

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR



Tese de Mestrado em Bioquímica

*Estudo dos mecanismos implicados na vasorelaxação
induzida pelos estrogénios na artéria umbilical humana*



Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Health Sciences Research Centre

Bruno Joel dos Santos Marques

Covilhã, 2008

**Estudo dos mecanismos implicados na vasorelaxação
induzida pelos estrogénios na artéria umbilical humana**

TESE DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Bruno Joel dos Santos Marques

n.º1329

Este projecto foi desenvolvido na Universidade da Beira Interior, no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) durante o ano lectivo 2007/2008.

Orientação técnica e científica:

Prof. Dr. Ignácio Verde

AGRADECIMENTOS

Para o desenvolvimento e concretizar deste trabalho contribuíram várias pessoas a quem quero expressar o meu sincero agradecimento.

Quero agradecer ao Prof. Doutor Ignácio Verde pela experiência transmitida e orientação científica do presente trabalho, assim como pela disponibilidade demonstrada.

Agradeço também à Elisa pelos conhecimentos transmitidos e esclarecimento de dúvidas que foram surgindo ao longo do trabalho, pela ajuda, pelas explicações dadas, pela disponibilidade, paciência e todo o apoio que manifestou.

À Universidade da Beira Interior por me ter acolhido durante estes anos de estudo e ao CICS (Centro de Investigação em Ciências da Saúde) onde foi possível realizar este trabalho de investigação.

À minha mãe, pai e irmã por todo o esforço e dedicação que se mostraram essenciais ao longo de todo o percurso. A toda a minha família pela ajuda.

À Ângela por todo o carinho, afecto, presença e apoio nos bons e maus momentos.

Aos meus colegas de curso, especialmente, ao João, Joana, Tiago, César, Caty e Filomena pelo apoio, auxílio, força e boa disposição que revelaram.

Obrigado por estarem sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos, perante as alegrias, o stress, o desespero e aqueles momentos que não seria possível ultrapassar sem a força e ajuda de todos os que estiveram presentes.

A todos um grande bem-haja.

ÍNDICE

RESUMO -----	V
ABSTRACT-----	VII
ABREVIATURAS -----	IX
1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1 O músculo liso-----	1
1.1.1 Organização e descrição geral do músculo liso -----	2
1.1.2 Morfologia do cordão e da artéria umbilical -----	4
1.1.3 Mecanismo contrácteis do músculo liso vascular -----	5
1.1.4 Tónus vascular e determinação da actividade contráctil -----	6
1.2 Potencial de membrana e canais iónicos-----	9
1.2.1 Potencial de membrana e tónus vascular -----	9
1.2.2 Canais de potássio nas células musculares lisas vasculares -----	11
1.2.3 Regulação do tónus vascular pelos canais de Ca ²⁺ -----	17
1.3 Péptidos natriuréticos-----	20
1.3.1 Sinalização dos péptidos natriuréticos -----	21
1.3.2 Receptores tipo A, B e C de Péptidos natriuréticos-----	21
1.3.3 Transdução de sinal dos péptidos natriuréticos-----	22
1.3.4 Mecanismo pelo qual os péptidos natriuréticos induzem relaxamento -----	25
1.4 Nucleótidos cíclicos -----	26
1.4.1 AMPc -----	28
1.4.2 GMPc -----	31
1.4.3 PDE's -----	34
1.5 Estrogénios-----	36
2. MÉTODOS-----	43
2.1 Preparação dos tecidos -----	43
2.2 Determinação da tensão exercida nos anéis da AUH -----	43
2.3 Drogas e reagentes -----	45
2.4 Análise estatística -----	45
3. RESULTADOS -----	46
3.1 Efeito do 17β-estradiol na contractilidade da AUH-----	46
3.2 Efeito do 17β-estradiol nos canais iónicos da AUH -----	48

3.2.1 Canais de potássio -----	48
3.2.2 Canais de cálcio-----	52
3.3. Efeito do ANP e dos diferentes inibidores de fosfodiesterases nos relaxamentos provocados pelo ANP (péptido natriurético atrial) -----	55
3.4 Efeito dos inibidores de ciclasas no relaxamento do 17β estradiol -----	59
3.5 Efeito do colesterol na contractilidade na AUH -----	61
4. DISCUSSÃO -----	63
5. CONCLUSÕES -----	70
6. BIBLIOGRAFIA-----	71
7. ANEXOS -----	79

RESUMO

A artéria umbilical humana (HUA) está envolvida na circulação fetoplacentária. Os mecanismos endócrinos e parácrinos, que regulam o estado contráctil das células musculares lisas, são muito importantes para uma óptima troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta, uma vez que os vasos sanguíneos umbilicais não são enervados. Estudos anteriores demonstraram que 17β -estradiol induz um relaxamento vascular da HUA, dependente da concentração de hormona adicionada, no entanto, o mecanismo vasorelaxante desta hormona ainda permanece por esclarecer. O efeito do 17β -estradiol na contractilidade desta artéria foi analisado. Foi investigado o mecanismo vasorelaxante do estradiol, e sua participação na actividade dos canais iónicos e dos nucleótidos cíclicos (AMPc e GMPc). Estes últimos, são os principais segundos mensageiros ligados à vasodilatação. São sintetizados por ciclases e degradados por diferentes tipos de fosfodiesterases (PDE's). Usando uma técnica de banho de órgãos, os anéis de artérias umbilicais humanas (HUA) sem endotélio foram contraídos com seretonina (5-HT, 1 μ M), histamina (10 μ M) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM). Foi observado que o 17β -estradiol, para a concentração máxima utilizada (100 μ M), induz um efeito vasorelaxante nas AUH, contraídas com 5-HT ($34,3 \pm 4,9\%$), histamina ($55,9 \pm 4,1\%$) e KCl 60 mM ($51,4 \pm 6,5\%$). A utilização de glibenclamida, um inibidor de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), a 4-aminopiridina, um inibidor de canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) e um inibidor de canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}), o tetraetilamonio (TEA), reduziu o efeito vasorelaxante do 17β -estradiol em HUA contraídas com histamina. Em artérias contraídas com KCl (60 mM) e 5-HT (1 μ M), apenas a 4-aminopiridina e a TEA, diminuíram o efeito do 17β -estradiol. Foi também observado, o efeito da nifedipina, um inibidor de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L. Foi observado que a sua adição não influenciou o efeito relaxante do 17β -estradiol nas artérias contraídas com 5-HT, histamina e KCl. Foi demonstrado, que a estimulação da guanilciclase, pelo ANP (péptido natriurético atrial), relaxa a AUH em contracções induzidas com a histamina e 5-HT. Isto indica que, o aumento intracelular do nucleótido cíclico, GMPc, leva à vasodilatação da artéria umbilical humana. Investigou-se também, o efeito da inibição de PDE's nas artérias contraídas com 5-HT (1 μ M) e histamina (10 μ M). Demonstrou-se que o inibidor inespecífico das PDE's, o IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, 50 μ M) relaxou as

AUH contraídas com histamina ($49,9\% \pm 5,4$) e 5-HT ($20,7\% \pm 6,5$), o que aumentou o efeito relaxante do ANP, quando as artérias são contraídas com histamina ($72,5\% \pm 3,7$). Por fim, analisamos o efeito dos inibidores da guanilciclase, ODQ (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one, $30 \mu\text{M}$) e da adenilciclase, SQ (9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9*H*-purin-6-amine, $100 \mu\text{M}$) em artérias contraídas com 5-HT ($1 \mu\text{M}$) e histamina ($10 \mu\text{M}$). Observamos uma diminuição do relaxamento provocado pelo estradiol quando estes inibidores foram utilizados. Em resumo, os nossos resultados demonstram que, o relaxamento induzido pelo 17β -estradiol é parcialmente mediado pela activação de canais de K^+ e pelo bloqueio dos canais de Ca^{2+} . O aumento dos níveis de GMPc induz o relaxamento do músculo liso vascular do cordão umbilical humano. As PDE's estão envolvidas no relaxamento muscular mediado pelo ANP. O inibidor de guanilciclase reduz os efeitos relaxantes do 17β -estradiol em artérias contraídas com 5-HT ($1 \mu\text{M}$) e com histamina ($10 \mu\text{M}$).

ABSTRACT

The human umbilical artery (HUA) is involved in fetoplacental circulation. Endocrine and paracrine mechanisms that regulate the contractile state of smooth muscle cells are very important for optimum gas and nutrient exchange between the foetus and the placenta, since the umbilical blood vessels are not innervated. Previous studies have shown that 17β -estradiol induced dose-dependent vascular relaxation in HUA, although the mechanism of this action is still under debate. Some effects of 17β -estradiol on the contractility of this artery were analyzed. We investigated the involvement of ion channels and cyclic nucleotide (cAMP and cGMP), which are the main second messengers linked to vasodilatation, in this mechanism. They are synthesized by cyclases and degraded by different types of phosphodiesterases (PDE). Using a standard organ bath technique, rings of human umbilical arteries (HUA) without endothelium were contracted by serotonin (5-HT, 1 μ M), histamine (10 μ M) and potassium chloride (KCl, 60 mM). The vasorelaxant effect of 17β -estradiol was analyzed. 17β -estradiol (100 μ M) relaxed human umbilical arteries contracted with 5-HT (34.3 \pm 4.9%), histamine (55.9 \pm 4.1%) and KCl 60 mM (51.4 \pm 6.5%). Glibenclamide, an ATP-sensitive potassium-channels (K_{ATP}) inhibitor, 4-aminopyridine, a voltage sensitive potassium-channels (K_v) inhibitor and tetraethylammonium (TEA), which inhibits K_v channels and Ca^{2+} activated potassium channels (K_{Ca}) decreased the effect of 17β -estradiol on histamine contracted HUA. In arteries contracted with KCl (60 mM) and 5-HT (1 μ M) only 4-aminopyridine and TEA decreased the effect of 17β -estradiol. We also test the effects of nifedipine, a voltage activated Ca^{2+} channel inhibitor, which did not influence the relaxant effect of 17β -estradiol in arteries contracted with 5-HT, histamine and KCl. The stimulation of guanylylcyclase relaxed the histamine and 5-HT induced contractions indicating that intracellular increase of the cyclic nucleotide, cGMP, lead to vasodilatation of the human umbilical artery. We investigate, the effect of PDE inhibition on 5-HT (1 μ M) and histamine (10 μ M) contracted arteries. The unspecific PDE inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 50 μ M) relaxed histamine-contracted human umbilical artery on 49.9 \pm 5.4 and 5-HT on 20.7 \pm 6.5% and increase the relaxant effect of ANP when the arteries are contracted with histamine on 72.5 \pm 3.7. At last, we analyzed the effect of guanylylcyclases inhibitor, ODQ (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one, 30 μ M) and adenylylcyclase inhibitor SQ (9-

(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine, 100 μM) on 5-HT (1 μM) and histamine (10 μM) contracted arteries. We observed a diminution of the relaxation when we used these inhibitors. In summary, our results demonstrate that, the relaxation is partially mediated by activation of K^+ channels and the blockage of Ca^{2+} channel. The increase of cGMP levels induces relaxation of the human umbilical vascular smooth muscle. The PDE's are involved in smooth muscle relaxation mediated by ANP. The inhibition of guanylylcyclase reduce the relaxant effects of 17β -estradiol on 5-HT (1 μM) and histamine (10 μM) contracted arteries.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: Concentração intracelular de Ca²⁺ livre
4-AP: 4-aminopiridina
17β-HSD: 17β-hidroxiesteróide desidrogenase
AMPC: Monofosfato de adenosina cíclico
ANP: Péptido natriurético tipo A
ATP: Adenosina trifosfato
AUH: Artéria umbilical humana
BNP: Péptido natriurético tipo B
CMV: Célula muscular vascular
CMLV: Célula do músculo liso vascular
CNP: Péptido natriurético tipo C
DAG: Diacilglicerol
DAO: Diamina oxidase
DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium – F 12
DMSO: Dimetilsulfóxido
EAT: Éster aciltransferase
E_m: Potencial de membrana em repouso
GLI: Glibenclamida
GT: Glucuronosiltransferase
GTP: Guanina trifosfato
HDC: L-histidina descarboxilase
HIS: Histamina
IP₃: Inositol trifosfato
IP₃-cinase: Cinase do fosfatidilinositol
K_{ATP}: Canais de potássio dependentes de ATP
K_{Ca}: Canais de potássio dependentes de Ca²⁺
K_{ir}: Canais de potássio inward-rectifier
K_v: Canais de potássio dependentes de voltagem

KCl: Cloreto de potássio
MAO B: Monoamina oxidase B
MLC: Cadeia leve de miosina cinase
MLV: Músculo liso vascular
NIF: Nifedipina
NSSC: Canais de catiões operados por voltagem não selectivos
PDE: fosfodiesterase
PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC: Proteína cinase C
PLC: Fosfolipase C
PMCA: Ca²⁺-TAPase da membrana plasmática
PSS: Solução salina fosfato
RIP₃: Receptor de IP₃
RRy: Receptores de Ryanodina
RE's: Receptores de estrogénios
RIP₃: Receptores de IP₃
ROCC: Canais de cálcio operados por receptores
RRy: Receptores de rianodina
RS: Retículo sarcoplasmático
SAC: Canais de Ca²⁺ *stretch-activated*
SER: 5-HT (Seretonina)
SNC: Sistema nervoso central
SOC: Canais de Ca *store-operated*
ST: Sulfotransferase
TEA: Tetraetilamónio
VOCC: Canais de cálcio operados por voltagem

1. INTRODUÇÃO

1.1 O músculo liso

O tecido muscular liso faz parte dos diversos sistemas e órgãos dos mamíferos, como os vasos sanguíneos e órgãos viscerais, onde é sujeito a vários estímulos de natureza mecânica, hormonal e neuronal [1]. A contractilidade das células deste músculo é fundamental para vários processos biológicos, como é o caso da manutenção do tónus vascular e pressão, das contracções uterinas que provocam o parto e do processo digestivo no intestino, entre outros [2]. O mau funcionamento do músculo liso está associado a patologias, tais como, hipertensão, bronquite asmática e nascimento prematuro. Existe uma grande diversidade relativamente à estrutura e propriedades das suas células, bem como à organização destas no tecido. Esta diversidade permite que exista um elevado grau de especialização para as diferentes necessidades fisiológicas dos diferentes órgãos e condições fisiológicas [1, 2]. Nos últimos anos têm existido grandes avanços no que diz respeito à elucidação da fisiologia do músculo liso, mas muitos dos fenómenos que envolvem as interacções moleculares das proteínas contrácteis e estruturais deste músculo necessitam ainda de mais investigação [1].

1.1.1 Organização e descrição geral do músculo liso

O músculo liso é composto por miócitos de forma fusiforme, com 30 a 200 µm de comprimento e 5 a 10 µm de largura no centro, com um volume semelhante ao de um monócito. O músculo liso pode ser genericamente dividido em dois tipos:

- músculo liso multiunidade;
- músculo liso unitário.

O músculo liso multiunidade é composto por fibras musculares que actuam de uma forma totalmente independente umas das outras e que são habitualmente enervadas por um único terminal nervoso. Este tipo encontra-se em algumas artérias de maior calibre, como é o caso, das vias das artérias pulmonares [3].

O músculo liso unitário é formado por miócitos que estão electricamente emparelhados uns com os outros, através de *GAP-junctions*, que são canais hidrofílicos que ligam os citoplasmas das células adjacentes. Este tipo de músculo está presente na maioria dos vasos sanguíneos do tracto urinário, digestivo, respiratório e reprodutivo [4].

No citoplasma de uma célula muscular lisa destaca-se o citoesqueleto e o aparelho contráctil. O citoesqueleto é responsável pela manutenção da forma fusiforme das células, constituindo uma estrutura com a qual outros elementos da célula podem interagir [4]. No aparelho contráctil, observam-se três tipos de filamentos:

- a) Filamentos finos compostos principalmente por actina;
- b) Filamentos densos (menos abundantes) compostos principalmente por miosina;
- c) Filamentos intermédios que consistem principalmente em vimentina no músculo

vascular. Pensa-se que estes filamentos intermédios desempenham uma função sobretudo a nível estrutural [1].

Os filamentos densos (miosina) e finos (actina) estão organizados obliquamente na célula muscular lisa, fixos à membrana citoplasmática por placas densas e dentro do citoplasma por corpos densos (*Fig.1*) [5]. O mecanismo fundamental em que se baseia o desenvolvimento de força, é basicamente o mesmo no músculo liso e no músculo estriado. Em ambos os tecidos, a produção de força ocorre como resultado de uma interacção cíclica de pontes cruzadas que causa o deslizar dos filamentos adjacentes de actina e miosina entre eles. Este modelo é designado por “modelo do deslizamento” dos filamentos na contracção (*Fig.3*) [6].

Através de uma variedade de mecanismos eléctricos e não eléctricos, as células musculares lisas produzem contracções ou relaxações coordenadas, para levarem a cabo as suas funções nos órgãos onde se encontram. O músculo liso vascular recobre o lúmen das artérias para formar a camada média (muscular) (Fig.1). Quando um estímulo excitatório actua nas células do músculo liso, induz uma contracção coordenada destas células reduzindo-se assim o diâmetro da artéria, atenuando o fluxo sanguíneo para os órgãos distais.

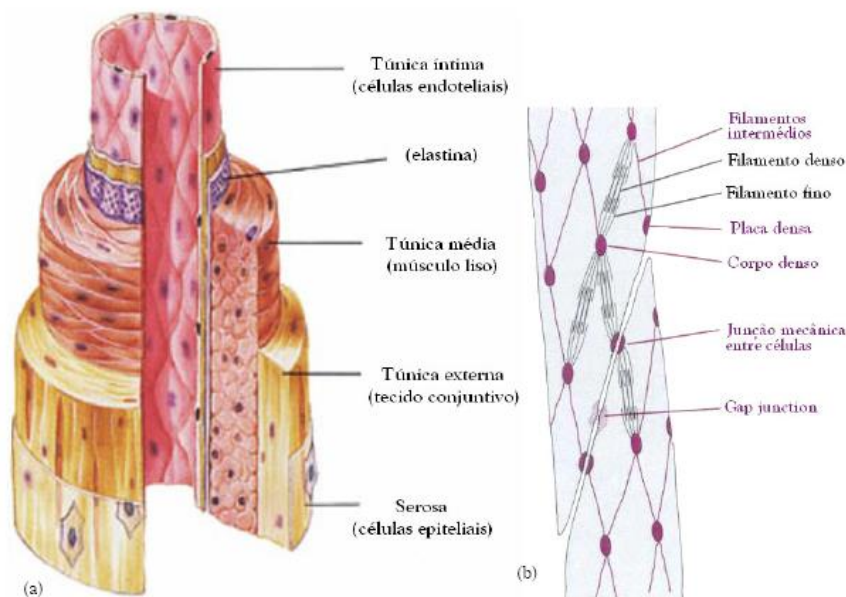


Fig.1: (a) Organização geral dos tecidos numa artéria.

(b) Representação esquemática da organização das células musculares vasculares e dos seus elementos contrácteis.

1.1.2 Morfologia do cordão e da artéria umbilical

O cordão umbilical (*Fig.2*) é uma estrutura vital para o crescimento e bem-estar do feto. Embora este seja provavelmente o único órgão que “morre quando a vida começa”, é uma estrutura essencial pois une o embrião à placenta [7]. O seu comprimento varia em média entre 50 a 60 cm no final da gestação, e apresenta três vasos sanguíneos que se encontram envolvidos de forma helicoidal na geleia de *Wharton* [7]. As duas artérias umbilicais levam o sangue venoso do embrião para a placenta, enquanto que a única veia transporta o sangue arterial da placenta para o embrião [8]. Em conjunto estas estruturas garantem a nutrição e respiração do embrião.

A geleia de *Wharton* (tecido mucóide) é composta por um baixo número de fibroblastos, elevadas quantidades de fibras de colagénio, substância fundamental, ácido hialurónico e sulfatos de glicosaminoglicanos [9].

As artérias umbilicais estão rodeadas apenas por uma camada de células epiteliais, achatadas ou cúbicas, não contêm nenhuma camada subendotelial subjacente ou lâmina elástica interna, e o endotélio encontra-se adjacente às camadas musculares. As camadas musculares são compostas por uma camada longitudinal interna (de lúmen irregular), sem nervos nem “*vasa vasorum*”, e uma camada circular externa que tem continuação na geleia de *Wharton* [9].

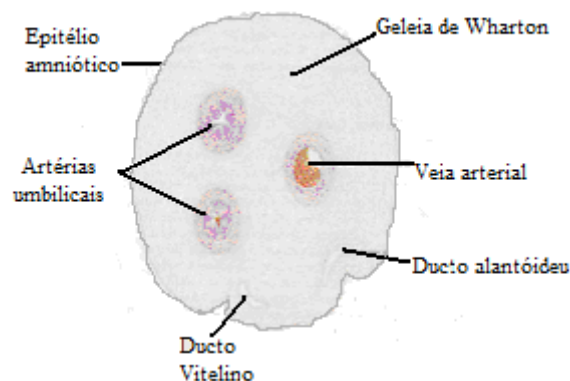


Fig.2: Corte transversal do cordão umbilical [9] com visualização das duas artérias umbilicais, veia umbilical e geleia de *Wharton*.

Estudos recentes demonstraram que alterações na morfologia e composição do cordão umbilical podem influenciar o decorrer da gravidez. Estas alterações estão frequentemente relacionadas com a restrição do crescimento fetal, distúrbios no coração do feto, entre outras, implicando perigo fetal [7, 10].

1.1.3 Mecanismo contrácteis do músculo liso vascular

Em condições fisiológicas, o principal papel das células musculares lisas diferenciadas é gerar força para uma contração. A intensidade desta força deve ser regulada com precisão por uma variedade de estímulos contrácteis extracelulares. O sinal intracelular predominante, responsável pela activação da maquinaria contráctil da célula, leva ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). O início da contração está associado com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e com a sua ligação à proteína ligadora de Ca^{2+} , a calmodulina. Este complexo Ca^{2+} -calmodulina activa a cinase das cadeias leves da miosina e aumenta a fosforilação das cadeias leves reguladoras da miosina. As cadeias leves da miosina fosforiladas promovem a interacção entre os filamentos de actina e de miosina, activam a ATPase da miosina e induzem a interacção cíclica de pontes cruzadas, originando a força contráctil [7, 11] (Fig.3).

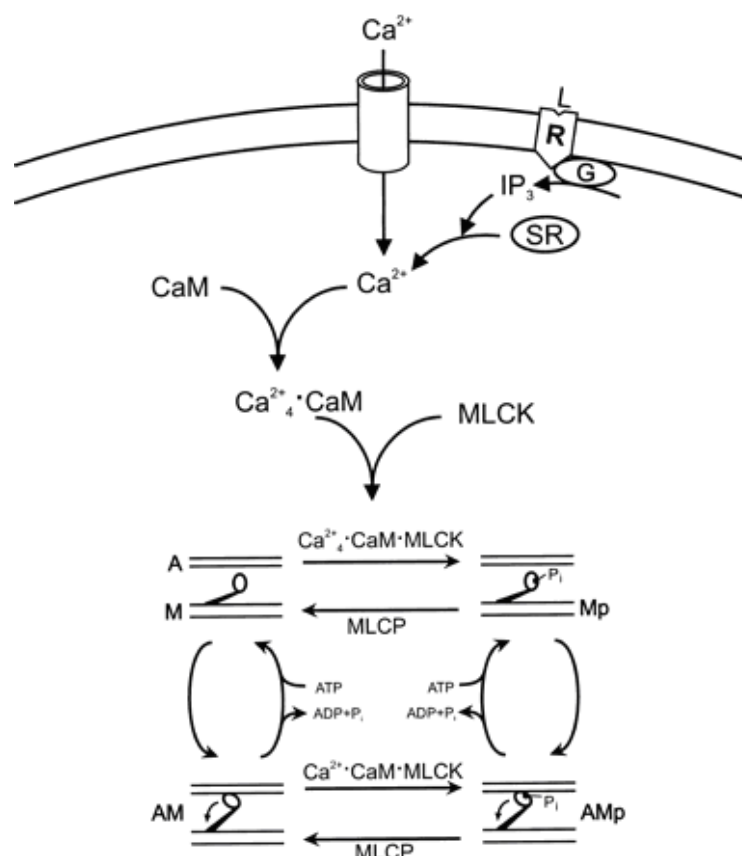


Fig.3: Modelo da contração do músculo liso [12].

Abreviaturas: G, proteína G; R, receptor; L, ligando; IP₃, inositol-1,4,5-trifosfato; SR, retículo sarcoplasmático; CaM, calmodulina; MLCK, cinase das cadeias leves de miosina; MLCP, fosfatase das cadeias leves de miosina; A, actina; M, miosina não fosforilada; Mp, miosina fosforilada; AM e Amp, força gerada por pontes cruzadas.

