



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeitos genómicos dos androgénios na atividade dos canais de potássio a nível vascular

Sara Antunes Castanheira

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

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

Covilhã, Outubro de 2014

Agradecimentos

Começo por expressar o meu agradecimento à Sr^a Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues pelo apoio, acompanhamento e disponibilidade demonstrados ao longo deste árduo ano de trabalho. Obrigada pela perseverança manifestada e pelos ensinamentos que me transmitiu.

Agradeço igualmente ao Sr^o Professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños por me proporcionar a oportunidade de integrar este fantástico grupo de investigação, a sua ajuda e disponibilidade sempre que solicitado.

Manifesto o meu apreço à equipa do Centro de Investigação no meu processo de integração e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Uma palavra amiga à Joana, à Melissa, ao Gonçalo e à Sara pelo seu contributo generoso, dando-me força e motivação até à sua conclusão.

Finalmente, um agradecimento especial à minha família, nomeadamente aos meus pais, avós, madrinha e irmã pelo apoio e incentivo que me transmitiram ao longo deste ano. A todos os meus amigos e demais pessoas que de uma ou outra forma me ajudaram a levar a bom porto esta tarefa, o meu bem-haja.

Resumo

Globalmente, as doenças cardiovasculares são consideradas umas das principais causas de morbidade e mortalidade. O papel dos androgénios no envolvimento destas doenças tem vindo a ser estudado e evidenciam um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular. Diversos estudos indicam que a testosterona possui um efeito vasodilatador sobre diversos vasos sanguíneos, incluindo a artéria umbilical humana. Este efeito é mediado pela ativação da PKG que posteriormente ativa os canais BK_{Ca} e K_V . Estudos recentes demonstram que os efeitos genómicos dos androgénios promovem alterações nas subunidades dos canais iónicos, nomeadamente na subunidade β_1 dos canais BK_{Ca} e na subunidade α_{1c} dos canais de Ca^{2+} tipo L. Estas modificações parecem influenciar a funcionalidade destes canais. O principal objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos genómicos dos androgénios nas células musculares lisas de artérias umbilicais humanas a nível da atividade dos canais de potássio.

Utilizou-se técnica de *Patch-clamp* para analisar a corrente de potássio nas células musculares lisas da artéria umbilical. Foi estudado o efeito de diferentes inibidores de canais de potássio em células incubadas e não incubadas com DHT (10nM) para posterior comparação. Estudou-se também o efeito dos androgénios nestas células a nível da contratilidade através da técnica de PCSA. Foram utilizadas células não incubadas e incubadas com DHT (10nM) e adicionados inibidores de proteínas cinases (KTA e KTg) de modo a averiguar se o efeito sobre a PKA e PKG seria igual em efeitos genómicos.

Os resultados demonstram que a corrente de K^+ observada em HUASMC é devida aos canais BK_{Ca} e K_V e que os efeitos genómicos dos androgénios envolvem a ativação de canais K_V . Também se verificou que a adição da KTg promove uma diminuição no relaxamento induzido pelo ANP e SNP, por conseguinte o efeito vasodilatador do SNP e ANP envolve a ativação da PKG. Finalmente demonstrou-se que os efeitos genómicos e não genómicos dos androgénios contribuem para o mesmo efeito.

Assim, os efeitos genómicos dos androgénios na atividade dos canais de potássio mostraram ser dependentes dos canais K_V e similares aos efeitos não genómicos.

Palavras-chave

Artéria umbilical humana, células musculares lisas, canais de potássio, androgénios, efeitos genómicos, proteína cinase G, guanilato ciclase membranar.

Abstract

Globally cardiovascular diseases are considered a major cause of morbidity and mortality. The role played by androgens in these diseases has been studied and evidences a protective effect on the cardiovascular system. Several studies indicate that testosterone has a vasodilatory effect on various blood vessels, including the human umbilical artery. This effect is mediated by activation of PKG which subsequently activates BK_{Ca} and K_V channels. Recent studies show that the genomic effects of androgens promote changes in ion channel subunits, including β_1 subunit of the BK_{Ca} channels and α_{1c} subunit of the L-type Ca²⁺ channels. These changes appear to influence the functioning of these channels. The main objective of this work was to analyze the genomic effects of androgens on smooth muscle cells of the human umbilical arteries at the level of activity of potassium channels.

Patch-clamp technique was used to analyze the potassium current in smooth muscle cells from the umbilical artery. The effect of different potassium channels inhibitors was studied in cells incubated and not incubated with DHT (10 nM) for comparison. Also studied was the effect of androgens in these cells at the level of contractility through the PCSA technique. Cells which were incubated with DHT (10 nM) and cells which were not incubated were used and added protein kinase inhibitors (KTa and KTg) in order to determine that the effect on PKA and PKG is equal in genomic effects.

