

Estudo do Efeito Vascular da Testosterona na Artéria Umbilical Humana na Hipertensão Gestacional

Lara Carina de Morais Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira
Co-orientador: Mestre Margarida Ferreira Lorigo

outubro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Lara Carina de Moraes Fernandes, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12029 de/o Ciências Biomédicas da Faculdade Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 09 /10 /2023

A handwritten signature in black ink that reads "Lara Fernandes". The signature is written in a cursive, flowing style.

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai (*in memoriam*).

*“O escuro às vezes não é a falta de luz
mas a presença de um sonho...”*

-Ondjaki

Agradecimentos

Aos que tornaram este trabalho possível,

À Prof. Doutora Elisa Cairrão por me ter acolhido e dado a oportunidade de desenvolver este trabalho laboratorial com um tema aliciante e igualmente desafiante. Agradeço por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades e pelo conhecimento científico transmitido. Agradeço, de igual forma, a minha co-orientadora Margarida Lorigo, pela disponibilidade e pela forma amistosa com que sempre me incentivou e apoiou.

Ao pessoal do meu laboratório, em especial ao Henrique e à Melissa, obrigada por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a ter uma visão mais otimista, mas sobretudo por estarem sempre disponíveis para me ouvir e ajudar. À Rafaella, obrigada por me teres acompanhado ao longo deste ano, por todas as horas passadas dentro e fora do laboratório, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos que fiz na “Covilândia” e que espero levar para o resto da vida, o meu muito obrigada à Catarina, Diana e Matilde por terem estado presentes desde o 1º ano da licenciatura e por terem contribuído para que estes 5 anos fossem leves, memoráveis e sem dúvida inesquecíveis, obrigada por fazerem com que cada segundo valesse à pena. Ao Marco, obrigada por teres sido essa adição boa e igualmente louca.

Ao Pete e ao José, obrigada por tudo mas sobretudo pelo ombro amigo e por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditava. A vossa lealdade e amizade tornaram os momentos mais difíceis suportáveis. Às minhas queridas amigas, Ana, Andreia e Carolina, o meu genuíno apreço pela amizade, apoio e carinho, sobretudo nos momentos mais difíceis. Obrigada por mesmo longe fazerem-se presentes, já lá vão mais de 10 anos, espero que possamos partilhar muitos mais juntas.

À minha avó, tios e primos por acreditarem em mim e por todo o apoio e carinho ao longo desta jornada. À minha mãe e ao meu irmão, agradeço pelo apoio incondicional, amor e paciência e pela força transmitida ao longo desta jornada. Sem vocês nada disto seria possível. Um especial obrigado a minha mãe, por ser essa fonte de inspiração contínua, o combustível que alimenta os meus sonhos e por tudo o que sou hoje.

À todos aqueles que ao longo destes anos, direta ou indiretamente, cruzaram o meu caminho, obrigada por de alguma forma terem ajudado no desenvolvimento e melhoramento do meu “eu”.

À todos, a minha imensa gratidão.

Resumo

As doenças hipertensivas da gravidez (DHG) englobam um conjunto de condições que afetam cerca de 10% de todas as gestantes no mundo inteiro. Este grupo complexo de patologias para além da hipertensão gestacional também abrange a hipertensão crónica/pré-existente e a pré-eclâmpsia (PE)/eclâmpsia. Ainda não é bem conhecida a exata etiologia destas patologias, no entanto, ao longo dos anos, diversos estudos destacaram o possível papel da testosterona (T) na fisiopatologia da PE. A T é uma hormona sexual cujo efeito vasorelaxante foi anteriormente comprovado na artéria umbilical humana (AUH) de mulheres não portadoras de DHG. No entanto, estudos prévios evidenciaram elevados níveis de T no plasma materno de mulheres portadoras de PE, e, por conseguinte, uma correlação positiva entre os níveis elevados desta hormona sexual e a presença e gravidade da doença. Apesar da maior parte dos estudos se focar nos efeitos da T na PE, é igualmente importante examinar esses efeitos na hipertensão gestacional, uma vez que é um precursor para a PE. Compreender de que forma a T pode estar conectada a esta patologia pode ajudar no diagnóstico precoce e na gestão de possíveis riscos.

Neste sentido, o presente trabalho teve dois principais objetivos: 1) avaliar como a exposição à T afeta a contratilidade celular em cordões umbilicais de mulheres com hipertensão gestacional; e 2) avaliar o papel de duas vias de sinalização endoteliais no efeito a longo prazo da T. Para atingir o primeiro objetivo recorreu-se ao isolamento de AUH de mulheres portadoras desta patologia para a obtenção de culturas de células do músculo liso. Através da técnica de Planar Cell Surface Area (PCSA) foi possível analisar a resposta das células ao agente contrátil serotonina (5-HT) e à T diretamente. Para avaliar o efeito a longo prazo dos androgénios na contratilidade celular, as células foram incubadas com dihidrotestosterona (DHT). As amostras de gestantes com hipertensão gestacional, após a adição da T, passaram a expressar uma resposta vasoconstritora, comportamento contrário ao observado no controlo (sem patologia). De seguida, de modo a atingir o segundo objetivo, foram realizados estudos de reatividade vascular e simulações computacionais de Docking Molecular. Os resultados indicam que 1) a inibição das vias endoteliais diminui a capacidade vasorelaxante da T; 2) a incubação com DHT interfere com a vasorelaxação induzida pela T; 3) a incubação com DHT potencializa a capacidade vasorelaxante do nitroprussiato de sódio (SNP), dependendo do agente contrátil utilizado. E por último, os resultados computacionais indicam que a T compete com o ligando natural por uma ligação ao centro ativo da sGC, mas não se liga ao NPR-C porque o recetor selecionado possui uma cauda citoplasmática curta sem o domínio catalítico GC.

Em suma, a T em amostras celulares de gestantes com hipertensão gestacional tem um efeito contrátil ao contrário do que é observado no controlo. O efeito da T é parcialmente dependente das vias endoteliais COX e eNOS, tendo sido a última também comprovada em estudos computacionais e o efeito a longo prazo da DHT interfere com a vasorelaxação induzida pela T. Tendo em conta os resultados obtidos no PCSA, o uso de amostras de hipertensão gestacional da AUH para estudos de reatividade vascular oferecem uma oportunidade para perceber de que forma a T afeta a contratilidade vascular e possíveis efeitos negativos que pode causar no desenvolvimento do feto.

Palavras-chave

Androgénios; Hipertensão gestacional; Artéria umbilical humana; Células do músculo liso

Abstract

Hypertensive disorders of pregnancy (HDP), including gestational hypertension, pre-existing/chronic hypertension, and preeclampsia (PE), encompass a range of conditions that affect about 10% of pregnancies worldwide. The etiology of these conditions is not fully understood however, throughout the years multiple studies have highlighted the potential role of testosterone (T) in pathogenesis of PE. T is a sexual hormone which vasorelaxant effect has been previously demonstrated in the human umbilical artery (HUA) of normotensive women, but previous studies have found increased T levels in maternal plasma of women with PE and, therefore, a correlation between high T levels and the disease has been made. Although much focus has been on PE it's equally important to investigate T effects on gestational hypertension since the latter is a precursor of PE. Understanding its association with T may provide insights into early diagnosis and in the management of possible risks.

Moreover, the present work aimed to 1) evaluate how T affects cells contractility in cell samples from the umbilical cord of women with gestational hypertension and 2) evaluate T effect in endothelial signaling pathways in T long-term effect. To achieve the first goal, we used HUA isolated from women with the disease to obtain smooth muscle cell cultures. Through the Planar Cell Surface Area (PCSA) technique, it was possible to analyze the response of the cells to the contractile agent serotonin (5-HT) and to T directly. To assess the long-term effect of androgens on cell contractility, cells were incubated with dihydrotestosterone (DHT). The samples of pregnant women with gestational hypertension, after the addition of T, began to express a vasoconstrictor response, the opposite behavior observed in the control (without pathology). Then, to achieve the second goal, vascular reactivity studies and computational simulations of Molecular Docking were performed. The results show that 1) the inhibition of endothelial pathways decreases the vasorelaxant capacity of T; 2) and that DHT incubation interferes with T-induced vasorelaxation; 3) incubation with DHT potentiates the vasorelaxant capacity of sodium nitroprusside (SNP) depending on the contractile agent used. And finally, the computational results indicated that T competes with the natural ligand for a binding to the active center and that it does not bind to NPR-C because the selected receptor has a short cytoplasmatic tail without a GC catalytic domain.

In summary, T in cell samples from pregnant women with gestational hypertension has a contractile effect contrary to what is observed in the control. T effect is partially dependent on COX and eNOS endothelial pathways, the latter having also been proven in computational studies and the long-term effect of DHT interferes with T-induced

vasorelaxation. Taking into the account the results obtained in the PCSA, the use of gestational hypertension samples from the HUA for vascular reactivity studies offers an opportunity to understand how T affects vascular contractility and possible negative outcomes it may have on the development of the fetus.

Keywords

Androgens;Gestational hypertension;Human umbilical artery;Smooth muscle cells

Índice

Capítulo I – Introdução	1
1.1 Doenças hipertensivas da gravidez	1
1.2 Testosterona	3
1.2.1 Mecanismo de vasorelaxação.....	6
1.2.2 O papel dos recetores de androgénios na pré-eclâmpsia	8
1.2.3 Patofisiologia da Pré-eclâmpsia	8
1.2.4 O papel da testosterona na pré-eclâmpsia	9
1.2.5 Testosterona e a hipertensão crónica/ pré-existente.....	10
1.3 Um caso particular: Homens transgénero e a gravidez	10
1.4 Abordagem terapêutica atual para a Pré-eclâmpsia	11
1.5 O órgão que sucumbe para dar início à vida	12
1.5.1 A artéria umbilical humana	13
1.5.2 Células musculares lisas da artéria umbilical humana.....	13
Capítulo II – Enquadramento e objetivos da investigação	15
Capítulo III – Materiais e Métodos	16
3.1 Recolha de amostras biológicas: cordão umbilical	16
3.1.1 Isolamento e cultura de células do músculo liso da AUH	16
3.1.2 Estudo de reatividade vascular.....	17
3.2 Estudos computacionais por docking molecular	19
3.3 Químicos	20
3.4 Análise estatística	20
Capítulo IV – Resultados	22
4.1 Estudos de contratilidade celular	22
4.2 Estudos de contratilidade arterial	24
4.2.1 Efeitos vasculares diretos da T na contratilidade das AUH induzida pela 5-HT ₂₅	
4.2.2 Efeitos vasculares diretos da T na contratilidade das AUH induzida pela KCl..	25
4.2.3 Efeitos vasculares diretos da T na contratilidade das AUH na presença de inibidores das vias endoteliais.....	26
4.2.4 Efeito da DHT a longo prazo na atividade contrátil da AUH contraída com serotonina e cloreto de potássio	30
4.3 Simulações no recetor atrial dos péptidos natriuréticos e da sGC	33

Capítulo V – Discussão.....	35
Capítulo VI – Conclusão	41
Referências	42
Anexos	51

Lista de Acrónimos

5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
ANP	Péptido natriurético auricular
AUH	Artéria umbilical humana
BKCa	Canal de K ⁺ ativado por alta condutância
Ca ²⁺	Cálcio
CASRN	Número do registo do serviço de resumo químico
cGMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CNP	Péptido natriurético tipo C do inglês C-type
COMT-I	Inibidor do catecol do inglês Catechol O-Metiltransferase
COX	Ciclooxigenase
DCV	Doenças cardiovasculares
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHG	Doenças hipertensivas da gravidez
DHT	Di-hidrotestosterona
E2	Estradiol
EtOH	Etanol
GPRC6A	do inglês G protein-coupled receptor family C group 6 member A
HEM	Hemoglobina
Indo	Indometacina
K ⁺	Potássio
KCl	Krebs despolarizante
Kv	Canais de potássio dependentes de voltagem
L-NAME	Hidrocloridrato N-nitro-L-arginina metil éster
L-VOCC	Canais de Ca ²⁺ operados por voltagem tipo L
NAG	N-acetilglicosamina
NPR-A	Receptor péptido natriurético tipo A
NPR-C	Recetor do péptido natriurético tipo C
PA	Pressão arterial
PCSA	Área da superfície planar celular
PDB	Base de dados proteínas
PE	Pré-eclâmpsia
PGI ₂	Prostaciclina
PKG	Proteína cinase G
RA	Recetor de androgénios

RUPP	Pressão de perfusão uterina reduzida
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SHBG	Globulina de ligação da hormona sexual
SNP	Nitroprussiato de sódio
T	Testosterona
Trans	Transgénero
TRPV4	Recetor do potencial transitório vanilóide tipo 4
TRT	Terapia de reposição de testosterona
VOCC	Canais de Ca ²⁺ operados por voltagem

Capítulo I – Introdução

1.1 Doenças hipertensivas da gravidez

A gestação é um processo dinâmico que envolve alterações metabólicas e hemodinâmicas cruciais para assegurar uma adequada circulação feto-placenta para o desenvolvimento do feto [1, 2]. Entre as transformações metabólicas, há uma redução na glicose sanguínea e na hipersensibilidade à insulina, enquanto nas hemodinâmicas ocorre um aumento no débito cardíaco e volume plasmático devido à retenção de água e sódio, diminuição de cerca de 25% na resistência vascular sistêmica e por conseguinte, diminuição na pressão arterial (PA), chegando a atingir valores inferiores aos observados em mulheres não grávidas a meio da idade gestacional e retornando ao normal por volta do terceiro trimestre [2-4]. Essa diminuição na PA deve-se ao aumento na produção de agentes vasorelaxantes, como o óxido nítrico (NO: do inglês *nitric oxide*) e a prostaciclina, e diminuição à sensibilidade aos agentes vasopressores, angiotensina II e norepinefrina, agentes vasoativos responsáveis pelo aumento da PA através da vasoconstrição arterial [2, 5]. Com a progressão da gravidez, ocorre um aumento de cerca de 40% do débito cardíaco de modo a manter a PA, uma vez que é também importante para a oxigenação do feto e suportar o aumento da taxa metabólica materna [1, 4]. Falha, ausência ou inabilidade materna para se adaptar a alterações hemodinâmicas podem levar a morbidade materna e fetal.

A hipertensão representa a condição médica mais prevalente durante a gravidez afetando cerca de 10% de mulheres grávidas em todo o mundo (Figura 1), é ainda responsável por quase 14% de mortes maternas à nível mundial e contribui significativamente para o aumento da morbidade neonatal e fetal [6, 7]. O diagnóstico de hipertensão na gravidez é feito através da medição da PA em duas ocasiões e a classificação depende da idade gestacional [8]. Apesar das divergências relativamente a terminologia e definições, de acordo com as guidelines internacionais que coincidem as com europeias, as DHG são divididas em 4 categorias [6, 9-11]:

- i. Hipertensão crônica/ pré-existente
- ii. Hipertensão gestacional
- iii. Pré-eclâmpsia/ eclâmpsia
- iv. Hipertensão crônica com pré-eclâmpsia sobreposta

Hipertensão crônica/ pré-existente quando pressão sanguínea sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão sanguínea diastólica ≥ 90 mmHg previamente à gravidez ou antes da 20^a

semana de gestação, ou uso de medicação anti-hipertensiva antes da gravidez ou hipertensão persistente 12 semanas após o parto [8]. Complica cerca de 1-5% das gravidezes, no entanto este cenário pode aumentar com o adiamento do parto para os 30 anos [12]. Mulheres com hipertensão pré-existente estão em maior risco de complicações decorrentes de enfermidades hipertensivas induzidas pela gravidez [13].

Hipertensão gestacional (pressão sanguínea sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão sanguínea diastólica ≥ 90 mmHg) aparece *de novo* após a 20^a semana, sem outra complicação associada, habitualmente ocorre nas últimas semanas de gestação e desaparece até à 12^a semana pós-parto [8]. Pode reaparecer em gestações subsequentes [12, 14]. Aproximadamente 15-46% dos casos de hipertensão gestacional progridem para pré-eclâmpsia (PE) [15].

Pré-eclâmpsia caracteriza-se pelo aparecimento de hipertensão arterial (pressão sanguínea sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão sanguínea diastólica ≥ 90 mmHg) associada a proteinúria e/ou trombocitopenia (contagem de plaquetas $\leq 100000/\text{mm}^3$), disfunção de órgãos, como incidência de distúrbios hematológicos, alteração da função hepática (aumento do nível sanguíneo de transaminases hepáticas), insuficiência renal (aumento da creatinina sérica na ausência de patologia renal) insuficiência ou falha hepática, edema pulmonar e/ou complicações neurológicas [2, 8]. A existência de proteinúria deixou de ser critério para o diagnóstico segundo a *American College of Obstetricians and Gynecologists* [16]. Dentre as 4 categorias, a PE representa o maior risco devido à sua complexidade e morbimortalidade. A eclâmpsia representa um quadro avançado da PE associado a episódios convulsivos generalizados durante a gestação, uma vez excluídas outras patologias (ex. epilepsia), e alta mortalidade materna [2].

Hipertensão crónica com PE sobreposta quando diagnosticada a PE após a 20^a semana numa paciente já diagnosticada com hipertensão crónica. O diagnóstico desta sobreposição deve ser considerado quando há uma suspeita do aumento da PA apesar de já se encontrar elevada, se a PA se tornar resistente ao tratamento ou se os níveis de proteinúria aumentarem. Representa um prognóstico mais desfavorável quando comparado a presença isolada da PE [12].

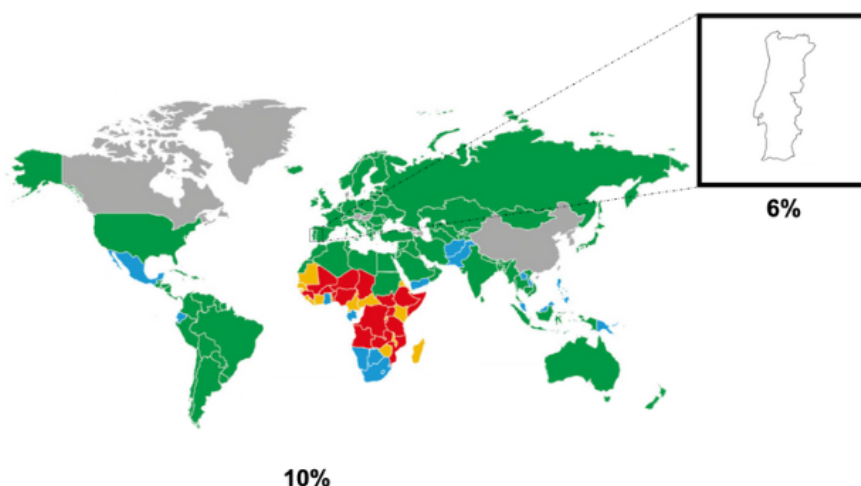


Figura 1. Prevalência de doenças hipertensas da gravidez no mundo inteiro em 2019. Adaptado de Wang W *et al* [17].

Nos Estados Unidos, as DHG estão entre o top 6 de causas mortais gestacionais sendo responsáveis por quase 10% de todas as mortes maternas [18]. Um estudo realizado em Portugal em 2005 demonstrou que a prevalência de DHG era 6% com $\frac{3}{4}$ de todos os casos induzidos pela gravidez porém, estima-se que atualmente, a prevalência seja muito maior não só em Portugal, mas como em todo o mundo, tendo em conta o aumento de fatores de risco, como a idade [19]. Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística, a idade média para o nascimento do primeiro filho aumentou 7 anos em Portugal, passando de 25,0 em 1960 para os 30,8 em 2013 [20]. A hipertensão durante a gestação aumenta o risco de desenvolver doenças cardiovasculares na vida adulta do feto e representam uma ameaça para a gestação devido ao risco maternal aumentado para ter acidente vascular cerebral, deslocamento placentário e falha de múltiplos órgãos, já para o feto, retardação no crescimento intrauterino, prematuridade e morte intrauterina são algumas das consequências desta morbidade maternal [19, 21].