1.1.4 Tónus vascular e determinação da actividade contráctil

A actividade contráctil das células do músculo liso, designada de tónus vascular, na parede das artérias e arteríolas é determinante para a resistência vascular do fluxo sanguíneo na circulação. Assim, o tónus vascular desempenha um papel importante na regulação da pressão sanguínea e na distribuição do sangue entre os tecidos e órgãos de todo o corpo, assim como no interior destes. A regulação da actividade contráctil das células do músculo liso vascular (CMLV) na circulação sanguínea depende de uma complexa interligação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores de hormonas, neurotransmissores, factores derivados do endotélio e pressão sanguínea. Todos estes sinais actuam nas células do músculo liso vascular para determinar a sua actividade e alterar o diâmetro dos vasos sanguíneos [13].

Como todas as células do músculo, as células do músculo liso vascular utilizam o Ca^{2+} como iniciador da contracção [14]. O aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} promove a contracção [15-17], permitindo a interacção com as proteínas contrácteis, actina e miosina [2, 18]. A sua relaxação tem sido descrita como um processo que resulta da diminuição das concentrações de cálcio livre, o que leva a uma diminuição ou perda do estímulo contráctil. O relaxamento do músculo liso pode ocorrer como o resultado de vários agentes. Estes agentes reduzem o tónus vascular do músculo liso por diferentes vias, que incluem a inibição de síntese de agonistas contrácteis, bloqueamento dos receptores que mediam a contracção do músculo liso e encerramento dos canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática. Estes agentes podem também interagir com receptores específicos localizados no citoplasma ou na membrana plasmática para gerar segundos mensageiros, que por sua vez, iniciam uma cascata molecular que produz uma relaxação [2].

A maior fonte para o aumento da concentração de Ca^{2+} ocorre pelo influxo destes iões através dos seus canais na membrana plasmática, e pela libertação de Ca^{2+} das reservas intracelulares. A sua concentração no interior das células é regulada por um conjunto simultâneo de processos, que podem ser divididos em dois mecanismos dependendo da necessidade que a célula tem de aumentar ou diminuir a concentração de Ca^{2+} no citosol [16, 17, 19, 20]. O mecanismo que permite o aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , inclui canais de entrada de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática (MP), que regulam a sua entrada a partir do espaço extracelular e canais do retículo sarcoplásmico (RS) [14, 21]. Além dos mecanismos que podem aumentar o

Ca^{2+} citoplasmático, existem outros processos que permitem activar o mecanismo responsável por remover o Ca^{2+} do citoplasma após este ter exercido as suas funções sinalizadoras. A remoção de cálcio pode ocorrer pela bomba ATPase- Ca^{2+} na MP, que permite a saída do Ca^{2+} para o exterior, e pela bomba de troca iónica $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no RE e/ou RS, que permite transportar o cálcio para as reservas intracelulares. A mitocôndria, também tem um papel importante na regulação dos níveis de Ca^{2+} , embora tenha baixa afinidade para o cálcio, possui uma grande capacidade para o importar e reduzir significativamente os seus níveis intracelulares diminuindo as respostas celulares [20]. O equilíbrio entre os mecanismos de importação e exportação de cálcio permitem uma concentração intracelular de aproximadamente 100nM. No entanto, a estimulação das células, por exemplo por despolarização, deformação mecânica ou activação hormonal, causa um mecanismo que aumenta as concentrações intracelulares de Ca^{2+} para valores de 1 μM ou valores superiores [20].

Diversos tipos de mensageiros promovem a libertação de Ca^{2+} das suas reservas intracelulares. A ligação de vários agonistas de receptores específicos na MP, leva à activação da fosfolipase C (PLC) que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) para produzir os mensageiros intracelulares, nomeadamente o inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 desloca-se facilmente no citoplasma e difunde-se para o interior da célula onde encontra receptores específicos de IP_3 (RIP_3) na membrana do retículo sarcoplasmático (*Fig.4*). Esta ligação altera a conformação do receptor formando um canal que permite a libertação do Ca^{2+} para o citoplasma. Os canais necessitam da ligação do IP_3 para serem activados e a sua activação é regulada pela concentração de Ca^{2+} no citosol [20].

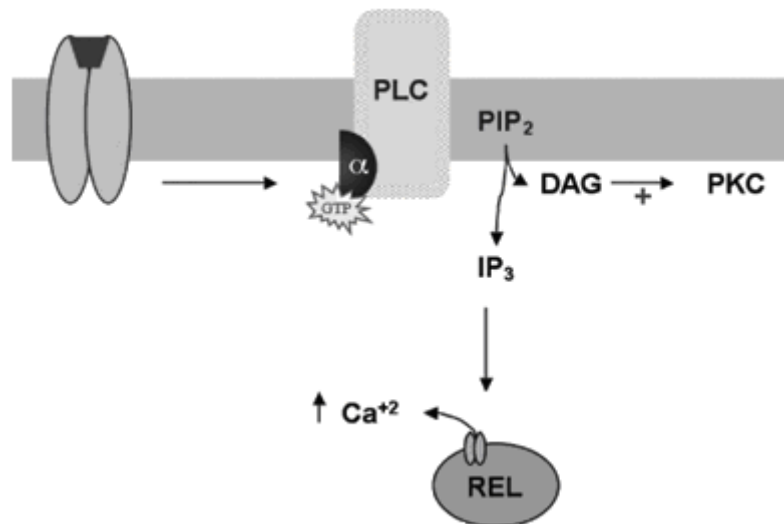


Fig.4: Modelo esquemático que representa a via da fosfolipase C.

Abreviaturas: PLC, fosfolipase C; PIP₂, fosfatidilinositol; DAG, diacilglicerol; IP₃, inositol trifosfato; PKC, proteína cinase C; REL, retículo endoplasmático liso.

Os receptores de ryanodina (RRy's) são estrutural e funcionalmente análogos aos RIP₃, apresentam aproximadamente o dobro da condutância e da massa molecular dos RIP₃'s. Os RRy's são altamente sensíveis às concentrações citosólicas de Ca²⁺ sendo ativados ou inibidos por essas concentrações (ativados para concentrações de 1-10μM e inibidos para concentrações superiores a 10μM) [20]. Estes receptores foram primeiro identificados como canais de cálcio intracelulares responsáveis pela liberação de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático no músculo-esquelético e cardíaco. No entanto, também foram encontrados sob outras isoformas no músculo liso e no cérebro [22]. Estes tipos de receptores são assim designados devido à sua alta afinidade pelo alcalóide ryanodina e por serem ativados por concentrações milimolares de cafeína [20]. Em conjunto, estes dois tipos de receptores (IP₃R e RRy) modulam a liberação de cálcio das reservas intracelulares e são o alvo final de diferentes vias de sinalização.

1.2 Potencial de membrana e canais iónicos

Designa-se por potencial de membrana, o gradiente eléctrico existente na diferença de cargas positivas entre o exterior e o interior da célula. No espaço extracelular existe um excesso de cargas positivas enquanto que no espaço intracelular ocorre o contrário.

1.2.1 Potencial de membrana e tónus vascular

Como já foi referido anteriormente, o movimento de iões e influxo de cálcio através dos canais iónicos da membrana plasmática, assim como, a libertação de cálcio das reservas intracelulares são a maior fonte de activação da contracção. Os iões não se encontram uniformemente distribuídos no interior e exterior da célula. Esta assimetria, quando associada à diferente permeabilidade da membrana plasmática para cada espécie iónica, torna-se responsável pela criação de um potencial de membrana em repouso (E_m) (Fig.5). Este E_m é essencialmente mantido pela distribuição e permeabilidade dos quatro iões: K^+ , Cl^- , Na^+ e Ca^{2+} . A maioria dos estudos em células musculares vasculares (CMV) isoladas sugere que o seu E_m varia em média entre -40 a -60 mV. Pensa-se que a interacção entre os canais de K^+ e Ca^{2+} é o principal factor que determina os níveis do par excitação-contracção nas CMV [6, 23, 24].

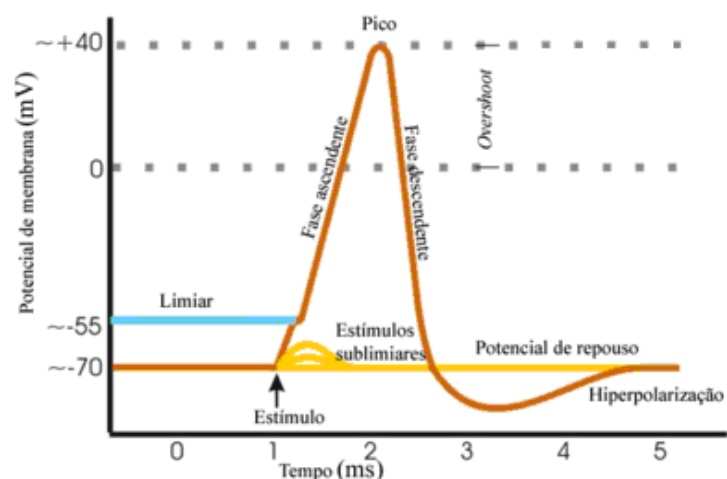


Fig.5: Potencial de membrana (E_m). Representação esquematizada da variação do potencial de membrana com despolarização na fase ascendente, provocada por um estímulo, e repolarização na fase descendente.

Existe uma relação muito íntima entre o potencial de membrana do músculo liso vascular e o tónus vascular, de tal forma que, uma pequena variação do potencial (despolarização ou hiperpolarização de poucos milivoltes), causa alterações significativas no diâmetro vascular (*Fig.6*) [23].

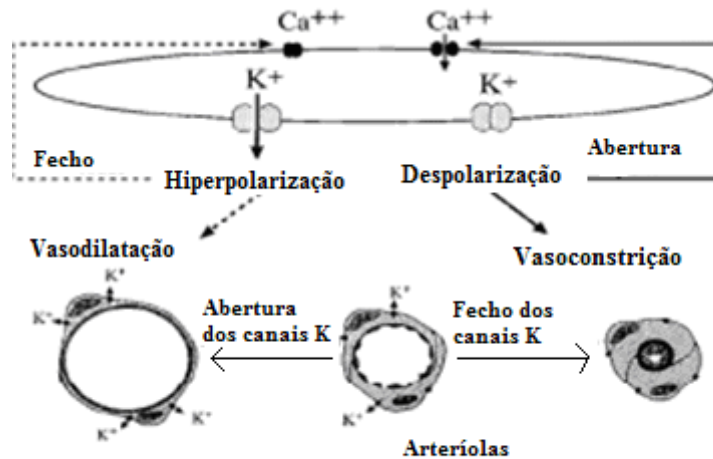


Fig.6: Representação esquemática da interação dos canais de potássio, canais de cálcio e tónus vascular mediante efeitos de despolarização ou hiperpolarização em células do músculo liso vascular [13].

Na membrana plasmática das células do músculo liso vascular existem no mínimo 4 tipos diferentes de canais de potássio, dois tipos de canais de Ca^{2+} operados por voltagem, dois tipos de canais de Cl^- , canais de Ca^{2+} *store operated* e canais catiónicos *stretch-actived*. Estes canais podem estar envolvidos na regulação do tónus vascular conjunta ou individualmente, na medida em que controlam o fluxo de iões entre a célula e o exterior [13].

1.2.2 Canais de potássio nas células musculares lisas vasculares

Os canais de potássio são a via dominante para o fluxo de iões de potássio nas células musculares vasculares [23, 25]. A sua actividade contribui de forma importante para a determinação e regulação do potencial de membrana e do tónus vascular [23, 25]. A abertura de um canal de potássio presente na membrana das células musculares vasculares, provoca um aumento da saída de iões de potássio do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva ($[K^+]_i > [K^+]_e$), o que causa hiperpolarização da membrana celular. Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais de Ca^{2+} operados por voltagem e consequente diminuição da entrada de iões Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento vascular (vasodilatação). Pelo contrário, o encerramento de um canal de potássio causa um estado de despolarização, levando à abertura de canais de Ca^{2+} operados por voltagem, e ao aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular, resultando na vasoconstrição (Fig.7) [13].

Os canais de K^+ desempenham assim um papel importante na regulação do tónus vascular assim como na regulação do potencial de membrana das células musculares lisas vasculares [26]. Os canais de potássio regulam o potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, e integram uma enorme variedade de sinais que controlam a dilatação e a contracção das artérias [27].

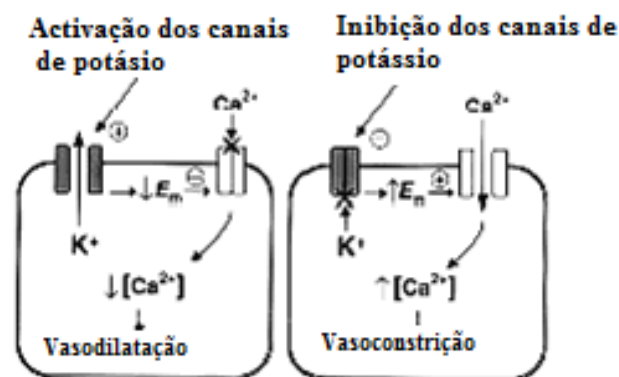


Fig.7: Ilustração das cascatas de sinalização nas células musculares lisas vasculares em resposta à activação do canal de K^+ e à sua inibição [27].

Estudos efectuados nos últimos 20 anos identificaram no mínimo quatro tipos de canais de potássio nas células musculares lisas vasculares [28] (*Fig.8*):

- Canais de potássio dependentes de voltagem (K_v)
- Canais de potássio dependentes de Ca^{2+} (K_{ca})
- Canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP})
- Canais de potássio (K_{ir} - *inward rectifier*)

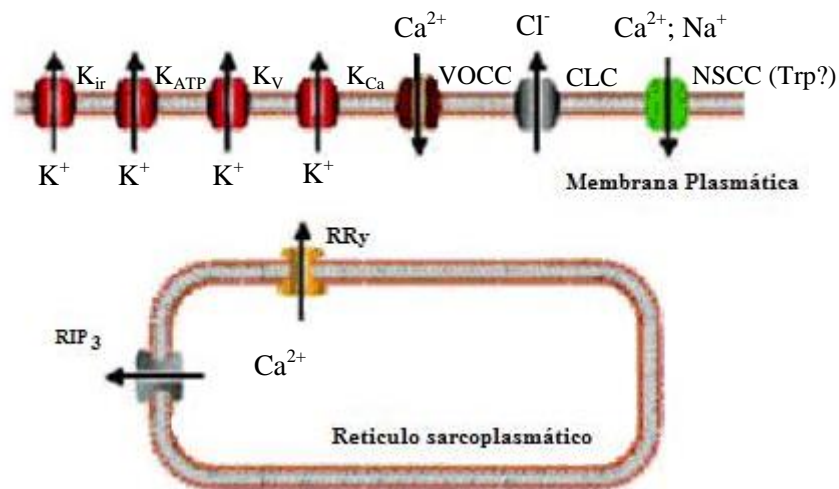


Fig.8: Representação esquemática do diagrama das famílias de canais iónicos expressos na membrana das células do músculo liso de artérias. Podem observar-se, canais de potássio (K_{ir} - *inward rectifier*), canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), canais de potássio dependentes de Ca^{2+} (K_{ca}), canais de cálcio operados por voltagem (indicado no diagrama por VOCC), dois ou mais tipos de canais de cloro (CLC) e diferentes tipos de canais catiónicos não selectivos (NSCC). Também se encontram representados os canais iónicos intracelulares (RyR e RIP_3) [28].

1.2.2.1 Canais de potássio dependentes de voltagem (Kv)

Os canais de potássio dependentes da voltagem (Kv) estão presentes na membrana celular do músculo liso vascular. Estes canais são activados pela despolarização membranar quando esta atinge um potencial de membrana situado entre os -35mv e os -55mv. Estudos *in vitro* de células musculares vasculares isoladas de pequenas artérias e arteríolas, comprovam que estes canais participam no mecanismo de *feedback* negativo para a regulação do potencial de membrana [13]. Os canais Kv podem também participar no mecanismo de acção quer de vasodilatadores quer de vasoconstritores. Os vasodilatadores que actuam via AMPc podem abrir estes canais [23, 28], enquanto os vasoconstritores encerram-nos através de mecanismos que aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} [28]. Estudos electrofisiológicos indicaram uma diminuição da expressão funcional deste tipo de canais nas células do músculo vascular de animais hipertensos, o que resulta na despolarização e no aumento do tónus vascular [13, 29, 30].

Os canais Kv são inibidos de forma selectiva pela 4-aminopiridina (4-AP) [31], e podem também ser inibidos pelos iões de céσιο e pela glibenclamida (Gli), uma droga derivada da sulfonilureia [23].

1.2.2.3 Canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca})

Estes canais foram assim denominados porque são activados pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} [13]. Os canais K_{Ca} também aumentam a sua actividade quando ocorre despolarização da membrana [13, 23]. Estes canais têm um papel fundamental no controlo do tónus vascular. A activação destes canais aumenta o efluxo de iões K^+ , o que contraria a despolarização e a vasoconstricção causadas pelo aumento da pressão intravascular e pela acção de alguns vasoconstritores. Estes canais podem ser activados por vasodilatadores que actuam pela cascata de sinalização via AMPc e GMPc [25, 28]. Vários vasoconstritores, como por exemplo, noradrenalina, angiotensina II e endotelina provocam despolarização das células musculares lisas vasculares. A activação dos canais K_{Ca} causa hiperpolarização da membrana provocando relaxamento do músculo liso vascular. O NO (óxido nítrico), causa um aumento do GMPc através da activação da enzima guanilciclase, enquanto que o GMPc leva à activação da proteína cinase G que podem provocar a activação dos canais K_{Ca} . Tal foi demonstrado em artérias aortas e coronárias de ratos [23, 25]. O NO, CO e outros vasodilatadores podem activar directamente este tipo de canais em alguns sistemas [23].

Os K_{Ca} são bloqueados por concentrações micromolares de iões de tetraetilamónio, caribdotoxina e iberiotoxina. A expressão deste tipo de canais nas membranas do músculo liso é aumentada em algumas patologias como a hipertensão [28, 32]. A sua expressão parece ser alterada em outras patologias como a aterosclerose e hipercolesterolemia [23].

1.2.2.3 Canais de potássio *inward rectifier* (**K_{ir}- inward rectifier**)

Os canais de potássio *inward rectifier* conduzem iões de potássio para o interior da célula perante potenciais negativos de membrana, enquanto que para potenciais positivos estes canais limitam a sua saída [33]. Os canais K_{ir} estão presentes numa grande variedade de células excitáveis e não excitáveis, incluindo as células musculares lisas vasculares [23]. Dados recentes sugerem que os canais K_{ir} medeiam a vasodilatação induzida pelo potássio nas artérias cerebrais e coronárias, mas o seu papel nas arteríolas do músculo liso permanece por esclarecer [13].

Estes canais são bloqueados por concentrações micromolares de iões de bário (Ba²⁺) e são activados por um aumento de concentrações extracelulares de K⁺ [33]. Noutros sistemas, a actividade dos K_{ir} pode ser modulada por proteínas cinases ou proteínas G. Esta hipótese é suportada por observações recentes que mostram que em determinados vasos sanguíneos, o NO pode activar os Kir [34]

1.2.2.4 Canais de potássio dependentes de ATP

Os canais de K⁺ dependentes de ATP foram encontrados no músculo liso vascular [35]. Estes canais são assim definidos devido à sua sensibilidade para o ATP intracelular, que leva à inibição da sua actividade [33]. Estes canais também são modulados por uma diversidade de sinais intracelulares como o ADP, H⁺ e Ca²⁺ [23, 33]. A dissociação do ATP causa o seu fecho e consequente hiperpolarização da membrana. Ao contrário do ATP intracelular, outros factores como, a redução da PaO₂ ou do pH, abrem o canal promovendo vasodilatação. Estas propriedades apoiam a ideia de que a actividade destes canais reflecte, em parte, o estado metabólico da célula (Fig.9). Os canais de K⁺ dependentes do ATP têm várias funções. A sua activação por vasodilatadores, associados à hiperpolarização da membrana, é responsável em muitos casos pela vasodilatação resultante.

Estudos mostraram que este tipo de canais podem ser activados por proteínas cinases A e proteínas dependentes de GMPc [23, 36], e têm sido implicados no mecanismo de acção vasodilatador da adenosina [36], PGI₂ [36] e NO [23]. Pelo contrário, a activação da proteína cinase C e o aumento do cálcio intracelular produzido

por vasconstrictores, como a noraepinefrina [37], vasopressina [38], endotelina [39] e angiotensina II, levam ao encerramento destes canais [40].

A densidade destes canais parece ser baixa, na ordem dos 300-500 canais/célula. Os canais de K^+ dependentes do ATP no músculo liso vascular não são dependentes da voltagem. A probabilidade destes canais estarem abertos nas células musculares lisas vasculares, é presumivelmente baixa na ausência de activadores do canal, ou na presença de concentrações intracelulares de ATP dentro dos limites fisiológicos. Estes canais podem ser bloqueados farmacologicamente por drogas derivadas da Sulfonilureia, como a Glibenclamida, e pelo ião bário (Ba^{2+}). Farmacologicamente, os canais podem ser abertos por drogas anti-hipertensivas como o sulfato de minoxidil e cromakalina [23]. Estes canais parecem ser regulados negativamente em doenças como a diabetes [36] e hipertensão [27].

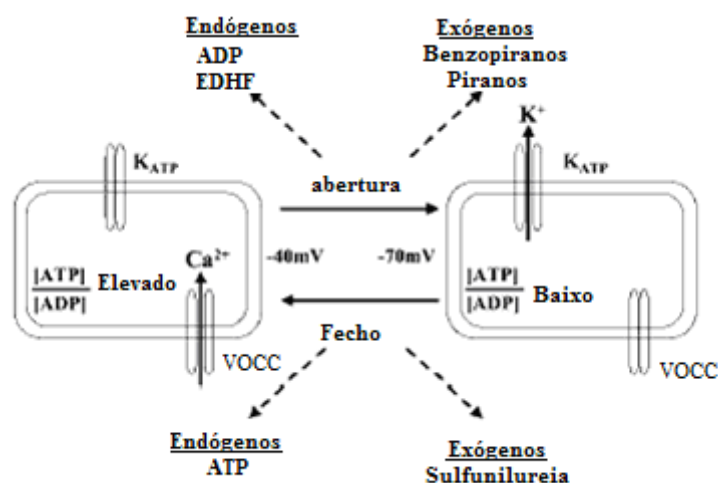


Fig.9: Representação do papel dos canais de K^+ dependentes do ATP [41].

1.2.3 Regulação do tónus vascular pelos canais de Ca^{2+}

Como já foi referido anteriormente, o cálcio é uma molécula sinalizadora muito versátil afectando um grande conjunto de processos celulares [17, 20]. O mecanismo de sinalização do cálcio é particularmente importante em todos os tipos de músculo, onde o cálcio é o elemento chave no par excitação-contracção. Este ião desempenha um papel central na contractilidade das células do músculo, onde entra por canais da membrana plasmática, interage com proteínas do retículo sarcoplasmático, como os receptores de ryanodina, e com proteínas dos miofilamentos [14].

A principal via para a entrada de cálcio na VSMC, é através de canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's) (Fig.10) situados na membrana plasmática, que consistem numa grande família de proteínas homólogas sendo diferenciadas consoante as suas propriedades cinéticas e farmacológicas. As VSMC's expressam dois tipos principais de canais de cálcio operados por voltagem, os canais do tipo L e do tipo T [14, 21]. Os canais de cálcio dependentes de voltagem têm um papel central na regulação do tónus vascular pelo facto de actuarem activamente no potencial de membrana. A hiperpolarização da membrana fecha estes canais e provoca a vasodilatação, enquanto que a despolarização abre-os, o que resulta na vasoconstrição.

Os canais de cálcio tipo L parecem ser os canais de cálcio predominantes para a entrada de cálcio na maioria das células vasculares, comparados com os canais do tipo T [42, 43]. Os canais de cálcio do tipo L são caracterizados pela sua activação para altas voltagens de correntes de cálcio (HVA) e são sensíveis às dihidropiridinas (DHP's). Pela despolarização das VSMC, os canais de cálcio tipo L abrem-se levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, provocando contracção e consequente vasoconstrição. Este tipo de canais tem um papel chave na determinação da pressão sanguínea e os seus bloqueadores fazem parte de uma classe importante de drogas antihipertensivas [14, 44, 45].