The results demonstrate that the K⁺ current in HUASMC is due to the BK_{Ca} and K_V channels and genomic effects of androgens involving activation of K_V channels. Another conclusion was that the addition of KTg promotes a decrease in the relaxation induced by SNP and ANP, so the vasodilator effect of SNP and ANP involve the activation of PKG. Finally it was proved that genomic and non-genomic effects of androgen contribute to the same effect.

Thus, the genomic effects of androgens on the activity of potassium channels are dependent on K_V channels and similars to the non-genomic effects.

Keywords

Human umbilical artery, smooth muscle cells, potassium channel, androgens, genomic effects, protein kinase G, particulate guanylate cyclase.

Índice

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE ACRÓNIMOS	xv
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CORDÃO UMBILICAL.....	1
1.1.1. <i>Artéria umbilical</i>	2
1.2. CÉLULAS DO MÚSCULO LISO.....	3
1.3. MECANISMOS DE CONTRAÇÃO	4
1.3.1. <i>Proteínas envolvidas no processo contrátil</i>	4
1.4. CICLO DAS PONTES CRUZADAS	10
1.4.1. <i>Contração dependente de cálcio</i>	11
1.4.1. <i>Contração independente de cálcio</i>	14
1.5. CANAIS IÓNICOS	17
1.5.1. <i>Canais de cálcio</i>	17
1.5.1. <i>Canais de potássio</i>	19
1.6. REGULAÇÃO DO RELAXAMENTO	26
1.6.1. <i>Nucleótidos cíclicos</i>	26
1.7. ANDROGÉNIOS.....	30
1.7.1. <i>Síntese de Testosterona</i>	31
1.7.2. <i>Ação da Testosterona</i>	32
1.7.3. <i>Papel da testosterona a nível cardiovascular</i>	36
CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....	38
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. SOLUÇÕES E MATERIAIS	39
3.1.1. <i>Soluções</i>	39
3.1.2. <i>Fármacos e químicos</i>	40
3.1.3. <i>Material</i>	41
3.2. MÉTODOS	41
3.2.1. <i>Amostra</i>	41

3.2.2. <i>Isolamento e cultura de HUASMC</i>	42
3.2.3. <i>Patch-clamp na configuração “whole-cell”</i>	43
3.2.4. <i>Planar Cell Surface Area</i>	45
3.2.5. <i>Análise estatística</i>	45
CAPÍTULO IV - RESULTADOS	46
4.1. EFEITO DOS ANDROGÉNIOS NA CORRENTE DE POTÁSSIO	46
4.2. EFEITO DOS ANDROGÉNIOS NA CONTRATILIDADE CELULAR	48
CAPÍTULO V - DISCUSSÃO	54
5.1. EFEITO DOS ANDROGÉNIOS NA CORRENTE DE POTÁSSIO	54
5.2. EFEITO DOS ANDROGÉNIOS NA CONTRATILIDADE CELULAR	56
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	59
CAPÍTULO VII - BIBLIOGRAFIA	60

Lista de Figuras

FIGURA 1 - ISOLAMENTO DOS VASOS SANGUÍNEOS DO CORDÃO UMBILICAL	1
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CARACTERÍSTICAS DAS SMC EM DIFERENTES FENÓTIPOS	4
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA ACTINA MONOMÉRICA E FILAMENTOSA	5
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA MIOSINA II DO MÚSCULO LISO	6
FIGURA 5 - ALTERAÇÃO CONFORMACIONAL DA CALMODULINA EM FUNÇÃO DO Ca^{2+}	8
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA CINASE DAS CADEIAS LEVES DE MIOSINA	9
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA FOSFATASE DAS CADEIAS LEVES DE MIOSINA	10
FIGURA 8 - REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO ATRAVÉS DE FOSFORILAÇÃO-DESFOSFORILAÇÃO REVERSÍVEL DAS CADEIAS REGULADORAS DE MIOSINA II	11
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FUNÇÕES DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO NO MÚSCULO LISO	13
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS MOLECULARES ENVOLVIDAS NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO	16
FIGURA 11 - DENDROGRAMA DOS VOCC	18
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO GERAL DE AÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO	20
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DOS CANAIS K_V	21
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DOS CANAIS BK_{Ca}	23
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DOS CANAIS K_{IR}	24
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DOS CANAIS K_{ATP}	26
FIGURA 17 - ESTRUTURA DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL E MEMBRANAR	28
FIGURA 18 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DA SÍNTESE DE ESTEROIDES SEXUAIS	31
FIGURA 19 - DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DO <i>PATCH-CLAMP</i>	44
FIGURA 20 - EFEITO DOS INIBIDORES 4-AMINOPIRIDINA, APAMINA, GLIBENCLAMIDA, IBERIOXINA E TETRAETILAMÓNIO SOBRE A CORRENTE BASAL DE K^+ EM HUASMC NÃO INCUBADAS	46
FIGURA 21 - EFEITO DOS INIBIDORES 4-AMINOPIRIDINA, APAMINA, GLIBENCLAMIDA, IBERIOXINA E TETRAETILAMÓNIO SOBRE A CORRENTE BASAL DE K^+ EM HUASMC INCUBADAS COM DHT	47
FIGURA 22 - EFEITO DOS INIBIDORES 4-AMINOPIRIDINA, APAMINA, GLIBENCLAMIDA, IBERIOXINA E TETRAETILAMÓNIO SOBRE A CORRENTE BASAL DE K^+ EM HUASMC INCUBADAS E NÃO INCUBADAS COM DHT	48
FIGURA 23 - CONTRAÇÕES INDUZIDAS PELA 5-HT E HIS EM HUASMC INCUBADAS E NÃO INCUBADAS COM DHT ..	49
FIGURA 24 - EFEITO DO NITROPUSSIATO DE SÓDIO, DO KT5720 E DO KT5823 SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR SEROTONINA EM HUASMC INCUBADAS E NÃO INCUBADAS COM DHT	50
FIGURA 25 - EFEITO DO PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR, DO KT5720 E DO KT5823 SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR SEROTONINA EM HUASMC INCUBADAS E NÃO INCUBADAS COM DHT	51
FIGURA 26 - EFEITO DO NITROPUSSIATO DE SÓDIO, DO KT5720 E DO KT5823 SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR HISTAMINA EM HUASMC INCUBADAS E NÃO INCUBADAS COM DHT	52
FIGURA 27 - EFEITO DO PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR, DO KT5720 E DO KT5823 SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR HISTAMINA EM HUASMC INCUBADAS E NÃO INCUBADAS COM DHT	53

