



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeitos genómicos da di-hidrotestosterona nas células vasculares do músculo liso humano

Paulo André Cardoso Bicho da Silva Saldanha

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

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

Covilhã, Junho de 2012

Dedicatória

*Ao meu avô,
Com saudade*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, creio que qualquer palavra que escreva não conseguirá superar todo o sentimento de gratidão que tenho para com a Professora Doutora Elisa Cairrão, não só pela confiança que depositou no meu trabalho, como a disponibilidade de transmitir todos os seus conhecimentos. Foi um privilégio ser orientando de uma pessoa que põe um aluno num ambiente de excelente aprendizagem, de referir a minha primeira dissecação das artérias, momentos únicos e inesquecíveis, e a inesgotável paciência para corrigir esta dissertação. Um muitíssimo obrigado. Não posso deixar de agradecer ao Professor Ignacio Verde pela sua contribuição e orientação no desenvolvimento deste projeto de investigação e de me ter proporcionado momentos excelentes dentro de um grupo de investigação que respeito imenso.

Queria também agradecer ao Professor Cláudio Maia pela paciência e pelo tempo despendido comigo para me ensinar-me real-time PCR.

A todos os membros do CICS-UBI um obrigado pelos sorrisos diários e por toda a boa convivência e disponibilidade para alcançarmos um bem comum.

Um agradecimento especial à Aura Vaz, pelos desenhos que são dignos de uma artista, o meu obrigado, e à Ana Martinho pelas horas infindáveis a discutir real-time PCR, o meu agradecimento pela pequena transferência de conhecimento

Aos meus verdadeiros amigos João Baltazar, Renato Leitão, deixo um sincero agradecimento por ter crescido como pessoa ao vosso lado e por ajudarem a superar todos os bons e maus momentos. Ao José Sereno, ao Miguel Rodrigues e ao Augusto Pedro, um muito obrigado pelo tempo que passei ao vosso lado e que me fez crescer como um ser crítico da ciência e do mundo.

À Tatiana Jesus, pela pessoa especial que é e que me faz sentir, porque o lugar das pessoas especiais é lado a lado daquelas com quem desejamos andar por caminhos que se cruzam para além das estrelas.

À minha adorada família, especialmente ao meu pai Carlos e à minha mãe Maria do Rosário, às minhas irmãs Maria Teresa e Cláudia por todo o amor, sacrifício e apoio quero agradecer-vos do fundo do meu coração porque sem vocês ao meu lado não teria chegado até aqui. Todo o meu sucesso e felicidade se devem a vocês.

Resumo

Os efeitos benéficos da testosterona (Tes) no sistema vascular são particularmente associados com a sua capacidade para reduzir a contractilidade vascular. Estes efeitos da Tes parecem ser devidos à ativação dos canais de potássio ativados pelo cálcio, de elevada condutância (BK_{Ca}) e pelos canais de potássio sensíveis à voltagem (K_V) e/ou à inibição dos canais de cálcio dependentes da voltagem tipo L (LTCC) nas células vasculares do músculo liso. Contudo os efeitos genómicos dos androgénios na expressão destes canais iónicos são desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos genómicos da di-hidrotestosterona (DHT) na expressão dos níveis de mRNA expressos pelas subunidades α - e β -dos BK_{Ca} e dos LTCC nas células do músculo liso (SMC) das artérias do cordão umbilical humano por análise da reação da polimerase em cadeia em tempo real (REAL-TIME PCR). As células do músculo liso das artérias do cordão umbilical (HUASMC) foram pré-incubadas durante 24 horas com DHT (1nM to 100nM). Os resultados mostraram um aumento da expressão da subunidade $\beta 1$ enquanto na subunidade α não houve alteração na expressão dos níveis de mRNA dos BK_{Ca} . Na expressão da subunidade α_{1C} dos LTCC os níveis de expressos de mRNA diminuíram devido à modulação da expressão genética pela DHT.

Os nossos resultados mostram ainda uma tendência de diminuição de expressão para as subunidades $\alpha 9.3$ e $\beta 2$ dos K_V enquanto que a subunidade $\beta 1$ não sofre alterações da expressão induzida pela DHT. Este trabalho também como objetivo um primeiro olhar sobre a expressão de canais iónicos patologias, como a hipertensão gestacional e a pré-eclampsia, que afetam a população mundial no mundo desenvolvido cerca de 6-8% de gestações. Estes resultados mostraram que a subunidade $\beta 1$ dos BK_{Ca} , que para muitos autores está ligada à hipertensão, apresentava uma diminuição na expressão do seu mRNA enquanto a subunidade α não apresenta alteração dos seus níveis de expressão de mRNA. A subunidade $\alpha 9.3$ e $\beta 1$ dos K_V também não apresentam alterações dos seus níveis de expressão e mRNA. Por outro lado a subunidade $\beta 2$ dos K_V e a subunidade α_{1C} dos LTCC apresentam uma diminuição da expressão. Sendo as HUASMC fáceis de obter, apresentam-se como células de extrema importância para descobrir novas vias de sinalização das células vasculares humanas. Várias patologias como hipertensão gestacional e pré-eclampsia possuem alterações na expressão dos canais iónicos das HUASMC tornando-se assim num estudo de extrema importância para tentar entender tais infortúnios que atingem o mundo moderno.

A continuação do estudo da hipertensão gestacional e da pré-eclampsia, assim como os estudos com várias hormonas que são sintetizadas e produzidas no nosso organismo poderão levar a um possível deslumbre do efeito de que várias hormonas possam ter em algumas doenças como o caso da hipertensão gestacional e pré-eclampsia.

Palavras-chave

Canais de Cálcio, Canais de Potássio, Di-hidrotestosterona, Hipertensão, Expressão de canais.

Abstract

The beneficial effect of testosterone (Tes) on the vascular system is partly associated with its ability to reduce vascular contractility. These effects of Tes seems to be due to the activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel (BK_{Ca}) and voltage sensitive potassium channels (K_V) and/or the inhibition L-type voltage-dependent calcium channels in vascular smooth muscle cell. However the genomic effects of the hormones in the expression of these ion channels are unknown. The aim of this work was to study the genomic effect of DHT in the relative mRNA expression levels of α - and β -subunits of BK_{Ca} and of L-type calcium channels in smooth muscle cell (SMC) of human umbilical artery by REAL-TIME polymerase chain reaction (REAL TIME-PCR) analysis. Human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC) were pre-incubated for 24 hours with DHT (10mM to 100nM). The results showed DHT enhance mRNA expression of β -subunit while α -subunit has no modification on mRNA expression levels of BK_{Ca} channels. In mRNA expression of L-type voltage-dependent calcium channels DHT decrease the modulation of gene expression.

Our results also show trend in the diminished expression for $\alpha_{9.3}$ and β_2 subunits of K_V while β_1 subunit doesn't have changes in her DHT induced expression. This work also has as objective a first glimpsed over the expression of ion channels in pathologies like gestational hypertension and preeclampsia which affects worldwide population in the developed world in about 6-8% of gestations. These results showed that β_1 subunit of BK_{Ca} , for many authors is the cause for hypertension, and has a diminished expression in her levels of mRNA while α subunit doesn't present changes in her levels of mRNA expression. On the other and β_2 subunit of K_V and $\alpha_{1\text{C}}$ subunit of LTCC presented a diminished expression.

HUASMC are easier to get and they present themselves with greater importance for the discovering of new signalling pathways in vascular human cells. Several pathologies like gestational hypertension and preeclampsia have some changes in ion channel expression of HUASMC becoming that in a study of great importance for trying to understand such misfortune that hits the modern world society.

The continuing of this study of gestational hypertension and preeclampsia, as well as studies with several hormones that are synthesized and produced by human organism can have in several diseases such as arterial hypertension and preeclampsia.

Keywords

Calcium channels, Potassium channels, Dihydrotestosterone, Hypertension, Channels expression.

Índice

Páginas

Introdução	1
Circulação Fetal e Cordão Umbilical	1
Artéria umbilical humana	3
Regulação da Contractilidade do Músculo liso Vascular	9
Contração do músculo liso vascular	9
Ação dos mensageiros químicos	12
Potencial de membrana	14
Canais de Cálcio	15
Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem (VOCC)	16
Canais de Potássio	19
Canais de potássio Retificadores Internos (K_{IR})	20
Canais de potássio operados por voltagem (K_V)	20
Canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca})	23
Testosterona	25
Generalidades	25
Mecanismo Vasodilatador da Testosterona	27
Importância da Testosterona no sistema cardiovascular	29
Patologias	29
Hipertensão	29
Objetivos	31
Materiais e Métodos	32
Preparação do tecido	32
Cultura de células	32
Preparação do tecido de Amostras Patológicas	34
Quantificação de RNA usando NanoPhotometer.	35
Expressão Canais de potássio e cálcio nas HUASMC	35
Análise Estatística	37

Resultados	38
Análise do efeito da DHT na expressão dos canais iónicos	38
Discussão	48
Conclusões e Perspetivas Futuras.....	52
Bibliografia.....	53

Lista de Figuras

Figura 1 - Circulação Fetal	2
Figura 2- Estrutura Geral das artérias.....	4
Figura 3- Microscopia eletrónica de varrimento mostrando esqueleto de colagénio de uma secção transversal do cordão umbilical humano após maceração de elementos celulares e substancia fundamental com NaOH	5
Figura 4 - Características ultraestruturais das células do músculo liso	7
Figura 5 - Regulação da contração do músculo liso através da fosforilação-desfosforilação reversível da cadeia leve regulatória da miosina II (LC20).....	10
Figura 6 - Papel do cálcio na regulação do estado contráctil das células vasculares do músculo liso.....	11
Figura 7 - Ativação da proteína G acoplada ao recetor e que resulta numa quebra do PIP2 mediada pela PLC.....	13
Figura 8 - Canais de potássio regulam o tonus do músculo liso afetando o potencial de membrana.....	14
Figura 9 - Topologia proposta para o canal de cálcio tipo L (LTCC)	18
Figura 10 - Esquema hipotético da estrutura geral dos VOCC	19
Figura 11 - Representação esquemática da organização tetramérica dos canais KV	21
Figura 12 - Diagrama esquemático dos BK _{Ca}	24
Figura 13 - Mecanismo da formação da di-hidrotestosterona, um potente metabolito da testosterona	26
Figura 14 - Locais propostos da ação da Testosterona que levam à sua atividade vasodilatadora.....	27
Figura 15 - Camada de músculo liso e subseqüentes células do músculo liso de artéria umbilical humana	33
Figura 16 - NanoPhotometer	34
Figura 17 - Programa do NanoPhotometer	34
Figura 18 - RT-PCR dos primers da subunidade α dos BK _{Ca} para diferentes concentrações de DHT.....	37
Figura 19 - Reta de eficiência para os primers que codificam para a subunidade K _v B2.....	38
Figura 20 - Análise das curvas de melting de amostras de Hipertensão	38
Figura 21 - Efeito da 5 α -DHT na subunidade α dos BK _{Ca} nas HUASMC	39
Figura 22 - Efeito da DHT na subunidade β dos BK _{Ca} nas HUASMC	40
Figura 23 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade Cav1.2 dos nas HUASMC	41
Figura 24 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade α 9,3 dos K _v nas HUASMC	42
Figura 25 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade β 1 dos K _v nas HUASMC...	43
Figura 26 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade β 3 dos K _v nas HUASMC...	44

Figura 27 - Estudo da expressão das subunidades dos BK _{Ca} em cordões Hipertensão Gestacional e num cordão de Pré-Eclampsia (P.E.).....	45
Figura 28 - Estudo da expressão das subunidades dos K _v em cordões Hipertensão Gestacional e num cordão de Pré-Eclampsia (P.E.)	46
Figura 29 - Estudo da expressão da subunidade α_{1c} dos LTCC em cordões Hipertensão Gestacional e num cordão de Pré-Eclampsia (P.E.)	47

Lista de Tabelas

	Páginas
Tabela 1 - Proteínas do fenótipo contráctil.....	8
Tabela 2 - Proteínas do fenótipo sintético	8
Tabela 3 - Funções Fisiológicas e Farmacológicas dos canais de Cálcio	17
Tabela 4 - Famílias dos canais Kv	22
Tabela 5 - Nomes IUPHAR dos membros dos grupos dos canais de potássio dependentes de cálcio com a designação do seu gene	23
Tabela 6 - Primers utilizados para Real-Time PCR.....	36
Tabela 7 - Identificação das amplificações da figura 20.....	37

Lista de Acrónimos

AR	Recetor clássico de Androgénio (<i>Androgen Recetor</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
ATPase	Trifosfatase de Adenosina (<i>Adenosine Triphosphatase</i>)
BK _{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio (<i>Large conductance calcium-activated potassium channels</i>)
Ca ²⁺	Cálcio (<i>Calcium</i>)
CaM	Calmodulina (<i>Calmodulin</i>)
cAMP	Monofosfato Cíclico 3'5'-Adenosina (<i>Cyclic Adenosine 3,5' - Monophosphate</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>Complementary DNA</i>)
DAG	Diacilglicerol (<i>Dyacylglycerol</i>)
DHT	Di-hidrotestosterona (<i>dihydrotestosterone</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	Trifosfato de Desoxirribonucleotídeos (<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i>)
ECM	Matrix extracelular (<i>Extracellular Matrix</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Factor de Crescimento do Endotélio (<i>Endothelium Growth Factor</i>)
ERK	Cinases Reguladas por Estímulos Extracelulares (<i>Extracellular-stimulus Regulated Kinases</i>)
FBS	Soro Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto (Fibroblast Growth Factor)
GDP	Guanosina difosfato (<i>Guanosine Diphosphate</i>)
G _{ia}	Subunidade α da Proteína Ligadora de GTP inibitória da Adenilato ciclase G _i (<i>α Subunit of the Inhibitory GTP binding protein</i>)
GPCR	Recetores associados a uma proteína G Heterotrimérica (<i>G Protein-Coupled Receptors</i>)

GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine triphosphate</i>)
G β	Subunidade β das proteínas G Heterotriméricas (<i>β Subunit of Heterotrimeric G Proteins</i>)
HT	Hipertensão (<i>Hypertension</i>)
HUA	Artéria umbilical humana (<i>Human Umbilical Artery I</i>)
IGF-I	Fator de Crescimento de Insulina (<i>Insuline Growth Factor</i>)
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de Inositol (<i>Inositol-1,4,5-Triphosphate</i>)
IP ₃ R	Recetor do IP ₃ (<i>Inositol - 1,4,5 - Triphosphate Recetor</i>)
K ⁺	Potássio (<i>Potassium</i>)
K _{ATP}	Canais de K ⁺ Sensíveis a ATP (<i>ATP -Sensitive Potassium Channels</i>)
K _{Ca}	Canais de Potássio ativados por Cálcio (<i>Calcium-activated Potassium Channels</i>)
KCl	Cloreto de Potássio (<i>Potassium Chloride</i>)
KH ₂ PO ₄	Ácido fosfórico (<i>Potassium dihydrogen phosphate monobasic</i>)
K _{IR}	Canais de K ⁺ Retificadores internos (<i>Inwardly Rectifying Potassium Channles</i>)
K _V	Canais de K ⁺ Operados por Voltagem (<i>Voltage-Gated Potassium Channels</i>)
LTCC	Canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L (<i>L-Type Calcium Channel</i>)
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio (<i>Magnesium Chloride</i>)
MLC ₂₀	Cadeias leves reguladoras da Miosina (<i>Myosin regulatory light chain</i>)
MLCK	Proteína Cinase das cadeias leves da miosina (<i>Myosin-light chain kinase</i>)
MLCP	Proteína Fosfatase das Cadeias Leves da Miosina (<i>Myosin-Light-Chain Phosphatase</i>)
mRNA	RNA Mensageiro (<i>Messenger RNA</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio (<i>Sodium Chloride</i>)
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de Sódio (<i>Sodium Phosphate</i>)
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio (<i>Sodium Bicarbonate</i>)
PBS	Tampão Fosfato-Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PE	Pré-eclampsia (<i>preeclampsia</i>)
PIP2	Fosfatidil Inositol 4,5 - Bifosfato (<i>phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate</i>)
PKA	Proteína Cinase A (<i>Protein Kinase A or Cyclic AMP-dependent Protein Kinase</i>)
PKC	Proteína Cinase C (<i>Protein Kinase C</i>)
PKG	Proteína Cinase G (<i>Protein Kinase G</i>)
PLC	Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)
PSS	Solução salina fisiológica (<i>Physiologic Saline Solution</i>)
REAL TIME - PCR	Reação da polimerase em cadeia (<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Ácid</i>)
ROCC	Canais de cálcio operados por recetores (<i>Recepted-operated calcium channel</i>)
RT - PCR	Reação da Transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RyR	Recetor de Rianodina (<i>Ryanodine receptor</i>)
SAC	Canais Ativados por Stress Físico (<i>Stretch-activeted channel</i>)
SHBG	Proteína ligada a Hormonas Sexuais (<i>Sex Hormone Binding Protein</i>)
SM - MHC	Cadeia pesada da miosina do músculo liso (<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>)
SMA	Actina do músculo liso (<i>smooth muscle actin</i>)
SMC	Células do músculo liso (<i>Smooth Muscle Cells</i>)
SMC	Células do músculo liso (<i>Smooth Muscle Cell</i>)
SOC	Canais Operados por Depósitos Intracelulares (<i>Store-operated channel</i>)
Tes	Testosterona (<i>Testosterone</i>)
VOCC	Canais de cálcio dependentes de voltagem (<i>Voltage Operated Calcium Channel</i>)

Introdução

Circulação Fetal e Cordão Umbilical

Antes de darmos o nosso primeiro sopro algo que possuímos e que nos alimentava como feto, o cordão umbilical, perde a sua função e é removido. Além de fazer a ligação entre o feto e a placenta a função do cordão umbilical é transportar nutrientes e oxigênio necessários à sobrevivência do feto.

A circulação fetal difere da circulação de um adulto. Algumas diferenças que se verificam são pelo facto de que a circulação feto-placentária possui três desvios, o ducto venoso, o forame oval e o ducto arterial que são suprimidos no nascimento. Ainda se verifica que um terço do sangue que sai de ambos os ventrículos na circulação fetal é direcionado para a placenta durante a segunda metade da gravidez e tal fração reduz-se com o aproximar do termo da gravidez. A relação pressão/fluxo da circulação adulta não se compara com a circulação fetal. Esta não possui uma circulação pulmonária e sistémica dividida (Struijk et al., 2008).

O sangue arterial que provém da placenta flui pela veia umbilical até ao feto, cuja ligação ao cordão umbilical é através do umbigo. Uma pequena parte do sangue entra na circulação do fígado através da veia porta, enquanto que quase a totalidade do sangue segue através do ducto venoso para se juntarem na veia cava inferior. No feto a veia cava inferior possui sangue arterial. Com o desenvolver da gestação o sangue passa em maior quantidade pela veia porta e por consequentemente pelo fígado que passa a filtrar a quase totalidade do sangue proveniente da placenta. (Kiserud and Acharya, 2004; Pina, 2007). O sangue da veia cava inferior, que procede do ducto venoso hepático ou da veia porta através das veias hepáticas chega à aurícula direita onde se mistura com o sangue venoso da veia cava superior. Esta mistura nunca é completa pois a válvula da veia cava inferior impede a mistura do sangue venoso com o arterial (Pina, 2007). Os pulmões não oxigenam o sangue e como este não necessita de ser oxigenado passa diretamente para a aurícula esquerda através do forame oval. Na aurícula esquerda predomina sangue arterial enquanto que nas cavidades cardíacas direitas há maior domínio de sangue venoso. O sangue predominante venoso chega ao ventrículo direito e passa para o tronco pulmonar. Apenas uma pequena porção dirige-se para os pulmões para nutrir o tecido pulmonar. O sangue do tronco pulmonar é desviado para o arco da aorta através do ducto arterial (Kiserud and Acharya, 2004). No arco da aorta misturam-se o sangue proveniente do forame oval com o sangue proveniente do tronco pulmonar, através do ducto arterial. A mistura dos dois tipos de sangue origina sangue parcialmente venoso que vai vascularizar os órgãos digestivos, urinários, genitais e os membros inferiores. O sangue conflui depois para as duas artérias umbilicais, a fim de alcançar a placenta para ser novamente arterializado (Pina, 2007).

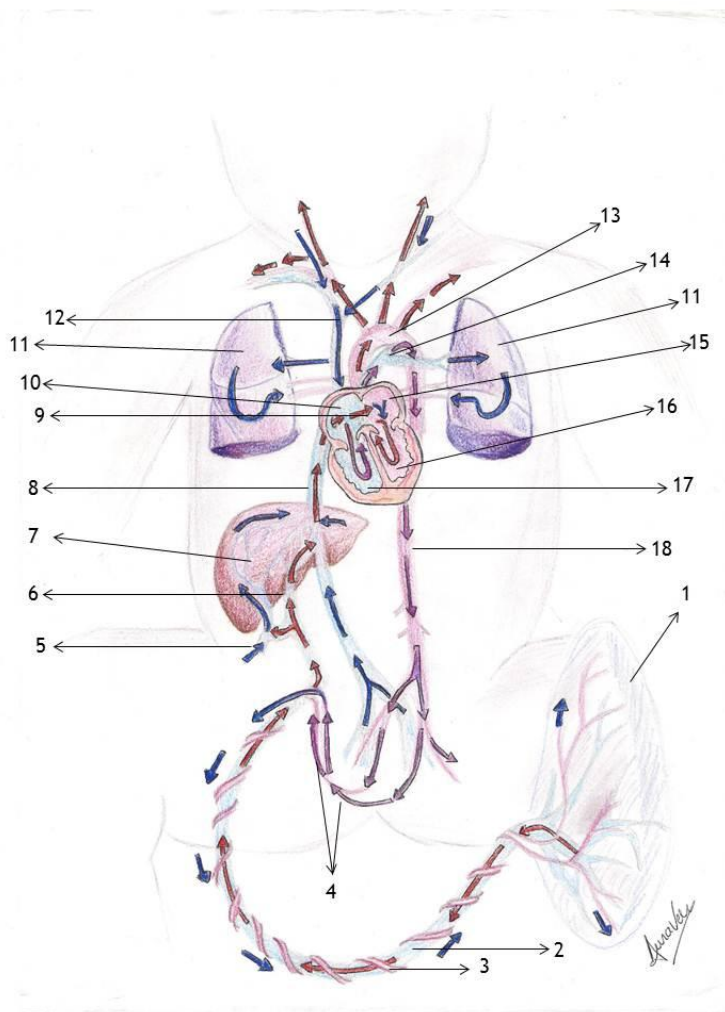


Figura 1 - Circulação Fetal

1. Placenta 2. Veia umbilical 3. Artérias umbilicais 4. Artérias hipogástricas 5. Veia porta 6. Ducto venoso 7. Fígado 8. Veia cava inferior 9. Forame oval (Botal) 10. Aurícula direita 11. Pulmão 12. Veia cava superior 13. Aorta 14. Ducto arterioso 15. Aurícula esquerda 16. Ventrículo esquerdo 17. Ventrículo direito 18. Aorta abdominal.

