKG não esta ligada à via da ROCK, uma vez que se houvesse esta ligação a adição do Y27 aumentaria o efeito de relaxação produzido anteriormente pelo SNP.

As diferenças observadas entre os autores supramencionados e o nosso estudo, podem dever-se a vários fatores nomeadamente, o tempo de estabilização após adição do Y27, a pré-incubação das SMC com o inibidor específico e a concentração de oxigénio presente. O tempo de estabilização para o Y27 foi cerca de 15-20 minutos, já nas experiências realizadas pelos autores Santos-Silva et al. o efeito produzido pelo inibidor foi determinado após 25 minutos, aproximadamente. Outros autores mencionaram um tempo de estabilização de cerca de 30 minutos. Nas nossas experiências não foi realizada a pré-incubação com o Y27 e em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, após pré-incubação dos anéis da HUA durante 15 min com Y-27 verificou-se uma diminuição significativa das contrações induzidas pela 5-HT e pela histamina [2]. Outro fator que também poderá ajudar a explicar as diferenças obtidas é a concentração de oxigénio. Os autores Quan et al. procederam ao estudo da reatividade vascular em artérias do cordão umbilical, recorrendo à técnica do banho de órgãos. Os anéis arteriais no sistema de banho de órgãos foram mergulhados numa solução de Krebs, apresentando 1,25 mM de Ca²⁺ extracelular. Este estudo permitiu comparar o efeito contráctil a diferentes concentrações de oxigénio, nomeadamente em condições normais (95% O₂) e baixas (2,5% O₂) deste gás. Os resultados demonstraram que a força contráctil induzida por 5-HT, KCl e histamina é maior em condições baixas de oxigénio [227]. No nosso estudo não foi induzido oxigénio na solução fisiológica PCSA, o que poderá ter influenciado os nossos resultados finais. Em suma, os nossos dados sugerem que as condições aplicadas tais como o tempo de estabilização, a pré-incubação das SMC vasculares com o Y27 e a presença de oxigénio podem ser determinantes na ação do inibidor e no efeito dos agonistas.

Capítulo VI- Conclusão

Este trabalho contribui para um conhecimento mais profundo dos mecanismos implicados na regulação da contractilidade da HUA. Foi demonstrado pela primeira vez em células do músculo liso da HUA, que as alterações na concentração de cálcio extracelular induzem diferentes efeitos na contractilidade provocada pelos agonistas. Com recurso a um inibidor específico da ROCK, verificou-se que a inibição desta cinase não afetou as contrações induzidas por 5-HT e histamina, numa solução fisiológica contendo diferentes concentrações de cálcio extracelular. Isto significa que a ROCK estará inativa a baixas e elevadas concentrações de cálcio, e que não se encontra envolvida na regulação da contractilidade da HUA. O SNP não induziu relaxação nas SMC vasculares contraídas por 5-HT e histamina tanto na presença como na ausência de cálcio e a adição conjunta do SNP e Y27, revela que a PKG não parece estar envolvida na via da ROCK.

Em suma, os nossos resultados demonstraram que o efeito da Ca^{2+} extracelular desempenha um papel chave na regulação da contractilidade da HUA, sendo este efeito independente da ativação da ROCK. Além disso, ainda sugerem numa perspectiva mais clínica que o controlo da concentração de Ca^{2+} ingerido pode ser um bom instrumento terapêutico em grávidas, na prevenção e tratamento de patologias, como a pré-eclampsia e hipertensão.