Lista de Tabelas

TABELA 1 - RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DOS CANAIS DE K^+ , POTENCIAL DE MEMBRANA E A CONTRATILIDADE NO MÚSCULO LISO.....	14
TABELA 2 - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	39
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO INTERNA (MIM K7) UTILIZADA NO PATCH-CLAMP	40
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO EXTERNA (RCS K_v1) UTILIZADA NO <i>PATCH-CLAMP</i> E NO PCSA	40
TABELA 5 - DESCRIÇÃO DO MATERIAL/EQUIPAMENTO E AS RESPATIVAS MARCAS	41

Lista de Acrónimos

AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
ANP	Péptido natriurético auricular (<i>auricular natriuretic peptide</i>)
Apo-CaM	Complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} /calmodulin complex)
APM	Apamina (<i>apamin</i>)
AR	Recetor de androgénios (<i>androgen receptor</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>adenosine triphosphate</i>)
BK _{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio de elevada condutância (<i>large conductance calcium-activated potassium channel</i>)
Ca ²⁺	Cálcio (<i>calcium</i>)
CaM	Calmodulina (<i>calmodulin</i>)
DAG	Diacilglicerol (<i>diacylglycerol</i>)
DHEA	Dehidroepiandrosterona (<i>dehydroepiandrosterone</i>)
DHT	Dihidrotestosterona (<i>dihydrotestosterone</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
GC	Guanilato ciclase (<i>Guanylate cyclase</i>)
GLI	Glibenclamida (<i>glibenclamide</i>)
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
GTP	Trifosfato de guanosina (<i>guanosine triphosphate</i>)
HUA	Artéria umbilical humana (<i>human umbilical artery</i>)
HUASMC	Células musculares lisas da artéria umbilical humana (<i>human umbilical artery smooth muscle cells</i>)
IBE	Iberiotoxina (<i>iberiotoxin</i>)
IK _{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio de condutância intermédia (<i>Intermediate conductance calcium-activated potassium channel</i>)
IP ₃ R	Recetor do IP ₃ (<i>inositol-1,4,5-triphosphate receptor</i>)
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de inositol (<i>inositol-1,4,5-triphosphate</i>)
K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP (<i>ATP - sensitive potassium channels</i>)
K _{IR}	Canais de potássio retificadores de influxo (<i>Inwardly rectifying potassium channels</i>)
K _V	Canais de potássio dependentes de voltagem (<i>voltage-gated potassium channels</i>)
MHC	Cadeia pesada de miosina (<i>myosin heavy chain</i>)
MLC20	Cadeias leves reguladoras de miosina (<i>myosin regulatory light chains</i>)
MLCK	Proteína cinase da cadeia leve de Miosina (<i>myosin-light-chain kinase</i>)
MLCP	Proteína fosfatase da cadeia leve de Miosina (<i>myosin-light-chain phosphatase</i>)
MYPT1	Fosfatase da miosina-1 (<i>Myosin Phosphatase Target Protein-1</i>)
NCX	Permutador Na ⁺ /Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NPRA	Recetor de péptido natriurético - A (<i>natriuretic peptide receptor - A</i>)
PDE	Fosfodiesterase (<i>phosphodiesterase</i>)
pGC	Guanilato ciclase membranar (<i>particulate guanylyl cyclase</i>)
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PKA	Proteína Cinase A (<i>cyclic AMP-dependent protein kinase</i>)
PKC	Proteína Cinase C (<i>protein kinase C</i>)
PKG	Proteína Cinase G (<i>protein kinase GMP-dependent protein kinase</i>)
PLC	Fosfolipase C (<i>phospholipase C</i>)