Sangue oxigenado (vermelho) →
Mistura de sangues, oxigenado e desoxigenado (roxo) →
Sangue desoxigenado (azul) →

No geral, um cordão umbilical é constituído por duas artérias e uma veia, as quais estão rodeadas pela geleia de Wharton, um tecido conectivo poroso, e por fora uma única camada de células do âmnio (Ferguson and Dodson, 2009). Em média um cordão mede entre 50-60cm de comprimento (Di Naro et al., 2001). No entanto, podem existir cordões mais curtos, os quais estão normalmente associados a anomalias ou má formação fetal, e cordões de maior comprimento, os quais estão usualmente associados à morte fetal por hipoxia ou ao à volta da veia (Benirschke, 1998; Ferguson and Dodson, 2009).

Artéria umbilical humana

As artérias são geralmente constituídas por três túnicas que se distinguem pela sua diferente morfologia. A camada interna é designada de túnica íntima. Esta camada é constituída por células endoteliais que formam uma única camada que controla a permeabilidade e regula o tónus vascular. A camada intermédia é designada de túnica média, a qual é constituída por células do músculo liso (SMC) e constituintes da matriz extracelular (proteoglicanos e fibras). As SMC são responsáveis pela contractilidade das artérias. Por último, a camada externa é designada de túnica adventícia. A túnica adventícia é constituída por fibroblastos, colagénio e elastina, sendo o colagénio uma proteína mecanicamente rígida que serve para limitar o raio de distensão dos vasos a grandes fluxos. Os fibroblastos são normalmente definidos como células de origem mesenquimais que produzem uma variedade de componentes da matriz extracelular, incluindo vários tipos de colagénio assim como fibronectinas (Souders et al., 2009). A principal função da elastina é fornecer a elasticidade e subsequente distensão/contração das artérias, fazendo que estas se contraíam/distendam para fornecer um pulso ao fluxo sanguíneo (Dobrin, 1978; Ferguson and Dodson, 2009; Gosline et al., 2002; Lu et al., 2004).

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 possuem uma parede rica em tecido elástico, como por exemplo a artéria aorta. A parede rica em tecido elástico, permite a dilatação ou expansão das artérias de forma eficiente, não provocando ao seu rompimento após alguns ciclos cardíacos (Rodrigues, 2009).

Relativamente às arteríolas pode-se referir que estas apresentam uma ou duas camadas de células musculares lisas. Estas recebem um fluxo sanguíneo elevado que provém das artérias do qual, cerca de 80% de fluxo que recebem é excessivo para a sua capacidade, o que faz com que sejam consideradas parte da resistência vascular. A sua principal função é a regulação da hemodinâmica, contribuindo para o controlo da pressão sanguínea e distribuição do sangue por cada região (Martinez-Lemus, 2011).

O diâmetro das artérias de grande calibre para os capilares vai diminuindo, assim como também ocorre um decréscimo do fluxo sanguíneo e o conteúdo de elastina que constitui as artérias e arteríolas. As artérias são as responsáveis por levar o sangue aos órgãos e por isso são responsáveis pelo controlo do fluxo sanguíneo, fazendo com que este diminua ao longo da circulação sistémica.

A classificação do sistema venoso é similar ao descrito para o arterial, assim este sistema possui vénulas e veias de médio e grande calibre. O sistema venoso tem como principal função recolher o sangue dos órgãos e transporta-lo para o coração. Este sistema funciona a pressões baixas já que estes vasos expandem-se para recolher o sangue.

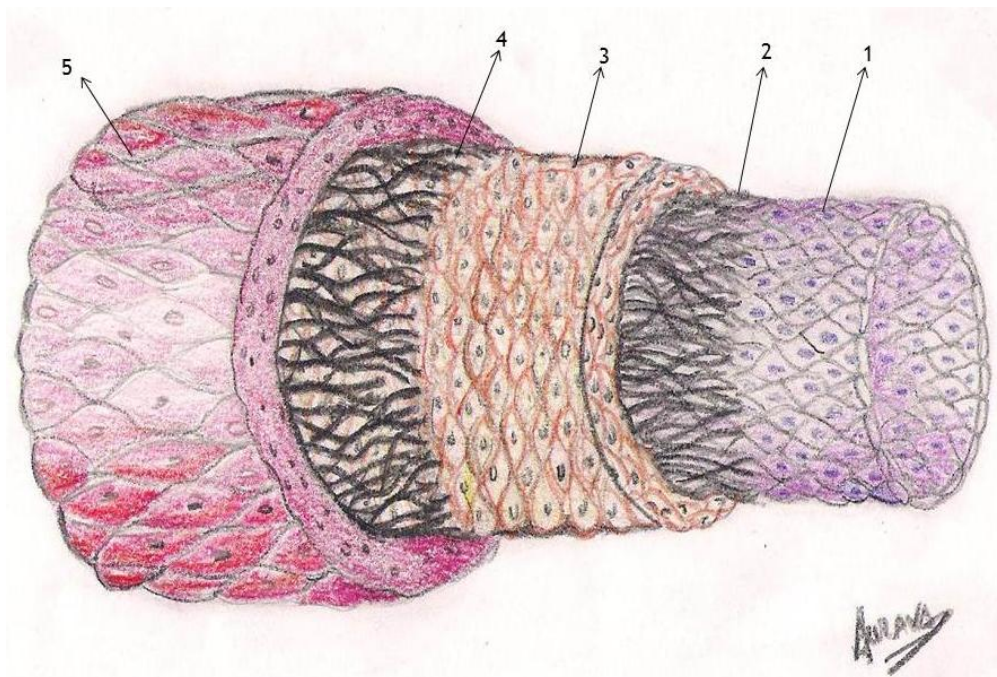


Figura 2- Estrutura Geral das artérias.

1. T nica interna ou íntima 2. Membrana elástica interna 3. T nica média ou própria 4. Membrana elástica externa 5. T nica externa ou adventícia

A artéria umbilical apresenta algumas semelhanças, com as restantes artérias, como por exemplo o facto de possuirem três t nicas. Contudo, a artéria umbilical possui características únicas que a distingue das outras artérias. Uma delas é a t nica adventícia ser formada pela geleia de Wharton, constituída por proteoglicanos, ácido hialur nico e moléculas que interagem com água, formando um muco viscoso, que dependendo da contra o ou relaxamento dos vasos pode prevenir estruturalmente a hiperdistensão dos vasos (Fig.2). A principal fun o desta geleia de Wharton é a prote o das camadas mais internas das artérias do cordão, contra anomalias que o movimento do feto possa provocar como tor oes e nós (Ferguson and Dodson, 2009). A grande diferença é no entanto a t nica média, que   constituída por duas camadas de células musculares lisas: a camada externa que apresenta uma disposi o circular, enquanto que, na camada mais interna as SMC estão arranjadas predominantemente numa forma o longitudinal ao eixo da artéria de forma desordenada numa substância fundamental. Numerosas contra oes levam ao início do fecho das artérias umbilicais. Estas contra oes têm origem nas SMC da camada externa. Em contraste, a camada interna parecer servir como um tecido plástico que pode ser facilmente deslocado, facilitando o estreitamento para completar este processo de encerramento (Meyer et al., 1978).

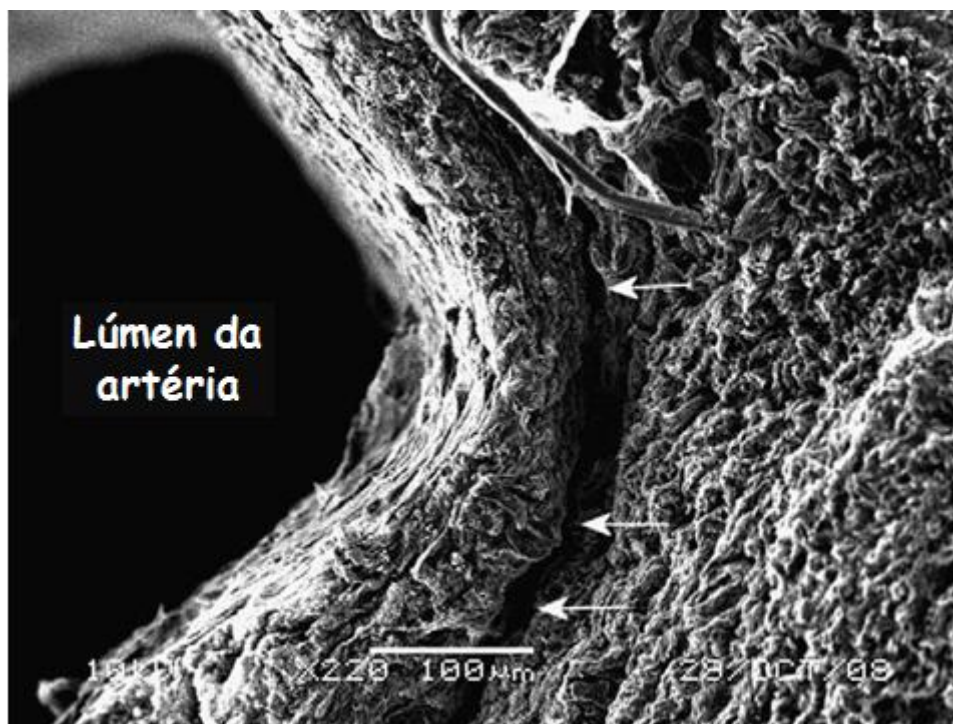


Figura 3- Microscopia eletrônica de varrimento mostrando esqueleto de colágeno de uma seção transversal do cordão umbilical humano após maceração de elementos celulares e substância fundamental com NaOH. O colágeno dentro da artéria umbilical parece estar alinhado radialmente em torno do lúmen do vaso (lado esquerdo da imagem). O colágeno dentro da geleia de Wharton (lado direito da imagem) não está bem alinhado. O espaço perivascular, denotado pelas setas brancas é mostrado em torno do exterior da túnica média do cordão umbilical. Este espaço pode facilitar a dilatação e contração dos vasos sem a restrição física da geleia de Wharton Adaptado de ((Ferguson and Dodson, 2009)).

As artérias umbilicais estão envolvidas na circulação fetoplacentar. Os mecanismos que regulam o estado contráctil destas artérias (parácrinos e hormonais/endócrinos) são de extrema importância para uma troca eficiente de nutrientes e oxigênio entre o feto e a placenta, uma vez que o cordão umbilical não possui inervações (Ferguson and Dodson, 2009; Santos-Silva et al., 2008). As artérias umbilicais não possuem uma membrana interna elástica e contêm pouca elastina (Ferguson and Dodson, 2009). As células vasculares do músculo liso são responsáveis pelo tônus vascular (Owens et al., 2004) respondendo a vários estímulos hormonais e hemodinâmicos, sendo por isso primordial entender os seus mecanismos de regulação (Cairrao et al., 2008; Cairrao et al., 2010; Santos-Silva et al., 2008).

Músculo Liso vascular

As células do músculo liso (SMC) estão presentes nas paredes de vários órgãos, nos vasos sanguíneos, nomeadamente nas artérias e nas veias, nas paredes do tubo digestivo como no estômago e nos intestinos, bexiga, vias respiratórias, útero e nos seios cavernosos do pênis e do clitóris (Gabbiani et al., 1981; Webb, 2003). Estas células têm como principais funções a regulação e distribuição do fluxo sanguíneo, a regulação da contractilidade e diâmetro das

artérias e remodelação vascular (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007; Rzucidlo et al., 2007; Shi and Tarbell, 2011; Wagenseil and Mecham, 2009).

As diferentes funções das SMC, como a remodelação dos vasos, poderá ser uma das razões da existência de diferentes fenótipos (Rensen et al., 2007), dado serem uma população muito heterogênea (Daniel and Sedding, 2011). Os fenótipos destas células variam entre o estado sintético e o estado contráctil (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007; Rzucidlo et al., 2007).

Em determinadas condições fisiológicas, como gravidez, ou após lesão vascular, as SMC exercem funções de remodelação (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007). O processo de remodelação arterial envolve principalmente a proliferação e a migração das SMC, assim como a acumulação destas na túnica íntima da artéria. Em resposta a uma lesão arterial, as SMC mudam de fenótipo, do seu estado quiescente e contráctil para o seu estado proliferativo e sintético. Esta mudança de fenótipo leva a um aumento de componentes da matriz extracelular (ECM), a proliferação e migração das SMC, cruciais na resposta à lesão, que contem como consequências a redução do fluxo sanguíneo (Daniel and Sedding, 2011). A variabilidade fenotípica das SMC assim como uma elevada taxa de proliferação, migração e capacidade sintética das mesmas células lhes dá extrema importância no importante papel da reparação vascular. Esta plasticidade das SMC maduras é uma propriedade inerente ao fenótipo diferenciado das SMC que provavelmente evoluiu em grandes organismos porque conferia uma vantagem de sobrevivência (Owens et al., 2004).

As formas contrácteis e sintéticas das SMC têm morfologias claramente distintas. Consequentemente a morfologia é ainda um importante parâmetro para a definição do fenótipo das SMC, embora o uso de marcadores proteicos para este propósito é habitual. As SMC contrácteis são alongadas enquanto as SMC sintéticas são menos alongadas e têm morfologia de paralelepípedo que é referida como epitelióide ou rômbrica, com uma morfologia semelhante à das células endoteliais (Figura 3).

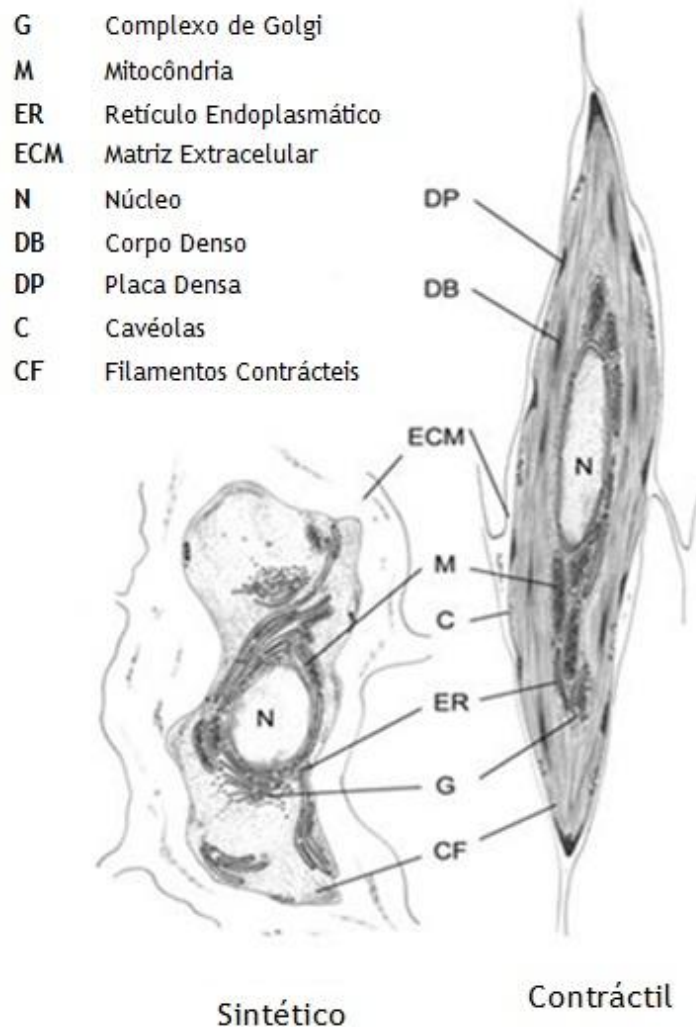


Figura 4 - Características ultraestruturais das células do músculo liso (Adaptado (Rensen et al., 2007)).

As SMC sintéticas contêm grande número de organelos, envolvidos na síntese proteica, e exibem taxas de crescimento elevadas e uma grande atividade migratória, comparativamente às SMC contráteis, uma vez que os organelos são substituídos por filamentos contráteis. Para diferenciar ambos os fenótipos são utilizados marcadores específicos, proteínas específicas do fenótipo contrátil (Tabelas 1) e sintético (Tabela 2), como a alfa actina do músculo liso (α -SMA), a cadeia pesada da miosina do músculo liso (SM-MHC) (Daniel and Sedding, 2011), h_1 -calponina, SM22 α , entre outras que são usadas como marcadores do fenótipo contrátil. (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007)

Efeitos genómicos da di-hidrotestosterona nas células vasculares do músculo liso humano

Tabela 1 - Proteínas do fenótipo contráctil (Beamish et al., 2010).

Nome	Produtos Proteína	Tamanho da Proteína (kDa)	Função
Musculo Liso α -actina (gene: ACTA2)	1	43	Geração de força
Musculo liso (h1) calponina (gene: CNN1)	1	34	Modulação da actividade ATP-ase da miosina; Sinalização em proteínas estrado para ERK e PKC
SM-22 α (trangelina) (gene: TAGLN)	1	22	Modulação da contração, especialmente que não depende da fosforilação cadeia leve da miosina
Caldesmona (gene: CALD1)	5 3 "pesadas" 2 "leves"	h-caldesmona 120-150 l-caldesmona 70-80	Regulação da contração do músculo liso
Cadeia Pesada da Miosina do músculo liso (gene: MYH11)	4 SM-1A SM-1B SM-2A SM-2B	200-204	Geradora de força
Smotelina (gene SMTN)	6 A1-A3 B1-B3	Smotelina-A :59 Smotelina-B:110	Grande: smotelina-B é expressa predominantemente na vasculatura de adultos, embora é expressa transitoriamente nas SMC viscerais

Tabela 2 - Proteínas do fenótipo sintético (Beamish et al., 2010)

Nome	Produtos Proteína	Tamanho da Proteína (kDa)	Função
Cadeia leve Caldesmona (l-caldesmona) (gene: CALD1)	2 cadeias leves	70-80	Envolvidas na regulação dependente do cálcio das interações actina-miosina
Vimentina (gene: VIM)	1	52-58	Filamento intermediário tipo III; mantem a forma da célula e a integridade do citoplasma
Cadeia pesada B da miosina não-muscular (SMemb) (gene:MYH10)	1	200	Geração da força actina-miosina; envolvida nos cones de crescimento dos neurónios
Tropomiosina 4 (gene: TPM4)	2	30	Proteína de ligação actina que regula o mecanismo da actina; interações sinérgicas com baixo peso molecular das isoformas da tropomiosina em cardiomiócitos
Proteína de ligação ao retinol celular1 (gene:RBP1)	3: a,b,c	18.3-23.6	Envolvida no metabolismo do retinoide; pode desenvolver um papel na evolução do tecido granuloso

Regulação da Contractilidade do Músculo liso Vascular

Contração do músculo liso vascular

O mecanismo contráctil é ativado pelo recetor de ativação mecânica das proteínas contrácteis actina e miosina. Uma mudança de potencial de membrana ou através de canais iónicos na membrana plasmática também podem ativar a contração das células (Webb, 2003).

A contração do músculo liso deve-se ao papel dos filamentos da actina na ativação da atividade ATPase da miosina e do ciclo das “pontes cruzadas” que está bem estabelecido. O ciclo de pontes cruzadas de actomiosina é reconhecido como o mecanismo fundamental para o desenvolvimento de uma tensão que leva ao encurtamento de todas as formas do músculo assim como na contração das células não musculares (Gunst and Zhang, 2008).

A ativação da miosina por um estímulo contráctil permite que os filamentos de miosina deslizem pelos filamentos de actina através da atividade ATPase da cabeça da miosina resultando num encurtamento (contração) ou num gerar de tensão pelas células. Nas SMC a actina está ligada a proteínas que por sua vez estão ligadas ao citoesqueleto e também se apresentam ligadas dentro do citosol aos corpos densos das SMC que são compostos primeiramente por α -actinina (Gunst and Zhang, 2008).

A polimerização da actina possuiu um papel importante no mecanismo de contractilidade das SMC. O aumento da concentração F-actina (estado filamentoso) e a diminuição da concentração G-actina (estado solúvel) ocorre quando as SMC ou os tecidos são ativados pelo estímulo contráctil (Gunst and Zhang, 2008). Estes estímulos contrácteis nas SMC são controlados por hormonas, agentes autocrinos/parácrinos e outros sinalizadores químicos (Cole and Welsh).

Para que a contração ocorra é necessário que a cadeia leve de miosina de 20-kDa (ML20) seja fosforilada pela cinase da miosina de cadeia leve (MLCK) levando à interação molecular da miosina com a actina (Webb, 2003). A atividade ATPase necessita de ATP, esta energia gasta pela ATPase da miosina resulta no deslizar da miosina pela actina, ação necessária para o ciclo de “pontes cruzadas” gerar uma força, levando à contração (Cole and Welsh; Webb, 2003).

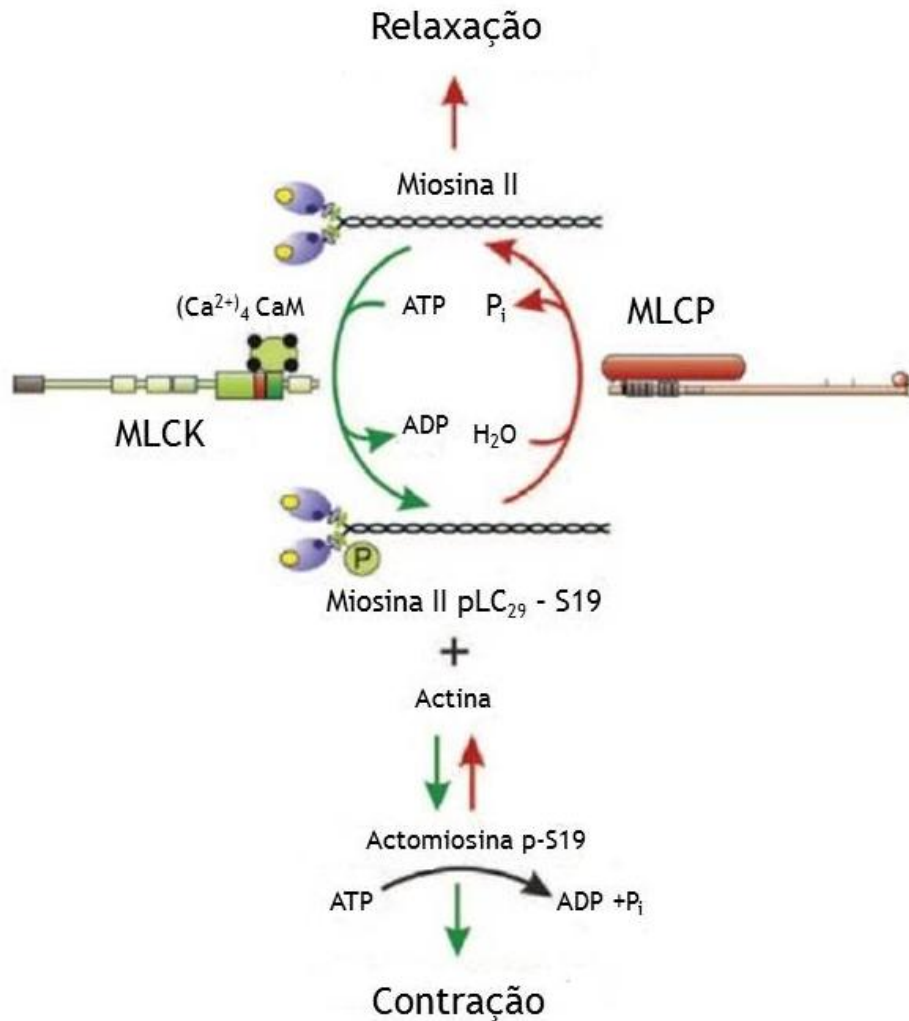


Figura 5 - Regulação da contração do músculo liso através da fosforilação-desfosforilação reversível da cadeia leve regulatória da miosina II (LC20). A cadeia leve da cinase da miosina (MLCK) é ativada pela ligação do Ca^{2+} - calmodulina $((Ca^{2+})_4$ -CaM levando à fosforilação da LC20 na serina 19 que permite interação da actina, a ativação da atividade ATPase da miosina e na presença de adenosina trifosfato (ATP), ligação de pontes cruzadas e contração da LC20 é desfosforilada pela fosfatase da miosina de cadeia leve (MLCP) que induz o relaxamento. O balanço da atividade da MLCK e da MLCP determina o nível de fosforilação da LC20 e da geração de força no estado estacionário (Cole and Welsh).

