



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeito da Testosterona na compartimentação do cGMP a nível vascular

Joana Rita Oliveira Feiteiro

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

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues
Co-orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Covilhã, junho de 2013

Aos meus Pais

Agradecimentos

Como não podia deixar de fazê-lo, em primeiro lugar, quero agradecer de uma forma muito especial toda a disponibilidade, atenção e orientação prestadas pela minha orientadora, a Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues. Foi sem dúvida um enorme prazer trabalhar com uma pessoa que me apoiou em todos os momentos, ajudando-me ao longo de todo este trabalho, orientando-me e permitindo-me concluí-lo. Em muito contribuiu para o meu crescimento intelectual e maturidade científica.

Ao Professor Doutor José Ignácio Verde Lusquiños por me permitir fazer parte deste grupo de investigação, por se mostrar sempre prestável e disponível. O meu muito obrigada.

Não poderia deixar de agradecer à equipa do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, pela forma como me receberam e facilitaram a minha integração no centro.

Às minhas colegas de laboratório, em especial, Melissa, Eduarda, Sara, Ângela deixo um obrigada muito especial, por todo o apoio técnico e científico, por todos os momentos e alegrias partilhados ao longo de toda a caminhada e por me suportarem e encorajarem naqueles momentos tempestuosos.

Aos meus pais, por permitirem ser o que sou hoje. Graças a eles pude concluir com êxito este meu mestrado.

À minha irmã Marta pelo significado que tem na minha vida e por estar sempre do meu lado; ao meu cunhado Marco por ser a pessoa otimista que é; ao meu afilhado Henrique por me transmitir a sua energia e alegria.

Ao meu namorado David, o homem que esteve sempre ao meu lado. Agradeço pelo seu apoio prestado nos momentos mais críticos desta etapa da minha vida e um agradecimento especial pelo seu companheirismo e sobretudo pelo seu amor.

O meu sincero obrigada a todas as mães dadoras e a toda a equipa do Bloco de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira pela sua colaboração, sem a qual este estudo não poderia ser realizado.

Resumo

Os canais de CNG são geralmente expressos em foto-recetores e em neurónio sensoriais oftativos e traduzem as alterações nas concentrações de cGMP e de cAMP, numa resposta elétrica e/ou num sinal de Ca^{2+} intracelular. Os CNG são ativados através da ligação direta a nucleótidos cíclicos, cAMP e cGMP. A síntese do monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) é controlada por dois tipos de guanilato ciclase (GC) que diferem na sua ativação e localização celular: a GC membranária (pGC) presente na membrana plasmática, a qual é ativada pelo péptido natriuretico, como o péptido natriuretico auricular (ANP); e a GC solúvel (sGC) que está localizada no citosol e a sua ativação é induzida pelo óxido nítrico (NO). O NO e o ANP usam o cGMP como segundo mensageiro. Existem muitos casos em que a ativação da pGC e da sGC conduz a diferentes efeitos funcionais, uma explicação para esses efeitos funcionais diferentes é o aumento do cGMP em locais subcelulares específicos, regulam diferentes alvos em distintas partes da célula. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo em células musculares lisas da artéria umbilical humana demonstraram que a testosterona ativa os canais BK_{Ca} e K_V devido à ativação da proteína cinase G (PKG). Além disso, o nosso grupo observou que a testosterona e o ANP, mas não SNP (nitroprussiato de sódio), estimula a atividade destes canais de potássio, o que sugere que a testosterona aumenta os níveis de cGMP por ativação pGC. Este estudo também sugeriu que esta hormona relaxa o músculo vascular através da ativação da pGC aumentando o nível intracelular do cGMP. Estes estudos também demonstraram que o ANP aumenta os níveis intracelulares de cGMP pela ativação da pGC e o NO aumenta os níveis intracelulares de cGMP através da ativação da sGC. Neste sentido o objetivo deste trabalho é analisar o efeito vasodilatador da testosterona e analisar a compartimentação do cGMP a nível vascular através da ativação dos CNG sensíveis a cGMP e a possível implicação das fosfodiesterases (PDE).

A técnica patch clamp na configuração whole cell foi usada para medir o sinal de ativação dos canais de CNG. As células musculares lisas da artéria umbilical humana são infetadas com o adenovírus WT-CNGA2. Os compostos utilizados foram: ANP (0,1 μ M e 1 μ M), SNP (10 μ M e 100 μ M), IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (100 μ M, inibidor não selectivo das PDE), To-156 (1 μ M, inibidor específico da PDE5), ciloestamida (10 μ M; inibidor específico da PDE3) e Sp-8 ((8-(4-Clorofeniltio)-3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina) (100 μ M, análogo da molécula cGMP) e testosterona (0,1, 1 e 10 μ M).

Analisando os resultados obtidos, observa-se que o ANP, SNP induzem um diferente aumento da I_{CNG} . O sinal do cGMP induzido pelo ANP parece ser controlado pela PDE5 e pela PDE3. Contudo, a administração do SNP parece criar dois efeitos separados, um mais localizado junto à membrana plasmática que é controlado pela PDE3 e pela PDE5, e o outro efeito localizado no interior das células que é regulado apenas pela PDE3. Em relação ao efeito da testosterona, observa-se que esta hormona ativa os CNG e que esta ativação é dependente da sua concentração.

Em suma, a distribuição temporal e espacial diferente do cGMP pode contribuir para efeitos específicos do ANP e de dadores do NO na função vascular. A testosterona age pelo aumento do cGMP que induz a ativação da PKG.

Palavras-chave

Células musculares lisas da artéria umbilical humana, canais de CNG, monofosfato guanosina cíclico, fosfodiesterases, compartimentação

Abstract

Cyclic nucleotide-gated (CNG) channels are usually expressed in photoreceptors and in olfactory neurons sensory, and they translate changes in intracellular cyclic nucleotide concentration in electrical response and/ or a sign of Ca^{2+} intracellular. They open by the direct binding of cAMP and cGMP. The cGMP synthesis is controlled by 2 types of guanylyl cyclases (GC) that differ in their cellular location and activation by specific ligands: a particulate GC (pGC) present at the plasma membrane, which is activated by natriuretic peptides such as atrial natriuretic peptide (ANP); and a soluble guanylyl cyclase (sGC) present in the cytosol and activated by nitric oxide (NO). NO and ANP use cGMP as second messenger, there are many instances in which activation of pGC and sGC leads to different functional effects, one explanation for different functional effects is that cGMP rises in specific subcellular locations, regulating different targets in different parts of the cell.

The studies performed by our group in human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC) demonstrated that testosterone activates BK_{Ca} and K_v channels due to PKG activation. Moreover, our group show that testosterone and ANP, but not sodium nitroprusside (SNP), stimulate the activity of these potassium channels, which suggest that testosterone increases cGMP levels by activating pGC. This study also demonstrated that ANP increases cGMP levels by activating particulate GC and NO increases cGMP levels by activating soluble GC. In this sense, the aim of this work is analyze the compartmentalization of the cGMP at level vascular through the CNG activated by increased levels of cGMP and the possible involvement of the phosphodiesterases (PDE) and to analyze the vasodilator effect of testosterone through the cGMP-activated CNG.

The whole cell configuration of patch clamp technique was used to measure the signal activation of CNG channels. The CNG channels are activated by cGMP. Human umbilical artery smooth muscle cells were infected with WT CNGA2 encoding adenovirus. The chemicals used in the experiments were: ANP (0,1 μ M and 1 μ M), SNP (10 μ M and 100 μ M); 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 100 μ M), a nonselective PDE inhibitor; To-156 (1 μ M), a PDE5 inhibitor; cilostamide (10 μ M), a specific PDE3 inhibitor and 8-(4-Chlorophenylthio)guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (Sp-8) (100 μ M) which is an analogue of cGMP, and testosterone (0.1, 1 and 10 μ M).

The results demonstrate that ANP and SNP stimulated in a different level the ICNG. The particulate pool of cGMP modulated by ANP seems to be controlled by the PDE5 and PDE3. Moreover, the administration of SNP seems to create two separated pools, one localized next to the plasma membrane, that are controlled by the PDE5 and PDE3, and other pool that are localized in the cytosol of the cells that is regulated only by PDE3.

Concerning the effect of testosterone was observed that the testosterone activates the CNG and that this activation is dependent on its concentration.

In summary, our results demonstrate that testosterone acts by increasing cGMP that induced the activation the PKG and differential spatial and temporal distributions of cGMP may therefore contribute to the specific effects of natriuretic peptides and NO donors in the vascular function

Keywords:

Human umbilical artery smooth muscle cells, cyclic nucleotide-gated channels, cyclic guanosine monophosphate, phosphodiesterases, compartmentation.

Índice

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	X
ÍNDICE	XIII
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVIII
LISTA DE ACRÓNIMOS	XX
CAPITULO I- INTRODUÇÃO	1
1.1. CORDÃO UMBILICAL	1
1.1.1. As artérias umbilicais humanas	2
1.2. TECIDO MUSCULAR LISO	4
1.3. PROTEÍNAS PARTICIPANTES NO PROCESSO CONTRÁTIL	6
1.4. NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS	9
1.5. CANAIS DE CNG (CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELS)	16
1.5.1. Topologia e características funcionais	17
1.5.2. Propriedades eletrofisiológicas dos canais de CNG	18
1.6. FOSFODIESTERASES (PDE)	18
1.6.1. As superfamílias das PDE	19
1.6.2. Alvos moleculares do cAMP e do cGMP	22
1.6.3. Inibidores das PDE	23
1.7. COMPARTIMENTAÇÃO DOS NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS	24
1.8. TESTOSTERONA	26
1.8.1. Generalidades	26
1.8.2. Mecanismos vasodilatadores da Testosterona	28
1.8.3. Relevância da testosterona a nível cardiovascular	31
CAPITULO II- MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1. MÉTODOS	32
2.1.1. Isolamento das artérias	32
2.1.2. Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana	32
2.1.3. Extração e purificação do adenovirus	33
2.1.4. Infecção Viral	34
2.1.5. Imunofluorescência	35
2.1.6. Patch clamp - Configuração Whole cell	35
2.1.7. Medição da corrente do CNG (I_{CNG})	37

2.1.8. Análise estatística	37
2.2. SOLUÇÕES E MATERIAIS	38
2.2.1 Soluções	38
2.2.2. Químicos	39
2.2.3. Material	40
CAPITULO III- OBJETIVOS	41
CAPITULO IV- RESULTADOS	42
4.1. Localização subsarcolemal dos canais CNGA2 recombinantes em HUASMC	42
4.2. Expressão Funcional dos canais CNGA2 na HUASMC	43
4.3. Efeito dos ativadores da GC sobre a intensidade da corrente do canal de CNG (I_{CNG})	44
4.4. Efeito dos inibidores das PDE sobre os CNG activados pelo cGMP	45
4.5. Efeitos dos inibidores das PDE sobre os CNG activados por cGMP, através da ativação da pGC e da sGCl	46
4.6. Efeito da testosterona na corrente do CNG (I_{CNG})	51
CAPITULO V- DISCUSSÃO	53
CAPITULO VI- CONCLUSÃO	59
CAPITULO VII- BIBLIOGRAFIA	60

Lista de Figuras

FIGURA 1. FOTOGRAFIA DA SUPERFÍCIE DA PLACENTA MATERNA E DO CORDÃO UMBILICAL DEPOIS DO NASCIMENTO.	1
FIGURA 2. CORTE TRANSVERSAL DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO.	2
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO GERAL DAS DIFERENTES CAMADAS DE UMA ARTÉRIA.	3
FIGURA 4. CORTE TRANSVERSAL DE UMA ARTÉRIA UMBILICAL HUMANA SEM ENDOTÉLIO.	4
FIGURA 5. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS SMC COM FENÓTIPO CONTRÁTIL E SINTÉTICO.	6
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE MIOSINA.	8
FIGURA 7. MODELO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DA ADENILATO CICLASE.	11
FIGURA 8. A ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE.	12
FIGURA 9. ESTRUTURA DOS RECEPTORES NPR.	14
FIGURA 10. MODELO HIPOTÉTICO DA ATIVAÇÃO E DESENSIBILIZAÇÃO (DESENSITIZED) DOS RECEPTORES NPR-A E B.	15
FIGURA 11. COMPOSIÇÃO DAS SUBUNIDADES DO CNG.	16
FIGURA 12. TOPOLOGIA DOS CANAIS DE CNG.	17
FIGURA 13. HIDROLISE DOS NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS PELAS FOSFODIESTERASES.	19
FIGURA 14. MODELO DE TRABALHO DA PDE5.	22
FIGURA 15. ALVOS MOLECULARES DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS.	23
FIGURA 16 BIOSÍNTESE DA TESTOSTERONA.	27
FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO WHOLE-CELL.	36
FIGURA 18. DETECÇÃO IMUNOFLORESCÊNCIA DOS CANAIS DE WT-CNGA2 RECOMBINANTES EM HUASMC.	43
FIGURA 19. EFEITO DA APLICAÇÃO DO SP-8 100 μ M A UMA CORRENTE DE CNG.	44
FIGURA 20. EFEITO DO cGMP NA INTENSIDADE I_{CNG}	45
FIGURA 21. EFEITO DA INIBIÇÃO DAS FOSFODIESTERASES NO SINAL DO cGMP NOS CNG.	46
FIGURA 22. PAPEL DOS SUBTIPOS DAS PDE NO SINAL DO cGMP INDUZIDO PELA PGC E PELA SGC.	47
FIGURA 23. PAPEL DA FOSFODIESTERASE TIPO 3 NO SINAL DO cGMP GERADO PELA SGC.	48
FIGURA 24. PAPEL DA PDE3 NO SINAL DO cGMP GERADO PELA GUANILATO CICLASE MEMBRANAR.	49
FIGURA 25. PAPEL DA PDE5 NO SINAL DO cGMP ESTIMULADO PELA SGC.	50
FIGURA 26. PAPEL DA PDE5 NO SINAL DO cGMP ESTIMULADO PELA PGC.	51
FIGURA 27 EFEITO DA TESTOSTERONA NOS CANAIS DE CNG.	52
FIGURA 28. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGULAÇÃO DOS SINAIS DE cGMP PELAS PDE.	57

Lista de Tabelas

TABELA 1. OS DIFERENTES TIPOS DE SUBUNIDADES DIFERENTES DOS CANAIS DE CNG. ADAPTADO DE [2]	16
TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS DAS PDE.	19
TABELA 3. SELETIVIDADE DOS INIBIDORES DAS PDE1-5.	24
TABELA 4. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REALIZAÇÃO DO ESTUDO.	38
TABELA 5. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO EXTERNA (RCS BA5) UTILIZADA NO <i>PATCH-CLAMP</i>	38
TABELA 6. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO INTERNA UTILIZADA NO <i>PATCH-CLAMP</i>	39
TABELA 7. MATERIAL USADO DURANTE A REALIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40

Lista de acrónimos

- AC** - Adenilato ciclase (Adenylcyclase or Adenyl cyclase or Adenylate cyclase)
- ADP** - Difosfato de adenosina ou Adenosina difosfato (Adenosine Diphosphate)
- AMP** - Monofosfato de adenosina ou Adenosina monofosfato (Adenosine monophosphate)
- ATP** - Trifosfato de adenosina ou Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)
- BK_{Ca}** - Canais de Potássio activados por Cálcio (Large Conductance Calcium-activated Potassium Channels)
- BNP** - Péptido Natriurético Cerebral (Brain Natriuretic Peptide)
- bNOS** - Óxido Nítrico sintetase cerebral (Brain Nitric Oxide Synthase)
- Ca²⁺** - Cálcio (Calcium)
- Ca²⁺/CaM** - Complexo cálcio-calmodulina (Ca²⁺-calmodulin complex)
- cAMP** - Monofosfato cíclico de adenosina ou Adenosina monofosfato cíclico (Cyclic Adenosine monophosphate)
- CaM** - Calmodulina (Calmodulin)
- cGMP** - Monofosfato cíclico de guanosina ou Guanosina monofosfato cíclico (Cyclic Guanosine monophosphate)
- CNG** - Canais Operados por Nucleotidos Cíclicos (Cyclic Nucleotide Gated Channels)
- DHEA** - Dehidroepiandrosterona (Dehydroepiandrosterone)
- DHT** - Di-hidrotestosterona (Dihydrotestosterone)
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
- ER** - Retículo Endoplasmático (Endoplasmic Reticulum)
- eNOS** - Sintetase do Óxido Nítrico endotelial (endotelial Nitric Oxide Synthase)
- FRET** - Ressonância Fluorescente de Transferência de Energia (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- 5'AMP** - Monofosfato de adenosina ou Adenosina monofosfato (Adenosine monophosphate)
- 5'GMP** - Monofosfato de guanosina ou Guanosina monofosfato (Guanosine monophosphate)
- GC** - Guanilato ciclase (Guanylcyclase or Guanylate cyclase)
- GDP** - Difosfato de guanosina ou Guanosina difosfato (Guanosine diphosphate)
- Gi α** - Subunidade da Proteína Ligadora GTP Inibitória da Adenilato Ciclase Gi (Subunit of the Inhibitory

GPCR - Recetores associados às proteínas-G heterotriméricas (G protein-coupled receptors)

GTP - Trifosfato de guanosina ou Guanosina trifosfato (Guanosine triphosphate)

Gβα - Subunidade βα das Proteínas G Heterotriméricas (βα Subunits of Heterotrimeric G Proteins)

HUASMC - Células Musculares Lisas da Artéria Umbilical Humana (Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells)

HUVECs - Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

iNOS - Óxido Nítrico sintetase induzível (Inducible Nitric Oxide Synthase)

IP3 - 1,4,5-Trifosfato de Inositol (Inositol-1,4,5-Triphosphate)

IP3R - Recetor do IP3 (Inositol-1,4,5-Triphosphate Recetor)

Canais de K⁺ - Canais de potássio (Potassium channels)

Canais de Ca²⁺ - Canais de cálcio (Calcium channels)

K_{ATP} - Canais de K⁺ Sensíveis a ATP (ATP -Sensitive Potassium Channels)

K_{Ca} - Canais de K⁺ Activados por Ca²⁺ (Calcium-Activated Potassium Channels)

KHD - Domínio Homólogo Cinase (Kinase Homology Domain)

K_V - Canais de K⁺ Operados por Voltagem (Voltage-Gated Potassium Channels)

LTCC - Canal de cálcio dependente da voltagem do tipo-L (L Type calcium channel)

MLC - Cadeias Leves da Miosina (Myosin Light Chains)

MLC17 - Cadeias Leves Essenciais da Miosina (Myosin Essential Light Chains)

MLC20 - Cadeias Leves Reguladoras da Miosina (Myosin Regulatory Light Chains)

MLCK - Proteína Cinase das Cadeias Leves da Miosina (Myosin-Light-Chain Kinase)

MLCP - Proteína Fosfatase das Cadeias Leves da Miosina (Myosin-Light-Chain Phosphatase)

NO - Óxido Nítrico (Nitric Oxide)

NOS - Sintetase do Óxido Nítrico (Nitric Oxide Synthase)

NP - Péptidos Natriuréticos (Natriuretic Peptide)

NPR - Recetores de Péptidos Natriuréticos (Natriuretic Peptides Recetors)

PDE - Fosfodiesterases (Phosphodiesterases)

pGC - Guanilato Ciclase Membranar (Particulate Guanylyl Cyclase)

PGF2α - Prostaglandina F2α (Prostaglandin F2α)

PIP2 - Fosfatidil Inositol 4,5-Bifosfato (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate)

PKA - Proteína Cinase A (Protein Kinase A or Cyclic AMP-dependent Protein Kinase)

PKC - Proteína Cinase C (Protein Kinase C)

PKG - Proteína Cinase G (protein Kinase G or Cyclic GMP-dependent Protein Kinase)

ROC - Canais Operados por Recetores (Recetor-Operated Channels)

sGC - Guanilato ciclase solúvel (Soluble guanylyl cyclase)

SHBG - Proteína Ligada a Hormonas Sexuais (Sex Hormone Binding Protein)

SMC - Células Musculares Lisas (Smooth Muscle Cells)

SNP - Nitroprussiato de Sódio (Sodium Nitroprusside)

VOCC - Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem (Voltage Operated Calcium Channel)

CAPITULO I- INTRODUÇÃO

1.1. Cordão Umbilical

O cordão umbilical é provavelmente o único órgão que morre quando a vida começa, é uma das partes mais importantes da unidade feto-placentária, desempenhando um papel primordial na determinação da forma como a vida extra-uterina começa [10]. Este anexo embrionário possui habitualmente entre 1 a 2 cm de diâmetro e o seu comprimento pode variar em 50-60 cm [10]. Porém, podem existir cordões umbilicais curtos ou longos, não sendo a sua ocorrência comum. Os cordões muito longos têm tendência ao prolapso, a enrolarem-se no feto, a formarem nós, sendo a sua identificação de vital importância, de forma a evitar uma possível hipóxia fetal ou anóxia. Os cordões demasiado curtos podem provocar a separação prematura da placenta da parede do útero durante o parto, sendo tal como no caso anterior, vital a sua identificação [11].

O cordão umbilical apresenta uma forma helicoidal (figura 1), devido ao típico enrolamento em espiral dos seus vasos sanguíneos [11]. É bastante flexível, de cor esbranquiçada e brilhante uma vez que está coberto por um epitélio simples, derivado do âmnio [11]. Apresenta ainda um aspeto gelatinoso derivado de um tecido conjuntivo embrionário especial denominado por geleia de Wharton, sendo esta constituída por células do tecido conjuntivo que estão dispersas numa superfície amorfa de substâncias compostas por proteoglicanos (ácido hialurónico e condroitina sulfato) e diferentes tipos de colagénio. Esta geleia também contém macrófagos, fibroblastos dispersos e uma delicada rede de fibras de colagénio e laminina [12].

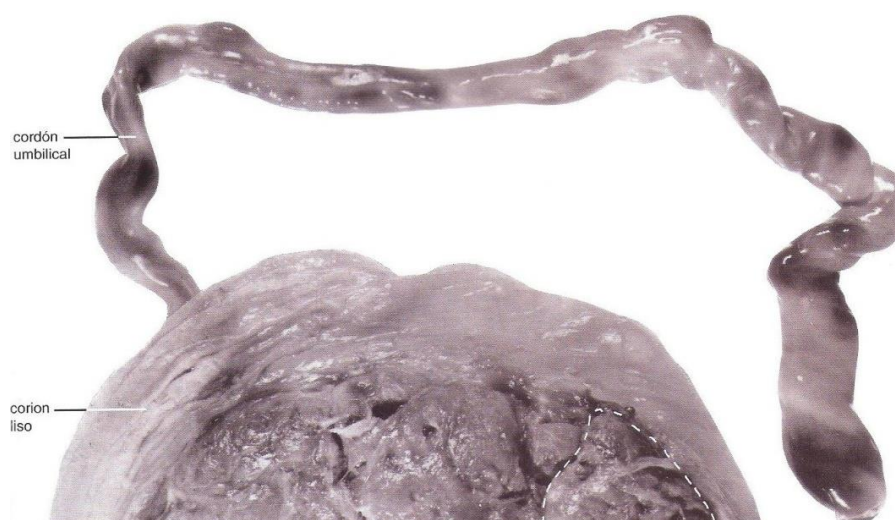


Figura 1. Fotografia da superfície da placenta materna e do cordão umbilical depois do nascimento. Adaptado de [13]

Habitualmente este anexo fetal possui duas artérias e uma veia (figura 2 e 3). A veia umbilical transporta sangue rico em oxigénio proveniente da placenta e as artérias carregam sangue pobre em oxigénio [11]. As artérias umbilicais são facilmente identificáveis pelo seu calibre mais pequeno, que é aproximadamente metade do calibre da veia, cerca de 6 mm.

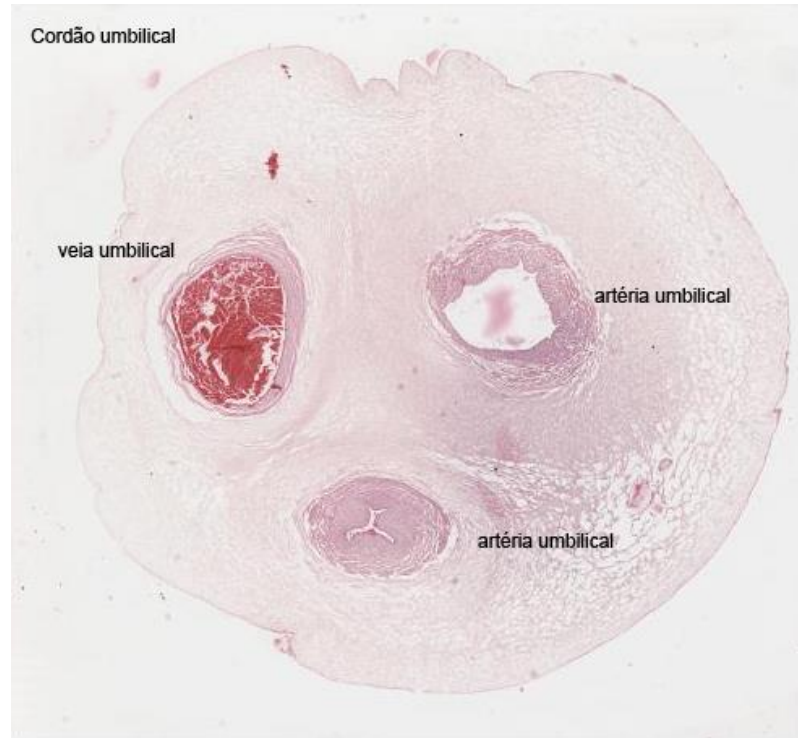


Figura 2. Corte transversal do cordão umbilical humano. Onde se pode observar as duas artérias umbilicais e a veia umbilical. Adaptado de [8]

1.1.1. As artérias umbilicais humanas

No geral as artérias são constituídas por três túnicas morfologicamente distintas, que são do interior para o exterior, a íntima, a média e a adventícia (figura 3).

- a) **Túnica íntima** - constituída por células endoteliais. A camada endotelial ou endotélio tem como principais funções, o controlo da permeabilidade vascular e a regulação do tónus vascular. O endotélio funciona como um sensor de alterações hemodinâmicas e de sinais ou estímulos químicos da corrente sanguínea, transmitindo-os posteriormente às células do músculo liso (SMC) vasculares [14].
- b) **Túnica média** - formada pelas SMC e constituintes da matriz extracelular, como fibras e proteoglicanos. As SMC possuem um único núcleo central e são geralmente longas (20-500 μm), mais espessas no centro (2-5 μm) e finas nas extremidades [15]. Estas células são as responsáveis pela contratilidade arterial.
- c) **Túnica adventícia** - constituída por fibroblastos e por fibras de colagénio e elásticas. Nesta túnica, também podem estar presentes os *vasa vasorum*,

pequenos vasos de tipo muscular que a nutrem, e os *nervi vasorum*, que são terminais nervosos [16].