Os canais de cálcio tipo T podem ser activados por baixa voltagem (LVA) e a ligação de um agonista pode levar à sua rápida activação. Por outro lado, estes canais podem ser inibidos por “*transient current*”. Outras características destes canais são a sua pequena condutância e baixa sensibilidade para agentes que bloqueiam os canais de tipo L e outros canais activados por altas voltagens [14, 43]. Outro tipo de canais de cálcio são os canais de cálcio operados por receptores (ROCC's) que compreendem canais localizados principalmente nas células secretoras e nervos terminais, como é o

exemplo do receptor nicotínico da acetilcolina e o receptor N-metil-D-aspartato. Os ROCC's são activados pela ligação de um agonista ao domínio extracelular do canal. Existe uma variedade de agonistas capazes de activar estes canais, tais como o ATP, a serotonina (5-HT), o glutamato e a acetilcolina [14, 46]. Os canais de Ca^{2+} activados mecanicamente também designados de canais de Ca^{2+} *stretch-activated* ou SAC, estão presentes em vários tipos de células e respondem à deformação da célula. Outro tipo de canais de Ca^{2+} , são os canais “store-operated” (SOCC's) (Fig.11), que são activados em resposta à depleção das reservas de Ca^{2+} . O mecanismo pelo qual ocorre este fenómeno ainda permanece por descobrir.

Como já foi referido, os canais de cálcio tipo L são os canais predominantes e são compostos por um complexo heterooligomérico consistindo num mínimo de 5 proteínas de quatro genes. As 5 subunidades proteicas são a α_1 , α_2 , β , γ e δ , das quais a subunidade α_1 actua como canal propriamente dito e as outras como subunidades reguladoras [20] (Fig.10).

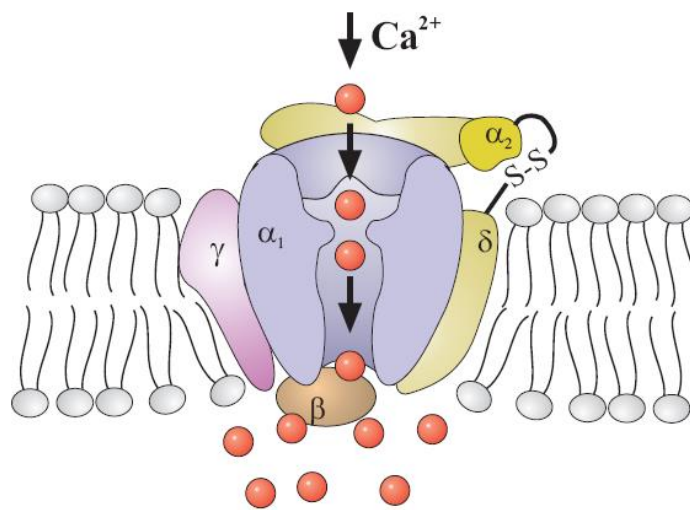


Fig.10: Representação esquemática da possível estrutura de um canal de Ca^{2+} operado por voltagem (VOCC). A subunidade α_1 é a proteína principal que funciona como poro condutor, através do qual íons de Ca^{2+} podem passar quando aberto. Esta subunidade é regulada por subunidades auxiliares: uma subunidade β intracelular, uma subunidade γ transmembranar e um complexo entre as subunidades α_2 extracelular e δ transmembranar ligadas por uma ponte química S-S [43].

Um estudo recente demonstrou a existência de outros tipos de canais de cálcio dependentes de voltagem no músculo liso da AUH [21]. Foi verificado a existência de

canais tipo L e T, como era de esperar, mas também a presença de canais tipo P e Q, o que representa uma novidade nas pesquisas efectuadas neste segmento [21].

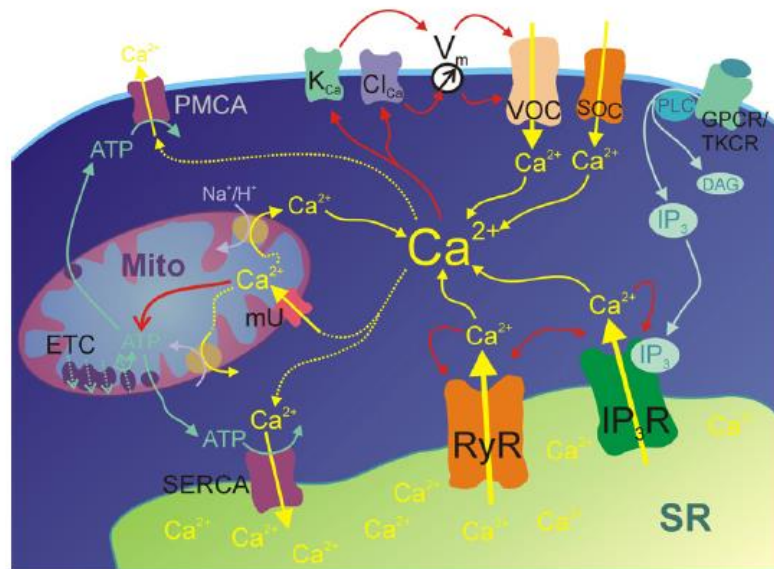


Fig.11: Integração dos diferentes canais iônicos regulados pelo Ca^{2+} . As vias que levam ao aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} citosólicas estão representadas a amarelo; a remoção do Ca^{2+} está representada por setas amarelas finas a tracejado. A regulação dos canais iônicos pelo Ca^{2+} encontra-se representada por setas vermelhas. Podemos observar, que o cálcio pode entrar no espaço extracelular da célula pela via dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem (representados na figura por VOC) ou por canais “store operated” (representados na figura por SOC), que são activados por despolarização da membrana plasmática (V_m) [47].

1.3 Péptidos natriuréticos

Os péptidos natriuréticos são uma família de mediadores peptídicos cardíacos e vasculares, com papéis fundamentais na homeostase cardiovascular, regulando a pressão e o volume sanguíneo [48]. As suas acções incluem efeitos autócrinos e parácrinos no miocárdio e na circulação coronária em condições normais e patológicas [49]. Os péptidos natriuréticos (PN) produzem um conjunto de acções que incluem respostas vasorelaxantes [50]. Estes péptidos são hormonas endógenas libertadas pelo coração em resposta a um estímulo do miocárdio. Até à data, foram identificados e caracterizados 3 tipos de péptidos natriuréticos, que incluem o péptido natriurético atrial (ANP ou factor natriurético atrial), o tipo B (péptido natriurético tipo B ou BNP) e o tipo C (péptido natriurético tipo C ou CNP) [49, 51-54]. Estes três péptidos são codificados por diferentes genes, no entanto possuem uma forma funcional comum constituída por uma estrutura em anel com 17 aminoácidos [49] (*Fig.12*).

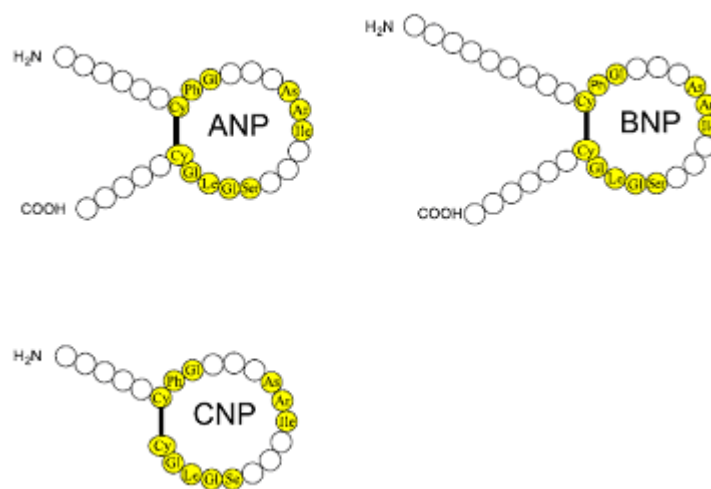


Fig.12: Representação dos anéis e cadeias terminais dos péptidos natriuréticos [49].

Abreviaturas: ANP, péptido natriurético atrial; BNP, péptido natriurético tipo B; CNP, péptido natriurético tipo C.

1.3.1 Sinalização dos péptidos natriuréticos

Os diversos efeitos dos péptidos natriuréticos são mediados pela ligação dos péptidos a receptores de membrana (NPR's) associados à guanilciclase (GC). Até à data, dois subtipos de receptores foram descobertos, o NPR-A e o NPR-B (também conhecidos por GC-A e GC-B respectivamente) responsáveis pela maioria das suas acções fisiológicas. Tanto o NPR-A como NPR-B funcionam com a guanilciclase particulada, uma forma distinta da guanilciclase solúvel, ou com enzimas citoplasmáticas estimuladas pelo óxido nítrico (NO). O terceiro receptor, NPR-C, serve provavelmente como um receptor de “clearance” [49, 51-54].

1.3.2 Receptores tipo A, B e C de Péptidos natriuréticos

Os receptores NPR-A e NPR-B (*Fig.13*) estão largamente expressos no sistema cardiovascular localizados nas aurículas e ventrículos, tal como, na aorta e vasculatura periférica (pulmões, rins, pele, plaquetas e fibras pré-sinápticas simpáticas).

Tanto o ANP como o BNP podem ligar-se ao NPR-A com alta afinidade, no entanto o BNP é 10 vezes menos potente que o ANP. O CNP não aumenta significativamente a concentração intracelular de GMPc em células que expressam NPR-A. No entanto, nas células que apenas expressam o NPR-B, somente o CNP pode estimular a actividade da guanilciclase com eficácia (*Fig.13*). Nestas células o ANP e o BNP não aumentam os níveis de GMPc, excepto quando estes se encontram em altas concentrações farmacológicas. Os NPR-A contêm um local de ligação extracelular ligado por um domínio transmembranar a um domínio intracelular, como se pode observar na figura 13. No domínio intracelular existem locais de ligação do ATP. Para a activação do receptor é necessário a ligação tanto do ligando PN como do GTP, que origina o GMPc [49, 48].

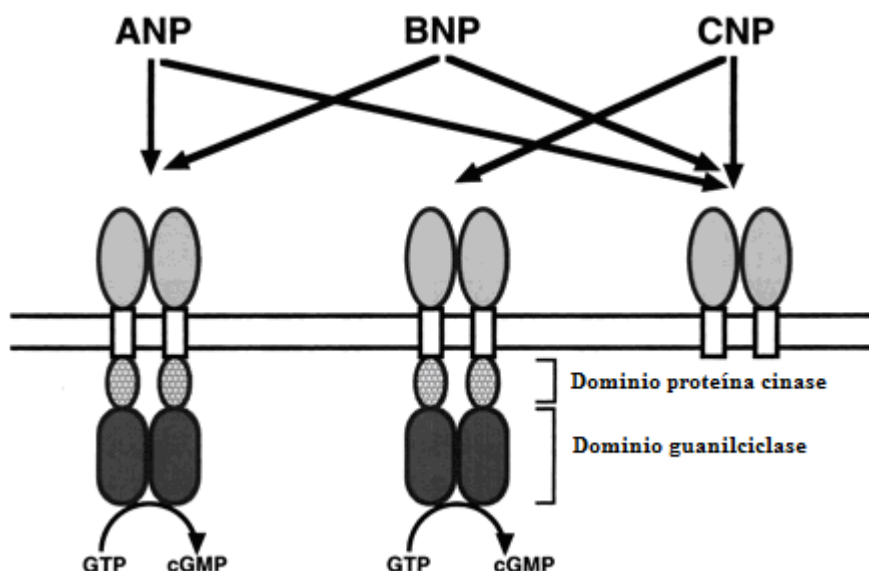


Fig.13: Representação esquemática da estrutura dos receptores natriuréticos [48].

Abreviaturas: ANP, péptido natriurético atrial; BNP, péptido natriurético tipo B; CNP, péptido natriurético tipo C.

1.3.3 Transdução de sinal dos péptidos natriuréticos

Os péptidos natriuréticos produzem respostas celulares principalmente através do aumento da concentração intracelular de GMPc (*Fig.13*) [49, 52, 55]. O aumento dos níveis de GMPc foi demonstrado em vários tecidos e células que expressam NPR-A e NPR-B após a exposição aos péptidos natriuréticos [24]. Os péptidos natriuréticos induzem a produção de GMPc que promove a activação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG ou CGK) [54]. A proteína cinase dependente de GMPc (PKG ou CGK) representa o principal mediador intracelular do sinal provocado pelo GMPc. O péptido natriurético induz o aumento dos níveis de GMPc que por sua vez provoca a activação dependente da ligação da PKG (*Fig.14 e 15*). Foram determinados dois genes diferentes que codificam a PKG em mamíferos [49, 54]. Um deles codifica a PKGI que é citosólica e vastamente expressa nos tecidos dos mamíferos. A PKGI apresenta duas isoformas, I α e I β . A PKG I α é detectada principalmente nos miócitos cardíacos, sistema vascular, fígado, cerebelo, rins e glândulas adrenais, enquanto que a PKG I β só está presente no útero. A PKG II não se encontra presente no sistema cardiovascular mas é expressa no cerebelo, intestinos, fígado, rins e ossos. A PKG I actua como um modulador de Ca²⁺ solúvel, enquanto a PKG II regula a homeostase dos fluidos na

membrana celular [54]. As PKG's fosforilam e activam numerosos substratos proteicos e canais iónicos que regulam o fluxo de iões. A proteína cinase dependente de AMPc (Proteína cinase A ou PKA) possui locais de ligação homólogos aos da PKG permitindo uma possível activação pelo GMPc [56].

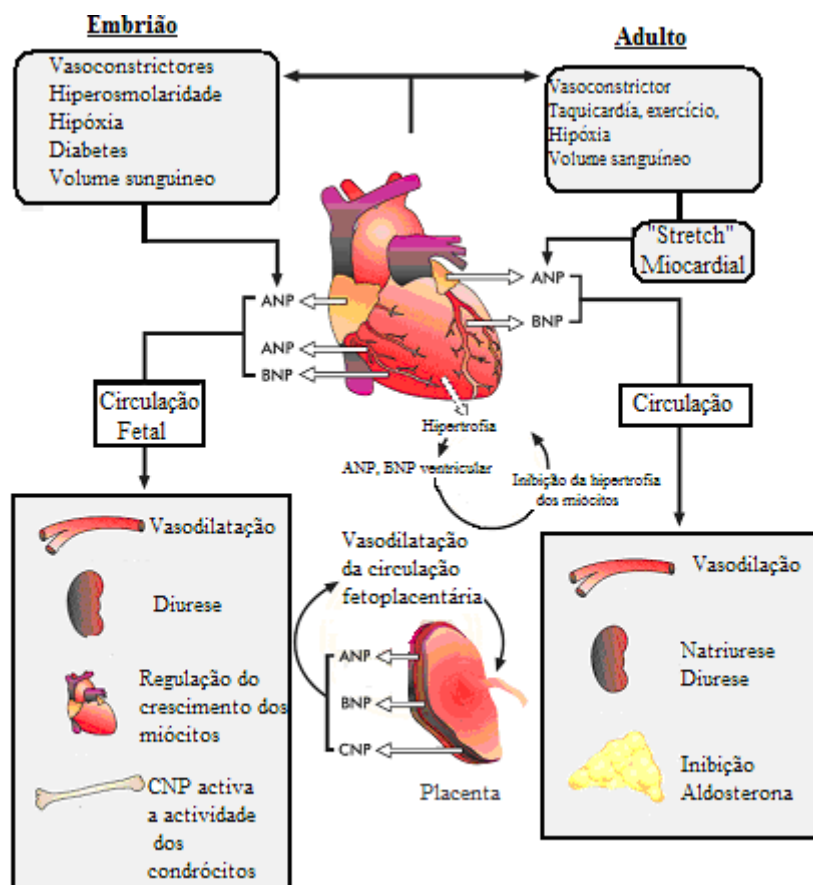


Fig.14: Diagrama comparativo do sistema de péptidos natriuréticos em embriões (esquerda) e em adultos (direita). Os quadros superiores mostram o estímulo fisiológico que regula a secreção de péptidos natriuréticos em adultos e embriões, e os inferiores a acção provocada pelos péptidos em vasos sanguíneos, rins, coração, ossos e glândulas adrenais.

A actividade de fosfodiesterases (PDE's) reguladas por GMPc é fundamental para a sinalização celular, pois estas regulam as concentrações intracelulares dos nucleótidos, afectando as respostas efectoras e celulares (*Fig.15*).

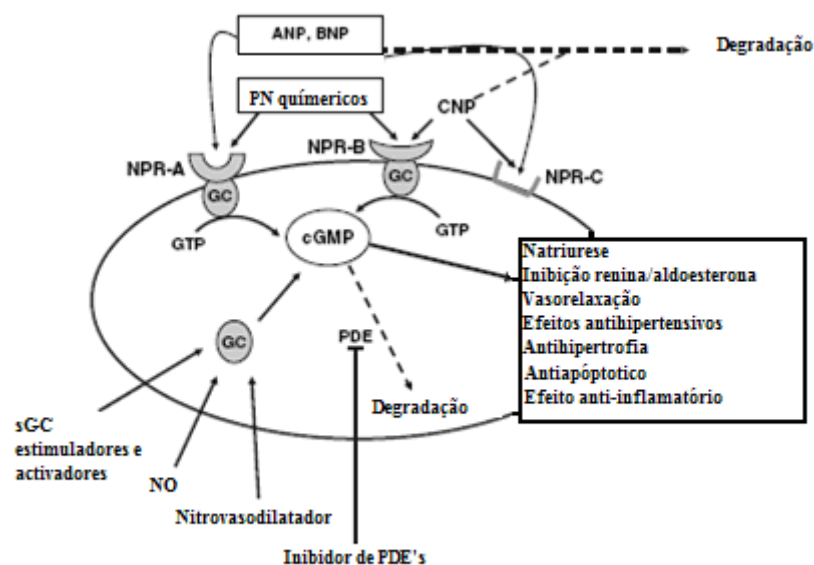


Fig.15: Representação esquemática da via de transdução de sinal para os peptídeos natriuréticos/óxido nítrico e alvos terapêuticos para a potenciação dos efeitos do GMPc [52].

Abreviaturas: ANP: péptido natriurético tipo A, B: péptido natriurético tipo B, CNP: péptido natriurético tipo C, GC: guanilciclase, sGC: guanilciclase solúvel, GMPc: guanosina monofosfato cíclico, GTP: guanosina trifosfato, NO: óxido nítrico, NPs: peptídeos natriuréticos, NPRA: receptor de péptido natriurético A, NPRB: receptor de péptido natriurético B, NPRC: receptor de péptido natriurético C e PDE: fosfodiesterase.

1.3.4 Mecanismo pelo qual os péptidos natriuréticos induzem relaxamento

A actividade da PKG, estimulada pela produção de GMPc, pode regular os canais iónicos em células do músculo vascular (CMV), produzindo um efeito hiperpolarizante e consequente vasorelaxação [49, 52-54]. No entanto, diferentes mecanismos efectores actuam em conjunto para baixar as concentrações de Ca^{2+} , utilizando o GMPc como segundo mensageiro. Estes mecanismos incluem a redução do influxo de Ca^{2+} , e aumento do efluxo de Ca^{2+} , sequestração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático e diminuição da mobilização de Ca^{2+} . As bombas Ca^{2+} -ATPase e Na^{+} -ATPase na membrana plasmática são activadas pelo GMPc através da PKG [49]. Dois canais de potássio são de particular interesse na relação com os péptidos natriuréticos, os K_{Ca} (sensíveis à iberotoxina) e os K_{ATP} (sensíveis à glibenclamida) [49, 50]. Outros efeitos para a vasorelaxação podem ser mediados através da activação de PDE dependentes de GMPc [49].

1.4 Nucleótidos cíclicos

Como referido anteriormente, numerosas funções celulares são reguladas por segundos mensageiros como o AMPc e o GMPc [56]. No sistema cardiovascular, a pressão sanguínea é regulada pela contracção e relaxação do músculo liso vascular em associação com as células endoteliais vasculares. Este processo é regulado pela estimulação extracelular através da alteração dos níveis de nucleótidos cíclicos, que por sua vez depende da razão entre a sua produção e degradação pelas PDE's [57]. Os nucleótidos cíclicos (AMPc e GMPc) são os segundos mensageiros principais responsáveis pela vasodilatação. Os níveis intracelulares destes segundos mensageiros são regulados pela adenilciclase (AC) e guanilciclase (GC), que são responsáveis pela sua síntese, e pelas fosfodiesterases (PDE's), que estão envolvidas na sua hidrólise [56, 58]. Vários estudos investigaram o efeito celular dos nucleótidos cíclicos, AMPc e GMPc, demonstrando antagonismos na maioria dos tecidos. Uma excepção foi o músculo liso vascular (MLV), no qual, ambos os nucleótidos produzem o mesmo efeito fisiológico, a vasorelaxação. No entanto, os mecanismos pelos quais AMPc ou GMPc induzem estas respostas ainda não estão completamente conhecidos. A maioria das investigações assume que, a resposta vasodilatadora para cada nucleótido é mediada por uma via de cascata de transdução distinta correspondendo a sua proteína cinase. No entanto, nos últimos 10 anos outros estudos revelaram um processo de sinalização mais complexo [56, 57] (*Fig.16*).

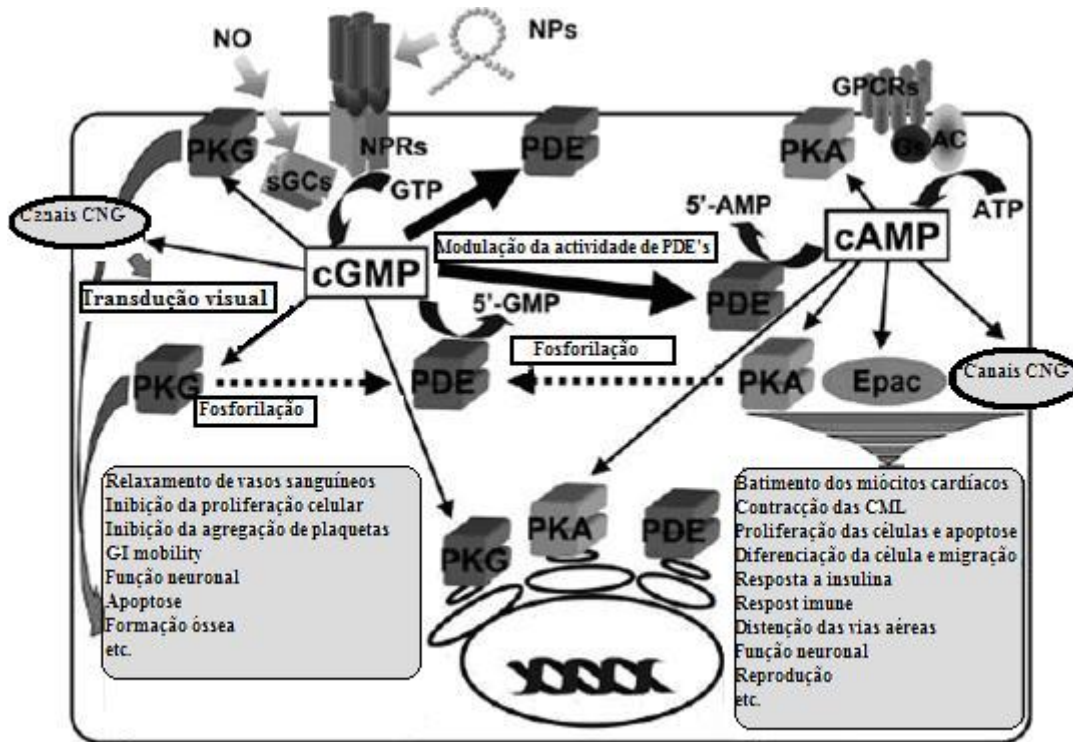


Fig.16: Sinalização e regulação dos nucleotídeos cíclicos. Localização das estruturas envolvidas no processo de sinalização de AMPc e GMPc. As estruturas efectoras do AMPc e GMPc são indicadas por setas a partir do seu nucleotídeo. A fosforilação das PDE's, pela PKA e pela PKG, é demonstrada por setas a tracejado. A modulação da actividade das PDE's pelo GMPc é identificada por uma seta fina. Os efeitos celulares e fisiológicos dos nucleotídeos cíclicos são mostrados em cinzento nas caixas de texto [57].

Abreviaturas: NP, péptido natriurético; NO, óxido nítrico; NPR's, receptores de péptidos natriuréticos; sGCs, guanilciclase solúvel; AC, adenilciclase; Gs subunidade da proteína ligadora de GTP; GPCR's, receptores acoplados a proteína G; Epac, proteína trocadora directamente activada por AMPc; CNGI, canal activado por nucleotídeos cíclicos, presente apenas em neurónios fotoreceptores e olfactivos e células não excitáveis.