Diversos estímulos externos provocam respostas fisiológicas nas SMC, devido à existência de recetores e de mecanismos intracelulares de tradução de sinal, nos quais podem participar diferentes mensageiros químicos extracelulares e intracelulares. A concentração de cálcio intra e extracelular é importante e pode levar à contração ou relaxamento das células. Assim o cálcio é um íon importante para a contração nas SMC, é armazenado em reservas intracelulares, nomeadamente no retículo endoplasmático, ou mobilizado do meio extracelular.

Em resposta a um estímulo específico nas SMC, a concentração de cálcio intracelular aumenta, levando a que o cálcio se ligue a uma proteína ácida, a calmodulina (CaM),

induzindo à sua mudança conformacional. Este complexo $4Ca^{2+}$ -CaM actina a cinase MLC que fosforila a cadeia leve de miosina (20kDa) MLC_{20} (ver figura 5).

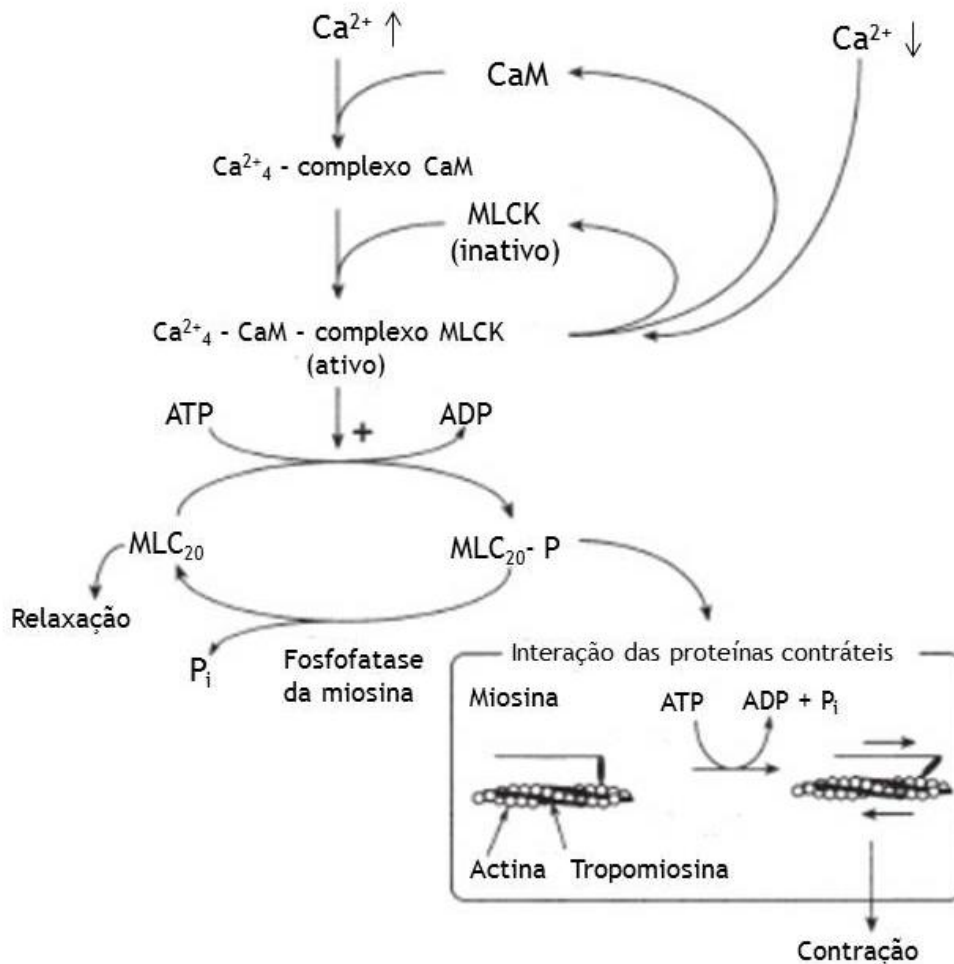


Figura 6 - Papel do cálcio na regulação do estado contráctil das células vasculares do músculo liso. Na via cálcio-calmodulina, a concentração de cálcio o aumenta de $1\mu M$ ou acima leva a contração enquanto o decréscimo da concentração de cálcio até $0,1\mu M$ ou abaixo leva à relaxação. Interações proteínas contrácteis: as proteínas contrácteis são empacotadas em filamentos finos e grossos; os filamentos finos são compostos por actina, tropomiosina e um filamento fino específico que liga proteínas (por exemplo: calponina), enquanto os filamentos grossos são compostos por miosina. Quando MLC_{20} é fosforilada as cabeças das moléculas de miosina estendem-se dos filamentos grossos para se ligarem à actina formando ligações cruzadas. Em associação com a actina a miosina converte energia química ATP num movimento de cabeças que estão ligadas à actina, exercendo uma força nos filamentos finos causando o encurtamento das SMC vasculares. Abreviaturas: setas para cima = aumento; setas para baixo = diminuição; sinal+= estimulação; ADP adenosina 5'-difosfato; CaM= calmodulina; MLCK= cadeia leve da cinase da miosina; MLC_{20} =20kd cadeia leve da miosina (reguladora); MLC_{20} -P= MLC_{20} fosforilado; P_i = fosfato inorgânico. In (Akata, 2007).

Ação dos mensageiros químicos

Diversos estímulos externos provocam respostas fisiológicas nas SMC, devido à existência de recetores e de mecanismos intracelulares de transdução do sinal, nos quais podem participar diferentes mensageiros químicos extracelulares e intracelulares. A superfamília dos recetores associados às proteínas G heterotriméricas (GPCR) possuiu vários recetores para muitas hormonas, neurotransmissores e neuromodeladores com importantes funções fisiológicas. Estes receptores são constituídos por sete domínios transmembranares em hélice alfa, ligados por três ansas intracelulares e três ansas extracelulares. As ansas extracelulares juntamente com a extremidade N-terminal são responsáveis pela ligação ao primeiro mensageiro, enquanto que as ansas intracelulares e a extremidade C-terminal são responsáveis pela ligação às proteínas G heterotriméricas (Kristiansen, 2004).

As proteínas G heterotriméricas são compostas por três subunidades, a α , a β e a γ (Akata, 2007), com massas moleculares de 39-45, 35-39 e 6-8kDa respectivamente (Kristiansen, 2004). A subunidade β e γ formam o dímero $\beta\gamma$ enquanto que subunidade α forma um monómero. Relativamente à subunidade α , esta possui vários tipos, que por grau de similaridade dividem a subunidade α em quatro famílias: G_s (G_s e G_{olf}), G_i (G_{tr} , G_{tc} , G_g , G_{i1-3} , G_o , e G_z), G_q (G_q , G_{11} , G_{14} , e $G_{15/16}$), e G_{12} (G_{12} e G_{13} ; (Cabrera-Vera et al., 2003)) (Kristiansen, 2004). Relativamente ao efeito das subunidades, as G_s , estimulam a adenilato ciclase, as $G_{i/o}$ são inibidoras da adenilato ciclase, as $G_{12/13}$ são activadoras da proteína G monomérica Rho e as $G_{q/11}$ são estimuladoras da PLC (Aittaleb et al.; Cabrera-Vera et al., 2003; Gohla et al., 2000; Kristiansen, 2004).

Todas as proteínas G heterotriméricas seguem o mesmo principal ciclo de activação/inactivação permitindo uma reversível transmissão específica do sinal dentro das células (Cabrera-Vera et al., 2003).

Quando o (difosfato de guanosina) GDP se liga à subunidade α , o complexo associado com as subunidades $\beta\gamma$ para formar um heterotrimerio inactivo. Quando se liga um agonista o recetor torna-se activado e sofre uma mudança conformacional resultado numa maior afinidade para a proteína G. Este por sua vez permite uma libertação rápida da GDP do local de ligação na subunidade α . Em condições fisiológicas o GDP é substituído por uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP) cuja concentração excede a do GDP levando à sua permuta na dita subunidade. A mudança leva a uma redução na afinidade da subunidade α para o complexo $\beta\gamma$ levando à dissociação do heterotrimerio. Estas subunidades dissociadas podem activar várias proteínas efectoras entre as quais canais iónicos, via de sinalização das proteínas cinase activada por mitógenos (MAPK), cinases de tirosina, entre outras. O estado activado da subunidade α dura até a mesma hidrolizar o GTP em GDP pela sua actividade intrínseca de GTPase, voltando depois à sua conformação inicial inactiva, assim como a sua afinidade pelo dímero $\beta\gamma$, formando de novo o complexo inicial (Kristiansen, 2004) (Figura 6).

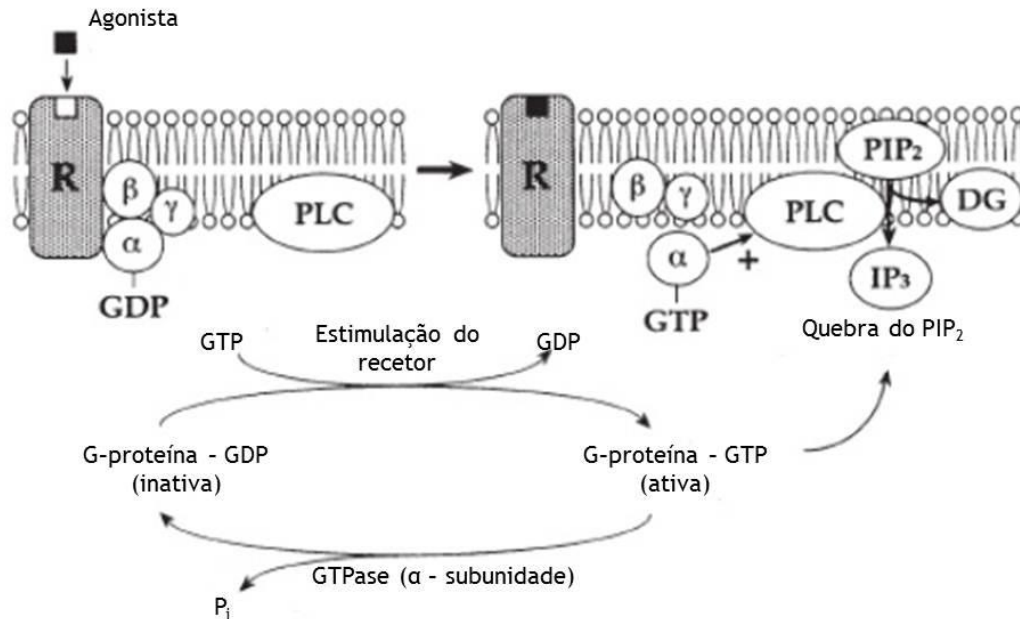


Figura 7 - Ativação da proteína G acoplada ao recetor e que resulta numa quebra do PIP₂ mediada pela PLC

R, recetor; GDP, guanosina-5'-difosfato; GTP, guanosina-5'-trifosfato; PLC, fosfolipase C; PIP₂, fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; proteína G, guanosina-5'-trifosfato ligada a proteína; IP₃, inositol 1, 4, 5-trifosfato; DAG, 1,2-diacilglicerol. In (Akata, 2007)

O aumento do cálcio intracelular é um passo essencial para aumentar a atividade contráctil das SMC vasculares. A proteína G_{q/11} estimula a fosfolipase C beta (PLCβ) que vai catalisar o lípido de membrana, o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em dois importantes segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃). A ligação do IP₃ ao seu recetor específico (IP₃R) no retículo sarcoplasmático induz a libertação de cálcio que por sua vez vai ativar as proteínas contrácteis e iniciar a contração. O outro mensageiro, o DAG, é necessário para ativar a proteína cinase C (PKC): a ativação pelo DAG é realizada em presença de fosfatidilserina. A PKC, que fosforila múltiplas proteínas envolvidas na sinalização das SMC vasculares, vai inibir a fosfatase da miosina, que não é desfosforilada, na cadeia leve da miosina, levando à contração. Outros alvos da PKC que levam também à contração são as cinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK)1/2, a Rho cinase e vários canais na membrana. Esta cinase possui outros alvos como o recetor no retículo sarcoplasmático, o recetor de rianodina (RyR), que é ativado pelo cálcio intracelular, que aumenta e que leva também a uma saída de cálcio do retículo sarcoplasmático (Bastin and Heximer, 2011).

Outra via é a entrada do cálcio pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC) provocando um aumento do cálcio intracelular que se vai ligar ao complexo cálcio-calmodulina que por sua vez ativa o complexo cálcio-calmodulina-cadeia leve da miosina que

é fosforilada por ATP e que posteriormente leva à contração das cadeias de actina e miosina levando à contração do músculo (Akata, 2007; Webb, 2003).

Potencial de membrana

No geral, a contração do músculo liso arterial deve-se a um aumento na concentração de cálcio, podendo este aumento dever-se a diferentes mecanismos: pela ativação induzida por agonistas de recetores específicos, e pela despolarização da membrana.

Regulação do potencial de membrana

Devido às diferentes concentrações dos iões no meio intracelular e extracelular, as células do músculo liso têm um potencial de membrana em repouso que, dependendo do vaso sanguíneo, varia entre -40 e -60 mV. Estas variações levam à contração e ao relaxamento das SMC vascular devido à ativação de canais dependentes de voltagem o que faz com que a concentração intracelular de iões oscile (Jackson, 2000).

Os canais de potássio são os canais iónicos mais abundantes nas células vasculares do músculo liso e controlam a concentração não só de K^+ como de Ca^{2+} . A hiperpolarização ou uma repolarização da membrana celular das SMC ocorre quando os canais de potássio abrem e libertar para o meio extracelular iões de potássio. Este fenómeno ocorre devido ao facto dos VOCC encerrarem e diminuírem o fluxo de iões cálcio para o citosol levando assim ao vasorelaxamento. No sentido oposto, isto é, quando há um aumento de concentração do cálcio no citosol devido à abertura do VOCC, os canais de potássio fecham, o que leva a uma despolarização da membrana e conseqüente vasoconstrição (Jackson, 2000, 2005).

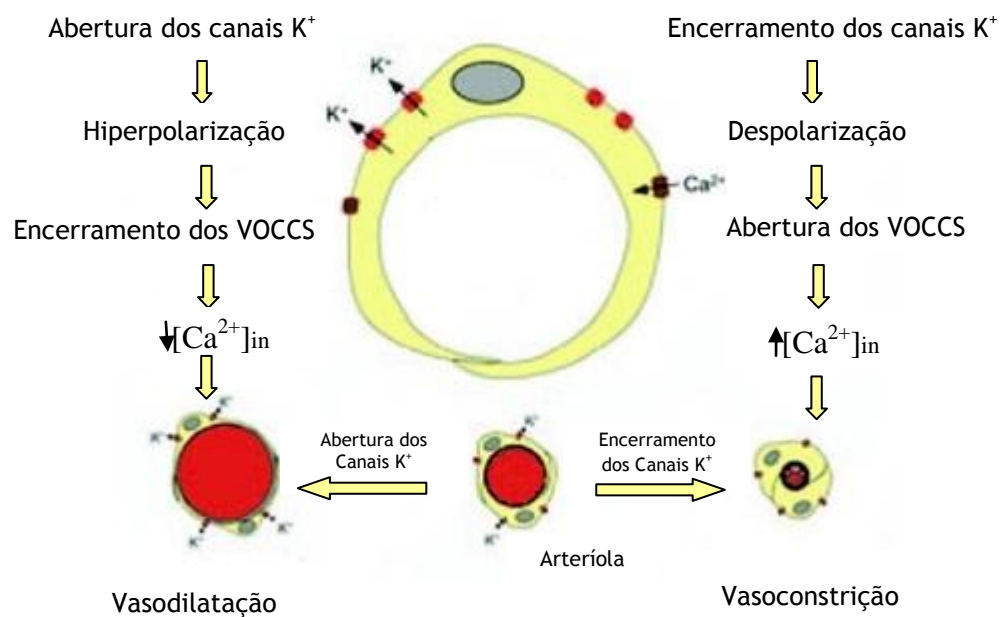


Figura 8 - Canais de potássio regulam o tonus do músculo liso afetando o potencial de membrana. Diagrama esquemático de uma célula do músculo liso arteriolar com canais de potássio abertos ou fechados. Adaptado de (Jackson, 2005).

Os canais de potássio regulam o potencial da membrana nas SMC vasculares. Quando existem diferenças de concentração de cálcio citosólico, os K_{Ca} são ativados provavelmente através da sua subunidade β_1 , que aumenta a sensibilidade ao íon cálcio, possuem um papel importante no tónus de artérias. Eles ajudam na regulação da resposta arterial à pressão e aos vasoconstritores. Os K_V regulam o potencial de membrana em resposta à despolarização da membrana. Os K_{IR} são ativados por hiperpolarização, o que permite um aumento da concentração de íões potássio intracelular quando a membrana se encontra hiperpolarizada e a saída de íões potássio quando o potencial de membrana aumenta, poderão mediar a vasodilatação provocada pelo potássio extracelular. Por fim os K_{ATP} constituem o alvo de estímulos que provocam a vasodilatação entre os quais a hipoxia e a adenosina (Jackson, 2000).

Existem outros canais também muito abundantes nas células, os canais de cloro. O movimento do cloro através da membrana é altamente regulado e grande parte mediado por transportadores e pelos canais de cloro. Os canais de cloro podem-se agrupar em quatro categorias: os canais de cloro com ligando, os canais de cloro ativados por voltagem, os canais de cloro regulados por cAMP e os canais de cloro ativados por cálcio. Estes canais no músculo liso levam a uma despolarização da membrana e mantêm a contração. Possuem assim um relevante papel na regulação do tónus vascular (Huang et al., 2012).

Os VOCC têm um papel importante na regulação do tónus vascular pelo potencial de membrana. A hiperpolarização da membrana leva a que estes canais fechem, provocando assim a vasodilatação, enquanto que a despolarização abre-os tendo como resultado a vasoconstrição.

Canais de Cálcio

As células estão delimitadas por uma membrana impermeável contendo proteínas especializadas que permitem trocas de vários átomos ou moléculas entre meio intra e extracelular. Tradicionalmente dois mecanismos básicos de transporte foram reconhecidos: os canais e os transportadores. Os transportadores como as bombas de cálcio, as bombas de sódio-potássio e o permutador sódio-cálcio que transportam íões contra gradientes de concentração e/ou elétricos e acoplados ao consumo energético. Os canais membranares são vistos como poros que quando abertos permitem a passagem por transporte passivo diminuindo os gradientes elétrico e/ou de concentração (Lacinova, 2005).

A entrada de cálcio para o meio intracelular do meio extracelular envolve vários tipos de canais de cálcio, os quais podem ser classificados canais de cálcio dependentes de voltagem e independentes de voltagem (Guibert et al., 2008). Os canais independentes de voltagem incluem canais como: os canais operados por recetores (ROCs) os quais são regulados por interação agonista-recetor; os canais operados por depósitos intracelulares (SOCs) os quais

são ativados pela liberação do cálcio dos depósitos intracelulares; e os canais ativados por *stress* físico (SACs) os quais são ativados por estiramento das membranas das SMC (Guibert et al., 2008).

Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem (VOCC)

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC) são necessários para a contração do músculo-esquelético, cardíaco e das células musculares lisas incluindo as vasculares (Sonkusare et al., 2006). Estes canais são proteínas membranares que detetam e traduzem as alterações do potencial elétrico da membrana, ou seja, aumentam a entrada do íon Ca^{2+} durante a despolarização e diminuem-na durante a repolarização.

Em termos estruturais, os VOCC são formados por complexos com multi-subunidades onde se distingue a subunidade α , β , $\alpha\delta$ e a subunidade γ que foi detetada no cérebro e no músculo-esquelético, não tido sendo ainda detetada nas SMC. A subunidade α_1 é a maior subunidade (190 a 250 kDa) e nela está incorporada o poro condutor, o sensor de voltagem e a zona de ligação de segundos mensageiros, drogas e toxinas. A subunidade α_1 é formada por quatro domínios homólogos (I-IV), com seis domínios transmembranares, cada um (S1-S6). O segmento S4 foi identificado como o sensor de voltagem. O *loop* entre o segmento S5 e S6 determina a seletividade dos íões e a sua condutância. A subunidade β , intracelular, é transmembranar e ligada por pontes dissulfureto à subunidade $\alpha\delta$ (figura 10) (Morgado et al., 2011).

Com o avançar da ciência, a deteção de novos canais, assim como novas propriedades dos canais, levou a que vários autores denominassem um canal com várias nomenclaturas (Catterall et al., 2005; Sonkusare et al., 2006). A última a ser adotada foi a de Ertel et al. na qual a denominação dos canais segue o esquema $\text{Ca}_v\ x.y$, onde x é o número da subfamília do canal e y o número do membro da subfamília. Esta classificação permite assim dividir os canais em três famílias, de acordo com a sua estrutura e funcionalidade ($\text{Ca}_v\ 1$, $\text{Ca}_v\ 2$ e $\text{Ca}_v\ 3$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Funções Fisiológicas e Farmacológicas dos canais de Cálcio Adaptado (Catterall et al., 2005).