PMCA	Ca ²⁺ ATPase da membrana plasmática (<i>plasma membrane Ca²⁺ATPases</i>)
PP1c-δ	Proteína fosfatase-1 (<i>protein phosphatase 1</i>)
ROCK	Proteína cinase dependente da Rho-A (<i>Rho-activated Kinase</i>)
RyR	Recetor de rianodina (<i>ryanodine receptor</i>)
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmática (<i>Sarco/endoplasmatic reticulum Ca²⁺ activated ATPase</i>)
sGC	Guanilato ciclase solúvel (<i>Soluble guanylyl cyclase</i>)
SK _{Ca}	Canais de potássio ativado por cálcio de pequena condutância (<i>small conductance calcium-activated potassium channel</i>)
SMC	Células Musculares Lisas (<i>Smooth Muscle Cells</i>)
SNP	Nitroprussiato de Sódio (<i>Sodium Nitroprusside</i>)
SR	Retículo sarcoplasmático (<i>sarcoplasmic reticulum</i>)
TEA	Tetrametilamónio (tetramethylammonium)
VOCC	Canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem (<i>Voltage-Operated Calcium Channel</i>)
4-AP	4-aminopiridina (<i>4-aminopyridine</i>)

Capítulo 1- Introdução

1.1. Cordão umbilical

O cordão umbilical é uma estrutura vital na anatomia fetal, pois desempenha um papel primordial na existência uterina (Kalish et al., 2003) uma vez que é a única ligação entre o feto e a mãe (placenta) (Romanowicz and Bankowski, 2009).

O anel primitivo, precursor do cordão umbilical, surge a partir da linha de flexão ventral da união âmnio-ectodérmica (Togni et al., 2007). Neste processo, estão envolvidas estruturas como o ducto vitelino, saco vitelino e alantóide (Kalish et al., 2003). Geralmente o cordão umbilical adquire um comprimento de 50-60cm (Di Naro et al., 2001).

O cordão é constituído por uma camada externa de âmnio, seguida de uma camada mais interior de tecido conjuntivo poroso, chamada Geleia de *Wharton* que envolve os vasos umbilicais, nomeadamente, duas artérias e uma veia. As artérias e a veia permitem o fluxo sanguíneo entre a mãe e o feto durante a gravidez, uma vez que estes vasos são frágeis a geleia oferece proteção para que não colapsem (Kalish et al., 2003; Ferguson and Dodson, 2009; Romanowicz and Bankowski, 2009).



Figura 1 - Isolamento dos vasos sanguíneos do cordão umbilical. Adaptado de (Mennan et al., 2013).

Os 3 vasos sanguíneos umbilicais enrolam de forma helicoidal e diferem na sua estrutura e função em comparação com alguns vasos de maior porte do corpo humano (Ferguson and Dodson, 2009). As artérias umbilicais transportam o sangue desoxigenado (venoso) e resíduos metabólicos do feto para a placenta enquanto a veia transporta o sangue oxigenado e rico em nutrientes da placenta para o feto (Romanowicz and Galewska, 2011).

Modificações na morfologia e constituição do cordão umbilical podem também levar a alguns problemas no período de gravidez, como a morte fetal, e durante o parto, o

sofrimento fetal por enrolamento do cordão envolto do feto, formação de nós e distúrbios da frequência cardíaca fetal. Em certas patologias como diabetes gestacional, hipertensão e pré-eclampsia pode ocorrer uma diminuição dos lípidos no cordão, haver rutura ou degeneração das fibras das células musculares lisas ou até redução da área do lúmen dos vasos (Di Naro et al., 2001; Inan et al., 2002; Ferguson and Dodson, 2009; Romanowicz and Bankowski, 2009; Chakraborty and Banu, 2013).

1.1.1. Artéria umbilical

As artérias umbilicais são constituídas por três túnicas: a íntima, formada por células endoteliais; a média, formada por diferentes camadas de células de músculo liso (SMC) vascular; e uma mais externa, adventícia, chamada de Geleia de *Wharton*, composta por tecido conjuntivo da mucosa e fibroblastos, que envolve os vasos sanguíneos (Rockelein and Schneider, 1992; Ferguson and Dodson, 2009; Corrao et al., 2013).

As células endoteliais que existem dentro das artérias e das veias são invulgarmente ricas em organelos que desempenham um papel importante na formação do líquido amniótico (Ferguson and Dodson, 2009).

As células do músculo liso da artéria umbilical humana (HUASMC) encontradas na túnica média parecem desempenhar um papel importante no controlo do fluxo de sangue feto-placentário devido à sua propriedade de contração (Haugen et al., 1997).