1.4.1 AMPc

A adenosina ciclase (AC) é uma enzima que catalisa a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosina trifosfato (ATP). Uma vez que a AC possui a capacidade para gerar AMPc é responsável pela regulação de um grande leque de funções celulares (função cardiovascular, endócrina, pulmonar e sistema nervoso) tal como outras estruturas se que encontram associadas a receptores acoplados a proteínas G (GPCR's) [59, 60] (Fig.17)

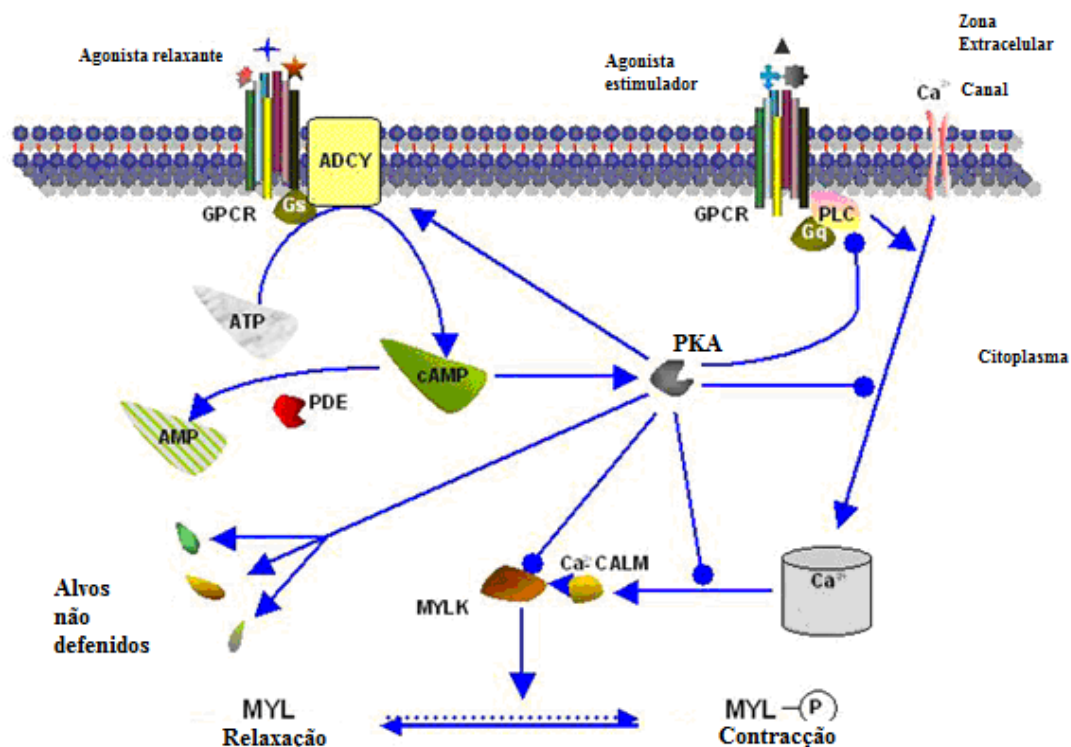


Fig.17: Sinalização via proteína G e respectivas subunidades, na qual ocorre ligação de um ligando (NT ou hormona) e activação da ciclase acoplada.

Assim, hormonas e neurotransmissores ligam-se a receptores acoplados à proteína G situados na membrana extracelular da célula, que por sua vez, activam a proteína G na zona intracelular activando também a AC [59] (Fig.17). O aumento dos níveis de AMPc activa a proteína dependente de AMPc (PKA) que por sua vez modula o transporte iónico. O efeito relaxante da PKA resulta de uma possível inibição da mobilização de cálcio e da maquinaria contráctil, na medida em que pode fosforilar

proteínas contrácteis como a cinase ligadora de cadeias leves de miosina e a fosfolipase C [12, 56, 61]. Os níveis de AMPc são então regulados pela actividade das fosfodiesterases, PDE's. Estudos recentes mostraram que a localização subcelular das PKA e PDE's são cruciais na função celular como resposta aos aumentos de AMPc [59]. Até à data, vários estudos clonaram e caracterizaram várias isoformas de AC em mamíferos, 9 isoformas ligadas à membrana e uma isoforma solúvel [62] (*Tabela 1*).

Tabela 1: Lista de isoformas de AC clonadas para diferentes espécies [62]

	Humano	Ratinhos	Ratos	Bovinos	Cão	Coelho	Galinha
ACI	L05500			M25579			
ACII	X74210		M80550			U25635	
ACIII	NM_004036-2	AF253540	M55075				
ACIV			M80633				
ACV	U65473		M96159		M88649	Z29371	AJ293817.1
ACVI	NM_020983	M93422	L01115		M94968		
ACVII	D25538	U12919	AF184150	Z49806			
ACIII	NM_001115.1	U85021	L16986				
ACIX	NM_001116.1	U30602					AJ401469
AC solúvel	NM_018673		AF081941.1				

A existência de uma grande diversidade permite dividir esta família em dois grupos de acordo com a sua semelhança, sequência e propriedades reguladoras (*Tabela 2*). Ao grupo I pertencem AC I, AC III e ACV III, que são reguladas pelos Ca^{2+} e pela calmodulina. O segundo grupo, compreende as AC II, AC IV e VII, que são estimuladas pela subunidade $G\beta\gamma$ da proteína G. As isoformas AC V e VI que estão predominantemente localizadas no coração formam o terceiro grupo. Ambas as enzimas são inibidas pela subunidade $G\alpha$ da proteína G e directamente pelo Ca^{2+} . O quarto grupo consiste na caracterização recente da isoforma ACI X regulada pela calcineurina. O último grupo compreende a única AC solúvel descoberta até à data. Esta última não é estimulada pela subunidade $G\alpha$ ou forskolina [62].

Tabela 2: Classificação das AC's de acordo com a sua regulação pelos vários moduladores. A tabela sumariza a regulação de cada isoforma [62].

Abreviaturas: Fsk, forskolina; CaM, calmodulina; PKA, proteína cinase dependente de AMPc; PKC, proteína cinase C.

Grupos	Isoformas	Activadores	Inibidores
Grupo 1	ACI	G α , Fsk, Ca ²⁺ /Cam	G α , G $\beta\gamma$, Cam cinaseIV, locais de ligação análogos ao -P
	ACIII	G α , Fsk, Ca ²⁺ /Cam	Cam cinase II, locais de ligação análogos ao -P
	ACVIII	G α , Fsk, Ca ²⁺ /Cam	locais de ligação análogos ao -P
Grupo 2	ACII	G α , Fsk, G $\beta\gamma$, PKC	locais de ligação análogos ao -P
	ACIV	G α , Fsk, G $\beta\gamma$	locais de ligação análogos ao -P
	ACVII	G α , Fsk, G $\beta\gamma$, PKC	locais de ligação análogos ao -P
Grupo 3	ACV	G α , Fsk, PKC	G α , Ca ²⁺ , PKA, locais de ligação análogos ao -P, G $\beta\gamma$
	ACVI	G α , Fsk	G α , Ca ²⁺ , PKA, PKC, locais de ligação análogos ao -P
Grupo 4	ACIX	G α	Calcineurina, locais de ligação análogos ao -P
Grupo 5	AC solúvel	HCO ₃ ⁻	?

1.4.2 GMPc

A guanilcilcase é a enzima responsável pela produção do GMPc em resposta a diferentes estímulos, como o óxido nítrico (NO), ligação de péptidos e fluxo intracelular de Ca^{2+} . Estes sinais utilizam receptores acoplados à guanilcilcase e co-factores para iniciar a conversão de GTP em GMPc. O GMPc, por sua vez, regula determinados processos celulares tais como a activação de proteínas cinases, afectando directamente canais iónicos ou alterando as concentrações de nucleotídeos cíclicos através da regulação por PDE's [63]. O GMPc é produzido por duas vias enzimáticas (*Fig.18*).

A primeira via ocorre pela guanilcilcase solúvel (GCs, livre no citoplasma), que converte GTP em GMPc após a sua activação por NO ou monóxido de carbono (CO) [2]. A GCs é expressa na maioria das células do sistema cardiovascular. Esta é composta por duas subunidades, α (isoformas α_1 , α_2 e α_3) e β (isoformas β_1 , β_2 e β_3), e contém um grupo prostético Heme que funciona como domínio receptor de NO e CO. As isoformas mais expressas nas células do músculo liso vascular são a α_3 e a β_3 . O NO é um modulador parácrino de vários processos fisiológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imune. Este modelador é sintetizado por uma das suas três sintases do óxido nítrico (NOS) que converte a L-arginina e oxigénio em L-citrulina e NO.

A segunda via ocorre pela guanilcilcase particulada (GCp, associada a receptores) que actua após a ligação dos péptidos natriuréticos ao receptor de membrana. A GCs é constituída por um grupo de moléculas transmembranares com um domínio extracelular que serve de receptor para os diferentes péptidos natriuréticos, e dois domínios intracelulares; a guanilcilcase (semelhante a GCs) e a tirosina cinase [2].

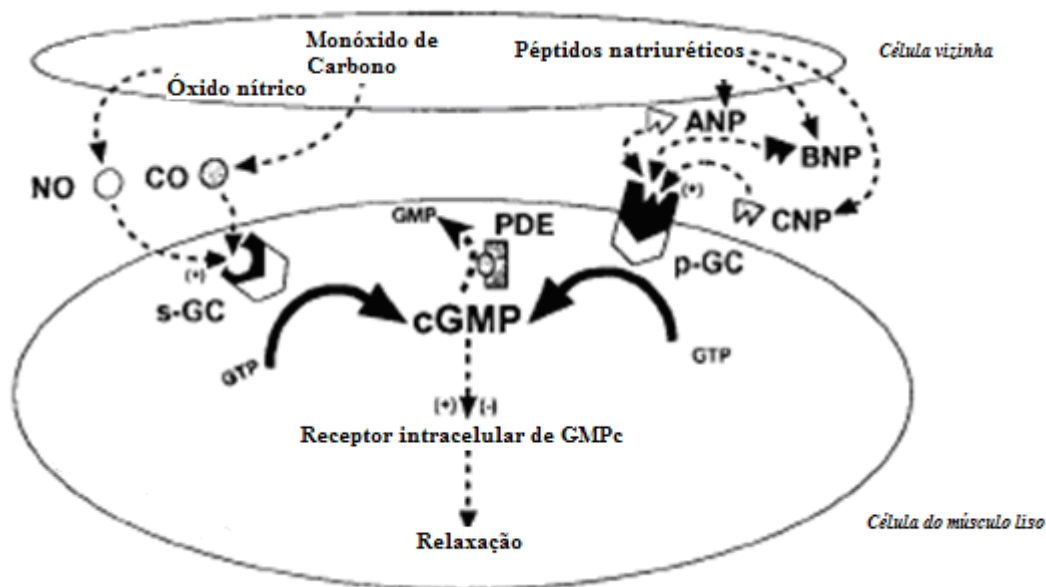


Fig.18: Representação esquemática da produção, degradação e efeitos do GMPc numa célula do músculo liso [2].

Após a sua produção, o GMPc exerce os seus efeitos em três grupos de proteínas efectoras, tais como, canais iónicos regulados por GMPc, fosfodiesterases activadas por GMPc e proteína cinase activada por GMPc (PKG) (*Fig.19*). O resultado da acção do GMPc depende essencialmente da expressão de várias proteínas na célula [2]. O GMPc regula directamente os canais iónicos nas células da retina, células do olfacto e do epitélio renal. No entanto o seu efeito nos canais iónicos das células do músculo liso ainda não está completamente esclarecido. Quanto às fosfodiesterases, existem três tipos que são reguladas alostericamente pelo GMPc, mas a acção deste pode depender do nível de expressão dos diferentes tipos de PDE's na célula. No entanto pensa-se que o mecanismo principal dos efeitos do GMPc, passa pela ligação e activação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que é responsável pela maioria das suas acções intracelulares. O GMPc permite a redução da concentração intracelular de cálcio através da activação da PKG, pois esta sabe-se que fosforila proteínas alvo (tais como, canais iónicos, bombas iónicas, receptores e enzimas) levando à diminuição das concentrações de Ca^{2+} e portanto ao relaxamento do músculo liso [2]. A PKG activa também os canais de $\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$. O efluxo de K^+ através destes canais está directamente interligado com a concentração de Ca^{2+} . Uma vez activados, estes canais actuam como um regulador de feedback negativo, hiperpolarizando a membrana e inibindo a entrada de Ca^{2+} através de canais VOCC's. A redução do influxo de Ca^{2+} , através dos VOCC's, permite uma

vasorelaxação das células do músculo liso. Tal mecanismo já foi demonstrado em artérias mesentéricas de rato, células do músculo liso da traqueia de porcos, células dos ovários de hamsters chineses e artérias coronárias de porcos. Foi também observado um efeito directo da PKG na inibição dos VOCC's, promovendo também a vasorelaxação [2].

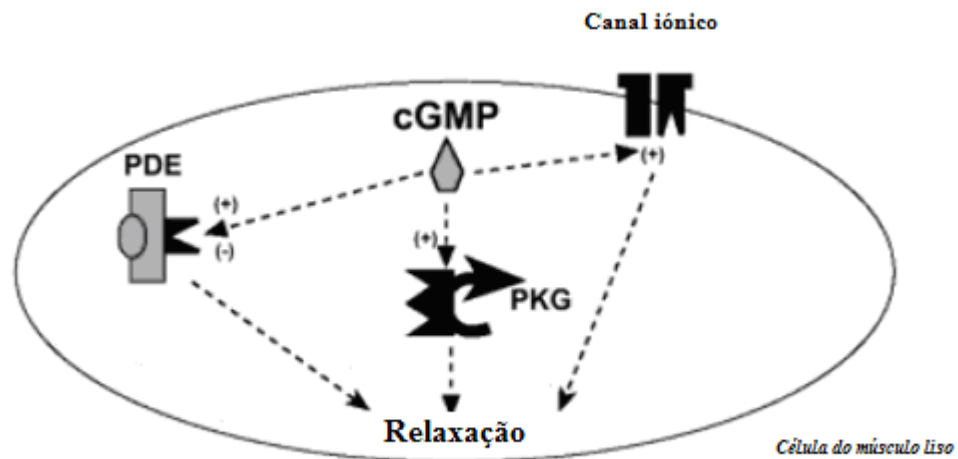


Fig.19: Representação esquemática dos sinais intracelulares de GMPc. No interior da célula muscular lisa o GMPc pode ligar-se e modificar a actividade de três tipos de proteínas receptoras. A PKG é considerada o principal mediador de GMPc que induz o relaxamento no músculo liso pela fosforilação de proteínas [2].

1.4.3 PDE's

Devido às isoenzimas da PDE serem expressas e reguladas de forma diferente, são consideradas como alvos privilegiados para a intervenção terapêutica em doenças cardiovasculares [57, 58, 64]. Até à data, já foram identificadas 11 famílias diferentes de isoenzimas da PDE, que são por sua vez divididas em 24 subfamílias [65]. As isoenzimas que estão descritas como sendo expressas em diversos tipos de músculo liso vascular são a PDE 1, PDE 3, PDE 4e PDE 5. A PDE 2 e PDE7 são apenas encontradas no músculo liso da aorta de porco e na artéria pulmonar humana respectivamente. Estas famílias de PDE's diferem no tipo de regulação e substrato específico (AMPc e GMPc) [58].

A PDE 1 é activada pelo sistema Ca^{2+} -calmodulina que hidrolisa o GMPc e o AMPc. Existem três genes diferentes de PDE 1 que já foram clonados (PDE 1A, PDE 1B e PDE 1C). A PDE 1A e 1B hidrolisam de forma mais eficaz o GMPc do que o AMPc, e foram encontradas em diversos músculos lisos vasculares. A PDE 1C hidrolisa o AMPc e GMPc com a mesma eficiência, mas só é expressa em culturas de células do músculo liso, e a sua função é importante para a proliferação celular. A PDE 2 é codificada por um único gene, estimulada pelo GMPc e hidrolisa o AMPc e o GMPc. A PDE 3 é inibida pelo GMPc que hidrolisa tanto o GMPc como o AMPc, mas apresenta maior afinidade para o GMPc. Esta PDE é codificada por dois genes, o PDE 3A e o PDE 3B, e encontra-se em diversas espécies de células do músculo liso vascular. Por sua vez, a PDE 4 hidrolisa selectivamente AMPc com grande afinidade e é inibida pelo Rolipram. Esta representa a maior família das PDE's e resulta do produto de quatro genes, como o PDE 4A, 4B, 4C e 4D. A PDE 5 hidrolisa especificamente o GMPc com grande afinidade e já foram identificados altos níveis desta PDE no músculo liso vascular [58]. A PDE 7 hidrolisa especificamente o AMPc, e já foram encontrados dois genes (PDE 7A e PDE 7B), no homem e no rato, para a codificarem [65]. O aumento dos níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos pela acção das ciclases (adenil e guanilciclase) ou pela inibição das PDE's representa uma estratégia para estudar os efeitos biológicos das PDE's.

A relaxação do músculo liso vascular, induzida por inibidores das PDE's, foi descrita por diversos autores. Alguns destes indicam que a PDE 1 e PDE 3 têm um papel importante na modulação da contractilidade da aorta de rato, enquanto outros observaram que a inibição de PDE 5 induz uma relaxação directa dessa artéria [58]. Foi

observado que a PDE 3 é a principal enzima a regular o efeito relaxante do GMPc em artéria coronária de porco. Também foi sugerido que a PDE 4 é a principal família implicada na regulação dependente de AMPc da contractilidade da artéria basilar canina [58].

O mecanismo pelo qual um aumento de AMPc pode induzir a vasorelaxação no MVL, permanece por esclarecer. Tem-se assumido que a activação da proteína dependente de AMPc (PKA) pode representar um dos mecanismos pelo qual este possa actuar. No entanto, vários estudos sugeriram que a PKA não é o único mediador que promove a vasorelaxação sendo atribuído um papel importante à PKG [61]. Apesar do envolvimento da PKA e/ou PKG ter sido bastante estudado, pouco se sabe sobre a participação das proteínas cinases dependentes de nucleotídeos cíclicos em tecidos. Até à data, não se encontra clarificado o efeito vasorelaxante mediado pela estimulação das ciclases ou pela inibição de PDE's envolvidas na activação da PKA e/ou PKG [61]

1.5 Estrogénios

Os efeitos vasculares das hormonas sexuais femininas foram propostos à mais de cem anos. O conhecimento do modelo celular/molecular pelo qual as hormonas induzem dilatação está longe de ser completamente entendido. No entanto, tornou-se claro que os estrogénios interagem directamente com o músculo liso humano afectando o seu tónus [66, 67]. Vários estudos demonstraram efeitos benéficos dos estrogénios na redução de incidentes de doenças coronárias, sugerindo um efeito protector a nível vascular [16, 26, 46, 68-70].

1.5.1 Síntese do estradiol

Os seres humanos produzem três esteróis, nomeadamente o estradiol, o estriol e a estrona, sendo o estradiol o mais importante. Na via biossintética (*Fig. 20*) do estradiol, a aromatase converte a androstenediona em estrona, e a 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase converte a estrona em estradiol. Por outro lado, a aromatase pode metabolizar directamente a testosterona em estradiol. Nas mulheres em pré-menopausa, o estradiol é sintetizado maioritariamente em tecidos como as células da granulosa dos ovários e placenta. No entanto, outros órgãos e tecidos produzem estradiol incluindo o tecido adiposo, pele, endométrio, mucosa vaginal, seios, fígado, vasos sanguíneos e coração. As enzimas responsáveis pela síntese de estradiol são também expressas nas células do músculo liso vascular, fibroblastos cardíacos e miócitos, sugerindo que estes locais de síntese possam ser importantes no sistema cardiovascular [71].

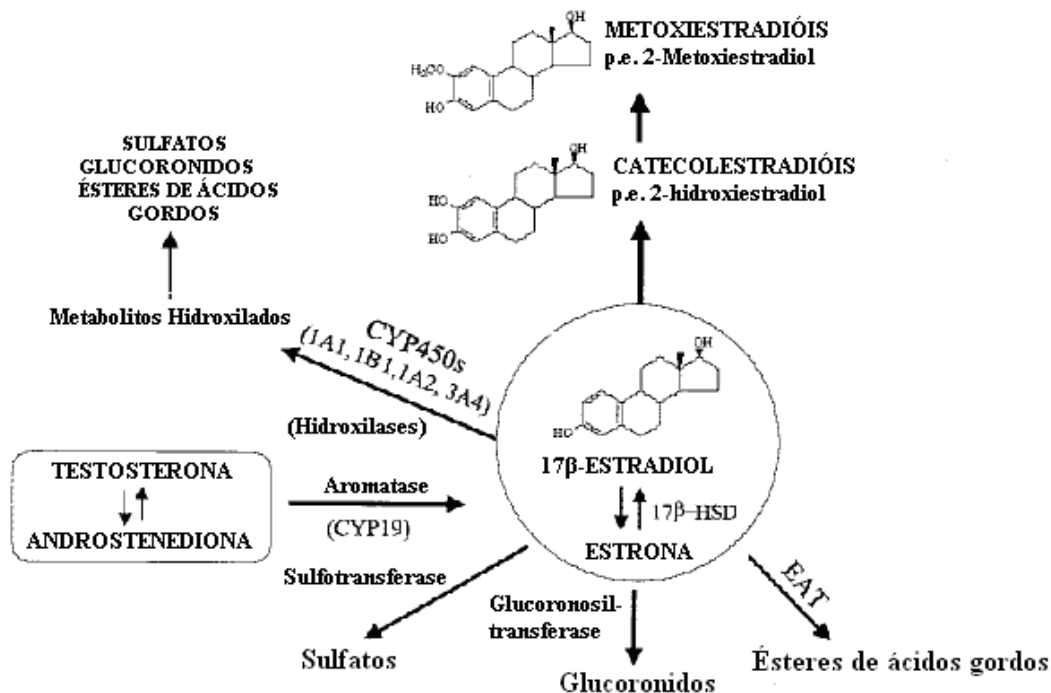


Fig.20: Representação das diferentes vias envolvidas na síntese e metabolismo do 17 β -estradiol, [71].

Abreviaturas: ST, sulfotransferase; GT, glucuronosiltransferase; EAT, Éster aciltransferase; 17 β -HSD; 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase.

1.5.2 Estrogénios e tónus vascular

Os efeitos directos das hormonas sexuais no MVL foram já descritos em vários conjuntos de artérias, como as humanas, caninas, suínos e ratos [69]. É importante referir, que quase todas as hormonas sexuais testadas até à data, parecem causar relaxamento vascular e inibir a contracção do MVL. Foi observado por vários estudos que os efeitos relaxantes vasculares do 17 β -estradiol eram superiores aos provocados por outras hormonas como a testosterona e progesterona [69, 71, 72].

Os estrogénios têm várias acções benéficas como o aumento da vasodilatação arterial, inibição da resposta celular causada por danos vasculares e prevenção da aterosclerose [42, 71, 73]. Os estrogénios promovem vasodilatação em artérias às quais foi removido o endotélio, sugerindo uma inibição do tónus num processo independente do endotélio, envolvendo uma acção directa nas células do músculo liso [66, 67]. Os estrogénios podem exercer dois tipos de efeitos nos tecidos cardiovasculares. Os efeitos directos resultam de uma via designada não genómica e os indirectos ocorrem por uma via denominada genómica (Tabela 3) [74-76]. A vasodilatação arterial ocorre

primariamente através de uma resposta rápida, via não genómica, que é independente de alterações na expressão genética [76, 77]. Os efeitos genómicos ocorrem após um longo período de tempo, pois envolvem alterações na expressão de genes que regulam o tónus vascular, a resposta vascular a danos ao nível da artéria e o desenvolvimento de aterosclerose [46, 76].

Tabela 3: Efeitos directos e indirectos dos estrogénios [46].

<u>Directos</u>	<u>Indirectos</u>
Efeitos rápidos, não genómicos	Efeito no soro lipoproteico
↑ vasodilatação arterial	↓ LDL-C
↑ síntese de óxido nítrico	↑ HDL-C
	↑ triglicéridos
Longo termo, genómicos	Efeitos na coagulação e fibrinólise
↑ enzimas vasodilatadoras	↓ Efeito dependente do tipo e da
↓ danos vasculares	dose de estrogénio e duração da terapia
↑ crescimento das células vasculares	Efeito antioxidante
endoteliais	↓ oxidação do LDL-C
↓ proliferação das células do	
músculo liso vascular	
HDL-C lipoproteína de alta	LDL-C lipoproteína de baixa
densidade em colesterol.	densidade em colesterol.

Muitos estudos efectuados observaram que todas as hormonas esteróides, a vitamina D e as hormonas tiróides estimulam um efeito rápido nas vias de transdução de sinal, tais como a produção de segundos mensageiros, a activação e inibição de canais iónicos e desencadeamento da cascata de proteínas cinases. Estas acções ocorrem num período de tempo de segundos a minutos, tempo esse demasiado rápido para envolver a transcrição de genes, não sendo afectadas pela presença de inibidores de transcrição de genes, e até em alguns casos, foi observado na ausência de núcleo [78]. Os receptores de hormonas sexuais já foram identificados no citosol e no núcleo de vários tipos celulares incluindo no endotélio e no músculo liso vascular (VSM) [77]. A interacção das hormonas sexuais com receptores intracelulares, sabe-se que estimula uma grande

quantidade de efeitos que podem afectar o crescimento celular e proliferação. Estudos recentes sugerem que estas hormonas sexuais podem também interagir com receptores membranares e induzirem possíveis efeitos vasculares não genómicos adicionais, tais como, a modificação da circulação de lipoproteínas, inibição da oxidação de lipoproteínas, atenuação de lesões ateroscleróticas, modulações favoráveis de homocisteína, mudanças na coagulação sanguínea e inibição da acumulação intravascular de colagénio [16]. Como as alterações no tónus vascular têm um papel central no controlo da pressão sanguínea na circulação em doenças coronárias e hipertensão, é importante observar o efeito das hormonas sexuais no tónus vascular [16].