Funções Fisiológicas e Farmacológicas dos canais de Cálcio				
Canal	Corrente	Localização	Antagonistas Específicos	Funções Celulares
Ca _v 1.1	L	Músculo-esquelético, túbulos transversos	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Excitação-contração de acoplamento;
Ca _v 1.2	L	Miócitos cardíacos; miócitos do músculo liso, células endócrinas; corpos celulares neuronais; dendrites proximais	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Libertação da hormona; regulação da transcrição, integração sináptica
Ca _v 1.3	L	Células endócrinas; corpos celulares neuronais e dendrites; cardíaca atrial miócitos e células <i>pacemaker</i> ; células ciliadas da cóclea	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Libertação da hormona; regulação da transcrição, regulação sináptica; <i>pacemaker</i> cardíaco; audição; libertação de neurotransmissores das células sensoriais
Ca _v 1.4	L	Bastonetes da retina e células bipolares, medula espinhal, glândula adrenal; mastócitos	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Libertação de neurotransmissores de fotorreceptores
Ca _v 2.1	P/Q	Terminais nervosos e dendriticos; células neuroendócrinas	ω - Agatoxina IVA	Libertação de neurotransmissores; transientes de Ca ²⁺ dendríticos; libertação de hormona
Ca _v 2.2	N	Terminais nervosos e dendrites; células neuroendócrinas	ω - Conotoxina GIVA	Libertação de neurotransmissores; transientes de Ca ²⁺ dendríticos; libertação da hormona
Ca _v 2.3	R	Corpos celulares neuronais e dendrites	SNX - 482	Disparo repetitivo; transientes de cálcio dendríticos
Ca _v 3.1	T	Corpos celulares neuronais e dendritos; miócitos do músculo cardíaco e liso	Nenhum	<i>Pacemaker</i> ; disparo repetitivo
Ca _v 3.2	T	Corpos celulares neuronais e dendrites; miócitos do músculo cardíaco e liso	Nenhum	<i>Pacemaker</i> ; disparo repetitivo
Ca _v 3.3	T	Corpos celulares neuronais e dendritos	Nenhum	<i>Pacemaker</i> ; disparo repetitivo

Neste trabalho, serão explicados apenas os canais de cálcio tipo L, uma vez que estes são os determinantes para o tónus arterial. Estes canais, os Ca_v1.2, são codificados pelo gene CACNA1C.

Canais de cálcio tipo L (LTCC)

Em condições ideais, a baixa probabilidade do estado aberto dos canais de cálcio Ca^{2+} dependentes da voltagem do “tipo L” (LTCC) nas SMC vasculares é delineado para firmemente regular o influxo de cálcio no tônus vascular e na pressão arterial (Sonkusare et al., 2006).

Estes canais são ativados por despolarizações de membrana mais positivas (a partir dos -20 mV), possuem uma condutância elevada e a sua inativação é mais lenta (300 a 600 ms) (Santana and Navedo, 2009). A entrada de cálcio citosólico via LTCC estimula uma grande liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático via recetor de rianodina (RyR) e recetor de trifosfato de inositol (IP3) (Guibert et al., 2008; Satin et al., 2011).

A modulação do comportamento do canal por fosforilação é ativada através da ligação intracelular dos domínios a moléculas sinalizadores incluindo proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase C (PKC). As ligações intracelulares N e C terminais desta subunidade interagem com a subunidade β e com moléculas de sinalização intracelular. Outra molécula sinalizadora como a proteína cinase G (PKG) fosforila resíduos específicos da subunidade $\text{Ca}_v1.2$ (Yang et al., 2007). Genes para as β subunidades (β_1 , β_2 , β_3 , β_4) foram ainda identificados e, quatro variantes de splicing existentes da subunidade $\alpha_2\delta$. O complexo α_2/δ regula a amplitude das correntes de cálcio e a cinética de ativação/inativação dos canais do tipo L. A subunidade β intervém na regulação da cinética e dos limiares de ativação e inativação destes canais. A estrutura dos LTCC ainda não está totalmente definida mas supõem-se que os canais LTCC, nas SMC vasculares, são constituídos por subunidades α_1 , β e $\alpha_2\delta$, embora das subunidades β só tenham sido reportado a existência de β_2 e β_3 (Sonkusare et al., 2006).

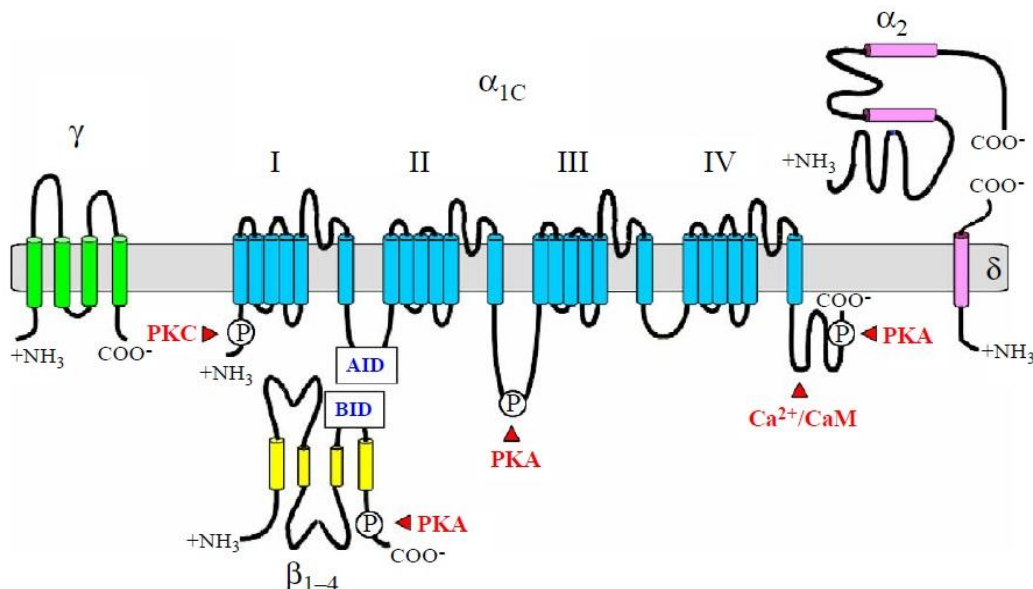


Figura 9 - Topologia proposta para o canal de cálcio tipo L (LTCC) (Sonkusare et al., 2006).

Abreviaturas: AID, domínio interativo α ; BID, domínio interativo β ; CaM , calmodulina; PKA, proteína cinase A; PKC, proteína cinase C. (PKC).

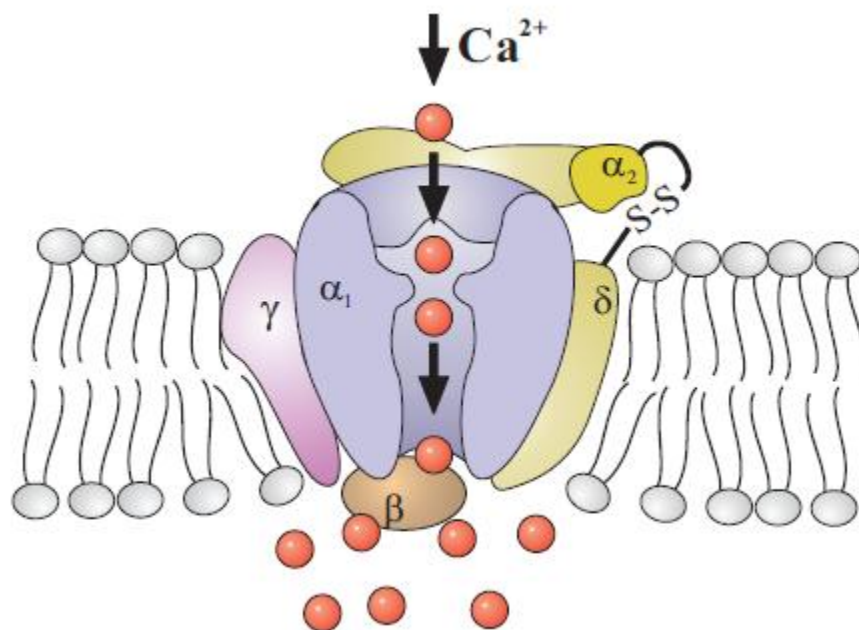


Figura 10 - Esquema hipotético da estrutura geral dos VOCC. A subunidade principal α_1 é uma proteína transmembranar que contém o poro do canal, através do qual os íons de cálcio passam, uma vez aberto. Esta subunidade é regulada pelas subunidades auxiliares, a subunidade β citosólica, o complexo α_2/δ e a subunidade γ transmembranar. In (Lacinova, 2005).

Canais de Potássio

A difusão rápida dos íons de potássio através da membrana é realizada através dos canais de potássio. Este movimento é fundamental em vários processos biológicos, como a proliferação, a secreção hormonal, a regulação do volume celular e a regulação do tônus vascular. Os canais de potássio são proteínas efetoras com múltiplas funções nas SMC vasculares. Uma das funções destes canais é a remodelação da vasculatura pela regulação da migração das SMC, proliferação e apoptose é uma das funções dos canais de potássio. Estes canais são importantes na manutenção do tônus vascular levando à repolarização da membrana que para contrariar e equilibrar as influências vasoconstritoras (Korovkina and England, 2002). Os canais de potássio são os canais iônicos mais abundantes nas SMC vasculares, e têm um papel primordial na regulação do potencial de membrana, controlando diretamente a concentração de potássio e indiretamente a de cálcio (Bonnet and Archer, 2007). Inicialmente Nelson et al. (1995) identificaram pelo menos 3 famílias diferentes de canais de potássio nas SMC. Estes incluem os canais de potássio retificadores internos (K_{IR}), dentro da qual existe a subfamília dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Gutman et al., 2005), os dependentes da voltagem (K_V), e os ativados por cálcio (K_{Ca}) (Nelson and Quayle, 1995).

Em termos estruturas pensa-se que estes canais evoluíram de proteínas com 2 domínios transmembranares como os canais K_{IR} para canais mais complexos como os K_V com 6 domínios transmembranares. O poro também sofreu o processo evolutivo adaptando-se para uma seletividade de íons (Alexander, 2009). Em termos de classificação os canais de potássio

seguem o seguinte esquema na qual o nome dos canais é representado por $K_A x.y$, onde A é o nome da família (K_V , K_{Ca} , K_{IR}), x é o número da subfamília e o y o número do membro da subfamília (Gutman et al., 2005).

Recentemente foram designados, pela União Internacional de Farmacologia (IUPHAR), os nomes da família dos KV assim como os nomes estabelecidos para o gene de cada canal pelo HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (Gutman et al., 2005). A proposta desta nova classificação pela IUPHAR é idêntica à classificação dos canais de cálcio (tabela 4).

Nos próximos subcapítulos serão apresentados em mais detalhe cada um dos canais de potássios que já foram identificados nas SMC vasculares.

Canais de potássio Retificadores Internos (K_{IR})

Os canais K_{IR} estão presentes numa grande variedade de células, incluindo as SMC vasculares. Estes canais caracterizam-se por apresentarem um influxo de íons de potássio a potenciais de membrana mais negativos do que o potencial de equilíbrio, e efluxos deste íon a potenciais de membrana mais positivos que o potencial de equilíbrio. A importância destes canais depende do seu grau de retificação, significando esta uma alteração da condutância do canal com a voltagem. Os canais K_{IR} são ativados pela hiperpolarização da membrana celular, ao contrário dos canais K_V e K_{Ca} , que são ativados pela despolarização da membrana. Estes canais permitem assim o influxo de íons K^+ , quando há hiperpolarização, e a saída deste íon, quando o potencial de membrana aumenta.

Atualmente existem 7 famílias K_{IR} (K_{IR1-7}). Os canais K_{IR} são os canais ancestrais dos canais de potássio e têm só 2 domínios transmembranares (Bonnet and Archer, 2007). Vários estudos demonstram que os canais de potássio retificadores internos têm um longo poro citoplasmático e confirma a importância destes canais apresentarem cargas negativas de aminoácidos nas paredes do poro.

Esta família de canais inclui os retificadores internos fortes ($K_{IR2.1-2.4}$) os ativados por proteínas G ($K_{IR3.1-3.4}$) e os sensíveis ao ATP ($K_{IR6.1-6.2}$) que possuem recetores sulfonilureia (SUR). (Alexander, 2009).

Canais de potássio operados por voltagem (K_V)

Os K_V presentes na membrana do músculo liso vascular são ativados por despolarização da membrana, quando esta atinge um potencial de membrana situado entre os -35 e os -55 mV e constituem um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana e na manutenção do potencial de repouso. Os K_V podem participar no mecanismo de ação tanto de vasodilatadores como de vasoconstritores. Os vasodilatadores podem agir ativando direta ou indiretamente estes canais, enquanto que os vasoconstritores podem fechar estes canais (Jackson, 2000; Ko et al., 2008).

Em termos estruturais, estes canais são geralmente constituídos por quatro subunidades α e uma subunidade auxiliar β . Cada uma das quatro subunidades α pode ter seis regiões ou segmentos transmembranares (S1-S6) em hélice alfa com um N- e C- terminais no citoplasma, com aminoácidos hidrofóbicos, e uma ansa associada à membrana entre os segmentos transmembranares S5 e S6, que formam o domínio do poro do canal (“P-loop”) (Bonnet and Archer, 2007). Além desta subunidade α existem outras subunidades, a subunidade β e outras proteínas da célula (Cox, 2005). Embora existam proteínas acessórias, como as subunidade β , nos canais K_V as quatro subunidades α , rodeiam a zona central, o poro, de estrutura tetramérica. O sensor de voltagem é formado pelos domínios S1-S4 sendo este último segmento (S4) carregado positivamente (uma série de resíduos de arginina) (Bonnet and Archer, 2007), o que confere sensibilidade à voltagem nestes canais. O modelo estrutural revela uma subunidade β tetramérica semelhante à vista com a subunidade α . O local de interação entre as duas subunidades é formado por um “loop” entre cada subunidade α e β o que proporciona uma superfície de acoplamento do tetrâmero α com o seu complementar β . A subunidade beta pode promover uma maior superfície para interações com outras proteínas como cinases, fosfatases e outros complexos de sinalização (Barros et al., 2012).

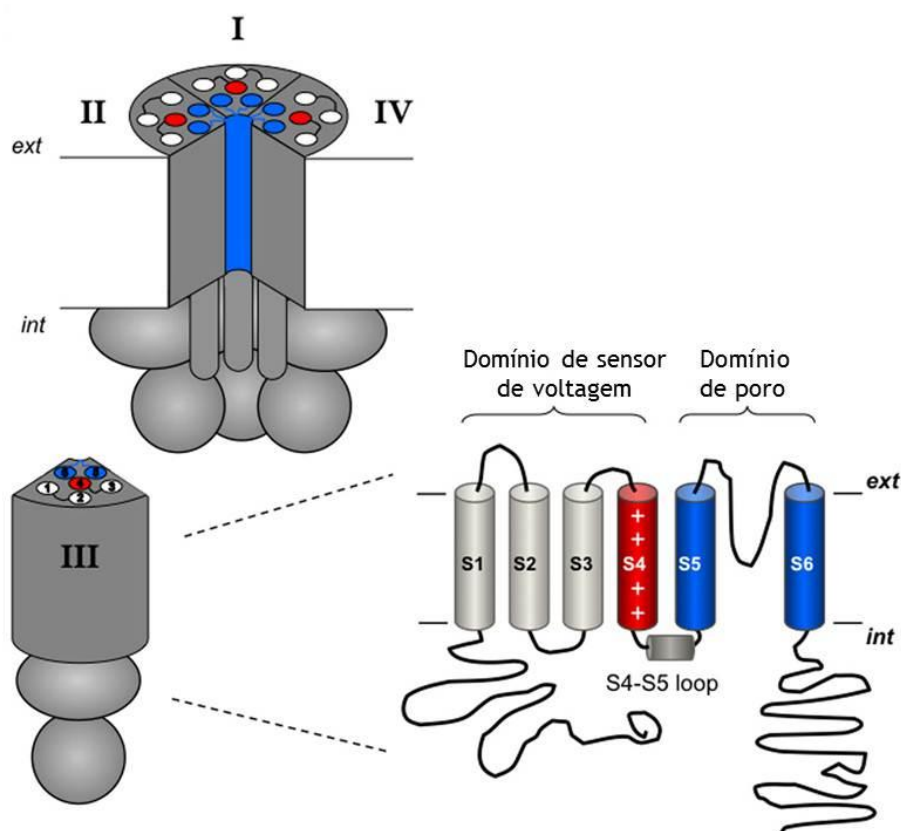


Figura 11 - Representação esquemática da organização tetramérica dos canais K_V . Um modelo estrutural de folding de uma das quatro subunidades α é mostrada à direita. Note que em contraste com uma considerável homogeneia no núcleo transmembranar e na ligação dos loops das hélices transmembranares, largas variações no seu tamanho relativo e posicionamento dos terminais amina e carboxílicos são encontrados em diferentes canais K_V (Barros et al., 2012).

Tabela 4 - Famílias dos canais Kv (Catterall et al., 2002) (Gutman et al., 2005)

IUPHAR	Gene
K _v 1.1	KCNA1
K _v 1.2	KCNA2
K _v 1.3	KCNA3
K _v 1.4	KCNA4
K _v 1.5	KCNA5
K _v 1.6	KCNA6
K _v 1.7	KCNA7
K _v 1.8	KCNA10
K _v 2.1	KCNB1
K _v 2.2	KCNB2
K _v 3.1	KCNC1
K _v 3.2	KCNC2
K _v 3.3	KCNC3
K _v 3.4	KCNC4
K _v 4.1	KCND1
K _v 4.2	KCND2
K _v 4.3	KCND3
K _v 5.1	KCNF1
K _v 6.1	KCNG1
K _v 6.2	KCNG2
K _v 6.3	KCNG3
K _v 6.4	KCNG4
K _v 7.1	KCNQ1
K _v 7.2	KCNQ2
K _v 7.3	KCNQ3
K _v 7.4	KCNQ4
K _v 7.5	KCNQ5
K _v 8.1	KCNV1
K _v 8.2	KCNV2
K _v 9.1	KCNS1
K _v 9.2	KCNS2
K _v 9.3	KCNS3
K _v 10.1	KCNH1
K _v 10.2	KCNH5
K _v 11.1	KCNH2
K _v 11.2	KCNH6
K _v 11.3	KCNH7
K _v 12.1	KCNH8
K _v 12.2	KCNH3
K _v 12.3	KCNH4
K _v B1	KCNAB1
K _v B2	KCNAB2
K _v B3	KCNAB3

Canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca})

Os canais de potássio ativados por cálcio são estão em grande número nas SMC e são considerados de grande importância. Estes canais são ativados por voltagem e por um aumento do cálcio intracelular. Estes canais são divididos em três grandes grupos, os BK_{Ca} (ou MaxiK), que são canais de elevada condutância; IK_{Ca} (ou IK1), que são canais como uma condutância intermédia; e SK_{Ca} , que são canais de baixa condutância. Os canais IK_{Ca} e os SK_{Ca} sensíveis à voltagem, são ativados por baixas concentrações de cálcio intracelular ($<1\mu M$) e, desempenham um papel importante em muitos processos dependentes da sinalização do cálcio em ambas as células elétricas excitáveis e não excitáveis. Não se ligam diretamente ao cálcio mas antes detetam cálcio via calmodulina que é constitutiva de uma região C-terminal. A ligação do cálcio à calmodulina resulta numa mudança conformacional que é responsável pela entrada do canal. Relativamente aos, $KCa1.1$ a ligação ao cálcio não é dependente à sua associação com a calmodulina mas sim pela mediação por, pelo menos três locais de ligação de cationes no domínio carboxílico no citoplasma em cada subunidade do canal (Wei et al., 2005).

Tabela 5 - Nomes IUPHAR dos membros dos grupos dos canais de potássio dependentes de cálcio com a designação do seu gene (Wei et al., 2005).

IUPHAR	HGNC	Outro
K_{Ca} 1.1	KCNMA1	Slo, Slo1, BK
K_{Ca} 2.1	KCNN1	SK_{Ca} 1
K_{Ca} 2.2	KCNN2	SK_{Ca} 2
K_{Ca} 2.3	KCNN3	SK_{Ca} 3
K_{Ca} 3.1	KCNN4	IK_{Ca} 1
K_{Ca} 4.1	KCNT1	Slack, Slo 2.2
K_{Ca} 4.2	KCNT2	Slick, Slo2.1
K_{Ca} 5.1	KCNU1	Slo3

BK - canais de potássio de grande condutância; SK - canais de potássio de pequena condutância;

IK - canais de potássio de condutância intermédia

Em relação aos BK_{Ca} , o componente mínimo mas necessário para sua a atividade é a subunidade que forma o poro, subunidade α , formada por tetrâmeros desta proteína. Existe outra subunidade que também é expressa nos BK_{Ca} que é a subunidade B1 encontrada nas SMC vasculares onde é largamente expressa.

Os canais BK_{Ca} apresentam 11 segmentos transmembranares (S0-S10), onde os segmentos (S0-S6) constituem a parte central do canal, e os segmentos S7-S10 são os responsáveis pela sensibilidade do canal ao Ca^{2+} . O segmento S0 interage com a subunidade B, que é a grande

responsável pela cinética de abertura e encerramento do canal. Existem quatro tipos de subunidade β (β_1 , a única presente em SMC, a β_2 de células cromafins de rato, β_3 de testículos e β_4 do cérebro (Ghatta et al., 2006)). Os segmentos transmembranares S1-S4 formam o módulo responsável pela sensibilidade à voltagem. Concretamente, o segmento S4 de cada domínio homólogo carregado positivamente funciona como um sensor de voltagem para a ativação. Na zona intracelular da membrana onde o canal está localizado há um terminal carboxílico (Ghatta et al., 2006; Orio et al., 2002).

O poro, constituído pela subunidade α , produz o seu efeito primário no aumento da estabilidade do estado aberto do canal. Pequenas mudanças nas concentrações de cálcio são funcionalmente importantes para a afinidade do cálcio nos estados abertos e fechados. Embora aumente a sensibilidade do cálcio/voltagem do canal BK, a subunidade β também modifica a cinética e altera as suas propriedades farmacológicas. Esta subunidade diminui a cinética de ativação e desativação do canal.

A subunidade β é codificada pelo gene da subunidade β_1 dos BK_{Ca} (*KCNMB1*) mapeado no cromossoma humano 5q34 (Genbank accession number U25138), enquanto o gene para a subunidade α está situado no cromossoma 10q 22-23 e é denominado por *KCNMA1* ou (*hSlo*; Gene ID: 3778). (Kotlikoff and Hall, 2003).

A subunidade β_1 aumenta a sensibilidade dos BK_{Ca} ao cálcio alterando a afinidade aparente ao local de ligação. Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado que a associação da subunidade formadora do poro α , com os diferentes fenótipos de subunidades β no tecido nativo é determinante na determinação das propriedades do canal, pode modificar as propriedades farmacológicas e a dependência da voltagem, a aparente sensibilidade ao cálcio e a cinética do agregado que forma o canal (Ghatta et al., 2006).