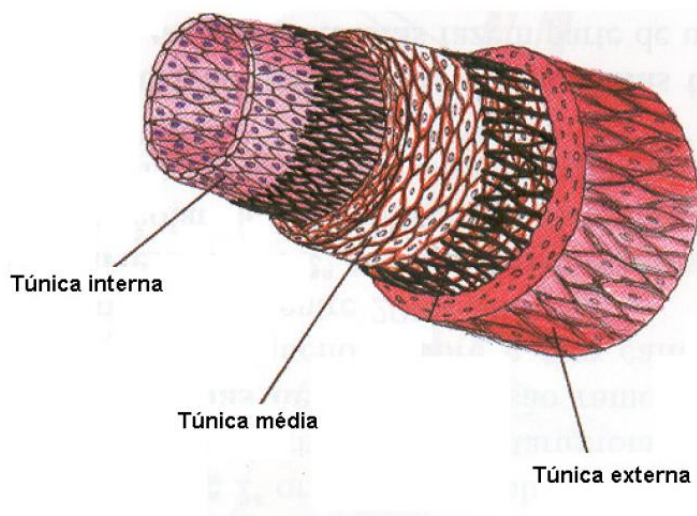


Figura 3. Representação esquemática da organização geral das diferentes camadas de uma artéria. Adaptado de [3]

A importância e a complexidade destas três túnicas dependem do tipo de artéria. O sistema arterial possui artérias de grande calibre (1-2,5 cm), de médio calibre (0,1-1 cm) e arteríolas (menores de 0,1 cm). As artérias de grande calibre, como a aorta, têm paredes mais grossas com grande quantidade de fibras elásticas. A elasticidade destas artérias permite-lhes expandirem-se ou dilatarem-se, dependendo das fases do ciclo cardíaco. A diminuição do diâmetro das artérias ao longo do sistema leva a uma diminuição da quantidade de fibras elásticas e a um aumento da quantidade de SMC. Anatomicamente, as paredes das artérias são mais fortes que as dos outros vasos sanguíneos, o que implica que as artérias são em média oito vezes menos distensíveis que as veias. As artérias são as responsáveis pelo fluxo sanguíneo dos diferentes órgãos do corpo humano e a mudança no diâmetro das artérias provoca um aumento ou diminuição deste fluxo. As vénulas recolhem o sangue dos capilares que é transportado pelas veias ao coração. O sistema venoso funciona a baixa pressão, já que os vasos que o formam expandem-se e acomodam-se à quantidade de sangue recebida.

Na artéria umbilical, a estrutura trilamelar possui características morfológicas específicas. A seguir à monocamada de células endoteliais, possui não uma mas duas camadas de células musculares lisas (figuras 3 e 4). A túnica média encontra-se envolvida por um tecido conjuntivo mucoso muito rico em água (geleia ou gelatina de Wharton), “tapeado” externamente por uma monocamada de células epiteliais [17, 18]. A túnica média é composta por duas camadas de células musculares lisas, apresentando a camada média mais externa, um aspeto estrutural típico (disposição circular). Na camada média mais interna, a maioria das células musculares lisas aparece disposta longitudinalmente em relação ao eixo da artéria e dispersos numa abundante substância fundamental amorfa pobre em fibras elásticas, mas

muito plásticas. Esta plasticidade da camada muscular mais interna da média é a grande responsável pela oclusão fisiológica da artéria umbilical no pós-parto. A contração das células musculares dispostas circularmente empurra a substância fundamental amorfa para dentro do lúmen da artéria, ocluindo-a. A grande diferença morfológica entre as células musculares lisas das duas camadas é que os da camada mais externa, ao contrário dos da camada mais interna são muito ricos em miofilamentos [15]. Estes miofilamentos são fibras que agrupadas formam a miofibrila, são de natureza proteica, a actina e a miosina [19]. Os vasos sanguíneos não possuem vasa vasorum nem linfáticos.

A artéria umbilical humana está envolvida na circulação fetoplacental. Os mecanismos endócrinos e paracrinis, que regulam o estado de contratilidade das células musculares lisas, são muito importantes para uma boa troca de gás e nutrientes entre o feto e a placenta, uma vez que os vasos sanguíneos umbilicais não possuem inervação. Deste modo, é importante caracterizar os mecanismos que regulam o tónus vascular e determinar quais os fatores que regulam o fluxo de sangue na circulação umbilical [20].

A regulação do tónus vascular da artéria umbilical humana fica à mercê dos mediadores vasoativos libertados localmente (prostaglandinas, serotonina e histamina, (entre outros), das substâncias transportadas pelo fluxo sanguíneo e de alguns iões como cálcio e potássio [21, 22].



Figura 4. Corte transversal de uma artéria umbilical humana sem endotélio, onde se pode observar a disposição das duas camadas de células umbilicais musculares lisas vasculares, sendo a mais interna longitudinal e a outra circular.

1.2. Tecido muscular liso

O músculo liso vascular é um tecido heterogéneo, formado por células fusiformes. As principais funções deste tecido são a contração e regulação do tónus vascular, fluxo

sanguíneo e pressão sanguínea. As células responsáveis pela atividade contrátil são as SMC. Na maior parte das vezes é possível distinguir as SMC dos diferentes órgãos segundo características, como dimensões físicas, organização, funções e regulação da sua atividade fisiológica.

O tecido muscular liso está presente em diferentes estruturas do corpo humano, como nas paredes do tubo digestivo, nas vias respiratórias, nos ureteres, no útero, nas artérias, nas veias e nos grandes vasos linfáticos. A sua atividade é regulada por vários estímulos de natureza mecânica e química. Embora se possa generalizar no que diz respeito a muitas das suas características, cada órgão possui um tipo de músculo liso específico. Assim, na maior parte das vezes é possível distinguir as células do tecido muscular liso (SMC) dos diferentes órgãos segundo características, como dimensões físicas, organização, funções e regulação da sua atividade fisiológica. Esta diversidade implica a existência de um elevado grau de especialização do músculo liso dos diferentes órgãos que está relacionado com a regulação das funções destes órgãos.

As SMC das artérias podem apresentar múltiplos fenótipos, que vão desde o contrátil até ao sintético (figura 5). Quando são realizadas culturas destas células, a presença de fatores de crescimento nos meios de cultura leva a um aumento de células com fenótipo sintético. As células com fenótipo sintético são caracterizadas por apresentarem uma grande capacidade proliferativa e migratória e uma grande atividade de síntese de componentes da matriz extracelular. Contrariamente, as células com fenótipo contrátil apresentam pouca atividade sintética e proliferativa [23] e expressam principalmente proteínas implicadas na regulação da contração vascular, como proteínas contrácteis, canais iónicos e enzimas. Assim, a análise da expressão ou da presença de algumas destas proteínas é correntemente utilizada para a identificação e definição de ambos os fenótipos [24]. A morfologia celular também é um parâmetro importante na identificação e definição dos diferentes fenótipos, uma vez que ambos os tipos de células apresentam diferenças morfológicas claras. As SMC com fenótipo contrátil são alongadas enquanto as sintéticas são menos alongadas, com uma morfologia semelhante à das células endoteliais.

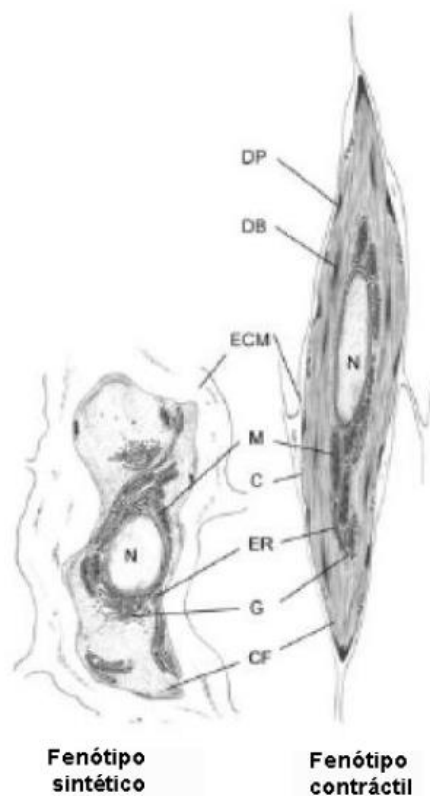


Figura 5. Características estruturais das SMC com fenótipo contrátil e sintético.

1.3. Proteínas participantes no processo contrátil

O músculo liso vascular possui características que variam dependendo do tipo de vaso, do seu tamanho e da sua localização. Podem observar-se nas células musculares lisas três tipos de filamentos contrácteis: delgados, grossos e intermédios. As proteínas participantes no mecanismo contrátil encontram-se agrupadas apenas nos filamentos delgados e nos filamentos grossos.

Filamentos delgados

Os filamentos delgados possuem aproximadamente 6-8 nm de diâmetro e são compostos principalmente por actina filamentosa ou fibrosa (F- actina). Ligados à actina e fazendo também parte do filamento delgado encontram-se mais três proteínas: a tropomiosina, a caldesmona e a calponina.

A actina ou a F- actina é uma proteína polimerica helicoidal formada por polimerização de monómeros de actina- G. Da actina são conhecidas quatro isoformas (α , β e duas γ), sendo todas elas capazes de formar filamentos delgados e de interagir com os filamentos de miosina [25]. Nas SMC as isoformas α e γ fazem parte do aparelho contrátil enquanto a isoforma β faz parte do citoesqueleto [26].

A tropomiosina (7kDa) é um dímero com uma estrutura em hélice alfa que se liga à actina na proporção de uma molécula de tropomiosina para sete monómeros de actina [27]. A função da tropomiosina no músculo liso é pouco clara, uma vez que este músculo não apresenta troponina (*troponin*), uma proteína que no músculo esquelético tem como principal função bloquear os sítios ativos da tropomiosina [28]. Da tropomiosina conhecem-se 18 isoformas, codificadas pelos seguintes quatro genes: α , β , γ e δ . Contudo nas SMC vasculares só se expressam as isoenzimas α e β . Nas células musculares lisas estas duas isoenzimas da tropomiosina encontram-se expressas em quantidades sensivelmente iguais, desconhecendo-se a existência de diferenças “contráteis” entre as isozimas α e β da tropomiosina [29].

A caldesmona apresenta locais de ligação para a actina, a miosina e a tropomiosina [27], [4, 30]. Estão identificadas duas isoformas da caldesmona, a h-caldesmona (150 KDa) e l-caldesmona (89KDa), só a isoforma h-caldesmona é expressa nas SMC vasculares diferenciadas [31, 32]

A calponina é uma proteína que interage com a actina e a tropomiosina, de forma independentemente do Ca^{2+} e com a calmodulina (CaM) de forma dependente de Ca^{2+} .

Conhecem-se três isoformas desta proteína, a básica (*h1*), a neutra (*h2*) e a ácida (*ha*), sendo a mais abundante no músculo liso a isoforma calponina *h1* [25, 33]. Desconhece-se a existência de diferenças funcionais entre duas variantes da isoenzima calponina *h1*. A região central da calponina *h1* é a região que se liga à actina e apresenta uma elevada homologia de resíduos com a troponina I do músculo estriado [34].

Filamentos grossos

Os filamentos grossos têm 15-18 nm de diâmetro e são compostos por miosina. A miosina é uma proteína assimétrica de grande tamanho, formada por seis cadeias polipeptídicas altamente conservadas: um dímero de cadeias pesadas (410 KDa) e dois pares de cadeias leves desiguais, duas reguladoras e duas essenciais (figura 6). As cadeias reguladoras possuem 20 kDa (MLC_{20}) e as cadeias essenciais de 17 kDa (MLC_{17}) [27]. O dímero de cadeias pesadas contém na extremidade N-terminal duas “cabeças globulares” e na extremidade C-terminal uma longa cauda ou bastão formada por duas hélices alfa. Cada “cabeça” da miosina encontra-se ligada a uma cadeia reguladora e a uma cadeia essencial. A “cabeça” da miosina pode ser clivada por enzimas e dar origem ao subfragmento S-1, que contém a “cabeça globular” e as cadeias leves (figura 6). Durante a contração muscular, as “cabeças” de miosina formam pontes com os filamentos de actina, originando um complexo químico conhecido como actomiosina [27].

No músculo liso estão identificadas duas isoformas das cadeias pesadas, SM1 (204 kDa) e SM2 (200 kDa) [31, 35]. Relativamente às cadeias leves (MLC), nas SMC vasculares foram identificadas MLC_{17} e MLC_{20} . Existem duas isoformas de MLC_{17} , a ácida e a básica [36] e uma terceira isoforma da MLC_{17} (23 kDa) que foi também identificada nas SMC embrionárias [37]. Das cadeias MLC_{20} foram já identificadas, a MLC_{20A} e a MLC_{20B} [27, 38]. Conhecendo-se a existências de diferenças no processo contrátil entre as isoformas MLC_{20A} e a MLC_{20B} .

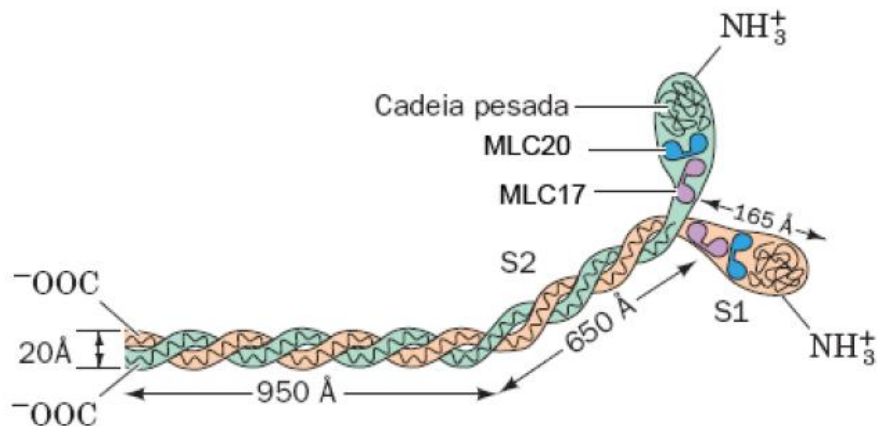


Figura 6. Representação esquemática da molécula de miosina. A cauda em forma de bastão é formada pelas duas hélices alfa, as quais provêm cada uma das suas cadeias pesadas idênticas, que se enrolam uma em torno da outra, formando uma espiral enrolada em paralelo. Uma de cada tipo das cadeias leves de miosina, uma cadeia leve essencial (MLC₁₇) e uma cadeia leve reguladora (MLC₂₀), que está associada a cada uma das cabeças globulares idênticas de miosina. Adaptado de [4]

CICLO DAS “PONTES CRUZADAS”

O modelo contrátil dos “filamentos deslizantes” é no geral comum a todos os tipos de músculo. Porém, o mecanismo de ativação da contratilidade dos vários tipos de músculos é particularmente diferente [27, 39]. No músculo esquelético, a interação actina-miosina e o ciclo das “pontes cruzadas” começa com a ligação do Ca^{2+} à subunidade C da troponina, uma proteína dos filamentos delgados. O músculo liso não expressa troponina, mas contém no seu lugar uma grande quantidade de outra proteína reguladora, a calmodulina (CaM). A CaM é uma proteína solúvel de pequenas dimensões (17 kDa), altamente conservada, e muito abundante no músculo liso, apresentando como principal característica o facto de se ligar ao Ca^{2+} e interagir com uma população heterogénea de proteínas alvo. Esta proteína possui uma estrutura tridimensional em forma de haltere, constituída por três domínios: os domínios globulares amino e carboxil terminais e um domínio bastante flexível que une os dois domínios globulares [40-42].

O mecanismo contrátil inicia-se pela ligação do Ca^{2+} à CaM e pela formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). O complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ liga-se e ativa a proteína cinase das cadeias leves da miosina (MLCK). A MLCK é uma proteína cinase de serina/treonina, da qual se conhecem três isoformas, a MLCK curta com um peso molecular de 140 kDa, e duas MLCK compridas ou de elevado peso molecular, uma forma embrionária que se expressa nas células sem atividade muscular (205 kDa) [43] e uma forma que se expressa nas células endoteliais (214 kDa) [4].

O complexo Ca-CaM-MLCK fosforila a MLC₂₀, permitindo à miosina adenosina trifosfatase (*myosin adenosine triphosphatase*) ser ativada pela actina, ocorrendo contração do músculo liso vascular, como resultado da interação entre a miosina e a actina [41, 44, 45]

A desfosforilação da MLC₂₀ conduz à desativação do mecanismo contrátil e é realizada pela fosfatase de serina/treonina do tipo I, a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP).

A MLCP é composta por três subunidades: uma catalítica (38 kDa), a isoforma da proteína fosfatase-1 (PP1), uma reguladora, a fosfatase da miosina-1 (MYPT1) com 110-133 kDa e uma pequena subunidade, cuja verdadeira função se desconhece, a M20 (20 kDa) [4].

1.4. Nucleótidos cíclicos

Os nucleótidos cíclicos, cAMP e cGMP são os principais mensageiros ligados à vasodilatação no músculo liso vascular e um aumento dos seus níveis intracelulares representa uma estratégia útil para induzir uma variedade de efeitos farmacológicos benéficos em estados patológicos cardiovasculares [46]

Os seus níveis intracelulares são resultados do balanço entre a taxa da sua síntese e da taxa da sua degradação. A síntese do cAMP e do cGMP é realizada respetivamente pela adenilato ciclase e pela guanilato ciclase. As fosfodiesterases (PDE) estão envolvidas na hidrólise dos dois nucleótidos cíclicos [47, 48]

AMP Cíclico (cAMP)

Cinquenta anos após a descoberta do cAMP por Earl Sutherland, a sua função em diferentes processos fisiológicos ainda continua sobre intensa investigação. Um grande número de hormonas, neurotransmissores e outras moléculas envolvidas na sinalização celular, estimulam a formação de cAMP no citoplasma de vários tipos de células, incluindo nas SMC vasculares. Este nucleótido é um dos principais mensageiros intracelulares associados à vasodilatação [48].

Adenilado Ciclase (AC)

A síntese de cAMP é catalisada pela adenilato ciclase (AC), uma enzima localizada na membrana plasmática, que converte a trifosfato de adenosina (ATP) em cAMP na presença de Mg²⁺ [49]. Existem nove isoformas membranares, AC1-AC9, que são codificadas por nove genes.

Generalizando, todas as isoformas membranares são inibidas pela proteína Gi e estimuladas pela proteína Gs e pela forskolina, uma droga com efeitos hipotensores [7, 50]. Em função do mecanismo de regulação, as AC foram classificadas em três grupos [7]:

- a) Grupo 1 (AC1, 3 e 8): podem ser ativadas pelo complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Contudo, em neurónios a AC3 é inibida pela proteína cinase II dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. A AC1 também pode ser inibida pela subunidade alfa da proteína Gi ou pelas subunidades beta-gama de outras proteínas G [7];
- b) Grupo 2 (AC2, 4, 7): podem ser ativadas pelas subunidades $\text{B}\gamma$ das proteínas Gs heterotriméricas [49] [7];
- c) Grupo3 (AC5, 6): podem ser inibidas diretamente pelo cálcio (a baixas concentrações) e pela subunidade alfa das proteínas Gi [7].
- d) Grupo 4 (AC9): é regulado pela calcineurina (calcineurin), sendo insensível ao cálcio e à $\text{G}\beta\gamma$ [7];
- e) Grupo 5: contém unicamente a AC solúvel, a qual não é estimulada pela G α [7].

As isoformas membranares da AC também podem ser reguladas por fosforilação.

Neste sentido, a AC2 e AC7 podem ser estimuladas pela proteína cinase C (PKC). Ao contrário, a atividade estimuladora da G α nas AC4 e AC5 diminui quando PKC é ativada. A fosforilação pela PKA pode inibir a atividade da AC5 e da AC1. A AC1 e a AC3 são ativadas pelo complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ e a cinase da CaM pode provocar a sua inibição [7].

Todas as isoformas membranares da AC possuem uma estrutura idêntica formada por duas partes com seis segmentos transmembranares cada uma (M1 e M2; figura 7).

Existem dois domínios citosólicos, designados respetivamente por C1 e C2, que apresentam regiões com atividade catalítica, que se designam por subdomínios C1a e C2a [49, 50]. A regulação das AC resulta da ação nos dois domínios catalíticos. As isoformas com o domínio catalítico C1a são reguladas pelas Gi, enquanto as com o domínio catalítico C2a são reguladas pelas Gs. Pensa-se que as Gi provocam uma rotação das regiões C1a no sentido oposto à rotação induzida pelas Gs e seria este tipo de rotação que diminuiria a atividade enzimática das AC [50].

A forskolina é um diterpeno derivado da planta indiana *Coleus forskohlii*, é muito utilizada em estudos de contratilidade, uma vez que aumenta os níveis de cAMP. Esta droga estimula todas as AC membranares, com exceção da AC9, porque esta AC tem o resíduo de serina substituído pelo de alanina e o de leucina pelo de treonina no local de ligação da forskolina [7]

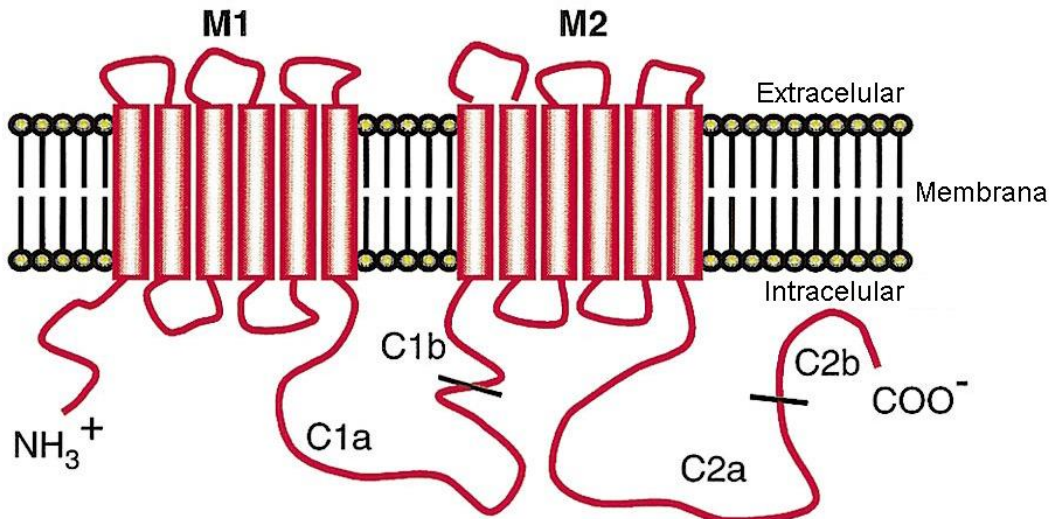


Figura 7. Modelo esquemático da estrutura da adenilato ciclase. Adaptada de [7].

Proteína cinase A (PKA)

Grande parte dos efeitos do cAMP em células eucariotas resulta da ativação da proteína cinase A (PKA) ou proteína cinase dependente de AMP cíclico. Esta proteína é uma cinase que fosforila as proteínas alvo em resíduos de serina e treonina e altera a atividade destas [51, 52].

A PKA é tetramérica, formada por duas subunidades catalíticas C e por um dímero regulador, constituído pelas subunidades RB e Ry [51]. A existência de diferentes isoformas destas três subunidades (C1, C2, RB1, RB2, Ry1, Ry2 e Ry3) implica que em teoria podem existir doze membros diferentes na família da PKA [53, 54]. Relativamente à subunidade reguladora, estudos funcionais demonstraram que possui dois sítios de ligação para o cAMP, mas apenas um dos locais se encontra inicialmente exposto e disponível para a ligação deste nucleótido. Esta primeira ligação provoca alterações conformacionais e torna disponível o outro local de ligação ao cAMP [55].

Na ausência de cAMP a PKA encontra-se inativa, com as subunidades reguladoras (R) e catalítica (C) formando um complexo tetramérico (R2C2). A ligação de duas moléculas de cAMP a cada uma das subunidades reguladoras leva à dissociação do complexo R2C2, em duas subunidades C ativas e um novo complexo formado por duas subunidades R2 (figura 8) [6, 56].

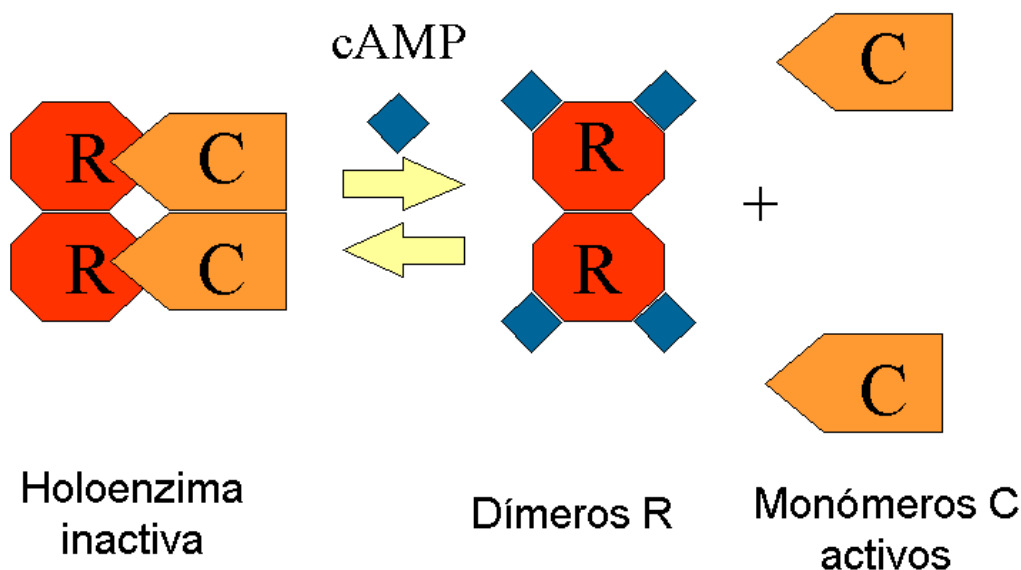


Figura 8. A ativação da proteína cinase. A PKA é uma enzima constituída por quatro subunidades, duas reguladoras e duas catalíticas. A ativação da PKA ocorre quando as quatro moléculas de cAMP se ligam ao dímero R, duas a cada subunidade R. Adotado de [6].