Capítulo VII- Bibliografia

1. Woodrum DA, Brophy CM. (2001) The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol*, 177, 135-43.
2. Feiteiro J. (2010) Estudo da Influência do Cálcio na Contractilidade da Artéria Umbilical Humana, pp 58.
3. Fox SB, Khong TY. (1990) Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta*, 11, 59-62.
4. Owens GK. (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 75, 487-517.
5. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*, 15, 100-8.
6. Hultgardh-Nilsson A, Krondahl U, Querol-Ferrer V, Ringertz NR. (1991) Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries. *Differentiation*, 47, 99-105.
7. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Alvarez E, Correia I, Verde I. (2009) Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 45, 175-84.
8. Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. (2003) Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1510-20.
9. Pauly RR, Bilato C, Cheng L, Monticone R, Crow MT. (1997) Vascular smooth muscle cell cultures. *Methods Cell Biol*, 52, 133-54.
10. Arthur J. Vander JHS, Dorothy S. Luciano. (2001) Human physiology: the mechanisms of body function.
11. Small JV, Sobieszek A. (1977) Studies on the function and composition of the 10-NM(100-A) filaments of vertebrate smooth muscle. *J Cell Sci*, 23, 243-68.
12. Lazarides E. (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283, 249-256.
13. Kurachi Y, Terzic A, Cohen MV. (2000) Heart Physiology and Pathophysiology.
14. Hodgkinson JL. (2000) Actin and the smooth muscle regulatory proteins: a structural perspective. *J Muscle Res Cell Motil*, 21, 115-30.
15. Phillips GN, Jr., Fillers JP, Cohen C. (1986) Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J Mol Biol*, 192, 111-31.
16. Lin JJ, Warren KS, Wamboldt DD, Wang T, Lin JL. (1997) Tropomyosin isoforms in non-muscle cells. *Int Rev Cytol*, 170, 1-38.
17. Furst DO, Cross RA, De Mey J, Small JV. (1986) Caldesmon is an elongated, flexible molecule localized in the actomyosin domains of smooth muscle. *EMBO J*, 5, 251-7.
18. Mabuchi K, Li Y, Tao T, Wang CL. (1996) Immunocytochemical localization of caldesmon and calponin in chicken gizzard smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 17, 243-60.
19. Hayashi K, Kanda K, Kimizuka F, Kato I, Sobue K. (1989) Primary structure and functional expression of h-caldesmon complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 164, 503-11.
20. Winder SJ, Walsh MP. (1990) Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*, 265, 10148-55.

21. Furst DO, Gautel M. (1995) The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *J Mol Cell Cardiol*, 27, 951-9.
22. Huxley HE. (2002) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356-1366, 1969. *Clin Orthop Relat Res*, S6-17.
23. Geeves MA, Holmes KC. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv Protein Chem*, 71, 161-93.
24. Babu GJ, Warshaw DM, Periasamy M. (2000) Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsc Res Tech*, 50, 532-40.
25. Stevens FC. (1983) Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol*, 61, 906-10.
26. Gallagher PJ, Herring BP, Stull JT. (1997) Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil*, 18, 1-16.
27. Geguchadze R, Zhi G, Lau KS, Isotani E, Persechini A, Kamm KE, Stull JT. (2004) Quantitative measurements of Ca²⁺/calmodulin binding and activation of myosin light chain kinase in cells. *FEBS Lett*, 557, 121-4.
28. Vogel HJ. (1994) The Merck Frosst Award Lecture 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem Cell Biol*, 72, 357-76.
29. Meador WE, Means AR, Quijcho FA. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*, 257, 1251-5.
30. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, 19, 325-41.
31. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273, 245-8.
32. Hartshorne DJ, Hirano K. (1999) Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem*, 190, 79-84.
33. Hirano K. (2007) Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci*, 104, 109-15.
34. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. (2004) Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 279, 37211-4.
35. Hirano K, Phan BC, Hartshorne DJ. (1997) Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 272, 3683-8.
36. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 11-21.
37. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol*, 98, 10-23.
38. Hagiwara S, Ozawa S, Sand O. (1975) Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol*, 65, 617-44.
39. Yu FH, Catterall WA. (2004) The VGL-chnome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*, 2004, re15.
40. Yamakage M, Namiki A. (2002) Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth*, 49, 151-64.
41. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci*, 17, 399-418.
42. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25, 533-5.

43. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 411-25.
44. Dolphin AC. (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S56-62.
45. Brueggemann LI, Martin BL, Barakat J, Byron KL, Cribbs LL. (2005) Low voltage-activated calcium channels in vascular smooth muscle: T-type channels and AVP-stimulated calcium spiking. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H923-35.
46. Kuo IY, Wolfle SE, Hill CE. (2011) T-type calcium channels and vascular function: the new kid on the block? *J Physiol*, 589, 783-95.
47. McDonald JC, Adamashvili I, Hayes JM, Aultman DF, Rhynes VK, Gelder FB. (1994) Soluble HLA class II concentrations in normal individuals and transplant recipients. Comparison with soluble HLA class I concentrations. *Transplantation*, 58, 1268-72.
48. Casteels R, Droogmans G. (1981) Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J Physiol*, 317, 263-79.
49. Xu SZ, Beech DJ. (2001) TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca²⁺ channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 88, 84-7.
50. Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX. (2002) Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L144-55.
51. Bergdahl A, Gomez MF, Wihlborg AK, Erlinge D, Eyjolfson A, Xu SZ, Beech DJ, Dreja K, Hellstrand P. (2005) Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, C872-80.
52. Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem*, 275, 32552-8.
53. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. (2011) Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol*, 704, 687-706.
54. Faraci FM, Heistad DD. (1998) Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78, 53-97.
55. Sobey CG. (2001) Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 28-38.
56. Jackson WF. (1998) Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation*, 5, 85-90.
57. Nelson MT, Quayle JM. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 268, C799-822.
58. Jackson WF, Huebner JM, Rusch NJ. (1997) Enzymatic isolation and characterization of single vascular smooth muscle cells from cremasteric arterioles. *Microcirculation*, 4, 35-50.
59. Aiello EA, Clement-Chomienne O, Sontag DP, Walsh MP, Cole WC. (1996) Protein kinase C inhibits delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 271, H109-19.
60. Rusch NJ, Liu Y. (1997) Potassium channels in hypertension: homeostatic pathways to buffer arterial contraction. *J Lab Clin Med*, 130, 245-51.
61. Wang R, Wang Z, Wu L. (1997) Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol*, 121, 927-34.
62. Bradley KK, Jaggar JH, Bonev AD, Heppner TJ, Flynn ER, Nelson MT, Horowitz B. (1999) Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol*, 515 (Pt 3), 639-51.

63. Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. (2000) Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K(+) current in K(+)-mediated vasodilation. *Circ Res*, 87, 160-6.
64. Kamouchi M, Van Den Brecht K, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. (1997) Modulation of inwardly rectifying potassium channels in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol*, 504 (Pt 3), 545-56.
65. Schubert R, Krien U, Wulfsen I, Schiemann D, Lehmann G, Ulfing N, Veh RW, Schwarz JR, Gago H. (2004) Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension*, 43, 891-6.
66. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*, 77, 1165-232.
67. Jackson WF. (2000) Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, 35, 173-8.
68. Warshaw DM, Fay FS. (1983) Cross-bridge elasticity in single smooth muscle cells. *J Gen Physiol*, 82, 157-99.
69. Santos-Silva AJ. (2009) Estudos dos mecanismos que regulam a contractilidade da artéria umbilical humana. In: Faculdade de Ciências da Saúde. Vol. PhD, pp 190. Universidade da Beira Interior, Covilhã.
70. Ebashi S, Wakabayashi T, Ebashi F. (1971) Troponin and its components. *J Biochem*, 69, 441-5.
71. Toyota N, Shimada Y, Bader D. (1989) Molecular cloning and expression of chicken cardiac troponin C. *Circ Res*, 65, 1241-6.
72. Somlyo AP, Somlyo AV. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372, 231-6.
73. Kamm KE, Stull JT. (1989) Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu Rev Physiol*, 51, 299-313.
74. Lin G, Fandel TM, Shindel AW, Wang G, Banie L, Ning H, Lue TF, Lin CS. (2011) Modulation of smooth muscle tone in the lower urinary tract: interplay of myosin light-chain kinase (MLCK) and MLC phosphatase (MLCP). *BJU Int*, 108, E66-70.
75. Mabuchi Y, Mabuchi K, Stafford WF, Grabarek Z. (2010) Modular structure of smooth muscle Myosin light chain kinase: hydrodynamic modeling and functional implications. *Biochemistry*, 49, 2903-17.
76. Webb RC. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, 27, 201-6.
77. Mooren FC, Kinne RK. (1998) Cellular calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1406, 127-51.
78. Akata T. (2007) Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth*, 21, 220-31.
79. Arner A, Pfister G. (1999) Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 63-146.
80. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. (2001) Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 32-9.
81. Guyton AC, Hall JE. (2006) Medical physiology. Elsevier Saunders, Mississippi.
82. Large WA, Wang Q. (1996) Characteristics and physiological role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *Am J Physiol*, 271, C435-54.
83. Nelson MT, Conway MA, Knot HJ, Brayden JE. (1997) Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J Physiol*, 502 (Pt 2), 259-64.
84. Yamazaki J, Duan D, Janiak R, Kuenzli K, Horowitz B, Hume JR. (1998) Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J Physiol*, 507 (Pt 3), 729-36.