A túnica média da artéria umbilical divide-se em duas camadas. A camada externa que possui células de músculo liso organizadas de forma circular e uma camada interna, fina, com cerca de $\frac{1}{4}$ da túnica média total, de células musculares lisas longitudinais dispostas irregularmente. O encerramento da artéria umbilical é iniciado por numerosas contrações vindas da camada externa enquanto que a camada interna apresenta uma certa plasticidade que permite completar facilmente o encerramento da artéria (Meyer et al., 1978; Rockelein and Schneider, 1992; Junek et al., 2000; Blanco et al., 2011).

A Geleia de *Wharton* é uma estrutura sólida, elástica e porosa onde se infiltra um fluido viscoso e mucoide, e armazenam alguns compostos como os fatores de crescimento. A matriz extracelular na parede vascular contém muitas macromoléculas como colagénio, elastina, proteoglicanos, glicoproteínas e ácido hialurónico, que são necessários para as propriedades estruturais e funcionais da parede do vaso (Romanowicz and Galewska, 2011), mantendo intacta a estrutura do cordão e evitando a hiperdistensão. A espessura e a turgescência desta geleia varia de acordo com a expansão e contração dos vasos.

Existem alguns casos em que os cordões possuem apenas uma artéria, esta situação eleva o risco de existir morte intrauterina e intraparto, independentemente da presença ou não de malformações congénitas ou cromossómicas. Pode levar a complicações pré-natais como anomalias fetais, aneuploidias, limitação de crescimento fetal e anomalias placentárias (Di Naro et al., 2001).

1.2. Células do músculo liso

Nas suas diversas funções, as células do músculo liso da camada média da arterial umbilical estão presentes em diferentes órgãos, nomeadamente na estrutura vascular, nas vias respiratórias, no tubo digestivo, na bexiga e no útero (Morano, 2003).

As SMC constituem um componente importante dos vasos sanguíneos e têm como função fisiológica a contração e relaxamento dos vasos, a regulação da pressão arterial e distribuição do fluxo de sangue (Zhang et al., 2012). A desregulação do tónus do músculo liso vascular pode causar inúmeras patologias, como hipertensão arterial com dano subsequente do(s) órgão(s) em causa, traduzindo por exemplo insuficiência renal e/ou cardíaca (Morano, 2003).

A estrutura da musculatura lisa consiste em numerosos miofilamentos orientados ao longo do eixo longitudinal da célula, especialmente de miosina (grossos) e actina (finos) que formam as unidades contráteis. Esta organização está integrada numa rede de filamentos intermediários e microtúbulos que atuam como suportes (Tuna et al., 2011).

As SMC possuem uma notável plasticidade fenotípica, permitem uma adaptação rápida, alterações profundas e reversíveis no fenótipo, entre um estado contrátil e um estado sintético, em resposta a estímulos ambientais biomecânicos, condições hemodinâmicas locais, forças físicas, fatores hormonais e de citocinas (Shi and Tarbell, 2011). No fenótipo contrátil as células são caracterizadas por uma estrutura composta por miofilamentos compactados, elevada expressão de proteínas do aparelho contrátil, baixa taxa proliferativa, com baixo teor em retículos endoplasmáticos rugosos, complexos de Golgi e ribossomas livres. No fenótipo sintético as células contêm um teor mínimo de proteínas contráteis, caracterizado por uma extensa proliferação e síntese da matriz extracelular. Estruturalmente são constituídas por um citoplasma desprovido de feixes contráteis com extensos retículos endoplasmáticos rugosos, complexos de Golgi e ribossomas livres. As células no fenótipo contrátil apresentam uma morfologia fusiforme e são mais alongadas do que no fenótipo sintético (Beamish et al., 2010).

As SMC contráteis maduras e diferenciadas apresentam um conjunto específico de proteínas contráteis, canais iónicos, recetores de membrana e moléculas sinalizadoras necessárias para a função contrátil (Margariti et al., 2006). Podem ser identificadas através desse conjunto de proteínas contráteis que inclui a α -actina do músculo liso, cadeia pesada de miosina do músculo liso (MHC), calponina, SM22- α , smoothelina, h-caldesmona, telocina, meta-vinculina e desmina (Cairrao et al., 2009). Estas proteínas podem servir como marcadores na identificação deste fenótipo embora possam também ser expressas no fenótipo sintético (Gomez and Owens, 2012).