1.2 Testosterona

As hormonas esteroides sexuais derivadas da molécula precursora de colesterol, de acordo com o número de átomos de carbono, são classificadas em 3 famílias: C18 estranos (derivados de estrogénios), C19 androstanos (derivados de androgénios) e C21 pregnanos (derivados da progesterona). A testosterona (T), hormona sexual masculina, pertence à família dos androgénios e é o principal androgénio na corrente sanguínea [22-25]. Nos homens, a biossíntese da T ocorre nos testículos, pelas células de Leydig, através da

androstenediona e dehidroepiandrosterona (DHEA). Diariamente são produzidas concentrações elevadas de T (3-10 mg) e a sua concentração sérica varia entre 350-1000 ng/dL, dependendo de fatores como por exemplo o ciclo circadiano e o stress [26]. A T é responsável pelo desenvolvimento de características primárias e secundárias nos homens, no entanto, apesar de ser conhecida como uma hormona masculina, também é produzida pelas mulheres, desempenhando um papel importante na fisiologia de ambos os sexos [24, 27-29]. Embora em menor quantidade, nas mulheres esta hormona é produzida pelos ovários e glândulas suprarrenais, e quando grávidas acresce a unidade feto-placenta [30, 31]. Nas mulheres, juntamente com os estrogénios, a T auxilia no crescimento, manutenção e restauração dos tecidos do sistema reprodutor feminino, libido e, durante a gravidez este androgénio sexual é crucial para a etapa de desenvolvimento do feto, principalmente para o desenvolvimento de características sexuais masculinas, proteção da mãe e do feto contra a exposição excessiva de androgénios através da ativação de mecanismos específicos, manutenção e regulação da gravidez e início do parto [31-33]. Nas mulheres, não grávidas, a sua concentração sérica varia entre 15-65 ng/dL [26].

A sua modulação é regulada em resposta ao feedback negativo da sinalização hipotálamo-hipófise-gónadas, com a libertação pulsátil da hormona libertadora de gonadotrofinas, e subsequente secreção das hormonas luteinizante e folículo-estimulante [34, 35]. Cerca de 2-3% de toda a T encontrada em circulação não está ligada a qualquer tipo de proteína, sendo denominada como T livre e por isso a sua solubilidade é muito inferior à sua concentração em circulação [25]. Nos homens, os níveis máximos de T livre são atingidos aos 30 anos e diminuem continuamente após atingido o pico [36]. Esta hormona encontra-se maioritariamente ligada a proteínas séricas, como a albumina e a globulina de ligação de hormonas sexuais (SHBG: do inglês *sexual hormone binding globulin*). Com a albumina estabelece uma ligação mais fraca, mas com potencial androgénico e com a SHBG, apesar ter mais afinidade, a sua atividade biológica é essencialmente inativa [28].

A nível celular, a regulação da homeostase dos níveis de T é feita por dois processos importantes: aromatização e redução (Figura 2). A aromatização da T consiste na sua conversão em estradiol (17 β -estradiol) (E2) e é catalisada pela enzima aromatase. Este processo representa uma via importante para a síntese de estrogénios. A enzima aromatase é expressa em diversos tecidos, tal como o tecido adiposo, mamas, fígado, cérebro, gonadas e placenta, e desempenha um papel crucial na maturação do esperma, manutenção da libido e da gravidez, regulação do parto e diferenciação sexual do feto no fim da gestação e pouco após o parto [37-39]. Já a redução da T é catalisada irreversivelmente pela enzima 5-reductase e resulta na metabolização da testosterona no seu metabólito di-hidrotestosterona (17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-ona) (DHT), mais potente, com maior afinidade para o

receptor de androgênios e maior tempo de semivida, porém os seus níveis plasmáticos (35-75 ng/dL) são muito inferiores aos da T [40, 41]. Este processo ocorre devido ao feedback negativo compensatório do cérebro e glândula pituitária e também em alguns tecidos periféricos, contudo, a maior parte da síntese da DHT ocorre a nível da pele e do fígado [41, 42].

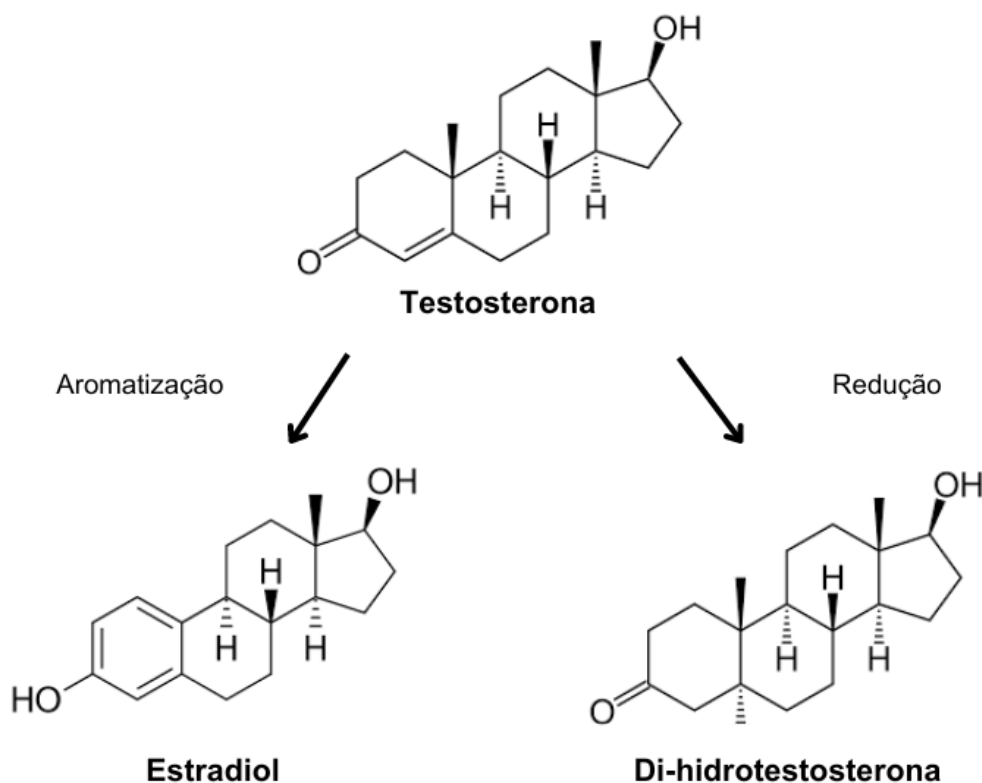


Figura 2. Metabolismo da testosterona.

Devido as suas múltiplas funções fisiológicas, ao longo dos anos foram conduzidas numerosas investigações sobre os seus efeitos no sistema cardiovascular, sobretudo no masculino. Os estudos evidenciaram que, embora o risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCV) seja mais elevado nos homens do que nas mulheres, estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que homens com DCV, diabetes melitos tipo 2, obesidade, dislipidemia e síndrome metabólica apresentam baixos níveis de T. Também foi observado que a prevalência de desenvolver DCV no homem aumenta com a idade, sendo que os níveis de T diminuíram, e, portanto, uma correlação positiva foi feita entre homens com disfunções cardiovasculares e baixos níveis de T [43-45]. Em concordância com estes estudos, Perusquia *et al.* sugeriu uma conexão entre níveis reduzidos de T e a terapia de reposição de testosterona (TRT) com, respetivamente, hipertensão e manutenção da pressão arterial (PA) normal, propondo um efeito anti-hipertensivo dos androgênios [46].

Contudo, alguns estudos reportaram para o perigo da TRT em homens com uma idade mais avançada e baixos níveis de T criando uma controvérsia entre cientistas e médicos [47, 48]. No entanto, estudos recentes têm sugerido que não existe uma relação direta entre baixos níveis de T e hipertensão, porém baixos níveis nos homens e elevados nas mulheres estão relacionados com distúrbios metabólicos que representam fatores de risco para as DCV (revisto em [49, 50]). Isto é, este aumento da hipertensão pode ser uma causa secundária e não um efeito direto.

Em relação ao efeito benéfico deste androgénio no sistema cardiovascular das mulheres, devido à informação escassa e contraditória, e efeitos secundários, tal como aumento do risco de infertilidade e virilização feminina, o seu uso não é aconselhado, sobretudo em mulheres grávidas. No entanto, existem estudos epidemiológicos que mostram o seu poder protetor no sistema cardiovascular de mulheres pós-menopausa com disfunção do desejo sexual hipoativo e em pré-menopausa [51-53].

1.2.1 Mecanismo de vasorelaxação

Estudos demonstram que a T induz um efeito vasodilatador em vasos sanguíneos de animais de diferentes espécies, incluindo em humanos, reforçando o possível efeito protetor dos androgénios contra DCV, no entanto, o mecanismo celular e molecular pelo qual atuam ainda não são bem compreendidos [26]. Os canais de potássio (K^+) são os principais responsáveis pela regulação do potencial membranar de repouso, e são predominantemente abundantes nas células do músculo liso [54]. A ativação dos canais de K^+ nas SMC leva ao encerramento de canais de cálcio (Ca^{2+}) operados por voltagem (VOCC: do inglês *voltage operated Ca^{2+} channels*), induzindo a hiperpolarização da membrana, e consequente vasorelaxação devido a redução do fluxo de Ca^{2+} [55, 56]. Na aorta de ratos, foi demonstrado que o efeito vasorelaxante da T não envolve canais de K^+ , já na artéria umbilical humana (AUH), a T abre canais de K^+ , inibindo os de Ca^{2+} dependentes de voltagem e assim, promove a vasorelaxação [57, 58].

Ao nível vascular, a T pode desencadear vias genómicas e não genómicas (Figura 3), que se sobrepõem, sendo o efeito vasorelaxante regulado por via não genómica [26, 59]. O efeito genómico ou de longa duração é desencadeado pela ativação intracelular do recetor de androgénios (RA), que regula a expressão de proteínas [60]. Uma vez ativado, ocorre um aumento na produção de sulfureto de hidrogénio e vasorelaxação através de 2 canais, canal catiónico recetor de potencial transitório vanilóide subtipo 4 (TRPV4: do inglês *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*) e canal de K^+ ativado Ca^{2+} por de elevada condutância (BK_{Ca} : do inglês *large conductance calcium-activated potassium*), bem como a regulação positiva da subunidade b1 do BK_{Ca} e negativa do L-type VOCC [60, 61].

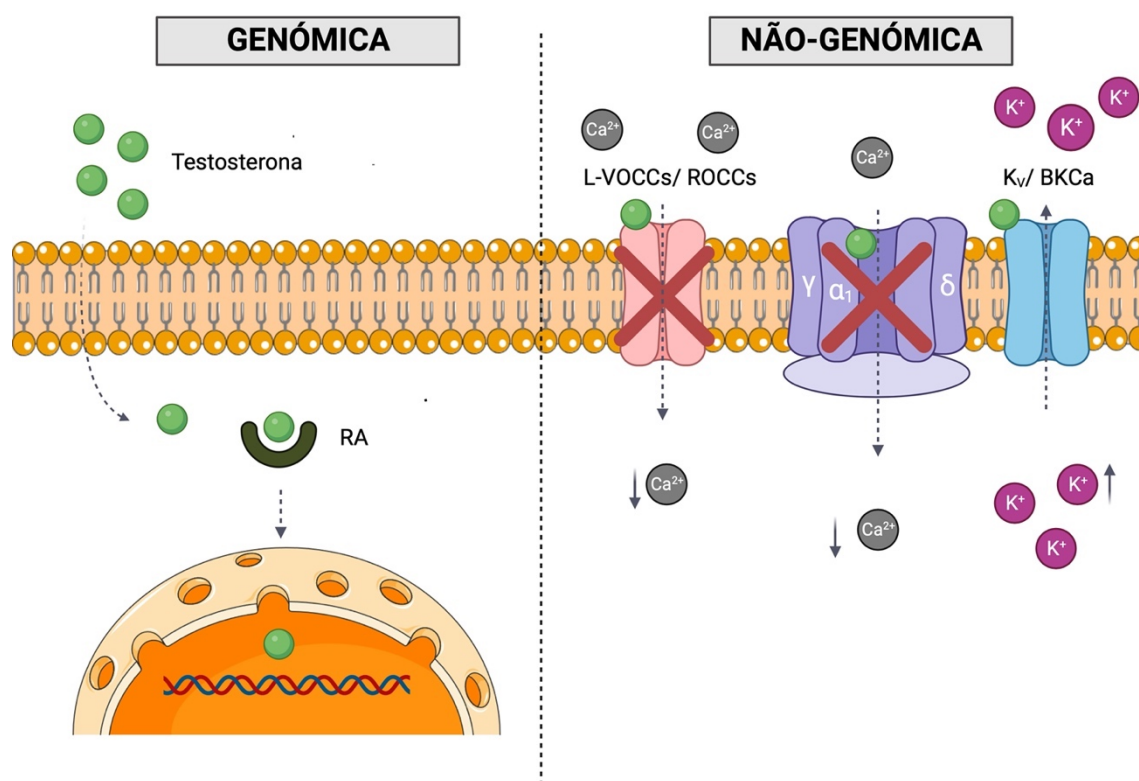


Figura 3. Via genómica e não genómica de vasorelaxação da testosterona. Legenda: BKCa - large-conductance calcium- and voltage-activated K⁺ channel, Ca²⁺ - Cálcio, K⁺ - Potássio, K_v - Voltage activated potassium channels, L-VOCCs - L-type voltage operated calcium channels, RA - recetor de androgénios, ROCCs - receptor-operated calcium channels.

Em relação ao efeito não genómico, ou de curta duração, ainda não é bem compreendido como é que a T induz à vasorelaxação, mas sabe-se que a ativação desta via conduz a alteração de mensageiros secundários no interior celular e/ou a ligação de complexos de sinalização associados a membrana. Cairrao *et al.* demonstrou nas células do músculo liso da artéria umbilical humana (AUH) que o rápido efeito da T leva ao aumento da concentração intracelular de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP: do inglês *cyclic guanosine monophosphate*), responsável pela subsequente ativação da proteína cinase G (PKG: do inglês *protein kinase G*) e, por conseguinte, ativação de canais de K⁺ dependentes de voltagem (K_v: do inglês *K⁺ channels voltage-operated*) e BK_{Ca}. Este efeito já foi anteriormente observado no péptido natriurético auricular (ANP: do inglês *atrial natriuretic peptide*), sugerindo que o ANP e a T podem partilhar a mesma via de sinalização [62]. Também foi demonstrado que a T partilha o mesmo alvo molecular (subunidade α_{1C} da L-VOCCs) como a dihidropiridina ao bloquear o influxo de Ca²⁺ no espaço intracelular [63].

Em suma, este androgénio apresenta múltiplas funções fisiológicas, tanto nos homens como nas mulheres, contudo, nos últimos anos diversos estudos associaram diversas alterações patofisiológicas gestacionais (ex. diabetes gestacional, PE), a níveis aberrantes deste androgénio [64-66]. Contudo, o seu envolvimento na hipertensão gestacional permanece uma incógnita. Será que os elevados níveis de testosterona desencadeiam um mecanismo desregulador que conduz ao aumento da pressão sanguínea ou é uma consequência do aumento anómalo da pressão sanguínea durante a gravidez?

1.2.2 O papel dos recetores de androgénios na pré-eclâmpsia

A presença de RA foi demonstrada em células estromais de placentas humanas normotensas e pré-eclâmpicas perto do fim da gravidez [67]. Na placenta humana, o RA é responsável pela regulação de diversos processos fisiológicos (ex. invasão de trofoblastos e a sua diferenciação em sinciciotrofoblastos, a parte mais exterior da placenta) [68]. Na pré-eclâmpsia, o papel dos RA ainda é uma incógnita, no entanto, estudos demonstraram um aumento na expressão e coloração de RA em amostras de placentas pré-eclâmpicas sugerindo que a desregulação dos níveis de RA pode estar envolvida na patofisiologia desta doença [67, 69]. Presume-se que a regulação positiva dos níveis de T e RA na placenta possa alterar a expressão de genes específicos envolvidos no desenvolvimento da PE.

Em relação aos RA membranares, recentemente, a expressão do membro A do grupo 6 de recetores acoplados à proteína G (GPRC6A: do inglês *G protein-coupled receptor family C group 6 member A*), envolvido no efeito não genómica da T, foi demonstrada na placenta humana, nomeadamente nos sinciciotrofoblastos [31]. No entanto, nada se sabe sobre a sua expressão em amostras de placentas pré-eclâmpicas, e muito menos em amostras de placentas de mulheres com hipertensão gestacional, porém, sabe-se que este recetor está envolvido na produção de interleucina 6, uma citocina inflamatória, anteriormente descrita como estando elevada na PE [11, 70]. Posto isto, tendo em conta que estudos anteriores demonstraram que existe uma alteração na expressão de RA, pode-se assumir que o mesmo acontece com a expressão da GPRC6A e, portanto, que a desregulação deste recetor também esteja envolvida no desenvolvimento desta patologia.

1.2.3 Patofisiologia da Pré-eclâmpsia

De etiologia desconhecida, esta patologia é uma das complicações mais graves da gravidez e representa uma das principais causas de morbilidade e mortalidade materna e perinatal. Anualmente, cerca de 4 milhões de mulheres são diagnosticadas com este transtorno progressivo, multi-sistémico e multifatorial, vitimizando mais de 70.000 mulheres e 500.000 bebés [71]. Na Europa, afeta 2,8-5,2% das mulheres grávidas, com uma

maior prevalência a nível mundial (2-8%), representando um fardo financeiro nos países desenvolvidos uma vez que contribui para o internamento materno [72, 73]. Nos países em desenvolvimento, devido à precariedade de cuidados pré-natais, escassez de unidades hospitalares, profissionais de saúde e recursos, o número de mortes associadas a esta condição é muito superior [74].

A PE apresenta discrepâncias raciais, com uma maior prevalência em mulheres negras, mas essa disparidade ainda é controversa porque não se sabe se ocorre devido ao maior predomínio de hipertensão arterial na raça negra ou se é uma predisposição genética para a doença [75]. No entanto, para além da predisposição genética, fatores ambientais e imunológicas que possam intervir com o desenvolvimento da placenta foram implicados no desenvolvimento desta condição [76]. Conhecida como a “doença das teorias”, devido às múltiplas teorias propostas para explicar a sua etiologia, diversos mecanismos foram implicados no seu desenvolvimento. Desde o aumento da atividade do eixo sistema renina-angiotensina e alterações em moléculas gasosas sinalizadoras, tal como o monóxido de carbono e NO, que contribuem para o aumento da pressão sanguínea, às alterações no processo de coagulação, tal como baixa contagem de plaquetas, que pode levar ao parto prematuro [77, 78]. No entanto, a teoria mais aceite descreve uma diminuição da perfusão da placenta e por conseguinte, libertação de fatores anti-angiogénicos que levam a diminuição de fatores de crescimento placentários e vasculares endoteliais, cruciais para a formação placentária [79]. Na falta desses fatores, o normal desenvolvimento da placenta é afetado devido ao precário fornecimento de oxigénio e nutrientes. Nos últimos anos, elevados níveis de androgénios, nomeadamente T, foram implicados em alterações no volume sanguíneo e na formação da placenta em mulheres pré-eclâmpticas e desta forma, a desregulação no mecanismo dos androgénios acresce às diversas teorias existentes que tentam explicar a etiologia da morbilidade maternal [77, 78].

1.2.4 O papel da testosterona na pré-eclâmpsia

Estudos em animais

Em 2021, o estudo *in vitro* realizado por Shin YY et al., no qual induziu a doença em modelos animais através de diferentes métodos, L-NAME (do inglês *N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride*) e COMT-I (do inglês *catechol-o-methyltransferase inhibitor*), com injeções diárias de 50 mg/kg/dia/200µl e 2.5mg/kg/dia/200µl, respetivamente, do dia 10 ao 17 gestacional, e RUPP (do inglês *reduced uterine perfusion pressure*) que reduziu o volume sanguíneo até 40% [80]. Os resultados exibiram concentrações placentárias diferentes das plasmáticas e aumentadas pelo menos 2 vezes.

Estudos *ex-vivo* em amostras de artérias de modelos animais da doença demonstraram que a T inibe a via de vasorelaxação do NO e induz hipertensão via o recetor de angiotensina II tipo 1 em artérias mesentéricas [81, 82]. Nas artérias uterinas a T afeta as vias de relaxação dependentes de endotélio e na aorta torácica, concentrações cumulativas de T induzem um efeito anti-hipertensivo [76, 83].