85. Janssen LJ. (2002) Ionic mechanisms and Ca²⁺ regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282, L1161-78.
86. Kitazawa T, Gaylinn BD, Denney GH, Somlyo AP. (1991) G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 266, 1708-15.
87. Somlyo AP, Somlyo AV. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83, 1325-58.
88. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 271, 20246-9.
89. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389, 990-4.
90. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Kandabashi T, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. (1999) Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res*, 43, 1029-39.
91. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*, 261, 44-51.
92. Nobes C, Hall A. (1994) Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 77-81.
93. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol*, 147, 1023-38.
94. Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 274, 37385-90.
95. Muranyi A, Derkach D, Erdodi F, Kiss A, Ito M, Hartshorne DJ. (2005) Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett*, 579, 6611-5.
96. Gong MC, Fuglsang A, Alessi D, Kobayashi S, Cohen P, Somlyo AV, Somlyo AP. (1992) Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J Biol Chem*, 267, 21492-8.
97. Ichikawa K, Ito M, Hartshorne DJ. (1996) Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*, 271, 4733-40.
98. Patel CA, Rattan S. (2006) Spontaneously tonic smooth muscle has characteristically higher levels of RhoA/ROK compared with the phasic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, G830-7.
99. Gao Y, Portugal AD, Negash S, Zhou W, Longo LD, Usha Raj J. (2007) Role of Rho kinases in PKG-mediated relaxation of pulmonary arteries of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292, L678-84.
100. Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. (2009) cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol*, 137-62.
101. Dou D, Ma H, Zheng X, Ying L, Guo Y, Yu X, Gao Y. (2010) Degradation of leucine zipper-positive isoform of MYPT1 may contribute to development of nitrate tolerance. *Cardiovasc Res*, 86, 151-9.
102. Karim SM, Rhee AY, Given AM, Faulx MD, Hoit BD, Brozovich FV. (2004) Vascular reactivity in heart failure: role of myosin light chain phosphatase. *Circ Res*, 95, 612-8.
103. Ma H, He Q, Dou D, Zheng X, Ying L, Wu Y, Raj JU, Gao Y. (2010) Increased degradation of MYPT1 contributes to the development of tolerance to nitric oxide in porcine pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299, L117-23.

104. Payne MC, Zhang HY, Prosdocimo T, Joyce KM, Koga Y, Ikebe M, Fisher SA. (2006) Myosin phosphatase isoform switching in vascular smooth muscle development. *J Mol Cell Cardiol*, 40, 274-82.
105. Gao Y, Portugal AD, Liu J, Negash S, Zhou W, Tian J, Xiang R, Longo LD, Raj JU. (2008) Preservation of cGMP-induced relaxation of pulmonary veins of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia: role of PKG and Rho kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L889-96.
106. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. (2005) Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J*, 392, 249-61.
107. Cobb MH. (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol*, 71, 479-500.
108. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79, 143-80.
109. Chang L, Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37-40.
110. Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*, 7, 67-74.
111. Siow YL, Kalmar GB, Sanghera JS, Tai G, Oh SS, Pelech SL. (1997) Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. *J Biol Chem*, 272, 7586-94.
112. Gartner A, Nasmyth K, Ammerer G. (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev*, 6, 1280-92.
113. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*, 184, 409-20.
114. Morgan KG. (1990) The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca²⁺ indicator aequorin. *Cardiovasc Drugs Ther*, 4, 1355-62.
115. Somlyo AP, Wu X, Walker LA, Somlyo AV. (1999) Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 201-34.
116. Vaandrager AB, de Jonge HR. (1996) Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem*, 157, 23-30.
117. Sonnenburg WK, Beavo JA. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, 26, 87-114.
118. Polson JB, Strada SJ. (1996) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 403-27.
119. Wang R. (1998) Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol*, 76, 1-15.
120. Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. (2002) Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem*, 230, 31-47.
121. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, Schulz S. (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*, 338, 78-83.
122. Bettencourt P. (2002) Brain natriuretic peptide (nesiritide) in the treatment of heart failure. *Cardiovasc Drug Rev*, 20, 27-36.
123. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-42.
124. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. (1995) Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1475-9.
125. Uhler MD. (1993) Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem*, 268, 13586-91.
126. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, 275, 21722-9.

127. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306, 174-6.
128. Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. (1988) Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*, 252, 269-73.
129. Lincoln TM, Cornwell TL. (1991) Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels*, 28, 129-37.
130. Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. (1991) Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem*, 266, 12337-41.
131. Komori K, Suzuki H. (1987) Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ Res*, 61, 586-93.
132. Orallo F. (1996) Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol Ther*, 69, 153-71.
133. Haynes J, Jr., Robinson J, Saunders L, Taylor AE, Strada SJ. (1992) Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilation. *Am J Physiol*, 262, H511-6.
134. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, 546, 113-20.
135. Hardie DG. (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 144, 5179-83.
136. Rembold CM. (1989) Desensitization of swine arterial smooth muscle to transplasmalemmal Ca²⁺ influx. *J Physiol*, 416, 273-90.
137. Takuwa Y. (1996) Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca²⁺, protein kinase C and myosin light chain phosphatase. *Jpn Heart J*, 37, 793-813.
138. Rembold CM. (1992) Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, 20, 129-37.
139. Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y, Zeng XR, Inoue I. (1993) Mechanism of activation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Life Sci*, 53, 1129-35.
140. Francis SH, Noblett BD, Todd BW, Wells JN, Corbin JD. (1988) Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*, 34, 506-17.
141. Landgraf W, Hullin R, Gobel C, Hofmann F. (1986) Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem*, 154, 113-7.
142. McDaniel NL, Rembold CM, Richard HM, Murphy RA. (1991) Cyclic AMP relaxes swine arterial smooth muscle predominantly by decreasing cell Ca²⁺ concentration. *J Physiol*, 439, 147-60.
143. Bender AT, Beavo JA. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58, 488-520.
144. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*, 93, 280-91.
145. Wang H, Robinson H, Ke H. (2007) The molecular basis for different recognition of substrates by phosphodiesterase families 4 and 10. *J Mol Biol*, 371, 302-7.
146. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. (2003) Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol*, 64, 533-46.
147. Noguera MA, Ivorra MD, Lugnier C, D'Ocon P. (2001) Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in contractile responses of denuded rat aorta related to various Ca²⁺ sources. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 363, 612-9.

148. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Morgado M, Alvarez E, Verde I. (2008) PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol*, 582, 102-9.
149. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. (2003) Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 39, 67-86.
150. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 65, 1-52.
151. Houslay MD, Adams DR. (2003) PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*, 370, 1-18.
152. Loughney K, Martins TJ, Harris EA, Sadhu K, Hicks JB, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K. (1996) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 271, 796-806.
153. Bender AT, Ostenson CL, Wang EH, Beavo JA. (2005) Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 497-502.
154. Sonnenburg WK, Seger D, Beavo JA. (1993) Molecular cloning of a cDNA encoding the "61-kDa" calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Tissue-specific expression of structurally related isoforms. *J Biol Chem*, 268, 645-52.
155. Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H, Beavo JA. (1995) Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 270, 30989-1000.
156. Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, Beavo JA. (2002) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13260-5.
157. Sadhu K, Hensley K, Florio VA, Wolda SL. (1999) Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem*, 47, 895-906.
158. Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V. (2001) Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 66, 241-77.
159. Palmer D, Maurice DH. (2000) Dual expression and differential regulation of phosphodiesterase 3A and phosphodiesterase 3B in human vascular smooth muscle: implications for phosphodiesterase 3 inhibition in human cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol*, 58, 247-52.
160. Liu H, Maurice DH. (1999) Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem*, 274, 10557-65.
161. Bolger G, Michaeli T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, Riggs M, Wigler M, Ferguson K. (1993) A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol*, 13, 6558-71.
162. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom S, Hauth JC, Williams JW. (2009) *Williams obstetrics*. McGraw-Hill, New York.
163. Benirschke K. (1998) Remarkable placenta. *Clin Anat*, 11, 194-205.
164. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. (1997) Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*, 18, 53-64.
165. Filiz AA, Rahime B, Keskin HL, Esra AK. (2011) Positive correlation between the quantity of Wharton's jelly in the umbilical cord and birth weight. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 50, 33-6.
166. Romanowicz L, Galewska Z. (2011) Extracellular Matrix Remodeling of the Umbilical Cord in Pre-eclampsia as a Risk Factor for Fetal Hypertension. *J Pregnancy*, 2011, 542695.