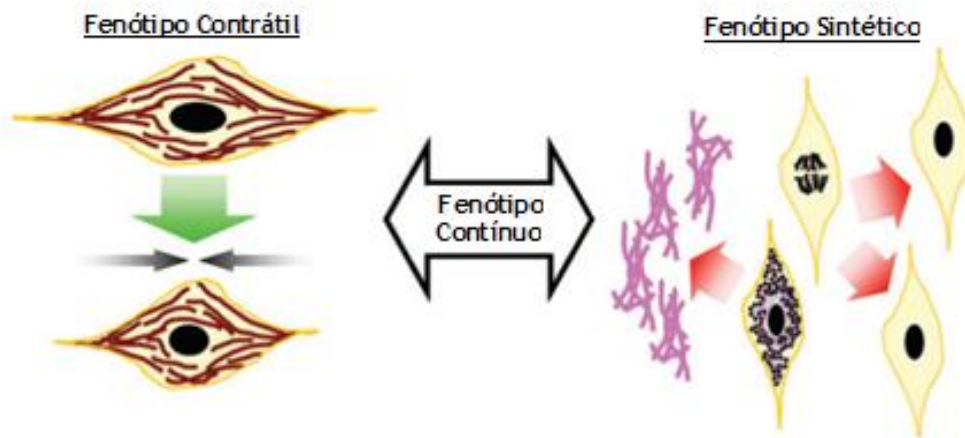


Figura 2 - Representação esquemática das características das SMC em diferentes fenótipos. Variam entre um fenótipo sintético/proliferativo e um quiescente/contrátil. Adaptado de (Beamish et al., 2010).

1.3. Mecanismos de contração

As propriedades contráteis das SMC vasculares refletem uma interação íntima e integrada com o ambiente extracelular e a estrutura tridimensional da parede do vaso. O processo geral de contração pode ocorrer por estímulos que promovem diretamente uma mudança no potencial de membrana ou por estímulos mediados por recetores que envolvem a ativação da sinalização pela proteína G com a produção de segundos mensageiros, incluindo 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG). Ambas as vias levam à ativação, dependente de cálcio (Ca^{2+}), da cinase das cadeias leves de miosina e do ciclo das pontes cruzadas de actomiosina. Alguns estudos apontam outros mecanismos que envolvem modulação da sensibilidade ao Ca^{2+} , regulação dos filamentos finos e remodelação do citoesqueleto (Hill and Meininger, 2012).

1.3.1. Proteínas envolvidas no processo contrátil

Filamentos Finos

Os filamentos finos são compostos principalmente por actina. A actina é uma das proteínas mais abundante nas células eucariotas e participa numa série de eventos fisiológicos como motilidade celular, divisão celular, transcrição de ADN (Oda and Maeda, 2010), produção de força e contratilidade (Schoenenberger et al., 2011).

A molécula de actina (G-actina) é composta por uma única cadeia polipeptídica de 375 aminoácidos, enrolada em dois domínios de tamanho similar (α/B), separados por uma cisão profunda que contém um local de ligação para pequenas moléculas os como nucleótidos. Cada domínio pode ser dividido em 2 subdomínios, todos eles contendo uma folha β central rodeada por diversas hélices α . Estes formam ainda outra fissura chamada de hidrofóbica ou

alvo de ligação que medeia a sua interação com a maioria das proteínas que ligam à actina (Schoenenberger et al., 2011).

Existem diversas isoformas de actina (α , β e duas γ). No músculo cardíaco, esquelético e liso está presente a α -actina e noutras células musculares a γ -actina. Nas células não musculares encontra-se a isoforma β -actina e γ -actina (Dominguez and Holmes, 2011).

Um monómero de actina (42kDa) (Gunst and Zhang, 2008) pode polimerizar formando filamentos helicoidais de cadeia dupla chamados de F-actina (Wang et al., 2012), compõem uma estrutura tipo rede que proporciona um suporte mecânico para as células e determina a sua forma.

A F-actina possui uma estrutura bilobada e assimétrica. Nas células do músculo liso os filamentos de actina estão ancorados à membrana através de um complexo de proteínas de adesão associado a caudas citoplasmáticas de integrinas. Podem também estar ancorados a corpos densos citosólicos compostos principalmente por proteínas α -actinina. No músculo liso, as isoformas de actina presentes são preferencialmente associadas com miosina e caldesmona que participam no processo de contração (Gunst and Zhang, 2008).

No citoplasma eucariótico a actina encontra-se predominantemente na forma filamentosa e está envolvida na maioria das funções fisiológicas (Schoenenberger et al., 2011).

A estrutura global do citoesqueleto de actina é mantida através de ações coordenadas de um elevado número de proteínas reguladoras que modulam o agrupamento e desmontagem dos filamentos, assim como da contração conduzida por proteínas de miosina (Reymann et al., 2012). O processo de contração provoca um aumento dos níveis de F-actina e diminuição de G-actina (Gunst and Zhang, 2008).