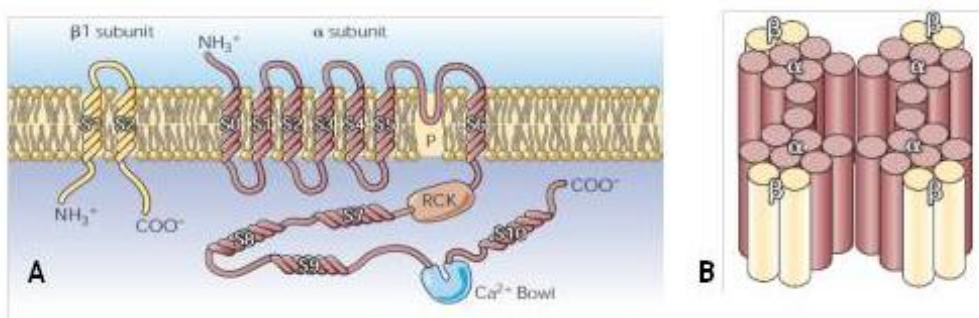


Figura 12 - Diagrama esquemático dos BK. (A) Estrutura de subunidades α e β : dos canais BK. A subunidade β_1 consiste em 2 domínios transmembranares e a subunidade α 11 domínios transmembranares (S0 - S10). Domínios hidrofóbicos localizados S0-S6 na membrana citoplasmática e a região do poro entre S5 e S6. (B) Associação de quatro subunidades α e quatro subunidades β que formam o canal BK nativo. In (Ledoux et al., 2006).

Testosterona

Generalidades

A testosterona (17 β -hydroxy-4-andosten-3-ona) é sintetizada nas células de Leydig. A Tes é regulada por um feedback negativo envolvendo a hormona libertadora da gonadotropina GnRH e principalmente a hormona leuteinizante (LH). Durante o desenvolvimento existem várias alturas em que há maiores concentrações de androgénios como nas 12 semanas de gestação, logo a seguir ao nascimento existe outro aumento da testosterona que só voltam a aumentar, nos homens, quando estes chegam à puberdade. Até lá os níveis de testosterona nos homens e nas mulheres são baixos e similares. Quando os homens atingem a puberdade o sistema hipotalâmico-hipofisiário liberta GnRH e LH de forma pulsátil o que leva a que as células de Leydig atinjam a maturidade e sintetizem testosterona em grandes quantidades (Basaria and Dobs, 2001).

A síntese diária da testosterona é realizada nos testículos, onde grande parte é produzida (0,24 μ mol/dia), e no córtex adrenal das glândulas supra-renais, que produz (0,002 μ mol/dia) de androgénios principalmente androstenediona. A sua concentração é máxima de manhã e diminui durante o dia até à noite. A concentração, no homem, da Tes diária no plasma varia entre 3,1ng/mL e 8,4ng/mL (Basaria and Dobs, 2001; Ng and Yuen, 2003). Nas mulheres a Tes também está presente embora em concentrações muito inferiores 0,15-0,46 ng/mL (Braunstein et al., 2011). Uma grande percentagem da testosterona é transportada na corrente sanguínea ligada a proteínas do plasma pela hormona sexual de ligação à globulina (SHBG), que é a proteína com maior afinidade para se ligar a Tes. Contudo a Tes também se pode ligar a outras proteínas séricas, como a albumina, com quem possui fraca afinidade, ficando prontamente disponível para entrar nos tecidos quando necessária (Basaria and Dobs, 2001; Jones et al., 2003). Em diferentes tecidos, a testosterona pode ser convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela ação da 5 α -reductase. A DHT (17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-ona) é o androgénio mais ativo, em termos genómicos, pois tem mais afinidade pelos recetores de androgénios, contudo a sua concentração plasmática é muito mais baixa do que a da testosterona (0,5nM-2,5nM nos homens) (Kalthorn et al., 2007). 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 (Jones et al., 2003).

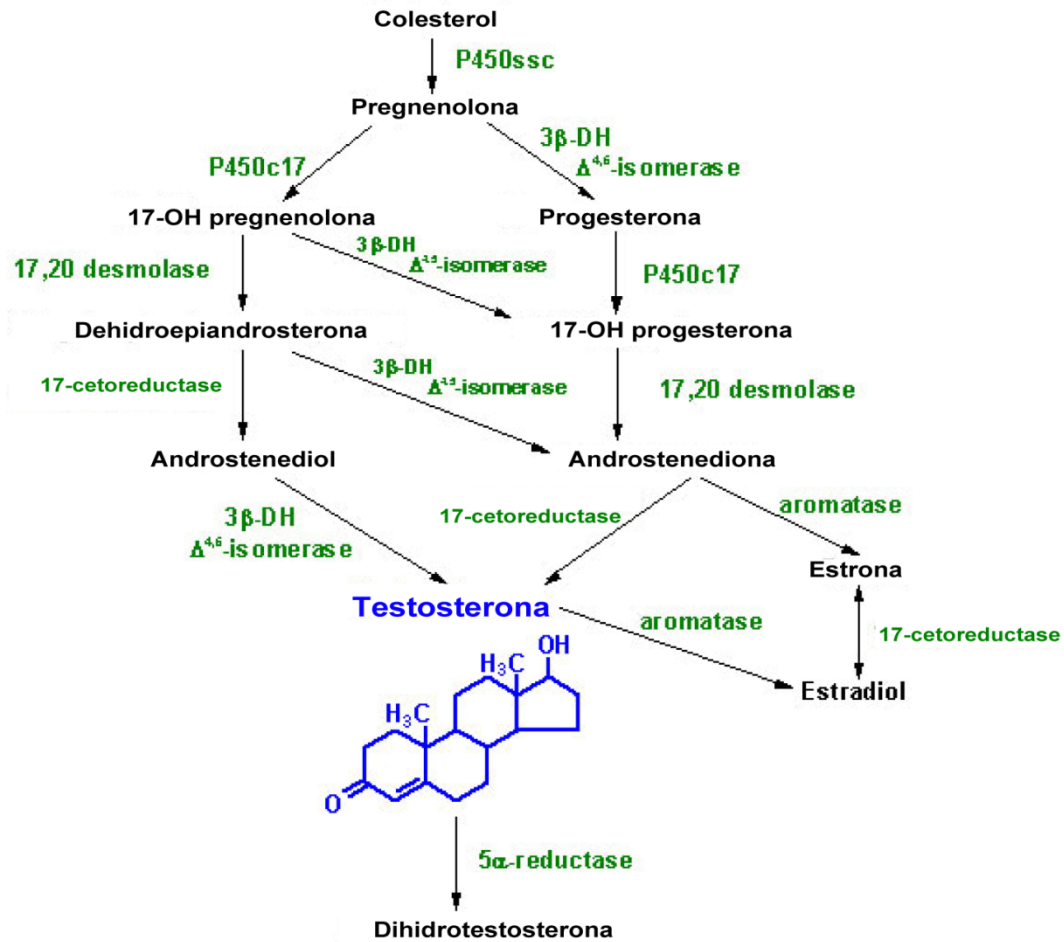


Figura 13 - Mecanismo da formação da di-hidrotestosterona, um potente metabolito da testosterona (Rodrigues, 2009).

Tradicionalmente era considerado que a ação dos esteroides sexuais, incluindo a testosterona e o seu metabolito 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. Este mecanismo de ação é semelhante ao de outras hormonas com estrutura química de esteroide. No geral, os efeitos produzidos por este tipo de mecanismo de ação são designados como “efeitos genómicos” pelos investigadores. Recentemente foi demonstrado que, para além desta 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 (Foradori et al., 2008; Jones et al., 2003).

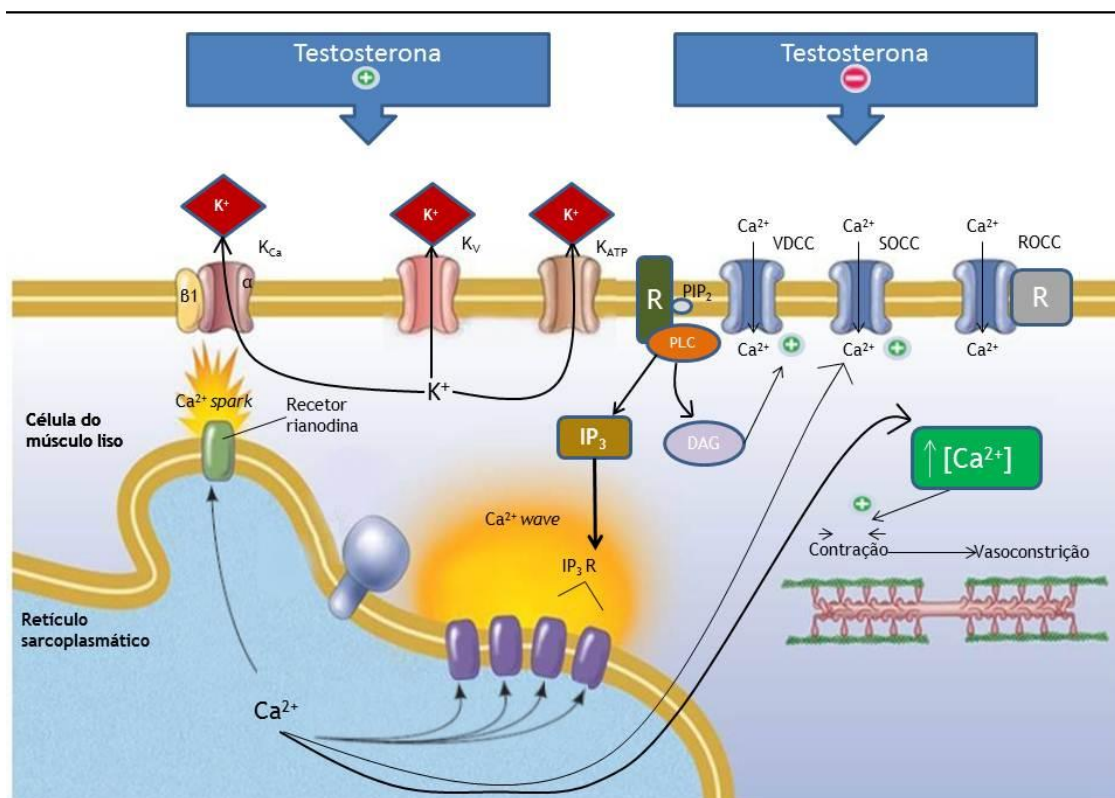


Figura 14 - Locais propostos da ação da Testosterona que levam à sua atividade vasodilatadora.

Abreviaturas: $[Ca^{2+}]_i$ = aumento do cálcio intracelular ; IP_3 = inositol trifosfato; IP_3R = recetor do IP_3 ; PLC = fosfolipase C; PIP_2 = fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; SOCC = canais de cálcio operados por depósitos Intracelulares ROCC = canais cálcio operados por recetores; VDCC = Canais de cálcio dependentes de voltagem K_{Ca} = Canais de potássio ativados por cálcio; K_V = canais de potássio operados por voltagem; K_{ATP} = canais de potássio sensíveis a ATP. Adaptado de (Jones et al., 2003; Yildiz and Seyrek, 2007).

Mecanismo Vasodilatador da Testosterona

Como foi referido anteriormente a Tes e o seu metabolito, a DHT, ligam-se ao AR. A ligação da hormona ao recetor vai levar a uma interação direta com o DNA do núcleo o que leva a uma transcrição de genes e consequente produção de proteínas (via genómica) (Jones et al., 2003; Yildiz and Seyrek, 2007). A DHT é biologicamente mais ativa que a Tes e ligação ao recetor de androgénios com 15 vezes maior afinidade que a Tes (Lopes et al.).

Vários estudos, como o de Yue et al., 1995; Tep-areenan et al., 2002; Jones et al., 2002a, utilizaram flutamida como agonista dos AR demonstrando que os AR não estavam envolvidos no mecanismo vasodilatador da testosterona (via não-genómica) (Jones et al., 2003).

O facto de, que a ação vasodilatadora da Tes é não-genómica é suportada por uma variedade de evidências que mostram que o vasorelaxamento induzido pela Tes persiste: a) quando a Tes é covalentemente ligada à albumina e não consegue atravessar a membrana celular; b) na presença de inibidores de transcrição ou de translação de DNA; c) na presença de

antagonistas de recetores de androgénios (AR) como a flutamida e d) deficiência em AR em ratos feminizados (Perusquia et al., 2012).

A testosterona por ação da aromatase converte-se em 17beta-estradiol. O 17 beta-estradiol leva ao vasorelaxamento dos vasos o que pode levar a que o efeito da Tes seja confundido com o do 17beta-estradiol. Em vários estudos utilizaram inibidores da aromatase que demonstraram que o efeito não genómico da Tes não é devido ao estradiol (Yildiz et al., 2005). Noutro estudo também foi observado que a DHT, que não pode ser convertida em estradiol produz um efeito vasodilatador semelhante ao da Tes (Montano et al., 2008).

O papel do endotélio no vasorelaxamento induzido por androgénios tem sido matéria de debate e, continua controverso onde a maioria dos autores como (Cairrao et al., 2008; Deenadayalu et al., 2001; Ding and Stallone, 2001; Jones et al., 2003; Seyrek et al., 2007) sugerem que o mecanismo de vasorelaxação é independente do endotélio (Perusquia et al., 2012). Existem alguns estudos que demonstram uma pequena interação entre o efeito da Tes e do endotélio, porém a grande parte do efeito vasodilatador provém da ação direta da Tes no músculo liso vascular (Jones et al., 2003; Yildiz and Seyrek, 2007).

Alguns autores explicam que a Tes possui uma ação vasodilatadora por ativação dos canais de potássio, outros porque é antagonista dos canais de cálcio (Ding and Stallone, 2001; Jones et al., 2003; Yildiz and Seyrek, 2007). Em relação aos canais de potássio os estudos iniciais demonstraram que o efeito vasodilatador da testosterona é devido à ativação dos K_V (Ding and Stallone, 2001), outros estudo que era devido a ativação dos BK_{Ca} (Deenadayalu et al., 2001) e foi também demonstrado que em artérias radiais a testosterona provoca a vasodilatação e que tal efeito é diminuído quando os K_{ATP} são inibidos por ação da gibenclamina (Seyrek et al., 2007). Um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou que a testosterona ativa os canais BK_{Ca} e dos K_V e que a proteína cinase G (PKG) também está envolvida neste processo (Cairrao et al., 2010).

Além do efeito vasodilatador da testosterona devido à ação dos canais de potássio esta possui um efeito antagónico com os canais de cálcio. Existem vários estudos que demonstram o efeito direto desta hormona na inibição dos canais de cálcio (Jones et al., 2003; Perusquia and Stallone, 2010).

Experiências de *patch-clamp* em células de aorta de rato e células (HEK293) transfetadas com a subunidade α_{1C} (Ca_V 1.2) demonstraram que a testosterona inibe os canais tipo L dos VOCC. Scragg et al (2004 e 2007) demonstra primeiro que a Tes é um potente inibidor a concentrações baixas (1nM) nas células HEK293 transfetadas com a subunidade α_{1C} , demonstrando depois mais tarde em aorta de rato que o efeito inibidor da Tes sobre os LTCC era direto e seletivo (Scragg et al., 2007; Scragg et al., 2004). Um estudo mais recente mostra ainda que a Tes pode ser antagonista a baixas concentrações e agonista a altas concentrações dos canais tipo L dos VOCC (Montano et al., 2008).

Estudos de hipertensão demonstraram ainda que durante esta patologia podem existir alterações a nível de expressão e o nível funcional dos canais pode ser afetado sendo assim de grande interesse estudar a sua expressão e funcionamento (Bonnet and Archer, 2007).

Importância da Testosterona no sistema cardiovascular

Ao longo dos anos tem vindo a ser discutida a importância da testosterona nas doenças cardiovasculares. Inicialmente a Tes foi considerada a causa de várias patologias. Nos dias de hoje é verificada o seu efeito benéfico tanto para o homem como para a mulher. Doenças como doença coronária arterial, hipertensão que ocorrem frequentemente em mais em homens do que em mulheres pré-menopausa contrariam com a maior frequência de hipertensão pulmonar primária que ocorre com maior frequência em mulheres pré-menopausa do que em homens. Estudos recentes mostraram que a testosterona (Tes) possui efeitos benéficos a nível cardiovascular e alguns estudos epidemiológicos apontaram para que as pessoas com doenças cardiovasculares possuem baixos níveis de Tes (Cairrao et al., 2008). Hipotesteronémia é associada a altas pressões sistólicas e diastólicas (Cairrao et al., 2008). Vários estudos demonstraram que o estrogénio possuía um efeito vasodilatador assim como a Tes que tem sido alvo de variados estudos (Ding and Stallone, 2001). Elevadas concentrações de Tes são prejudiciais ao homem (Perusquia et al.; Perusquia and Stallone, 2010) enquanto que a terapia hormonal de substituição (Jones, 2010) em determinadas patologias é uma forma de prevenir e/ou reduzir a severidade de doenças cardiovasculares como hipertensão que ainda hoje atinge grande número de indivíduos.

Patologias

Hipertensão

A hipertensão é um desafio para a saúde pública mundial por causa da sua alta frequência e o seu concomitante risco cardiovascular e doença renal (Kearney et al., 2005). Além de ser uma doença que possui riscos a nível renal, e cardiovascular a hipertensão afeta também as mulheres na gravidez. As síndromes hipertensivas na gravidez são a principal causa de morbidez e mortalidade materna e fetal no mundo desenvolvido complicando cerca de 6 a 8% das gestações. A Hipertensão arterial (HTA) na gravidez inclui 4 principais formas de apresentação: HTA crónica, que antecede a gravidez ou é documentada antes das 20 semanas de gestação, pré-eclampsia (PE) / eclampsia, HTA crónica com PE sobreposta e HTA gestacional. A HTA gestacional define-se como uma elevação significativa da pressão arterial após as 20 semanas de gestação em gestantes previamente normotensas, atingindo valores superiores a 140/90 mmHg. Quando os valores de pressão arterial se mantêm acima de 160/110 mmHg de forma sustentada, é considerada grave. A pré-eclampsia (PE) define-se pela presença de proteinúria ($\geq 300\text{mg}/24\text{horas}$) em gestante com HTA (Barra et al.).

Vários autores afirmam que a disfunção de canais iónicos, mais precisamente os canais de potássio e dos canais de cálcio, poderá levar à hipertensão. Defeitos na função do canal de potássio poderá levar a uma vasoconstrição e assim levarem a alterações que podem envolver

mecanismos patogénicos como a hipertensão (Nelson and Quayle, 1995). Em condições experimentais as quais refletem condições fisiológicas nas SMC vasculares de animais hipertensos as correntes eram maiores nos BK_{Ca} e menores nas correntes de K_v (Cox, 2002; Pinterova et al., 2011). Estudos em ratos demonstraram que expressão da subunidade β_1 dos BK_{Ca} em ratos hipertensos severos e hipertensos ligeiros diminui não havendo alteração visível na subunidade α (Amberg et al., 2003; Amberg and Santana, 2003). Além dos BK_{Ca} apresentarem uma função alterada também os K_v apresentam uma função alterada: A sua função é diminuída nas SMC vasculares de animais hipertensos o que poderá levar à despolarização e conseqüente aumento do tónus vascular. Em hipertensão uma diminuição da regulação dos canais K_v foi demonstrada embora a expressão da proteína tenha aumentado (Cox and Rusch, 2002).

Este trabalho tem como objetivo o estudo genómico de canais iónicos das HUAMSC e um primeiro olhar sobre a expressão de vários canais iónicos na hipertensão gestacional.

Objetivos

Ao longo dos anos tem vindo a ser discutida a importância da testosterona nas doenças cardiovasculares. Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a testosterona (Tes) possui efeitos benéficos a nível cardiovascular (Cairrao et al., 2008). A terapia hormonal de substituição (Jones, 2010) em determinadas patologias é uma forma de prevenir e/ou reduzir a severidade de doenças cardiovasculares como hipertensão que ainda hoje atinge grande número de indivíduos. As síndromes hipertensivas na gravidez são a principal causa de morbidez e mortalidade materna e fetal no mundo desenvolvido complicando cerca de 6 a 8% das gestações (Barra et al.)

Foi definido como objetivo o estudo do efeito o estudo genómico, nas HUASMC, de canais iónicos das como os:

BK_{Ca} e suas subunidades α e $\beta 1$;
K_V e as suas subunidades $\alpha 9.3$, $\beta 1$, $\beta 3$;
LTCC e a sua subunidade α_{1C} .

Foi ainda definido outro objetivo que teria como interesse obter um primeiro olhar sobre a expressão de vários canais iónicos na hipertensão gestacional e na pré-eclampsia como os:

BK_{Ca} e suas subunidades α e $\beta 1$;
K_V e as suas subunidades $\alpha 9.3$, $\beta 1, \beta 2$, $\beta 3$;
LTCC e a sua subunidade α_{1C} .

Materiais e Métodos

Preparação do tecido

Pedaços do cordão umbilical foram obtidos (entre 3-7cm) a partir de partos normais com o consentimento informado das mães. Todos os procedimentos levados a cabo com o cordão umbilical foram aprovados pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira EPE (Covilhã, Portugal) em conformidade com a Declaração de Helsínquia. Os cordões umbilicais foram recolhidos dentro de intervalos de tempo não superiores a 10 minutos, após os partos. As amostras do cordão umbilical foram recolhidas em soluções salinas estéreis (PSS; composição, mM: NaCl 110; CaCl₂ 0.15; KCl 5; MgCl₂ 2; HEPES 10; NaHCO₃ 10; KH₂PO₄ 0.5; NaH₂PO₄ 0.5; Glucose 10; EDTA 0.49). A fim de evitar degradação e contaminação dos cordões foram adicionadas à solução de PSS uma mistura de antibióticos, a penicilina (5 U/ml), a estreptomicina (5 µg/ml), a anfotericina B (12.5 ng/ml), e antiproteases (leupeptina 0.45 mg/l, benzamidina 26 mg/l e inibidor de tripsina 10 mg/l).

Cultura de células

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 (Cairrao et al., 2010; Martin de Llano et al., 2007). Brevemente, o cordão umbilical foi lavado com PSS, contendo penicilina (5 U/ml), estreptomicina (5 µg/ml), anfotericina B (12,5 ng/ml) para evitar a contaminação. O cordão umbilical é colocado numa placa de Petri com o mesmo meio de lavagem e mistura de antibióticos e as artérias foram isoladas por dissecação da geleia de Wharton envolvente. Para a obtenção de culturas de HUASMC estes procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar, sob condições de esterilidade. Após o isolamento da HUA, os segmentos desta artéria foram cortados em retângulos, e a túnica íntima foi mecanicamente removida com uma leve passagem de um cotonete estéril sobre a mesma.

A camada de músculo liso vascular foi extraída da parte interior da artéria, utilizando para o efeito pinças estéreis apropriadas. As camadas da túnica média foram cortadas em pequenos fragmentos. Estas camadas de músculo liso foram posteriormente colocadas em frascos de cultura e foi adicionado 2 ml de meio HUASMC, contendo *Dulbecco's modified Eagle's medium F12* (DMEM-F12), 5% FBS, fator de crescimento epidérmico (EGF, 100 ng/ml), fator de crescimento de fibroblastos (FGF, 1 µg/ml), heparina (2 mg/ml), e insulina (5 µg/ml). Os frascos de cultura utilizados no procedimento descrito anteriormente foram revestidos com colagénio (5 µg/cm²) e colocadas a 37°C numa atmosfera de 95% ar 5%.CO₂. O meio de cultura

Efeitos genômicos da di-hidrotestosterona nas células vasculares do músculo liso humano

foi mudado todos os 2-3 dias e as culturas confluentes foram obtidas passado um mês. Subculturas destas células foram obtidas até à sexta passagem.