GMP Cíclico (cGMP)

Posteriormente à descoberta do cAMP, foi descoberta na urina de rato o monofosfato cíclico de 3'5'-guanosina (GMP cíclico ou cGMP) [57]. Relativamente à sua síntese, existem duas formas da enzima guanilato ciclase (GC) que sintetizam o cGMP: uma forma particular ou membranar (pGC) e uma forma solúvel ou citosólica (sGC). As duas formas, que convertem o trifosfato de guanosina (GTP) em cGMP na presença de Mg^{2+} , são reguladas diferentemente, sendo a sGC activada pelo NO e a pGC por péptidos natriuréticos (NP) [58]. Juntamente com o cAMP, o cGMP é um dos principais mensageiros intracelulares associados à vasodilatação.

Guanilato ciclase solúvel (sGC)

A sGC é uma proteína heterodimérica formada por duas subunidades, a α (α_1 ou α_2) e a β (β_1 ou β_2) [59, 60]. Esta proteína pode estar ligada a um grupo prostético heme através da histidina 105 da subunidade β_1 [61]. A formação do complexo NO-heme e a subsequente alteração na conformação deste complexo é responsável pelo aumento da atividade catalítica desta enzima em aproximadamente 200 vezes [62-64]. Ambas as subunidades do heterodímero apresentam uma estrutura semelhante, um domínio regulador ligado pelo grupo heme na região N-terminal, um domínio central e um domínio catalítico C-terminal muito conservado [63]. Embora as duas subunidades possuam domínios catalíticos, é necessário que as subunidades α e β estejam simultaneamente co-expressas para que a enzima tenha

atividade [64]. As combinações de subunidades mais habituais são a $\alpha 1/B1$ e a $\alpha 2/B1$, ambas presentes no sistema vascular, sendo a $\alpha 1/B1$ a mais expressa [63, 65].

Como foi referido anteriormente, a sGC é ativada pelo NO o qual é sintetizado através da oxidação do aminoácido L-arginina, que é catalisado pela óxido nítrico sintetase (NOS), com formação simultânea de L-citrulina. Foram clonadas e caracterizadas três isoformas da NOS, das quais duas são dependentes de Ca^{2+}/CaM e são expressas de forma constitutiva, predominantemente no cérebro (bNOS) e nas células endoteliais (eNOS). A outra isoforma da NOS é induzível (iNOS) e independente de cálcio [63]. Na forma ativa, todas as isoformas do NOS são homodímeros, possuindo cada subunidade dois domínios unidos pelo local de ligação do complexo Ca^{2+}/CaM [66]. O NO é um exemplo típico de comunicação parácrina, uma vez que é sintetizado numa célula e exerce os seus efeitos na célula adjacente. Assim, a nível vascular, imediatamente após a sua síntese no citosol das células endoteliais atravessa as membranas celulares e vai ligar-se e ativar a sGC nas SMC vasculares, resultando no aumento da síntese do cGMP [63].

Guanilato ciclase membranar (pGC)

Nos mamíferos, existem sete isoformas da pGC (pCG-A à pCG-G). Três destas isoformas são ativadas pela ligação a péptidos natriuréticos (NP), sendo também designadas por recetores de péptidos natriuréticos (NPR): pGC-A (ou NPR-A), pGC-B (ou NPR-B) e recetor de clearance (ou NPR-C). As outras isoformas nunca foram identificadas no músculo liso vascular, todavia em neurónios de nemátodes observou-se que estas isoformas podem funcionar como recetores de feromonas ou de odores. Na maioria dos tecidos, o recetor NPR-C é o mais abundante, sendo principalmente expresso na aurícula, músculo liso vascular e no endotélio [67]. No entanto, o NPR-A e o NPR-B também se encontram muito expressos no músculo liso vascular [68] [69]. Os recetores NPR-A e B são transmembranares e apresentam uma estrutura única constituída por cinco domínios (figura 9): 1) domínio N-terminal extracelular, responsável pelo reconhecimento e ligação ao NP; 2) domínio transmembranar; 3) domínio homólogo cinase (KHD); 4) domínio responsável pela dimerização; 5) domínio catalítico da região C-terminal. O NPR-C apresenta o domínio N-terminal extracelular similar ao dos recetores NPR-A e NPR-B, mas não contém os domínios KHD e catalítico [9, 70]. O NPR-C tem como função principal eliminar da circulação ou do meio extracelular os NP [71-73].

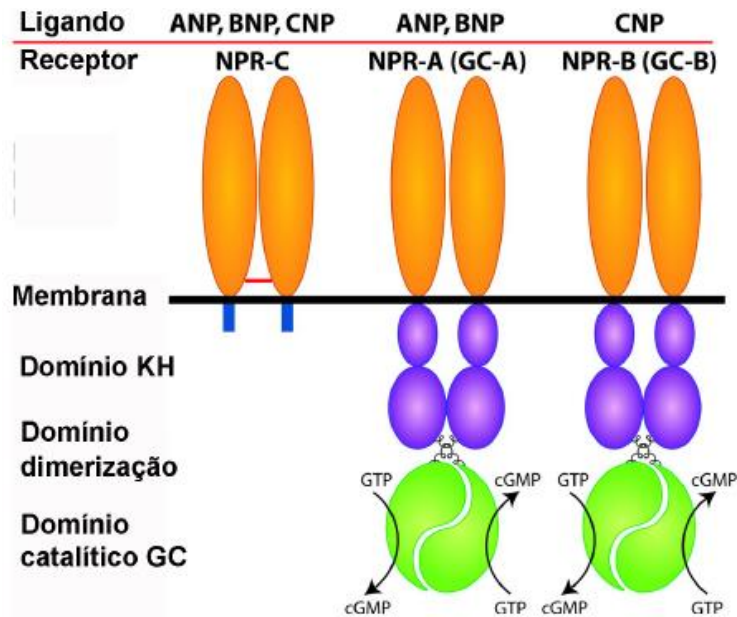


Figura 9. Estrutura dos recetores NPR. Os recetores NPR-A e B apresentam uma estrutura similar, que consiste no domínio N-terminal extracelular, domínio transmembranar, no domínio homólogo cinase (KHD), no domínio responsável pela dimerização e no domínio catalítico GC, que contém a região C-terminal. O receptor NPR-C apresenta apenas o domínio extracelular. Adaptado de [9].

Relativamente à afinidade pelos NP, o péptido natriurético auricular (ANP) e o péptido natriurético cerebral (BNP) podem-se ligar ao NPR-A e ao NPR-C, e o péptido natriurético C (CNP) pode ligar-se ao NPR-B e ao NPR-C [74]. O mecanismo exato de ativação e de dessensibilização dos recetores NPR-A e B ainda não é conhecido. Um modelo hipotético para o explicar foi proposto por Potter et al. (2006), segundo o qual podem apresentar três estados (figura 10) [9]:

1. No estado basal, os recetores, que estavam no estado dessensibilizado, são fosforilados por tirosina cinases no KHD o que permite a ligação dos NP;
2. No estado ativo, a ligação do NP ao recetor fosforilado promove uma mudança conformacional que permite a associação de duas partes do domínio intracelular, anulando o efeito inibitório que a KHD exercia sobre a atividade catalítica e ativando a ciclase;
3. No estado dessensibilizado, a exposição prolongada ao NP provoca desfosforilação do KHD por uma fosfatase específica, o que provoca uma redução da atividade. A saída do ligando e a fosforilação faz voltar o recetor ao estado basal.
4. Atualmente, ainda não se sabe qual a cinase e a fosfatase envolvidas na fosforilação e desfosforilação dos recetores de NP [70]. Inicialmente, pensava-se que a PKC poderia estar envolvida na fosforilação, contudo estudos posteriores demonstraram que esta proteína pode provocar, de forma indireta, a desfosforilação do recetor [46].

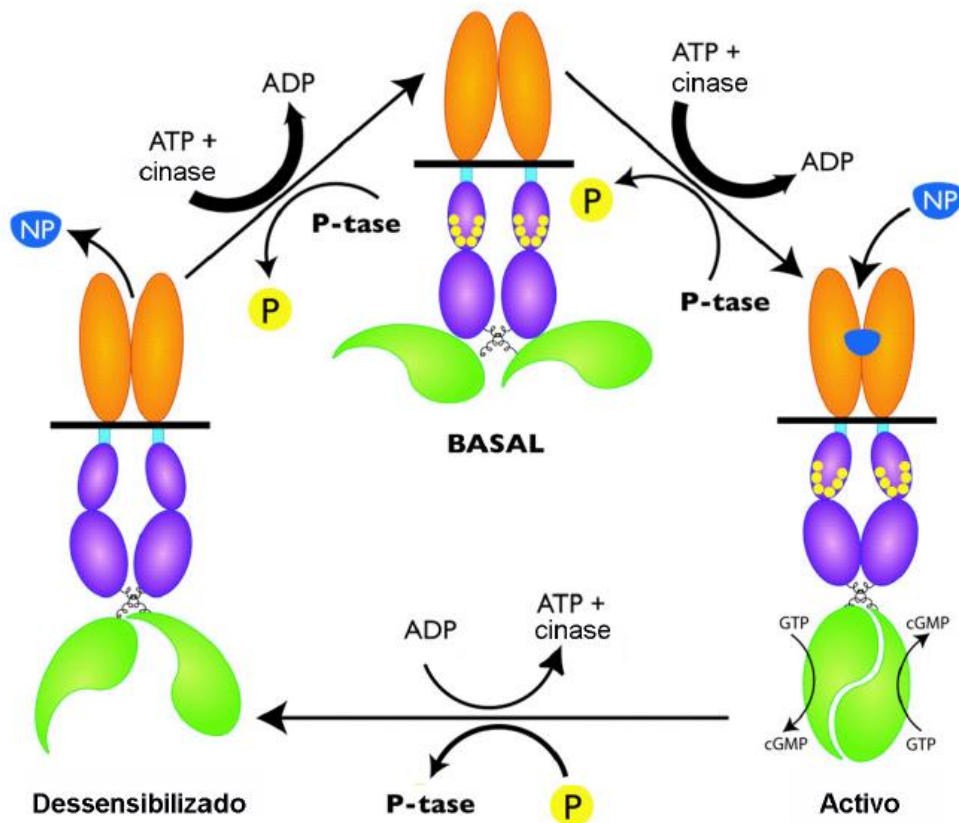


Figura 10. Modelo hipotético da ativação e dessensibilização (desensitized) dos receptores NPR-A e B. Adaptado de [9].

Proteína cinase G (PKG)

Os efeitos do cGMP em células eucariotas resultam geralmente da ativação da proteína cinase G (PKG) ou proteína cinase dependente de GMP cíclico. Esta proteína cinase altera a atividade de proteínas alvo, fosforilando radicais específicos de serina e treonina [51, 52].

A PKG está presente em vários tecidos e nos mamíferos já foram identificadas 2 isoformas, a citosólica PKG-I e a membranar PKG-II [75, 76] [77]. A isoforma PKG-II não se encontra expressa nas SMC, sendo a PKG-IB a predominantemente expressa nas SMC vasculares [75, 78-81].

Estruturalmente, a PKG é um homodímero, em que cada subunidade é construída por dois domínios funcionais, o regulador e o catalítico. O domínio regulador contém dois locais de ligação para o cGMP. Estes dois sítios de ligação possuem cinéticas diferentes para o cGMP, um possuindo elevada afinidade de ligação para o cGMP (sítio de dissociação lenta ou sítio lento) e o outro baixa afinidade de ligação para este nucleótido (sítio de dissociação rápida ou sítio rápido) [82].

O domínio catalítico contém dois importantes domínios de ligação, um para o Mg^{2+} - ATP e o outro para a proteína a fosforilar. Na ausência do nucleótido cíclico, a PKG mantém-

se num estado catalítico inativo. Todavia, a ocupação dos dois sítios de ligação do cGMP no domínio regulador provoca uma alteração na sua conformação formando-se, um homodímero ativo e, como resultado final, a transferência do fosfato do ATP para as proteínas alvo [82, 83]. Porém, esta atividade de fosforilação é precedida de uma autofosforilação do monómero da PKG, que é iniciada pela ligação do cGMP ao sítio lento do domínio regulador [80].

1.5. Canais de CNG (Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels)

Os canais de CNG foram descobertos há 27 anos por Fesenko e seus colaboradores [84]. Estes canais são canais catiónicos não seletivos que traduzem as alterações nas concentrações de cGMP e de cAMP numa resposta elétrica e/ou num sinal de Ca^{2+} intracelular, normalmente são expressos em fotorreceptores e em neurónio sensoriais olfativos. A função dos CNG ainda não esta bem caracterizada apesar de serem expressos em diferentes tecidos. No entanto, estudos recentes em fotorreceptores e em neurónios sensoriais têm ajudado a entender a sua função [85].

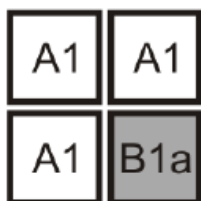
Os canais de CNG nativos são heterotetrameros constituídos por duas subunidades diferentes, a subunidade A (alfa) e B (beta), que juntas formam um poro central de condutância iónica (tabela 1).

As subunidades que formam os CNG são dependentes do tecido em análise, como é visível na figura 11. Podendo também observar-se que o nome destas estruturas depende das subunidades que a compõem [86-90].

Tabela 1. Os diferentes tipos de subunidades diferentes dos canais de CNG. Adaptado de [2]

Subunidades dos canais de CNG	Canais	Gene
"Alfa" (α)	alfa 1	CNG A1
	alfa 2	CNG A2
	alfa 3	CNG A3
	alfa 4	CNG A4
"Beta" (β)	beta 1	CNG B1
	beta 3	CNG B3

rod channel



cone channel



olfactory channel



Figura 11. Composição das subunidades do CNG. In [2]

1.5.1. Topologia e características funcionais

Os canais de CNG pertencem à superfamília dos canais iônicos dependentes de voltagem. Estruturalmente os membros deste grupo de canais são constituídos por um domínio N-terminal intracelular, seis domínios transmembranares (S1-S6) e um domínio C-terminal intracelular. Os segmentos transmembranares estão ligados uns aos outros por hélices (“loops”) curtas, estando o último “loop” localizado entre o segmento S5 e S6 o qual forma o poro. O domínio C-terminal está subdividido em três domínios funcionais: C-linker, domínio de ligação de nucleótido cíclico (CNBD) e um C-terminal distal [85, 91].

Os canais de CNG estão estruturalmente e evolutivamente relacionados com os canais ativados pela hiperpolarização ligada a nucleótidos cíclicos (HCN). Recentemente, a estrutura cristalina do C-terminal dos canais HCN foi determinada, sendo esta estrutura constituída por um domínio C-linker e um domínio CNBD (figura 12) [1]. O C-linker e o CNBD têm sido extensamente analisados e demonstraram estar envolvidos em processos de abertura do canal. Em contraste, a função do C-terminal distal tem sido a menos estudada até agora. Contudo, este domínio tem demonstrado um papel importante no controlo funcional do canal, nomeadamente sendo o local de ligação de vários fármacos [92, 93].

A comparação do CNBD dos HCN à de outras proteínas de ligação de nucleótidos cíclicos, como o ativador do gene de proteína (Cap) [94] e a proteína cinase dependente cAMP (PKG1) [95], revela que estas partilham propriedades de ligação similares.

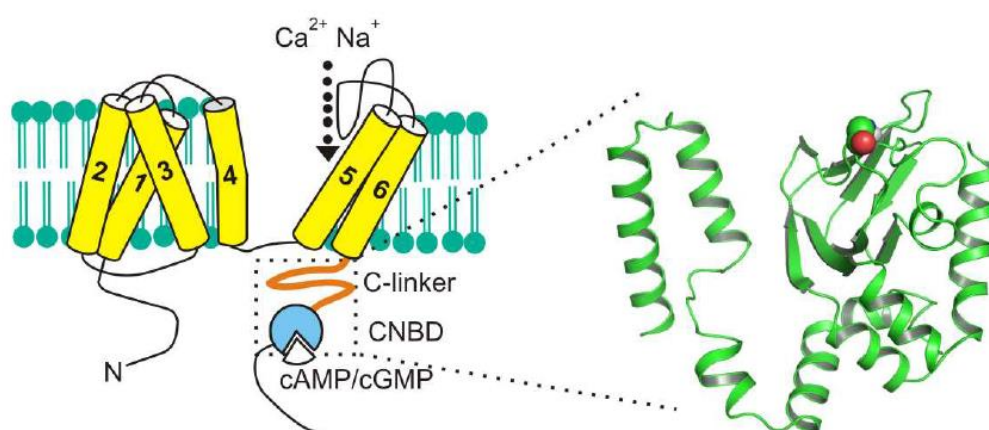


Figura 12. Topologia dos canais de CNG.

Esquerda: Subunidade do canal, composta pelos domínios N- e C- terminal intracelular e seis domínios transmembranares (1-6), Direita: Modelo 3D do domínio C-terminal da subunidade CNGB1a baseada na dinâmica molecular. In [1, 2]

1.5.2. Propriedades eletrofisiológicas dos canais de CNG

Como mencionado anteriormente os canais de CNG podem ser ativados pelo cAMP e pelo cGMP. No entanto a afinidade do ligando, a eficácia, a probabilidade de abertura, a permeabilidade iônica ou adaptação dependem das subunidades que formam o canal. Por exemplo, os canais de CNG olfativos mostram uma sensibilidade semelhante entre o cAMP e cGMP, enquanto nos fotorreceptores a sensibilidade dos canais de CNG ao cGMP é maior do que para o cAMP do que para o cGMP [96, 97]. Estudos em eletrofisiologia indicam que a abertura do canal de CNG ocorre de forma cooperativa. Além disso, demonstrou-se que a ligação dos dois ligando é suficiente para ativar completamente o canal. A ligação dos dois ligandos restantes tem apenas efeitos de estabilização na conformação aberta do canal [98]. Além disso, a ordem preferencial de ligação do ligando para as subunidades individuais também parece existir, como demonstrado recentemente, para os canais de CNG olfativos [99].

A ligação do ligando a subunidade CNG B1b ocorre após a ligação dos dois primeiros ligandos de CNG A4 e CNG A2.

Assim, conclui-se que a subunidade CNG B1b não está envolvida na abertura inicial do canal, mas sim na estabilização do seu estado aberto [2].

1.6. Fosfodiesterases (PDE)

As fosfodiesterases (PDE) estão distribuídas ubiquamente em tecidos de mamíferos e desempenham um papel importante na sinalização celular pela hidrólise do cAMP e cGMP, isto é, são um grupo de enzimas intracelulares que catalisam a hidrólise do 3' do fosfato cíclico ligado a adenosina e/ou guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico (figura 13). Devido à sua diversidade, que permite a distribuição específica ao nível subcelular e celular, as PDE podem regular seletivamente várias funções celulares. O seu papel primordial na sinalização intracelular permitiu que estas fossem designadas como novos alvos terapêuticos para a inflamação, disfunção sexual [5, 100].

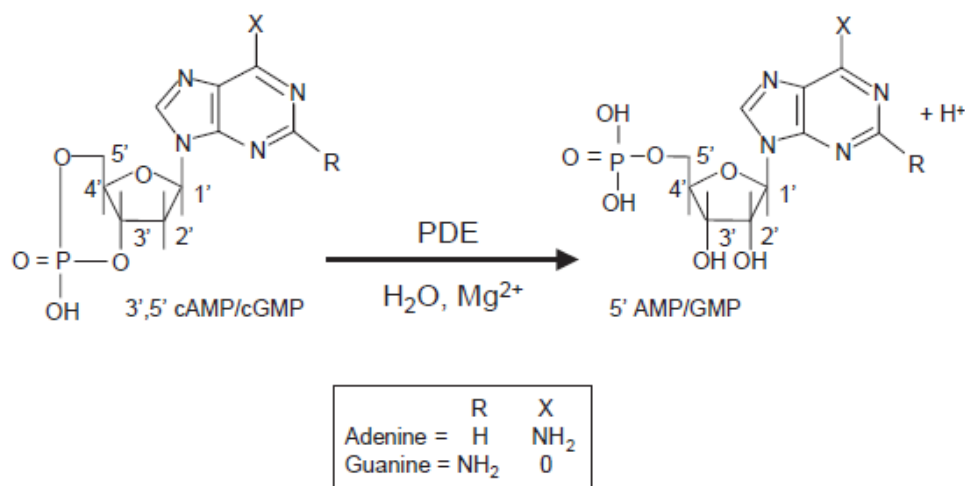


Figura 13. Hidrolise dos nucleótidos cíclicos pelas fosfodiesterases. In [5]

1.6.1. As superfamílias das PDE

Até ao momento, foram identificadas 11 famílias (tabela 2) de PDE com base na similaridade estrutural, como a homologia, os domínios de proteína e propriedades enzimáticas. Cada família engloba 1-4 genes distintos, que dão origem a cerca de 50 isoformas [100]. As características comuns entre as famílias das PDEs incluem um núcleo altamente conservado próximo do terminal carboxil, entre a extremidade amino e o domínio catalítico existem domínios reguladores e uma região amino-terminal única, que confere especificidade. Os domínios reguladores contem sequências específicas que são responsáveis pelas diferentes propriedades de cada PDE [5, 101]

Embora a PDE1 a PDE6 foram as primeiras isoformas bem caracterizadas por causa da sua predominância em vários tecidos e células, a sua contribuição específica para a função e sua regulação em fisiopatologia permanecem em campos de investigação abertos. Em muitas patologias, tais como a inflamação, a neurodegeneração, e cancro, alterações na sinalização intracelular relacionadas com a desregulação da PDE, pode explicar as dificuldades observadas na prevenção e tratamento destas patologias [5].

Tabela 2. Classificação das famílias das PDE. In [5]

Família das PDE	Substrato	Propriedade	Inibidores específicos
PDE1	CAMP, CGMP	Ativa o complexo Ca ²⁺ /calmodulina	Nimidipina
PDE2	CAMP, CGMP	Ativa o CGMP	EHNA
PDE3	CAMP, CGMP	Inibe o CGMP	Cilostamina, milrinona
PDE4	CAMP	Insensível ao	Rolipram,

		CGMP	Ro20-1724, roflumilast
PDE5	CGMP	Fosforila a PKA/PKG	Zaprinast, DMPPO, E4021, Sildenafil
PDE6	CGMP	Ativa a Transducina	Zaprinast, DMPPO, E4021, Sildenafil
PDE7	CAMP	Insensível ao rolipram	BRL 50481, ICI 242
PDE8	CAMP	Insensível ao rolipram e ao IBMX	Desconhecido
PDE9	CGMP	Insensível ao IBMX	Desconhecido
PDE10	CAMP, CGMP	Desconhecido	Desconhecido
PDE11	CAMP, CGMP	Desconhecido	Desconhecido

Os membros da família das PDE apresentam diferentes especificidades na hidrólise dos substratos cAMP e cGMP. Assim, a PDE da família 4, 7 e 8 hidrolisam cAMP, enquanto a família 5, 6 e 9 são específicas para o cGMP. As famílias 1, 2, 3, 10 e 11 utilizam ambos os substratos, cAMP e cGMP, apresentadas eficácias catalíticas distintas [102]. No músculo liso vascular são expressas vários tipos de PDE, nomeadamente a PDE1-5 e PDE7 [101, 103, 104]. Segundo Santos Silva et al. entre estas famílias apenas a PDE1, PDE3, PDE4 e a PDE5 estão presentes na artéria umbilical humana [21].

Família das PDE1

As PDE pertencentes a esta família são dependentes do cálcio e da CaM e foram umas das primeiras famílias a serem identificadas. A característica distinta desta família é a sua regulação pelo complexo Ca^{2+}/CaM . São expressas em diferentes tipos de células, no interior de tecidos ou regiões dentro de uma célula, e portanto podem ajudar a regular um número muito diversificado de nucleótidos cíclicos em processos dependentes de cálcio [5]. Em humanos, a PDE1A e PDE1B mostra alta afinidade para o cGMP, e pouca afinidade para o cAMP. A PDE1C apresenta alta afinidade para ambos os nucleótidos. Nas células do músculo liso vascular, a isoforma que se expressa maioritariamente encontra-se ligada à regulação da contratilidade da artéria pulmonar humana. Esta família de PDE está implicada em vários processos fisiológicos e patológicos [100, 105-108].

Família das PDE3

A principal função desta família é a sua capacidade de hidrolisar tanto o cAMP como o cGMP, contudo foi sugerido que in vivo a hidrólise de cAMP é inibida pelo cGMP. Assim, esta família também foi designada por “PDE inibida pelo cGMP”. Verificou-se que a ligação do cGMP ao domínio catalítico da PDE3, funciona como “ativador” da inibição da hidrólise de cAMP, daí resulta um aumento da concentração do cAMP [109, 110].

Esta família de PDE é composta por dois genes (PDE3A e PDE3B) [111-113]. A família das PDE3s também é distinguida pela sua capacidade de serem ativadas por vias de fosforilação, incluindo a PKA ou da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). A PDE3 foi identificada no músculo liso, plaquetas, tecidos cardíacos adipócitos e fígado. A nível vascular, parece estar envolvida na regulação da contratilidade, provocando a sua inibição o relaxamento do músculo liso vascular e a Contração do músculo cardíaco [46, 103, 110, 114, 115]

Família das PDE4

Esta família é expressa em vários tipos de tecidos, e tipos de células, nomeadamente as células do músculo liso da artéria umbilical humana, desempenhando um papel importante na regulação da contratilidade. Para além da artéria umbilical, esta PDE é expressa na artéria pulmonar humana, mesentérica e femoral. A PDE4 hidrolisa seletivamente o cAMP com elevada afinidade e especificamente inibida pelo rolipram, não sendo reguladas pelo cGMP [21, 101, 103, 116, 117].

Família das PDE5

A PDE5 é a principal família de PDE que hidrolisam o cGMP, nas células do músculo liso, uma vez que está em posição para controlar eficazmente a via de sinalização cGMP/PKG especialmente sobre condições de níveis de cálcio baixo [100, 114].

A família das PDE5 consiste em um único gene, PDE5A, o qual pode codificar três variantes de splice diferentes que hidrolisam especificamente o cGMP (PDE5A1, A2 e A3) [118, 119]. As três proteínas diferem no seu N-terminal, mas até a data não foram detetadas diferenças funcionais significativas entre elas

[118, 119], A PDE5 existe como homodímero e cada subunidade tem dois domínios grandes: o domínio regulador N-terminal e o domínio catalítico C-terminal que permanecem em estreita proximidade (figura 14) [120-123]

A dimerização dos monómeros da PDE5 ocorre por meio de interações complexas entre os domínios N-terminal. O domínio N-terminal é também composto por outros elementos como um local de fosforilação único (Ser¹⁰² humanos), que pode ser fosforilado quer pela PKG quer pela PKA [124, 125], e dois domínios GAF (A e B).