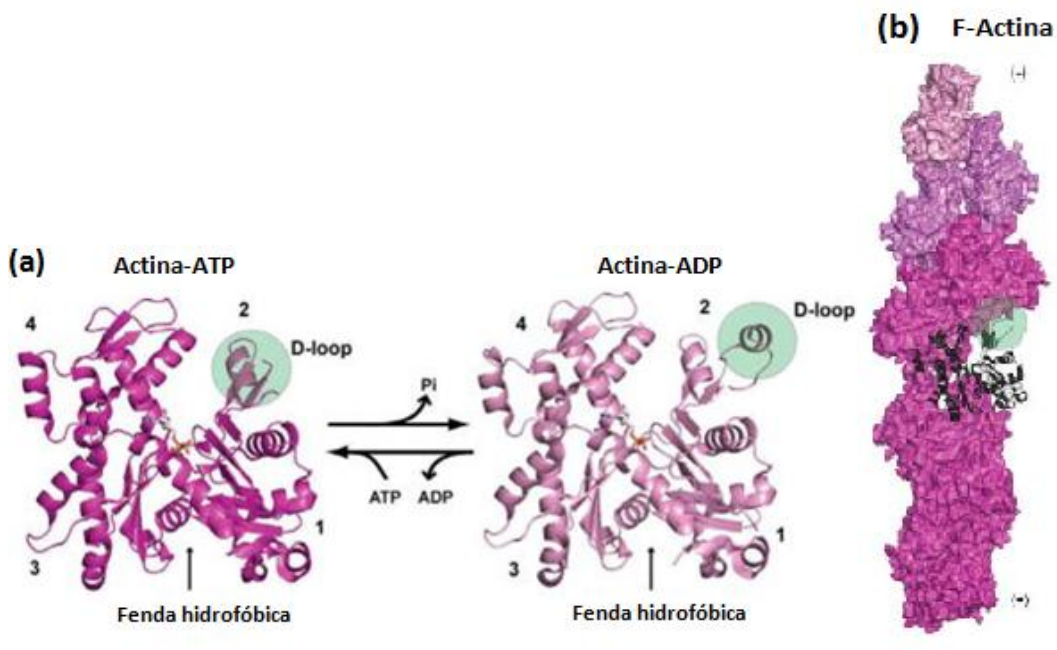


Figura 3 - Estrutura da actina monomérica (a) e filamentosa (b). Adaptado de (Lee and Dominguez, 2010).

Filamentos Grossos

Os filamentos grossos são compostos por miosina. Esta molécula é o principal componente do músculo e foi descoberta em 1864 por Willie Kühne (Holmes, 2004). A sua estrutura é bem conhecida, sendo definida de uma forma generalizada, por uma cauda longa que termina com dois lóbulos, denominados de cabeças (Skubiszak, 2011).

Cada molécula de miosina é constituída por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e dois pares de cadeias leves, nomeadamente, cadeias reguladoras de 20 kDa (MLC20) e cadeias essenciais de 17kDa, ligadas à região do “pescoço” de cada MHC (Cole and Welsh, 2011).

A cauda consiste em duas hélices α enroladas em espiral. As cabeças têm uma estrutura anatómica mais complexa (Skubiszak, 2011), possuem um domínio de ligação à actina e um local de ligação para o ATP (Cole and Welsh, 2011). As cabeças são o componente estrutural fundamental no mecanismo de geração de força no músculo (Andrucho et al., 2004) uma vez que os filamentos de actina se deslocam ao longo das cabeças de miosina, por uma espécie de ação de remo em que o combustível para este processo é fornecido a partir da hidrólise de ATP (Holmes, 2004).

Este processo é denominado de ciclo das pontes cruzadas. O modo de ação vai depender do arranjo das moléculas de miosina com os filamentos finos (Skubiszak, 2011), sendo posteriormente descrito neste trabalho.

Existem, pelo menos, 4 isoformas de MHC descritas no músculo liso, todas elas derivadas de um único gene, através de *splicing* alternativo (SMA, SMB, SM1 e SM2). O *splicing* alternativo no terminal carboxilo conduz às diferenças existentes entre a isoforma I e II, nomeadamente no tamanho da cauda (Martin et al., 2007). A isoforma II (SM2) da miosina, com 200KDa, possui uma cauda curta, com uma sequência de apenas 9 aminoácidos enquanto a isoforma I (SM1), com 204KDa apresenta uma cauda, com 43 aminoácidos (Chi et al., 2008).

A cadeia pesada de miosina II do músculo liso é a proteína motora que impulsiona a contração do músculo liso (Chi et al., 2008) e responsável pela produção de energia (Cole and Welsh, 2011).

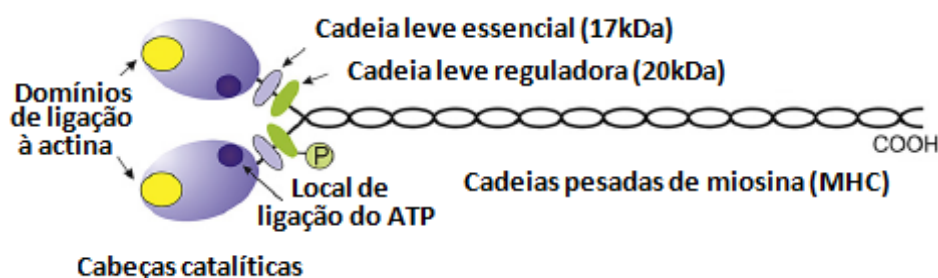


Figura 4 - Representação da estrutura da miosina II do músculo liso. Adaptado de (Cole and Welsh, 2011).