1.5.3 Receptores de estrogénios

Os receptores de estrogénios são expressos em diferentes números, tanto no endotélio como MVL, em vários sistemas vasculares. Tem sido proposto que existe uma associação entre o número de receptores de estrogénios e a função normal das células endoteliais, sugerindo que uma diminuição dos números de receptores no endotélio pode representar um risco para doenças cardiovasculares. Para além disso, os receptores de hormonas apresentam diferentes subtipos, distribuição nos tecidos e localização subcelular, e podem ser modulados por vários agonistas e antagonistas [16]. Foram identificados dois tipos de receptores de estrogénios, os ER α - e os ER- β [72, 77]. Os ER- α apresentam vários subtipos, tais como, ER- α A, ER- α C, ER- α E e ER- α F. Da mesma forma os receptores ER- β também apresentam subtipos, que são os ER- β 1, ER- β 2, ER- β 4 e ER- β 5 [76]. Vários estudos propõem que os ER- α promovem o efeito protector dos estrogénios em resposta a danos vasculares. No entanto, o ER- β encontra-se mais largamente distribuído no MVL humano, particularmente em mulheres [72, 79, 80]. Os ER's foram localizados no núcleo e no citoplasma. Os esteróides sexuais, como os estrogénios, difundem-se através da membrana plasmática e formam complexos com receptores nucleares/citoplasmáticos. Estes, por sua vez, ligam-se à cromatina e estimulam a transcrição de genes com um elemento regulador específico associado aos esteróides. As transcrições mediadas pelos ER's requerem um co-activador para mediar a actividade de transcrição, o SRC-3, co-activador esteróide 3 que se encontra expresso na MVL [16].

1.5.4 Efeitos genómicos dos estrogénios

O mecanismo clássico de acção do 17β -estardiol em tecidos alvo, também designado de via genómica, envolve a ligação do 17β -estardiol a receptores de estrogénios nucleares/citosólicos (RE- α ou RE- β) [72, 75] (*Fig.22*). Estes receptores de estrogénios pertencem a uma classe de receptores classificados como factores nucleares de transcrição activados por ligandos. Estes ligandos activam o receptor nuclear, que vai actuar como factor de transcrição, estimulando a síntese de mRNA após um certo tempo de exposição (horas a dias). A activação destes receptores pelas hormonas correspondentes afecta a expressão de um gene, actuando numa sequência específica em genes alvo. Estes elementos são conhecidos como elementos de resposta a estrogénios modulando eventos de transcrição [74-77].

A interacção das hormonas sexuais com um receptor nuclear/citosólico determina um efeito genómico promovendo o crescimento endotelial da célula. Ao nível do MVL, os esteróides inibem o crescimento e induzem um efeito antiproliferativo [16, 76]. Como está representado na figura 21, na via genómica, os estrogénios ligam-se a RE nucleares/citosólicos, provocando a inibição de factores de crescimento activados por MAP cinase, a transcrição de genes e a consequente inibição do crescimento e proliferação do MVL [16].

1.5.5 Efeitos não genómicos dos estrogénios

Supõe-se actualmente que os efeitos rápidos, designados de efeitos não genómicos do 17β -estardiol, resultam da possível existência de receptores de estrogénios na membrana plasmática [81]. Estes, por sua vez, poderão estar envolvidos na regulação dos canais iónicos da membrana, nos receptores associados à proteína G e na activação da MAP cinase e da PKC (proteína cinase C) [81, 82]. Pensa-se que estes receptores actuam também no aumento da actividade dos nucleótidos cíclicos e na regulação da actividade da PLC [82]. Tais efeitos provocariam alterações em toda a actividade contráctil das células. Esses efeitos rápidos (inferiores a 30 minutos) reforçam a possibilidade de uma via de sinalização celular rápida pela existência de um receptor membranar para o 17β -estardiol na membrana plasmática. Recentemente, alguns estudos mostraram que diversas acções das hormonas esteróides sobre as membranas plasmáticas envolvem vias de sinalização não nucleares, tais como, ligação às proteínas

G e formação de segundos mensageiros [81]. Os estrogénios podem induzir a mobilização de Ca^{2+} , o aumento dos níveis de segundos mensageiros como os nucleótidos cíclicos (GMPc e AMPc) [68, 83] e activarem diversas cinases, incluindo a proteína cinase C [84], a cinase do fosfatidilinositol- 3-OH (IP_3 -cinase) e a MAPK [84], através de mecanismos que ainda não se encontram completamente entendidos [16]. Os estrogénios promovem relaxamento das artérias por um efeito independente do endotélio em artérias de ratos, porcos e artérias coronárias humanas quando pré-contráidas por um agente contráctil [16, 66, 83, 85, 86]. A acção desta hormona na parede arterial promove alterações do fluxo de iões nas células do músculo liso. Assim, o efeito vasodilatador pode ser influenciado pelo género, tipo de vasos em estudo e prévia exposição aos estrogénios [77]. Os estrogénios exercem um efeito inibidor directo no músculo liso *in vitro*, pela suposta activação do efluxo de potássio [66, 83, 85] e inibição do influxo de cálcio [66, 83, 86, 87].

Na figura 21, encontram-se representados os modelos mais aceites actualmente para o modo de actuação dos estrogénios. Podemos observar que na via não genómica, os estrogénios ligam-se a RE's da membrana plasmática, levando à inibição do mecanismo de contracção do MVL provocado por agonistas. Um agonista (A) activa um receptor específico (R), estimulando a fosfolipase C da membrana (PLC) e aumentando a produção de IP_3 e DAG. O IP_3 estimula a libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático (SR). O agonista também estimula a entrada de cálcio através dos canais de cálcio. O cálcio liga-se a CAM e activa a cinase das cadeias leves de miosina (MLC) levando à sua fosforilação, iniciando a contracção do MVL. O DAG provoca a activação da proteína cinase C (PKC). A PKC pode fosforilar a calponina (CaP) e/ou activar a cascata de proteínas cinases como a Raf, MAPK cinase (MEK), e a MAPK, levando à fosforilação da *caldesmon* (CaD) e a um aumento da força dos miofilamentos. Os possíveis efeitos dos estrogénios incluem a activação dos canais de K^+ , levando à hiperpolarização da membrana. Também promovem a inibição da entrada de cálcio pelos canais VOCC's e consequente inibição da fosforilação da MLC dependente de cálcio, inibindo a contracção do MVL. Os estrogénios também podem inibir a PKC e/ou a via da MAPK, causando uma maior inibição da actividade contráctil do MVL [16].

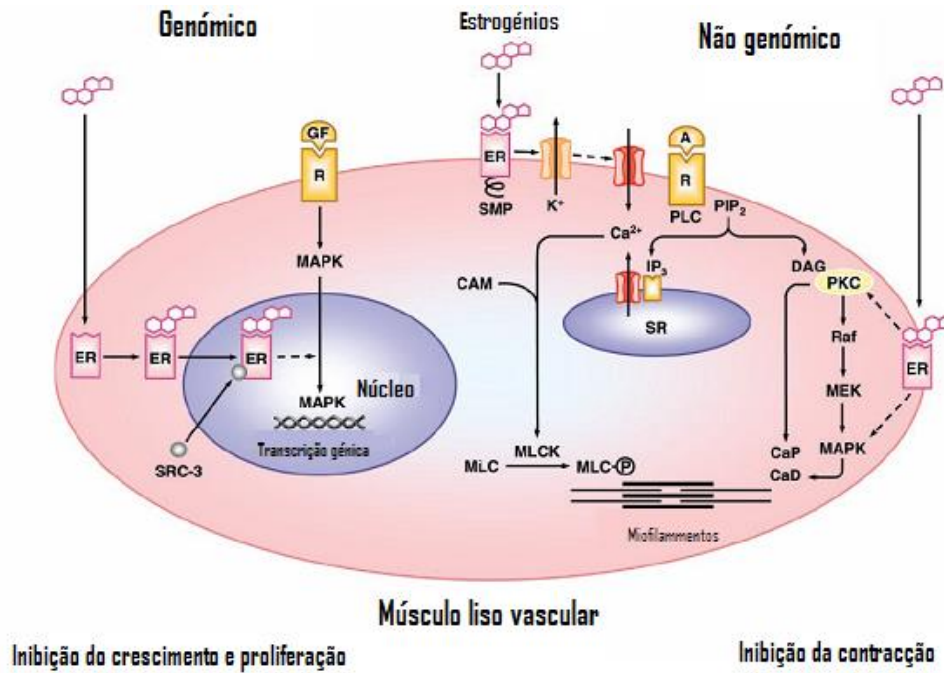


Fig.22: Representação esquemática dos efeitos genômicos e não genômicos dos estrogénios no MVL [16].

Abreviaturas: PLC, fosfolipase C; CAM, proteína ligadora de Cálcio; PKC, proteína cinase C, ER, receptor de estrogénios; SR, retículo sarcoplasmático; MLCK, cinase ligadora de cadeias leves de miosina; MLC; cadeias leves de miosina; GF, factores de crescimento; R, receptor; CaD, caldesmon.

2. MÉTODOS

2.1 Preparação dos tecidos

Várias porções do cordão umbilical, de 3 a 7 cm, foram obtidas de partos normais no bloco de obstetrícia e ginecologia do Centro Hospitalares da Cova da Beira. Os cordões foram colhidos com o consentimento prévio das mães e de acordo com os protocolos aprovados pelo Comité de Ética do hospital. As amostras de cordão umbilicais foram colocadas numa solução salina fisiológica, PSS (composição em mM: NaCl 110, CaCl₂ 0.15, KCl 5, MgCl₂ 2, HEPES 10, NaHCO₃ 10, KH₂PO₄ 0.5, NaH₂PO₄ 0.5, glucose 10, EDTA 0.49). Para evitar contaminações e degradação dos tecidos foi também adicionado ao PSS, penicilina (5 U/ml), estreptomicina (5 µg/ml), anfotericina B (12.5 ng/ml) e antiproteases (leupeptine 0.45 mg/l, benzamidina 26 mg/l) e inibidor de tripsina (10 mg/l). As artérias foram isoladas a partir dos segmentos de cordão umbilical, após a remoção da geleia de *Warton*. Deixou-se repousar as artérias aproximadamente 24h e foi removido o endotélio, pela passagem de uma linha de algodão, presa a uma agulha, pelo lúmen. Todo este processo foi realizado a uma temperatura de aproximadamente 4°C, em solução de PSS. (Descrição das soluções utilizadas nos anexos)

2.2 Determinação da tensão exercida nos anéis da AUH

Procedeu-se a montagem dos anéis da artéria do cordão umbilical, de 3 à 4mm de comprimentos, num banho termostaticado de banho de órgãos (LE01.004, Letica). Os anéis foram suspensos individualmente em ganchos de aço inoxidável inseridos nos seus lúmens e montados, sob uma tensão isométrica de 1,5g. Esta montagem foi realizada em pocetos de vidro com 15ml de solução modificada de Krebs bicarbonato (composição em mM: NaCl 119, KCl 5.0, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 0.5, MgSO₄ 1.2, EDTA 0.03, glucose 11). Para a medição da tensão utilizou-se um transdutor de tensão (TRI 201, Panlab SA, Espanha) e um amplificador (ML118/D Quad Bridge, AD.Instruments). A interface foi realizada com Power-Lab/4SP (ML750, ADInstruments) e o software Chart5 PowerLab (ADInstruments). A solução foi mantida

a 37°C, borbulhada com uma mistura gasosa de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Depois dos anéis de artérias montados, a solução foi renovada de 10 em 10 minutos com a solução de Krebs, por três vezes. Estabilizou-se ao longo das lavagens a tensão aproximadamente a 1,5 g. Depois da tensão estabilizar, contraiu-se os anéis de AUH utilizando KCL (60 mM), His (10 µM) e 5-HT (1 µM), e observou-se a vasodilatação induzida pelo 17β-estradiol (1-100 µM). Os anéis de AUH cujas contrações fossem inferiores a, 1g quando contraídos com KCl e 5-HT, e 600 mg quando contraídos com a His, foram descartados.

Para se determinar o efeito dos canais de potássio no relaxamento induzido pelo 17β-estradiol, foram utilizados diferentes inibidores de canais:

- TEA (1 mM); um inibidor de canais de grande condutância, K_{Ca} e de canais de potássio dependentes de voltagem, K_v;
- Glibenclamida (10 µM); um inibidor de canais sensíveis ao ATP;
- 4-Aminopiridina (1mM); um inibidor de canais dependentes de voltagem, K_v.

Para se determinar o efeito dos canais de cálcio no relaxamento induzido pelo 17β-estradiol, foi utilizado um potente bloqueador de canais de Ca²⁺ tipo L, a nifedipina (10 µM).

Foi observado o papel dos nucleótidos cíclicos com auxílio do péptido natriurético (ANP, 0,1 µM) e das diferentes isoformas de PDE's no relaxamento induzido pelo 17β-estradiol na AUH.

Para tal, foi utilizado:

- 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 50 µM), um inibidor inespecífico de PDE's;
- 8-metoximetil-3-isobutil-1-metilxantina (MMBX, 2 µM), um inibidor específico da PDE 1;
- Cilostamida (Cil 1 µM), para inibir especificamente a PDE 3.

Foi observado o efeito dos inibidores de ciclase:

- ODQ (30 µM) um inibidor específico da guanilciclase;
- SQ (100 µM), um inibidor específico da adenilciclase.

Por fim, foi observado o efeito do colesterol, na contractilidade da AUH, utilizando as mesmas concentrações do 17β-estradiol (1-100 µM).

2.3 Drogas e reagentes

Todas as drogas foram adquiridas à *Sigma-Aldrich Química* (Sintra, Portugal), a excepção da 4-AP, cilostamida e MMBX comprados à *Biogen Científica* (Madrid, Espanha). O 17 β -estradiol e colesterol foram inicialmente dissolvidos em DMSO, e as concentrações finais obtidas nas diluições com solução de Krebs. A His, 5-HT, Gli, 4-AP, TEA, NIF, ODQ, SQ e ANP foram dissolvidos em água destilada para obter as concentrações pretendidas. A Cil, Col e MMBX foram dissolvidos em etanol.

2.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi efectuada com auxílio do programa informático *Sigma Stat*, sistema de análise estatística, versão 1.00 (1992). O efeito relaxante do 17 β -estradiol foi dado como percentagem de relaxamento relativamente a contracção efectuada. Os resultados foram expressos como médias \pm SEM (erro padrão associado ao número de experiências, n). A comparação entre dois grupos foi feita com teste *t-student*. A comparação entre vários grupos analisados utilizando a *One-Way ANOVA*, seguida de um teste de Tukey ou Dunnet para determinar diferenças significativas entre as médias. Os níveis de significância foram considerados para $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do 17 β -estradiol na contractilidade da AUH

Os anéis de AUH sem endotélio foram expostos a diferentes agonistas de receptores (5-HT 1 μ M e HIS, 10 μ M) e à despolarização (KCl, 60 mM). A tensão nas contracções dos anéis da AUH, quando estimuladas com HIS (10 μ M), 5-HT (1 μ M) e KCl (60 mM), reflecte os diversos mecanismo de acção nas CMV. Verificou-se que o efeito vasoconstritor da 5-HT foi superior, em média, ao KCl que por sua vez é superior ao da histamina na AUH (Tabela 1).

Estes três agentes contrácteis foram utilizados como estímulo inicial para se poder observar os efeitos vasorelaxantes do 17 β -estradiol.

Tabela 4: Média das contracções (em mg) induzidas pelos diferentes agonistas utilizados; HIS (10 μ M), 5-HT (1 μ M) e KCl (60 mM), erro padrão associado ao número de contracções efectuadas e o número de contracções efectuadas (n).

	5-HT	HIS	KCl
Média	1753,564	1067,130	1640,672
Erro padrão	77,462	45,370	71,354
n (n.º de artérias)	182	231	204

Em geral, o 17 β -estradiol induz uma vasorelaxação dependente da concentração adicionada aos anéis de AUH contraídos previamente com HIS, 5-HT e KCl (Fig.23). O tempo necessário para se observar o efeito relaxante a diferentes concentrações de 17 β -estradiol varia entre 2 a 15 minutos. O DMSO, veículo utilizado para dissolver o 17 β -estradiol, não teve nenhum efeito relaxante nas artérias para as concentrações utilizadas.

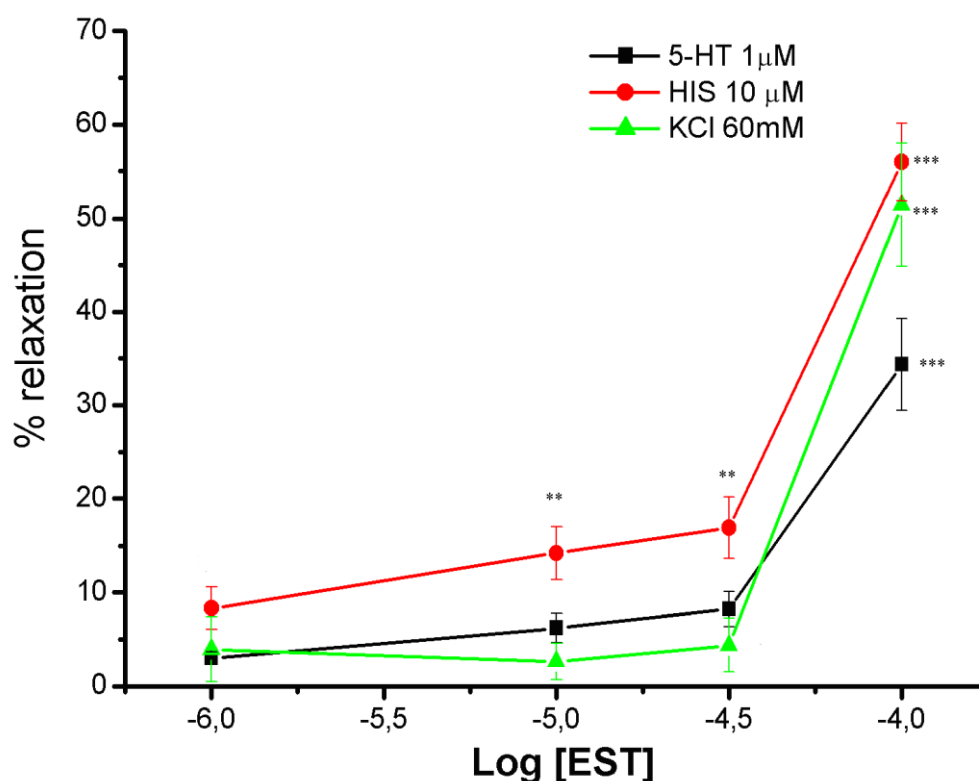


Fig.23: Efeito relaxante da adição de concentrações cumulativas de 17 β -estradiol (1-100 μ M) em pré-contrações realizadas com 5-HT (1 μ M), HIS (10 μ M) e KCl (60 mM) na AUH sem endotélio. Cada ponto representa o valor médio, sendo as linhas verticais o valor de erro associado ao n (n, corresponde no mínimo a seis contrações). (* p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (17 β -estradiol vs controlo))

Como podemos ver na figura 23, o efeito vasorelaxante é dependente da concentração de 17 β -estradiol adicionada e  máximo para concentrações de 17 β -estradiol de 100 μ M. Observa-se que o efeito relaxante máximo foi semelhante entre a HIS e o KCl (55,978% \pm 4,155 e 52,435 \pm 6,564, respectivamente). Para contrações induzidas por 5-HT (34,375 % \pm 4,9172) o relaxamento provocado pela concentração máxima de estradiol é inferior relativamente à HIS e ao KCl.

3.2 Efeito do 17 β -estradiol nos canais iónicos da AUH

3.2.1 Canais de potássio

Foi observado o efeito de três inibidores de canais de potássio, a Gli, 4-AP e TEA, no efeito vasorelaxante do 17 β -estradiol na AUH. Isto é, permite-nos analisar o envolvimento destes diferentes canais de potássio na vasorelaxação induzida quando contraídos com os diferentes agentes contrácteis.

- Glibenclamida (GLI); Inibidor de canais de K_{ATP} ;
- 4-aminopiridina (4-AP); Inibidor de canais de K_v ;
- Tetraetilamonio (TEA); Inibidor de canais de K_{Ca} .

Inicialmente, após promover a contracção pelos diferentes agentes, os anéis de AUH foram expostos durante aproximadamente 15 minutos à Gli, 4-AP e ao TEA, juntos ou separadamente.

Pode observar-se nas figuras 24, 25 e 26, os efeitos da adição de Gli, 4-AP e TEA no efeito relaxante associado ao 17 β -estradiol para as maiores concentrações adicionadas (EST 100 μ M).

A utilização da Gli (10 μ M), um inibidor de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), não afectou significativamente o efeito do 17 β -estradiol em pré-contracções com KCl e 5-HT. Relativamente ao inibidor de canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), o 4-AP (1mM) reduziu de forma significativa o efeito relaxante do 17 β -estradiol para todos os agentes contrácteis utilizados. Por sua vez a TEA, um inibidor de canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}), reduziu de forma significativa o efeito relaxante associado ao 17 β -estradiol em todas as artérias, independentemente do agente contráctil utilizado (Fig.24, 25 e 26).

O veículo utilizado para dissolver o 17 β -estradiol (DMSO) não promoveu qualquer efeito na contractilidade da AUH para as concentrações utilizadas.

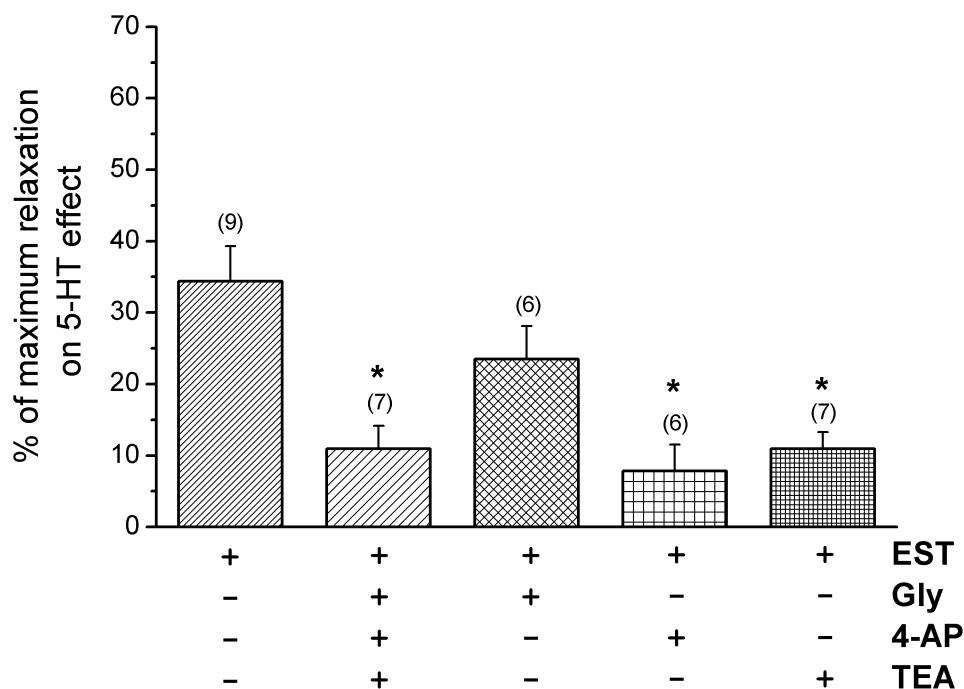


Fig.24: Efeito dos diferentes inibidores de canais de potássio (GLI, 10 μ M; 4-AP, 1mM e TEA, 1mM), numa pré-contracção com 5-HT (1 μ M) relativamente ao tratamento com 17 β -estradiol (EST, 100 μ M) na AUH. (* $p < 0,05$ em relação ao efeito do EST)

Quando o agente contráctil é a 5-HT, podemos observar que o relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol é alterado quando colocado em presença de diferentes inibidores de canais de potássio. Pois, podemos observar que a presença de inibidores de canais dependentes de voltagem e de cálcio, provocam diferenças significativas relativamente ao relaxamento provocado pelo 17 β -estradiol. Não se observaram diferenças significativas quando se utilizou o inibidor de canais dependentes de ATP.