Somente o domínio GAF A aparece ligado ao cGMP com elevada afinidade [126] [123]. A interação do cGMP na zona catalítica estimula a ligação do cGMP ao domínio GAF A, que causa um alongamento aparente da PDE5 [123, 127] e expõe o Ser¹⁰² para a fosforilação pelo PKG e em menor grau pela PKA [125, 128, 129]. A fosforilação da PDE5 pelo PKG no domínio GAF regulador melhora a atividade catalítica do cGMP [125]. A ligação alostérica do cGMP à PDE5 pode também servir como um local de armazenamento intracelular.

Recentemente, foi demonstrado que acetilcolina aumenta a atividade da PDE5 e a fosforilação pela via da inibição da fosfatase 1 mediada pela PKC [130]. A PDE5 é considerada, geralmente, como uma proteína citosólica presente em vários tecidos, como o

músculo liso, o coração, o pâncreas e o cérebro [119]. A respeito do coração, a PDE5A aparece expressa em cão, em ratinhos e miócitos cardíacos humanos, e representa cerca de 40% da atividade hidrolítica da cGMP total em ratinhos [131].

O estado de ativação da PDE5 é dependente do nível intracelular de cGMP, que podem regular, pelo menos, três diferentes fases ativação [5]

- 1) Um estado hidrolítico basal baixo na ausência de ccGMP,
- 2) Um estado reversível ativado quando se liga o cGMP ao GAF A, que é um pré-requisito para permitir fosforilação;
- 3) Uma ativação completa da PDE5.

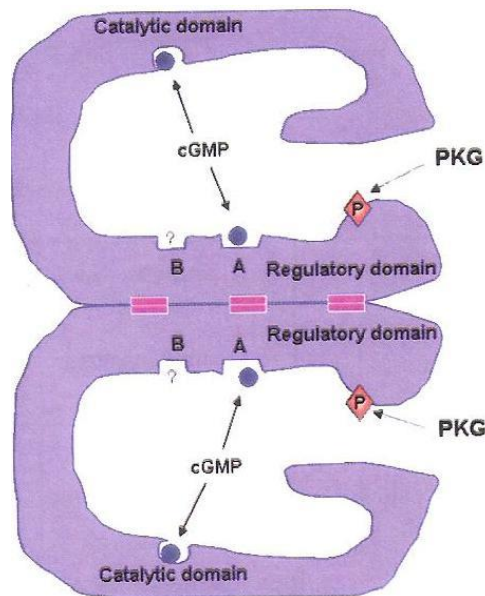


Figura 14. Modelo de trabalho da PDE5 (homodímero) , O domínio regulador contém o local de fosforilação da PKG e dois domínios GAF (A e B). O cGMP liga-se ao domínio GAF-A com elevada afinidade. O domínio catalítico está localizado no C-terminal da enzima, e contém “bolso” catalítico, que induz o local de ligação do cGMP.

1.6.2. Alvos moleculares do cAMP e do cGMP

Os nucleótidos cíclicos inativados pelas PDE, regulam múltiplos alvos intracelulares, a PKA, a PKG, a proteína “ exchange” diretamente ativada pelo cAMP (EPAC), os canais de CNG, como as próprias PDE (figura 15).

Os alvos mais estudados são os nucleótidos dependentes da proteína cinase A, a PKA e a PKG que são diretamente ativadas pelo cAMP e pelo cGMP. O cAMP e o cGMP controlam respostas celulares funcionais como o cálcio intracelular, a proliferação celular, a inflamação e a transcrição genética [132]. Uma vez que eles estão ligados a diferentes ultraestruturas celulares por via de proteínas específicas de ancoragem de cinase A (AKAPS) [133] ou de ancoragem de cinase G (GKAPS) [134], participam na compartimentação da sinalização intracelular [135].

As isozimas PDE, como a PDE2 e a PDE3 são ativadas ou inibidas pelo cGMP, enquanto que a PDE10 é potencialmente inibida pelo cAMP. Permitindo transmissões de informações significativas entre as PDE.

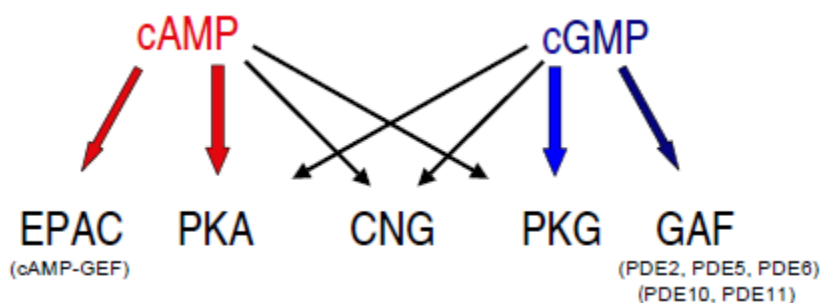


Figura 15. Alvos moleculares de nucleótidos cíclicos. O cAMP ativa diretamente a EPAC, a PKA, bem como os CNG. O cGMP ativa diretamente a PKG e o CNG interage com o domínio de ligação do CGMP (GAF) da PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 e PDE11. Além disso o cAMP e o cGMP podem cruzar e ativar a PKG e a PKA respectivamente [5].

1.6.3. Inibidores das PDE

O maior avanço na área das PDE tem sido no desenvolvimento de inibidores seletivos destas enzimas (tabela 3). Eles são utilizados como ferramentas farmacológicas para caracterizar o papel funcional das PDE e a sua implicação em estados farmacológicos. A teofilina foi o primeiro inibidor não seletivo das PDE a ser descrito [136]. Mais tarde, análogo da xantina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) foi considerado como inibidor não seletivo das PDE com elevada eficiência, mas na última década, um grande número de inibidores seletivos das PDE foram desenvolvidos. Clinicamente, o número de inibidores das PDE, incluindo a milrinona, foram desenvolvidos para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca. A inibição da PDE3 reduz a resistência vascular pulmonar e periférica total e melhora o fluxo de sangue coronário, esta inibição também aumenta a contratilidade do coração. Estas ações vasodilatadoras e inotrópicas combinadas tornam a inibição da PDE3 e uma terapia efetiva num melhoramento no estado cardíaco em pacientes com insuficiência cardíaca em comparação com uma terapia inotrópica e vasodilatadora em separado. Contudo, o tratamento crónico com milrinona está associada com um aumento do risco de mortalidade, e o seu uso é limitado [137].

Também o inibidor da PDE5, como o citrato sildenafil (Viagra®), foi proposto pela primeira vez como droga anti- hipertensivo. Inesperadamente, durante estudos clínicos o sildenafil melhorou a função erétil, apontando que a PDE5 como um novo alvo para o tratamento da disfunção erétil. O enorme sucesso financeiro e terapêutico de inibidores das PDE tem focado a atenção nesta área de pesquisa.

Recentemente os inibidores das PDE foram também propostos para o tratamento da hipertensão pulmonar e da hipertrofia cardíaca [138, 139].

Tabela 3. Seletividade dos inibidores das PDE1-5. Adaptado de [140]

Droga	EC ₅₀ (μM)
Não seletivo IBMX	2-60 μM
PDE1 seletivo Vinpocetina	14 μM
PDE2 EHNA Bay 60-7550	1μM 4,7nM
PDE3 seletivo Cilostamina Milrinona	20 nM 150nM
PDE4 seletivo Ro 20-1724 Rolipram	1μM 2μM
PDE5 seletivo Sildenafil Vardenafil T0-156	10nM 1nM

1.7. Compartimentação dos nucleótidos cíclicos

A hipótese da existência de compartimentos subcelulares de nucleótidos cíclicos foi formulada para o cAMP há mais de 30 anos [141]., para explicar diferentes fenômenos observados nos cardiomiócitos [142-144]. Nestas células, a compartimentação do cAMP e do cGMP já foi demonstrada, porém o mecanismo que limita a sua difusão no citosol ainda não foi completamente esclarecido.

Alguns autores sugerem que este fenômeno se deve a uma barreira física formada por elementos do retículo endoplasmático localizados perto da membrana plasmática. Outros autores sugerem que este fenômeno depende da localização de diversos elementos relacionados com as vias de transdução do sinal dos nucleótidos cíclicos [145].

Estes sinais de nucleótidos cíclicos localizados são importantes para a velocidade e especificidade de eventos mediados pelo cAMP e cGMP, permitindo que a célula distinga diferentes estímulos externos que atuam numa via de sinalização comum. Assim, a localização subcelular de nucleótidos cíclicos será responsável pela regulação compartimentada específica das funções precisas e cAMP e cGMP, em respostas a diferentes estímulos, podem orquestrar uma ampla variedade de respostas celulares.

Recentemente, foi também proposto que as PDE poderiam ser responsáveis pela existência de diferentes concentrações de cAMP e/ou cGMP em distintos locais citosólicos. Além disso, também foi demonstrado que diversas proteínas relacionadas com a sinalização através dos nucleótidos cíclicos estão localizadas em zonas específicas, formando

supostamente complexos. A existência destes complexos pode permitir a interação rápida, eficiente e seletiva dos elementos constituintes para modular uma função celular.

Técnicas inovadoras, como por exemplo a ressonância fluorescente de transferência de energia (FRET) e a transfeção de células com canais operados por nucleótidos cíclicos (CNG), têm proporcionado evidências diretas da compartimentação dos nucleótidos cíclicos nos cardiomiócitos [142, 146-148].

Apesar do estudo da compartimentação nas SMC vasculares ser muito recente, já existem dados sobre este fenómeno a nível vascular. Neste sentido, foi demonstrado que o aumento do cGMP induzido pelos NP e pelos dadores de NO pode ocorrer em compartimentos subcelulares diferentes [149-151]. Mais recentemente, Piggott et al. (2006) demonstraram que a nível vascular existe compartimentação do cGMP e que as PDE não são as únicas responsáveis por este fenómeno [152]. Cawley et al. (2007) em SMC de aorta de rato, observaram que os dadores de NO provocavam aumentos transitórios da concentração de GMP, que dependem da atividade da sGC e da PDE5 [153]. Nausch et al. (2008) observaram a existência de compartimentos subcelulares de cGMP em SMC de aorta de rato. Estes autores sugeriram que a PDE5 regula diferencialmente os efeitos dos dadores de NO e dos NP [154]. Estas observações parecem indicar a existência de compartimentos subcelulares de nucleótidos cíclicos nas SMC vasculares. Porém, o mecanismo que provoca a formação destes compartimentos nas SMC vasculares continua sobre intensa investigação.

Outro aspeto da compartimentação envolve as caveolae que são estruturas “invaginadas” semelhantes a balões, do plasma membranas. Estes domínios celulares constituem um subconjunto de balsas de lípidos e são mais enriquecidos em colesterol e esfingolipídios, bem como proteínas específicas tais como as proteínas caveolinas.

A proteínas caveolinas servem como componentes estruturais de caveolae, enquanto que funcionam também como proteínas de “andaime” capazes de recrutar numerosas moléculas de sinalização para a caveolae, bem como regulam a sua atividade [155]. As proteínas de transdução de sinal que estão envolvidas na via de nucleótidos cíclicos que se localizam na caveolae e/ou interagem com a caveolina nas VSMC são as PKA [156] e vários tipos de adenilato ciclase (AC3, AC5, AC6) [157]. Sampson et al, revelaram que a co-localização dos canais de K_{ATP} e adenilato ciclase na caveolae do músculo liso da aorta de rato tem significância fundamental demonstrando que a integridade da caveolae é importante para a modulação dos canais K_{ATP} mediados pelo AC [156]. A integridade da caveolae parece também ser necessária para a sinalização de Ca^{2+} nas VSMC [158]. Referente, ao endotélio, em ratinhos deficientes em caveolina 1, algumas respostas dependentes do cGMP é largamente melhoradas e não reduzidas, ilustrando falta de relevância da caveolina para a fixação e localização da eNOS [159], [160].

Assim, a caveolae parece constituir um domínio de sinalização importante que desempenha um papel relevante não só na regulação do tónus do músculo liso mas também na proliferação, tal como pode ser visto na formação de neointina e da aterosclerose [161].

1.8. Testosterona

A elevada taxa de morbidade e mortalidade de pessoas com doenças cardiovasculares é atualmente um dos principais problemas a nível mundial, principalmente na população masculina, onde estas taxas são maiores. Entre indivíduos normotensos de idade similar também a média da tensão arterial é superior nos homens. Uma das possíveis causas destas diferenças pode ser os diferentes padrões de secreção de hormonas sexuais em homens (testosterona) e mulheres (estradiol e progesterona). Neste capítulo são apresentados os mecanismos pelo qual a testosterona pode provocar vasodilatação, alguns aspetos gerais desta hormona e a sua relevância a nível vascular [46].

1.8.1. Generalidades

A testosterona é o androgénio maioritário existente na circulação sanguínea. É responsável, entre outros, pelo crescimento normal, pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas e pela regulação do metabolismo. Esta hormona sexual é sintetizada a partir do colesterol (Figura 16), principalmente nas células de Leydig dos testículos. Para a síntese de testosterona é usado o colesterol proveniente dos ésteres de colesterol armazenados na matriz intracelular ou das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A secreção testicular de testosterona é modulada principalmente pela hormona luteinizante (LH). A conversão de colesterol em testosterona é realizada por enzimas da família dos citocromos P 450 (figura 16). No geral, os testículos do homem adulto produzem diariamente grandes quantidades de testosterona (2,5-10 mg), originando níveis plasmáticos de 350-1000 ng/dl, variando estas concentrações de forma circadiana. A testosterona não é uma hormona exclusiva do sexo masculino pois as mulheres atingem níveis plasmáticos de 15-65 ng/dl [162-167]. Nas mulheres os outros tipos de androgénios são produzidos pelos ovários e pelas glândulas supra-renais, os quais posteriormente podem ser convertidos em testosterona e DHT noutros tecidos. Normalmente, durante a gravidez a unidade feto-placentária tem a capacidade de sintetizar androgénios e estrogénios, podendo estes desempenhar um papel biológico importante durante a gravidez. A concentração de dehidroepiandrosterona (DHEA) e de 16alfa-DHEA e dos sulfatos correspondentes é maior na HUA do que na veia umbilical humana, sugerindo que a produção de androgénios ocorre maioritariamente no compartimento fetal. No término da gestação, a produção de sulfatos de DHEA é de aproximadamente 200-220mg/24horas, dos quais 90-95% são secretados pelo feto. O DHEA é biossintetizado principalmente pelas glândulas supra-renais e pelo fígado, a partir principalmente de três precursores: pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona e 17,21-dihidroxipregnenolona. [168]. A maioria dos androgénios produzidos pelo feto é posteriormente convertida em estrogénios na placenta. Contudo, a testosterona

biossintetizada no testículo do feto é determinante na diferenciação sexual do mesmo [169, 170].

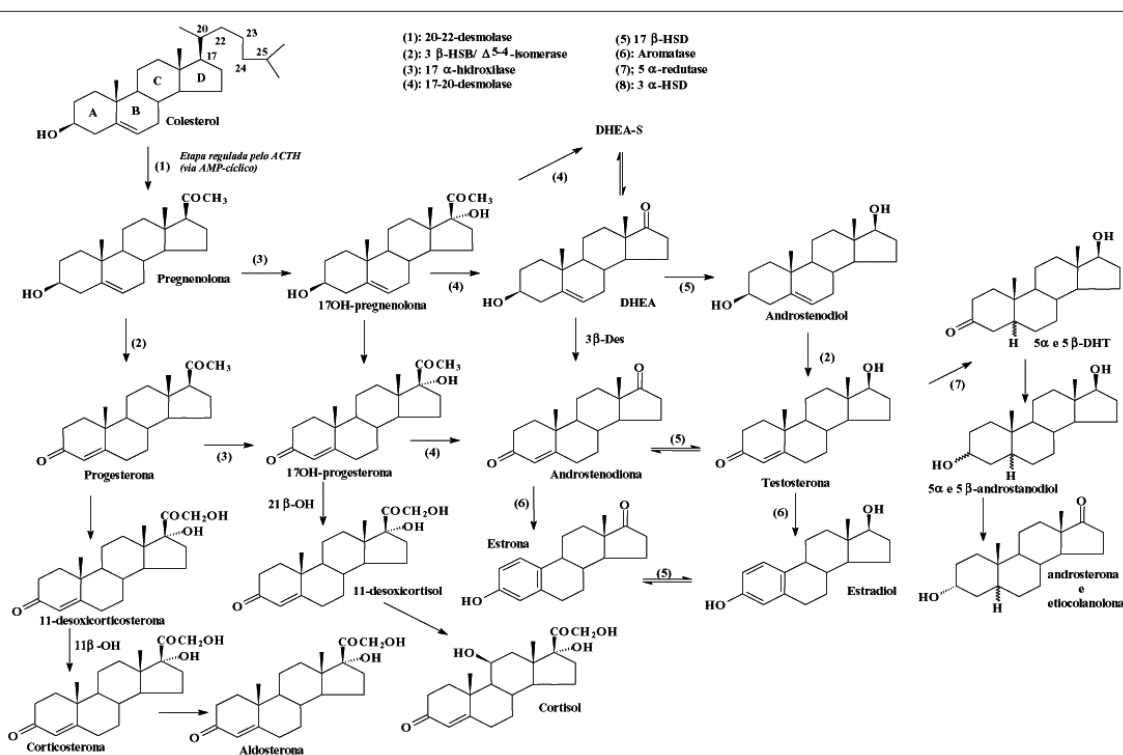


Figura 16 Biossíntese da testosterona. A testosterona é sintetizada a partir do colesterol por uma seqüência de cadeias enzimáticas dentro das células de Leydig, localizadas no interstício do testículo maduro. Adaptado de [168]

Na corrente sanguínea, a testosterona circula em concentrações muito superiores à sua solubilidade, um vez que está maioritariamente ligada a proteínas séricas, como as SHBG (Sexual Hormone Binding Globulin) e à albumina [171]. Em diferentes tecidos, a testosterona pode ser convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela ação da 5 α redutase. A DHT é o androgénio mais ativo, pois tem mais afinidade pelos recetores de androgénios, contudo a sua concentração plasmática é muito mais baixa do que a da testosterona (35-75ng/dl nos homens). Por outro lado, em diferentes tecidos, como a pele, as mamas, a próstata e os músculos, a testosterona pode ser convertida em estradiol pela ação da aromatase [172]. A maioria da testosterona circulatória é convertida em vários metabólitos no fígado, como a androsterona e o etiocholanolona, que após conjugação com o ácido glucurónico e sulfúrico são excretados na urina. Tradicionalmente era considerado que a ação dos esteroides sexuais, incluindo a testosterona e o seu metabólito DHT, ocorria porque estas hormonas se difundiam através da membrana plasmática das células alvo e ligavam-se aos recetores intracelulares de androgénios (AR). Estes recetores são membros da superfamília de recetores nucleares, que funcionam como fatores de transcrição génica. A ligação de androgénios ao AR provoca a

dimerização do recetor, agindo o dímero como fator de transcrição que se ligam a sequências específicas do DNA (Androgen Response Elements) e regulam a expressão de genes-alvo [173-177]. Este mecanismo de ação é semelhante ao de outras hormonas com estrutura química de esteróide. No geral, os efeitos produzidos por este tipo de mecanismo de ação são designados como “efeitos genómicos” [178].

Além da ação genómica dos esteroides, estas moléculas podem também exercer “efeitos não-genómicos” de desenvolvimento mais rápido e que poderão estar relacionados com uma interação com estruturas presentes na membrana plasmática [178]. A primeira evidência destes efeitos foi descrita em 1967 por Szego e Davis que demonstraram que doses fisiológicas de 17beta-estradiol provocavam um aumento muito rápido (15s) da concentração de cAMP no útero de ratinhos, após a extração dos ovários [179].

1.8.2. Mecanismos vasodilatadores da Testosterona

Estudos recentes têm demonstrado que a testosterona atua como um vasodilatador direto em vários tecidos e vasos sanguíneos, incluindo a artéria humana [20, 180, 181]. Como foi referido anteriormente, a testosterona e a DHT, seu metabolito ativo, podem regular numerosas funções celulares através da ligação ao AR. O complexo hormona-recetor interage diretamente com o DNA nuclear, modulando a transcrição de genes e, portanto, a síntese proteica. Alguns autores consideram que a realização deste processo demora várias dezenas de minutos e portanto, do ponto de vista temporal, estes efeitos genómicos são considerados lentos, quando comparados com os efeitos não genómicos devidos a ativação de recetores membranares [181, 182]. Por esta razão, os efeitos vasodilatadores da testosterona, que se verificam após vários segundos, são considerados como efeitos não genómicos da testosterona [180, 183]

Mecanismos de sinalização potencial da testosterona na reatividade vascular

Os estudos iniciais sobre os mecanismos intracelulares implicados na vasodilatação da testosterona centraram-se na análise de um possível envolvimento do recetor nuclear (AR). Assim, foi demonstrado que o efeito vasodilatador da testosterona é rápido e reversível, sendo improvável que este efeito envolva a ativação de um recetor nuclear de androgénios (AR) [182, 184, 185]. Esta teoria é apoiada pelo fato de que os efeitos vasodilatadores foram mostrados pela utilização de análogos de androgénios ligados à albumina, o que impede a difusão transmembranar e/ou a endocitose e, por conseguinte, acesso do AR citoplasmático em células musculares lisas [186], e pela utilização de inibidores de síntese proteica [187]. Além disso, os análogos de testosterona que são incapazes de permeiar a membrana da célula têm sido mencionados para produzir uma maior resposta vasodilatadora do que os análogos permeáveis [186], e de forma similar os análogos da testosterona com efeito não genómico

provocam um aumento da vasodilatação comparado com os análogos com efeito genómico [180, 186] .

Alguns autores observaram que a testosterona provocava vasodilatação em ratos, quando o AR não esta presente, demonstrando assim que este efeito não era mediado por este recetor [185, 188, 189]. Murphy e Khalil (1999) foram os únicos que sugeriram que o efeito vasodilatador desta hormona na artéria coronária de porco era inibido pela flutamida [190]. De forma geral, esta dicotomia sobre a participação do AR também aparece quando os efeitos de outros esteróides sexuais são analisados, e alguns autores demonstraram a presença de recetores nucleares destas hormonas na membrana plasmática [191]. De forma a explicar estas contradições alguns autores sugeriram que diferenças regionais e/ou entre espécies podiam estar envolvidas na distribuição diferencial dos recetores hormonais [184, 188, 192].

Efeito no endotélio vascular

Vários estudos demonstraram que o efeito vasodilatador da testosterona é independente do endotélio [190, 193-199]. No entanto, outros autores sugeriram que o efeito vasodilatador da testosterona é parcialmente dependente do endotélio, e que esta hormona estimula a produção de diferentes mediadores endoteliais que provocam vasodilatação. Além disso a testosterona pode também modular a libertação do óxido nítrico (NO) [200]. A testosterona é metabolizada diretamente a estradiol pela aromatase, que é conhecida por estimular a libertação do NO. [201]

O NO é um potente vasodilatador que pode sintetizado pela sintetase do óxido nítrico (NOS) e é libertado pelo endotélio vascular, entre outros tecidos. A vasodilatação induzida pelo NO é frequentemente alvo terapêutico no tratamento da hipertensão e da angina [200]. *In vitro*, em culturas de células endoteliais humanas, a síntese de NO aumentam em resposta a concentrações fisiológicas de testosterona pela ativação da via não genómica da via de sinalização intracelular e influxo Ca^{2+} [180, 183].

Além disso, o aumento da expressão e fosforilação do NOS endotelial (eNOS) foi observado nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) [202]. A testosterona aumenta a produção do NO [201] e estimula a sua síntese, provocando o aumento da formação de cGMP e induzir a relaxação das células do músculo liso vascular [195, 201]

Em síntese, alguns estudos demonstraram uma pequena interação entre o efeito da testosterona e o endotélio, contudo, parece evidente que o efeito vasodilatador da testosterona é maioritariamente devido a uma ação direta no músculo liso vascular [46].

Modulação dos canais iónicos

O mecanismo fundamental subjacente às acções vasodilatadoras da testosterona tem sido proposto por diversos estudos que envolvem um efeito sobre a função dos canais iónicos das células do músculo liso, influenciando tanto a abertura canal de potássio (K^+) como a

inativação do canal de cálcio (Ca^{2+}) [182] [203] isto é, a testosterona provoca abertura dos canais de potássio. A abertura destes canais pode provocar diminuição do potencial de membrana e, conseqüentemente, o encerramento dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Neste sentido, alguns dos autores [186, 192, 194] podem ser concordantes com a hipótese da testosterona inibir os canais de Ca^{2+} . No entanto, vários estudos demonstraram ou sugeriram que esta hormona inibe diretamente os canais de Ca^{2+} e provoca abertura dos canais de potássio.

Ativação dos Canais de Potássio

Vários estudos com artérias de animais têm sugerindo um efeito modulador da testosterona nos canais de potássio. No ano de 1995 realizou-se o primeiro estudo o usando aorta e artérias coronárias de coelho contraídas com $\text{PGF2}\alpha$ e KCl [194]. Estes autores demonstraram que a testosterona relaxa artérias contraídas por despolarização (KCl 30 mM) e este efeito era devido à ativação dos K_V e BK_{Ca} , e não à ativação dos K_{ATP} ou à inibição de VOCC [194]. No entanto, a participação dos K_{ATP} não está clara, já que outros autores sugeriram que o efeito relaxante da testosterona é dependente da ativação destes canais [204]. Por outro lado, Ding e Stallone (2001) observaram que o efeito da testosterona em aortas torácicas de rato contraídas com noradrenalina e KCl é exclusivamente devido à ativação dos K_V [186], não estando envolvidos os K_{ATP} e BK_{Ca} [205]. Outros estudos demonstraram a participação dos BK_{Ca} [20], mas não dos K_V e K_{ATP} , no mecanismo vasodilatador da testosterona em artérias mesentéricas e aorta de rato [184, 192]. Deenadayalu et al. (2001) demonstraram, através de experiências com artérias coronárias suínas e de experiências de Patch-clamp com células musculares lisas destas artérias, que a vasodilatação provocada pela testosterona é devido à ativação dos BK_{Ca} .

Bloqueio dos canais de Cálcio

Em 1996 Perusquia et al. propôs que a testosterona apresenta um efeito antagonista sobre os canais de Ca^{2+} . Neste estudo, os autores concluíram que a testosterona, a 5 β -DHT e a 5 α -DHT apresentavam um efeito vasodilatador na aorta rato contraída pela noradrenalina, devido à inibição direta ou indireta dos ROC [206]. Estudos seguintes propuseram que o efeito vasodilatador da 5 β -DHT na aorta torácica de rato contraída pela noradrenalina e pelo KCl (60 mM) ocorria através da inibição dos ROC e dos VOCC , sendo este efeito mais acentuado nos VOCC [207].