167. Mauro A, Buscemi M, Provenzano S, Gerbino A. (2011) Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. *Folia Histochem Cytobiol*, 49, 211-8.
168. Sobolewski K, Malkowski A, Bankowski E, Jaworski S. (2005) Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta*, 26, 747-52.
169. Lukashev ME, Werb Z. (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*, 8, 437-41.
170. Radenkovic M, Radunovic N, Momcilov P, Grbovic L. (2009) Altered response of human umbilical artery to 5-HT in gestational diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep*, 61, 520-8.
171. Ferguson VL, Dodson RB. (2009) Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 144 Suppl 1, S108-13.
172. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. (2007) Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*, 45 Suppl A, A25-32.
173. Haugen G, Mellembakken J, Stray-Pedersen S. (1997) Characterization of the vasodilatory response to serotonin in human umbilical arteries perfused in vitro. The influence of the endothelium. *Early Hum Dev*, 47, 185-93.
174. Asmussen I, Kjeldsen K. (1975) Intimal ultrastructure of human umbilical arteries. Observations on arteries from newborn children of smoking and nonsmoking mothers. *Circ Res*, 36, 579-89.
175. Asmussen I. (1980) Ultrastructure of human umbilical arteries. Studies on arteries from newborn children delivered by nonsmoking, white group D, diabetic mothers. *Circ Res*, 47, 620-6.
176. White RP. (1988) Comparison of vasorelaxants in human basilar arteries and umbilical arteries. *Eur J Pharmacol*, 155, 109-15.
177. Rankin JH, McLaughlin MK. (1979) The regulation of the placental blood flows. *J Dev Physiol*, 1, 3-30.
178. Haugen G, Bjoro K, Stray-Pedersen S. (1991) Vasoactive effects of intra- and extravascular serotonin, PGE2 and PGF2 alpha in human umbilical arteries. *Gynecol Obstet Invest*, 31, 208-12.
179. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Marques B, Verde I. (2009) Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reprod Sci*, 16, 1175-85.
180. Tiritilli A. (2000) 5-hydroxytryptamine induces vasoconstriction of the human umbilical artery: effects of hypoxia and nicorandil. *Gynecol Obstet Invest*, 50, 77-83.
181. Radenkovic M, Grbovic L, Radunovic N, Momcilov P. (2007) Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep*, 59, 64-73.
182. Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Ogus E. (2003) Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci*, 72, 1321-9.
183. Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Johnson D, Vedernikov YP. (1995) Human umbilical vessels: responses to agents frequently used in obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol*, 172, 1395-403.
184. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. (2008) Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 376, 375-83.
185. Weiner CP, Gelfan R, Socol ML. (1984) Intrapartum treatment of preeclamptic hypertension by ketanserin--a serotonin receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol*, 149, 576-8.
186. Weiner CP, Socol ML, Vaisrub N. (1984) Control of preeclamptic hypertension by ketanserin, a new serotonin receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol*, 149, 496-500.
187. Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EA, Saxena PR, Vulto AG, MaassenVanDenBrink A. (2006) Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens*, 24, 1345-53.

188. Karlsson C, Bodelsson G, Bodelsson M, Stjernquist M. (1999) Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating circular smooth muscle contraction in the human umbilical artery. *Gynecol Obstet Invest*, 47, 102-7.
189. Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle C. (1999) Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br J Pharmacol*, 127, 1247-55.
190. Quyyumi AA. (2003) Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol*, 91, 19H-24H.
191. Neves MF, Kasal DA, Cunha AR, Medeiros F. (2012) Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension. *Int J Hypertens*, 2012, 187526.
192. Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
193. Rousseau DL, Li D, Couture M, Yeh SR. (2005) Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. *J Inorg Biochem*, 99, 306-23.
194. Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ. (2002) Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem*, 277, 31020-30.
195. Kannan MS, Johnson DE. (1995) Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. *Life Sci*, 56, 2229-38.
196. Bina S, Hart JL, Muldoon SM. (1995) Comparative effects of exogenous nitrovasodilators on cGMP levels in different canine blood vessels. *Life Sci*, 56, PL33-8.
197. Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1480-5.
198. Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS. (1996) Regulation of Ca(2+)-activated K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. *J Appl Physiol*, 81, 1264-72.
199. Quignard JF, Frapier JM, Harricane MC, Albat B, Nargeot J, Richard S. (1997) Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide. *J Clin Invest*, 99, 185-93.
200. Jiang H, Colbran JL, Francis SH, Corbin JD. (1992) Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem*, 267, 1015-9.
201. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, Van de Loo PG, Van der Linde HJ, Dik IE, Nijkamp FP. (1996) Induction of guinea pig airway hyperresponsiveness by inactivation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 302, 109-15.
202. Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL. (1996) Sodium nitroprusside stimulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 270, L338-45.
203. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-6.
204. Myatt L, Brockman DE, Langdon G, Pollock JS. (1993) Constitutive calcium-dependent isoform of nitric oxide synthase in the human placental villous vascular tree. *Placenta*, 14, 373-83.
205. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE. (1994) An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 170, 175-85.
206. Leung SW, Quan A, Lao TT, Man RY. (2006) Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early Hum Dev*, 82, 457-62.
207. MacGillivray I, Rose GA, Rowe B. (1969) Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci*, 37, 395-407.
208. Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Von Oeyon P, Papera S, Sealey JE, Laragh JH. (1980) Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Med*, 68, 97-104.