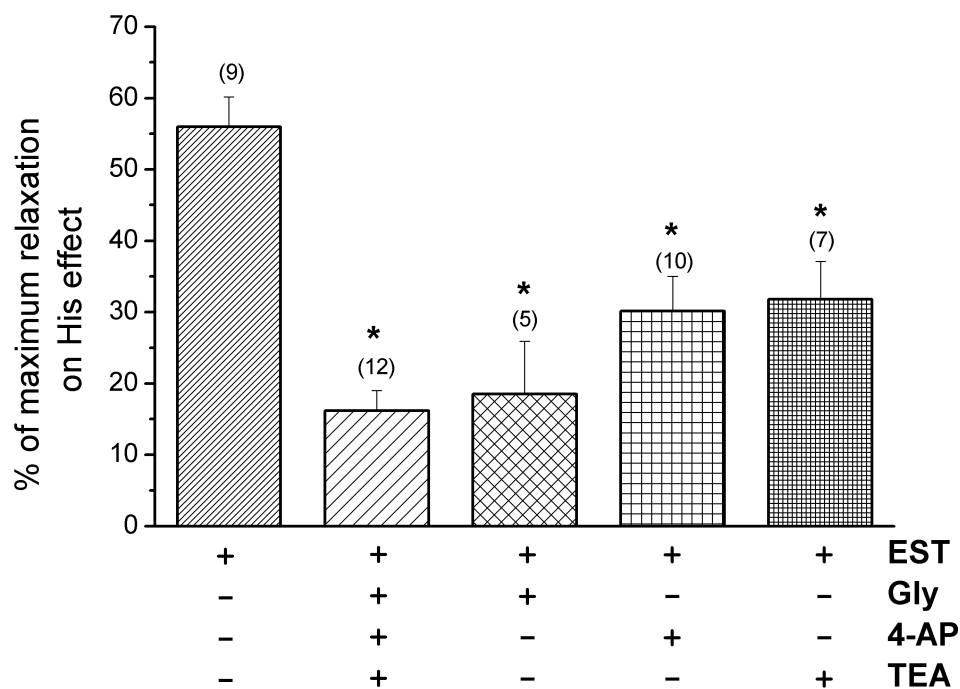


Fig.25: Efeito dos diferentes inibidores de canais de potássio (GLI, 10 μ M; 4-AP, 1mM e TEA, 1mM) numa pré-contracção com HIS (10 μ M) relativamente ao tratamento com 17 β -estradiol (EST, 100 μ M) em AUH. (* $p < 0,05$ em relação ao efeito do EST)

Na contracção efectuada com HIS, podemos observar que a inibição dos três tipos de canais provoca alterações na contractilidade da AUH, na medida em que a sua adição promove alterações relativamente ao relaxamento provocado pelo 17 β -estradiol.

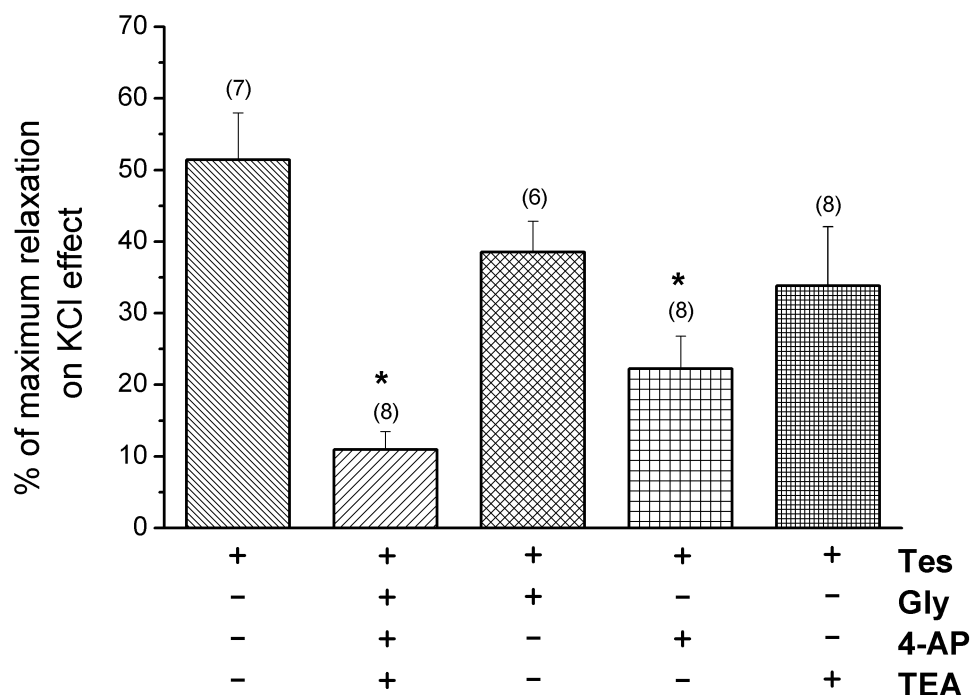


Fig.26: Efeito dos diferentes inibidores de canais de potássio (GLI, 10 μ M; 4-AP, 1mM e TEA, 1mM) numa pré-contracção com KCl (60mM) relativamente ao tratamento com 17 β -estradiol (EST, 100 μ M) em AUH. (* $p < 0,05$ em relação ao efeito do EST)

Na contracção efectuada com KCl, podemos observar que o relaxamento é alterado de forma significativa quando é adicionado um inibidor de Kv. Enquanto que a adição dos inibidores K_{Ca} e K_{ATP} , não alteram o relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol.

A utilização de todos os inibidores de canais de potássio provocou sempre uma redução do efeito relaxante do 17 β -estradiol, não ultrapassando um relaxamento máximo na ordem dos 16% na contracção efectuada com a histamina (10 μ M). A adição dos inibidores de canais de potássio, somente adicionando o veículo utilizado para dissolver o 17 β -estradiol, apenas provocou um relaxamento basal na ordem dos 5%.

3.2.2 Canais de cálcio

Identificou-se o papel dos canais de cálcio na vasorelaxação provocada pelo 17 β -estradiol na AUH, utilizando a nifedipina (NIF), um potente bloqueador de canais de Ca²⁺ tipo L.

Na contracção efectuada com 5-HT (1 μ M), a adição da nifedipina não provocou alterações no relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol (Fig.27). A utilização da nifedipina em simultâneo com o estradiol não aumentou o relaxamento observado.

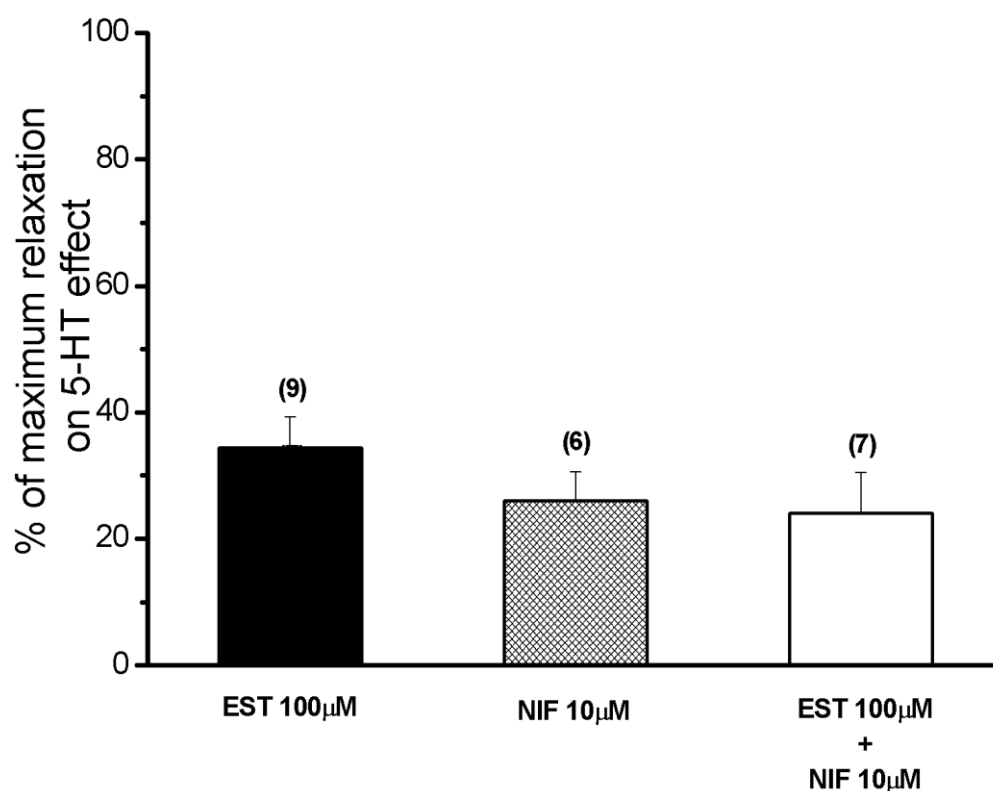


Fig.27: Efeito da utilização da nifedipina (NIF, 10 μ M) numa pré-contracção com 5-HT (1 μ M) na AUH. As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras.

Na figura 27, podemos observar a inexistência de um potenciamento da relaxação, quando se utilizam juntamente a nifedipina e o 17 β -estradiol. O relaxamento induzido pela NIF não difere do 17 β -estradiol, não se obtendo diferenças significativamente estatísticas entre os dois grupos.

Na contracção efectuada com HIS (10 μ M), o relaxamento provocado pela nifedipina não difere do relaxamento induzido pelo estradiol. A utilização em simultâneo dos dois agentes, não altera significativamente o relaxamento (Fig.28).

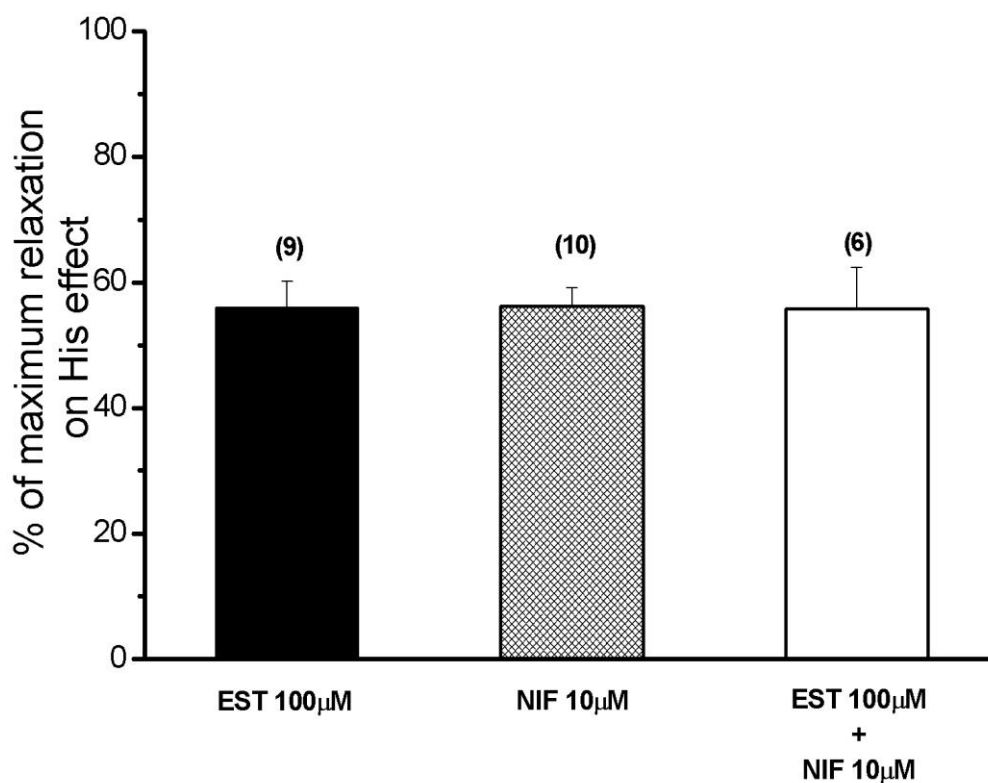


Fig.28: Efeito da utilização da nifedipina (NIF, 10 μ M) numa pré-contracção com histamina (HIS, 10 μ M) na AUH. As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras.

Do mesmo modo que para a 5-HT, na contracção com HIS não se observam diferenças significativas na vasorelaxação produzida pela utilização da NIF ou do 17 β -estradiol. A utilização da NIF em conjunto com o estradiol não provocou um aumento do relaxamento.

Foi também realizado o mesmo estudo para uma pré-contracção com KCl (Fig.29). Observou-se que o tratamento com NIF (10 μ M) promoveu um relaxamento completo da artéria.

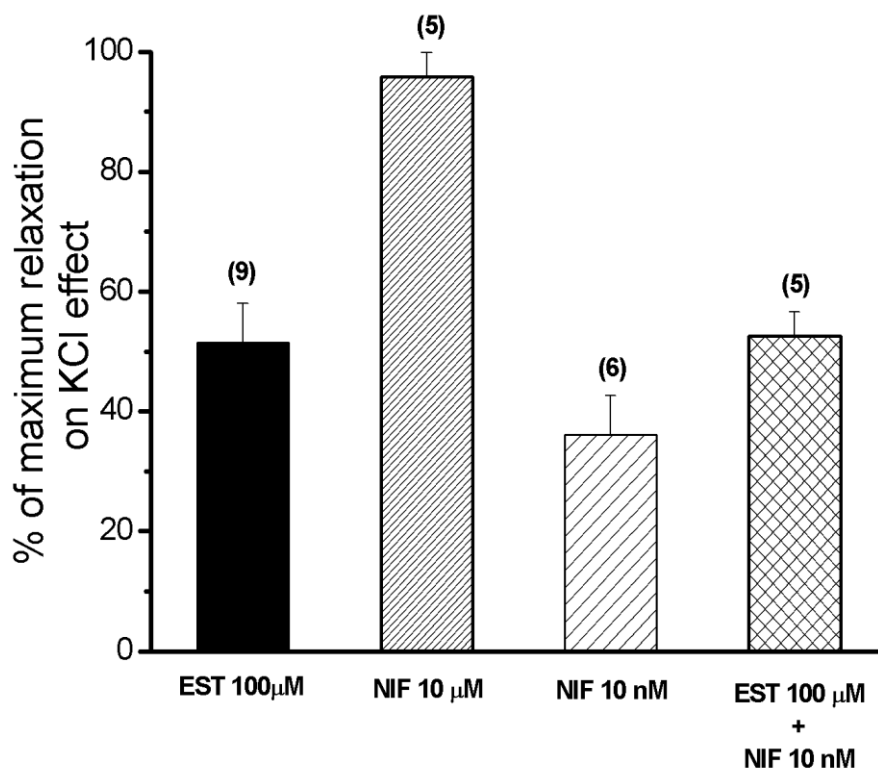


Fig.29: Efeito da utilização da NIF (10 μ M) numa pré-contracção com KCl (60mM) na AUH. As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras. (* $p < 0,05$; 17 β -estradiol vs 17 β -estradiol + nifedipina)

Neste caso podemos observar que a nifedipina (NIF, 10 μ M) promove um relaxamento total da contracção induzida pelo KCl. Para perceber de uma forma mais eficaz o efeito no relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol, foi necessário diminuir a concentração de nifedipina para 10 nM. A utilização desta concentração não demonstrou diferenças significativas relativamente ao relaxamento provocado pelo 17 β -estradiol. A utilização em conjunto do estradiol e da nifedipina não provocou nenhum aumento do relaxamento.

3.3. Efeito do ANP e dos diferentes inibidores de fosfodiesterases nos relaxamentos provocados pelo ANP (péptido natriurético atrial)

De forma a entender o mecanismo de relaxamento do 17 β -estradiol, tentou-se associar o seu mecanismo ao mecanismo de vasorelaxação provocado pelo ANP. O efeito do ANP é mediado pela ligação do péptido aos receptores associados à guanilciclase, produzindo respostas celulares específicas, principalmente através do aumento da concentração intracelular de GMPc. Assim, os anéis de AUH sem endotélio, foram contraídos com os três agentes contrácteis, observando-se resultados significativos somente para a HIS e 5-HT (Fig.30 e 31). Foram adicionados diferentes inibidores de PDE nas contracções e posteriormente analisados os seus efeitos.

Assim, o ANP foi utilizado para aumentar os níveis de GMPc. Este activador de guanilciclase induziu um relaxamento de aproximadamente 17%, na artéria contraída com 5-HT (Fig.30). A adição do 17 β -estradiol aumentou ligeiramente o relaxamento para cerca de 19%. Na contração efectuada com 5-HT, podemos observar que o relaxamento induzido pelo ANP não difere significativamente do provocado pelo 17 β -estradiol, e que a utilização em simultâneo não provocou um potenciamento da relaxação. Os inibidores de PDE's, que evitam a degradação do GMPc, foram posteriormente adicionados e verificou-se que somente a adição de um inibidor inespecífico de PDE's (IBMX) promoveu resultados semelhantes aos do 17 β -estradiol. A adição de inibidores específicos, nas artérias contraídas com 5-HT, como o MMBX (inibidor específico da PDE 1) e Cilostamida (inibidor específico da PDE 3) provocaram um relaxamento mais fraco e significativamente inferior que o provocado pelo IBMX. Ou seja, a utilização de inibidores específicos de fosfodiesterases não aumentou o efeito vasorelaxante para valores semelhantes ao do 17 β -estradiol.

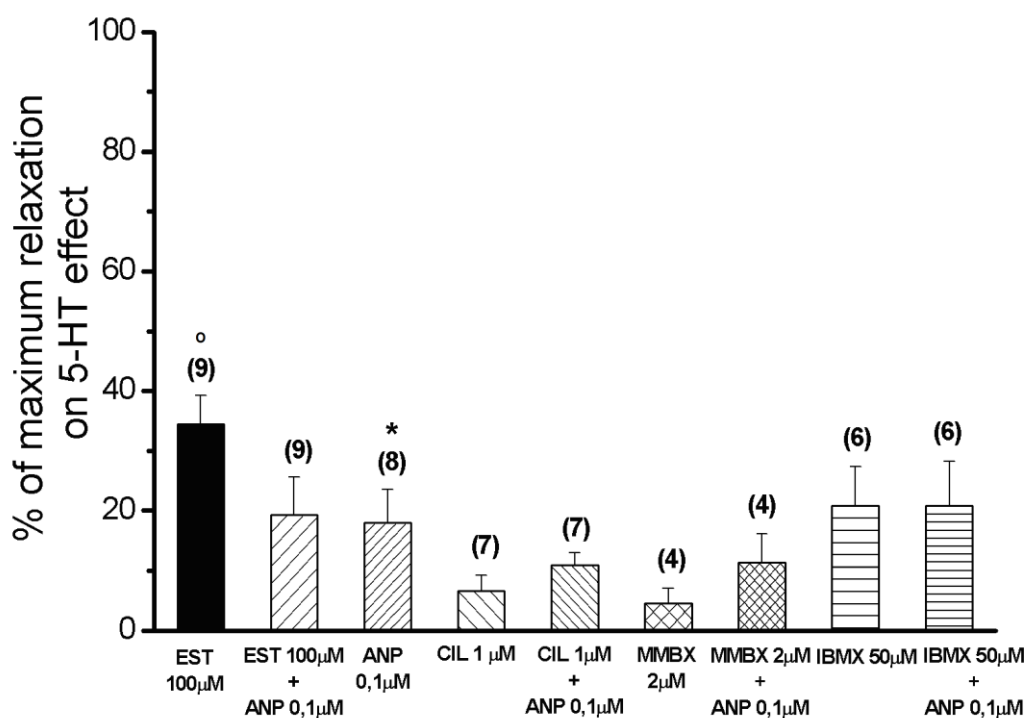


Fig.30: Efeito do ANP (0,1 µM) e diferentes inibidores de fosfodiesterases numa pré-contracção com 5-HT (1 µM) na AUH. As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras. (* p<0,05 em relação ao efeito do EST; ° p<0,05 em relação ao efeito do ANP)

A utilização do ANP, visa aumentar as concentrações intracelulares do GMPc. Pode observar-se na figura 30, que a sua adição promove um relaxamento. Os resultados mostram que o relaxamento provocado pelo ANP é diferente do provocado pelo 17β-estradiol. No entanto, a utilização em conjunto promove um relaxamento semelhante ao do estradiol ou ao do ANP, quando utilizados individualmente. Ou seja, o relaxamento provocado quando utilizados os dois agentes é semelhante, podendo supor-se um mecanismo comum de relaxamento da AUH, quando tratada com estradiol. A adição dos inibidores de PDE's quando comparados com o relaxamento provocado com o ANP, não promoveu diferenças significativas no relaxamento da AUH. O veículo utilizado para dissolver os inibidores de PDE (etanol) não promoveu qualquer efeito na contractilidade da AUH para as concentrações utilizadas.

Na contracção efectuada com HIS (Fig.31), podemos observar que o relaxamento induzido pelo ANP (aproximadamente 40%) difere significativamente do provocado pelo 17β -estradiol (55%). No entanto a utilização em simultâneo destes dois agentes promove diferenças no relaxamento (38%), quando comparado com o estradiol.

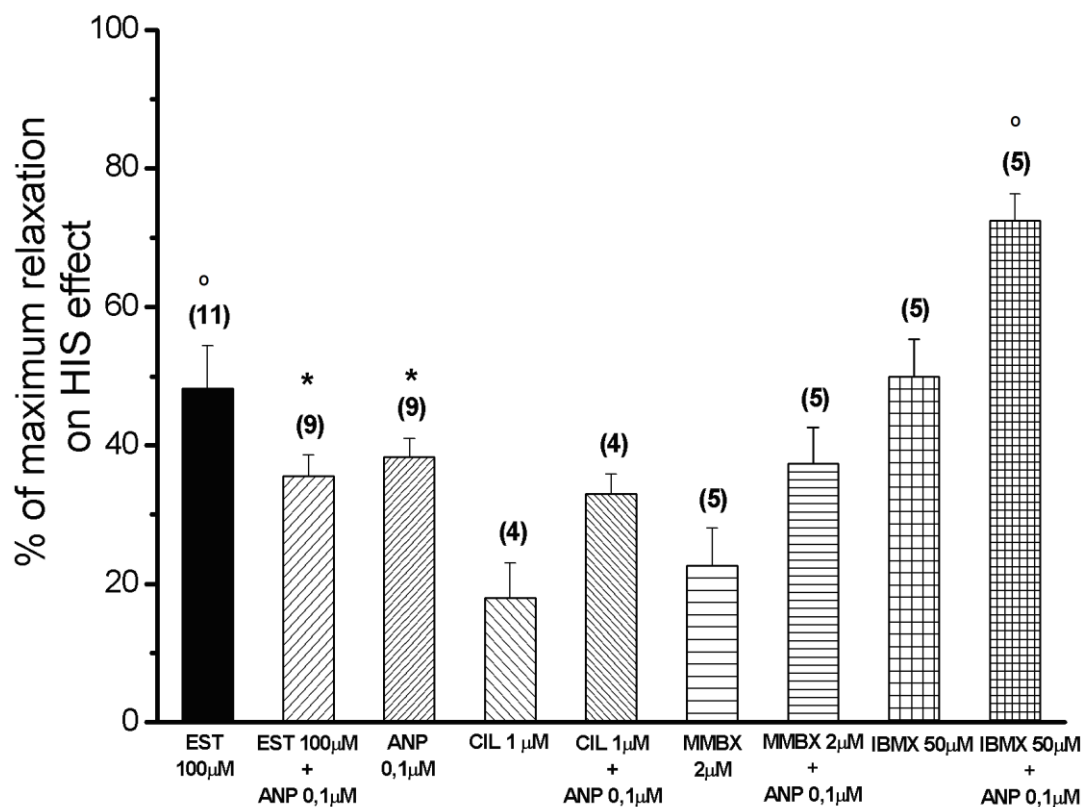


Fig.31: Efeito do ANP (0,1 µM) e diferentes inibidores de fosfodiesterases numa pré-contracção com HIS (10 µM) na AUH. As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras. (* $p < 0,05$ em relação ao efeito do EST; ° $p < 0,05$ em relação ao efeito do ANP)

Quando adicionados os inibidores específicos de PDE's, somente a adição de IBMX (inibidor inespecífico de PDE) promoveu um efeito vasorelaxante significativo das artérias contraídas com HIS. O efeito vasorelaxante do ANP é aumentado cerca de duas vezes quando este inibidor é utilizado. Isto indica um efeito vasorelaxante agudo quando ocorre uma inibição de todos os tipos de PDE. Os outros inibidores de PDE's, tanto a cilistamida (inibidor de PDE 3) como o MMBX (inibidor de PDE 1), não provocaram alterações no relaxamento induzido pelo ANP. O veículo utilizado para

dissolver os inibidores de PDE (etanol) não promoveu qualquer efeito na contractilidade da AUH para as concentrações utilizadas.

Foi realizado o estudo do efeito do ANP em contracções efectuadas com KCl.