No ano de 2008 Montano et al. Demonstrou, utilizando células de aorta de rato que, dependendo da concentração, a testosterona pode ser antagonista (baixas concentrações, nM) ou agonista (altas concentrações, μM) dos VOCC do tipo L. Com este estudo também se pode observar que concentrações elevadas da testosterona aumentam os níveis de cAMP, podendo assim dever-se a ativação da PKA [208].

Em relação a artéria umbilical humana, primeiramente, Fausett et al. (1999) observaram que esta não relaxava significativamente depois de ser contraída por

despolarização [209]. Posteriormente em 2007 Perusquia et al. sugeriram que esta hormona provocava relaxação da HUA contraída com KCl e com 5-HT devido à inibição dos VOCC ou dos ROC, diretamente, e não através da ativação de vias de sinalização intracelulares. Este estudo, também foi extremamente importante porque demonstrou que os outros androgénios fetais, como DEAH, podem induzir um efeito relaxante significativo.

Envolvimento da PKG no efeito de relaxação da testosterona

Recentemente foi demonstrado que a estimulação da corrente de potássio (canais BK_{Ca} e K_v) pela testosterona é atenuada por um inibidor da PKG nas células do músculo liso vascular umbilicais humanas (HUVSMC) [193]. Nestas células a atividade dos canais BK_{Ca} e K_v aumenta através do ANP devido a ativação da PKG [193]. Deenadayalu et al. (2012) também observou que a relaxação induzida pela testosterona em artérias coronárias é mediada pela cascata de sinalização PI3 cinase-Akt/NO/cGMP/PKG depois da estimulação e repolarização dos canais BK_{Ca} das células VSM [210]. Contudo o envolvimento do cGMP e não do cAMP na “cross activation” [211] induz a ativação da PKG e que nunca tinha sido demonstrado antes. Neste sentido, Cairrao et al. (2010) demonstrou a ativação da PKG através da técnica patch clamp [193], a ativação direta da PKG pode também ser devido sem o aumento do cGMP [212]

1.8.3. Relevância da testosterona a nível cardiovascular

Devido à elevada prevalência de algumas doenças cardiovasculares nos homens, a testosterona foi inicialmente considerada como prejudicial para o sistema cardiovascular. Nos últimos anos, diferentes estudos clínicos reverteram esta ideia. De facto, foi observado que homens com doenças cardiovasculares apresentavam baixos níveis de testosteronemia [213]. Similarmente, outros estudos demonstraram uma correlação inversa entre os níveis de testosterona e o risco de aterosclerose [180]. Por outro lado, a maior prevalência das doenças cardiovasculares nos homens aumenta nas idades avançadas, quando a produção de testosterona declina. Estas observações sugerem que esta hormona tem efeitos benéficos para o sistema cardiovascular. [180]

Nos anos 40, vários estudos demonstraram que a terapêutica com testosterona em doentes do sexo masculino com angina de peito apresentava efeitos benéficos [163, 180, 182]. Analogamente, estudos realizados em indivíduos do sexo masculino com doenças coronárias demonstraram que a administração aguda deste androgénio, em concentrações suprafisiológicas, melhorava a tolerância ao exercício físico e reduzia a severidade da angina de peito [214, 215].

A terapia de substituição hormonal com androgénios é actualmente uma realidade para determinadas patologias [178, 180].

CAPITULO II- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Métodos

2.1.1. Isolamento das artérias

Para a realização do estudo foram usados cordões umbilicais humanos. O protocolo realizado com as amostras humanas foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB). As amostras dos cordões umbilicais foram recolhidas no Bloco de Obstetrícia e Ginecologia do CHCB, e provieram de partos eutócitos e com gestações compreendidas entre as 37 e as 42 semanas.

Os cordões umbilicais são recolhidos dentro de intervalos de tempo não superiores a 10 minutos após os partos. Entre 3 a 7 cm de cordão umbilical foi cortado da metade proximal ao recém-nascido e colocado numa solução fisiológica salina (PSS) estéril, a 4°C.

A fim de evitar possíveis contaminações e a degradação das células foram adicionados à solução os seguintes antibióticos: penicilina (5 U/mL), estreptomicina (5 µg/mL) e anfotericina B (12.5 ng/mL), e as seguintes antiproteases: leupeptina (0.45 mg/L), benzamidina (26 mg/L) e inibidor da tripsina (10 mg/L). Os anéis vasculares de 3-4 mm foram cuidadosamente isolados a partir dos segmentos do cordão umbilical e o endotélio vascular foi mecanicamente removido com um fio de algodão.

São excluídos dos ensaios os cordões umbilicais cujas mães apresentaram patologias durante a gravidez. Também foram excluídas do protocolo de investigação, as grávidas que fizeram medicações para além do ácido fólico durante as primeiras 21 semanas de gestação e de suplementos de ferro durante todo o período gestativo.

Para a realização do isolamento da HUA, o cordão umbilical foi colocado dentro de uma caixa de Petri com cerca de 20mL de PSS, a 4°C e as artérias foram isoladas por dissecação da geleia de Wharton envolvente. O endotélio vascular foi removido mecanicamente com um fio de algodão.

2.1.2. Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana

A dissecação do cordão umbilical e cultura celular do mesmo foi obtida usando os procedimentos descritos por Martin et al e por Cairrão et al. [216] [217].

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

Após o isolamento da HUA, os segmentos da artéria foram cortados em rectângulos, e a túnica íntima (endotélio) foi mecanicamente removida com uma leve passagem de um cotonete estéril sobre a mesma. As artérias sem endotélio foram transferidas para uma nova caixa de petri com 3 ml de PSS e antibiótico. As camadas de músculo liso vascular foram extraídas, usando para o efeito pinça e bisturi cirúrgico [217] [216].

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

As culturas confluentes foram obtidas entre 20-30 dias. Quando as células apresentaram uma confluência entre 90-95% na superfície do frasco de cultura, foram passando por sucessivas tripsinizações. Subculturas destas células foram obtidas até ao máximo de 10 passagens [217]

2.1.3. Extração e purificação do adenovirus

A purificação do adenovirus (Ad - CNG A2) foi realizada segundo um protocolo que fornecido pelo fabricante Vivapure AdenoPACK 20, Sartorius Biotech.

Preparação da amostra

As células utilizadas foram as HEK-293 (células do rim embrionário humano). Estas células foram cultivadas numa solução de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contendo FBS a 10% a 37° C numa atmosfera de ar de 95% e CO₂ a 5%, após as células HEK apresentarem uma confluência de 70-80% são infetadas com 4µL de vírus (10 m.o.i). Este volume de vírus deve ser colocado em 15mL de DMEM-F12 contendo FBS a 10% num frasco de cultura. As células já infetadas são guardadas numa incubadora durante 2-5 dias, dependendo este tempo dos efeitos fitopatológicos do vírus. De seguida, as células e o meio foram transferidos para um falcon de 50mL e centrifugadas a 3500g durante 15 minutos. O sobrenadante foi decantado e guardado num tubo estéril de 50mL, o pellet foi ressuscitado em 2mL de sobrenadante armazenado previamente. Seguidamente foi feito o método congelamento / descongelamento da suspensão de células, usando um banho de água a 25°C e um congelador a -80°C (repetir este procedimento três vezes) e no fim centrifugar a 3500g durante 15 min, e repetir caso a amostra não esteja límpida. Seguidamente o sobrenadante viral foi recolhido e misturado com o sobrenadante inicial e de seguida foi adicionado 1 µL de Benzonase por cada 1mL de volume de cultura, sendo a concentração final de 12,5 U/mL. A amostra foi agitada e guardada a 37°C num período de meia hora. Após este tempo a mistura foi transferida para uma coluna do Kit, Vivaclear Maxi e centrifugada a 500g durante 5min ou

até que o volume total passe a membrana. Por fim, a amostra foi recolhida na totalidade, e foram adicionados 2mL de *loading buffer* para 18mL de amostra.

Preparação da AdenoPACK20

Em 45mL de água destilada foi diluído 5mL de *washing buffer*. E equilibrar a coluna AdenoPACK20 maxi spin adicionando 5mL de *buffer washing* diluído e centrifugar a 500g durante 5 minutos.

Purificação do adenovírus

A amostra que foi recolhida antes a preparação da coluna para a AdenoPack Maxi é transferida para a AdenoPACK Maxi, e centrifugada a 500g durante 5 min ou até que o volume total passe a membrana. De seguida, a coluna foi lavada com 18mL de *buffer washing* através de uma centrifugação a 500g durante 5 minutos (repetir o processo com uma solução nova de *buffer washing*). Por fim, o adenovírus da membrana da AdenoPACK Maxi foi eluído com 1 mL de *buffer elution*, pipetar o *buffer elution* para a membrana e centrifugar a 500g durante 5 min e incubar 10 minutos. Este processo é repetido.

Quantificação do adenovirus

O adenovírus foi diluído num tampão Tris 20mM-SDS 0,1% e deixado durante 15 minutos à temperatura ambiente, e de seguida foi medida a DO a 260nm.

A quantificação é calculada unicamente pelo número total de partículas, através da seguinte fórmula: $DO \times 1.1 \times 10E12$

A solução de adenovírus foi armazenada a -80°C.

2.1.4. Infeção Viral

Quando as HUASMC atingiram confluência total, foram tripsinizadas e transferidas para multiwells previamente revestidas com colagénio. Assim que as células chegaram a 70-80% de confluência, as células foram colocadas durante 1 hora na presença de solução de Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM-F12), meio de cultura celular com ausência de FBS (soro fetal bovino) e antibiótico. Após este tempo, o meio foi substituído por 400 uL de meio livre de FBS contendo 7µL de "WT CNGA2 encoding adenovirus (Ad-CNGA2)", utilizando uma infeção de multiplicidade (MOI) de 5000 unidades formadoras de placas por célula (pfu/cell). Os vetores foram oferecidos pelo professor Albert Smolenski (Frankfurt, Alemanha). Após a infeção, as células foram colocadas a 37° C numa atmosfera de ar de 95% e CO₂ a 5% durante 24 horas. Após este período, o meio foi substituído por 1 mL de DMEM-F12 contendo FBS a 5% e colocado numa incubadora durante a noite.

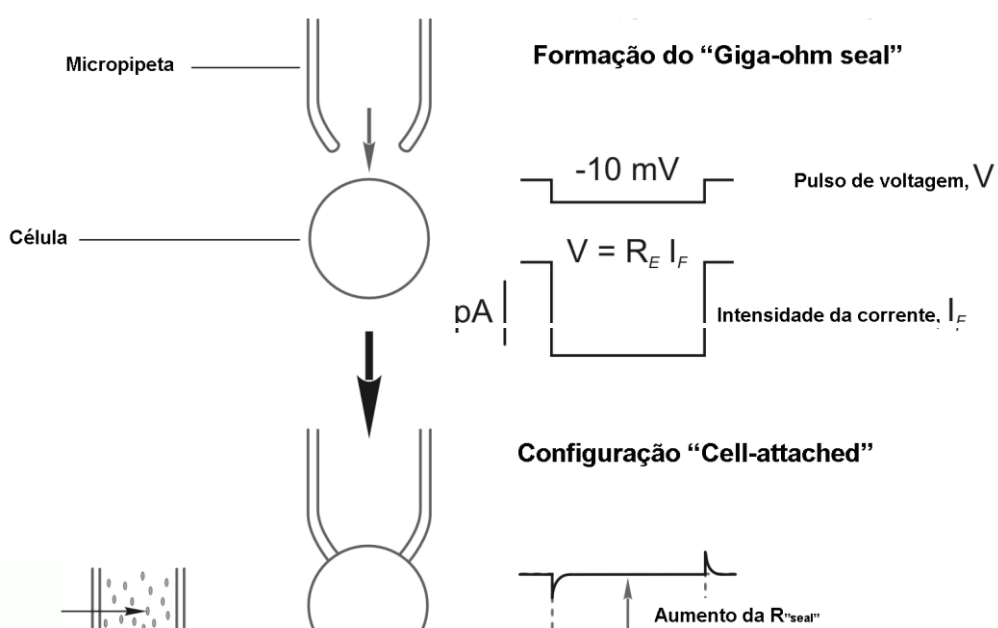
2.1.5. Imunofluorescência

A Imunofluorescência é uma técnica que consiste na utilização de anticorpos específicos para detectar a presença de uma proteína em células em cultura ou em um tecido. Neste estudo, as HUASMC foram fixadas em lamelas, permeabilizadas e incubadas com um anticorpo monoclonal de ratinho contra CNGA2 como descrito anteriormente [142]. Este anticorpo foi um presente generoso Drs. F. Mueller e B. Kaupp (Juelich, Alemanha). As células foram reveladas com Alexa Fluor 488 anticorpo de cabra anti-ratinho. Após a montagem das amostras, as proteínas expressas foram localizadas utilizando um microscópio Zeiss AX10 e o software axio visão real 4.6.

2.1.6. Patch clamp - Configuração Whole cell

Princípios teóricos

A técnica de Patch-clamp foi introduzida por Neher e Sakmann em 1976, sendo atribuído a estes autores o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1991. Esta técnica permite detectar correntes que passam através de canais iônicos em diversos tipos células, nomeadamente nas SMC vasculares. A ponta de uma micropipeta de vidro é pressionada contra a membrana da célula de forma a isolar eletricamente uma pequena porção (patch) de membrana. A aplicação duma pressão negativa no interior da micropipeta resulta na criação de um “selo” de elevada resistência (designado por “giga-ohm seal”) entre a superfície interna da micropipeta e a membrana da célula [218].



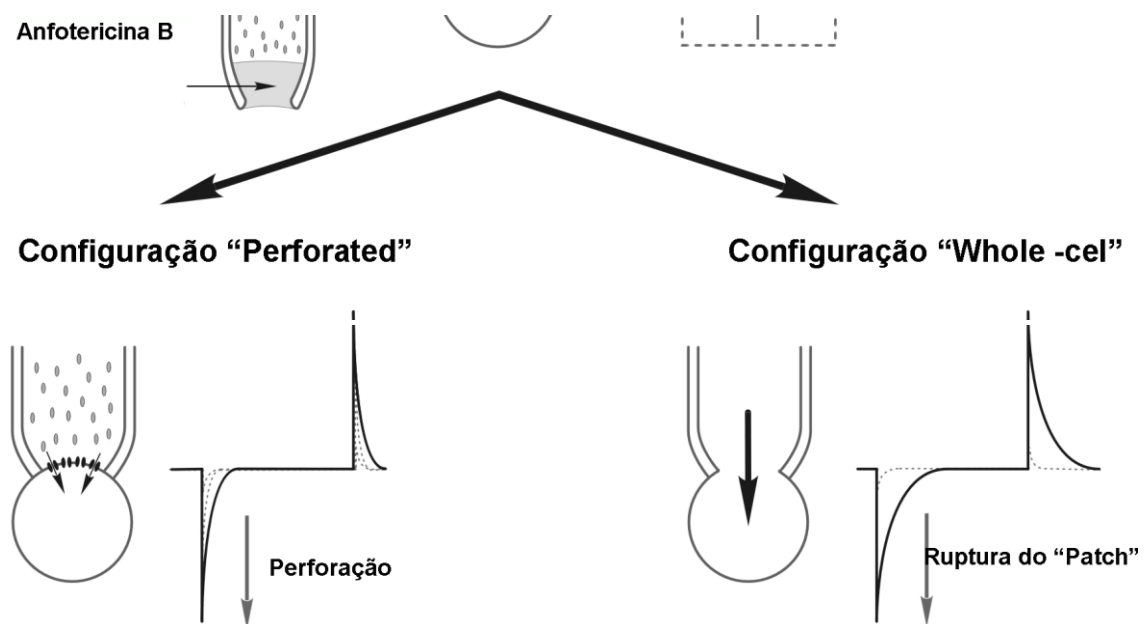


Figura 17. Representação esquemática da configuração whole-cell. Esta técnica permite medir as correntes iônicas associadas a todos os canais iônicos existentes na membrana da célula.

Configuração Whole-cell

Uma vez estabelecido o selo, a corrente passa através dos canais abertos na porção de membrana eletricamente isolada permitindo o fluxo para a pipeta, sendo esta configuração designada como “cell-attached” [218]. A estabilidade mecânica do selo entre a membrana e a micropipeta permite a realização de várias configurações para o estudo dos canais iônicos. Quando existe a rutura do patch de membrana dentro da micropipeta, gera-se uma continuidade entre a solução da micropipeta e o interior da célula, originando-se uma via de baixa resistência elétrica entre os dois meios, tornando possível o controlo da voltagem da célula. Esta configuração é designada de “Whole-cell”, uma vez que permite medir as correntes iônicas associadas a todos os canais iônicos existentes na membrana da célula.

Uma variação desta configuração “Whole-cell” ocorre quando em lugar de existir rutura do patch é promovida a formação de pequenas perfurações na membrana da célula com um antibiótico. Nestes casos, a solução interna na micropipeta contém pequenas quantidades do antibiótico (anfotericina B ou gramicidina) que vai promover a formação das pequenas perfurações na membrana da célula, permitindo a comunicação entre a solução da micropipeta e o interior da célula. Esta configuração permite o estudo da atividade dos canais iônicos na célula viva e a análise da influência das vias de transdução do sinal na atividade dos canais (Figura 17) [48].

2.1.7. Medição da corrente do CNG (I_{CNG})

Todas as experiências eletrofisiológicas foram realizadas à temperatura ambiente, sendo os protocolos de estimulação dependentes da corrente iónica a analisar.

A configuração whole cell da técnica patch clamp é utilizada para registar a corrente do CNGA2 (I_{CNG}). As células foram mantidas a um potencial de repouso 0 mV, e hiperpolarizadas a cada 8 segundos, a -50mV durante 200ms.

I_{CNG} foi registada na ausência de catiões divalentes na solução extracelular (tabela 4), permitindo os catiões monovalentes passarem por os canais de forma não específica. Os eletrodos (2.8 -4.2M Ω) eram feitos de vidro macio (Reagent 5, Portugal) e preenchidos com a solução interna (tabela 5).

A corrente basal da CNG foi medida após 5-10 min para estabilizar a pipeta com as soluções intracelulares. Correntes não foram compensados por capacitância e correntes de fuga. Todas as experiências são realizadas à temperatura ambiente (21-25°C). As células foram seguradas usando um amplificador de voltagem Axopatch 200B de patch-clamp (Axon instruments, USA). As correntes foram medidas a uma frequência de 10 kHz através do conversor analógico-digital de interface de Digidata 1322A (Axon instruments, USA), ligado a um computador compatível com o software de Pclamp8 (Axon instruments, USA). A solução externa foi aplicada para a proximidade da célula, colocando a célula na abertura de um tubo capilar. A I_{CNG} basal foi estudada na presença de diferentes concentrações de Tes (0,1-10 mM), ANP (0,1-1 μ M), SNP (10-100 μ M), IBMX (100 μ M), T0-156 (0,01-10 μ M), Ciloestamida (0,1-10 μ M) e 8-Sp (100 μ M) dissolvidos na solução externa.

2.1.8. Análise estatística

A amplitude da I_{CNG} é independente do tempo e foi medida no final do impulso de 200 ms. Em um total de 199 células, a média de capacitância de membrana (C_m) foi de $49,3 \pm 3,2$ pF. A densidade da I_{CNG} (dI_{CNG}), que representa a relação da amplitude da corrente, a média de C_m foi $7,0 \pm 0,5$ pA / pF. Em cada condição experimental, as respostas de dI_{CNG} a uma droga foi expressa em relação à "corrente basal" obtida na solução extracelular de controlo resultante da relação: "resposta" = (I_{CNG} -"corrente basal")/ C_m .

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

2.2. Soluções e Materiais

2.2.1 Soluções

Na tabela 4 estão mencionadas as várias soluções utilizadas nos procedimentos experimentais usados neste trabalho, assim como a sua composição.

Tabela 4. Soluções utilizadas na realização do estudo.

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

Tabela 5. Composição da solução externa (Rcs Ba5) utilizada no *Patch-clamp*

	HUASMC
	I _{CNG}
NaCl, mM	107
CsCl, mM	20

HEPES, mM	10
Glucose, mM	5
Ba, mM	5
pH (NaOH)	7,4

Tabela 6. Composição da solução interna utilizada no *Patch-clamp*

HUASMC	
I _{CNG}	
HEPES, mM	20
EGTA, mM	20
Glicose, mM	5
TEA, mM	5
Na ₂ ATP, mM	3,1
Na ₂ GTP	0,42
Cscl, mM	113,8
MgCl ₂ , mM	2,5
CaCl ₂ , mM	0,062
pH (CsOH)	7.3

2.2.2. Químicos

Todas as drogas e químicos usados foram adquiridos por Sigma-Aldrich Quimica (Sintra, Portugal), excepto a ciloestamida e o T0-156, que foram adquiridos por Biogen Cientifica (Madrid, Espanha). O 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX), a ciloestamida, o T0-156 e a testosterona foram inicialmente dissolvidos em etanol. O nitroprussiato de sódio (SNP), o péptido natriuretico auricular (ANP) e o Sp-8 foram inicialmente dissolvidos em água

destilada. No final as soluções são obtidas por diluição na solução externa (Rcs Ba5) utilizada no Patch-clamp

2.2.3. Material

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

Tabela 7. Material usado durante a realização do procedimento experimental

Material	Marca
Balança digital	Sartorius
Medidor de pH	Metrohm
Material cirurgico especifico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless; Tekno
Frasco de cultura e multiwells	Orange scientific
Sistema de incubação	Pecon
Caixas de petri pequenas para o Patch Clamp	Sarstedt
Eletrodos do Patch Clamp	Reagente 5, Portugal
Amplificador Axopatch 200B	Axon Instruments, EUA
Conversor analógico-digital de interface de Digidata 1322A	(Axon Instruments, EUA)
Computador compatível com o software de Pclamp8	(Axon Instruments, EUA)

CAPITULO III- OBJETIVOS

Vários estudos clínicos têm sugerido que os androgénios apresentam efeitos benéficos para o sistema cardiovascular. No nosso grupo de investigação já foi demonstrado que os androgénios têm um efeito vasodilatador em artérias humanas através da ativação de canais de potássio. Nestes estudos prévios também observamos que a testosterona provoca ativação da proteína cinase G (PKG) provavelmente devido à estimulação da pGC e que é a PKG a responsável pela estimulação dos canais BK_{Ca} e K_v . Torna-se assim importante demonstrar que o efeito da testosterona nestas células se deve ao aumento do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) perto da membrana plasmática e não ao aumento do cGMP induzido pelo óxido nítrico (NO) ou pela estimulação direta da PKG. O objetivo fulcral deste estudo foi analisar o mecanismo vasodilatador da testosterona através da ativação dos CNG ativados por cGMP e analisar um possível envolvimento das fosfodiesterases neste mecanismo.

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

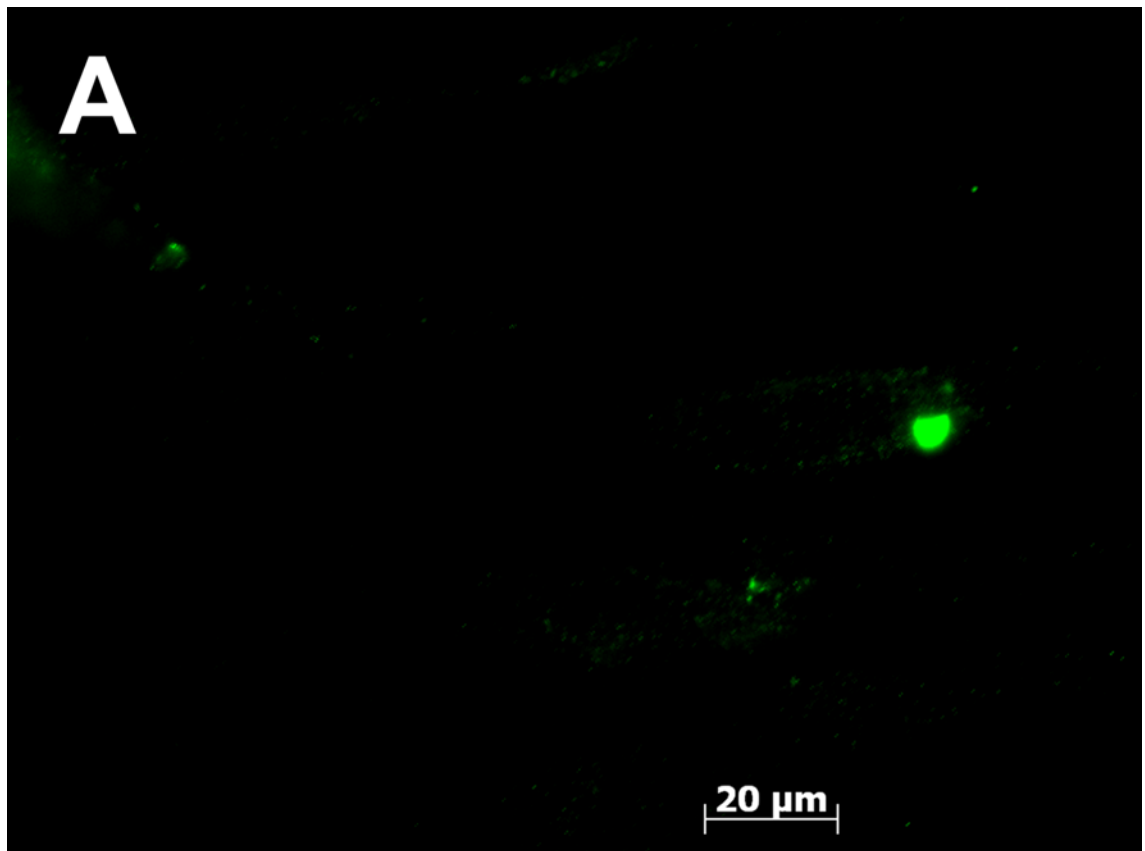
1. Isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana.
2. Extração e purificação do adenovírus (Ad-CNGA2).
3. Utilização de um sistema designado Patch Clamp na configuração whole cell.
4. Análise do efeito da testosterona e do ANP na corrente do CNG ativados por cGMP
5. Estudo da existência da compartimentação do cGMP e do seu possível mecanismo

CAPITULO IV- RESULTADOS

Todas as experiências foram realizadas com HUASMC infetadas com adenovírus CNGA2, com o objetivo de expressarem canais de CNG. Estes canais são importantes para a concretização deste estudo uma vez que oferecem uma informação confiável sobre o cGMP, porque os CNG são abertos diretamente com o cGMP.

4.1. Localização subsarcolemal dos canais CNGA2 recombinantes em HUASMC

A expressão do CNGA2 foi investigada por imunofluorescência em HUASMC após 36 h de cultura. Células nativas ou Ad-CNGA2 foram marcadas com anticorpo primário contra CNGA2 e visualizados com o anticorpo secundário conjugado fluoroforo (Alexa 488). A figura 18. Uma mostra imagens de células representativas Ad-CNGA2 infetados (B) ou não infetados (A). As células infetadas mostram um sinal fluorescente forte membrana plasmática. Estes resultados revelaram que as células estão infetadas com WT CNGA2 (Ad-CNGA2).