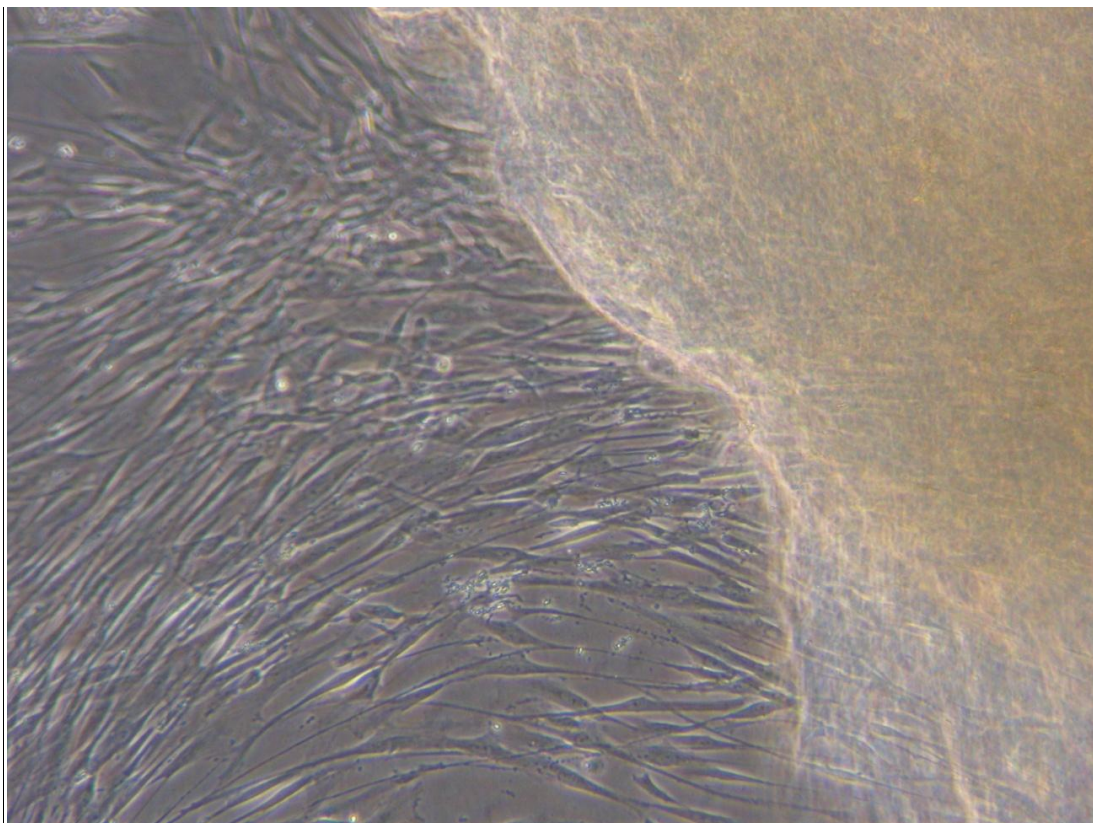


Figura 15 - Camada de músculo liso e subsequentes células do músculo liso de artéria umbilical humana

Preparação do tecido de Amostras Patológicas

A extração das amostras de hipertensão e os seus controlos foram realizados da seguinte maneira: após a extração das camadas do músculo liso o tecido foi primeiro triturado e de seguida foi homogeneizado com a solução Tri reagent™ RNA purification system (Ambion) seguindo-se a extração de RNA. Para a quantificação de RNA (ácido ribonucleico) foi utilizado o NanoPhotometer (IMPLEN, Munich, Germany). O programa de medição foi seleccionado, carregou-se 3µL para a célula de leitura que foi realizada de seguida.



Figura 16 - NanoPhotometer (IMPLEN, Munich, Germany) usado para quantificar as amostras de RNA

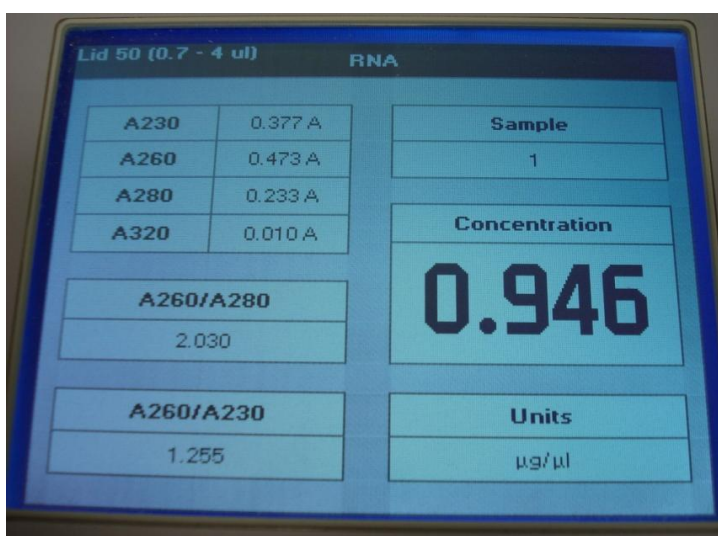


Figura 17 - Programa do NanoPhotometer (IMPLEN, Munich, Germany)

Quantificação de RNA usando NanoPhotometer.

O ecrã mostra a concentração de RNA e rácios de absorção de A260/A280 e de A260/A230. A pureza de RNA foi determinada pelos dois rácios. RNA e DNA absorvem à luz ultravioleta num comprimento de onda de 260nm e as proteínas à mesma luz tendem a absorver a 280nm daí o rácio A260/280 ser usado para medir a pureza do RNA/DNA e respetiva contaminação de proteínas. Soluções de RNA/DNA puras mostraram o rácio A260/A280 deve ser entre 1,8 e 2.0.

Expressão Canais de potássio e cálcio nas HUASMC

O PCR em tempo real foi usado para demonstrar característica do fenótipo de culturas de HUASMC de diferentes passagens (1-6) Foram usados primers para BK_{Ca}1.1. α (KCNMA1 Gene ID: 3778), BK_{Ca}1.1. β ambos de canais de potássio ativados por cálcio humanos e primers da subunidade α 1C dos LTCC. Ainda foram usados primers do housekeeping para o gene humano da β -Actina para adquirir quantidades relativas de DNA de cada uma das amostras.

As células de culturas confluentes de diferentes passagens foram colocadas em meio sem soro durante 24 horas e foram expostas a concentrações de DHT entre 1 e 100 nM por um período de 24 horas. O RNA total foi extraído das HUASMC usando o reagente Tri reagent™ RNA purification system (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. Depois o RNA total (1 μ g) foi desnaturado durante 5 minutos a 65°C numa reação contendo 500 μ M de desoxinucleotidos trifosfatados e 250 ng de primers (Invitrogen) A transcriptase reversa foi realizada a 37°C durante 60 minutos num volume de reação de 20 μ L contendo tampão de transcriptase reversa, 60U de RNaseOUT (Invitrogen), 10 mM DTT, e 200U de Superscript™ II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen). Um microlitro de cDNA foi amplificado numa mistura de reação contendo 10mM dNTPs, 5 U/ μ L de Taq polymerase, e 5pmol ml⁻¹ de primers no tampão fornecido pelo fabricante (Promega, Madison, WI) numa reacção de RT-PCR.

Os primers usados foram os seguintes:

Tabela 6 - Primers utilizados para Real-Time PCR

Nome Primer	Gene	Genbank accession number		Sequências	Tamanho do Fragmento (bp)	Referência Bibliográfica
B-Actina	ACTB	NM_001101	Fw	5'-CATCCTCACCTGAAGTACCC-3'	314	(Zhang et al., 2009)
			Rv	5'-AGCCTGGATAGCAACGTACATG-3'		
KvB1	KCNAB1	NM_003471.3	Fw	5'-TTGCTGTGGAATCATCTCA-3'	231	{Rozen, 2000 #212}
			Rv	5'-CCAGGAGCACAGAACTCACA-3'		
KvB2	KCNAB2	NM_001199860.1	Fw	5'-TGGGCAATAAACCTACAGC-3'	195	{Rozen, 2000 #212}
			Rv	5'-CAGCGACTTGGGAGATCATT-3'		
KvB3	KCNAB3	NM_004732.3	Fw	5'-TCAGAGGGAGAAGGTGGAGA-3'	215	{Rozen, 2000 #212}
			Rv	5'-GGTCCATGACTTTGGCTTGT-3'		
Kv α 9.3	KCNS3	NM_002252.3	Fw	5'-CAGTGAGGATGCACCAGAGA-3'	200	{Rozen, 2000 #212}
			Rv	5'-TTGCTGTGCAATTCTCCAAG-3'		
BK1.1 α	KCNMA1	NM_001014797	Fw	5'-AAGCAACGGAATGGAGGCAT-3'	147	(Bai et al., 2006)
			Rv	5'-CCAGTGAACATCCCAGTAGAGT-3'		
BK1.1 β	KCNMB1	NM_172159	Fw	5'-CAATGTGGTGAACGCAGCC-3'	86	(Bai et al., 2006)
			Rv	5'-TGTGATGCTGAGGCGTGAA-3'		
LTCC α 1C	CACNA1C	NM_001167625	Fw	5'-TGCCTGGAATACGCCCTCAAGG-3'	104	{Rozen, 2000 #212}
			Rv	5'-ACAGGCAGCTCTGGCCGTAGTG-3'		

Usando os primers específicos (Tabela 6), BK α 1.1. α , e subunidade B1, LTCC subunidade α _{1C} (C α V1.2), K α B₁, K α B₂, K α B₃, K α α _{9.3} nas HUASMC e nos tecidos, em cada experiência, foi quantificada a expressão de mRNA por Real Time PCR. A expressão dos canais iônicos foi normalizada usando um primer específico para o gene humano da β -actina como housekeeping (Tabela 6) A eficiência do Real Time PCR (IQ5, Biorad, Hercules) foi realizada usando uma reação de volume total 20 μ L contendo 1 μ L de cDNA, 10 μ L de SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences), 300nM de cada um dos primers. Após a desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, as condições dos 40 ciclos foram as seguintes: 95°C 10s, temperatura de annealing 30s, e 72°C durante 10s. Os fragmentos de PCR amplificados foram verificados por curvas de melting: reações foram aquecidas desde 55°C até 95°C com 10s a cada temperatura (0,05°C/s). Todas as amostras foram executadas em triplicados em cada ensaio de Real Time PCR. As diferenças entre experiências foram calculadas usando o modelo matemático de Pfaffl usando a fórmula:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

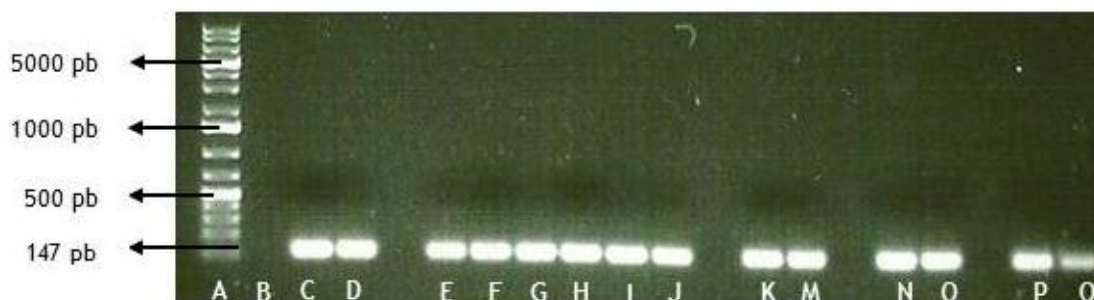


Figura 18 - RT-PCR dos primers da subunidade α dos BK_{Ca} para diferentes concentrações de DHT.

Tabela 7 - Identificação das amplificações da figura 18

A - Marcador de pesos moleculares	B - Controlo Negativo	C - Controlo 5	D - Controlo 6	E - DHT 1 μ M- 1	F - DHT 1 μ M- 2	G - DHT 1 μ M- 3	H - DHT 1 μ M- 4
I - DHT 1 μ M-5	J - DHT 1 μ M- 6	K - DHT 100nM-5	M - DHT 100nM-6	N - DHT 10nM-5	O - DHT 10nM-6	P - DHT 1nM- 5	Q - DHT 1nM- 6

Análise Estatística

Para quantificar a expressão amostras de valores de Ct foram calculados usadas curvas modelo fabricadas a partir do cDNA gerado a partir do gene do housekeeping β -actina das HUASMC. Todos os ensaios foram validados com uma eficiência determinada entre 90% e 105%.

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média das experiências, para cada condição experimental analisada. A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat Statistical Analysis System, versão 3.5. A significância estatística entre os diferentes grupos e o controlo foi analisada usando a one-way ANOVA seguida do teste Dunnet's post hoc.

Os níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos ($P < 0,05$).

Resultados

Análise do efeito da DHT na expressão dos canais iônicos

A expressão de algumas subunidades de canais iônicos nas células do músculo liso das artérias do cordão umbilical foi analisada usando real-time PCR. Algumas células foram tratadas com diferentes concentrações de DHT (1-100nM) ou não foram tratadas o que serviu de controle. Este processo foi seletivo para as subunidades relevantes como demonstradas pelo aparecimento de produtos únicos por análise da curva de melting (exemplo da subunidade $K_v\alpha 9.3$ para várias amostras de hipertensão, figura 20)

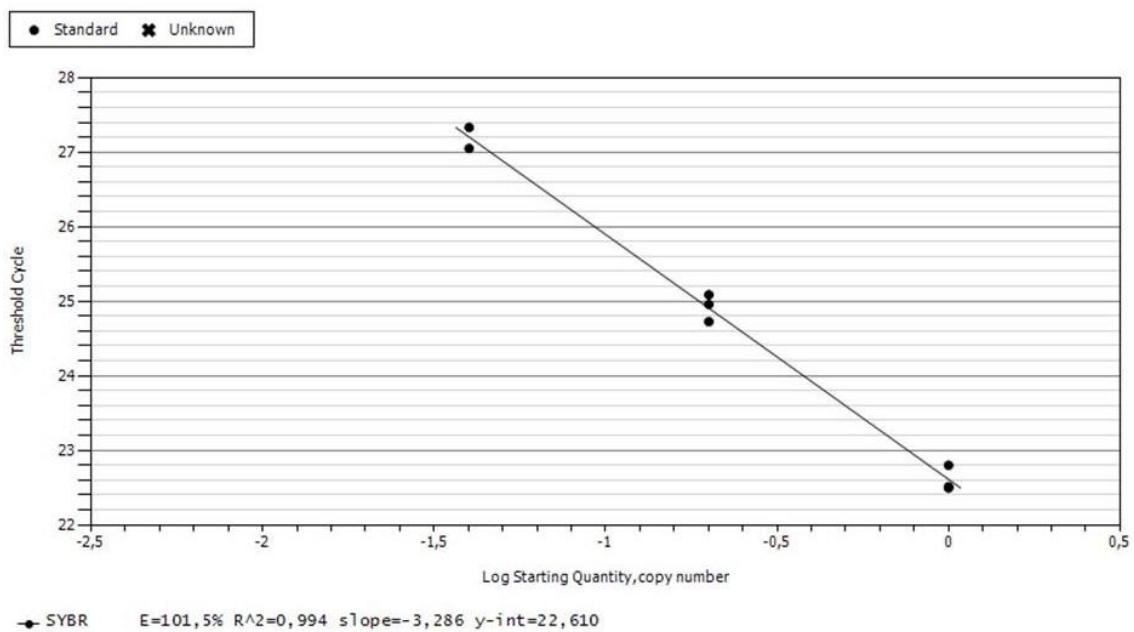


Figura 19 - Reta de eficiência para os primers que codificam para a subunidade $K_v B2$

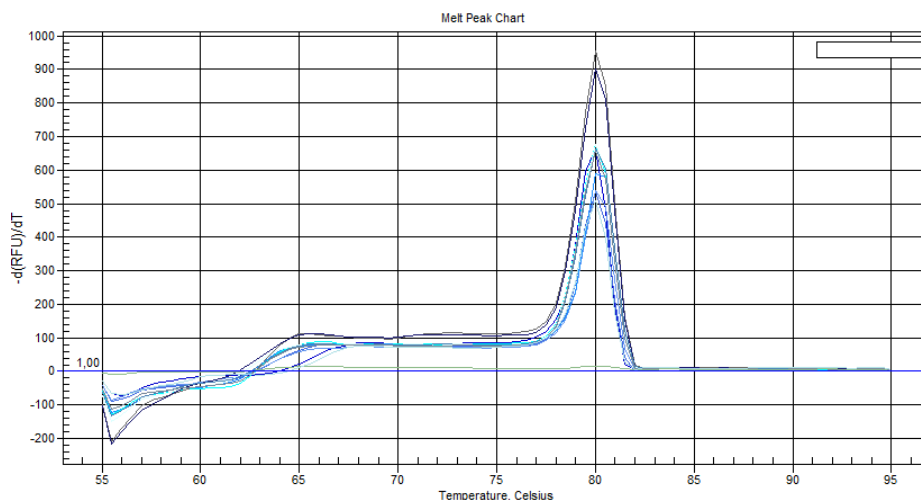


Figura 20 - Análise das curvas de melting de amostras de Hipertensão

Efeitos genômicos da di-hidrotestosterona nas células vasculares do músculo liso humano

Em relação aos BK_{Ca}, as subunidades α - e β 1, a expressão do mRNA codificando para a subunidade α não foi significativamente diferente entre o controle e as células tratadas com diferentes concentrações de DHT (1-100nM) (Fig.21)

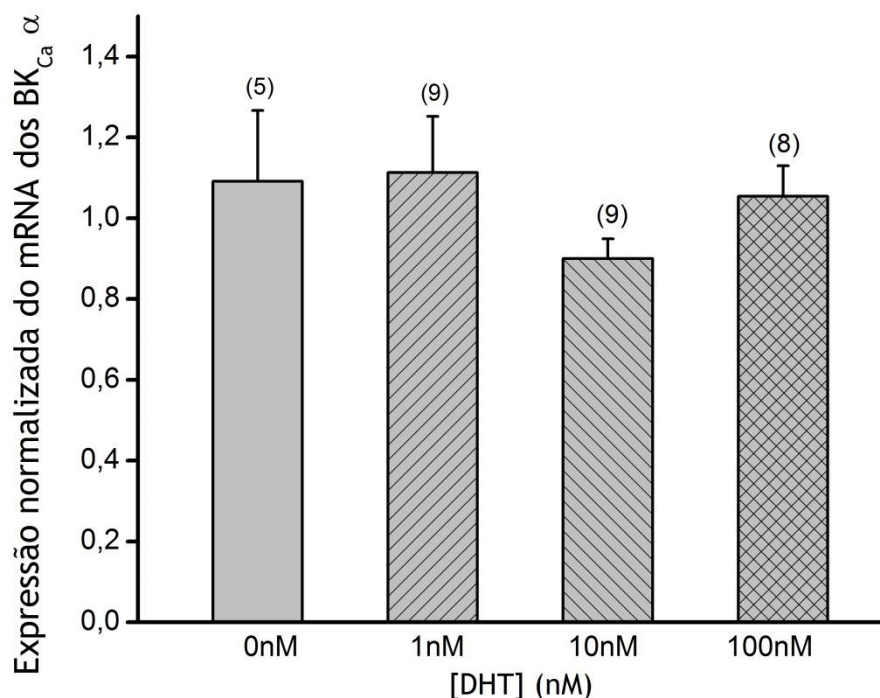


Figura 21 - Efeito da 5 α -DHT na subunidade α dos BK_{Ca} nas HUASMC. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de experiências indicadas entre parênteses. A intensidade relativa da subunidade α dos BK_{Ca} versus β -Actina foi determinada usando one-way ANOVA com Dunnet's post hoc test ($P < 0.05$).

Em relação à expressão de mRNA codificando para a subunidade β 1, a DHT a concentrações de 10nM e de 100nM a sua expressão aumenta significativamente ($P < 0,05$) como mostra a figura 22.

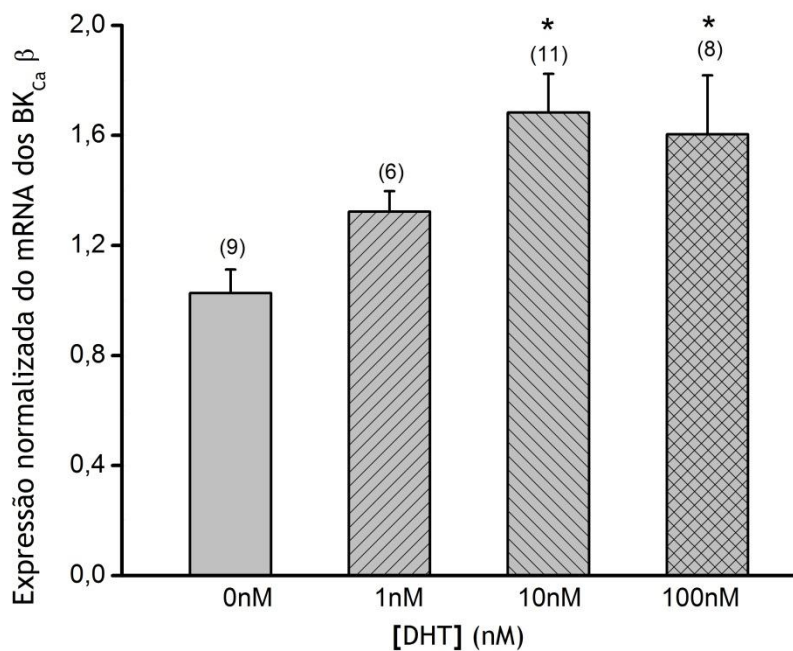


Figura 22 - Efeito da DHT na subunidade B dos BK_{Ca} nas HUASMC. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de experiências indicadas entre parênteses. A intensidade relativa da subunidade B dos BK_{Ca} versus β -Actina foi determinada usando one-way ANOVA com Dunnet's post hoc test ($P < 0.05$).

*Aumento significativo em comparação com o controle, $P < 0.05$.

Por outro lado, o tratamento das células com DHT diminuiu significativamente a expressão da subunidade α dos canais de cálcio tipo L dependentes da voltagem, como mostra a figura 23. Assim nas HUASMC o tratamento com DHT aumenta a expressão dos canais BK_{Ca} e reduz a expressão dos LTCC.