Estudos *in vivo* demonstraram o potencial anti-hipertensivo da T em modelos roedores conscientes com PE durante a gravidez e pós-parto [76, 84]. A administração intravenosa diária de T foi eficiente na redução da pressão sanguínea sugerindo que a produção deficiente de androgénios durante a gravidez pode contribuir para a predisposição da PE

Estudos em humanos

No referente a estudos *in vitro*, vários autores demonstraram que amostras placentárias apresentam uma maior coloração e níveis de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) de RA sugerindo uma desregulação na expressão de RA [67, 69, 85]. Modelos *in vitro* não foram bem-sucedidos na mimetização da doença devido à sua complexidade, no entanto, exibiram uma alteração na produção da testosterona [80].

Estudos epidemiológicos realizados ao longo dos anos, descreveram uma associação entre altos níveis de T encontrados no soro e plasma materno durante o 3º trimestre e a presença da doença, em alguns casos níveis aberrantes foram relacionados com a gravidade da doença [86-93]. A medição deste androgénio em amostras do cabelo, cordão umbilical e placenta de mulheres pré-eclâmpticas não exibiram diferenças quando comparada a amostras de mulheres normotensas [94].

1.2.5 Testosterona e a hipertensão crónica/ pré-existente

Em 2007, o grupo de investigação liderado por Irribara AC *et al.* demonstrou que mulheres com hipertensão crónica/pré-existente possuíam níveis de T livre e total mais baixos quando comparados com mulheres normotensas, mas não o suficiente para haver uma diferença significativa e, portanto, os altos níveis de T não foram associados a este tipo de hipertensão [95]. Assim, mais estudos são necessários para se poder tirar uma conclusão definitiva sobre os níveis de T e a possível associação com a hipertensão crónica/pré-existente.

1.3 Um caso particular: Homens transgénero e a gravidez

A T é a principal hormona usada na terapia de afirmação de género para homens transgénero (transição do género feminino para o masculino), e apesar da informação confusa em relação ao seu efeito na PA, a maior parte dos estudos considera a T como eficaz

e segura apesar dos seus efeitos a longo prazo no sistema cardiovascular serem ainda pouco compreendidos [96-98]. Em comparação com mulheres, os homens transgêneros (trans) apresentam níveis exógenos de T mais elevados e por conseguinte, são associados com distúrbios metabólicos, o uso a longo prazo deste androgénio por homens trans compromete a vasorelaxação mediada por fluxo [99]. Em mulheres em pós-menopausa, elevados níveis de T e reduzidos de SHBG foram associados com um maior risco de desenvolver hipertensão arterial e aumento na pressão arterial [52]. Estes resultados estão de acordo com o “Vale Metabólico da Morte” redesenhado por Stallone no qual níveis baixos a normais de androgénios em mulheres são associados com efeitos metabólicos benéficos enquanto níveis altos são associados com distúrbios metabólicos, também observados em homens com baixos níveis de T, e que contribuem para o aumento do risco de desenvolver DCV [49].

Embora escassos, foram reportados casos que descrevem o processo de gestação em homens trans com e sem o uso de tecnologia de assistência de reprodução, após a descontinuação do uso hormonal da T, tendo sido inclusive descrito gravidezes acidentais. Num estudo transversal, fizeram parte da amostra 41 homens trans que passaram pelo processo de gestação, dos quais 25 usaram a T para o processo de transição, já os restantes, não é mencionado o que utilizaram [100]. Entre os que relataram ter tido uma gravidez acidental, não foi mencionado as semanas de gestação que tinham aquando da descoberta e cessão da hormonoterapia. Dos 41 participantes do estudo, 5 foram diagnosticados com hipertensão e desses 5, 4 já tinham usado a T. O estudo não especifica ao certo o tipo de hipertensão desenvolvida pelos participantes, no entanto, apesar dos dados serem insuficientes para inferir sobre uma possível associação entre o uso de T e o desenvolvimento de DHG, pode-se concluir que a percentagem de homens trans no estudo diagnosticados com alguma DHG foi superior à da população feminina (>16%). Em suma é crucial realizar mais estudos caso-controlo onde a concentração de T em homens trans é analisada antes, durante e após a gestação para avaliar de que forma os altos níveis de androgénios interferem no sistema cardiovascular e mecanismo subjacentes. Dados confiáveis vão permitir o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes, e garantir uma gestação mais segura e saudável para homens trans e mulheres, bem como o desenvolvimento saudável do feto.

1.4 Abordagem terapêutica atual para a Pré-eclampsia

Não existe um tratamento ou cura para as DHG, no entanto, existem formas terapêuticas de prevenção e fármacos usados para controlar a alteração de certos parâmetros (ex. aumento da pressão arterial) daí a importância do diagnóstico prévio e

monitorização contínua [101, 102]. As guidelines internacionais da HDP (do inglês *hypertensive disorders of pregnancy*) reconhecem baixas doses de aspirina (75-100 mg) como a única abordagem terapêutica preventiva eficaz contra a PE. Estes riscos incluem hipertensão em gestações anteriores, doenças autoimunes, hipertensão crónica pré-existente, raça e etnia ou múltiplos fatores de risco para a doença [101, 103]. Em Portugal, a dose preventiva recomendada de aspirina é 100 mg [2]. Entre os parâmetros alterados na PE, para além da pressão arterial, existe o risco do desenvolvimento de um quadro convulsivo para mulheres no estado mais avançado da doença (eclâmpsia) e subdesenvolvimento dos pulmões do feto devido a necessidade de se realizar um parto prematuro. E, portanto, medicação anti-hipertensiva (labetalol, nifedipina e metildopa), para prevenir convulsões (sulfato de magnésio) e/ou corticosteroides (recomendado para mulheres entre as semanas 24-36 de gestação) para promover a maturação fetal dos pulmões antes do parto, devem ser administradas [79, 101, 102]. Com o agravamento da doença, frequentemente induz-se o parto para que ocorra a excreção da placenta e deste modo evitar o agravamento de complicações maternas e fetais e a progressão dos sintomas [2]. Contudo, dado a gravidade desta condição o número de anos de incapacidade é relativamente alto sobretudo na faixa etária dos 25-29 anos apesar de apresentarem uma taxa de incidência inferior [17]. Assim a melhoria do acompanhamento da gestação pré-eclâmptica e diminuição da mortalidade materna associada é uma prioridade, e representa um dos objetivos de desenvolvimento do milénio (Objetivo 5: Melhorar a saúde materna) posto isto, é indispensável perceber os mecanismos que medeiam o desenvolvimento desta condição e desenvolver formas terapêuticas mais eficientes.

1.5 O órgão que sucumbe para dar início à vida

O cordão umbilical é uma estrutura endócrina temporária que permite a interligação placentária ao feto e é responsável pelo transporte de sangue e nutrientes. Na primeira semana de gestação, desenvolve-se simultaneamente com a placenta constituindo uma estrutura crucial para a ligação feto-placentária [58, 104]. Possui um comprimento normal de 50 a 60 cm, com 1 a 2 cm de diâmetro e aproximadamente 40g de peso. Cordões mais curtos ou longos, não sendo uma ocorrência habitual podem existir e causar a separação antecipada da placenta da parede uterina, se forem muito curtos, ou sofrer prolapso e/ou envolverem o feto, formar nós e conduzir a anoxia fetal, se forem muito longos [105]. Rodeado por um tecido conjuntivo mucoso com aspeto esbranquiçado (Geleia de Wharton), possui 3 vasos sanguíneos: 1 veia, com maior diâmetro e paredes finas que transporta sangue oxigenado da placenta para o feto, e 2 artérias, que por oposição são mais estreitas e com parede mais grossa e fazem o retorno do sangue para a placenta [104, 106]. A geleia de Wharton desempenha a função da camada adventícia, a pois a artéria umbilical carece

de adventícia e *vasa vasorum* ao contrário do que é observado noutras artérias, e atua como uma camada protetora amortecendo e reduzindo o perigo de oclusão dos vasos causado pelo movimento fetal [107].

Ao longo dos anos estudos, estudos demonstraram que alterações no metabolismo e morfologia do cordão foram observadas em certas perturbações da gravidez, como pré-eclâmpsia, hipertensão e diabetes [108]. Dado a facilidade da obtenção do cordão, sem quaisquer riscos para a mãe ou feto, visto que pode ser obtido logo após o parto, representa uma amostra ideal para o estudo de patologias cardiovasculares e patologias que estejam relacionadas com a gestação.

1.5.1 A artéria umbilical humana

A artéria umbilical humana (AUH) está implicada na circulação feto-placentária e os mecanismos endócrinos e parácrinos que regulam o seu estado contrátil são essenciais para a otimização de gases e de nutrientes entre o feto e a placenta uma vez que o cordão não é uma estrutura inervada e dependente da libertação de substâncias vasoativas [58]. Possui um calibre médio (1-10 mm) com uma parede constituída maioritariamente por fibras musculares e é formada por 3 túnicas, de dentro para fora: interna ou íntima, média e externa ou adventícia [109].

- i. Túnica interna ou íntima: possui uma monocamada de células endoteliais revestida por fibras de colagénio, através da ação de agentes vasoativos dependentes do endotélio controla o tónus vascular [110, 111].
- ii. Túnica média: formada por feixes musculares revestidos interna e exteriormente por camadas elásticas de células musculares lisas. A camada interna separa a túnica média da íntima tem um aspeto enrugado e células musculares lisas dispostas de forma longitudinal. A camada externa, rica em miofilamentos, separa a túnica média da externa e está disposta de forma circular permitindo a variação do calibre arterial [110, 112].
- iii. Túnica externa ou adventícia: desempenhada pela geleia de Wharton, envolvida por vasos e abundante em glicosaminoglicanos [106, 109].

Durante as doenças hipertensivas da gravidez, como por exemplo a pré-eclâmpsia, ocorrem alterações ao nível morfológico e metabólico do cordão [113]. Estudar os mecanismos que modulam a reatividade da AUH acresce uma mais-valia na abordagem terapêutica de certas patologias gestacionais.

1.5.2 Células musculares lisas da artéria umbilical humana

As células musculares lisas são componentes celulares essenciais das paredes dos vasos sanguíneos e desempenham um papel fundamental no tônus vascular, respondendo a estímulos hormonais e hemodinâmicos [114, 115]. Quando um vaso sanguíneo é submetido a forças de alta pressão, como por exemplo estiramento mecânico, ocorre uma expressão diferencial de genes das células musculares lisas que levam a remodelação vascular ou modulação fenotípica, passando as células de um fenótipo contrátil (células alongadas e fusiformes) para sintético (células menos alongadas e com morfologia de paralelepípedos), assemelhando-se a células endoteliais. Esta mudança fenotípica é crucial para a reparação da lesão vascular [116].

As células musculares lisas do cordão regulam o fluxo sanguíneo fetoplacental, podendo ser encontradas na túnica média da AUH [115].

Estudos sugerem que lesões vasculares desencadeiam mudanças de fenótipo nas células musculares lisas, porém os mecanismos subjacentes ainda não são claros [117]. A utilização destas células torna-se então crucial para estudar e melhor compreender as vias envolvidas na modulação da reatividade celular e a patogênese de doenças vasculares, sendo o cordão umbilical rico neste tipo de células, estas podem ser isoladas através da AUH.

Capítulo II – Enquadramento e objetivos da investigação

As doenças hipertensivas da gravidez (DHG) representam uma das condições mórbidas mais prevalentes e contribuem para a mortalidade neonatal e maternal no mundo inteiro. De entre os grupos que envolvem este espectro de condições, a pré-eclâmpsia (PE) representa o maior risco devido à sua complexidade. De etiologia desconhecida, alguns estudos sugerem o envolvimento da T na PE através da mediação dos recetores de androgénios (RA). Já foi demonstrado o efeito vasorelaxante da T em diferentes vasos sanguíneos, incluindo na AUH. Sabe-se que o seu efeito é semelhante ao observado no péptido natriurético auricular (ANP) mas o mecanismo não é totalmente conhecido. Tendo em conta a quantidade de casos de hipertensão gestacional e o facto de que nada se sabe sobre o efeito da T na atividade contrátil de células provenientes de gestantes com hipertensão gestacional, torna-se relevante descobrir o mesmo e perceber de que forma a T afeta esta patologia. Posto isto, o objetivo principal deste trabalho é perceber de que forma o efeito da T afeta a contratilidade celular num contexto de hipertensão gestacional.

Diferentes objetivos foram traçados para esclarecer questões quanto ao mecanismo de ação da testosterona:

- 1) Clarificar o mecanismo de ação da T sobre a guanilato ciclase solúvel (sGC) e o recetor clearance dos péptidos natriuréticos (NPR-C), através de docking molecular;
- 2) Avaliar o efeito da T nas vias de sinalização do óxido nítrico e da ciclooxigenase;
- 3) Analisar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos no efeito a longo prazo da DHT na relaxação induzida pela T.

Capítulo III – Materiais e Métodos

3.1 Recolha de amostras biológicas: cordão umbilical

Para a realização deste estudo experimental, foram recolhidas amostras de cordões umbilicais de origem humana provenientes de partos vaginais no término da gestação. Neste estudo foram incluídas mulheres normotensas e hipertensas diagnosticadas com hipertensão gestacional, no entanto, as amostras de mulheres hipertensas só foram usadas para o PCSA. Os estudos de banho com AUH hipertensas fazem parte de perspetivas futuras. As amostras biológicas oriundas do Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira possuíam entre 3 e 7 cm de comprimento e todos os procedimentos efetuados estavam aprovados pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira EPE No.33/2018, 18 de Julho de 2018 (Covilhã, Portugal), e em conformidade com a Declaração de Helsínquia. Após o parto, de modo a evitar a deterioração e contaminação, os cordões umbilicais foram imediatamente colocados numa solução salina fisiológica de (PSS; composição mM: NaCl 110; CaCl₂ 0.15; KCl 5; MgCl₂; HEPES 10; NaHCO₃ 10; KH₂PO₄ 0.5; NaH₂PO₄ 0.5; EDTA 0.49) com uma mistura de antibióticos (penicilina (5 U/ mL), estreptomicina (5 µg/mL) e anfotericina B (12,5 ng/mL)) e mantidos durante 4-24h, à temperatura de 4°C.

3.1.1 Isolamento e cultura de células do músculo liso da AUH

Para a obtenção de células do músculo liso da AUH, o isolamento foi realizado em condições estéreis, no interior da câmara de fluxo laminar e com o material previamente esterilizado. O cordão foi colocado numa placa de *Petri* sobre gelo, com 250 ml de PSS e 250µL de antibiótico. Inicialmente, de modo a isolar as artérias, a geleia de Wharton foi removida com o auxílio de uma tesoura e pinça cirúrgica. Uma vez isoladas, as artérias foram cortadas em pedaços retangulares e depois ao meio de modo a expor a túnica íntima (endotélio) que foi posteriormente removida mecanicamente com um cotonete. Com uma pinça cirúrgica extraiu-se camadas do músculo liso da parte interna da túnica média, e essas camadas foram depois lavadas 4 vezes com agitação mecânica em 3 ml de PSS com antibiótico. De seguida, foram distribuídas em frascos de cultura (T25) previamente revestidos com colagénio (5µg/cm²) e colocadas na incubadora a 37°C numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Após 19 min foi adicionado 3 mL de meio, e os T25 foram colocados novamente na incubadora. Passado 24h foi adicionado o restante meio de modo a perfazer 5 mL de meio nos T-flasks.

A cada 2-3 dias foi mudado o meio de cultura e após 15-30 dias foram obtidas culturas confluentes, com as quais se obteve subculturas através de consecutivas tripsinizações. Ao fim de algumas passagens (máximo 6), as células foram transferidas para

multiwells e após atingiram novamente o estado confluyente, colocadas em meio sem soro 24h antes de serem utilizadas para a técnica *Planar Cell Surface Area* (PCSA).

Para alguns ensaios foi realizada uma pré-incubação com DHT. Para tal após as células atingirem a confluência e estarem em meio sem soro, foi adicionado DHT (1, 10, 100 nM) de um stock previamente dissolvido em etanol e incubou-se durante outras 24h. As culturas eram provenientes de grávidas normotensas e de grávidas com hipertensão gestacional.

Estudos de contratilidade das células do músculo liso da AUH *por Planar Cell Surface Area*

A técnica PCSA foi utilizada para analisar a contratilidade das células do músculo liso da AUH. As células tripsinizadas foram colocadas numa placa de *Petri* com uma base de vidro específica revestida com colagénio, e depois incubadas durante 2h sob as mesmas condições. Findo o período de incubação, as células estavam prontas para o ensaio microscópico, o qual foi realizado na ausência de luz.

As células foram observadas num microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1, Jena, Alemanha) totalmente motorizado e equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade Axio Cam *Hsm* (Zeiss, Jena, Alemanha) com um sistema de incubação integrado capaz de controlar a temperatura. As células foram inicialmente observadas ao microscópio onde se tirou a primeira fotografia (foto 0) que serviu de controlo e adicionou-se 5 µL de agente contrátil serotonina (5-HT, 1 µM). Passado 20 min tirou-se a 2ª fotografia e adicionou-se 10 µL de testosterona (T; 100 nM). 20 minutos após a adição da T foi tirada a última fotografia, que revelava o efeito da T sobre as células pré-contraídas.

A análise o tratamento das imagens foi realizado no programa Axionvision 4.8 software, recorrendo ao suplemento Automatic measurement programs, que permitiu medir a diferença de área das células após a adição dos fármacos. Todos os procedimentos mencionados anteriormente foram realizados de igual forma com células pré-incubadas com DHT e amostras de células provenientes de cordões de mulheres hipertensas, para comparação.

3.1.2 Estudo de reatividade vascular

Preparação e extração das artérias umbilicais do cordão umbilical

Inicialmente realizou-se o isolamento das artérias do cordão umbilical para a realização dos estudos de reatividade vascular com e sem endotélio. Para o isolamento, o cordão foi colocado numa placa de *Petri* com PSS, onde as artérias foram isoladas dos

restantes componentes do cordão, geleia de Wharton e veia umbilical. Uma vez isoladas, as artérias foram colocadas num tubo de falcon com 10 ml de PSS. Posteriormente o endotélio é removido de modo mecânico com uma linha de algodão (no caso das artérias sem endotélio) e de seguida as artérias são colocadas num falcon com 10 ml de DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's médium; composição: DMEM-F12 liofilizado; NaHCO_3 81,2 g/L Ácido L-ascórbico 20 mg/L) a 4°C durante 24h. As artérias com endotélio passam diretamente para a solução DMEM-F12. No caso das artérias incubadas, estas passaram diretamente para a solução DMEM-F12 com a respetiva concentração de dihidrotestosterona (DHT, 100 nM ou 100 μM).

Estudo da reatividade vascular usando a técnica de banho de órgãos

Após 24h em DMEM-F12 os anéis de AUH com aproximadamente 3-5 mm são utilizados para a realização do banho de órgãos. Os anéis, montados em pequenos ganchos de aço inoxidável são submersos em poços com 10 mL de solução de bicarbonato de Krebs à 37°C em contato contínuo com gás carbogénio (95% O_2 e 5% CO_2). A medição da tensão isométrica é feita com transdutores de força (TRI201, PanLab AS, Espanha), uma interface PowerLab/4SP (ML750, ADInstruments) ligada a um sistema computadorizado com o programa "PowerLab Chart5" e um amplificador (ML118/D QuadBridge, ADInstruments).

Uma vez colocados os anéis, estes são submetidos a uma tensão entre 2 e 2,5 g e equilibrados durante 45 min, período correspondente a lavagens de 15 min cada, de modo a estabelecer a tensão basal no final. Após os 45 min, os anéis são submetidos a um teste de viabilidade com serotonina (5-HT; 1 $\mu\text{mol/L}$). Deste modo, artérias com uma contratilidade inferior a 1000g são excluídas do estudo. Uma vez testada a viabilidade, os anéis de AUH foram contraídos com serotonina (5-HT, 1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (KCl, 60 mmol/L) e após estabilizada a resposta contrátil induzida, concentrações crescentes de T (1-100 $\mu\text{mol/L}$) foram adicionadas. Para controlo foi utilizado etanol (veículo usado para dissolver a T) nas mesmas condições referidas anteriormente.