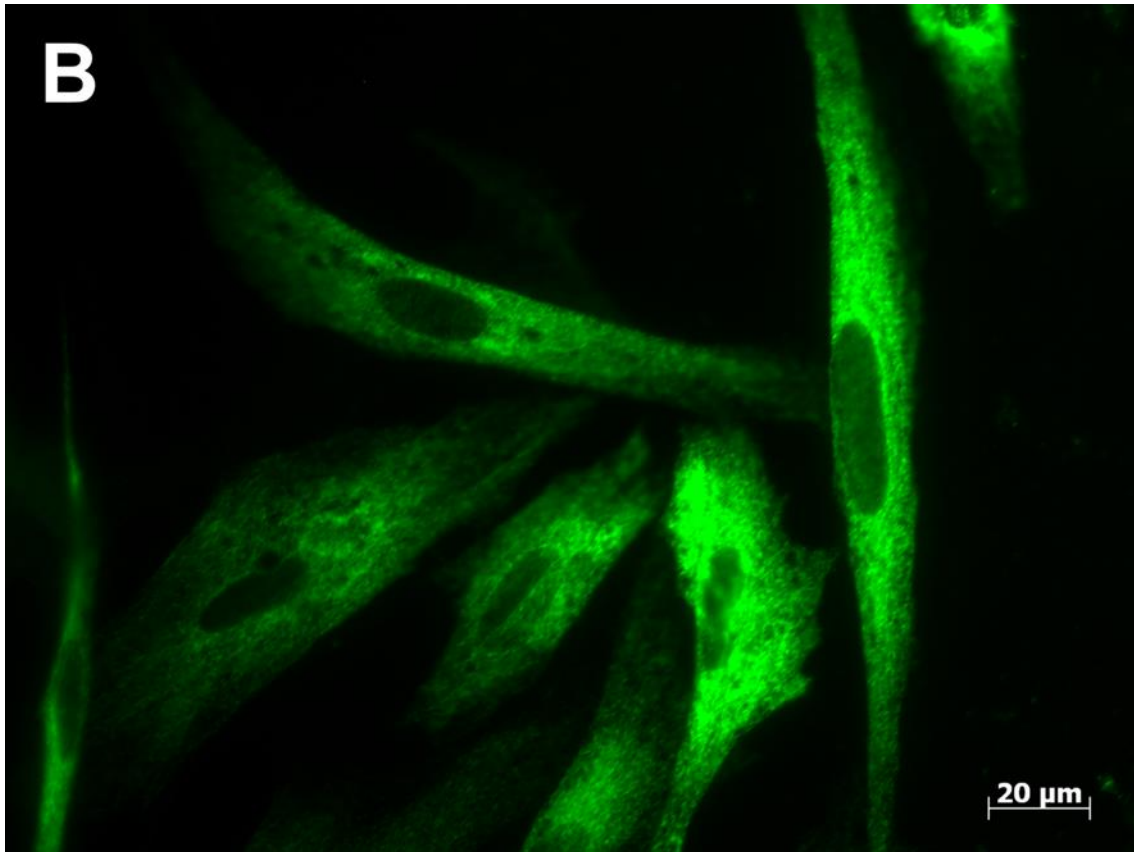


Figura 18. Detecção imunofluorescência dos canais de WT-CNGA2 recombinantes em HUASMC. As células de músculo liso foram infectadas com o adenovírus (Ad-CNGA2) (B) ou foram utilizadas como controle negativo (A) e marcadas com anticorpo anti-CNGA2 após 36h de cultura. As imagens foram produzidas utilizando um microscópio Zeiss AX10.

4.2. Expressão Funcional dos canais CNGA2 na HUASMC

A corrente de CNGA2 (I_{CNG}) foi registrada 36 horas após a infecção das células com o Ad-CNGA2. A Figura 19 mostra uma experiência típica em que o análogo do cGMP, Sp-8 (100 μ M) foi administrado e induziu um o efeito máximo sobre I_{CNG} em condições de basais. A aplicação deste análogo do cGMP provocou um efeito rápido e constante ao longo do tempo.

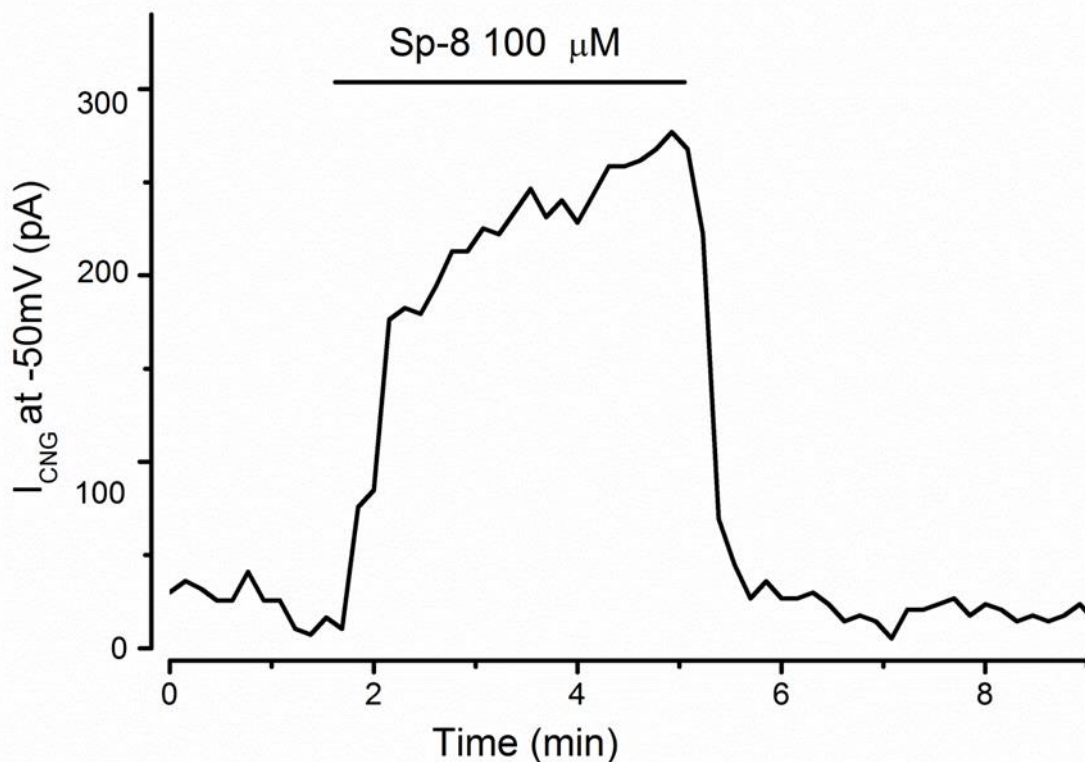


Figura 19. Efeito da aplicação do Sp-8 100 μ M a uma corrente de CNG. Registo original da corrente de CNG a -50mV, em células infectadas com o adenovirus (Ad-CNGA2).

4.3. Efeito dos ativadores da GC sobre a intensidade da corrente do canal de CNG (I_{CNG})

Primeiramente determinou-se se os canais de CNG respondiam a um aumento dos níveis intracelulares do cGMP. Para tal utilizou-se o SNP (ativador do sGC) e o ANP (ativador da pGC). Como mostra a figura 20, quer o SNP (10 e 100 μ M) quer o ANP (0,1 e 1 μ M) aumentam a I_{CNG} . Contudo estes efeitos são menores que o efeito provocado pelo Sp-8 100 μ M, um análogo do sinal natural da molécula cGMP, apesar de se verificar, apenas, diferença significativa entre o Sp-8 100 μ M e o SNP para ambas as concentrações analisadas ($P < 0,05$).

Estes resultados indicam que a corrente gerada pelo Sp-8 100 μ M corresponde à amplitude máxima da I_{CNG} que as HUASMC infetadas com adenovirus CNGA2 podem gerar.

Nas experiências seguintes apenas se utilizou o SNP com concentração de 100 μ M e o ANP com concentração de 0,1 μ M, pois foi com estas concentrações que se observaram um efeito maior.

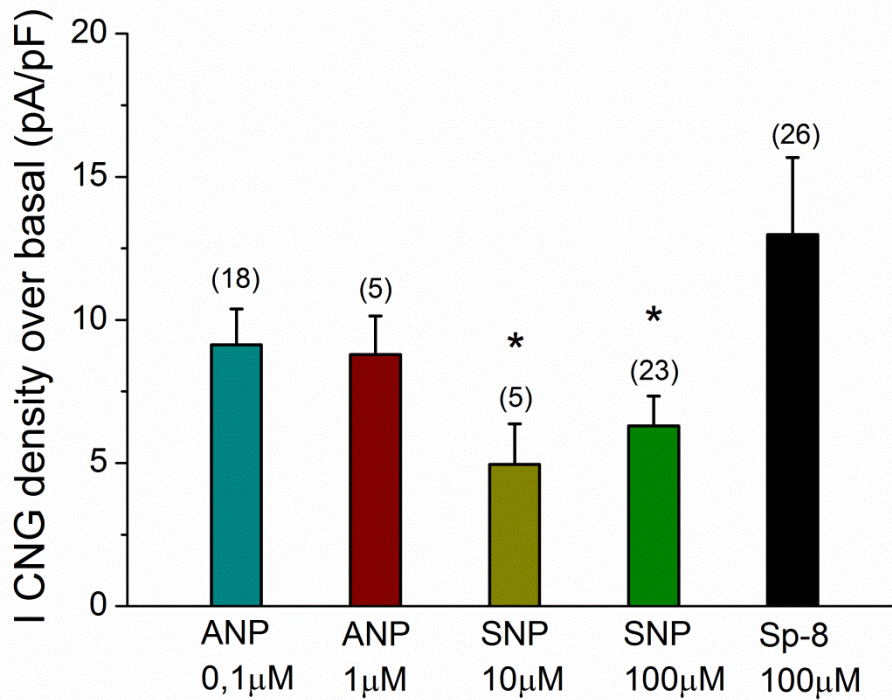


Figura 20. Efeito do cGMP na intensidade I_{CNG} . No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o erro padrão. * $P < 0,05$ versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet, teste.

4.4. Efeito dos inibidores das PDE sobre os CNG ativados pelo cGMP

Estudos anteriores em cardiomiocitos mostram que a atividade das PDE pode controlar a distribuição intracelular do cGMP. Neste sentido, o nosso objectivo foi demonstrar qual o efeito provocado pela inibição das PDE na compartimentação deste nucleótido cíclico a nível vascular. Para tal, utilizamos um inibidor não seletivo das PDE, o IBMX (3-Isobutil-1-metilxantina), o qual provocou um aumento da I_{CNG} . Quando se junta ANP 0,1µM ao IBMX 100µM ocorre uma diminuição da I_{CNG} , o que sugere que as PDE limitam os “pools” do cGMP junto a membrana. Por outro lado quando se adiciona o SNP 100µM ao inibidor não específico das PDE, é visível um aumento de resposta do SNP, como se observa na figura 21.

O efeito do IBMX 100µM e da mistura IBMX 100µM mais ANP 0,1µM são menores do que o efeito obtido para o Sp-8 100µM, contrariamente ao observado para o SNP mais IBMX.

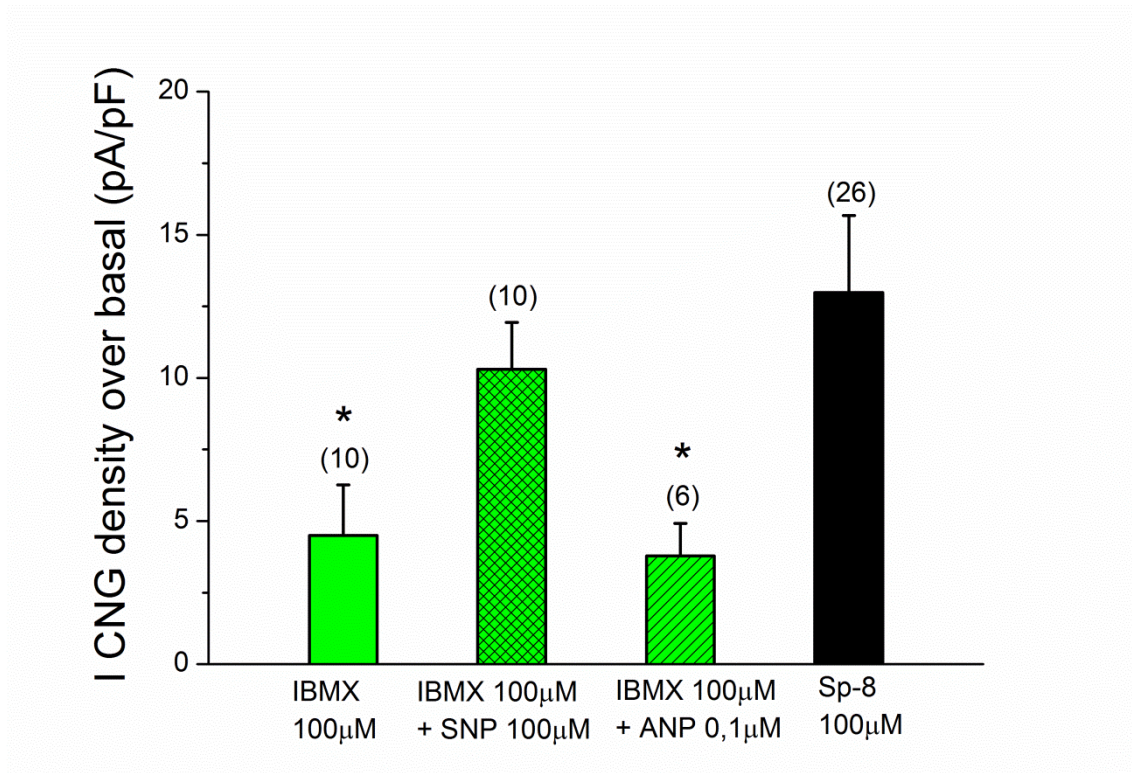


Figura 21. Efeito da inibição das fosfodiesterases no sinal do cGMP nos CNG. No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o erro padrão. * P <0,05 versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet.

4.5. Efeitos dos inibidores das PDE sobre os CNG ativados por cGMP, através da ativação da pGC e da sGCl

Resultados preliminares mostram que a atividade das PDE pode ser importante na distribuição intracelular do cGMP em HUASMS. Nas experiências que se seguem, fomos identificar quais os subtipos que podem estar envolvidos nesta compartimentação do cGMP. As principais isoformas que hidrolisam o cGMP, nas HUASMS, são a PDE3 e a PDE5, assim utilizou-se inibidores específicos, a ciloestamida (0,1µM) e o T0-156 (10µM) respetivamente. Como já foi mostrado anteriormente o ANP (0,1µM) e o SNP (100µM) aumentando a I_{CNG} (figura 20). Contudo, quando se utilizou a ciloestamida 1µM e o T0 10µM observa-se apenas um pequeno aumento do I_{CNG} (Fig.22), sendo este aumento muito inferior (P<0,05) ao efeito provocado pelo Sp-8 100µM.

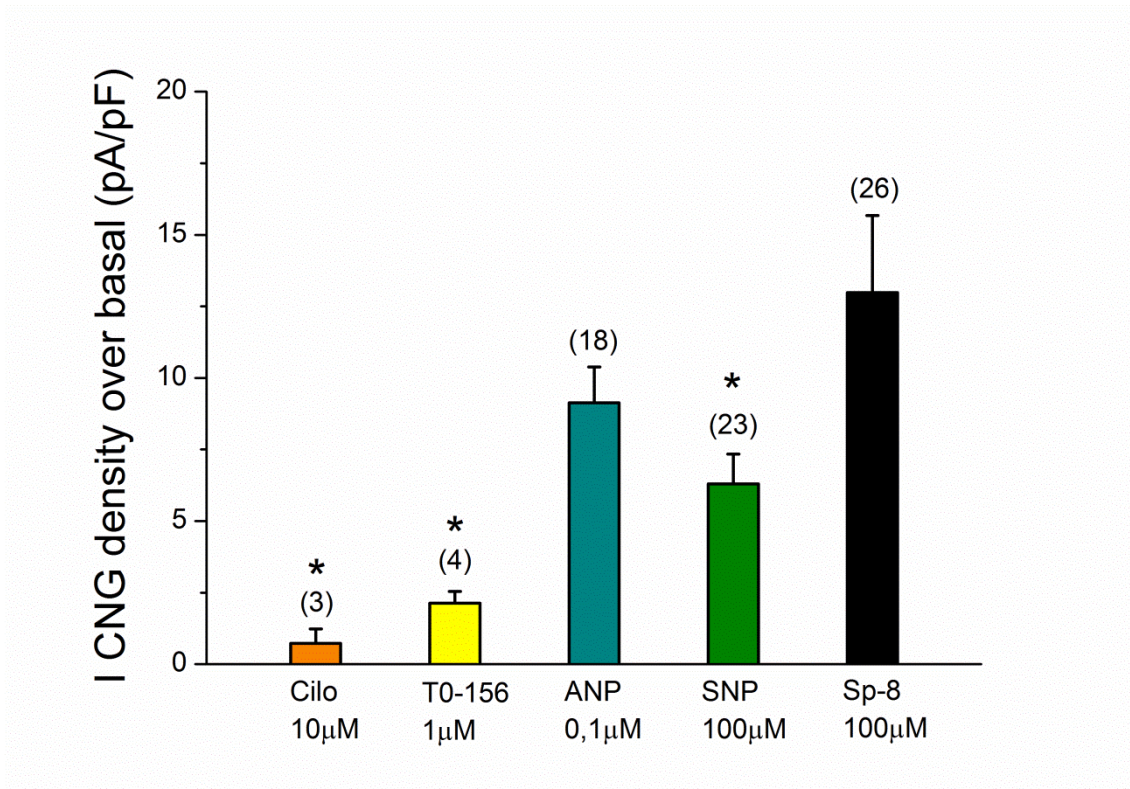


Figura 22. Papel dos subtipos das PDE no sinal do cGMP induzido pela pGC e pela sGC. No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o erro padrão. * P < 0,05 versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet, teste Tukey.

O SNP é um dador do NO, que ativa sGC e por sua vez estimula a produção de cGMP. Deste modo, fomos saber qual a contribuição da PDE3 para o controlo dos níveis intracelulares do cGMP quando induzido pela sGC. Na figura 23 podemos observar que quando se adicionou a ciloestamida (0,1 e 1 µM) ao SNP 100µM ocorreu um decréscimo significativo (P < 0,05) em comparação com o SNP isolado, o que não se verifica quando se adicionou SNP 100µM juntamente com ciloestamida 10µM pois houve um aumento da I_{CNG} , apesar não haver diferenças significativas (P > 0,05).

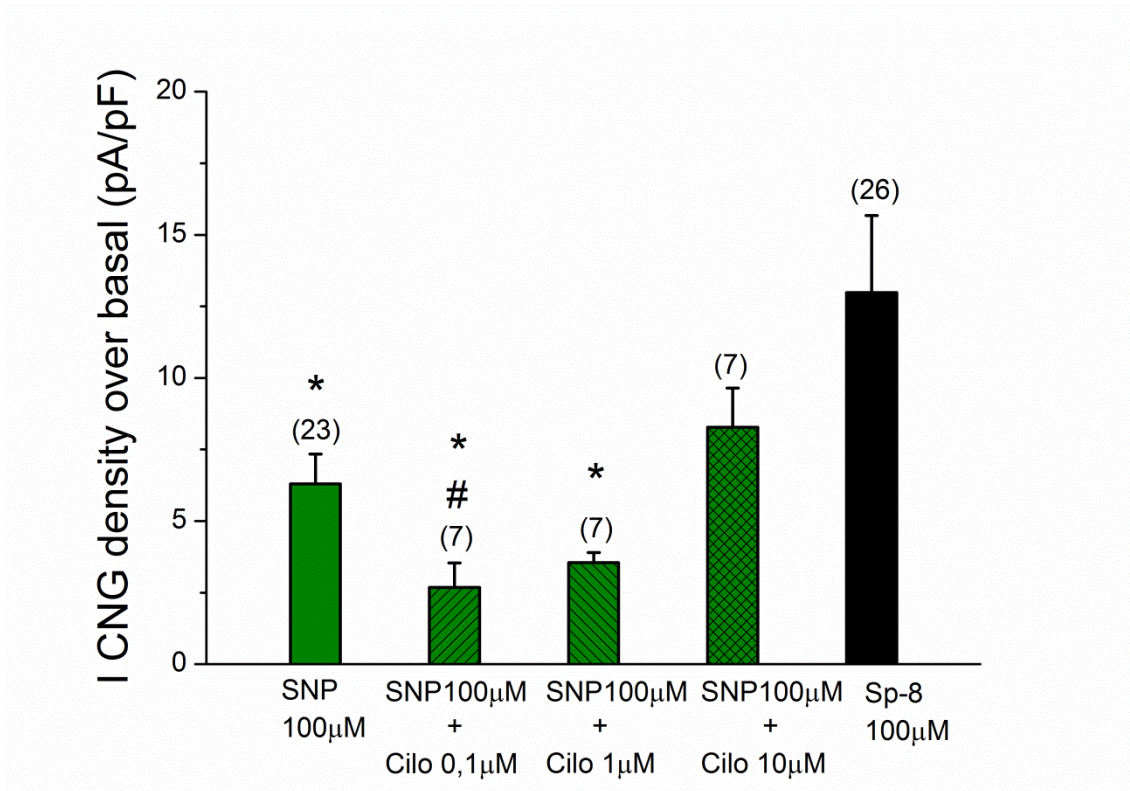


Figura 23. Papel da fosfodiesterase tipo 3 no sinal do cGMP gerado pela sGC. No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o desvio padrão. * P <0,05 versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet. # P <0,05 versus o efeito do SNP 100µM, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet.

O ANP é um ativador direto da pGC, que induz a produção do cGMP junto a membrana plasmática. Neste caso, analisou-se qual seria o papel da PDE3 no controlo do cGMP quando provocado pela pGC. Como se observa na figura 24 o ANP induz um aumento claro da I_{CNG} , contudo quando se adiciona a ciloestamida (0,1, 1 e 10µM) esse aumento diminui significativamente ($P < 0,05$). O que pode sugerir que a PDE3 também está envolvida na difusão do cGMP mas neste caso mais junto a membrana da célula, uma vez que aqui o aumento do cGMP é induzido pela pGC.

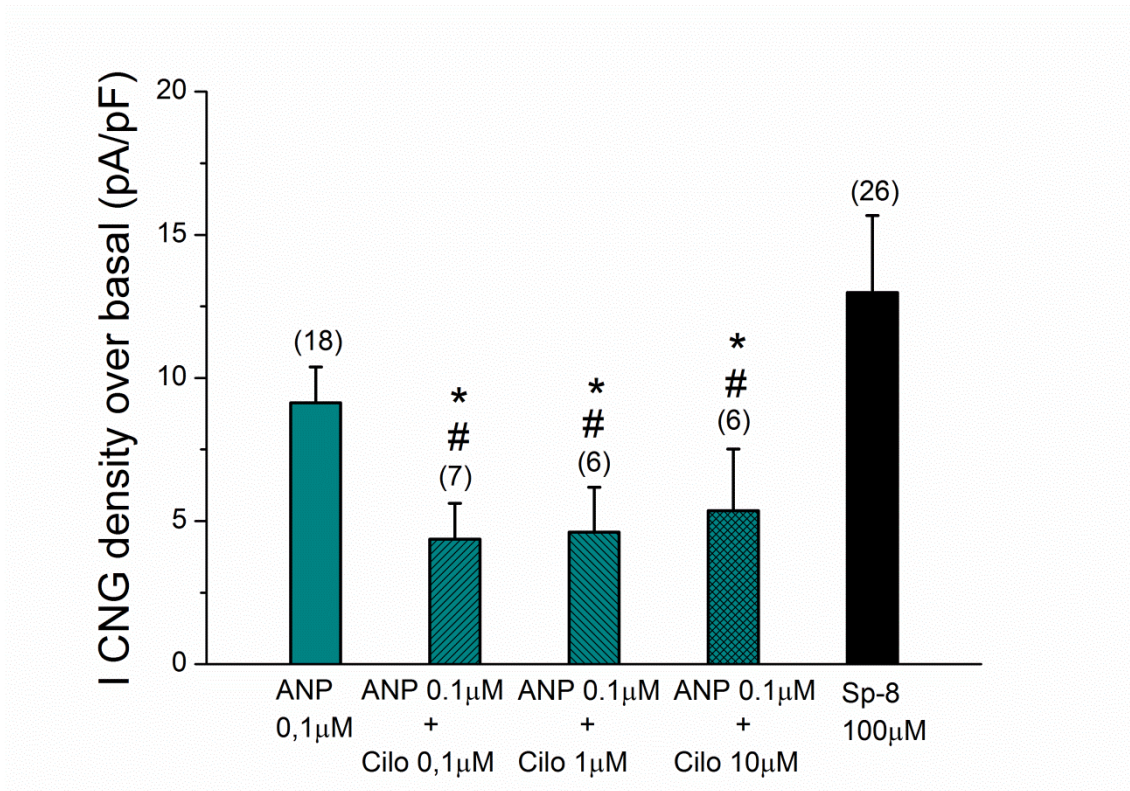


Figura 24. Papel da PDE3 no sinal do cGMP gerado pela guanilato ciclase membranar. . No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o desvio padrão. * P <0,05 versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet # P <0,05 versus o efeito do ANP 0.1µM, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet.

Para analisar o efeito da PDE5 na regulação do cGMP utilizou-se o SNP em simultâneo com o T0 (0,01, 0,1 e 1 µM) e observou-se que o efeito provocado diminui ligeiramente em comparação com o do SNP isolado, como é visível na figura 25. Sugerindo assim, que a inibição da PDE5 leva a uma dispersão do cGMP. O efeito do inibidor da PDE5 (T0-156) e pelo SNP é inferior ao provocado pelo Sp-8 (P<0,05).