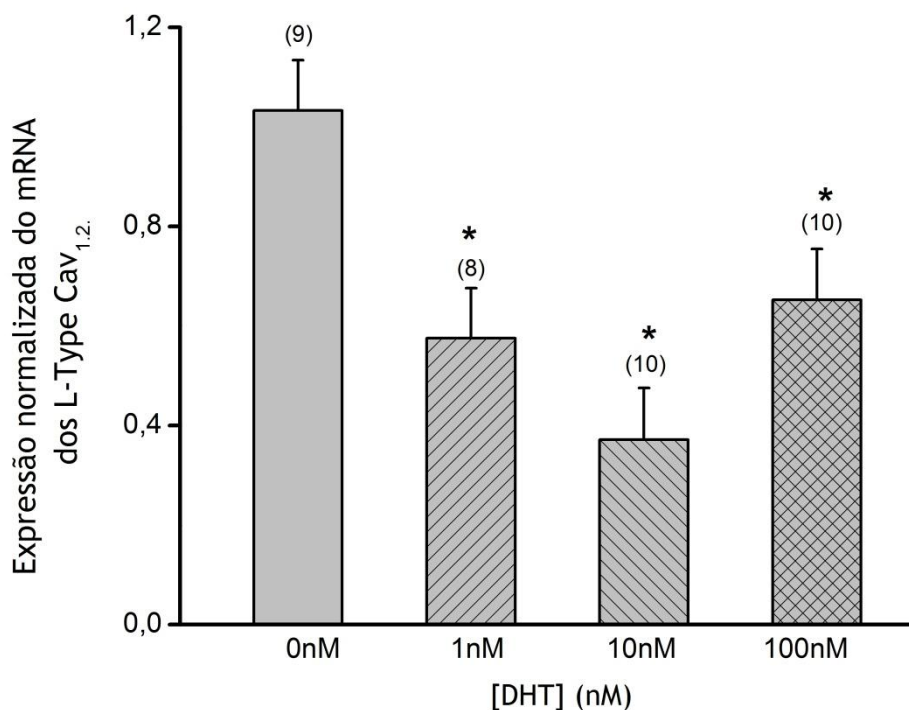


Figura 23 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade Cav1.2 dos nas HUASMC. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de experiências indicadas entre parênteses. A intensidade relativa da subunidade Cav_{1.2} dos LTCC versus β -Actina foi determinada usando one-way ANOVA com Dunnet's post hoc test ($P < 0.05$).

*Decréscimo significativo em comparação com o controlo, $P < 0.05$.

Prosseguindo com o estudo dos canais de potássio realizaram-se experiência em relação aos canais de potássio dependentes da voltagem. Estes estudos são estudos preliminares visto que só apresento valores para 2 HUA.

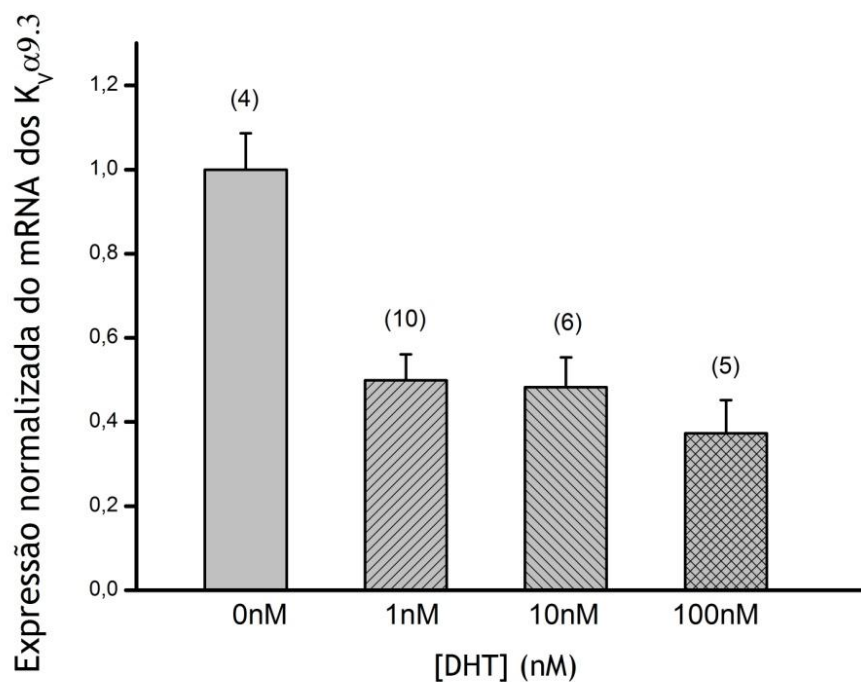


Figura 24 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade $\alpha_{9,3}$ dos K_V nas HUASMC. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de experiências indicadas entre parênteses. Intensidade relativa da subunidade $\alpha_{9,3}$ dos K_V versus β -Actina. Experiência com um número de artérias igual a 2.

Em relação à subunidade $\alpha_{9,3}$ dos K_V , a expressão do mRNA codificando para a subunidade $\alpha_{9,3}$ parece indicar diferenças significativas entre o controlo e as artérias tratadas com diferentes concentrações de DHT (1-100nM) levando-nos a crer que existe uma diminuição da expressão desta subunidade (Fig.24).

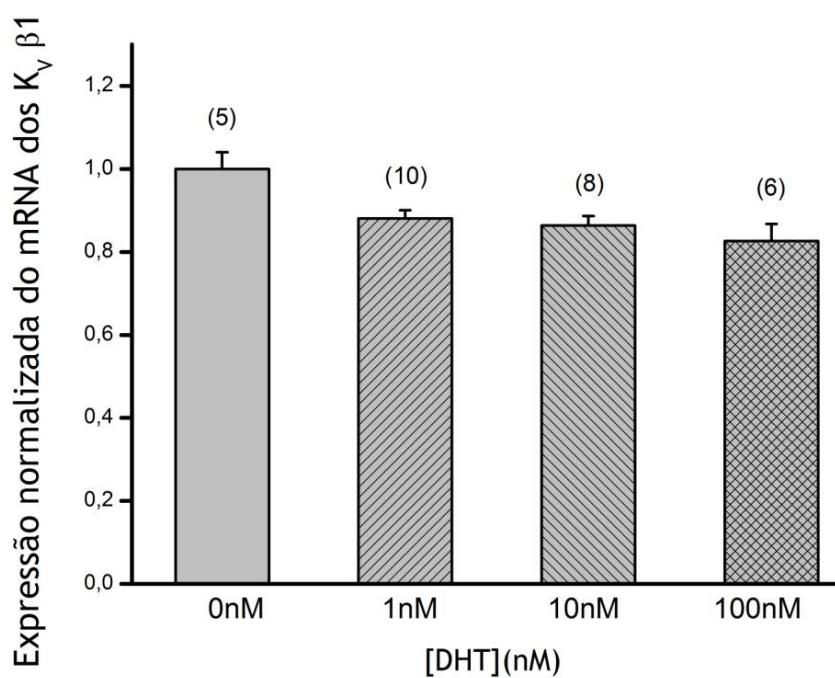


Figura 25 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade $\beta 1$ dos K_v nas HUASMC. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de experiências indicadas entre parênteses. Intensidade relativa da subunidade $\beta 1$ dos K_v versus β -Actina. Experiência com um número de artérias igual a 2.

Em relação à subunidade $\beta 1$ dos K_v , a expressão do mRNA codificando para a subunidade $\beta 1$ não indica ser significativamente diferente entre o controle e as artérias tratadas com diferentes concentrações de DHT (1-100nM) (Fig.25)

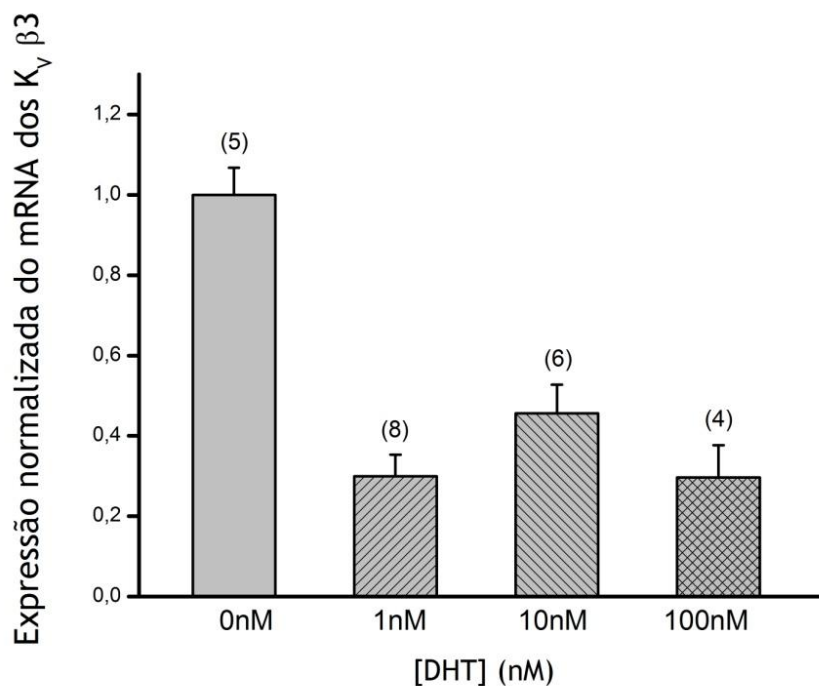


Figura 26 - Efeito de diversas concentrações de DHT na subunidade B3 dos Kv nas HUASMC. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de experiências indicadas entre parênteses. Intensidade relativa da subunidade B3 dos Kv versus β-Actina. Experiência com um número de artérias igual a 2.

Em relação à subunidade B3 dos Kv, a expressão do mRNA codificando para a subunidade B3 leva a crer que existe uma diminuição da expressão desta subunidade. Esta diminuição parece possuir diferenças significativas entre o controle e as artérias tratadas com diferentes concentrações de DHT (1-100nM) (Fig.26)

Neste trabalho foi iniciado um estudo para se verificar a expressão do mRNA dos canais de potássio e cálcio presentes em patologias como a hipertensão gestacional e a pré-eclampsia

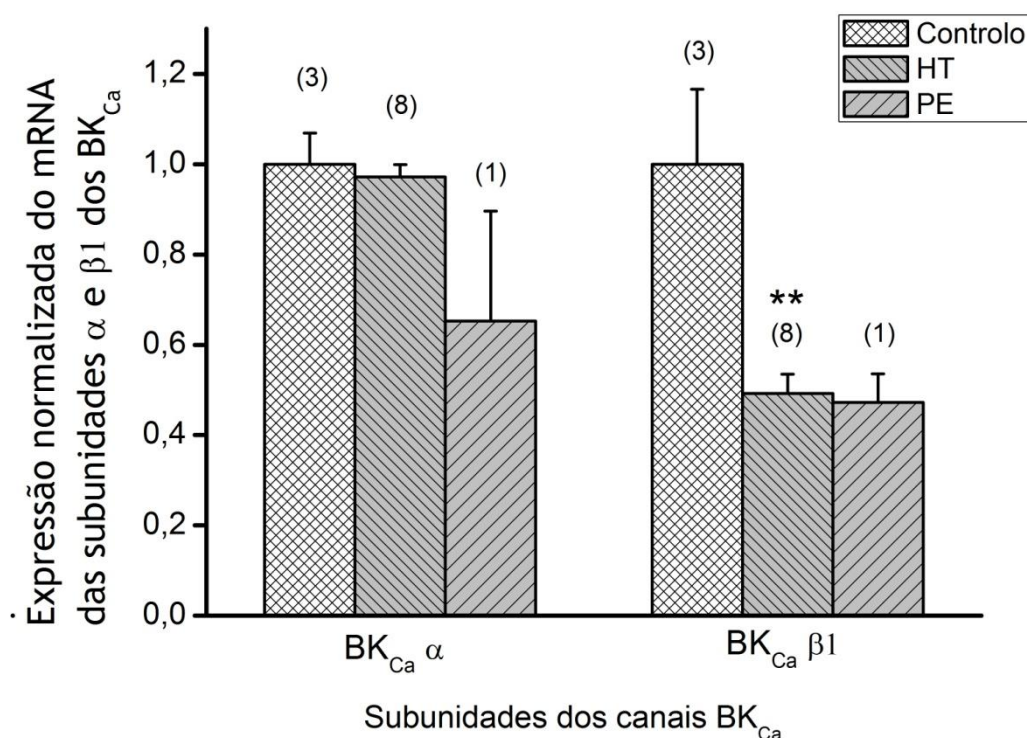


Figura 27 - Estudo da expressão das subunidades dos BK_{Ca} em cordões Hipertensão Gestacional e num cordão de Pré-Eclampsia (P.E.). As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. A intensidade relativa das subunidades α e β1 dos BK_{Ca} versus β-Actina foi determinada

**Decréscimo significativo em comparação com o controlo, P <0.01, utilizando o Teste t-student

Em relação às subunidades α e β1 dos BK_{Ca}, a expressão do mRNA codificando para a subunidade α na hipertensão não indica ser significativamente diferente entre o controlo e as artérias com HTA enquanto que por outro lado a subunidade β1 para o mesmo grupo de artérias possui uma diminuição na expressão em relação ao controlo. No caso das artérias com pré-eclampsia em ambas as subunidades parece existir uma diminuição da expressão das mesmas (Fig.27).

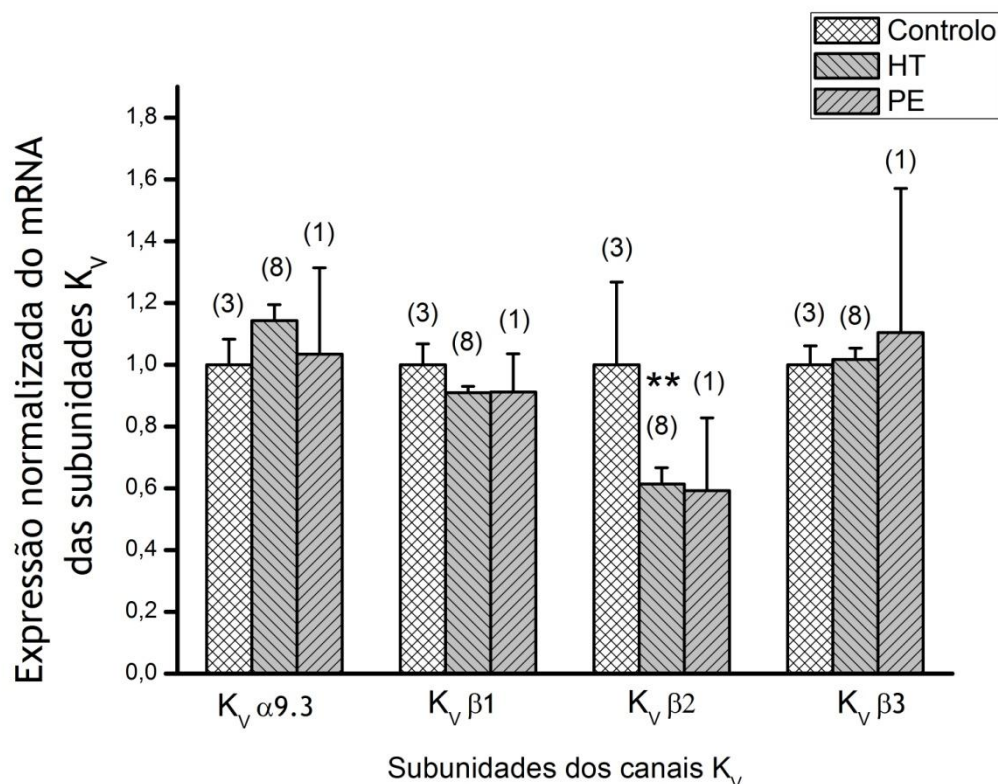


Figura 28 - Estudo da expressão das subunidades dos K_v em cordões Hipertensão Gestacional e num cordão de Pré-Eclampsia (P.E.). As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. A intensidade relativa das subunidades $\alpha 9.3$ $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ dos K_v versus β -Actina foi determinada

*Decréscimo significativo em comparação com o controlo, $P < 0.05$ utilizando o Teste t-student.

Em relação às subunidades $\alpha 9.3$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ dos K_v , a expressão do mRNA codificando para a subunidade $\alpha 9.3$, $\beta 1$ e $\beta 3$ não indica ser significativamente diferente entre o controlo e as artérias com HTA enquanto que por outro lado a subunidade $\beta 2$ para o mesmo grupo de artérias possui uma diminuição na expressão em relação ao controlo. No caso das artérias com pré-eclampsia só na subunidade $\beta 2$ poderá existir uma diminuição da expressão da mesma. (Fig.28).

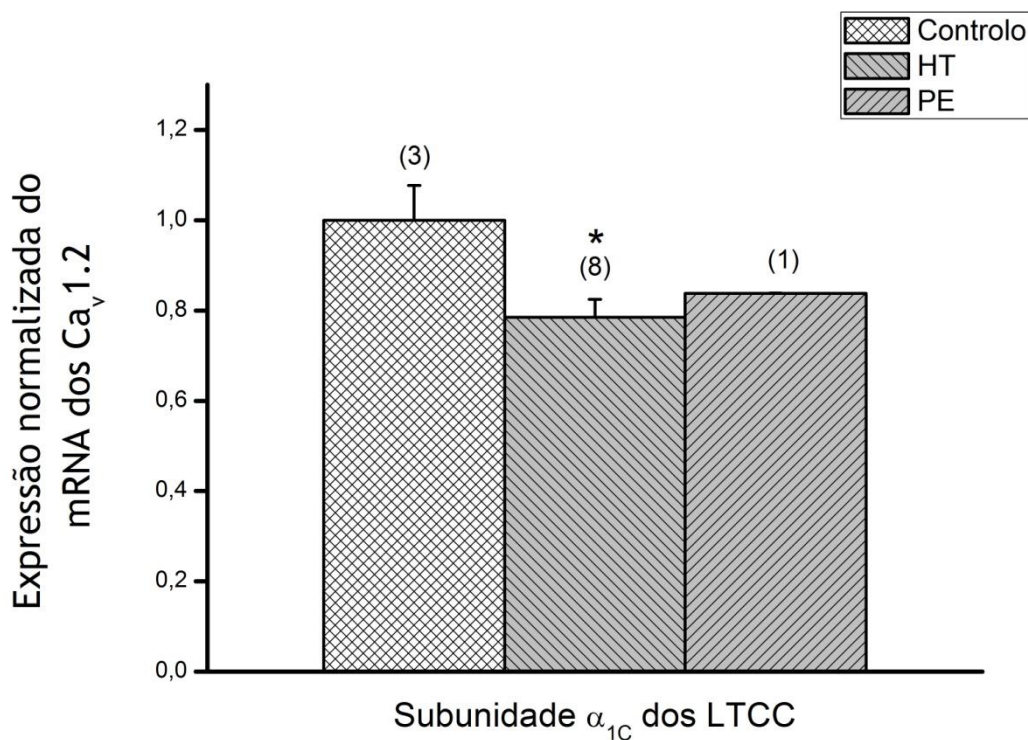


Figura 29 - Estudo da expressão da subunidade α_{1C} dos LTCC em cordões Hipertensão Gestacional e num cordão de Pré-Eclampsia (P.E.). As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. A intensidade relativa da subunidade α_{1C} dos LTCC versus β -Actina foi determinada

*Decréscimo significativo em comparação com o controlo, $P < 0.05$, utilizando o Teste t-student.

Em relação à subunidade $Ca_v1.2$ dos LTCC, a expressão do mRNA codificando esta subunidade indica uma diminuição na expressão em relação ao controlo nas artérias com HTA enquanto que no caso das artérias com pré-eclampsia esta subunidade poderá apresentar também uma diminuição da expressão. (Fig.29).

Discussão

O cordão umbilical humano é uma excelente amostra para a obtenção de células musculares lisas humanas, as quais irão permitir o estudo de diferentes mecanismos celulares e das suas funções. Neste trabalho, o isolamento destas células foi realizado por explantes de camadas de músculo liso de artérias umbilicais humanas. Os procedimentos descritos permitiram o desenvolvimento de culturas de células do músculo liso da artéria do cordão umbilical humano (HUASMC) puras, isto é, sem contaminações de células endoteliais e/ou de fibroblastos. O fenótipo das células obtidas foi analisado previamente pelo nosso grupo, e conclui-se que estas células apresentavam um fenótipo contráctil, e apresentavam canais iónicos funcionais.

Vários estudos realizados nos últimos anos usando variados vasos sanguíneos humanos têm demonstrado que a testosterona é um vasodilatador e que pode modular a atividade de alguns canais iónicos (Cairrao et al., 2008; Cairrao et al., 2010; Perusquia et al., 2007; Yildiz et al., 2005). Diferentes tipos de canais de cálcio e de potássio têm sido implicados no mecanismo vasodilatador da testosterona. Para este trabalho, utilizou-se a di-hidrotestosterona, DHT, em detrimento da Tes, uma vez que a Tes pode ser convertida em estradiol pela ação da aromatase (Jones et al., 2003). Esta e o seu metabolito, a DHT, ligam-se ao recetor de androgénios (AR), a ligação da hormona ao recetor vai levar a uma interação direta com o DNA do núcleo o que leva a uma transcrição de genes e consequente produção de proteínas (via genómica) (Jones et al., 2003; Yildiz and Seyrek, 2007).

A escolha do metabolito DHT para ativar a via genómica, deve-se ao facto de a Tes poder ser convertida em estradiol, o que poderia levar a obtermos resultados em que entrariam os efeitos do estradiol e da Tes. Assim, escolheu-se a DHT para se observarem somente os efeitos dos androgénios nas células dado que esta não é convertida em estradiol. Tornou-se depois importante perceber que concentrações da DHT se deveriam usar. Consideraram-se as concentrações entre 1nM e 100nM como concentrações fisiológicas (Er et al., 2007; Perusquia and Stallone). Neste sentido, após a obtenção de HUASMC em confluência, estas foram incubadas durante 24 horas com concentrações de 5 α -DHT, entre 1nM e 100nM. A exposição das células aos efeitos da DHT tinham como objetivo estudar a expressão de mRNA α e β dos BK_{Ca} e da subunidade Cav1.2 dos LTCC. A expressão da subunidade alfa dos LTCC foi significativamente baixa em células tratadas com DHT comparando com as células não tratadas, os controlos. Tsang et al mostraram que em ratos ovariectomizados há um aumento da expressão da subunidade α_{1C} dos LTCC (Tsang et al., 2004), sugerindo que os androgénios diminuem a expressão dos LTCC. Alguns dados obtidos em cardiomiocitos desafiam esta hipótese. Alguns autores demonstraram que o pré-tratamento com androgénios aumenta a expressão da subunidade α_{1C} dos LTCC em cardiomiocitos (Er et al., 2007; Golden et al., 2002; Golden et al., 2003). Contudo, Golden et al 2003 sugere que estes são os efeitos genómicos dos estrogénios devido à conversão de Tes em estrogénios (Golden et al., 2003). Por outro

lado, gonadectomia em ratos macho diminuem a expressão da subunidade α_{1C} em cardiomiocitos, enquanto que terapia hormonal de substituição de Tes em ratos castrados resulta num aumento dos níveis de mRNA dos LTCC comparando com os controlos (Golden et al., 2002; Golden et al., 2003).