De modo a perceber os efeitos do L-NAME, inibidor da sintetase do NO endotelial, e da Indometacina (Indo), inibidor da ciclooxigenase-2 (COX-2), os inibidores foram adicionados após a adição da serotonina (5-HT, 1 $\mu\text{mol/L}$) e antes da adição do cloreto de potássio (KCl, 60 mmol/L). Depois de estável, as diferentes concentrações de T foram adicionadas de forma crescente. Este procedimento foi realizado em AUH com endotélio na ausência de luz, uma vez que a Indo é um agente fotodegradável.

De seguida utilizou-se o SNP, um agente vasorelaxante para comparar o seu efeito com o da T nas artérias com endotélio pré-incubadas com DHT. Inicialmente, os anéis foram contraídos com 2 agentes contráteis: serotonina (5-HT, 1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio

(KCl, 60 mmol/L). Após a estabilização do agente contrátil foi adicionado concentrações crescentes de SNP (1 e 10 $\mu\text{mol/L}$) depois de estabilizada a relaxação induzida pelo SNP foram adicionadas concentrações de T e do controlo. O procedimento foi mais uma vez realizado na ausência de luz porque o SNP é fotodegradável.

3.2 Estudos computacionais por docking molecular

Os estudos computacionais por docking molecular foram realizados de acordo com o descrito anteriormente pelo nosso grupo de investigação [118]. O programa Autodock4 (<http://autodock.scripps.edu/>) foi escolhido para calcular a energia de ligação e os modos de interação da T no centro ativo de duas proteínas: sGC e ANP. As coordenadas das estruturas 3D para as proteínas alvo ANP, sGC e T foram obtidas no Protein Data Bank [PDB] (<https://www.rcsb.org/>) e o software Quimera 1.15 foi utilizado para a respetiva preparação das proteínas e ligandos. A estrutura cristalina do “Crystal Structure of Hormone/Receptor Complex” (PDB ID: 1JDP) a 2.00 Å com os seus ligandos, 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose (NAG) e CHLORIDE ION (CL), foi extraída. Separou-se o recetor clearance tio C do péptido natriurético (NPRC-C) (ANP, cadeia B) e o ligando (NAG, cadeia B) pelo programa Quimera 1.15, para obter o NPRC-C e o NAG. Da mesma forma, a estrutura cristalina do “Structure of human soluble guanylate cyclase in the unliganded state” (PDB ID: 6JTo) a 4.00 Å juntamente o seu ligando, PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE (HEM), foi extraída. A proteína (sGC, cadeia B) e o ligando (HEM, cadeia B), foi isolada com o programa Quimera 1.15 para obter a sGC e o HEM. E por último, foi extraída a estrutura cristalina “Crystal Structure of Human Anti-steroid Fab 5F2 in Complex with Testosterone” (PDB ID: 3KDM) a 1.50 Å com o seu ligando, T. Utilizou-se o Quimera 1.15, para isolar o ligando (T). Para calcular a energia de ligação e os modos de interação da T nos centros ativos da sGC e NPR-C, uma vez extraídos e preparados os alvos da simulação, foi utilizado o programa Autodock (<http://autodock.scripps.edu/>).

Para preparar as moléculas, particularmente, para remover moléculas de água, fundir átomos de hidrogénio não polares e adicionar cargas parciais de Gasteiger usou-se o programa Autodock Tools 1.5.6. As identificações da PubChem e Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN) dos ligandos constam na Tabela 1. Para obter as estruturas 3D, adicionou-se átomos de hidrogénio, e a minimização da energia e otimização da geometria foram realizadas pela força de campo MMFF94 no software ChemBio3D 13.0. Para o docking molecular, os ficheiros das estruturas foram salvos no formato PDBQT.

Tabela 1. Nomenclatura e abreviaturas, PubChem e Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN) dos ligandos para o estudo de docking molecular com a guanilil ciclase solúvel (GCs) e o recetor clearance do péptido natriurético atrial (NPR-C).

	NOME	ABREVIATURAS	PUBCHEM ID	CASRN
1	PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE	HEM	4971	553-12-8
2	2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose	NAG	24139	7512-17-6
3	TESTOSTERONA	T	6013	58-22-0

Para realizar os cálculos do mapa grid baseados nas coordenadas do centro ativo da estrutura cristalina da proteína foi usado o Autogrid 4. À volta do centro ativo da sGC e do NPR-C, foram contruídas caixas grid com um *spacing* de 0.375 e com as dimensões (36 x, 32 y, 26 z) e x center = 123.342; y center = 113.269; z center = 135.037 e (11 x, 15 y, 22 z) e x center = 7.939; y center = 23.761; z center = 36.322, respetivamente.

Os controlos do docking molecular foram validados com um valor de RMS inferior a 2 Å e os resultados confirmados com o Autodock Vina. O algoritmo genético Lamarkian do Autodock foi usado para realizar todos os cálculos de docking molecular e os restantes parâmetros de docking foram mantidos por defeito. No final, foi obtido um total de 10 híbridos para cada simulação e foi analisado o híbrido com a menor energia de ligação. A interação da T no centro ativo das proteínas alvo selecionadas (sGC e NPR-C) foi visualizada no software Quimera 1.15.

3.3 Químicos

Para a execução desta investigação foram utilizados os seguintes químicos: testosterona (T), serotonina (5-HT), histamina (His), N(w)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), Indometacina (Indo), nitroprussiato de sódio (SNP), etanol (EtOH) e dihidrotestorona (DHT). Todos os componentes, exceto o DHT, foram adquiridos através da Sigma-Aldrich Quimica (Sintra, Portugal). A DHT (Tokyo Chemical Industry Co, Ltd) foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Samuel Silvestre. A 5-HT, His, L-NAME e o SNP foram inicialmente dissolvidos em água miliQ, enquanto a T, DHT e a Indo foram em etanol puro. De forma a evitar interferências no estudo, a concentração de EtOH nunca excedeu os 0.01%.

Para os diferentes procedimentos foram preparadas diluições de T; EtOH e SNP. Os compostos químicos anteriormente mencionados foram diluídos em Krebs diluído, tendo sido as diluições preparados no próprio dia da experiência. No caso do PCSA, foram dissolvidos em meio sem soro.

3.4 Análise estatística

Para cada condição experimental analisada, os resultados foram expressos em função da média \pm erro padrão de n experiências. A análise estatística dos dados foi feita no programa estatístico *SigmaStat Statistical Analysis System* versão 3.5 (*Systat Software, London, UK*). A significância estatística entre os dois grupos de dados foi analisada usando

o teste t-Student e Mann-Whitney (teste não paramétrico). A significância estatística entre as diferentes concentrações e o controle foi analisada usando o one-way ANOVA seguida do teste post hoc Tukey ou post hoc Holm-Sidak para determinar as diferenças significativas entre as concentrações de T. Para grupos com 2 condições diferentes foi utilizado a two-way ANOVA seguida do teste post hoc Holm-Sidak post-hoc. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Capítulo IV – Resultados

4.1 Estudos de contratilidade celular

Os estudos de contratilidade celular sobre as células musculares lisas da AUH foram realizados utilizando a técnica de PCSA. A 5-HT foi o agente contrátil escolhido. A figura 4 mostra o perfil contrátil das células do músculo liso da AUH com diferentes incubações de DHT, provenientes de amostras normais (A) e hipertensas (B).

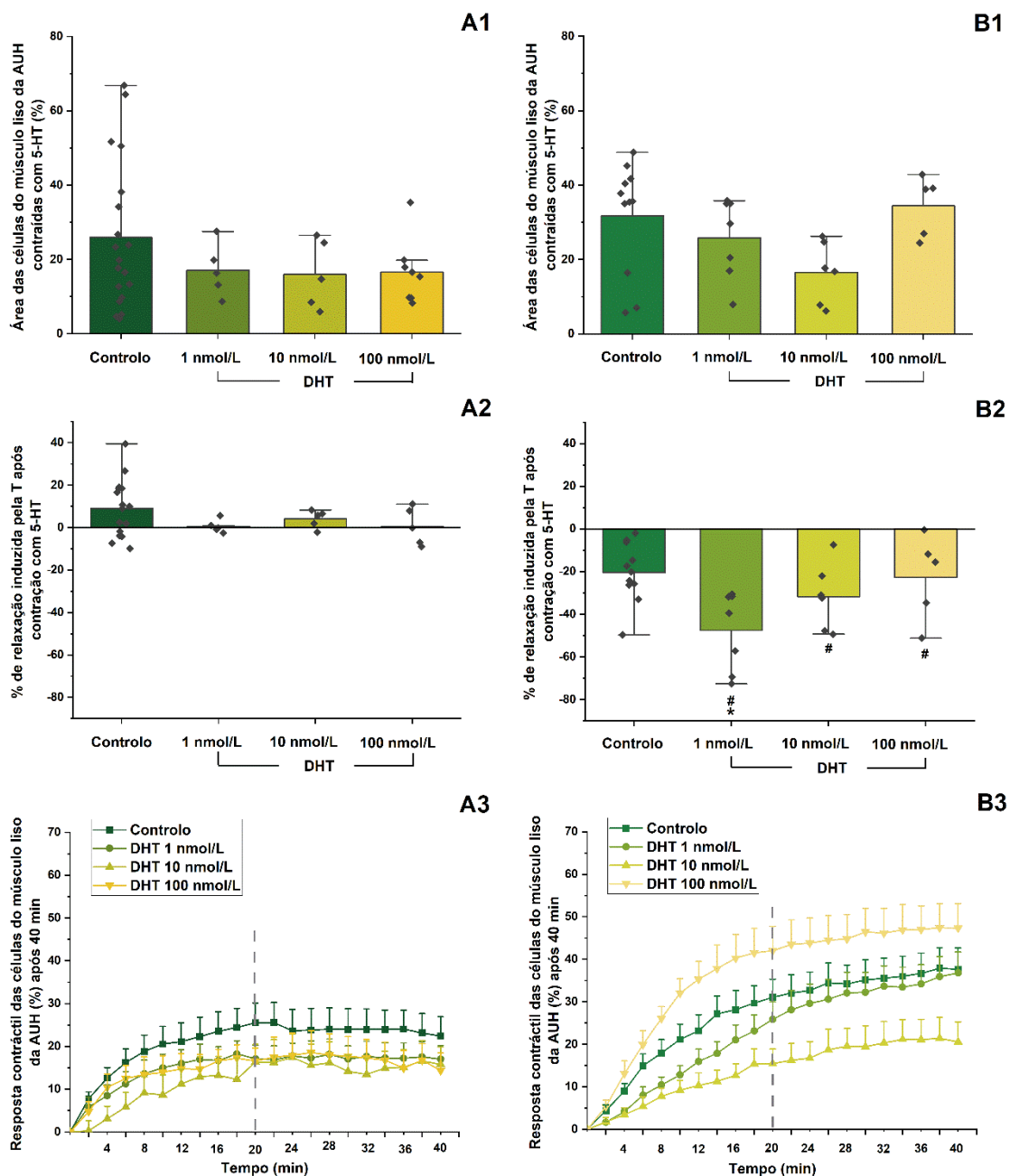


Figura 4. Perfil contrátil das células do músculo liso da AUH com diferentes incubações de DHT (1, 10 e 100 nmol/L), provenientes de amostras normais (A) e hipertensas (B). 1- Área celular após contração induzida pela

serotonina (5-HT). 2- Percentagem (%) de relaxação induzida pela testosterona (T) após contração com serotonina (5-HT, 1 μ M). 3- Perfil temporal contrátil celular. Cada barra representa a média dos dados, e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM). Em 1 e 2, os pontos de dispersão indicam o -n. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA seguida do teste post-hoc Holm-Sidak, onde **p*<0,05 *versus* o controlo e *#p*<0,05 *versus* células normotensas (sem patologia).

Na figura 4 é possível observar a área de contração de células normais (A1) e hipertensas (B1), respetivamente, após a adição da 5-HT. Relativamente às células normais, apesar de não ter havido diferenças significativas, é possível observar que no controlo, a área de contração é maior quando comparada com as outras condições experimentais. Já em B1, não há diferenças significativas novamente, mas as células pré-incubadas com 10 nmol/L de DHT apresentam uma área de contração menor quando comparadas com as restantes. Entre as células normais e hipertensas, houve diferenças estatísticas (*p*<0,05) na área de contração induzida pela 5-HT sendo que a contração induzida nas células hipertensas foi superior. Os resultados estatísticos observados demonstraram que não há uma interação estatisticamente significativa entre as condições (com hipertensão *versus* sem hipertensão) e as concentrações experimentais (*p*=0,825).

Na figura 4A2 e 4B2 está representada a percentagem de relaxamento induzida pela T após a contração com 5-HT. Em 4A2 a T induziu relaxamento, mas não há diferenças significativas (Tabela 2), já em 4B2 se verificou o efeito contrário, isto é, contração e houve diferenças significativas para a incubação de 1 nmol/L quando comparado com o controlo (*p*<0,05, *two-way* ANOVA post hoc Holm Sidak). Entre as células normais e hipertensas, houve diferenças significativas para o controlo e todas as incubações de DHT (*p*<0,05, *two-way* ANOVA post hoc Holm Sidak). Mais uma vez, não houve uma interação estatística significativa entre as condições e as concentrações experimentais (*p*=0,429).

Tabela 2. Diferenças significativas na contratilidade celular induzida pela T em células sem patologia (normotensas) e em células com patologia (hipertensas) ($p < 0,05$, *two-way* ANOVA, post hoc Holm-Sidak).

Condição experimental		[DHT] nmol/L				
		Controlo	1	10	100	
Sem patologia	[DHT] nmol/L	Controlo	-	p=0,233	p=0,305	p=0,443
		1	-	-	p=0,865	p=0,628
		10	-	-	-	p=0,759
		100	-	-	-	-
Com patologia	[DHT] nmol/L	Controlo	-	p=0,242	p=0,006	p=0,628
		1	-	-	p=0,113	p=0,160
		10	-	-	-	p=0,006
		100	-	-	-	-
Sem patologia	[DHT] nmol/L	Controlo	-	p=0,233	p=0,305	p=0,443
		1	-	-	p=0,865	p=0,628
		10	-	-	-	p=0,759
		100	-	-	-	-
Com patologia	[DHT] nmol/L	Controlo	-	p=0,242	p=0,006	p=0,628
		1	-	-	p=0,113	p=0,160
		10	-	-	-	p=0,006
		100	-	-	-	-
Sem patologia vs. Com patologia		p=0,000	p=0,156	p=0,929	p=0,002	

Na figura 4A3 e 4B3 está representado o perfil temporal das células do músculo liso da AUH após a adição da 5-HT (agente contrátil) e T (agente vasorelaxante) em células provenientes de amostras normais (4A3) e hipertensas (4B3). Em células sem patologia, a adição de T aumenta a área das células (4A1), induzindo um relaxamento (4A2). Esse decréscimo na resposta contrátil celular é também observado pelo perfil temporal em 4A3. Já no caso de células hipertensas, o efeito vasorelaxante da T é revertido para um efeito contrátil (B2). Esse aumento na resposta contrátil celular é também visível pelo perfil temporal em 4B3.

4.2 Estudos de contratilidade arterial

O estudo de contratilidade arterial de artérias umbilicais humanas foi realizado recorrendo à técnica de banho de órgãos.

4.2.1 Efeitos vasculares diretos da T na contratilidade das AUH induzida pela 5-HT

Os anéis vasculares da AUH sem e com endotélio foram pré-contraídos com serotonina (5-HT, 1 μ M) e contrações estáveis foram obtidas após 10-15 minutos. Uma vez estável, o efeito vascular da testosterona (T, 1-100 μ M) sobre a AUH foi analisado. Na figura 5 podemos observar o efeito da T na AUH com e sem endotélio.

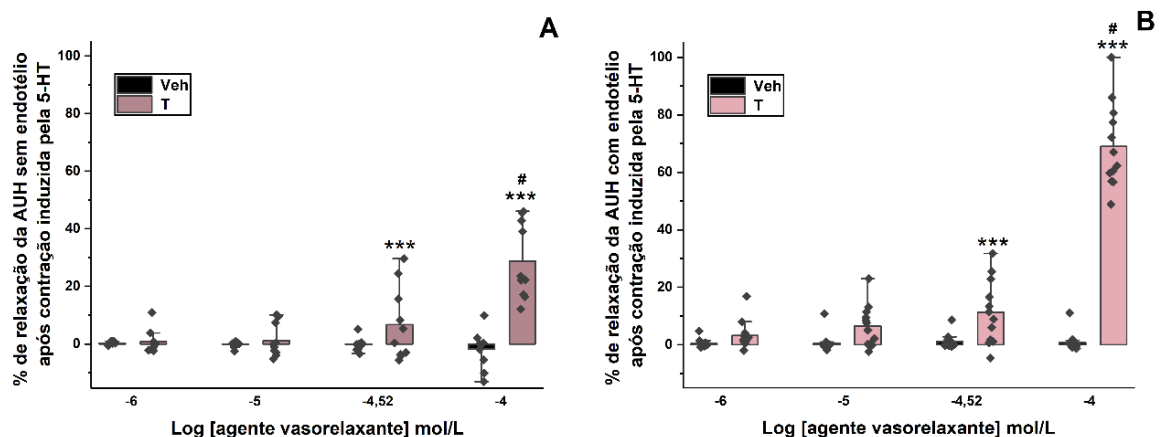


Figura 5. Percentagem da relaxação dos anéis da AUH contraídos com serotonina (5-HT) expostas a concentrações crescentes de testosterona (T; 1-100 μ mol/L, apresentado como Log[T]) na ausência (A) e presença de endotélio (B). Cada barra representa a média, as linhas verticais o erro padrão da média e os pontos de dispersão cada n. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde *** $p < 0,001$ versus o controle e pelo teste *one-way* ANOVA com teste post hoc Tukey, onde # $p < 0,05$ versus concentrações de T.

Conforme observado nas figuras 5A e 5B entre o grupo teste (T) e os respectivos controles (Veh), houve diferenças estatísticas para as concentrações de T de 50 e 100 μ M ($p < 0,001$, teste *t-student*). A T provocou um efeito vasorelaxante máximo para a concentração maior em teste (100 μ M), em artérias sem (28,71%) e com endotélio (69,01%) ($p < 0,05$, *one-way* ANOVA com teste post hoc Tukey). Estes resultados demonstram que o efeito vasorelaxante da T em AUH pré-contraídos com 5-HT, embora também possa acontecer na ausência de endotélio, depende deste para atingir o seu potencial máximo.

4.2.2 Efeitos vasculares diretos da T na contratilidade das AUH induzida pela KCl

Os anéis vasculares da AUH sem e com endotélio foram pré-contraídos com cloreto de potássio (KCl, 60 mM) e contrações estáveis foram obtidas após 10-15 minutos). Uma vez estável, o efeito vascular da testosterona (T, 1-100 μ M) sobre a AUH foi analisado. Na figura 6 podemos observar o efeito da T na AUH com e sem endotélio.

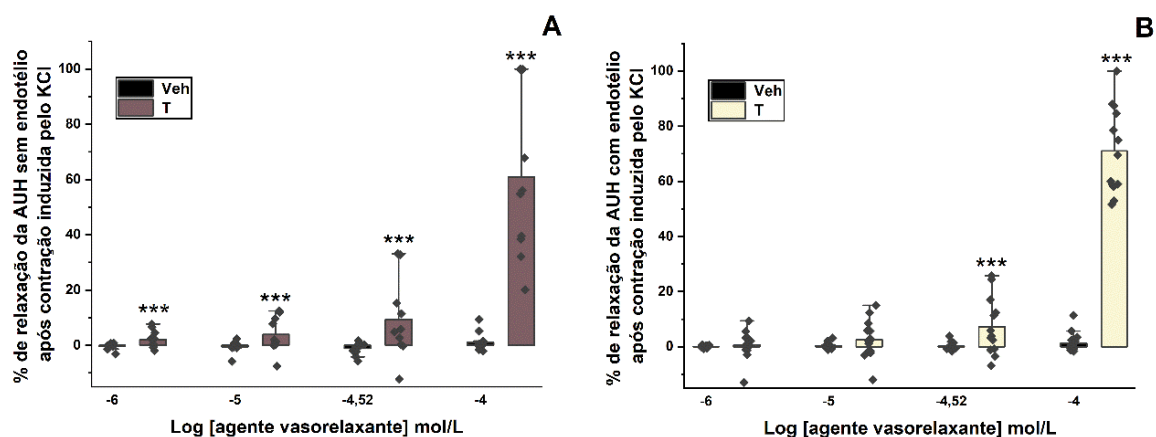


Figura 6. Percentagem da relaxação dos anéis da AUH contraídos com cloreto de potássio (KCl, 60 mM) expostas a concentrações crescentes de testosterona (T; 1-100 μ mol/L, apresentado como Log[T]) na ausência (A) e presença de endotélio (B). Cada barra representa a média, as linhas verticais o erro padrão da média e os pontos de dispersão cada n. A análise estatística foi realizada pelo teste Mann-Whitney, onde $***p < 0,001$ versus o controle e pelo teste *one-way* ANOVA com teste post hoc Tukey.