209. Thadhani R, Ecker JL, Kettyle E, Sandler L, Frigoletto FD. (2001) Pulse pressure and risk of preeclampsia: a prospective study. *Obstet Gynecol*, 97, 515-20.
210. Bosio PM, McKenna PJ, Conroy R, O'Herlihy C. (1999) Maternal central hemodynamics in hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 94, 978-84.
211. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA. (2007) Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol*, 24, 257-66.
212. Salafia CM, Pezzullo JC, Lopez-Zeno JA, Simmens S, Minior VK, Vintzileos AM. (1995) Placental pathologic features of preterm preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 173, 1097-105.
213. Yogev, Chen, Hod, Coustan, Oats, McIntyre, Metzger, Lowe, Dyer, Dooley, Trimble, McCance, Hadden, Persson, Rogers. (2010) Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 202, 255 e1-7.
214. Wolf M, Kettyle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R. (2001) Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation. *Obstet Gynecol*, 98, 757-62.
215. Romundstad PR, Magnussen EB, Smith GD, Vatten LJ. (2010) Hypertension in pregnancy and later cardiovascular risk: common antecedents? *Circulation*, 122, 579-84.
216. Junek T, Baum O, Lauter H, Vetter K, Matejevic D, Graf R. (2000) Pre-eclampsia associated alterations of the elastic fibre system in umbilical cord vessels. *Anat Embryol (Berl)*, 201, 291-303.
217. Inan S, Sancı M, Can D, Vatanserver S, Oztekin O, Tinar S. (2002) Comparative morphological differences between umbilical cords from chronic hypertensive and preeclamptic pregnancies. *Acta Med Okayama*, 56, 177-86.
218. von Dadelszen P, Ornstein MP, Bull SB, Logan AG, Koren G, Magee LA. (2000) Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis. *Lancet*, 355, 87-92.
219. Martin de Llano JJ, Fuertes G, Garcia-Vicent C, Torro I, Fayos JL, Lurbe E. (2007) Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels. *Transl Res*, 149, 1-9.
220. Torrecillas G, Medina J, Diez-Marques ML, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. (1999) Mechanisms involved in the somatostatin-induced contraction of vascular smooth muscle cells. *Peptides*, 20, 929-35.
221. Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke IH. (1995) Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*, 68, 2588-600.
222. Wylam ME, Samsel RW, Schumacker PT, Umans JG. (1993) Extracellular calcium and intrinsic tone in the human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 1475-81.
223. Santos-Silva A, Cairrao E, Verde I. (2010) Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. *Health*, 2, 321-331.
224. Ark M, Ozveren E, Yazici G, Korkmaz B, Buyukafsar K, Arikan O, Kubat H, Songu-Mize E. (2004) Effects of HA-1077 and Y-27632, two rho-kinase inhibitors, in the human umbilical artery. *Cell Biochem Biophys*, 41, 331-42.
225. Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y, Takuwa Y. (2003) Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res*, 93, 548-56.
226. Lovren F, Triggle C. (2000) Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol*, 131, 521-9.
227. Quan A, Leung SW, Lao TT, Man RY. (2003) 5-hydroxytryptamine and thromboxane A₂ as physiologic mediators of human umbilical artery closure. *J Soc Gynecol Investig*, 10, 490-5.