Os resultados obtidos mostram que em artérias tratadas com DHT há uma diminuição da expressão da subunidade α_{1C} dos LTCC, contrariando Er et al (2007) que observou que a indução de androgénios a longo termo aumenta a expressão e a atividade dos LTCC em cardiomiocitos de rato (Er et al., 2007).

Em relação aos canais de potássio ativados por cálcio, mais precisamente os BK_{Ca} este possuem uma subunidade α , a subunidade formadora do poro e que possuem também o domínio transmembranar ligado à voltagem que faz com que estes sejam além de sensíveis ao cálcio também sejam sensíveis à voltagem, e $B1$ cuja subunidade é a única expressa em SMC (Ghatta et al., 2006). Olhando para a expressão destes canais os níveis de expressão da subunidade α dos mesmos não é influenciado pelo estímulo com DHT. Embora a expressão da subunidade $B1$ seja significativamente aumentada com o estímulo de DHT nas concentrações de 10nM e de 100nM. Anteriormente Tsang et al. demonstraram que na aorta de rato os efeitos da deficiência dos estrogénios a longo termo não afetavam a expressão da subunidade alfa ou beta dos canais BK_{Ca} (Tsang et al., 2004). A nível vascular, alguns estudos demonstram que a subunidade beta destes canais é a subunidade reguladora (Lee and Cui, 2010; Morrow et al., 2006). Esta subunidade parece conferir sensibilidade ao cálcio ao canal podendo assim conduzir a uma maior ativação dos canais BK_{Ca} (Sweet and Cox, 2009). Os resultados obtidos mostram uma sobreexpressão da subunidade $B1$ em presença da DHT o que pode induzir a uma mudança na conformação do canal. Ledoux et al (2006) sugere que as mudanças na conformação ou na sensibilidade ao cálcio nestes canais poderão levar a que estes canais atuem como puros K_v (Ledoux et al., 2006). Por outro lado, outros estudos efetuados em ratos mostram que uma diminuição da expressão da subunidade $B1$ nas SMC vascular poderá levar a hipertensão (Amberg et al., 2003; Amberg and Santana, 2003). Embora a subunidade α possa funcionar isoladamente, a subunidade B faz com que a primeira subunidade seja muito mais sensível ao cálcio intracelular, que é o principal estímulo de ativação destes canais, os BK_{Ca} . Os resultados de Zhou et al mostram que a administração de testosterona em ratos castrados provoca uma recuperação da função e expressão dos K_v , que tinham perdido. Neste estudo, também foi demonstrado que o tratamento com a Tes em ratos provocou uma diminuição da hipertensão, uma vez que a castração provocou um aumento da pressão arterial e da pressão sistólica (Zhou et al., 2008). Neste sentido, foi demonstrada uma ligação clara entre a testosterona e a hipertensão e os canais (K_v e os BK_{Ca}).

Por conseguinte, o aumento da expressão da subunidade B observado neste estudo pode levar a um efeito benéfico relacionado com a vasodilatação e a Tes pode possuir um papel benéfico a nível cardiovascular.

A importância dos canais da regulação nas SMC e consequente tónus vascular leva-nos a atribuir a estes a grande importância de perceber a composição molecular, atividade e

expressão dos mesmos em doenças como a hipertensão arterial e em particular a hipertensão arterial na gravidez, hipertensão gestacional, assim como a pré-eclampsia. Os canais de potássio BK_{Ca} e os K_V estão em maior abundância nas SMC. Uma desregulação poderia levar a uma ou mais patologias.

As mudanças de propriedades e de funções dos canais de potássio em SMC vasculares hipertensas foram propostas nos estudos de Jones et al (Cox, 2005). Embora grande parte do interesse se foque nos BK_{Ca} e nos K_V é nestes últimos que as funções alteradas são reconhecidas (Cox, 2005; Cox et al., 2001). Num estudo realizado por Cox (2005) afirma que expressão de gene e proteína de subunidades alfa eram elevadas em pequenas artérias mesentéricas de animais hipertensos. Nesse mesmo estudo ele verificou que existe uma diminuição da corrente dos K_V nas SMC vasculares hipertensas, sendo o cálcio intracelular o responsável pela inibição das correntes dos K_V (Cox, 2005). Em doentes com hipertensão pulmonar primária (HPP), verificou-se que os níveis de mRNA de algumas subunidades alfa são significativamente baixos nas SMC das artérias pulmonares de doentes. A amplitude da corrente de potássio nas SMC das artérias pulmonares destes mesmos doentes é baixa (Mandegar and Yuan, 2002). Esta diminuição da função e da amplitude da corrente nos canais K_V das SMC vasculares de animais hipertensos e em doentes com HPP, pode levar a uma despolarização da membrana assim como ao aumento do tónus vascular (Jackson, 2000; Mandegar and Yuan, 2002; Pinterova et al.). Um aumento de proteína dos canais K_V relacionado com uma diminuição da função dos mesmos foi relatado por Cox et al onde observou que em animais hipertensos o cálcio intracelular pode levar a uma diminuição da regulação (Pinterova et al.). Os nossos resultados em cordões com hipertensão gestacional mostram que em termos da expressão de mRNA só a subunidade B2 sofre uma diminuição da expressão que poderá levar a uma alteração na conformação e atividade do canal assim como diminuição da função do mesmo.

Em relação aos canais BK_{Ca} , os nossos resultados em HUA de grávidas com hipertensão gestacional indicam que a subunidade B1 sofre uma diminuição da expressão e não se verifica o mesmo na subunidade α . Sendo a subunidade B1 a subunidade reguladora do canal e sofrendo esta uma diminuição na atividade do canal, em artérias cerebrais de rato hipertensas, Amberg et al (2003) concluíram nos seus estudos que essa diminuição observada nas ditas artérias inclui uma aparente redução na formação da subunidade B1 resultando na diminuição da expressão da transcrição do gene da subunidade B1 (Amberg et al., 2003). Estes resultados em concordância com os obtidos por nós são contrariados pelos resultados de Liu et al, Navarro-Antolín et al e Chang et al, que verificaram que um aumento da expressão das duas subunidades α e B1 dos BK_{Ca} na hipertensão (Eichhorn and Dobrev, 2007).

Nos canais BK_{Ca} o mecanismo responsável pela corrente dos mesmos, durante a hipertensão, parece sofrer um aumento da expressão da proteína do canal que provavelmente ocorre como feedback negativo em resposta ao aumento do tónus vascular (Pinterova et al., 2011) Em modelos animal, mais especificamente em ratos hipertensos espontâneos, verificou-se um aumento do influxo de cálcio e um aumento da atividade dos BK_{Ca} em SMC de artérias

femorais (Eichhorn and Dobrev, 2007). Neste mesmo modelo animal England et al em aorta, Cox et al em artérias mesentéricas e Liu et al em artérias cerebrais verificaram que a inibição destes canais por bloqueadores específicos causa uma forte despolarização e vasoconstrição (Eichhorn and Dobrev, 2007).

Em relação aos LTCC, os nossos resultados mostram que em HUA com hipertensão a expressão do mRNA da subunidade formadora do poro α_{1C} diminui e em relação aos controles. Contrariando estes resultados, no estudo de Pratt et al referenciado por Sonkusare et al (2006) um aumento da subunidade formadora do poro α_{1C} dos LTCC em artérias de ratos com hipertensão espontânea, comparando com ratos normotensos com pressão arterial normal. A existência desta subunidade sobreexpressa na circulação mesentérica, femoral e renal nos ratos hipertensos leva a crer que esta anormalidade se estenda para outras plataformas vasculares (Sonkusare et al., 2006) o que não se verificou nas HUA com hipertensão gestacional. Contrariando os nossos resultados ao nível da expressão, Sonkusare et al (2006) mostra que expressão da proteína aumentada é associada ao aumento da corrente de cálcio (Sonkusare et al., 2006). A perda do potencial de repouso da membrana resultando na despolarização induzindo a abertura dos canais de cálcio foi observada em SMC vasculares de vários modelos de ratos hipertensos (Sonkusare et al., 2006). Em artérias cerebrais hipertensas para modelo animal específico para o estudo Wellman et al confirmaram que a concentração do cálcio intracelular é elevada nas SMC de artérias cerebrais devido ao potencial de despolarização o que provavelmente reflecta uma diminuição da condutância dos canais K_V aumentando do cálcio intracelular alterava a expressão (Wellman et al., 2001). Em relação ao cordão de pré-eclampsia os resultados levam-nos a crer que existe uma diminuição da expressão do mRNA das subunidades α e β_1 dos BK_{Ca} , uma diminuição da subunidade β_2 dos K_V e nos LTCC uma diminuição da expressão do mRNA da subunidade formadora do poro, a α_{1C} .

Sendo a hipertensão gestacional uma doença que afeta parte das mulheres no mundo ocidental e que tanto ela como a pré-eclampsia põe em risco a saúde das mães e dos fetos é de grande interesse prosseguir o estudo para se verificar quais os canais envolvidos na hipertensão gestacional e pré-eclampsia.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Com os nossos resultados acima descritos podemos confirmar que a-DHT é o metabolito com maior afinidade para se ligar aos recetores de androgénio e assim ativar ou inibir a expressão proteica. No caso da subunidade β dos BK_{Ca} , possível subunidade reguladora da atividade do canal, ativa a expressão da mesma podendo levar a uma maior sensibilização do canal às variações das concentrações de cálcio no meio intracelular. No caso da subunidade $Ca_v1.2$ dos LTCC a DHT inibe a expressão da mesma levando assim a uma redução de influxo de cálcio nas células não havendo por isso a despolarização da membrana e que pode levar à contração das células.

Um estudo inicial para averiguar que canais estarão envolvidos na hipertensão arterial e mais especificamente na hipertensão gestacional e pré-eclampsia demonstrou que nesta patologia a expressão do mRNA da subunidade $\beta 1$ está diminuída. Esta subunidade tem sido ao longo dos últimos anos ligada a esta patologia por experiências realizadas em ratos com knock out do gene de interesse e em vários modelos animais de hipertensão. Além desta subunidade estar diminuída a subunidade $\beta 2$ dos K_v e a subunidade α_{1C} dos LTCC apresentam também uma diminuição da expressão do mRNA dos cordões com hipertensão levando a pensar que esta patologia pode levar a uma diminuição dos canais LTCC e K_v . A única amostra de pré-eclampsia mostra-nos inicialmente que poderá existir uma diminuição das duas subunidades dos BK_{Ca} assim como da subunidade $\beta 2$ dos K_v e α_{1C} dos LTCC.

As células do músculo liso do cordão umbilical, sendo fáceis de obter, leva-nos para novos rumos capazes de desvendar que tipos de sinalização intracelular ocorre e podendo-se estudar com maior proximidade à fisiologia das células humanas. Como é que a testosterona potencia ou não na descoberta das vias não genómicas da mesma levou a um entendimento mais pormenorizado do efeito que ela possui nas células do músculo liso e consequente estudo genómico para completar as vias de sinalização que ambas as vias ativam. O nosso grupo utilizando as células do músculo liso das artérias do cordão umbilical tem obtido alguns resultados promissores quanto ao efeito benéfico da testosterona em doenças cardiovasculares como a hipertensão. A iniciação dos estudos genómicos leva-nos a querer possuir um maior conhecimento de como são expressas diversas proteínas que levam à vasodilatação e à vasoconstrição alterando assim a regulação do tonus vascular.

A continuação do estudo da hipertensão gestacional e da pré-eclampsia, assim como os estudos com várias hormonas que são sintetizadas e produzidas no nosso organismo poderão levar a um possível deslumbre do efeito de que várias hormonas possam ter em algumas doenças como o caso da hipertensão arterial e pré-eclampsia.

Bibliografia

- Aittaleb, M., Boguth, C.A., and Tesmer, J.J. (2010). Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol* 77, 111-125.
- Akata, T. (2007). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth* 21, 220-231.
- Alexander (2009). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition. *Br J Pharmacol* 158 Suppl 1, S1-254.
- Amberg, G.C., Bonev, A.D., Rossow, C.F., Nelson, M.T., and Santana, L.F. (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca(2+) activated K(+) channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest* 112, 717-724.
- Amberg, G.C., and Santana, L.F. (2003). Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension. *Circ Res* 93, 965-971.
- Bai, X., Lacey, H.A., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Turner, M.A., Sibley, C.P., and Fyfe, G.K. (2006). TASK channel expression in human placenta and cytotrophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 13, 30-39.
- Barra, S., Cachulo, M.D., Providencia, R., and Leitao-Marques, A. (2012). Hypertension in pregnancy: The current state of the art. *Rev Port Cardiol*.
- Barros, F., Dominguez, P., and de la Pena, P. (2012). Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol* 3, 49.
- Basaria, S., and Dobs, A.S. (2001). Hypogonadism and androgen replacement therapy in elderly men. *Am J Med* 110, 563-572.
- Bastin, G., and Heximer, S.P. (2011). Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. *Arch Biochem Biophys* 510, 182-189.
- Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K., and Marchant, R.E. (2010). Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 467-491.
- Benirschke, K. (1998). Remarkable placenta. *Clin Anat* 11, 194-205.
- Bonnet, S., and Archer, S.L. (2007). Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 115, 56-69.
- Braunstein, G.D., Reitz, R.E., Buch, A., Schnell, D., and Caulfield, M.P. (2011). Testosterone reference ranges in normally cycling healthy premenopausal women. *J Sex Med* 8, 2924-2934.
- Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., and Hamm, H.E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24, 765-781.

- Cairrao, E., Alvarez, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2008). Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376, 375-383.
- Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2010). PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol* 640, 94-101.
- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57, 411-425.
- Cole, W.C., and Welsh, D.G. (2011). Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys* 510, 160-173.
- Cox, R.H. (2002). Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vascul Pharmacol* 38, 13-23.
- Cox, R.H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 42, 167-195.
- Cox, R.H., Folander, K., and Swanson, R. (2001). Differential expression of voltage-gated K(+) channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 37, 1315-1322.
- Cox, R.H., and Rusch, N.J. (2002). New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation* 9, 243-257.
- Daniel, J.M., and Sedding, D.G. (2011). Circulating smooth muscle progenitor cells in arterial remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 50, 273-279.
- Deenadayalu, V.P., White, R.E., Stallone, J.N., Gao, X., and Garcia, A.J. (2001). Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol* 281, H1720-1727.
- Di Naro, E., Ghezzi, F., Raio, L., Franchi, M., and D'Addario, V. (2001). Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96, 150-157.
- Ding, A.Q., and Stallone, J.N. (2001). Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol* 91, 2742-2750.
- Dobrin, P.B. (1978). Mechanical properties of arterises. *Physiol Rev* 58, 397-460.
- Eichhorn, B., and Dobrev, D. (2007). Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376, 145-155.
- Er, F., Michels, G., Brandt, M.C., Khan, I., Haase, H., Eicks, M., Lindner, M., and Hoppe, U.C. (2007). Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* 41, 467-477.
- Ferguson, V.L., and Dodson, R.B. (2009). Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144 Suppl 1, S108-113.
- Foradori, C.D., Weiser, M.J., and Handa, R.J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29, 169-181.

- Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhashtonay, C., Vandekerckhove, J., Weber, K., and Franke, W.W. (1981). Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 298-302.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., and O'Rourke, S.T. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110, 103-116.
- Gohla, A., Schultz, G., and Offermanns, S. (2000). Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* 87, 221-227.
- Golden, K.L., Marsh, J.D., and Jiang, Y. (2002). Castration reduces mRNA levels for calcium regulatory proteins in rat heart. *Endocrine* 19, 339-344.
- Golden, K.L., Marsh, J.D., Jiang, Y., Brown, T., and Moulden, J. (2003). Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E449-453.
- Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C., and Savage, K. (2002). Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 121-132.
- Guibert, C., Ducret, T., and Savineau, J.P. (2008). Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 98, 10-23.
- Gunst, S.J., and Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C576-587.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., *et al.* (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 473-508.
- Huang, F., Wong, X., and Jan, L.Y. (2012). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXV: calcium-activated chloride channels. *Pharmacol Rev* 64, 1-15.
- Jackson, W.F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35, 173-178.
- Jackson, W.F. (2005). Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12, 113-127.
- Jones, R.D., Pugh, P.J., Jones, T.H., and Channer, K.S. (2003). The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 138, 733-744.
- Jones, T.H. (2010). Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 21, 496-503.
- Kalhorn, T.F., Page, S.T., Howald, W.N., Mostaghel, E.A., and Nelson, P.S. (2007). Analysis of testosterone and dihydrotestosterone from biological fluids as the oxime derivatives using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 3200-3206.

- Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., and He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365, 217-223.
- Kiserud, T., and Acharya, G. (2004). The fetal circulation. *Prenat Diagn* 24, 1049-1059.
- Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D., and Park, W.S. (2008). Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44, 65-81.
- Korovkina, V.P., and England, S.K. (2002). Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 317-323.
- Kotlikoff, M., and Hall, I. (2003). Hypertension: beta testing. *J Clin Invest* 112, 654-656.
- Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103, 21-80.
- Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1, 1-78.
- Ledoux, J., Werner, M.E., Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (2006). Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 21, 69-78.
- Lee, U.S., and Cui, J. (2010). BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci* 33, 415-423.
- Lopes, R.A., Neves, K.B., Carneiro, F.S., and Tostes, R.C. (2012). Testosterone and vascular function in aging. *Front Physiol* 3, 89.
- Lu, Q., Ganesan, K., Simionescu, D.T., and Vyavahare, N.R. (2004). Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 25, 5227-5237.
- Mandegar, M., and Yuan, J.X. (2002). Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* 38, 25-33.
- Martin de Llano, J.J., Fuertes, G., Garcia-Vicent, C., Torro, I., Fayos, J.L., and Lurbe, E. (2007). Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels. *Transl Res* 149, 1-9.
- Martinez-Lemus, L.A. (2011). The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110, 5-11.
- Meyer, W.W., Rumpelt, H.J., Yao, A.C., and Lind, J. (1978). Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *Eur J Pediatr* 128, 247-259.
- Montano, L.M., Calixto, E., Figueroa, A., Flores-Soto, E., Carbajal, V., and 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, 2517-2526.
- Morgado, M., Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2011). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 69, 247-266.
- Morrow, J.P., Zakharov, S.I., Liu, G., Yang, L., Sok, A.J., and Marx, S.O. (2006). Defining the BK channel domains required for beta1-subunit modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5096-5101.

- Nelson, M.T., and Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268, C799-822.
- Ng, B.H., and Yuen, K.H. (2003). Determination of plasma testosterone using a simple liquid chromatographic method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 793, 421-426.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., and Latorre, R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* 17, 156-161.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84, 767-801.
- Perusquia, M., Espinoza, J., Montano, L.M., and Stallone, J.N. (2012). Regional differences in the vasorelaxing effects of testosterone and its 5-reduced metabolites in the canine vasculature. *Vascul Pharmacol* 56, 176-182.
- Perusquia, M., Navarrete, E., Gonzalez, L., and Villalon, C.M. (2007). The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci* 81, 993-1002.
- Perusquia, M., and Stallone, J.N. (2010). Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H1301-1307.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pina, J.A.E. (2007). *Anatomia Humana do Coração e Vasos* (LIDEL - Edições Técnicas, Lda - Lisboa).
- Pinterova, M., Kunes, J., and Zicha, J. (2011). Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol Res* 60, 381-402.
- Rensen, S.S., Doevendans, P.A., and van Eys, G.J. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15, 100-108.
- Rodrigues, M.E.C. (2009). Estudo do mecanismo vasodilatador da testosterona a nível arterial. In *Biomedicina* (Covilhã, Universidade da Beira Interior).
- Rzucidlo, E.M., Martin, K.A., and Powell, R.J. (2007). Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg* 45 Suppl A, A25-32.
- Santana, L.F., and Navedo, M.F. (2009). Molecular and biophysical mechanisms of Ca²⁺ sparklets in smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 47, 436-444.
- Santos-Silva, A.J., Cairrao, E., Morgado, M., Alvarez, E., and Verde, I. (2008). PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol* 582, 102-109.
- Satin, J., Schroder, E.A., and Crump, S.M. (2011). L-type calcium channel auto-regulation of transcription. *Cell Calcium*.
- Scragg, J.L., Dallas, M.L., and Peers, C. (2007). Molecular requirements for L-type Ca²⁺ channel blockade by testosterone. *Cell Calcium* 42, 11-15.
- Scragg, J.L., Jones, R.D., Channer, K.S., Jones, T.H., and Peers, C. (2004). Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca(2+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 503-506.

- Seyrek, M., Yildiz, O., Ulusoy, H.B., and Yildirim, V. (2007). Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci* 103, 309-316.
- Shi, Z.D., and Tarbell, J.M. (2011). Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Ann Biomed Eng* 39, 1608-1619.
- Sonkusare, S., Palade, P.T., Marsh, J.D., Telemaque, S., Pesic, A., and Rusch, N.J. (2006). Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. *Vascul Pharmacol* 44, 131-142.
- Souders, C.A., Bowers, S.L., and Baudino, T.A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105, 1164-1176.
- Struijk, P.C., Mathews, V.J., Loupas, T., Stewart, P.A., Clark, E.B., Steegers, E.A., and Wladimiroff, J.W. (2008). Blood pressure estimation in the human fetal descending aorta. *Ultrasound Obstet Gynecol* 32, 673-681.
- Sweet, T.B., and Cox, D.H. (2009). Measuring the influence of the BKCa β 1 subunit on Ca²⁺ binding to the BKCa channel. *J Gen Physiol* 133, 139-150.
- Tsang, S.Y., Yao, X., Wong, C.M., Chan, F.L., Chen, Z.Y., and Huang, Y. (2004). Differential regulation of K⁺ and Ca²⁺ channel gene expression by chronic treatment with estrogen and tamoxifen in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 483, 155-162.
- Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89, 957-989.
- Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201-206.
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 463-472.
- Wellman, G.C., Cartin, L., Eckman, D.M., Stevenson, A.S., Saundry, C.M., Lederer, W.J., and Nelson, M.T. (2001). Membrane depolarization, elevated Ca²⁺ entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2559-2567.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S.I., Bellinger, A.M., Mongillo, M., and Marx, S.O. (2007). Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 α 1c and β 2 subunits. *Circ Res* 101, 465-474.
- Yildiz, O., and Seyrek, M. (2007). Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115, 1-6.
- Yildiz, O., Seyrek, M., Gul, H., Un, I., Yildirim, V., Ozal, E., Uzun, M., and Bolu, E. (2005). Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 45, 580-585.
- Zhang, R., Zhou, L., Li, Q., Liu, J., Yao, W., and Wan, H. (2009). Up-regulation of two actin-associated proteins prompts pulmonary artery smooth muscle cell migration under hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 467-475.
- Zhou, P., Fu, L., Pan, Z., Ma, D., Zhang, Y., Qu, F., Guo, L., Cao, J., Gao, Q., and Han, Y. (2008). Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 593, 87-91.