Conforme observado na figura 6A entre o grupo teste (T) e os respectivos controles (Veh), houve diferenças estatísticas para todas as concentrações de T de 1, 10, 50 e 100 μ M ($p < 0,001$, teste Mann-Whitney). Na figura 6B as diferenças estatísticas entre T e o grupo controle foram observados nas últimas concentrações, 50 e 100 μ M ($p < 0,001$, teste Mann-Whitney). O efeito vasorelaxante máximo foi atingido na última concentração em ambas as situações, não tendo sido observada diferenças estatísticas (com endotélio (71,05%) *vs* sem endotélio (65,39%)). A ausência de endotélio não afeta a relaxação induzida pela T em artérias pré-contraídas com KCl.

4.2.3 Efeitos vasculares diretos da T na contratilidade das AUH na presença de inibidores das vias endoteliais

Os anéis vasculares da AUH foram pré-contraídos com serotonina (5-HT, 1 μ M) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM). A adição dos inibidores L-NAME e Indo ocorreu 15 min antes da contração com 5-HT e após a contração estável com KCl, obtida após 10-15 min. Uma vez estável, o efeito vascular da testosterona (T, 1-100 μ M) sobre a AUH foi analisado. Os resultados estatísticos constam na tabela 3.

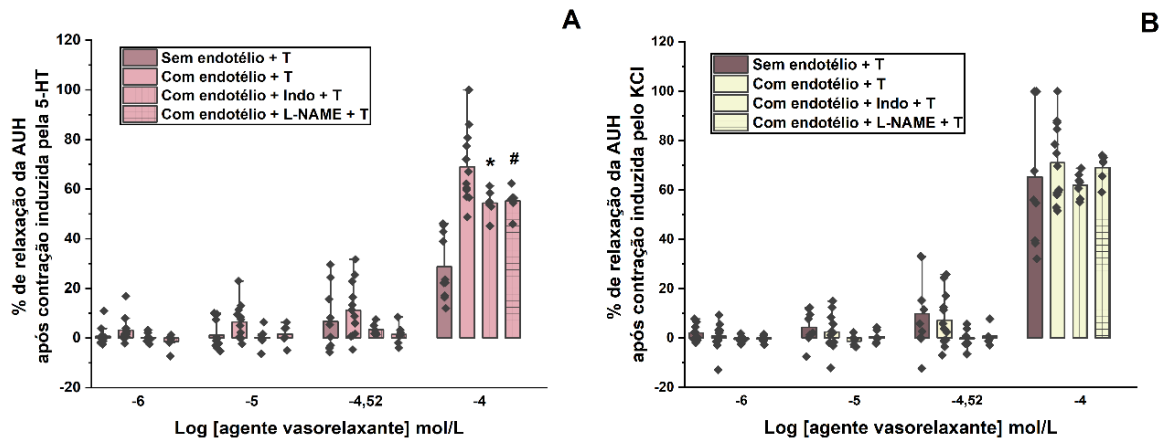


Figura 7. Percentagem da relaxação dos anéis da AUH contraídos com serotonina (5-HT, 1 μ mol/L) (A) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM) (B) na presença dos inibidores L-NAME e Indometacina e expostas a concentrações crescentes de testosterona (T; 1-100 μ mol/L, apresentado como Log[T]). Cada barra representa a média, as linhas verticais o erro padrão da média e os pontos de dispersão cada n. A análise estatística foi realizada pelo *two-way* ANOVA seguido pelo teste post hoc Holm-Sidak onde * $p < 0,05$ representa a diferença entre T versus Indo + T e # $p < 0,05$ representa a diferença entre T versus L-NAME + T.

Tabela 3. Diferenças significativas na vasorelaxação (%) de AUH pré-contraídas com 5-HT e KCl, com e sem endotélio e na presença de inibidores Indo e L-NAME ($p < 0,05$, *two-way* ANOVA seguido pelo teste post hoc Holm-Sidak).

Condição experimental		Log [T] mol/L				
		-6	-5	-4,52	-4	
5-HT	Sem endotélio + T	-6	-	p=0,912	p=0,121	p=0,000
		-5	-	-	p=0,149	p=0,000
		-4,52	-	-	-	p=0,000
		-4	-	-	-	-
	Com endotélio + T	-6	-	p=0,340	p=0,022	p=0,000
		-5	-	-	p=0,177	p=0,000
		-4,52	-	-	-	p=0,000
		-4	-	-	-	-
	Com endotélio + Indo + T	-6	-	p=1,000	p=0,512	p=0,000
		-5	-	-	p=0,513	p=0,000
		-4,52	-	-	-	p=0,000
		-4	-	-	-	-
Com endotélio + L-NAME + T	-6	-	p=0,552	p=0,565	p=0,000	
	-5	-	-	p=0,985	p=0,000	
	-4,52	-	-	-	p=0,000	
	-4	-	-	-	-	
KCl	Sem endotélio + T	-6	-	p=0,702	p=0,141	p=0,000
		-5	-	-	p=0,275	p=0,000
		-4,52	-	-	-	p=0,000
		-4	-	-	-	-
	Com endotélio + T	-6	-	p=0,667	p=0,122	p=0,000
		-5	-	-	p=0,263	p=0,000
		-4,52	-	-	-	p=0,000
		-4	-	-	-	-
	Com endotélio + Indo + T	-6	-	p=1,000	p=0,879	p=0,000
		-5	-	-	p=0,879	p=0,000
		-4,52	-	-	-	p=0,000
		-4	-	-	-	-
Com endotélio + L-NAME + T	-6	-	p=1,000	p=0,982	p=0,000	
	-5	-	-	p=0,982	p=0,000	
	-4,52	-	-	-	p=0,000	
	-4	-	-	-	-	

Conforme observado na figura 7A e tabela 3, para as artérias pré-contraídas com 5-HT, o maior efeito vasorelaxante foi observado para a última concentração de T (100 μ M) ($p < 0,05$, *two-way* ANOVA post hoc Holm Sidak). Nestas artérias, o menor efeito vasorelaxante da T foi obtido no grupo Sem endotélio + T ($p < 0,05$, *two-way* ANOVA seguido de post hoc Holm Sidak). Em relação ao efeito da T na presença de endotélio, diferenças estatísticas foram observadas entre o grupo Com endotélio + T e os grupos com endotélio na presença dos inibidores Indo ($p = 0,001$) e L-NAME ($p = 0,002$). Nos grupos com endotélio na presença de inibidores foi observado uma redução de cerca de 14% do efeito vasorelaxante da T quando comparado com o grupo Com endotélio + T. Há interações estatisticamente significativas entre as condições e as concentrações experimentais ($p = < 0,001$).

No caso das artérias pré-contraídas com KCl, e conforme a figura 7B e tabela 5, foi observado um relaxamento máximo após a adição da última concentração (T, 100 μ M). Em relação ao efeito da T na presença de endotélio, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo Com endotélio + T e os grupos com endotélio na presença dos inibidores Indo ($p = 0,076$) e L-NAME ($p = 0,717$). Neste caso, não há interações estatísticas significativas entre as concentrações e as condições experimentais ($p = 0,886$).

Efeitos diretos da Indometacina e do L-NAME na tensão basal da vasculatura humana

A tensão produzida pela contração da 5-HT após a adição dos inibidores Indo e L-NAME está presente na figura 8. Os resultados demonstram que a tensão basal da AUH não foi alterada com a adição dos inibidores endoteliais uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos em análise ($p = 0,457$, *one-way* ANOVA).

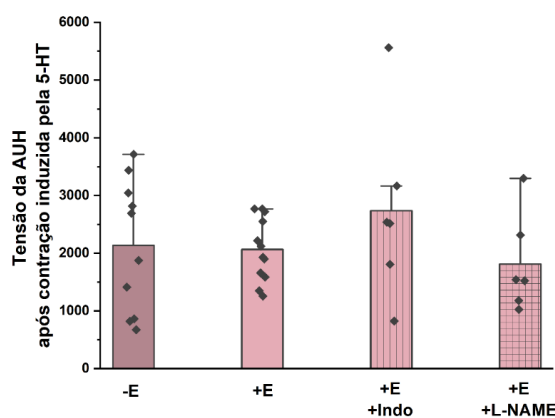


Figura 8. Tensão induzida pela serotonina (5-HT, 1 μ mol/L) após a adição dos inibidores endoteliais L-NAME (inibidor da via do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)) e indometacina (inibidor da via da ciclooxigenase 2

(COX-2)) em anéis da AUH. Cada barra representa a média, as linhas verticais o erro padrão da média e os pontos de dispersão cada n. A análise estatística foi realizada pela *one-way* ANOVA.

4.2.4 Efeito da DHT a longo prazo na atividade contrátil da AUH contraída com serotonina e cloreto de potássio

Os anéis vasculares da AUH pré-incubados com DHT foram pré-contraídos com serotonina (5-HT, 1 μ M) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM) e contrações estáveis foram obtidas após 5-10 min. Uma vez estável e de forma a analisar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos no efeito induzido pela T na AUH, foi utilizado o nitroprussiato de sódio (SNP, 1 e 10 μ mol/L), um estimulador da guanilil ciclase solúvel. De seguida, a vasorelaxação induzida pela testosterona (T, 1-100 μ M) foi analisada. O gráfico 9 resume os resultados obtidos das experiências realizadas para a 5-HT e KCL, servindo o grupo sem incubação como controlo e nas tabelas 4 e 5 constam os resultados estatísticos.

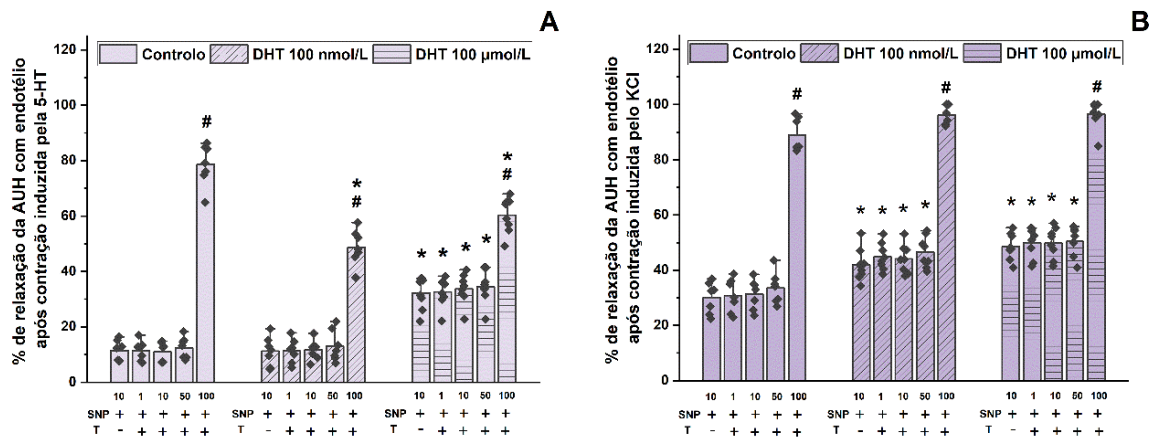


Figura 9. Percentagem da relaxação dos anéis da AUH incubados com dihidrotestosterona (DHT) contraídos com serotonina (5-HT) (A) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM) (B) e expostas a concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio (SNP, 1 e 10 μ mol/L) e testosterona (T; 1-100 μ mol/L). Cada barra representa a média, as linhas verticais o erro padrão da média e os pontos de dispersão cada n. A análise estatística foi realizada pelo *two-way* ANOVA seguido pelo post hoc Holm-Sidak onde * $p < 0,05$ versus controlo (AUH sem incubação com DHT) e # $p < 0,05$ versus SNP sem adição de T.

Tabela 4. Diferenças significativas na vasorelaxação (%) de AUH pré-incubadas com DHT e contraídas com 5-HT e KCl ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Holm-Sidak).

Condição experimental	Log [SNP] mol/L		Log [T] mol/L				
	-5	-6	-5	-4,52	-4		
5-HT	Controlo	-5	-	$p=0,997$	$p=0,858$	$p=0,714$	$p=0,000$
		-6	-	-	$p=0,856$	$p=0,716$	$p=0,000$
		-5	-	-	-	$p=0,585$	$p=0,000$
		-4,52	-	-	-	-	$p=0,000$
		-4	-	-	-	-	-
	DHT 100 nmol/L	-5	-	$p=0,973$	$p=0,869$	$p=0,510$	$p=0,000$
		-6	-	-	$p=0,896$	$p=0,532$	$p=0,000$
		-5	-	-	-	$p=0,620$	$p=0,000$
		-4,52	-	-	-	-	$p=0,000$
		-4	-	-	-	-	-
DHT 100 μ mol/L	-5	-	$p=0,886$	$p=0,571$	$p=0,384$	$p=0,000$	
	-6	-	-	$p=0,672$	$p=0,467$	$p=0,000$	
	-5	-	-	-	$p=0,760$	$p=0,000$	
	-4,52	-	-	-	-	$p=0,000$	
	-4	-	-	-	-	-	
KCl	Controlo	-5	-	$p=0,811$	$p=0,666$	$p=0,236$	$p=0,000$
		-6	-	-	$p=0,847$	$p=0,343$	$p=0,000$
		-5	-	-	-	$p=0,450$	$p=0,000$
		-4,52	-	-	-	-	$p=0,000$
		-4	-	-	-	-	-
	DHT 100 nmol/L	-5	-	$p=0,270$	$p=0,408$	$p=0,115$	$p=0,000$
		-6	-	-	$p=0,782$	$p=0,606$	$p=0,000$
		-5	-	-	-	$p=0,434$	$p=0,000$
		-4,52	-	-	-	-	$p=0,000$
		-4	-	-	-	-	-
DHT 100 μ mol/L	-5	-	$p=0,621$	$p=0,657$	$p=0,546$	$p=0,000$	
	-6	-	-	$p=0,959$	$p=0,925$	$p=0,000$	
	-5	-	-	-	$p=0,883$	$p=0,000$	
	-4,52	-	-	-	-	$p=0,000$	
	-4	-	-	-	-	-	

Em relação à figura 9A, o efeito vasorelaxante máximo foi atingido após a adição da última concentração de T (100 μ mol/L) para todas as condições experimentais, sendo esse efeito sinérgico e estaticamente significativo quando comparado com o efeito do SNP

sozinho (# $p < 0,05$) (Tabela 4). Para a incubação de 100 nmol/L de DHT, na máxima concentração de T o efeito vasorelaxante observado foi cerca de 30% inferior ao do controlo, já para a incubação de 100 $\mu\text{mol/L}$, o efeito vasorelaxante da T após a adição da concentração máxima foi 20% inferior. Ainda sobre a incubação de 100 $\mu\text{mol/L}$ de DHT, as concentrações inferiores a concentração máxima de T incluindo a do SNP demonstraram um efeito superior e estatisticamente significativo quando comparado com o controlo (* $p < 0,05$) (Tabela 5). O mesmo não foi observado para a incubação de 100 nmol/L (* $p > 0,05$). Há interação estatisticamente significativa entre as concentrações e as condições experimentais ($p = < 0,001$).

Tabela 5. Diferenças significativas na vasorelaxação (%) de AUH pré-incubadas com DHT ($p < 0,05$, *two-way* ANOVA seguido pelo teste post hoc Holm-Sidak).

Condição experimental		Log [SNP] mol/L		Log [T] mol/L		
		-5	-6	-5	-4,52	-4
5-HT	Controlo vs. DHT 100 nmol/L	p=0,941	p=0,966	p=0,788	p=0,826	p=0,000
	Controlo vs. DHT 100 $\mu\text{mol/L}$	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
	DHT 100 nmol/L vs. DHT 100 $\mu\text{mol/L}$	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
	Controlo vs. DHT 100 nmol/L	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,007
	Controlo vs. DHT 100 $\mu\text{mol/L}$	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,012
	DHT 100 nmol/L vs. DHT 100 $\mu\text{mol/L}$	p=0,013	p=0,059	p=0,035	p=0,150	p=0,856

Já na figura 9B, mais uma vez o efeito vasorelaxante máximo foi atingido na última concentração (T; 100 $\mu\text{mol/L}$) em todas as condições experimentais, tendo sido observadas diferenças estatísticas quando comparado com o SNP sozinho (# $p < 0,05$) (Tabela 4). Tanto a incubação com 100 nmol/L como a de 100 $\mu\text{mol/L}$ com DHT apresentaram um vasorelaxamento superior ao do controlo em todas as concentrações de T excetuando para a concentração máxima, isto é, todas as concentrações exceto a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram diferenças estatísticas quando comparado com o controlo (* $p < 0,05$) (Tabela 5). Há interações estatísticas significativas entre as concentrações e as condições ($p = < 0,001$).

4.3 Simulações no recetor atrial dos péptidos natriuréticos e da sGC

Foi simulada a ligação da T às proteínas alvo (sGC e NPR-C) para verificar a sua afinidade de ligação. As simulações de controlo foram realizadas com os ligandos originais e demonstraram geometrias de interação ligando-proteína presentes nas estruturas cristalinas com um RMSD ≤ 2.0 Å. As simulações apresentaram um RMSD entre 0.57 e 2.24 Å, para a molécula sGC com o seu ligando natural HEM e para a molécula NPR-C com o seu ligando natural NAG, respetivamente. O último controlo, embora apresente um RMSD >2 Å foi validado visto que a diferença é mínima. E assim, todas as simulações foram validadas e de seguida procedeu-se à avaliação da interação da T e das proteínas alvo.

As energias de ligação da TES, bem como do ligando natural no centro ativo da sGC (Figura 10) e recetor *clearance* para o ANP foi simulada, e os resultados da simulação do docking molecular podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 4. Energias de ligação dos ligandos HEM, NAG e T (1-10) calculados por docking molecular.

Composto	GCs	ANP-CR
HEM	-17.07	-
NAG	-	1.47
T_1	-9.89	26400.0
T_2	-9.88	26500.0
T_3	-9.88	26500.0
T_4	-9.88	28600.0
T_5	-9.87	28700.0
T_6	-9.87	26500.0
T_7	-9.87	26500.0
T_8	-9.87	26600.0
T_9	-9.87	28700.0
T_10	-9.87	29800.0

Em relação à simulação para a sGC, os resultados demonstraram que o HEM liga-se ao seu centro ativo da sGC com uma energia de ligação negativa (-17,07). A ligação sGC ao ligando natural HEM envolve uma interação de resíduos de aminoácidos Arg 116, Met 115 e TYR 2, formando 1 ponte de H com o resíduo Arg 116 a 1.965 Å (Figura 1A, C). No que diz respeito à ligação da T com a sGC, para além do Arg 116 e TYR 2, ainda há a ligação ao resíduo de aminoácido Ala 117 e a 0.4 Å não tem pontes de H, mas a 3 Å tem 1 ponte de H com o resíduo Arg 116 (4.333 Å), tal como aparece na (Figura 1B, D). Através das análises de acoplamento verificou-se uma energia de ligação de -17.07 kcal/mol e -9,89 kcal/mol para o ligando HEM e para a T, respetivamente. A análise do docking mostra que a T se liga ao centro ativo do sGC.