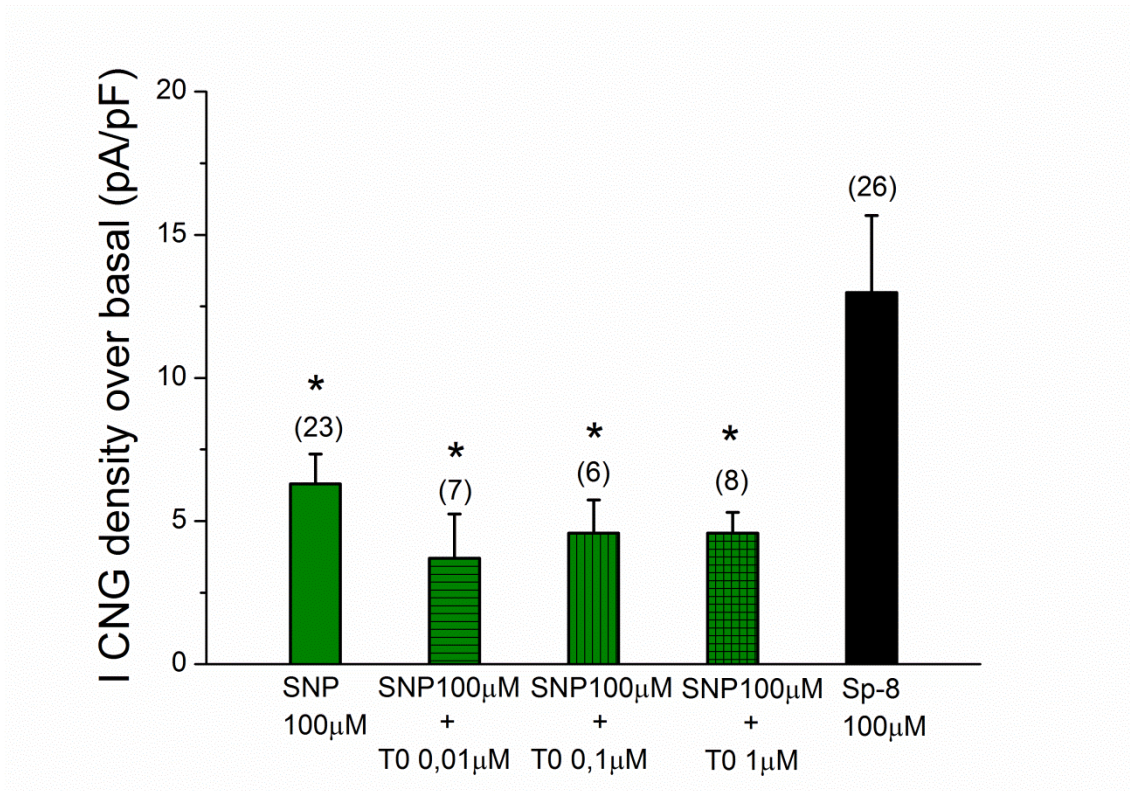


Figura 25. Papel da PDE5 no sinal do cGMP estimulado pela sGC. No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o desvio padrão. * $P < 0,05$ versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnett

Em relação ao efeito do ANP 0,1µM e do inibidor da PDE5, TO 0,01µM, como mostra a figura 26 este efeito diminui quando se junta ao ANP 0,1µM o inibidor específico da PDE5, sendo essa diminuição significativa, para a concentração de TO menor. Por outro lado quando se adiciona as concentrações superiores de TO (0,1 e 1µM) observa-se um pequeno aumento, contudo estas alterações não apresentam diferenças significativas em relação ao efeito provocado pelo ANP 0,1µM isolado ($P > 0,05$).

Sugerindo, também que a inibição da PDE5 provoca uma pequena dispersão do cGMP junto à membrana. Neste gráfico também é possível observar que não existem diferenças significativas entre o análogo do cGMP (Sp-8 100µM) e as várias concentrações do inibidor da PDE5 e o ANP ($P > 0,05$).

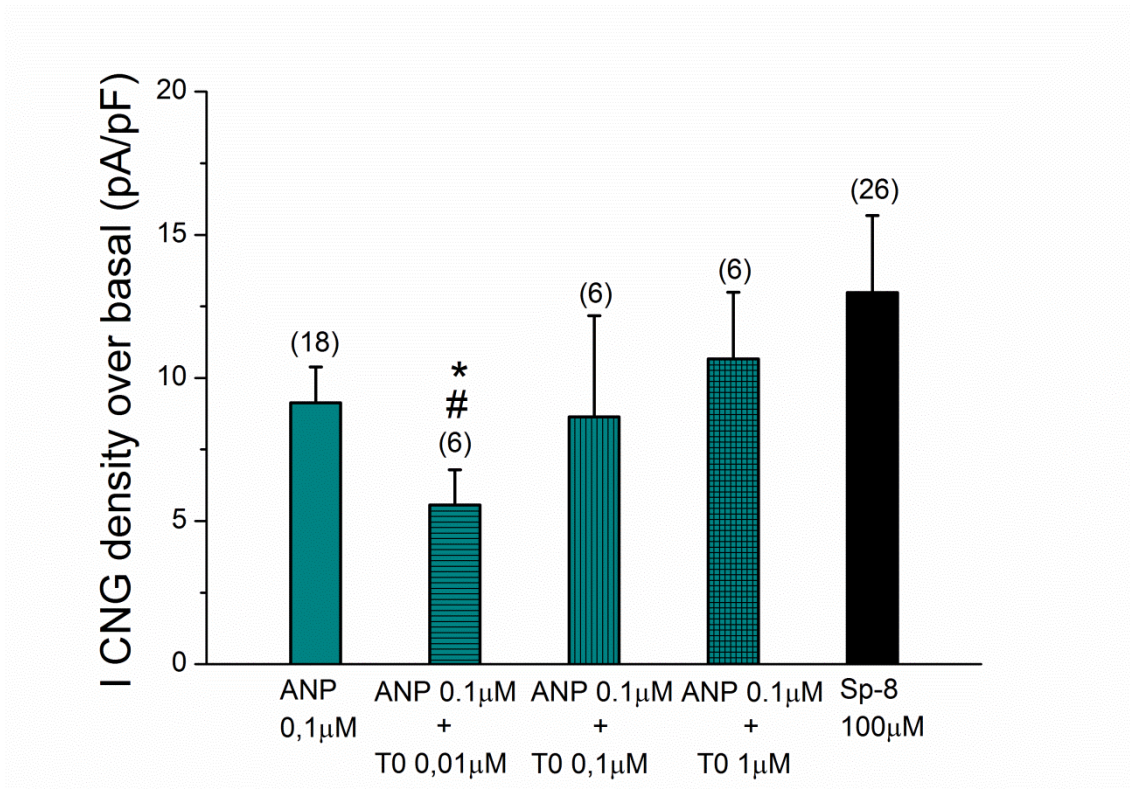


Figura 26. Papel da PDE5 no sinal do cGMP estimulado pela pGC. No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o desvio padrão. * P <0,05 versus o efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet # P <0,05 versus o efeito do ANP 0.1µM, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet.

4.6. Efeito da testosterona na corrente do CNG (I_{CNG})

A corrente do canal CNG foi também medida após administração de diferentes concentrações de testosterona (0,1, 1 e 10µM). A figura 27 mostra que a testosterona aumenta a atividade do canal ativado por cGMP.

A testosterona induz uma maior ativação da corrente, quando a sua concentração é mais elevada, sendo esta ativação dependente da concentração da testosterona. No entanto, também se pode observar que o Sp-8 µM induziu uma resposta superior do que a observada para a concentração máxima de testosterona.

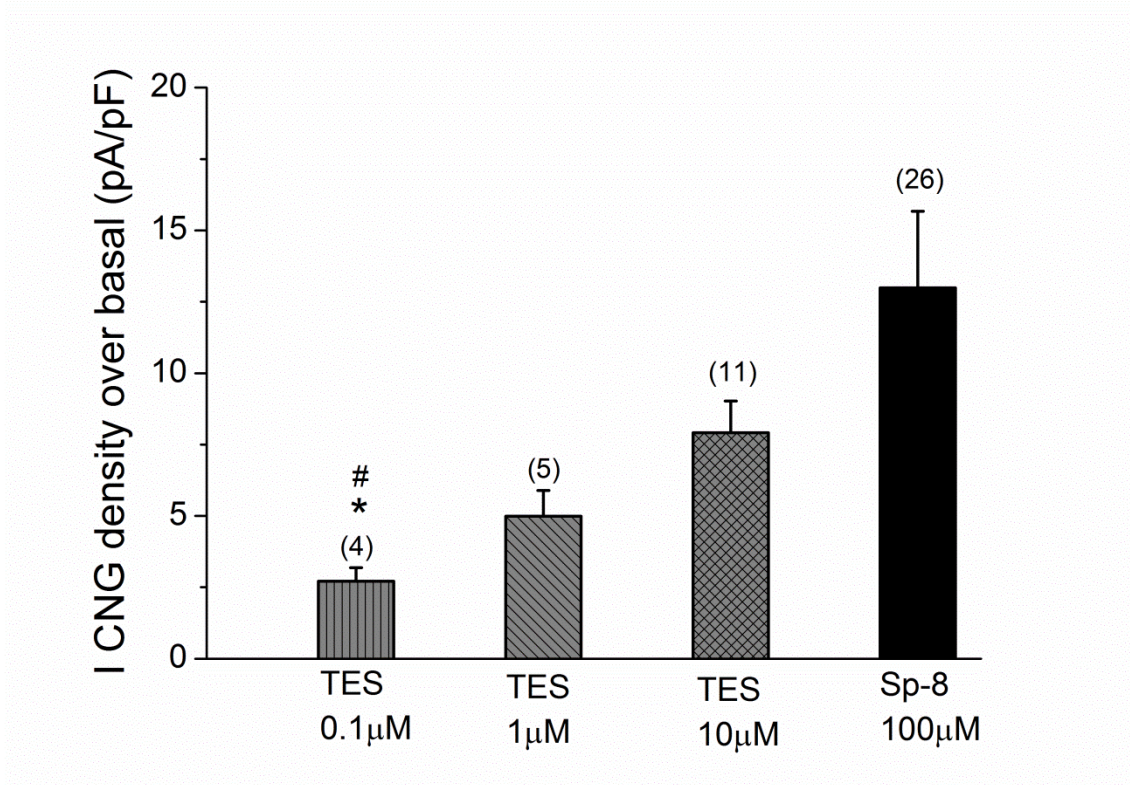


Figura 27 Efeito da testosterona nos canais de CNG. A ativação dos CNG pelo cGMP foi conseguida pela testosterona (0,1,1 e 10µM). No final a célula foi estimulada com Sp-8 100µM, como um controlo interno para o WT CNGA2. As barras representam a média e as linhas o desvio padrão. $P < 0,05$ versus ao efeito do Sp-8, one-way ANOVA seguido por um teste post hoc de Dunnet. # $P < 0,05$ versus, ao efeito da testosterona

CAPITULO V- DISCUSSÃO

Isolamento e cultura de células do músculo liso vascular da artéria umbilical humana (HUASMC)

O cordão umbilical humano é uma excelente amostra para a obtenção de células musculares lisas humanas, as quais irão possibilitar o estudo de diferentes mecanismos celulares e das suas funções. Neste trabalho experimental, a dissecação do cordão umbilical e cultura do mesmo foi realizado segundo um protocolo descrito por Martin et al. e por Cairrão et al. [216, 217], como já foi descrito anteriormente no capítulo II. Um dos obstáculos para a obtenção de culturas puras destas células é a presença de células endoteliais, na túnica íntima, e de fibroblastos, na túnica adventícia. Como já foi visto por alguns autores em experiências realizadas com artérias umbilicais humanas [219] ou artérias placentárias humanas [220], a não remoção da túnica íntima aumentou a possibilidade de contaminação das culturas de SMC vasculares com células endoteliais. Assim, para evitar a contaminação com este tipo de células, durante o estudo, procedemos à remoção mecânica do endotélio

Um problema central das células musculares lisas em cultura foca-se em estas poderem desenvolver fenótipo contrátil ou sintético, os quais estão associados e são caracterizados por alterações morfológicas, proliferativas e na expressão de diferentes proteínas [181]. As SMC vasculares maduras e completamente diferenciadas exibem uma atividade proliferativa e sintética extremamente baixa, estando altamente especializadas na função contrátil. Estas células expressam um padrão específico de proteínas relacionadas com a regulação da contratilidade, como por exemplo canais do tipo L [221]. Desde modo, uma das principais preocupações deste trabalho foi demonstrar a presença do fenótipo contrátil nas células das culturas de HUASMC. De acordo com Cairrão et al. (2009) demonstraram que quando a cultura está em confluência plena e após 24 horas em meio sem soro, estas células apresentam o fenótipo contrátil [217].

Em suma, e de acordo com os procedimentos feitos ao longo deste trabalho as HUASMC, sem contaminações de células endoteliais e/ou de fibroblastos, apresentaram um fenótipo contrátil. Estas células foram posteriormente utilizadas para alcançar os objetivos seguintes deste estudo.

Quais os mecanismos subjacentes a compartimentação dos sinais do cGMP?

Novas metodologias têm vindo a ser desenvolvidas para detetar e definir as mudanças espaciais e temporais de cAMP e cGMP intracelular em células vivas. Um desses novos métodos é baseado na utilização de canais de CNGA2. Estes canais são formados por tetrâmeros que estão fechados na ausência de cGMP. Quando o cGMP aumenta no lado

citoplasmático da membrana sarcolema, o canal abre e uma corrente iônica passa através dele. Esta corrente é detetada através da técnica patch-clamp [222]. Os CNG não são dependentes de voltagem. Estes canais são regulados pelo complexo Ca^{2+}/CaM o que diminui a sensibilidade ao cGMP [85], contudo nas nossas condições experimentais, é improvável que o Ca^{2+} desempenhe algum papel, porque os íons de cálcio são omissos quer na solução externa quer na interna, utilizadas em patch clamp.

Os canais CNG usados neste estudo são normalmente expressos em neurónios sensoriais e fotorreceptores. Contudo, os nossos resultados de imunofluorescência em HUASMC revelam que após 36 h de as células terem sido infetadas com o WT CNGA2 (Ad-CNGA2), as nossas células expressavam os canais de CNG. Assim, este resultado indica-nos que as células musculares lisas expressam CNG depois de 36h de infeção, além disso observamos que estes canais estão distribuídos de forma homogénea ao longo da membrana plasmática das HUASMC. Para determinar se estes canais eram funcionais, a procedemos à medição da corrente do CNG (I_{CNG}) utilizando a configuração whole cell do patch clamp, no qual testamos as HUASMC infetadas com o Ad-CNGA2 com o Sp-8 100 μ M, um análogo ao cGMP. Segundo Rich et al. os canais WT- CNGA2 respondem a alterações da concentração de cGMP apresentando um limiar de deteção de 0,1 0,5 μ mol/L, um $K_{1/2}$ de 1,4 μ mol/L, e uma amplitude máxima de 5 - 10 μ mol/L de cGMP [223]. Neste sentido, a corrente de CNG no final de cada experiência foi saturada como uma concentração de 100 μ mol/L do análogo de cGMP (Sp-8), para avaliar a atividade máxima do canal de CNG, tomando sempre este efeito como um controlo interno em todas as nossas experiências.

Castro et al. (2006) mostraram que existe uma compartimentação em miócitos cardíacos adultos intactos [142]. A nível de HUASMC a compartimentação ainda não foi estudada. Neste contexto, este trabalho fornece a primeira evidência direta para compartimentação do cGMP intracelular em HUASMC. Neste sentido tornou-se fundamental o estudo do efeito da ativação dos dois tipos de GC (solúvel e membranar) na I_{CNG} , Para esta análise as HUASMC infetadas com o Ad-CNGA2 foram testadas com SNP (10 e 100 μ M) e ANP (0.1 e 1 μ M). Os resultados mostram que a ativação da sGC pelo dador do óxido nítrico, o SNP aumenta a I_{CNG} , assim como a ativação da pGC pelo ANP também aumentou a I_{CNG} , contudo o efeito provocada pelo ANP é superior ao efeito provocado pelo SNP. Estes resultados sugerem que a ativação da pGC pelo ANP leva a um aumento do cGMP junto a membrana plasmática, enquanto que, a ativação da sGC induz um aumento do cGMP mais no interior das células. A diferença entre o ANP e o SNP pode resultar de concentrações distintas do cGMP produzidas quer pelo sGC ou pela pGC, isto é concentração do nível de cGMP no citosol é diferente da concentração do cGMP junto á membrana. Assim o NO induz um aumento global do cGMP enquanto que o ANP induz um sinal de cGMP restrito junto á membrana, desde modo leva-nos a concluir que o cGMP é produzido em compartimentos distintos, e a sua sinalização celular varia com a sua localização celular. Contudo, estudos feitos com outro tipo de células,

nomeadamente em cardiomiocitos, e usando a mesma abordagem (canais de CNG) demonstram que apenas o ANP (e não o SNP) ativa os canais de CNG [142].

Existem actualmente várias hipóteses para explicar a compartimentação celular. Neste sentido, alguns autores sugerem que este fenómeno se deve a uma barreira física formada por elementos do reticulo endoplasmático, localizados perto da membrana plasmática. Outros autores sugerem que este fenómeno depende da localização de diversos elementos relacionados com as vias de transdução do sinal dos nucleótidos cíclicos. Mais recentemente, foi também proposto que as fosfodiesterases (PDE) poderiam ser responsáveis pela existência de diferentes concentrações de cAMP e/ou cGMP em distintos locais citosólicos [47, 142, 152]

O passo seguinte deste estudo foi analisar o efeito da inibição das PDE na distribuição do cGMP, para tal as HUASMC, sempre infetadas, foram sujeitas a um inibidor não seletivo de PDE, o IBMX 100 μ M. Os nossos resultados indicam que a distribuição homogénea do cGMP é impedida pela atividade da PDE, porque quando bloqueamos a atividade da PDE com o IBMX a I_{CNG} diminui. Contudo, o IBMX também foi testado juntamente com o SNP 100 μ M e com ANP 0.1 μ M, e quando se comparou o efeito do IBMX com os resultados obtidos do IBMX juntamente com o SNP e do IBMX com o ANP, observou-se um aumento da I_{CNG} com o IBMX mais o SNP e uma pequena diminuição da I_{CNG} com o IBMX mais ANP, o que nos leva a concluir que o cGMP concentrado junto a membrana plasmática está sob o controlo de uma PDE específica e que o cGMP concentrado no citosol é controlado por outra PDE específica. Podemos então concluir que a compartimentação é abolida e o cGMP fica difuso de forma livre dentro da célula. Este efeito do IBMX esta de acordo com resultados prévios obtidos em estudos com células do fígado embrionário humano (HEK-NPRA) como descreveu Piggott et al. [152] e em cardiomiocitos como descreveu Castro et al. [142].

No decorrer deste trabalho, houve a necessidade de saber quais as PDE que podiam estar envolvidas no controlo da compartimentação do cGMP nas HUASMC. Em 2008 Santos.Silva et al. conclui que as PDE que são expressas no músculo liso são as PDE1, PDE3, PDE4 e PDE5 [21], contudo aquelas que hidrolisam o cGMP são as PDE3 e PDE5 [5]. De acordo com estes dados, fomos testar as células infetadas com o Ad-CNGA2 com um inibidor específico da PDE3, a ciloestamida 10 μ M, e com um inibidor específico da PDE5, o T0-156 1 μ M e o que se observou foi que houve uma ativação dos CNG contudo este efeito foi menor em relação ao observado para o SNP 100 μ M, para o ANP 0,1 μ M e para o Sp-8 100 μ M. Para um estudo mais aprofundado sobre a informação anteriormente descrita, o passo seguinte foi descobrir qual o papel específico quer da PDE3 quer da PDE5.

Então em separado fomos estudar o efeito do SNP 100 μ M com a ciloestamida (inibidor da PDE3) a diferentes concentrações 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M e o efeito do ANP 0,1 μ M com o mesmo inibidor e com as mesmas concentrações. E o que observamos foi que o efeito do SNP 100 μ M diminui quando se junta ao da ciloestamida, contudo com ciloestamida a 10 μ M esse

efeito aumenta mas sem diferença significativa. Neste sentido, concluímos que quando inibimos a PDE3 ocorre uma dispersão do cGMP dentro da célula, isto é, a PDE3 controla o sinal de cGMP gerado pela sGC, controla a concentração do cGMP no citosol da HUASMS. No que diz respeito ao efeito do ANP 0,1 μ M também diminui quando se adiciona a ciloestamida 0,1, 1 e 10 μ M ao ANP 0,1 μ M, esta diminuição é semelhante para as concentrações utilizadas da ciloestamida e o efeito do inibidor é significativamente diferente do efeito do ANP 0,1 μ M, o que nos leva a concluir que a PDE3 controla também o cGMP gerado pela pGC.

Em relação ao papel da PDE5 na compartimentação do cGMP nestas células, a estratégia utilizada foi igual aquela usada para a PDE3, mas em vez de utilizarmos a ciloestamida, utilizamos o T0-156 também com diferentes concentrações 0,01 μ M, 0,1 μ M e 1 μ M, que como já foi dito é um inibidor específico da PDE5.

Analisando os dados obtidos observamos que o efeito do SNP 100 μ M diminui quando se adicionou o T0-156 e a diminuição foi semelhante para todas as concentrações usadas, levando a concluir que a PDE5 também regula o sinal do cGMP. Contudo quando comparamos o efeito dos dois inibidores com o efeito do SNP 100 μ M, observamos que a administração do SNP pode criar dois efeitos separados, um mais localizado junto a membrana plasmática que é controlado pela PDE3 e pela PDE5, e o outro efeito mais localizado no interior das células que é regulado apenas pela PDE 3.

Em relação ao efeito do ANP 0,1 μ M observamos uma diminuição do seu efeito quando se adiciona a este o inibidor específico da PDE5 (T0-156), sendo essa diminuição significativa para a concentração menor de T0 (0,01 μ M). Em contrapartida, quando se adiciona o T0 com concentrações de 0,1 μ M e 1 μ M observa-se um pequeno aumento. Sugerindo assim que a inibição da PDE5 provoca um pequena dispersão do cGMP junto á membrana. Estes resultados estar de acordo com os obtidos anteriormente por Cawley et al. (2007) [153] em SMC de aorta de rato, observaram que os dadores de NO provocavam aumentos transitórios da concentração de GMP, que dependem da Atividade da sGC e da PDE5. Nausch et al. (2008) [154] observaram a existência de compartimentos subcelulares de cGMP em SMC de aorta de rato. Estes autores sugeriram que a PDE5 regula diferencialmente os efeitos dos dadores de NO e dos NP

Os nossos resultados permitiram prever um modelo para a compartimentação do cGMP nas HUASMC (figura 28).

Como mostra a figura 28 estes dados sugerem que o “pool” do cGMP induzido pelo ANP, isto é, induzido pela pGC parece ser controlado pela PDE 3 e pela PDE5 junto à membrana. Estes resultados são similares aos obtidos em cardiomiocitos, contudo nestas células as PDE que controlam a compartimentação do cGMP são as PDE 2 e a PDE5, em que a PDE2 controla o cGMP induzido pela pGC e a PDE5 controla o cGMP estimulado pela sGC. [142].

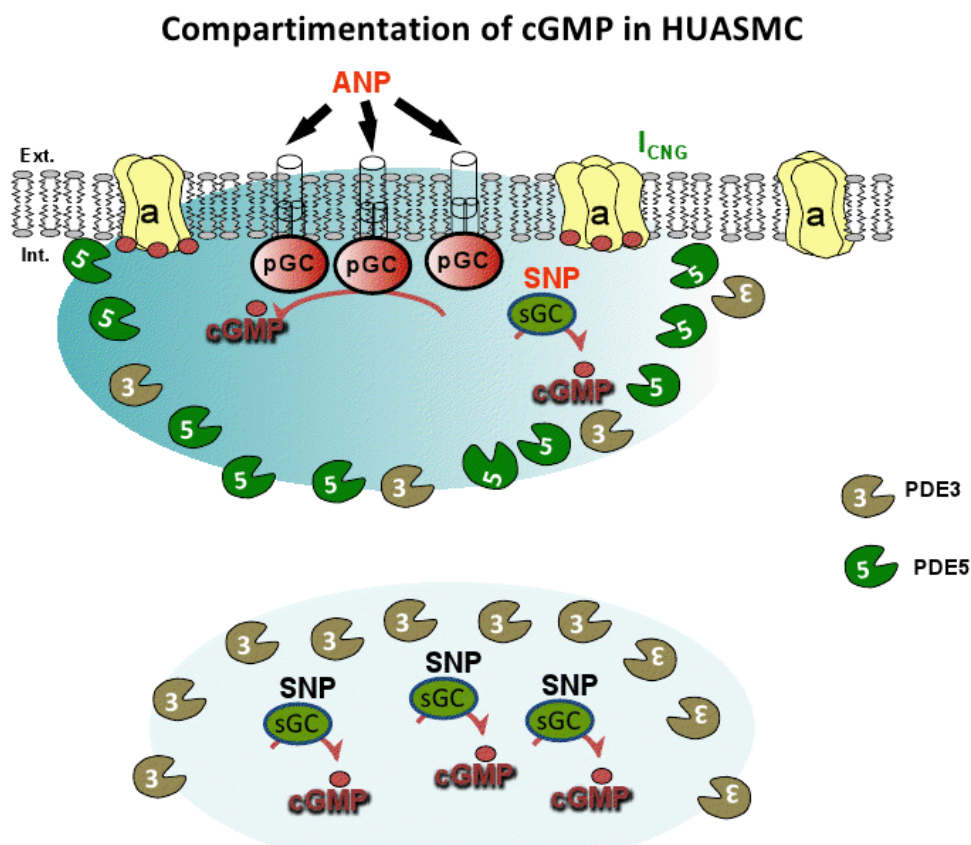


Figura 28. Representação esquemática da regulação dos sinais de cGMP pelas PDE.

Mecanismo vasodilatador da testosterona

O nosso estudo revela pela primeira vez que o efeito rápido da testosterona aumenta o cGMP, e este efeito é semelhante ao observado com o péptido natriurético. Neste sentido a relaxação não genómica induzida pela testosterona é mediada pelo cGMP/PKG que estimula os canais BK_{Ca} e K_V .

Os dadores do NO e o ANP são potentes vasodilatadores que atuam aumentando o cGMP intracelular resultando na ativação da PKG. Contudo, vários estudos usando VSMC observam que a “cross-activation” resulta na ativação da PKG pelo cAMP, e vários autores ligam esta via para a ativação de canais de potássio [211, 212]. Além disso, Airhart et al. (2003) mostrou que a PKG pode interagir diretamente com o ANP ligando a recetores tipo I (NPRA) e para que esta ativação possa ocorrer a PKG precisa se deslocar para a proximidade da membrana plasmática, sendo a ativação da PKG independente do aumento do cAMP ou cGMP.