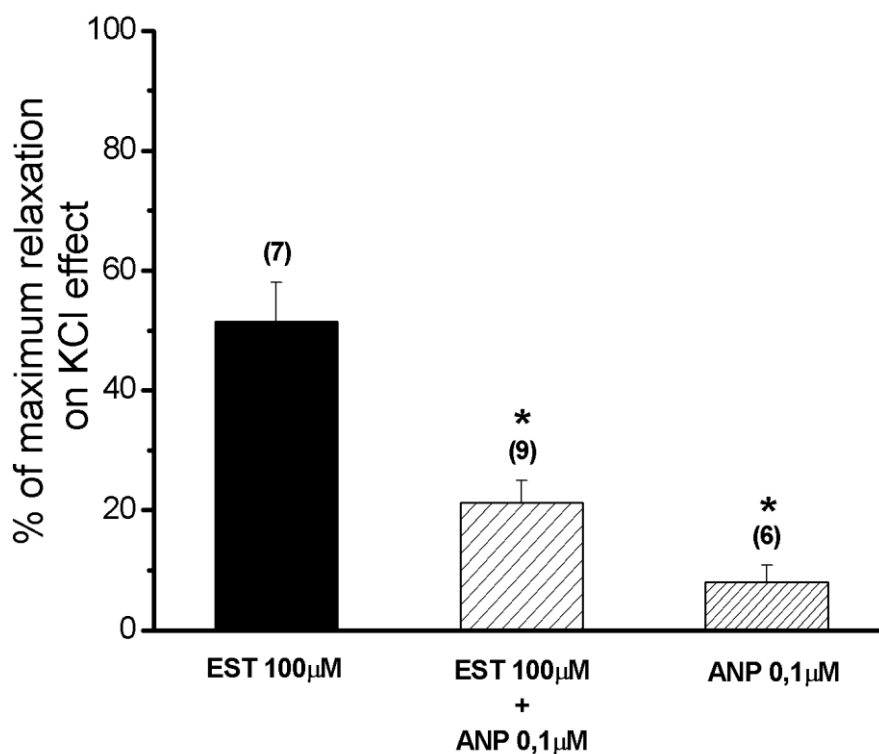


Fig.32: Efeito do ANP (0,1 μ M) e numa pré-contracção com KCl (60 mM) na AUH. As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras. (* $p < 0,05$ em relação ao efeito do EST)

Quando adicionado o ANP nas artérias contraídas com KCl (60mM), observou-se uma diminuição drástica do relaxamento relativamente ao verificado pelo 17 β -estradiol (Fig.32). A utilização do ANP não promoveu efeitos de relaxação semelhantes aos do 17 β -estradiol.

3.4 Efeito dos inibidores de ciclasas no relaxamento do 17 β estradiol

Neste trabalho, foi também observado o envolvimento das ciclasas no relaxamento provocado pelo 17 β -estradiol. Assim adicionou-se um inibidor de adenilciclase (SQ) ou um inibidor de guanilciclase (ODQ) adicionando-se de seguida o 17 β -estradiol.

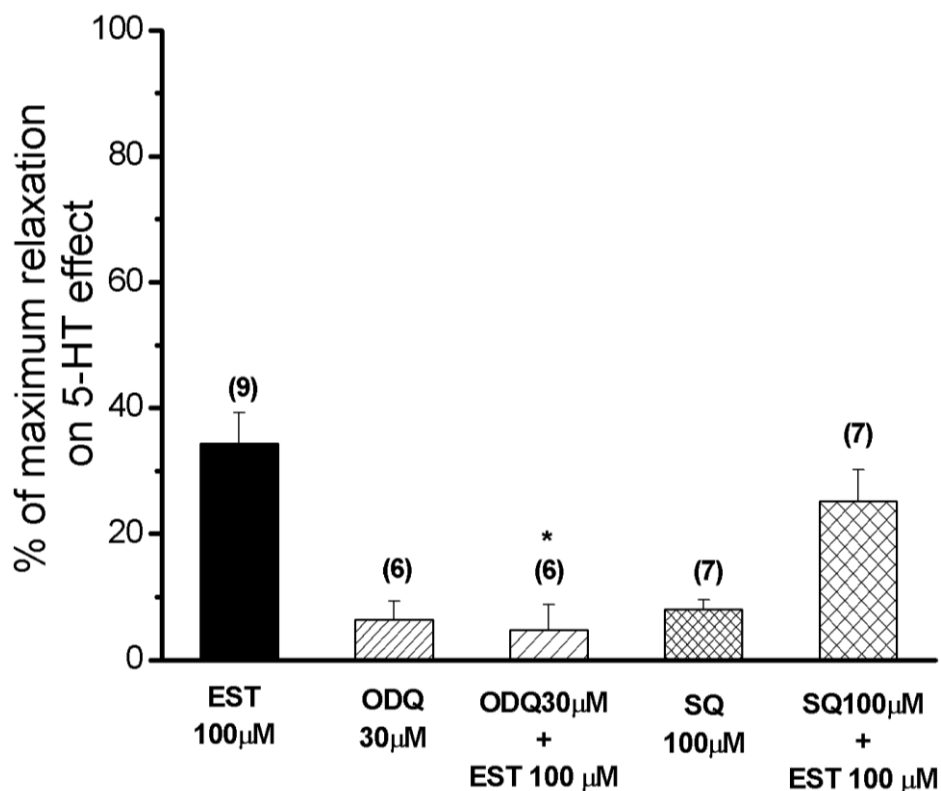


Fig.33: Relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol e inibidores de guanilciclase (ODQ) e adenilciclase (SQ) em pré-contracções com 5-HT (1 μ M) na artéria umbilical humana. (* p<0,05 em relação ao efeito do EST).

Nas artérias contraídas com 5-HT, podemos observar que apenas a adição do inibidor de guanilciclase promoveu uma alteração ao relaxamento provocado pelo 17 β -estradiol. A adição do inibidor de adenilciclase não provocou diferenças significativas na vasorelaxação (Fig.33).

Em artérias contraídas com HIS, podemos observar que tanto a adição do inibidor de guanilciclase como do inibidor de adenilciclase, promovem alterações no relaxamento provocado pelo 17 β -estradiol. Ou seja, a adição de inibidores de nucleótidos cíclicos, que visa inibir a sua produção, promove uma diminuição do relaxamento induzido pelo estradiol.

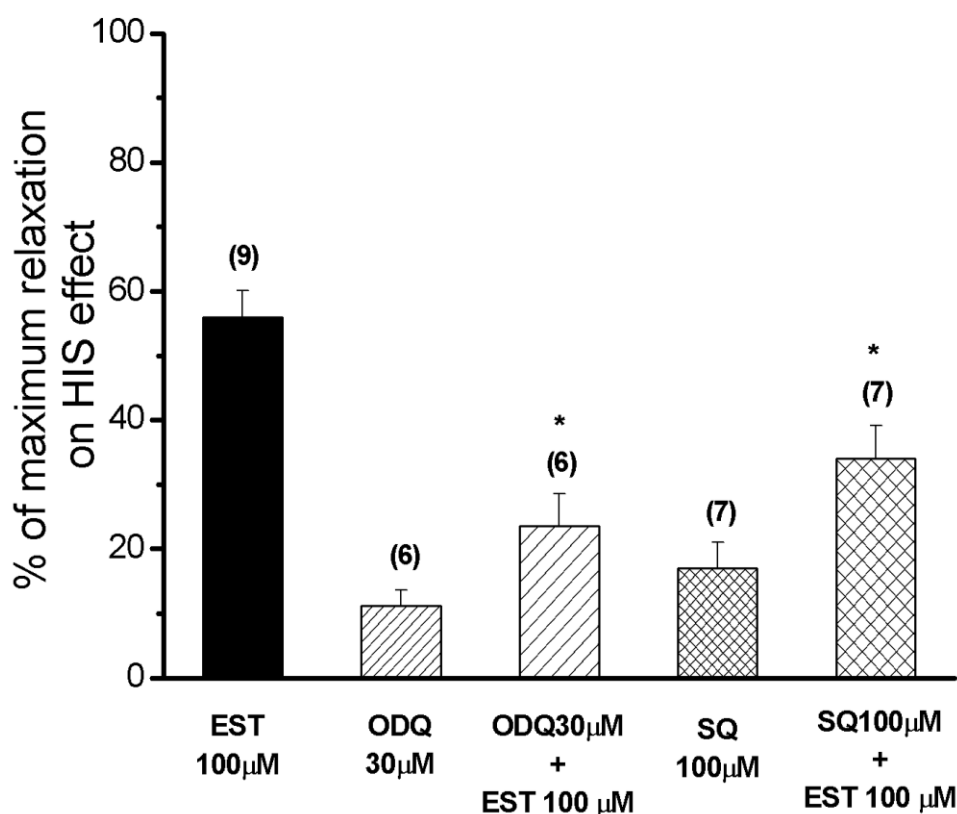


Fig.34: Relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol e inibidores de guanilciclase (ODQ) e adenilciclase (SQ) em pré-contracções com Histamina (HIS, 10 μ M) na artéria umbilical humana. (* $p < 0,05$ em relação ao efeito do EST)

Os resultados a acima apresentados mostram de forma clara que a utilização de inibidores de ciclasas provocam alterações no relaxamento induzido pelo 17 β -estradiol (Fig.34). O relaxamento induzido pelo estradiol quando a artéria é contraída com 5-HT apenas é diminuído pela utilização de um inibidor de guanilciclase. Na artéria contraída com HIS, a vasorelaxação induzida pelo estradiol também é alterada, pois observa-se uma diminuição do relaxamento quando utilizado o ODQ e SQ.

3.5 Efeito do colesterol na contractilidade na AUH

Nas páginas anteriores foi estudado o efeito do estradiol na contractilidade da AUH. Sabe-se que muitas das hormonas femininas promovem vasorelaxação em alguns tipos de vasos. De forma a poder identificar uma acção própria do 17β -estradiol estudou-se a acção do colesterol. Ou seja, com o objectivo de mostrar que o relaxamento observado era devido a uma acção do estradiol e não ao resultado do mecanismo comum a todas as hormonas femininas, foi utilizado um precursor destas hormonas.

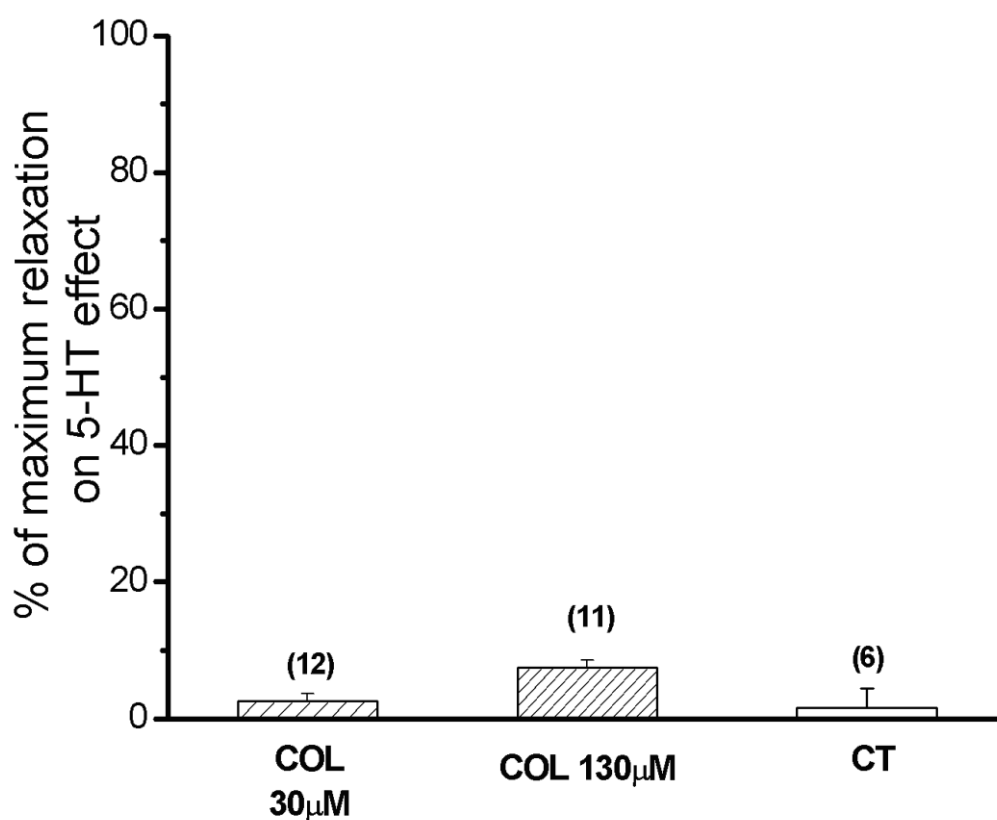


Fig.35: Efeito do colesterol (30 μ M e 130 μ M) e controlos na AUH quando contraídas com 5-HT (1 μ M). As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras.

Foi observado na figura 35 que na artéria contraída com 5-HT não se observam efeitos relaxantes significativos por parte do colesterol para as concentrações utilizadas.

Foi realizado o mesmo tipo de experiências com a Histamina.

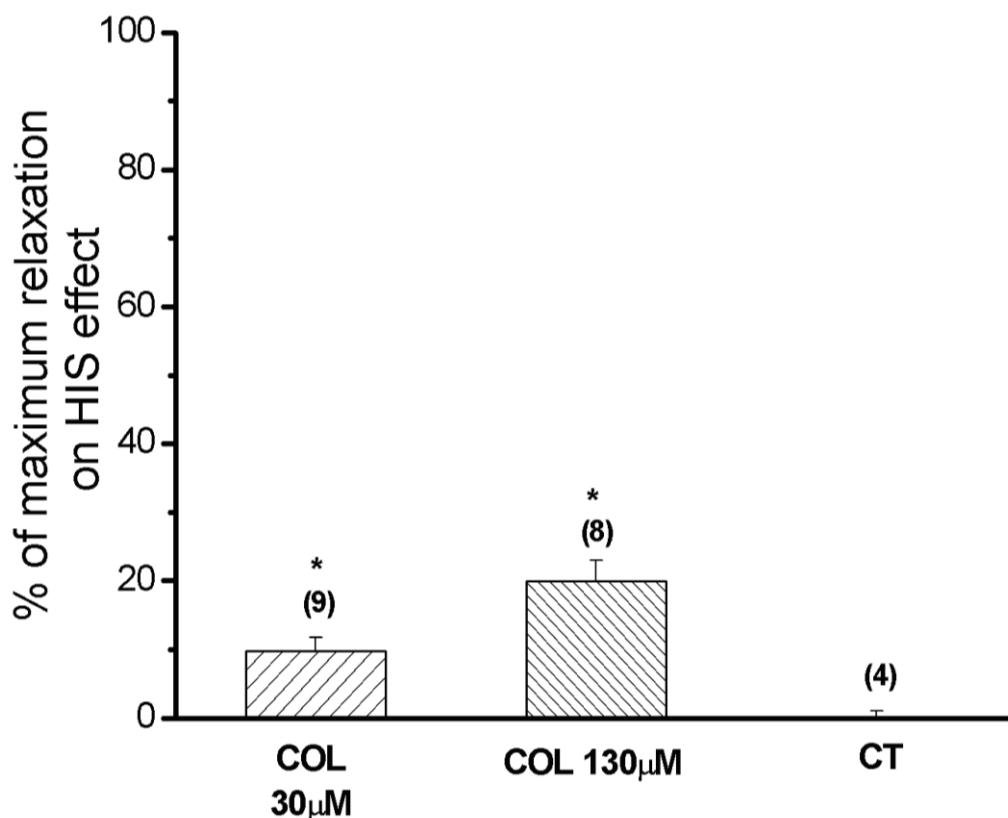


Fig.36: Efeito do colesterol (30 μ M e 130 μ M) e controlos na AUH quando contraídas com HIS (10 μ M). As linhas representam o EPM (erro padrão da média) do número de experiências indicado junto às barras. (* $p < 0,05$ em relação ao controlo)

Neste caso, observa-se um relaxamento da AUH para a concentração inferior de colesterol (Fig.36). Obtiveram-se resultados significativos relativamente ao controlo, podendo identificar um mecanismo pelo qual o colesterol provoca um efeito relaxante quando a artéria é contraída com histamina. No entanto é importante referir, que o relaxamento provocado pelo colesterol para a maior concentração utilizada (aproximadamente 20%) é bem diferente do relaxamento induzido pelo estradiol em artérias contraídas com HIS (55%) (Fig.23).

4. DISCUSSÃO

O controlo alterado da contracção/relaxamento do músculo liso está implícito em vários processos patológicos, levando a uma necessidade crescente da compreensão dos mecanismos subjacentes. As hormonas esteróides têm vários papéis importantes no sistema vascular devido aos seus receptores específicos localizados no endotélio vascular e células do músculo liso vascular. Tem sido reportado que os estrogénios têm um importante papel vasodilatador, quer pelo aumento da produção de NO no endotélio, quer na modulação da homeostase do cálcio nas CMLV. Os estrogénios são elementos activos para as células do músculo liso vascular onde exercem as suas acções protectoras por um efeito directo nas paredes dos vasos. Os efeitos vasorelaxantes das hormonas femininas foram propostos à mais de cem anos [88]. O aumento de evidências clínicas mostrou que os estrogénios dilatam artérias e aumentam o fluxo sanguíneo por um mecanismo independente do endotélio. O facto dos estrogénios poderem ter um efeito cardioprotector levou ao aumento significativo de interesse [66]. Este efeito foi observado para concentrações de 100 μM (27 g/mL), o que representa uma concentração 4000 vezes superior aos níveis fisiológicos no fluxo sanguíneo dos fetos (0.0062g/mL) [67].

Para se observar o efeito relaxante do 17β -estradiol, foi necessário utilizar agentes contrácteis, ou seja, agentes promotores de contracção nos anéis da AUH. A estes anéis contraídos foi posteriormente adicionado o 17β -estradiol, permitindo a visualização de um efeito relaxante. Os nossos resultados mostraram uma contracção máxima superior, em média, quando é utilizado a 5-HT e o KCl na AUH, quando comparada com o valor da contracção média induzida pela His. Estes resultados parecem estar de acordo com o que foi demonstrado por outros autores [89, 90]. Foi também observado que a contracção máxima induzida pela 5-HT é, em média, superior à produzida pelo KCl despolarizante. Os diferentes mecanismos implicados na actividade contráctil destes agentes podem explicar estes resultados. A contracção vascular induzida pelo KCl é o resultado do influxo de cálcio extracelular. Esse influxo ocorre pelos canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L. Por outro lado, o efeito contráctil da 5-HT na AUH leva à activação de receptores específicos $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ e $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ [91]. A activação dos receptores $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ inibe a actividade da adenilciclase, enquanto que a activação dos receptores $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ estimula a fosfolipase C que por sua vez permite um aumento na

concentração dos níveis de IP_3 [91]. No caso da His, a activação dos receptores H_1 no músculo liso da AUH, induz a contracção por activação da fosfolipase C e consequente aumento do IP_3 [92]. Foi também identificada a expressão dos receptores H_2 da His na AUH. A sua activação estimula a actividade da adenilciclase que leva a um aumento do AMPc e consequente relaxamento [93]. Para além disso, o menor efeito contráctil da histamina, quando comparado com 5-HT e KCl, pode ser devido à activação de diferentes tipos de receptores e consequentemente a diferentes vias de sinalização. A histamina parece activar o receptor H_2 responsável pela vasorelaxação. Isto leva à diminuição do efeito contráctil induzido pela activação do receptor H_1 , mantendo-se este como o efeito predominante. Os diferentes valores de contracção máximos dependem do agente contráctil utilizado e podem dar-nos algumas indicações do mecanismo vasorelaxante induzido pelo 17β -estradiol.

Relativamente ao 17β -estradiol, mostramos que este induz um relaxamento dependente da concentração quando os anéis de AUH são contraídos com His, 5-HT e KCl. O relaxamento máximo é obtido para concentrações de 17β -estradiol de $100 \mu M$.

Com os dados acima apresentados, demonstramos que 17β -estradiol (EST), tem um efeito vasodilatador directo na artéria umbilical humana, por um mecanismo independente do endotélio, tal como foi demonstrado por Fauset, 1999 [67]. Estes dados encontram-se de acordo com as publicações de outros autores que identificaram por perfusões e preparações de segmentos arteriais um efeito não genómico dos estrogénios no tónus vasomotor. Esta acção foi também demonstrada em anéis da artéria umbilical humana [94, 95]. Podemos portanto identificar que a resposta aos estrogénios passa por um mecanismo rápido, não mediado por efeitos genómicos, tal como foi observado por outros grupos de investigadores [83]. Por exemplo, foi observado que a adição de catecolestrogénios provocam um relaxamento, após 20 minutos, numa contracção realizada com uma solução despolarizante de KCl, em segmentos arteriais uterinos de suínos [70]. Outros estudos semelhantes foram efectuados, nos quais utilizaram concentrações micromolares de 17β -estradiol, onde foram obtidos relaxamentos dos segmentos da artéria do cordão umbilical humano, 5 minutos após a adição da hormona. No entanto, o mecanismo pelo qual se observa esta vasorelaxação mediada pelo rápido efeito dos estrogénios, não se encontra clarificado [70]. Outros estudos realizados sobre o efeito do 17β -estradiol em perfusões coronárias de coelhos mostraram um efeito vasodilatador imediato [70]. A hiperpolarização, resultante da utilização de estradiol, foi observada em células do músculo liso após a administração de estrogénios sintéticos,

como o dietilstilbestrol, para concentrações de 1 μM . Para além disso, concentrações micromolares de 17β -estradiol mostraram inibir a resposta contráctil, provocada por BAY K 8644 (um agonista de canais de cálcio dependentes de voltagem), das artérias coronárias esquerdas de segmentos retirados de coelhos e suínos. Em todas estas experiências, a resposta aguda vascular aos estrogénios indica um envolvimento de mecanismos de acção membranares. No entanto, é importante referir que os efeitos dos estrogénios na actividade vascular podem depender da origem do tecido vascular em estudo. Os estrogénios podem inibir directamente a contracção do músculo liso vascular, por um mecanismo que pode eventualmente passar por uma modulação na actividade dos canais iónicos nas células, provocando portanto a relaxação [69].

Assim, tem sido proposto por vários autores, que o 17β -estradiol é um importante activador de canais de K^+ [83, 86, 96, 97]. Nesse sentido, foi estudado no nosso trabalho o envolvimento deste tipo de canais na vasorelaxação induzida pelo 17β -estradiol. Os nossos resultados demonstraram que a utilização de diferentes inibidores de canais de potássio alteravam o relaxamento induzido pela hormona na AUH. Por consequente, verificamos um envolvimento dos canais de K^+ na resposta hiperpolarizante do 17β -estradiol e na capacidade que este pode ter na modulação da saída de iões de K^+ . Com o objectivo de melhorar a caracterização dos canais K^+ , foram utilizados diferentes inibidores de canais de K^+ . Foi observado, que a utilização de todos os inibidores de canais de K^+ provocavam uma diminuição do relaxamento induzido pelo 17β -estradiol, para os três agentes contrácteis utilizados. Ou seja, de forma geral, estes dados permitem-nos sugerir que na AUH, os canais de potássio, K_{ATP} , K_{v} , e K_{Ca} , podem mediar a resposta vasodilatadora do 17β -estradiol. Os dados encontram-se de acordo com alguma bibliografia, onde é demonstrado que em artérias coronárias de suínos, a vasorelaxação era afectada por inibidores de canais de potássio, K_{v} e K_{Ca} , ambos inibidos pela *charybdotoxin* [96]. Outro estudo mais recente, demonstrou que a utilização de TEA, um inibidor de canais de K_{Ca} , atenuava a resposta vasorelaxante do 17β -estradiol, em artérias uterinas de ovelhas [83]. Surgiram também outros tipos de estudos, em *patch-clamp*, que mostraram que o 17β -estradiol activava de forma eficaz os canais de potássio dependentes de Ca^{2+} , em células do músculo liso de artérias coronárias de suínos [96], artérias uterinas de ovelhas [83] e artérias de ratos [97]. No entanto, é necessário referir que alguns estudos não observaram uma activação dos canais de potássio em resposta ao estradiol. É o caso de Salom *et al.*, 2002, que determinou que a resposta vasorelaxante ao estradiol, em artérias carótidas de ratos, não

era devido a um acção do estradiol nestes canais. Identificaram somente uma acção ao nível dos canais de cálcio. Podemos, no entanto, reportar que o efeito vasorelaxante do 17 β -estradiol na AUH passa por um mecanismo de acção ao nível dos canais de potássio, principalmente os K_{Ca} e K_v das células do músculo liso da artéria umbilical humana. Esse efeito é independente da transcrição de genes e de acordo com a maioria dos estudos da mesma área [66, 85, 97].