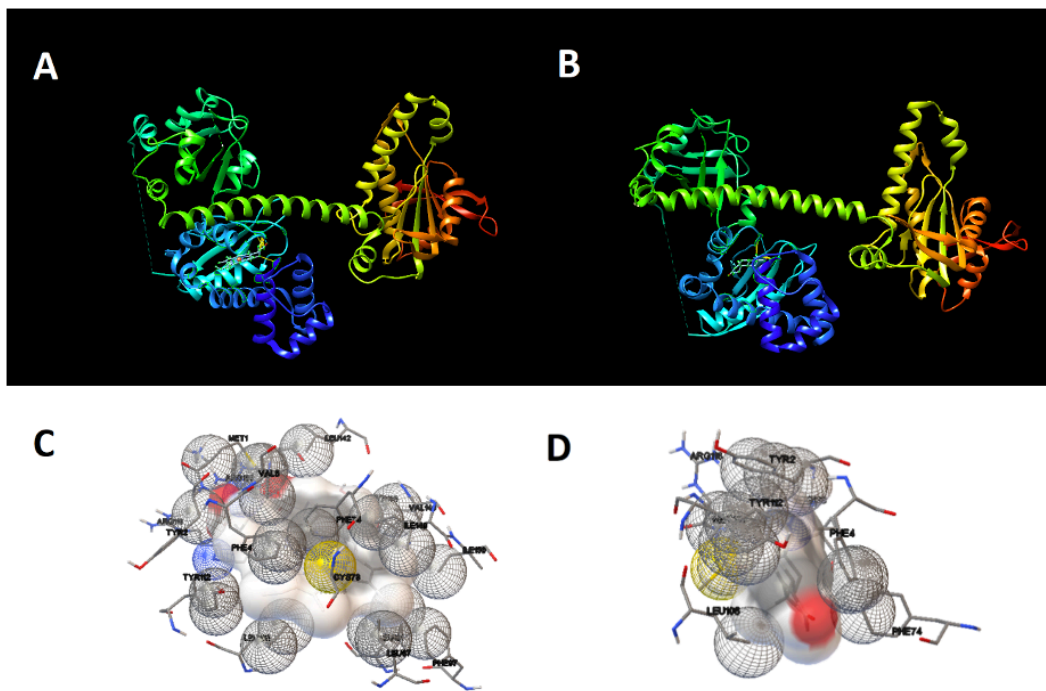


Figura 10. Representação do docking do complexo sGC com o ligando PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE (HEM) e TESTOSTERONE (T). (A, B) mostram as representações 3D das interações e conformações preferidas entre o ligando natural, HEM, e a T, respetivamente, com o centro ativo do sGC usando o Quimera 1.15. (C, D) mostram as interações entre o HEM e T, respetivamente, com os resíduos de aminoácidos no centro ativo do sGC, usando o software Autodock.

No que diz respeito ao resultado do docking molecular do NPR-C com o seu ligando natural NAG, a energia de ligação do ligando natural do recetor do ANP no seu centro ativo é 1.47 kcal/mol, o que reflete uma má ligação do NAG ao NPR-C. Na análise do docking molecular com a T no centro ativo do NPR-C, obtivemos uma energia de ligação bastante superior (26400.0 kcal/mol), o que quer dizer que a T não se liga ao NPR-C.

Capítulo V – Discussão

A T é um esteroide que induz a vasorelaxação de diversos vasos sanguíneos de diferentes espécies, incluindo em humanos, via genómica, e não genómica [26]. Contudo, o mecanismo pelo qual ela atua ainda não é bem conhecido e nada se sabe sobre o seu efeito nos vasos sanguíneos de gestantes com hipertensão. Sabe-se que a PE é uma doença de etiologia desconhecida e ao longo dos anos diversos estudos apontaram para uma associação entre elevados níveis de T e a doença, porém se são os níveis de T que medeiam o aumento na pressão sanguínea materna durante a gravidez ou se é uma consequência do aumento da pressão sanguínea permanece uma incógnita [66, 102]. Pereira-de-Morais L *et al.* mostraram que a PE causa alterações na contratilidade vascular dos vasos do cordão umbilical, aumentando a reatividade para todas as tensões basais ao contrário do que acontece em amostras normotensas [119].

Estudos *in vitro* e *ex vivo* indicam que na PE níveis aberrantes de T interferem com o fluxo sanguíneo e as vias de relaxação, aumentando o stress oxidativo com um aumento na expressão e foi detetada uma maior coloração dos recetores de androgénios em amostras de placenta, podendo essas alterações estar envolvidas na desregulação dos processos fisiológicos regulados pela T e por conseguinte contribuir para o desenvolvimento da doença [67, 80, 82, 85]. Resultados de um estudo realizado por Iribara AC *et al.* demonstraram que não há diferenças estatísticas entre os níveis séricos de T em mulheres com hipertensão crónica/pré-existente e normotensas [95]. No entanto existe uma lacuna na literatura no que concerne aos efeitos da T na hipertensão gestacional.

Por esse motivo, o primeiro objetivo estabelecido para este trabalho foi a análise dos efeitos causados pela T na contratilidade celular num contexto de hipertensão gestacional através da técnica PCSA. O efeito a longo prazo da DHT também foi observado. Esta técnica permitiu avaliar mudanças na área celular sendo que para esse propósito as células foram expostas a um agente contrátil, neste caso a 5-HT, e a um agente vasodilatador, T. Aquando da incubação com o agente contrátil, tal como esperado, todas as células, normotensas e hipertensas, com ou sem incubação produziram uma resposta contrátil. No entanto, a resposta à 5-HT foi superior nas células hipertensas. Deste modo, acreditamos que a expressão dos recetores para a 5-HT nas células do músculo liso, nomeadamente o recetor 5-HT_{2A}, através do qual a 5-HT induz vasoconstrição, esteja aumentada, ou haja um aumento na sensibilidade desses recetores durante a hipertensão gestacional que possa contribuir para a manutenção da alta PA [120]. Ao longo dos anos diversos estudos demonstraram uma hipersensibilidade de vasos sanguíneos à 5-HT na hipertensão porém, o papel da 5-HT na hipertensão ainda é controverso (revisto em [121]). Porém, altos níveis de 5-HT foram reportados em casos de PE, e estudos também evidenciaram um aumento

na excreção urinária de metabolitos de 5-HT em mulheres com a doença [122, 123]. Toh *et al.* observou que mulheres expostas à terapia com 5-HT corriam o risco de desenvolver PE e hipertensão gestacional, mas os dados que associam a 5-HT à hipertensão gestacional ainda são limitados [124].

Ao nível do efeito induzido pela T, os resultados obtidos em células provenientes de amostras normotensas demonstraram o seu efeito vasorelaxante. Deste modo, os resultados observados corroboram com trabalhos anteriormente publicados, ou seja, sob condições normais ou normotensas, a adição da T produz um efeito vasorelaxante [57, 125-127]. Apesar de não haver diferenças significativas, esse efeito foi inferior em células pré-incubadas com 1 e 100 nmol/L de DHT. Em células provenientes de amostras hipertensas, foi observado o efeito oposto ao observado em células normotensas. Isto é, a T induziu um efeito contrátil tendo sido observado diferenças significativas para o controlo e para todas as concentrações de incubação de DHT (1-100 nmol/L) tendo a incubação com 1 nmol/L de DHT produzido o maior efeito contrátil observado quando comparado ao controlo. Estes resultados sugerem uma desregulação durante a hipertensão gestacional nas vias de sinalização responsáveis pelo vasorelaxamento induzido pela T.

Em suma, foi demonstrando através da técnica PCSA que a T induz um efeito relaxante em células musculares lisas da AUH normotensas e o efeito contrário, isto é contração em células hipertensas. Para as células normotensas a incubação com 1 e 100 nmol/L de DHT diminui a resposta vasorelaxante da T enquanto para as células hipertensas parece intensificar o efeito contrátil.

Para a contração com 5-HT, o efeito da concentração de incubação não depende da patologia ou ausência dela. Em relação ao efeito da T, parece que há diferenças entre haver ou não patologia e entre as incubações, porém, os efeitos que são observados para as incubações não dependem da existência ou ausência de patologia.

De seguida, o passo seguinte foi determinar o efeito vascular endotelial da T na AUH.

Para tal, estudos de reatividade arterial foram realizados com a técnica de banho de órgãos em artérias com e sem endotélio. Inicialmente, o efeito das diferentes concentrações de T (1-100 μ M) foi analisado, após a contração da AUH por serotonina (5-HT, 1 μ M) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM). Os nossos resultados indicaram que a T foi capaz de induzir uma vasorelaxação em AUH previamente contraídas por 5-HT e KCl, independentemente do papel do endotélio. O vasorelaxamento induzido pela T foi dependente da concentração e o efeito máximo foi conseguido para a concentração de 100 μ M de T, tanto para artérias sem e com endotélio, para os dois agentes de contração utilizados. No entanto, foi visto que a T induz uma percentagem de vasorelaxamento

superior em AUH com o endotélio intacto após a contração com 5-HT o que está de acordo com outros autores que sugeriram que o efeito vasorelaxante da T era parcialmente dependente de vias de vasorelaxação endoteliais [127-129]. Relativamente ao efeito da T na contração induzida por KCl, o efeito máximo de vasorelaxação foi atingido na concentração máxima (T, 100 μ M) independentemente do papel do endotélio, o que sugere um efeito dependente da dose-concentração, isto é, quanto maior for a dose de T maior o efeito vasorelaxante produzido.

Depois, foram usados os inibidores Indo (inibidor das cicloxigenases) e L-NAME (inibidor não seletivo da eNOS) [130, 131]. Após a inibição da COX com a Indo, contraíram-se as AUH com 5-HT e KCl, a adição dos inibidores não afetou a contração induzida pela 5-HT. O mesmo não foi observado em Lorigo M *et al.* para os anéis arteriais de rato após a inibição com o L-NAME, onde foi observado que a contração pelos agentes noradrenalina e fenilefrina foi significativamente superior quando comparado com as outras contrações. Já para o COX não foram observadas diferenças estatísticas [132]. A diferença nos resultados obtidos deve-se ao uso de amostras de espécies diferentes, bem como compostos. A T é uma hormona natural, já os disruptores endócrinos (compostos usados no estudo por Lorigo M. *et al.*) são químicos exógenos nocivos para a saúde humana que interferem com a ação das hormonas.

Em artérias pré-contraídas com 5-HT, uma diminuição de 14% foi observada na concentração mais alta (T, 100 μ M) na presença da Indo quando comparado com artérias com endotélio. Ao inibir as cicloxigenases, a Indo interfere com a síntese das prostaglandinas, especialmente a da prostaciclina (PGI₂) [130, 133]. A diminuição no efeito vasorelaxante da T após a inibição da via COX sugere que a vasorelaxação induzida pela T é, em parte, mediada pelas prostaglandinas. A inibição da via eNOS apresentou resultados semelhantes, indicando, tal como foi anteriormente evidenciado que a T atua através da via GC. O L-NAME (inibidor da eNOS) é uma enzima que catalisa a conversão da L-arginina em NO, atua através da via da GC, levando ao aumento da cGMP e consequente vasorelaxação [134]. O efeito das diferentes concentrações de T utilizadas depende da condição experimental, isto é, ter ou não endotélio, ausência ou presença de inibidores. Por último, foi analisado o efeito da inibição da Indo e do L-NAME quando as artérias foram previamente contraídas com KCl. O vasorelaxamento induzido pela T foi semelhante independentemente do inibidor utilizado, isto é, a adição dos inibidores não afeta a vasorelaxação induzida pela KCl, sugerindo que a vasorelaxação induzida pela T em artérias pré-contraídas com KCl não é mediada pelas prostaglandinas nem pelo NO. No caso do KCl, o efeito das diferentes concentrações já não depende da condição experimental.

Em suma, de acordo com os resultados obtidos, foi verificado que em artérias pré-contraídas com 5-HT o efeito da T ocorre até na ausência de endotélio, no entanto o seu

efeito vasorelaxante é muito superior na presença de endotélio. A T atua pela via do NO e das ciclooxigenases para induzir a vasorelaxação e tendo em conta os resultados obtidos supõe-se que é possível que a inibição simultânea das duas vias possa ter um efeito semelhante ao observado em artérias sem endotélio. Em artérias pré-contraídas com KCl, o efeito observado da T é independente da existência de endotélio e da inibição provocada pela Indo e pelo L-NAME sugerindo que o efeito da T após contração induzida pelo KCl em AUH com endotélio não é mediado pelo endotélio. Consequentemente, o efeito da T parece envolver a ativação de canais de K^+ , o que vai de encontro ao demonstrado anteriormente por Cairrao et al. [58].

No que diz respeito ao efeito do SNP (estimulador da sGC) os resultados demonstraram que induziu um efeito vasorelaxante, embora que pouco significativo, e inferior ao da T sozinha, em AUH pré-contraídas com 5-HT. Tendo em conta as diferenças no efeito vasorelaxante induzido, os resultados sugerem que a SNP e a T induzem vasorelaxação na AUH com endotélio através de vias diferentes. Em artérias pré-contraídas com KCl o efeito do SNP foi superior assemelhando-se ao efeito da T em AUH sem endotélio pré-contraídas com 5-HT. No entanto o efeito da SNP, em artérias contraídas com KCl foi superior assemelhando-se ao efeito da T em AUH sem endotélio pré-contraídas com 5-HT. Independentemente do agente contrátil utilizado, a adição conjunta do SNP e da T induz um efeito que parece ser aditivo, e mais uma vez, os dados sugerem que o efeito da T e do SNP é atingido através de vias diferentes que levam à vasorelaxação. O que está de acordo com os resultados obtidos por Feiteiro et al. [127]. O grupo de investigação demonstrou que o ANP (estimulador da GC membrana (pGC) que causa o aumento do cGMP intracelular) e a T induzem um efeito vasorelaxante semelhante e em conjunto esse efeito não é significativamente superior sugerindo que partilham a mesma via. Portanto, tendo em conta que já foi demonstrado que a T e a ANP partilham a mesma via, faz sentido que a T e o SNP atuem a partir de vias diferentes tendo em conta a existência da compartimentação da cGMP na vasculatura do músculo humano, isto é, a sua localização. Noutro estudo mais recente, Feitiro *et al.* demonstrou que quando o pGC é ativado pelo ANP ocorre um aumento do cGMP perto da membrana, já quando é a sGC ativada pelo SNP esse aumento do cGMP ocorre no citosol, mas também perto da membrana [135]. Tal deve-se aos diferentes subtipos de PDE (PDE3 e PDE5). A PDE5 controla a “pool” particulada, já a PDE3 é exclusiva da solúvel.

De seguida, de modo a analisar o efeito a longo prazo da DHT na vasorelaxação induzida pela SNP e pela T, as artérias foram incubadas com diferentes concentrações de DHT (100 nM e 100 μ M). Em artérias pré-contraídas com 5-HT, e incubadas com 100 nM, o efeito do SNP foi semelhante ao observado no controlo (artérias não incubadas) mas a

adição da última concentração de T (100 μ M) induziu um efeito vasorelaxante inferior. Sugerindo que para concentração de 100 nM, a incubação com DHT interfere na vasorelaxação induzida pela T. Em artérias pré-incubadas com 100 μ M de DHT, o efeito do SNP foi 3 vezes superior ao do controlo e o efeito da T após a adição da última concentração induziu uma percentagem de vasorelaxação semelhante ao do SNP sozinho. Os resultados sugerem que a incubação de 100 μ M de DHT interfere com as vias de vasorelaxação dos dois agentes, potencializando o efeito do SNP e reduzindo o da T. O efeito da concentração de T depende da condição experimental, isto é, na incubação, e consequente concentração do agente incubador utilizado (DHT), ou ausência dela. Em artérias pré-contraídas com KCl e incubadas com DHT, o efeito do SNP foi superior quando comparado com o controlo, para as duas concentrações de DHT utilizadas, no entanto o efeito da T foi semelhante. Já para o KCl, o efeito da concentração depende da condição experimental, ou seja, da incubação e concentração de DHT.

Resumindo, o SNP e a T atuam através de vias independentes para induzir a vasorelaxação. As artérias continuam responsivas após a incubação. A incubação com DHT interfere com a vasorelaxação induzida pela T após contração com 5-HT, talvez através da ligação aos recetores de androgénios, tendo em conta que a DHT é mais biologicamente ativa do que a T e se liga com 2 vezes mais afinidade ao RA tal ocorre porque a DHT difere da T pela ausência de uma única ligação dupla num dos anéis [136, 137]. Já a incubação com 100 μ M de DHT parece estimular a resposta das artérias ao NO, potencializando o efeito do SNP. Em relação à contração induzida pelo KCl, o efeito a longo prazo da DHT parece interferir apenas com a vasorelaxação induzida pelo SNP aumentando o seu efeito, o que faz sentido porque tal como foi anteriormente dito a DHT é um androgénio mais potente que a T, e sendo a T capaz de modular os canais de K^+ , nomeadamente o BK_{Ca} e K_V devido a ativação do PKG e juntamente com a ativação do PKG pelo SNP, ocorre a hiperpolarização da membrana e consequente uma maior vasorelaxação produzida pelo SNP [127].

Posteriormente foram realizados estudos computacionais para avaliar o modo de ação da T sobre a atividade da GC.

Anteriormente, Cairrao *et al.* analisou o efeito da T e do ANP e demonstrou que a T induz o aumento do cGMP [62, 127]. Além disso, também demonstrou que o efeito rápido da T é semelhante ao observado para o ANP. Contudo, os autores não conseguiram demonstrar o mecanismo/recetor pelo qual a T provoca o aumento da concentração intracelular do cGMP. Porém o mecanismo pelo qual o ANP provoca o aumento intracelular do CGMP parece envolver a ativação do recetor A do péptido natriurético (NPR-A) [138]. Assim, e uma vez que, a sGC e o recetor A da ANP (NPR-A) são moléculas envolvidas na

vasodilatação, foram o alvo escolhido para a experiência do docking molecular com o intuito de esclarecer o modo de ação da T na via não genômica. Contudo como o NPR-A não está disponível na PDB, tivemos de analisar o NPR-C. Além disso, estudos recentes têm sugerido que a ativação do NPR-C parece estar envolvida nos efeitos vasodilatadores do péptido natriurético C (CNP) [139].

Relativamente aos resultados da análise do docking molecular, resultados indicam que a T se liga ao centro ativo da sGC, embora não tão bem quanto ao ligando natural HEM, mas o mesmo não se verifica no NPR-A. Quando comparado com o ligando natural, a ligação da T ao sGC também envolve a interação com três resíduos de aminoácidos e há também a formação de 1 ponte de H, porém, essas interações ocorrem a uma distância maior quando comparada com o ligando natural HEM. Os resultados do docking molecular indicam que a T tem afinidade com o sGC mas o mesmo não acontece com o NPR-C, o que é confirmado pela energia de ligação. Quanto mais baixa for a energia de ligação, mais estável e mais forte é a ligação [118]. A energia de ligação da T a sGC (-9.89kcal/mol) é mais baixa do que quando ocorre a interação da T com o centro ativo do NPR-C (26400.0 kcal/mol). Tal acontece porque o recetor isolado possui uma cauda citoplasmática curta que carece de um domínio catalítico GC. Contudo, não podemos excluir a possibilidade da ligação da T ao domínio catalítico, uma vez que o recetor utilizado não tem. Embora o docking molecular seja apenas uma simulação, os resultados obtidos sugerem que a T age sobre a sGC, competindo com o HEM pelo seu centro ativo. Em suma, quanto ao NPR-C, excluimos a possibilidade de ocorrer ligação extracelular, mas há a possibilidade de ocorrer ligação intracelular da T ao domínio catalítico, envolvendo a T livre na circulação.

Capítulo VI – Conclusão

Este trabalho analisa pela primeira vez os efeitos da T em células de cordões umbilicais de mães portadoras de hipertensão gestacional, e contribui para um conhecimento mais aprofundado dos efeitos deste androgénio nesta patologia. Foi demonstrado que a T provoca um efeito celular contrátil no grupo com hipertensão gestacional, ao contrário do que acontece no controlo. O efeito a longo prazo da DHT também foi avaliado e verificou-se que em células do grupo com hipertensão gestacional quanto menor for a concentração de incubação de DHT maior o efeito de contração observado. Já no grupo controlo, foi observado um efeito relaxante superior para a incubação de 10 nmol/L de DHT quando comparado com as outras incubações.

No referente aos estudos de reatividade vascular podemos concluir que o efeito vasorelaxante da T depende das vias eNOS e COX, sendo que este efeito também depende do agente contrátil utilizado. Também foi observado, tal como esperado, que a T não partilha a mesma via que o SNP, e que a incubação com DHT interfere com a resposta da T, diminuindo o seu efeito vasorelaxante; tal acontece porque a DHT é um androgénio mais potente que a T, aumentando o efeito vasorelaxante da SNP através da modulação dos canais de K⁺. Por último, através do docking molecular, concluiu-se que a T compete pela ligação ao centro ativo da sGC mas essa ligação não é tão estável e forte quando comparada à do ligando natural HEM, o que sugere que a via não genómica pode ser desencadeada pela ligação da T a sGC. Por outro lado, vimos que a T não se liga ao recetor clearance do ANP selecionado para o docking molecular (NPR-C), no entanto pode existir ligação intracelular, envolvendo a T livre em circulação, ao domínio catalítico.