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de investigação indicam que a testosterona induz vasorelaxação mediada pela ativação da PKG que activa os canais BK_{Ca} e K_V em HUASMC [193]. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a testosterona ativa

os canais de CNG que são sensíveis ao cGMP. A estimulação destes canais pela testosterona é similar á estimulação provocada pelo ANP. Estes resultados parecem estar de acordo com os resultados prévios que indicam que a testosterona tem um efeito similar que a ativação da pGC pelo ANP 1 μ M, e ativa a PKG provocando a abertura dos canais BKCa e KV. [193].Este estudo permitiu-nos confirmar que o ANP e a testosterona atuam por uma via semelhante para induzir o aumento da cGMP e vasorelaxação.

Assim, o nosso estudo demonstra que os efeitos rápidos da testosterona nas HUASMC são devido a ativação da pGC, e ao aumento do cGMP na membrana sarcolemal.

CAPITULO VI- CONCLUSÃO

Este estudo analisa pela primeira vez a dinâmica espaço-temporal do cGMP intracelular em HUASMC. E contribui para um conhecimento mais profundo sobre a compartimentação do cGMP nas HUASMC. Assim, foi demonstrado pela primeira vez que:

- A regulação e a síntese do cGMP são compartimentadas nas HUASMC, e que esta compartimentação do cGMP é diferente da compartimentação demonstrada em miócitos cardíacos;
- O ANP e o SNP ativam os canais de CNG;
- A compartimentação do cGMP é controlada por PDE específicas, em particular pela PDE3 e PDE2;
- A testosterona age através do aumento do cGMP que induz a ativação da PKG;

CAPITULO VII- BIBLIOGRAFIA

1. Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425, 200-5.
2. Becirovic E. (2010) Role of the CNGB1a Subunit of the Rod Cyclic Nucleotide-Gated Channel in Channel Gating and Pathogenesis of Retinitis Pigmentosa. *Vol. Doutor*, pp 65. Munchen, Alemanha.
3. Lidel. (2007) *Anatomia Humana do Coração e Vasos*.
4. Arner A, Pfitzer G. (1999) Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 63-146.
5. Lugnier C. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 109, 366-98.
6. Skalhegg BS, Tasken K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, 5, D678-93.
7. Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene*, 269, 13-25.
8. Guarner J, Southwick K, Greer P, Bartlett J, Santander A, Blanco S, Pope V, Levine W, Zaki S. (2000) Testing umbilical cords for funisitis due to *Treponema pallidum* infection, Bolivia. *Emerg Infect Dis*, 6, 487-92.
9. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, 27, 47-72.
10. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. (2001) Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 96, 150-7.
11. Benirschke K. (1998) Remarkable placenta. *Clin Anat*, 11, 194-205.
12. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. (1997) Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*, 18, 53-64.
13. Keith L. Moure TVNP, Kohei Shiuta. (2000) *Color Atlas of Clinical Embriology*, Philadelphia, USA.
14. Vanhoutte PM. (1989) Endothelium and control of vascular function. *State of the Art lecture. Hypertension*, 13, 658-67.
15. Meyer WW, Rumpelt HJ, Yao AC, Lind J. (1978) Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *Eur J Pediatr*, 128, 247-59.
16. Gabella G. (1997) Morphology of smooth muscle. In: *Cellular aspects of smooth muscle function* (eds. CY Kao, ME Carsten), pp 1-47. Cambridge University Press, Cambridge.
17. Overbach AM, Daniel SJ, Cassady G. (1970) The value of umbilical cord histology in the management of potential perinatal infection. *J Pediatr*, 76, 22-31.
18. Altshuler G, Tsang RC, Ermocilla R. (1975) Single umbilical artery. Correlation of clinical status and umbilical cord histology. *Am J Dis Child*, 129, 697-700.
19. Editora P. (2002) *Terra, Universo da Vida*, 2ª parte. In: *Biologia 12º ano*, pp 607, Porto.
20. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. (2008) Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 376, 375-83.

21. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Morgado M, Alvarez E, Verde I. (2008) PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol*, 582, 102-9.
22. Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Ogun E. (2003) Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levocromakalim. *Life Sci*, 72, 1321-9.
23. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84, 767-801.
24. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*, 15, 100-8.
25. Hodgkinson JL. (2000) Actin and the smooth muscle regulatory proteins: a structural perspective. *J Muscle Res Cell Motil*, 21, 115-30.
26. Fatigati V, Murphy RA. (1984) Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem*, 259, 14383-8.
27. Gunst SJ. (1999) Applicability of the sliding filament/crossbridge paradigm to smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 7-61.
28. Morgan KG, Gangopadhyay SS. (2001) Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J Appl Physiol*, 91, 953-62.
29. Girjes AA, Keriakous D, Cockerill GW, Hayward IP, Campbell GR, Campbell JH. (2002) Cloning of a differentially expressed tropomyosin isoform from cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 505-15.
30. Wang CL, Chalovich JM, Graceffa P, Lu RC, Mabuchi K, Stafford WF. (1991) A long helix from the central region of smooth muscle caldesmon. *J Biol Chem*, 266, 13958-63.
31. Pauly RR, Bilato C, Cheng L, Monticone R, Crow MT. (1997) Vascular smooth muscle cell cultures. *Methods Cell Biol*, 52, 133-54.
32. Ueki N, Sobue K, Kanda K, Hada T, Higashino K. (1987) Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9049-53.
33. Takahashi K, Abe M, Hiwada K, Kokubu T. (1988) A novel troponin T-like protein (calponin) in vascular smooth muscle: interaction with tropomyosin paracrystals. *J Hypertens Suppl*, 6, S40-3.
34. Leinweber B, Parissenti AM, Gallant C, Gangopadhyay SS, Kirwan-Rhude A, Leavis PC, Morgan KG. (2000) Regulation of protein kinase C by the cytoskeletal protein calponin. *J Biol Chem*, 275, 40329-36.
35. Babij P, Periasamy M. (1989) Myosin heavy chain isoform diversity in smooth muscle is produced by differential RNA processing. *J Mol Biol*, 210, 673-9.
36. Helper DJ, Lash JA, Hathaway DR. (1988) Distribution of isoelectric variants of the 17,000-dalton myosin light chain in mammalian smooth muscle. *J Biol Chem*, 263, 15748-53.
37. Kawashima M, Nabeshima Y, Obinata T, Fujii-Kuriyama Y. (1987) A common myosin light chain is expressed in chicken embryonic skeletal, cardiac, and smooth muscles and in brain continuously from embryo to adult. *J Biol Chem*, 262, 14408-14.
38. Somlyo AP. (1993) Myosin isoforms in smooth muscle: how may they affect function and structure? *J Muscle Res Cell Motil*, 14, 557-63.
39. Small JV, Furst DO, De Mey J. (1986) Localization of filamin in smooth muscle. *J Cell Biol*, 102, 210-20.
40. Saimi Y, Kung C. (2002) Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol*, 64, 289-311.

41. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*, 76, 967-1003.
42. Isotani E, Zhi G, Lau KS, Huang J, Mizuno Y, Persechini A, Geguchadze R, Kamm KE, Stull JT. (2004) Real-time evaluation of myosin light chain kinase activation in smooth muscle tissues from a transgenic calmodulin-biosensor mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6279-84.
43. Gallagher PJ, Garcia JG, Herring BP. (1995) Expression of a novel myosin light chain kinase in embryonic tissues and cultured cells. *J Biol Chem*, 270, 29090-5.
44. Akata T. (2007) Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth*, 21, 232-42.
45. Somlyo AV, Khromov AS, Webb MR, Ferenczi MA, Trentham DR, He ZH, Sheng S, Shao Z, Somlyo AP. (2004) Smooth muscle myosin: regulation and properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 1921-30.
46. Cairrao E. (2009) Estudo do mecanismo vasodilatador da testosterona a nível arterial. Vol. Doutor, pp 196. Universidade da Beira Interior, Covilha.
47. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. (2012) Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci*, 69, 247-66.
48. Angus CJGaJA. (1996) *The Pharmacology of Vascular Smooth Muscle*.
49. Hanoune J, Defer N. (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 145-74.
50. Tesmer JJ, Sprang SR. (1998) The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol*, 8, 713-9.
51. Walsh DA, Van Patten SM. (1994) Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J*, 8, 1227-36.
52. Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, Anand GS. (2005) Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta*, 1754, 25-37.
53. Hardie DG. (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 144, 5179-83.
54. Beebe SJ. (1994) The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin Cancer Biol*, 5, 285-94.
55. Tasken K, Aandahl EM. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84, 137-67.
56. Skalhegg BS, Tasken K. (1997) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, 2, d331-42.
57. Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. (1963) Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun*, 11, 330-4.
58. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*, 184, 409-20.
59. Friebe A, Koesling D. (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*, 93, 96-105.
60. Koesling D, Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Friebe A. (2004) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int*, 45, 813-9.
61. Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling D. (1996) A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur J Biochem*, 240, 380-6.

62. Brandish PE, Buechler W, Marletta MA. (1998) Regeneration of the ferrous heme of soluble guanylate cyclase from the nitric oxide complex: acceleration by thiols and oxyhemoglobin. *Biochemistry*, 37, 16898-907.
63. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*, 62, 505-15.
64. Russwurm M, Koesling D. (2002) Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem*, 230, 159-64.
65. Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D. (2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest*, 116, 1731-7.
66. Shaul PW. (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*, 64, 749-74.
67. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Kosuge K, Aoi N, Izumi Y, Kanmatsuse K, Ozawa Y. (2002) Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene. *Endocrine*, 17, 85-90.
68. Suga S, Nakao K, Kishimoto I, Hosoda K, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Ogawa Y, Komatsu Y, Nakagawa O, et al. (1992) Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 71, 34-9.
69. Rehemudula D, Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Uwabo J, Sato M, Izumi Y, Kanmatsuse K, Ozawa Y. (1999) Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension. *Circ Res*, 84, 605-10.
70. Kuhn M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*, 93, 700-9.
71. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. (1999) The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7403-8.
72. Anand-Srivastava MB. (2005) Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides*, 26, 1044-59.
73. Rose RA, Giles WR. (2008) Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *J Physiol*, 586, 353-66.
74. Schulz S, Chinkers M, Garbers DL. (1989) The guanylate cyclase/receptor family of proteins. *FASEB J*, 3, 2026-35.
75. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, 86, 1-23.
76. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*, 91, 1421-30.
77. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 52, 375-414.
78. Geiselhoring A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, Schlossmann J. (2004) IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J*, 23, 4222-31.
79. Wollert KC, Fiedler B, Gambaryan S, Smolenski A, Heineke J, Butt E, Trautwein C, Lohmann SM, Drexler H. (2002) Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. *Hypertension*, 39, 87-92.

80. Hofmann F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 280, 1-4.
81. Feil R, Hofmann F. (2003) Alternative splicing of cGMP-dependent protein kinase I and nitrate tolerance. *Circ Res*, 93, e143.
82. Smith JA, Reed RB, Francis SH, Grimes K, Corbin JD. (2000) Distinguishing the roles of the two different cGMP-binding sites for modulating phosphorylation of exogenous substrate (heterophosphorylation) and autophosphorylation of cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 275, 154-8.
83. Francis SH, Corbin JD. (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol*, 56, 237-72.
84. Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*, 313, 310-3.
85. Kaupp UB, Seifert R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, 82, 769-824.
86. Zhong H, Molday LL, Molday RS, Yau KW. (2002) The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature*, 420, 193-8.
87. Zheng J, Trudeau MC, Zagotta WN. (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron*, 36, 891-6.
88. Weitz D, Ficek N, Kremmer E, Bauer PJ, Kaupp UB. (2002) Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron*, 36, 881-9.
89. Peng C, Rich ED, Varnum MD. (2004) Subunit configuration of heteromeric cone cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 42, 401-10.
90. Zheng J, Zagotta WN. (2004) Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 42, 411-21.
91. Matulef K, Zagotta WN. (2003) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 23-44.
92. Trudeau MC, Zagotta WN. (2002) An intersubunit interaction regulates trafficking of rod cyclic nucleotide-gated channels and is disrupted in an inherited form of blindness. *Neuron*, 34, 197-207.
93. Kizhatil K, Baker SA, Arshavsky VY, Bennett V. (2009) Ankyrin-G promotes cyclic nucleotide-gated channel transport to rod photoreceptor sensory cilia. *Science*, 323, 1614-7.
94. Su Y, Dostmann WR, Herberg FW, Durick K, Xuong NH, Ten Eyck L, Taylor SS, Varughese KI. (1995) Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science*, 269, 807-13.
95. Weber IT, Gilliland GL, Harman JG, Peterkofsky A. (1987) Crystal structure of a cyclic AMP-independent mutant of catabolite gene activator protein. *J Biol Chem*, 262, 5630-6.
96. Altenhofen W, Ludwig J, Eismann E, Kraus W, Bonigk W, Kaupp UB. (1991) Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9868-72.
97. Varnum MD, Black KD, Zagotta WN. (1995) Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 15, 619-25.
98. Waldeck C, Vocke K, Ungerer N, Frings S, Mohrlen F. (2009) Activation and desensitization of the olfactory cAMP-gated transduction channel: identification of functional modules. *J Gen Physiol*, 134, 397-408.
99. Ardell MD, Bedsole DL, Schoborg RV, Pittler SJ. (2000) Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene. *Gene*, 245, 311-8.

100. Bender AT, Beavo JA. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58, 488-520.
101. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*, 93, 280-91.
102. Wang H, Robinson H, Ke H. (2007) The molecular basis for different recognition of substrates by phosphodiesterase families 4 and 10. *J Mol Biol*, 371, 302-7.
103. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. (2003) Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol*, 64, 533-46.
104. Noguera MA, Ivorra MD, Lugnier C, D'Ocon P. (2001) Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in contractile responses of denuded rat aorta related to various Ca²⁺ sources. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 363, 612-9.
105. Bender AT, Ostenson CL, Wang EH, Beavo JA. (2005) Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 497-502.
106. Loughney K, Martins TJ, Harris EA, Sadhu K, Hicks JB, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K. (1996) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 271, 796-806.
107. Sonnenburg WK, Seger D, Beavo JA. (1993) Molecular cloning of a cDNA encoding the "61-kDa" calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Tissue-specific expression of structurally related isoforms. *J Biol Chem*, 268, 645-52.
108. Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H, Beavo JA. (1995) Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 270, 30989-1000.
109. Beavo JA. (1995) cGMP inhibition of heart phosphodiesterase: is it clinically relevant? *J Clin Invest*, 95, 445.
110. Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V. (2001) Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 66, 241-77.
111. Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC, Yan C. (2005) Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation*, 111, 2469-76.
112. Hambleton R, Krall J, Tikishvili E, Honeggar M, Ahmad F, Manganiello VC, Movsesian MA. (2005) Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *J Biol Chem*, 280, 39168-74.
113. Meacci E, Taira M, Moos M, Jr., Smith CJ, Movsesian MA, Degerman E, Belfrage P, Manganiello V. (1992) Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3721-5.
114. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. (2003) Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 39, 67-86.
115. Palmer D, Maurice DH. (2000) Dual expression and differential regulation of phosphodiesterase 3A and phosphodiesterase 3B in human vascular smooth muscle: implications for phosphodiesterase 3 inhibition in human cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol*, 58, 247-52.
116. Liu H, Maurice DH. (1999) Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem*, 274, 10557-65.

117. Bolger G, Michaeli T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, Riggs M, Wigler M, Ferguson K. (1993) A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol*, 13, 6558-71.
118. Kotera J, Fujishige K, Akatsuka H, Imai Y, Yanaka N, Omori K. (1998) Novel alternative splice variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 273, 26982-90.
119. Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA, Ferguson K. (1998) Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*, 216, 139-47.
120. Fink TL, Francis SH, Beasley A, Grimes KA, Corbin JD. (1999) Expression of an active, monomeric catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J Biol Chem*, 274, 34613-20.
121. Sekharan MR, Rajagopal P, Klevit RE. (2005) Backbone 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the 46 kDa dimeric GAF A domain of phosphodiesterase 5. *J Biomol NMR*, 33, 75.
122. Thomas MK, Francis SH, Corbin JD. (1990) Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 265, 14964-70.
123. Zoraghi R, Bessay EP, Corbin JD, Francis SH. (2005) Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J Biol Chem*, 280, 12051-63.
124. Colbran JL, Francis SH, Leach AB, Thomas MK, Jiang H, McAllister LM, Corbin JD. (1992) A phenylalanine in peptide substrates provides for selectivity between cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 267, 9589-94.
125. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH. (2000) Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem*, 267, 2760-7.
126. Sopory S, Balaji S, Srinivasan N, Visweswariah SS. (2003) Modeling and mutational analysis of the GAF domain of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase, PDE5. *FEBS Lett*, 539, 161-6.
127. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 65, 1-52.
128. Francis SH, Bessay EP, Kotera J, Grimes KA, Liu L, Thompson WJ, Corbin JD. (2002) Phosphorylation of isolated human phosphodiesterase-5 regulatory domain induces an apparent conformational change and increases cGMP binding affinity. *J Biol Chem*, 277, 47581-7.
129. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. (2003) PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J*, 22, 469-78.
130. Murthy KS. (2008) Contractile agonists attenuate cGMP levels by stimulating phosphorylation of cGMP-specific PDE5; an effect mediated by RhoA/PKC-dependent inhibition of protein phosphatase 1. *Br J Pharmacol*, 153, 1214-24.
131. Takimoto E, Champion HC, Belardi D, Moslehi J, Mongillo M, Mergia E, Montrose DC, Isoda T, Aufiero K, Zaccolo M, Dostmann WR, Smith CJ, Kass DA. (2005) cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ Res*, 96, 100-9.
132. Francis SH, Corbin JD. (1999) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36, 275-328.
133. Dell'Acqua ML, Scott JD. (1997) Protein kinase A anchoring. *J Biol Chem*, 272, 12881-4.

134. Vo NK, Gettemy JM, Coghlan VM. (1998) Identification of cGMP-dependent protein kinase anchoring proteins (GKAPs). *Biochem Biophys Res Commun*, 246, 831-5.
135. Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD. (1992) Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*, 263, C607-15.
136. Butcher RW, Sutherland EW. (1962) Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem*, 237, 1244-50.
137. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, et al. (1991) Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med*, 325, 1468-75.
138. Hemnes AR, Champion HC. (2006) Sildenafil, a PDE5 inhibitor, in the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 4, 293-300.
139. Lewis GD, Semigran MJ. (2006) The emerging role for type 5 phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*, 3, 123-8.
140. Castro LRVd. (2008) cGMP in Cardiac Cells: Specificity and regulation Vol. Doutor, pp 186. Universidade da Beira Interior, Covilhã.
141. Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM, Keely SL. (1977) Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem*, 252, 3854-61.
142. Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R. (2006) Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation*, 113, 2221-8.
143. Conti M, Beavo J. (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem*, 76, 481-511.
144. Zaccolo M, Pozzan T. (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*, 295, 1711-5.
145. Karpen JW, Rich TC. (2001) The fourth dimension in cellular signaling. *Science*, 293, 2204-5.
146. Dodge-Kafka KL, Langeberg L, Scott JD. (2006) Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res*, 98, 993-1001.
147. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G. (2006) Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res*, 99, 816-28.
148. Lissandron V, Zaccolo M. (2006) Compartmentalized cAMP/PKA signalling regulates cardiac excitation-contraction coupling. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 399-403.
149. Zolle O, Lawrie AM, Simpson AW. (2000) Activation of the particulate and not the soluble guanylate cyclase leads to the inhibition of Ca²⁺ extrusion through localized elevation of cGMP. *J Biol Chem*, 275, 25892-9.
150. Rho EH, Perkins WJ, Lorenz RR, Warner DO, Jones KA. (2002) Differential effects of soluble and particulate guanylyl cyclase on Ca²⁺ sensitivity in airway smooth muscle. *J Appl Physiol*, 92, 257-63.
151. Zhang Q, Moalem J, Tse J, Scholz PM, Weiss HR. (2005) Effects of natriuretic peptides on ventricular myocyte contraction and role of cyclic GMP signaling. *Eur J Pharmacol*, 510, 209-15.
152. Piggott LA, Hassell KA, Berkova Z, Morris AP, Silberbach M, Rich TC. (2006) Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments. *J Gen Physiol*, 128, 3-14.

153. Cawley SM, Sawyer CL, Brunelle KF, van der Vliet A, Dostmann WR. (2007) Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 19, 1023-33.
154. Nausch LW, Ledoux J, Bonev AD, Nelson MT, Dostmann WR. (2008) Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 365-70.
155. Michel V, Bakovic M. (2007) Lipid rafts in health and disease. *Biol Cell*, 99, 129-40.
156. Sampson LJ, Hayabuchi Y, Standen NB, Dart C. (2004) Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*, 95, 1012-8.
157. Ostrom RS, Liu X, Head BP, Gregorian C, Seasholtz TM, Insel PA. (2002) Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol*, 62, 983-92.
158. Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC. (2004) Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res*, 94, 1408-17.
159. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 293, 2449-52.
160. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H, Jr., Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, 276, 38121-38.
161. Bergdahl A, Sward K. (2004) Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*, 82, 289-99.
162. Luu-The V, Belanger A, Labrie F. (2008) Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 207-21.
163. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. (2008) Androgen actions and the ovary. *Biol Reprod*, 78, 380-9.
164. Rainey WE, Nakamura Y. (2008) Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108, 281-6.
165. Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. (2005) Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol*, 43, 939-62.
166. Miller WL. (2002) Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol*, 198, 7-14.
167. Franchimont P. (1983) Regulation of gonadal androgen secretion. *Horm Res*, 18, 7-17.
168. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. (2010) Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)*, 7, 47.
169. Pasqualini JR. (2005) Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97, 401-15.
170. Carr BR, Simpson ER. (1981) De novo synthesis of cholesterol by the human fetal adrenal gland. *Endocrinology*, 108, 2154-62.
171. Michels G, Er F, Eicks M, Herzig S, Hoppe UC. (2006) Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*, 147, 5160-9.
172. Longcope C, Kato T, Horton R. (1969) Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. *J Clin Invest*, 48, 2191-201.

173. Heinlein CA, Chang C. (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*, 16, 2181-7.
174. Michels G, Hoppe UC. (2008) Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol*, 29, 182-98.
175. Wehling M. (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 59, 365-93.
176. Khalil RA. (2005) Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension*, 46, 249-54.
177. Losel R, Wehling M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 46-56.
178. Saldanha PA, Cairrao E, Maia CJ, Verde I. (2013) Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 40, 181-9.
179. Szego CM, Davis JS. (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58, 1711-8.
180. Kelly DM, Jones TH. (2013) Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol*, 217, R47-71.
181. Yildiz O, Seyrek M. (2007) Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 115, 1-6.
182. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. (2003) The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol*, 138, 733-44.
183. Perusquia M, Espinoza J, Montano LM, Stallone JN. (2010) Regional differences in the vasorelaxing effects of testosterone and its 5-reduced metabolites in the canine vasculature. *Vascul Pharmacol*, 56, 176-82.
184. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. (2002) Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol*, 135, 735-40.
185. Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS. (2002) Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39, 814-23.
186. Ding AQ, Stallone JN. (2001) Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol*, 91, 2742-50.
187. Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. (2000) Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*, 129, 1301-8.
188. Channer KS, Jones TH. (2003) Cardiovascular effects of testosterone: implications of the "male menopause"? *Heart*, 89, 121-2.
189. Jones RD, English KM, Jones TH, Channer KS. (2004) Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond)*, 107, 149-58.
190. Murphy JG, Khalil RA. (1999) Decreased [Ca²⁺]_i during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17beta-estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 44-52.
191. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J*, 9, 404-10.
192. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. (2003) Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 465, 125-32.

193. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. (2010) PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol*.
194. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. (1995) Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*, 91, 1154-60.
195. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. (2001) Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1720-7.
196. Crews JK, Khalil RA. (1999) Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1034-40.
197. Crews JK, Murphy JG, Khalil RA. (1999) Gender differences in Ca(2+) entry mechanisms of vasoconstriction in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34, 931-6.
198. Perusquia M, Hernandez R, Morales MA, Campos MG, Villalon CM. (1996) Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol*, 27, 181-5.
199. Honda H, Unemoto T, Kogo H. (1999) Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34, 1232-6.
200. Miller VM, Mulvagh SL. (2007) Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 263-70.
201. Campelo AE, Cutini PH, Massheimer VL. (2012) Testosterone modulates platelet aggregation and endothelial cell growth through nitric oxide pathway. *J Endocrinol*, 213, 77-87.
202. Ota H, Akishita M, Akiyoshi T, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. (2012) Testosterone deficiency accelerates neuronal and vascular aging of SAMP8 mice: protective role of eNOS and SIRT1. *PLoS One*, 7, e29598.
203. Alvarez E, Cairrao E, Morgado M, Morais C, Verde I. (2010) Testosterone and cholesterol vasodilation of rat aorta involves L-type calcium channel inhibition. *Adv Pharmacol Sci*, 2010, 534184.
204. Seyrek M, Irkilata HC, Vural IM, Yildirim I, Basal S, Yildiz O, Dayanc M. (2011) Testosterone relaxes human internal spermatic vein through potassium channel opening action. *Urology*, 78, 233 e1-5.
205. Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. (1996) Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation*, 94, 2614-9.
206. Seyrek M, Yildiz O, Ulusoy HB, Yildirim V. (2007) Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci*, 103, 309-16.
207. Perusquia M, Villalon CM. (1999) Possible role of Ca²⁺ channels in the vasodilating effect of 5beta-dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 371, 169-78.
208. Montano LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquia M. (2008) Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology*, 149, 2517-26.
209. Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y. (1999) The effects of sex steroids on human umbilical artery and vein. *J Soc Gynecol Investig*, 6, 27-31.
210. Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN, White RE. (2012) Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H115-23.

211. Jiang H, Colbran JL, Francis SH, Corbin JD. (1992) Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem*, 267, 1015-9.
212. Akishita M, Yu J. (2012) Hormonal effects on blood vessels. *Hypertens Res*, 35, 363-9.
213. English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS. (2000) Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *Eur Heart J*, 21, 890-4.
214. Webb CM, Adamson DL, de Zeigler D, Collins P. (1999) Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 83, 437-9, A9.
215. Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, della Monica PL, Bonfigli B, Volpe M, Chierchia SL. (1999) Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation*, 99, 1666-70.
216. Martin de Llano JJ, Fuertes G, Garcia-Vicent C, Torro I, Fayos JL, Lurbe E. (2007) Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels. *Transl Res*, 149, 1-9.
217. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Alvarez E, Correia I, Verde I. (2009) Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 45, 175-84.
218. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.
219. Okker-Reitsma GH, Dziadkowiec IJ, Groot CG. (1985) Isolation and culture of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries. *In Vitro Cell Dev Biol*, 21, 22-5.
220. Leik CE, Willey A, Graham MF, Walsh SW. (2004) Isolation and culture of arterial smooth muscle cells from human placenta. *Hypertension*, 43, 837-40.
221. Owens GK. (1996) Role of mechanical strain in regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 79, 1054-5.
222. Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW. (2000) Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol*, 116, 147-61.
223. Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW. (2001) In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol*, 118, 63-78.