No entanto, é necessário, ter em atenção que a contracção do músculo liso é mediada por um aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺ e que a sua redução permite a indução da vasodilatação. Alguns estudos demonstraram que os estrogénios diminuem as concentrações intracelulares de Ca²⁺ em artérias coronárias de suínos [98], e inibem a contracção das artérias coronárias de coelhos [99] por diminuição do influxo de cálcio do meio extracelular pela membrana plasmática que não era devido ao mecanismo de libertação do cálcio intracelular [66]. Outro estudo identificou os canais de cálcio, como sendo os principais canais a actuarem na resposta vasodilatadora do estradiol [86]. Esse trabalho de investigação foi realizado em artérias carótidas de ratos [86]. Dados electrofisiológicos mostraram que o estradiol inibia correntes de cálcio em células de artérias carótidas de rato [95] e de artérias basilares de coelhos [100]. Alguns estudos mostraram também que os estrogénios inibem o influxo de cálcio em artérias coronárias sem alterações na sensibilidade dos elementos contrácteis ao cálcio [101]. Outros estudos têm observado que o 17 β -estradiol antagoniza o efeito de agonistas dos canais de cálcio em perfusões de artérias coronárias [102]. De forma conjunta, estes estudos mostraram que o 17 β -estradiol actua como um antagonista fisiológico dos canais de cálcio para suprimir o seu influxo pela membrana plasmática, em células de artérias do músculo liso, e promoverem uma vasodilatação. Sabendo que a abertura dos canais de potássio é um meio indirecto, para reduzir o influxo de cálcio pela via dos canais de cálcio dependentes de voltagem, foi observado neste estudo o efeito da nifedipina (um potente bloqueador de canais de Ca²⁺ tipo L). O efeito da adição deste inibidor, mostrou ser semelhante ao efeito relaxante do 17 β -estradiol nas contracções efectuadas com His, 5-HT e KCl. Quando adicionada juntamente ao 17 β -estradiol, não foi observado qualquer potenciamento nem efeito aditivo na relaxação, deixando transparecer um mecanismo de relaxamento comum entre o 17 β -estradiol e a NIF. Os dados obtidos encontram-se de acordo com a bibliografia consultada. Os nossos resultados indicam claramente que na artéria umbilical humana o mecanismo de vasorelaxação dos estrogénios passa por activação/inactivação dos canais iónicos, isto é,

tanto por uma activação dos canais de potássio como por uma inactivação dos canais de cálcio.

No entanto, o processo de transdução de sinal pelo qual os estrogénios actuam na actividade dos canais iónicos, ainda permanece por esclarecer, mas algumas evidências têm identificado outros elementos importantes nesta cascata de sinalização [66]. Foi determinado em vários estudos que os estrogénios estimulam o sistema de um segundo mensageiro, o GMPc, em células do músculo liso humano. Sabe-se que o aumento da concentração intracelular de GMPc estimula a actividade canais de Ca^{2+} . Os possíveis mecanismos que interligam os efeitos dos estrogénios aos canais iónicos, sugerem que o 17β -estradiol aumenta a acumulação de GMPc, que por sua vez, estimula a actividade dos canais iónicos [66]. Desta forma, o presente estudo também pretende investigar o envolvimento do aumento de GMPc e das diferentes famílias de PDE's no relaxamento mediado pelo 17β -estradiol. Ou seja, propusemos uma possível actuação do 17β -estradiol no aumento das concentrações dos nucleótidos cíclicos na AUH. Até à data tem sido reportado que a exposição ao 17β -estradiol promove um aumento das concentrações de GMPc e NO em artérias coronárias. O relaxamento produzido ocorreria, por um mecanismo que envolve um segundo mensageiro como o NO no músculo liso vascular [101]. Assim, tentou observar-se o efeito vasorelaxante da adição de ANP, um péptido que permite o aumento das concentrações intracelulares de GMPc, na AUH sem endotélio. É importante referir que a regulação dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc tem um papel importante em vários processos fisiológicos, incluindo a contractilidade vascular do músculo liso. Os nucleótidos cíclicos podem modular o tónus vascular do músculo liso [65]. As PDE's têm sido um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos, devido à existência de diferentes isoenzimas que são reguladas e expressas de forma diferente no sistema cardiovascular. Relativamente à circulação fetoplacentária, tem sido provado que os nucleótidos cíclicos induzem vasodilatação [58, 103]. Os diferentes tipos de PDE's, que modulam esse efeito na AUH, foram recentemente descritos como sendo a PDE 4 e PDE 5 [58]. O nosso estudo tentou identificar a possível acção do 17β -estradiol no aumento da actividade do GMPc, modulado pela actividade de PDE's. Verificou-se que o ANP induziu um vasorelaxamento das artérias do cordão umbilical humano, indicando que a elevação dos níveis intracelulares de GMPc têm um papel importante na regulação do tónus vascular da AUH. O efeito vasodilatador do ANP, no nosso estudo, foi semelhante ao efeito provocado pelo 17β -estradiol nas artérias contraídas com 5-HT e His. Muitos

autores também observaram propriedades vasodilatadoras do GMPc em artérias caninas [104], artérias pulmonares humanas [105], veias da placenta humanas [106] e da artéria umbilical humana [91]. Os dados obtidos permitem-nos supor que o aumento da concentração de GMPc tem um efeito a nível vascular, na medida que, apenas a sua adição promoveu um relaxamento semelhante ao provocado pelo 17 β -estradiol. Isto permite-nos identificar um possível mecanismo comum, no qual ocorre a estimulação da produção de GMPc, em artérias cujo endotélio foi previamente removido. Estes dados encontram-se de acordo com a literatura que cita o 17 β -estradiol como estimulador da produção de GMPc em artérias coronárias de suínos [101]. A activação do sistema GMPc/PKG, estimula uma cascata de sinalização que promove uma activação dos canais iónicos em artérias do músculo liso não humanas [66]. No entanto, o meio pelo qual os estrogénios estimulam a produção de GMPc em artérias do cordão umbilical humano sem endotélio, ainda permanece por esclarecer.

Como já foi descrito anteriormente, as enzimas responsáveis pela degradação dos nucleótidos cíclicos são as fosfodiesterases (ou PDE's). O estudo das suas isoformas e do modo como regulam os nucleótidos cíclicos é crucial para permitir determinar os efeitos vasculares no uso de diferentes inibidores nas terapêuticas utilizadas. Vários estudos, utilizando diferentes amostras vasculares, demonstraram a presença de seis famílias diferentes de PDE's no músculo liso vascular. Estudos recentes efectuados por Santos-Silva *et al.*, 2008, mostraram a presença de diferentes subtipos de PDE's na AUH, como as PDE 1B, PDE 3A, PDE 4 B, PDE 4C, PDE 4 D e PDE 5 A. A utilização de um inibidor inespecífico de PDE's (IBMX), nas nossas experiências, resultou num claro aumento da vasorelaxação na contração efectuada com His, e num valor semelhante ao do provocado pelo 17 β -estradiol quando contraído com 5-HT. As diferenças observadas entre estes dois agonistas podem eventualmente ser devidas aos diferentes mecanismos envolvidos na activação de receptores de His e 5-HT. De forma a analisar a funcionalidade dos diferentes tipos de PDE's na regulação da contractilidade, foram utilizados diferentes inibidores selectivos dos subtipos de PDE's expressos nestas artérias. Foi observado que nem o MMBX nem a cilostamida provocam um relaxamento semelhante ao do IBMX em artérias contraídas com His e 5-HT, tal como identificou Santos-Silva *et al.*, 2008 [58]. Estes resultados sugerem que a inibição da PDE 1 e 3 não aumentam o relaxamento para valores semelhantes ao do 17 β -estradiol. Os nossos dados confirmam um mecanismo relaxante pela via associado ao GMPc na artéria umbilical humana, mas excluem as PDE 1 e PDE 3 desse mecanismo.

Os efeitos vasodilatadores do GMPc em associação com inibidores de PDE's podem reflectir um mecanismo vasorelaxante idêntico ao da hormona utilizada neste trabalho. Mas foi necessário observar se o efeito vasodilatador era dependente do GMPc. Para tal, foram utilizados inibidores de enzimas produtoras de nucleótidos cíclicos. Esse efeito foi demonstrado de forma clara quando se utilizou um inibidor da guanilciclase, o ODQ. A utilização deste inibidor provocou uma diminuição drástica do relaxamento, quando utilizado sozinho ou com a adição do 17 β -estradiol, em contracções efectuadas com His e 5-HT. Podemos portanto determinar que a inibição da actividade da guanilciclase bloqueia o efeito vasorelaxante provocado pelo 17 β -estradiol. O efeito benéfico dos estrogénios na relaxação do músculo liso vascular poderá ser atribuído à estimulação de GMPc e aos seus efeitos como segundo mensageiro, actuando este último ao nível de canais iónicos. Dados semelhantes foram obtidos noutra tipo de vasos como é caso das artérias coronárias de suínos [101]. A inibição da adenilciclase, com a utilização do SQ só provocou alterações no relaxamento para a 5-HT.

Estes resultados permitem supor que a vasorelaxação induzida pelo 17 β -estradiol é mediada pelos nucleótidos cíclicos [2]. No entanto encontra-se descrito que, tanto o AMPc como o GMPc apresentam diferentes acções celulares, como a influência na sua síntese e degradação, uma *cross-activation* das respectivas proteínas cinases e a fosforilação de proteínas comuns através da activação das proteínas cinases. Estes três potenciais níveis de interacção têm sido objecto de estudo, mas permanece por descobrir a forma como a actuam ao nível fisiológico [2, 61] no entanto podem justificar os resultados obtidos.

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, demonstramos que o 17β -estradiol induz uma vasorelaxação das artérias do cordão umbilical humano. A vasorelaxação observada é independente do endotélio, na medida em que este foi removido. Os estrogénios exercem as suas acções protectoras por um efeito directo nas paredes dos vasos da artéria. Os resultados identificam um mecanismo que não é mediado pela via intracelular denominada de clássica, na qual ocorre a ligação dos estrogénios a receptores intracelulares e a activação de síntese proteica. Este efeito directo observado parece ser mediado pela inactivação dos canais de cálcio tipo L, provocando uma inibição do influxo de cálcio. Os resultados obtidos permitem-nos também identificar uma activação ao nível dos canais de potássio, permitindo assim um efluxo de potássio e portanto um efeito hiperpolarizante por parte do estradiol. Assim, concluímos que na AUH o 17β -estradiol pode mediar o seu papel directo por uma alteração na permeabilidade iónica. Os nossos resultados demonstram também, que o aumento dos níveis de GMPc na artéria umbilical humana induz um relaxamento. A vasorelaxação provocada pelo 17β -estradiol sugere um mecanismo comum ao do provocado pelo GMPc. Por outro lado, foi demonstrado que as PDE's estão envolvidas na vasorelaxação induzida pelo ANP na artéria umbilical humana. Foi também observado que a inibição das ciclases reduz o efeito relaxante da hormona em estudo. Os resultados obtidos constituem o mecanismo celular que pode explicar o modelo molecular de acção dos estrogénios no processo de vasorelaxação da AUH, à qual foi removido o endotélio. Este fenómeno pode ser particularmente importante na manutenção do fluxo sanguíneo na circulação fetoplacentária, evitando assim a possível ocorrência de patologias para o recém-nascido.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Murphy RA. Signal transduction and regulation in smooth muscle: problems and progress. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;134:1-6.
- [2] Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000;184:409-20.
- [3] Guyton AC, Hall JE. *Human physiology and mechanism of disease*. Philadelphia, USA, 2000.
- [4] Bannister LH. *Grey's anatomy*. Edinburgh, London, 1995.
- [5] Gordienko DV, Povstyan OV, Harhun MI, Pucovsky V. Smooth muscle cells and interstitial cells of blood vessels. *Cell Calcium* 2004;35:643-57.
- [6] Sperelakis N. *Cell physiology, a molecular approach*. California, USA: Academic Press, 2001.
- [7] Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96:150-7.
- [8] Mader SS. *Understanding Human Anatomy and Physiology*. USA: McGraw-Hill 2005.
- [9] Zang SX. *An Atlas of histology*. New York, USA, 1999.
- [10] Barbera A, Galan HL, Ferrazzi E, Rigano S, Jozwik M, Battaglia FC, et al. Relationship of umbilical vein blood flow to growth parameters in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:174-9.
- [11] Woodrum DA, Brophy CM. The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2001;177:135-43.
- [12] Yuan W, Lopez Bernal A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth* 2007;7 Suppl 1:S10.
- [13] Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 2000;35:173-8.
- [14] Cribbs LL. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium* 2006;40:221-30.
- [15] Berridge MJ. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 2006;40:405-12.
- [16] Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R233-49.

- [17] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11-21.
- [18] Poburko D, Lhote P, Szado T, Behra T, Rahimian R, McManus B, et al. Basal calcium entry in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2004;505:19-29.
- [19] Berridge MJ. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004;1742:3-7.
- [20] Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:3-10.
- [21] Salemme S, Rebolledo A, Speroni F, Petrucci S, Milesi V. L, P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:55-64.
- [22] Bennett DL, Cheek TR, Berridge MJ, De Smedt H, Parys JB, Missiaen L, et al. Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J Biol Chem* 1996;271:6356-62.
- [23] Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:C799-822.
- [24] Hughes AD. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1995;32:353-70.
- [25] Alioua A, Mahajan A, Nishimaru K, Zarei MM, Stefani E, Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14560-5.
- [26] Milesi V, Raingo J, Rebolledo A, Grassi de Gende AO. Potassium channels in human umbilical artery cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:339-46.
- [27] Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:28-38.
- [28] Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 2005;12:113-27.
- [29] Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res* 1996;79:295-301.
- [30] Tamaro P, Smith AL, Hutchings SR, Smirnov SV. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2004;143:303-17.

- [31] Cheong A, Dedman AM, Beech DJ. Expression and function of native potassium channel [K(V)alpha1] subunits in terminal arterioles of rabbit. *J Physiol* 2001;534:691-700.
- [32] Rusch NJ, Liu Y. Potassium channels in hypertension: homeostatic pathways to buffer arterial contraction. *J Lab Clin Med* 1997;130:245-51.
- [33] Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 1997;77:1165-232.
- [34] Rivers RJ, Hein TW, Zhang C, Kuo L. Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles. *Circulation* 2001;104:1749-53.
- [35] Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu Rev Physiol* 1998;60:667-87.
- [36] Jackson WF. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1993;265:H1797-803.
- [37] Jackson WF. Hypoxia does not activate ATP-sensitive K⁺ channels in arteriolar muscle cells. *Microcirculation* 2000;7:137-45.
- [38] Wakatsuki T, Nakaya Y, Miyoshi Y, Zeng XR, Nomura M, Saito K, et al. Effects of vasopressin on ATP-sensitive and Ca(2+)-activated K⁺ channels of coronary arterial smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 1992;58 Suppl 2:339P.
- [39] Miyoshi Y, Wakatsuki T, Nomura M, Saito K, Nakaya Y, Inoue I. Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Jpn J Pharmacol* 1992;58 Suppl 2:338P.
- [40] Miyoshi Y, Nakaya Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:700-6.
- [41] Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Ogus E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci* 2003;72:1321-9.
- [42] Siow RC, Li FY, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic Biol Med* 2007;42:909-25.
- [43] Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2005;24 Suppl 1:1-78.

- [44] Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, et al. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* 2003;22:6027-34.
- [45] Moosmang S, Haider N, Bruderl B, Welling A, Hofmann F. Antihypertensive effects of the putative T-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2. *Circ Res* 2006;98:105-10.
- [46] Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 2002;89:12E-7E; discussion 7E-8E.
- [47] Chalmers S, Olson ML, MacMillan D, Rainbow RD, McCarron JG. Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium* 2007;42:447-66.
- [48] Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2001;51:489-94.
- [49] D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004;101:113-29.
- [50] Otsuka K, Tanaka H, Horinouchi T, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y. Functional contribution of voltage-dependent and Ca²⁺ activated K⁺ (BK(Ca)) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides. *J Smooth Muscle Res* 2002;38:117-29.
- [51] Cao C, Han JH, Kim SZ, Cho KW, Kim SH. Diverse regulation of atrial natriuretic peptide secretion by serotonin receptor subtypes. *Cardiovasc Res* 2003;59:360-8.
- [52] Lee CY, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev* 2007;12:131-42.
- [53] Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 2002;230:31-47.
- [54] Baxter GF. The natriuretic peptides. *Basic Res Cardiol* 2004;99:71-5.
- [55] Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res* 2003;93:907-16.
- [56] White RE, Kryman JP, El-Mowafy AM, Han G, Carrier GO. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate

- BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;86:897-905.
- [57] Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 2007;100:309-27.
- [58] Santos-Silva AJ, Cairrao E, Morgado M, Alvarez E, Verde I. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol* 2008;582:102-9.
- [59] Rich TC, Karpen JW. Review article: cyclic AMP sensors in living cells: what signals can they actually measure? *Ann Biomed Eng* 2002;30:1088-99.
- [60] Feldman RD, Gros R. New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: implications in cardiovascular regulation. *Life Sci* 2007;81:267-71.
- [61] Eckly-Michel A, Martin V, Lugnier C. Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br J Pharmacol* 1997;122:158-64.
- [62] Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biological approaches to unravel AMPc and function. *Gene* 2001;269:13-25.
- [63] Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;52:375-414.
- [64] Polson JB, Strada SJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:403-27.
- [65] Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res* 2003;39:67-86.
- [66] White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, et al. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2002;53:650-61.
- [67] Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y. The effects of sex steroids on human umbilical artery and vein. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:27-31.
- [68] Keung W, Vanhoutte PM, Man RY. Acute impairment of contractile responses by 17beta-estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2005;144:71-9.

- [69] Ruehlmann DO, Mann GE. Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. *Curr Med Chem* 2000;7:533-41.
- [70] Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *Faseb J* 1996;10:615-24.
- [71] Dubey RK, Tofovic SP, Jackson EK. Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:403-9.
- [72] Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833-42.
- [73] Suzuki T, Nakamura Y, Moriya T, Sasano H. Effects of steroid hormones on vascular functions. *Microsc Res Tech* 2003;60:76-84.
- [74] Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:152-6.
- [75] Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 2000;21:57-94.
- [76] Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:369-81.
- [77] Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1143-58.
- [78] Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 2005;67:335-76.
- [79] Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, et al. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res* 2001;89:534-9.
- [80] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:69-78.
- [81] Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003;148:281-92.
- [82] Simoncini T, Mannella P, Genazzani AR. Rapid estrogen actions in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:424-30.
- [83] Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to 17beta-oestradiol in rat arteries. *Eur J Pharmacol* 2003;476:139-49.

- [84] Haynes MP, Li L, Russell KS, Bender JR. Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vascul Pharmacol* 2002;38:99-108.
- [85] Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CL, et al. Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17beta-estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:4-13.
- [86] Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. Acute relaxant effects of 17-beta-estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. *Steroids* 2002;67:339-46.
- [87] Ullrich ND, Koschak A, MacLeod KT. Oestrogen directly inhibits the cardiovascular L-type Ca²⁺ channel Cav1.2. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:522-7.
- [88] White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 2002;38:73-80.
- [89] Leung SW, Quan A, Lao TT, Man RY. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early Hum Dev* 2006;82:457-62.
- [90] Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008;376:375-83.
- [91] Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle C. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br J Pharmacol* 1999;127:1247-55.
- [92] Hawley J, Rubin PC, Hill SJ. Distribution of receptors mediating phosphoinositide hydrolysis in cultured human umbilical artery smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1005-11.
- [93] Schneider A, Riess P, Elbers A, Neugebauer E, Schaefer U. Polyclonal anti-histamine H2 receptor antibodies detect differential expression of H2 receptor protein in primary vascular cell types. *Inflamm Res* 2004;53:223-9.
- [94] Silva de Sa MF, Meirelles RS. Vasodilating effect of estrogen on the human umbilical artery. *Gynecol Invest* 1977;8:307-13.
- [95] Ogata R, Inoue Y, Nakano H, Ito Y, Kitamura K. Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca channels through GTP-binding protein. *Br J Pharmacol* 1996;117:351-9.

- [96] White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, et al. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* 1995;16:739-51.
- [97] Tsang SY, Yao X, Chan HY, Chen ZY, Ming WC, Huang Y. Effect of 17beta-estradiol exposure on vasorelaxation induced by K(+) channel openers and Ca(2+) channel blockers. *Pharmacology* 2002;65:26-31.
- [98] Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1999;276:H926-34.
- [99] Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *Am J Physiol* 1992;263:H271-5.
- [100] Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. 17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 1994;266:C975-80.
- [101] Darkow DJ, Lu L, White RE. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol* 1997;272:H2765-73.
- [102] Raddino R, Manca C, Poli E, Bolognesi R, Visioli O. Effects of 17 beta-estradiol on the isolated rabbit heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986;281:57-65.
- [103] Downing JW, Ramasubramanian R, Johnson RF, Minzter BH, Paschall RL, Sundell HW, et al. Hypothesis: selective phosphodiesterase-5 inhibition improves outcome in preeclampsia. *Med Hypotheses* 2004;63:1057-64.
- [104] Barnette MS, Manning CD, Price WJ, Barone FC. Initial biochemical and functional characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in canine colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:801-12.
- [105] Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *Am J Physiol* 1994;266:L536-43.
- [106] Figueroa R, Martinez E, Fayngersh RP, Tejani N, Mohazzab HK, Wolin MS. Alterations in relaxation to lactate and H₂O₂ in human placental vessels from gestational diabetic pregnancies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H706-13.

7. ANEXOS

Preparação de soluções:

Tabela 1: Preparação da solução PSS (Solução Salina de Fosfato) concentrada, para um volume final de 1L.

Solução	Concentração	Volume (mL)	Marca dos reagentes
EDTA	100 mM	50	Sigma
KCl	1M	50	Sigma
HEPES	1M	100	Sigma
Reagente	Quantidade (g)		
MgCl ₂	0,4066	4,066	Sigma
NaHCO ₃	0,8401	8,401	Sigma
KH ₂ PO ₄	0,0680	0,680	Sigma
NaH ₂ PO ₄	0,0600	0,600	USB
Glicose	1,8016	18,016	Sigma
H ₂ O destilada	Perfazer até 1 L		
	pH = 7,4		

Tabela 2: Preparação da solução PSS diluída, para um volume final de 1 L.

Solução	Concentração	Volume (mL)	Marca dos reagentes
PSS básico concentrado	---	100	---
NaCl	1M	110	Panreac
CaCl ₂	1M	0,16	Sigma
H ₂ O destilada	Perfazer até 1 L		
	pH = 7,4		

Nota: A filtração desta solução é realizada com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

Tabela 3: Preparação da solução de AP (Antiprotease) para um volume final de 1 mL de PSS.

Reagente	Quantidade (mg)	Marca dos reagentes
Pefabloc	6	Fluka
Benzamidina	6,5	Sigma
Inibidor de tripsina	2,5	Sigma
Leupectina	0,1125	Sigma
Solução	Quantidade (mL)	
PSS básico diluído	1	

Nota: É feita uma solução de 5 mL de AP e alíquota-se para eppendorfs. Esta solução é filtrada antes de se utilizar, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

Tabela 4: Solução AB (Antibiótico/Antimicótico).

Reagente	Quantidade	Marca dos reagentes
Penicilina	10000 U	Sigma
Estreptomicina	10 mg	Sigma
Anfotericina	25 µg	Sigma

Nota: A solução é alíquotada para eppendorfs. A quantidade a acrescentar de AB ao meio de cultura e às soluções é 10 µL/mL de solução.

Tabela 5: Meio DMEM-F12.

Solução	Quantidade (mL)	Marca dos reagentes
DMEM – F12 liofilizado	Para 1L	Sigma
Reagente	Quantidade (g)	
L-ascórbico	0,02	Sigma
NaHCO ₃	1,2	Sigma
	pH=7,4	

Tabela 6: Preparação da solução de Krebs básica concentrada.

Solução	Concentração	(mL/L)	Marca dos reagentes
EDTA	100 mM	100	Sigma
KCl	1M	6	Sigma
Reagente	Quantidade (g)		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,92	---	Sigma
Ácido ascórbico	3,27	---	Sigma
KH ₂ PO ₄	2,11	---	Sigma
H ₂ O destilada	Perfazer até 1 L		
	pH = 7,4		

Tabela 7: Preparação da solução de Krebs diluída.

Solução	Concentração	(mL/L)	Marca dos reagentes
Krebs básico concentrado	---	200	Sigma
CaCl ₂	1M	1	
NaCl	1M	240	Sigma
Reagente	Quantidade (g)		
NaHCO ₃	4.2	---	Sigma
Glicose	3,964	---	Sigma
	Perfazer até 1 L		
	pH = 7,4		

Tabela 8: Preparação da solução de Krebs despolarizante (60mM KCl).

Solução	Concentração	(mL/L)	Marca dos reagentes
Krebs básico concentrado	---	100	Sigma
CaCl ₂	1M	0,5	
NaCl	1M	64	Sigma
KCl	1M	55	Sigma
Reagente	Quantidade (g)		
NaHCO ₃	2,1	---	Sigma
Glicose	1,982	---	Sigma
Perfazer até 1 L			
pH = 7,4			