Assim, este estudo permitiu concluir que a T provoca a contração das células do músculo liso na hipertensão gestacional e em amostras da AUH normotensas o seu efeito é parcialmente dependente das vias do NO e COX, sendo a sua vasorelaxação afetada pelo efeito a longo prazo da DHT. Por último, os estudos computacionais sugerem que a via não genómica pode ser desencadeada pela ligação da T a sGC. Explorar o papel da T na hipertensão gestacional, nomeadamente, na contratilidade celular de amostras da AUH de mulheres e, porventura, futuramente homens trans com esta condição, oferece uma oportunidade para melhor perceber de que forma esta hormona afeta as DHG, melhorar o diagnóstico e traçar planos de risco ajudando assim a melhor a saúde maternal.

Referências

- [1] P. Soma-Pillay, C. Nelson-Piercy, H. Tolppanen, and A. Mebazaa, "Physiological changes in pregnancy," (in eng), *Cardiovasc J Afr*, vol. 27, no. 2, pp. 89-94, Mar-Apr 2016, doi: 10.5830/cvja-2016-021.
- [2] G. M. Peres, M. Mariana, and E. Cairrao, "Pre-Eclampsia and Eclampsia: An Update on the Pharmacological Treatment Applied in Portugal," *J Cardiovasc Dev Dis*, vol. 5, no. 1, Jan 17 2018, doi: 10.3390/jcdd5010003.
- [3] S. Parrettini, A. Caroli, and E. Torlone, "Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes," (in eng), *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 11, p. 611929, 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.611929.
- [4] N. H. Troiano, "Physiologic and Hemodynamic Changes During Pregnancy," (in eng), *AACN Adv Crit Care*, vol. 29, no. 3, pp. 273-283, Fall 2018, doi: 10.4037/aacnacc2018911.
- [5] M. C. Gongora and N. K. Wenger, "Cardiovascular complications of pregnancy," *International journal of molecular sciences*, vol. 16, no. 10, pp. 23905-23928, 2015.
- [6] V. Regitz-Zagrosek et al., "2018 ESC Guidelines for the management of cardiovascular diseases during pregnancy: The Task Force for the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC)," *European Heart Journal*, vol. 39, no. 34, pp. 3165-3241, 2018, doi: 10.1093/eurheartj/ehy340.
- [7] L. Say et al., "Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis," (in eng), *Lancet Glob Health*, vol. 2, no. 6, pp. e323-33, Jun 2014, doi: 10.1016/s2214-109x(14)70227-x.
- [8] A. M. Khedagi and N. A. Bello, "Hypertensive Disorders of Pregnancy," (in eng), *Cardiol Clin*, vol. 39, no. 1, pp. 77-90, Feb 2021, doi: 10.1016/j.ccl.2020.09.005.
- [9] "ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia," (in eng), *Obstet Gynecol*, vol. 133, no. 1, p. 1, Jan 2019, doi: 10.1097/aog.0000000000003018.
- [10] S. Butalia et al., "Hypertension Canada's 2018 Guidelines for the Management of Hypertension in Pregnancy," (in eng), *Can J Cardiol*, vol. 34, no. 5, pp. 526-531, May 2018, doi: 10.1016/j.cjca.2018.02.021.
- [11] "Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy," (in eng), *Obstet Gynecol*, vol. 122, no. 5, pp. 1122-1131, Nov 2013, doi: 10.1097/01.aog.0000437382.03963.88.
- [12] R. G. Wilkerson and A. C. Ogunbodede, "Hypertensive Disorders of Pregnancy," (in eng), *Emerg Med Clin North Am*, vol. 37, no. 2, pp. 301-316, May 2019, doi: 10.1016/j.emc.2019.01.008.
- [13] "Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy," (in eng), *Am J Obstet Gynecol*, vol. 183, no. 1, pp. S1-S22, Jul 2000.
- [14] A. Mammaro et al., "Hypertensive disorders of pregnancy," (in eng), *J Prenat Med*, vol. 3, no. 1, pp. 1-5, Jan 2009.
- [15] J. R. Barton, M. O'Brien J, N. K. Bergauer, D. L. Jacques, and B. M. Sibai, "Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome," (in eng), *Am J Obstet Gynecol*, vol. 184, no. 5, pp. 979-83, Apr 2001, doi: 10.1067/mob.2001.112905.
- [16] A. Tagetti and C. Fava, "Diagnosis of hypertensive disorders in pregnancy: an update," *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, vol. 5, 2019.
- [17] W. Wang et al., "Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study," (in

- eng), *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 21, no. 1, p. 364, May 8 2021, doi: 10.1186/s12884-021-03809-2.
- [18] A. A. Creanga, C. J. Berg, C. Syverson, K. Seed, F. C. Bruce, and W. M. Callaghan, "Pregnancy-related mortality in the United States, 2006-2010," (in eng), *Obstet Gynecol*, vol. 125, no. 1, pp. 5-12, Jan 2015, doi: 10.1097/aog.0000000000000564.
- [19] A. M. Póvoa, F. Costa, T. Rodrigues, B. Patrício, and F. Cardoso, "Prevalence of hypertension during pregnancy in Portugal," (in eng), *Hypertens Pregnancy*, vol. 27, no. 3, pp. 279-84, 2008, doi: 10.1080/10641950802000943.
- [20] PORTATA. *Idade média da mãe ao nascimento do primeiro filho (Anos)*, April 28th 2023,
- [21] M. W. Cunningham, Jr. and B. LaMarca, "Risk of cardiovascular disease, end-stage renal disease, and stroke in postpartum women and their fetuses after a hypertensive pregnancy," (in eng), *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 315, no. 3, pp. R521-r528, Sep 1 2018, doi: 10.1152/ajpregu.00218.2017.
- [22] P. Felig and L. A. Frohman, McGraw-Hill, Ed. *Endocrinology & Metabolism*, 4 ed. McGraw-Hill, 2001.
- [23] A. D. Mooradian, J. E. Morley, and S. G. Korenman, "Biological actions of androgens," (in eng), *Endocr Rev*, vol. 8, no. 1, pp. 1-28, Feb 1987, doi: 10.1210/edrv-8-1-1.
- [24] S. Melmed, R. Koenig, C. Rosen, M. D. P. D. Richard J Auchus, and A. Goldfine, Elsevier Health Sciences, Ed. *Williams Textbook of Endocrinology, 14 Edition*. Elsevier Health Sciences, 2015, p. 1792.
- [25] M. Kaushik, S. P. Sontineni, and C. Hunter, "Cardiovascular disease and androgens: a review," *Int J Cardiol*, vol. 142, no. 1, pp. 8-14, Jun 25 2010, doi: 10.1016/j.ijcard.2009.10.033.
- [26] M. Lorigo, M. Mariana, M. C. Lemos, and E. Cairrao, "Vascular mechanisms of testosterone: the non-genomic point of view," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 196, 2020.
- [27] B. B. Yeap, "Testosterone and its metabolites: differential associations with cardiovascular and cerebrovascular events in men," (in eng), *Asian J Androl*, vol. 20, no. 2, pp. 109-114, Mar-Apr 2018, doi: 10.4103/aja.aja_50_17.
- [28] V. Tyagi, M. Scordo, R. S. Yoon, F. A. Liporace, and L. W. Greene, "Revisiting the role of testosterone: Are we missing something?," (in eng), *Rev Urol*, vol. 19, no. 1, pp. 16-24, 2017, doi: 10.3909/riu0716.
- [29] L. Schiffer, W. Arlt, and K. H. Storbeck, "Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited," (in eng), *Mol Cell Endocrinol*, vol. 465, pp. 4-26, Apr 15 2018, doi: 10.1016/j.mce.2017.08.016.
- [30] H. G. Burger, "Androgen production in women," (in eng), *Fertility and sterility*, vol. 77 Suppl 4, pp. S3-5, Apr 2002, doi: S0015028202029850 [pii].
- [31] A. M. Parsons and G. J. Bouma, "A Potential Role and Contribution of Androgens in Placental Development and Pregnancy," (in eng), *Life (Basel)*, vol. 11, no. 7, Jul 1 2021, doi: 10.3390/life11070644.
- [32] S. R. Hammes and E. R. Levin, "Impact of estrogens in males and androgens in females," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 129, no. 5, pp. 1818-1826, May 1 2019, doi: 10.1172/jci125755.
- [33] M. Perusquía, E. Navarrete, J. Jasso-Kamel, and L. M. Montaña, "Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels," (in eng), *Biol Reprod*, vol. 73, no. 2, pp. 214-21, Aug 2005, doi: 10.1095/biolreprod.104.036954.
- [34] T. M. Plant and G. R. Marshall, "The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis and the Control of Its Secretion in Male Primates," *Endocrine Reviews*, vol. 22, no. 6, pp. 764-786, 2001, doi: 10.1210/edrv.22.6.0446.
- [35] A. V. Schally *et al.*, "Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones," (in eng), *Science*, vol. 173, no. 4001, pp. 1036-8, Sep 10 1971, doi: 10.1126/science.173.4001.1036.

- [36] A. Elagizi, T. S. Kohler, and C. J. Lavie, "Testosterone and Cardiovascular Health," *Mayo Clinic proceedings*, vol. 93, no. 1, pp. 83-100, Jan 2018, doi: 10.1016/j.mayocp.2017.11.006.
- [37] C. Stocco, "Tissue physiology and pathology of aromatase," (in eng), *Steroids*, vol. 77, no. 1-2, pp. 27-35, Jan 2012, doi: 10.1016/j.steroids.2011.10.013.
- [38] E. R. Simpson *et al.*, "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis," (in eng), *Endocr Rev*, vol. 15, no. 3, pp. 342-55, Jun 1994, doi: 10.1210/edrv-15-3-342.
- [39] L. Kragie, "Aromatase in primate pregnancy: a review," (in eng), *Endocr Res*, vol. 28, no. 3, pp. 121-8, Aug 2002, doi: 10.1081/erc-120015041.
- [40] P. M. Marchetti and J. H. Barth, "Clinical biochemistry of dihydrotestosterone," (in eng), *Ann Clin Biochem*, vol. 50, no. Pt 2, pp. 95-107, Mar 2013, doi: acb.2012.012159 [pii] 10.1258/acb.2012.012159.
- [41] R. S. Swerdloff, R. E. Dudley, S. T. Page, C. Wang, and W. A. Salameh, "Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels," (in eng), *Endocr Rev*, vol. 38, no. 3, pp. 220-254, Jun 1 2017, doi: 10.1210/er.2016-1067.
- [42] P. S. Cooke, M. K. Nanjappa, C. Ko, G. S. Prins, and R. A. Hess, "Estrogens in Male Physiology," (in eng), *Physiol Rev*, vol. 97, no. 3, pp. 995-1043, Jul 1 2017, doi: 10.1152/physrev.00018.2016.
- [43] D. M. Kelly and T. H. Jones, "Testosterone: a vascular hormone in health and disease," *J Endocrinol*, vol. 217, no. 3, pp. R47-71, Jun 2013, doi: 10.1530/JOE-12-0582.
- [44] M. Lorigo, M. Mariana, N. Oliveira, M. C. Lemos, and E. Cairrao, "Vascular Pathways of Testosterone: Clinical Implications," *Journal of cardiovascular translational research*, vol. 13, no. 1, pp. 55-72, Feb 2020, doi: 10.1007/s12265-019-09939-5.
- [45] M. Qu *et al.*, "Association of Serum Testosterone and Luteinizing Hormone With Blood Pressure and Risk of Cardiovascular Disease in Middle-Aged and Elderly Men," *Journal of the American Heart Association*, vol. 10, no. 7, p. e019559, 2021, doi: doi:10.1161/JAHA.120.019559.
- [46] M. Perusquia, N. Herrera, M. Ferrer, and J. N. Stallone, "Antihypertensive effects of androgens in conscious, spontaneously hypertensive rats," *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 167, pp. 106-114, Mar 2017, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.11.016.
- [47] T. Goodale, A. Sadhu, S. Petak, and R. Robbins, "Testosterone and the Heart," *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, vol. 13, no. 2, pp. 68-72, Apr-Jun 2017, doi: 10.14797/mdcj-13-2-68.
- [48] S. G. Chrysant and G. S. Chrysant, "Cardiovascular benefits and risks of testosterone replacement therapy in older men with low testosterone," *Hosp Pract (1995)*, vol. 46, no. 2, pp. 47-55, Apr 2018, doi: 10.1080/21548331.2018.1445405.
- [49] J. N. Stallone and A. K. Oloyo, "Cardiovascular and metabolic actions of the androgens: Is testosterone a Janus-faced molecule?," *Biochemical Pharmacology*, vol. 208, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115347>.
- [50] M. Perusquia, "Androgens and Non-Genomic vascular responses in hypertension," *Biochemical Pharmacology*, vol. 203, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115200>.
- [51] M. Barton, E. R. Prossnitz, and M. R. Meyer, "Testosterone and secondary hypertension: new pieces to the puzzle," in *Hypertension*, vol. 59, no. 6). United States, 2012, pp. 1101-3.
- [52] L. Wang, M. Szklo, A. R. Folsom, N. R. Cook, S. M. Gapstur, and P. Ouyang, "Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis," (in eng), *Atherosclerosis*, vol. 224, no. 1, pp. 228-34, Sep 2012, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.005.

- [53] A. Martínez-García and S. R. Davis, "Testosterone use in postmenopausal women," (in eng), *Climacteric*, vol. 24, no. 1, pp. 46-50, Feb 2021, doi: 10.1080/13697137.2020.1796961.
- [54] E. A. Ko, J. Han, I. D. Jung, and W. S. Park, "Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells," *J Smooth Muscle Res*, vol. 44, no. 2, pp. 65-81, Apr 2008.
- [55] E. D. Burg, C. V. Remillard, and J. X. Yuan, "Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications," (in eng), *Br J Pharmacol*, vol. 153 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S99-s111, Mar 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707635.
- [56] W. F. Jackson, "Potassium channels in the peripheral microcirculation," *Microcirculation*, vol. 12, no. 1, pp. 113-27, 2005, doi: 10.1080/10739680590896072.
- [57] E. Alvarez, E. Cairrao, M. Morgado, C. Morais, and I. Verde, "Testosterone and cholesterol vasodilation of rat aorta involves L-type calcium channel inhibition," *Advances in pharmacological sciences*, vol. 2010, p. 534184, 2010, doi: 10.1155/2010/534184.
- [58] E. Cairrão, E. Alvarez, A. J. Santos-Silva, and I. Verde, "Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery," (in eng), *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 376, no. 5, pp. 375-83, Jan 2008, doi: 10.1007/s00210-007-0213-3.
- [59] O. Yildiz and M. Seyrek, "Vasodilating mechanisms of testosterone," *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, vol. 115, no. 1, pp. 1-6, Jan 2007, doi: 10.1055/s-2007-949657.
- [60] A. K. Lucas-Herald, R. Alves-Lopes, A. C. Montezano, S. F. Ahmed, and R. M. Touyz, "Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications," *Clinical science*, vol. 131, no. 13, pp. 1405-1418, Jul 1 2017, doi: 10.1042/CS20170090.
- [61] P. A. Saldanha, E. Cairrão, C. J. Maia, and I. Verde, "Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle," (in eng), *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 40, no. 3, pp. 181-9, Mar 2013, doi: 10.1111/1440-1681.12047.
- [62] J. Feiteiro, A. J. Santos-Silva, I. Verde, and E. Cairrao, "Testosterone and atrial natriuretic peptide share the same pathway to induce vasorelaxation of human umbilical artery," (in English), *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 63, no. 5, pp. 461-5, May 2014, doi: 10.1097/FJC.000000000000060.
- [63] J. L. Scragg, M. L. Dallas, and C. Peers, "Molecular requirements for L-type Ca²⁺ channel blockade by testosterone," *Cell Calcium*, vol. 42, no. 1, pp. 11-15, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.11.003>. 0143-4160.
- [64] C. Hakim, V. Padmanabhan, and A. K. Vyas, "Gestational Hyperandrogenism in Developmental Programming," *Endocrinology*, vol. 158, no. 2, pp. 199-212, Feb 1 2017, doi: 10.1210/en.2016-1801.
- [65] S. West *et al.*, "Overweight, obesity and hyperandrogenemia are associated with gestational diabetes mellitus: A follow-up cohort study," (in eng), *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 99, no. 10, pp. 1311-1319, Oct 2020, doi: 10.1111/aogs.13883.
- [66] S. Kumar, G. H. Gordon, D. H. Abbott, and J. S. Mishra, "Androgens in maternal vascular and placental function: implications for preeclampsia pathogenesis," *Reproduction*, vol. 156, no. 5, pp. R155-R167, Oct 16 2018, doi: 10.1530/REP-18-0278.
- [67] T. Y. Hsu *et al.*, "Expression of androgen receptor in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies," (in eng), *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol. 48, no. 3, pp. 262-7, Sep 2009, doi: S1028-4559(09)60301-6 [pii] 10.1016/S1028-4559(09)60301-6.
- [68] E. S. McWhorter, J. E. Russ, Q. A. Winger, and G. J. Bouma, "Androgen and estrogen receptors in placental physiology and dysfunction," *Front. Biol.*, vol. 13 pp. 315-326 2018
- [69] K. Sathishkumar, M. Balakrishnan, V. Chinnathambi, M. Chauhan, G. D. Hankins, and C. Yallampalli, "Fetal sex-related dysregulation in testosterone production and

- their receptor expression in the human placenta with preeclampsia," (in Eng), *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, vol. 32, no. 5, pp. 328-35, May 2012, doi: 10.1038/jp.2011.101.
- [70] M. Pi, S. K. Nishimoto, and L. D. Quarles, "GPRC6A: Jack of all metabolism (or master of none)," *Molecular metabolism*, vol. 6, no. 2, pp. 185-193, Feb 2017, doi: 10.1016/j.molmet.2016.12.006.
- [71] E. Dimitriadis *et al.*, "Pre-eclampsia," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 9, 2023, doi: <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00417-6>.
- [72] M. Umesawa and G. Kobashi, "Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: prevalence, risk factors, predictors and prognosis," *Hypertens Res*, vol. 40, pp. 213–220, 2017, doi: <https://doi.org/10.1038/hr.2016.126>.
- [73] M. Ma'ayeh and M. M. Costantine, "Prevention of preeclampsia," (in eng), *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 25, no. 5, p. 101123, Oct 2020, doi: 10.1016/j.siny.2020.101123.
- [74] L. Duley, "The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia," *Seminars in Perinatology*, vol. 33, no. 3, pp. 130-137, 2009, doi: <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2009.02.010>.
- [75] H. O. Fasanya, C. J. Hsiao, K. R. Armstrong-Sylvester, and S. G. Beal, "A Critical Review on the Use of Race in Understanding Racial Disparities in Preeclampsia," (in eng), *J Appl Lab Med*, vol. 6, no. 1, pp. 247-256, Jan 12 2021, doi: 10.1093/jalm/jfaa149.
- [76] M. Perusquia, A. E. Hanson, C. M. Meza, C. Kubli, N. Herrera, and J. N. Stallone, "Antihypertensive responses of vasoactive androgens in an in vivo experimental model of preeclampsia," *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 178, pp. 65-72, Apr 2018, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.11.001.
- [77] M. T. Acromite, C. S. Mantzoros, R. E. Leach, J. Hurwitz, and L. G. Dorey, "Androgens in preeclampsia," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 180, no. 1, pp. 60-63, 1999.
- [78] E. Salamalekis, P. Bakas, N. Vitoratos, M. Eleftheriadis, and G. Creatsas, "Androgen levels in the third trimester of pregnancy in patients with preeclampsia," *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 126, no. 1, pp. 16-9, May 1 2006.
- [79] B. Jim and S. A. Karumanchi, "Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications," (in eng), *Semin Nephrol*, vol. 37, no. 4, pp. 386-397, Jul 2017, doi: 10.1016/j.semnephrol.2017.05.011.
- [80] Y. Y. Shin *et al.*, "Comparison of steroid hormones in three different preeclamptic models," (in eng), *Mol Med Rep*, vol. 23, no. 4, Apr 2021, doi: 10.3892/mmr.2021.11891.
- [81] V. Chinnathambi, M. Balakrishnan, J. Ramadoss, C. Yallampalli, and K. Sathishkumar, "Testosterone alters maternal vascular adaptations: role of the endothelial NO system," (in eng), *Hypertension*, vol. 61, no. 3, pp. 647-54, Mar 2013, doi: 10.1161/hypertensionaha.111.00486.
- [82] V. Chinnathambi, A. S. More, G. D. Hankins, C. Yallampalli, and K. Sathishkumar, "Gestational Exposure to Elevated Testosterone Levels Induces Hypertension via Heightened Vascular Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Rats¹," *Biology of Reproduction*, vol. 91, no. 1, 2014, doi: 10.1095/biolreprod.114.118968.
- [83] V. Chinnathambi *et al.*, "Elevated testosterone levels during rat pregnancy cause hypersensitivity to angiotensin II and attenuation of endothelium-dependent vasodilation in uterine arteries," *Hypertension*, vol. 64, no. 2, pp. 405-14, Aug 2014, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03283.
- [84] Q. P. Liao, I. A. Buhimschi, G. Saade, K. Chwalisz, and R. E. Garfield, "Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post-partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones," (in eng), *Hum Reprod*, vol. 11, no. 12, pp. 2777-84, Dec 1996, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019209.

- [85] K. C. Lan *et al.*, "Levels of sex steroid hormones and their receptors in women with preeclampsia," (in eng), *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 18, no. 1, p. 12, Feb 18 2020, doi: 10.1186/s12958-020-0569-5.
- [86] J. M. Faupel-Badger *et al.*, "Maternal and cord steroid sex hormones, angiogenic factors, and insulin-like growth factor axis in African-American preeclamptic and uncomplicated pregnancies," (in eng), *Cancer Causes Control*, vol. 23, no. 5, pp. 779-84, May 2012, doi: 10.1007/s10552-012-9934-9.
- [87] E. K. Tuutti *et al.*, "Serum testosterone levels during early pregnancy in patients developing preeclampsia," (in eng), *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 71, no. 5, pp. 413-8, Sep 2011, doi: 10.3109/00365513.2011.580858.
- [88] A. Perez-Sepulveda *et al.*, "Placental Aromatase Is Deficient in Placental Ischemia and Preeclampsia," *PLoS one*, vol. 10, no. 10, p. e0139682, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0139682.
- [89] N. Berkane *et al.*, "Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia," (in eng), *Placenta*, vol. 69, pp. 40-49, Sep 2018, doi: 10.1016/j.placenta.2018.07.004.
- [90] Y. Y. Shin *et al.*, "Regulation of steroid hormones in the placenta and serum of women with preeclampsia," (in eng), *Mol Med Rep*, vol. 17, no. 2, pp. 2681-2688, Feb 2018, doi: 10.3892/mmr.2017.8165.
- [91] Z. M. Ibrahim, E. A. Kishk, M. S. Elzamlout, A. M. Elshahat, and O. T. Taha, "Fetal gender, serum human chorionic gonadotropin, and testosterone in women with preeclampsia," (in eng), *Hypertens Pregnancy*, vol. 39, no. 3, pp. 302-307, Aug 2020, doi: 10.1080/10641955.2020.1765174.
- [92] T. Al-Maihy, A. Al-Gareeb, and H. Al-Kuraishy, "Testosterone is a surrogate and proxy biomarker for severity of late-onset preeclampsia: A cross-sectional study," *Asian Pacific Journal of Reproduction*, vol. 9, no. 1, pp. 1-8, 2020, doi: 10.4103/2305-0500.275522.
- [93] Y. Shen *et al.*, "Serum estradiol to testosterone ratio as a novel predictor of severe preeclampsia in the first trimester," (in eng), *J Clin Hypertens (Greenwich)*, vol. 25, no. 1, pp. 53-60, Jan 2022, doi: 10.1111/jch.14601.
- [94] M. L. Eckstein *et al.*, "Differences in Hemodynamic, Hormonal and Heart Rate Variability Parameters in Complication-Free Pregnancies Compared to Individuals with Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia: An Observational Retrospective Analysis," (in eng), *Life (Basel)*, vol. 11, no. 7, Jun 29 2021, doi: 10.3390/life11070626.
- [95] C. Irribarra Á, R. Almuna V, S. Aedo M, and A. Porcile J, "Testosterona sérica en trastornos hipertensivos del embarazo," (in Spanish), *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, vol. 72, no. 1, pp. 33-37, 2007.
- [96] I. Velho, T. M. Figuera, P. K. Ziegelmann, and P. M. Spritzer, "Effects of testosterone therapy on BMI, blood pressure, and laboratory profile of transgender men: a systematic review," *Andrology*, vol. 5, no. 5, pp. 881-888, 2017, doi: <https://doi.org/10.1111/andr.12382>.
- [97] K. Wierckx *et al.*, "Cross-sex hormone therapy in trans persons is safe and effective at short-time follow-up: results from the European network for the investigation of gender incongruence," (in eng), *J Sex Med*, vol. 11, no. 8, pp. 1999-2011, Aug 2014, doi: 10.1111/jsm.12571.
- [98] R. N. Mwamba, A. Ekwonu, P. V. B. Guimaraes, and O. A. Raheem, "The efficacy, safety, and outcomes of testosterone use among transgender men patients: A review of the literature," *Neurourology and Urodynamics*, vol. n/a, no. n/a, pp. 1-10 2022 doi: <https://doi.org/10.1002/nau.25094>.
- [99] R. J. McCredie, J. A. McCrohon, L. Turner, K. A. Griffiths, D. J. Handelsman, and D. S. Celermajer, "Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens," (in eng), *J Am Coll Cardiol*, vol. 32, no. 5, pp. 1331-5, Nov 1998, doi: 10.1016/s0735-1097(98)00416-1.
- [100] A. D. Light, J. Obedin-Maliver, J. M. Sevelius, and J. L. Kerns, "Transgender men who experienced pregnancy after female-to-male gender transitioning," (in eng),

- Obstet Gynecol*, vol. 124, no. 6, pp. 1120-1127, Dec 2014, doi: 10.1097/aog.0000000000000540.
- [101] F. A. English, L. C. Kenny, and F. P. McCarthy, "Risk factors and effective management of preeclampsia," (in eng), *Integr Blood Press Control*, vol. 8, pp. 7-12, 2015, doi: 10.2147/ibpc.s50641.
- [102] E. A. Phipps, R. Thadhani, T. Benzing, and S. A. Karumanchi, "Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies," (in eng), *Nat Rev Nephrol*, vol. 15, no. 5, pp. 275-289, May 2019, doi: 10.1038/s41581-019-0119-6.
- [103] H. National Collaborating Centre for Women's and Children's, "National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance," in *Hypertension in Pregnancy: The Management of Hypertensive Disorders During Pregnancy*. London: RCOG Press Copyright © 2011, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists., 2010.
- [104] J. Sypecka and A. Sarnowska, "Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors," *Life Sciences*, vol. 139, no. 0024-3205, pp. 24-29, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.08.006>.
- [105] T. Stefos *et al.*, "Umbilical cord length and parity—the Greek experience," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 107, no. 1, pp. 41-44, 26 March 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(02\)00307-X](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(02)00307-X)
- [106] S. Bosselmann and G. Mielke, "Sonographic Assessment of the Umbilical Cord," *Geburtshilfe Frauenheilkd*, vol. 75, no. 8, pp. 808-818, Aug 2015, doi: 10.1055/s-0035-1557819.
- [107] V. L. Ferguson and R. B. Dodson, "Bioengineering aspects of the umbilical cord," *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 144 Suppl 1, pp. S108-13, May 2009, doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.024.
- [108] E. Di Naro, F. Ghezzi, L. Raio, M. Franchi, and V. D'Addario, "Umbilical cord morphology and pregnancy outcome," *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 96, no. 2, pp. 150-7, Jun 2001.
- [109] E. Cairrão, A. J. Santos-Silva, E. Alvarez, I. Correia, and I. Verde, "Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels," vol. 45, pp. 175–184, 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9161-6>
- [110] G. Wolf, "Cell physiology of vascular smooth muscle cells and mesangial cells and the impact of this on the control of renal circulation," *Advances in Organ Biology*, vol. 9, pp. 35-61, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S1569-2590\(00\)09056-X](https://doi.org/10.1016/S1569-2590(00)09056-X).
- [111] A. Cetin, A. Kükner, and F. Oztürk, "Ultrastructure of human umbilical vessels in pre-eclampsia," (in eng), *J Matern Fetal Neonatal Med*, vol. 12, no. 3, pp. 178-84, Sep 2002, doi: 10.1080/jmf.12.3.178.184.
- [112] W. W. Meyer, H. J. Rumpelt, A. C. Yao, and J. Lind, "Structure and closure mechanism of the human umbilical artery," *Eur J Pediatr*, vol. 128, pp. 247–259 1978, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00445610>
- [113] Y. Lan, Z. Yang, M. Huang, Z. Cui, Y. Qi, and H. Niu, "Morphological and structural changes of umbilical veins and clinical significance in preeclampsia," (in eng), *Hypertens Pregnancy*, vol. 37, no. 3, pp. 105-110, Aug 2018, doi: 10.1080/10641955.2017.1420799.
- [114] M. Lorigo, M. Mariana, J. Feiteiro, and E. Cairrao, "How is the human umbilical artery regulated?," (in eng), *J Obstet Gynaecol Res*, vol. 44, no. 7, pp. 1193-1201, Jul 2018, doi: 10.1111/jog.13667.
- [115] E. Cairrão, A. J. Santos-Silva, E. Alvarez, I. Correia, and I. Verde, "Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels," (in eng), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 45, no. 3-4, pp. 175-84, Mar-Apr 2009, doi: 10.1007/s11626-008-9161-6.
- [116] G. K. Owens, M. S. Kumar, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease," (in eng), *Physiol Rev*, vol. 84, no. 3, pp. 767-801, Jul 2004, doi: 10.1152/physrev.00041.2003.

- [117] C. H. Huang *et al.*, "Identify potential drugs for cardiovascular diseases caused by stress-induced genes in vascular smooth muscle cells," *PeerJ*, vol. 4, p. e2478, 2016, doi: 10.7717/peerj.2478.
- [118] M. Lorigo, C. Quintaneiro, L. Breitenfeld, and E. Cairrao, "UV-B Filter Octylmethoxycinnamate Alters the Vascular Contractility Patterns in Pregnant Women with Hypothyroidism," *Biomedicines*, vol. 9, no. 2, p. 115, 2021.
- [119] L. Pereira-de-Morais *et al.*, "The preeclampsia condition alters external potassium-evoked contraction of human umbilical vessels," (in eng), *Placenta*, vol. 138, pp. 68-74, Jul 2023, doi: 10.1016/j.placenta.2023.05.005.
- [120] S. W. Watts, M. Baez, and R. C. Webb, "The 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor and 5-HT receptor signal transduction in mesenteric arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats," (in eng), *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 277, no. 2, pp. 1103-13, May 1996.
- [121] S. W. Watts and R. P. Davis, "5-hydroxytryptamine receptors in systemic hypertension: an arterial focus," (in eng), *Cardiovasc Ther*, vol. 29, no. 1, pp. 54-67, Feb 2011, doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00173.x.
- [122] A. C. Bolte, H. P. van Geijn, and G. A. Dekker, "o Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin f serotonin," *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 95, no. 1, pp. 12 - 21, 2001
- [123] Y. Ishii, H. Kanai, A. Maezawa, A. Tsuchida, S. Yano, and T. Naruse, "Evaluation of intraplatelet and urinary 5-hydroxytryptamine (5-HT), and urinary 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels in patients with toxemia of pregnancy," (in eng), *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, vol. 80, no. 1, pp. 21-40, Apr 1993.
- [124] S. Toh, A. A. Mitchell, C. Louik, M. M. Werler, C. D. Chambers, and S. Hernández-Díaz, "Selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of gestational hypertension," (in eng), *Am J Psychiatry*, vol. 166, no. 3, pp. 320-8, Mar 2009, doi: 10.1176/appi.ajp.2008.08060817.
- [125] T. M. Chou *et al.*, "Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo," (in eng), *Circulation*, vol. 94, no. 10, pp. 2614-9, Nov 15 1996, doi: 10.1161/01.cir.94.10.2614.
- [126] M. Perusquía *et al.*, "Testosterone-induced relaxation involves L-type and store-operated Ca²⁺ channels blockade, and PGE₂ in guinea pig airway smooth muscle," (in eng), *Pflugers Arch*, vol. 467, no. 4, pp. 767-77, Apr 2015, doi: 10.1007/s00424-014-1534-y.
- [127] E. Cairrão, A. J. Santos-Silva, and I. Verde, "PKG is involved in testosterone-induced vsasorelaxation of human umbilical artery," *Eur J Pharmacol*, 2010 Aug 25.
- [128] P. Tep-areenan, D. A. Kendall, and M. D. Randall, "Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta," *European Journal of Pharmacology*, vol. 465, no. 1-2, pp. 125-132, 2003.
- [129] H. Honda, T. Unemoto, and H. Kogo, "Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats," *Hypertension*, vol. 34, no. 6, pp. 1232-1236, 1999.
- [130] O. Summ and S. Evers, "Mechanism of action of indomethacin in indomethacin-responsive headaches," (in eng), *Curr Pain Headache Rep*, vol. 17, no. 4, p. 327, Apr 2013, doi: 10.1007/s11916-013-0327-x.
- [131] Z. Wu *et al.*, "Inhibition of eNOS by L-NAME resulting in rat hind limb developmental defects through PFKFB3 mediated angiogenetic pathway," *Sci Rep*, vol. 10, 2020, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74011-1>.
- [132] M. Lorigo and E. Cairrao, "UV-B filter octylmethoxycinnamate-induced vascular endothelial disruption on rat aorta: In silico and in vitro approach," *Chemosphere*, vol. 307, 2, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135807>.
- [133] E. Ricciotti, Y. Yu, T. Grosser, and G. A. Fitzgerald, "COX-2, the dominant source of prostacyclin," in *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 3). United States, 2013, p. E183.

- [134] P. A. Cahill and E. M. Redmond, "Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health," (in eng), *Atherosclerosis*, vol. 248, pp. 97-109, May 2016, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
- [135] J. Feiteiro, I. Verde, and E. Cairrão, "Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in human vascular smooth muscle cells," (in eng), *Cell Signal*, vol. 28, no. 3, pp. 109-116, Mar 2016, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.12.004.
- [136] W. Gao, C. E. Bohl, and J. T. Dalton, "Chemistry and structural biology of androgen receptor," (in eng), *Chem Rev*, vol. 105, no. 9, pp. 3352-70, Sep 2005, doi: 10.1021/cr020456u.
- [137] R. A. Davey and M. Grossmann, "Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside," (in eng), *Clin Biochem Rev*, vol. 37, no. 1, pp. 3-15, Feb 2016.
- [138] K. N. Pandey, "Biology of natriuretic peptides and their receptors," *Peptides*, vol. 26, no. 6, pp. 901-32, Jun 2005.
- [139] A. J. Moyes and A. J. Hobbs, "C-type Natriuretic Peptide: A Multifaceted Paracrine Regulator in the Heart and Vasculature," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 9, May 8 2019, doi: 10.3390/ijms20092281.

Anexos

Endothelial Pathways Involved in the Vasorelaxant Effects of Testosterone in the Human Umbilical Artery

Lara M. Fernandes^(1,2), Margarida Lorigo^(1,2) and Elisa Cairrão^(1,2,*)

¹FCS-UBI – Health Sciences Faculty, University of Beira Interior, 6200-506, Covilhã, Portugal

²CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506, Covilhã, Portugal

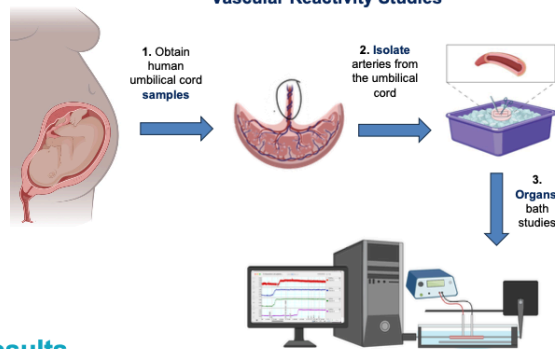
(* Email: ecairrao@fcsaude.ubi.pt)

Introduction

Hypertensive disorders of pregnancy (HDP) represent the most prevalent medical complications during pregnancy. Some studies associate preeclampsia (PE) with high testosterone (T) levels. However, it is known that T can act by genomic and non-genomic pathways to induce vasorelaxation of numerous vessels (e.g., human umbilical artery (HUA)) decreasing blood pressure. Thus, this project aims to evaluate the effects of T on nitric oxide and cyclooxygenase signaling pathways. The model chosen was HUA, and contractility experiments were performed using an organ bath system. L-NAME (an inhibitor of eNOS) and Indomethacin (an inhibitor of COX-2) were used to analyze contractile responses.

Methods

Vascular Reactivity Studies



Results

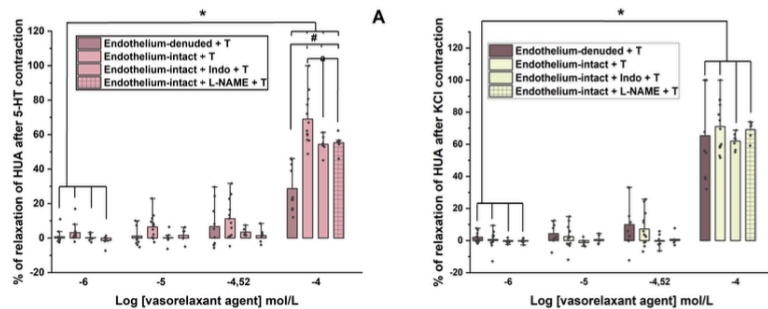


Figure 1. Percentage of relaxation of human umbilical artery rings contracted with serotonin (5-HT) and potassium chloride (KCl) in the presence of L-NAME and Indomethacin and exposed to cumulative concentrations doses of testosterone (1-100 $\mu\text{mol/L}$, presented as Log [T]). Each column represents the mean value, the lines the S.E.M. and the dispersion dots each n. * Represents statistical differences between T and control (Two Way ANOVA followed by Holm-Sidak post hoc tests); # between all T concentrations (Two Way ANOVA followed by Holm-Sidak post hoc tests).

Conclusion

- In arteries pre-contracted with 5-HT, a decreased T effect by 14% was observed in the highest concentration in the presence of inhibitors compared to endothelium-intact rings. The decrease in T vasorelaxant effect in the presence of the two inhibitors seems to be additive being similar to the effect observed in endothelium-denuded arteries.
- In arteries pre-contracted with KCl, the presence of endothelium and inhibitors of eNOS and COX-2 doesn't change the T vasorelaxant response.

Acknowledgements

The authors would like to thank all donors' mothers who participated in this study and all the staff from Gynaecology–Obstetrics Department staff of CHUCB (Covilhã, Portugal) for their collaboration. This work was developed within the scope of the CICS-UBI projects UIDB/00709/2020 and UIDP/00709/2020, financed by FCT/MCTES. M.L. acknowledges the PhD fellowship from FCT (Ref. 2020.06616. BD).

The role of testosterone in maternal vascular maintenance: implications for preeclampsia

Lara M Fernandes^{1,2}, Margarida Lorigo^{1,2} and Elisa Cairrao^{1,2}►

Lara Morais Fernandes^{1,2} (fernandeslara287@gmail.com), Margarida Lorigo^{1,2} (margarida.lorigo@gmail.com) and Elisa Cairrao^{1,2}► (ecairrao@fcsaude.ubi.pt)

¹ CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506, Covilhã, Portugal.

² FCS - UBI, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.

Testosterone implications for preeclampsia

► Corresponding author:

Elisa Cairrao, PhD
Health Sciences Research Centre
University of Beira Interior
Av. Infante D. Henrique
6200-506 Covilhã
Portugal
Tel.: +351-275-329049
Fax: +351-275-329099
e-mail: ecairrao@fcsaude.ubi.pt
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4823-5701>