As proporções das isoformas de MHC alteram com o desenvolvimento, estado hormonal e estados patológicos. Estão desproporcionalmente distribuídas nos tecidos musculares lisos e o rácio SM1/SM2 é rigidamente regulado (Martin et al., 2007). Esta proporção contribui também para a diferença na contração entre os tecidos musculares lisos (Chi et al., 2008).

Calmodulina

A calmodulina (CaM) é uma proteína que liga ao Ca^{2+} . Foi o segundo sensor de Ca^{2+} intracelular a ser descoberto em 1970, no cérebro, por Cheung e o grupo Kakiuchi (Schaub and Heizmann, 2008).

A CaM constitui, pelo menos, 0,1% da proteína total presente nas células e é expressa em níveis mais elevados em células em crescimento rápido, especialmente aquelas submetidas a divisão e diferenciação celular (Chin and Means, 2000).

É uma proteína relativamente pequena (16-18 kDa), composta por cerca de 148 aminoácidos e organizada em dois domínios globulares distintos, N- e C-terminal, ligados por um *linker* central flexível. Ambos possuem domínios hélice-volta-hélice, cada um com dois sítios de ligação para o Ca^{2+} (Martinez-Luis et al., 2007). Na região N-terminal existem dois locais de ligação de alta afinidade enquanto que perto da extremidade C-terminal encontram-se dois de baixa afinidade (Igarashi and Watanabe, 2007).

Esta proteína existe em duas configurações distintas, denominada de apocalmodulina (apo-CaM) na ausência de Ca^{2+} e na forma de complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ na presença de Ca^{2+} (Igarashi and Watanabe, 2007). A ligação de Ca^{2+} à CaM provoca uma alteração conformacional nos dois domínios, expondo aminoácidos hidrofóbicos na superfície da proteína que favorece a sua interação com proteínas alvo (Villalobo et al., 2013).

A CaM pode interagir com mais de 100 proteínas diferentes, tanto enzimas como proteínas estruturais. Participa em vias de sinalização que regulam inúmeras atividades celulares fundamentais, incluindo o metabolismo de glicogénio, motilidade intracelular, transporte de cálcio, metabolismo de nucleótidos cíclicos, fosforilação e desfosforilação de proteínas, progressão do ciclo celular e regulação da expressão de genes (Schaub and Heizmann, 2008). Pode também regular a atividade da bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática e vários canais iónicos (Chin and Means, 2000), nomeadamente os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Martinez-Luis et al., 2007).

As proteínas que podem interagir com a CaM são por exemplo a adenilato ciclase, fosfodiesterases e proteínas cinases que estão direta ou indiretamente envolvidas em processos de fosforilação. Estas proteínas podem ser classificadas em 6 grupos com base no seu modo de regulação na presença ou ausência de Ca^{2+} . No terceiro grupo encontra-se a cinase das cadeias leves de miosina, que na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} (CaM desocupada ou parcialmente ocupada com Ca^{2+}), forma um complexo inativo e de baixa afinidade, enquanto que na presença de elevadas concentrações, origina um complexo de alta afinidade e é ativada. Estas interações dependentes de Ca^{2+} não afetam apenas a afinidade do complexo, mas também regulam a atividade das proteínas alvo (Chin and Means, 2000).

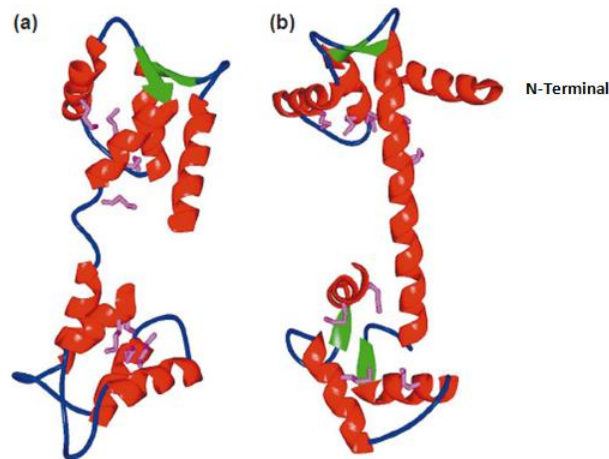


Figura 5 - Alteração conformacional da calmodulina em função do Ca^{2+} . (a) na ausência de Ca^{2+} e (b) CaM ligada ao Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$), com exposição dos resíduos hidrofóbicos. Adaptado de (Chin and Means, 2000).

Cinase das cadeias leves de miosina

A cinase das cadeias leves de miosina (MLCK) foi isolada pela primeira vez a partir do músculo liso em 1977 (Kudryashov et al., 2004). É ubiquamente expressa no músculo liso, cardíaco e esquelético, bem como em células não musculares. O seu único substrato conhecido *in vivo* é a miosina (Hong et al., 2009).

Existem diversas isoformas de MLCK e embora não seja restrita ao músculo liso, nestes tecidos encontra-se a MLCK1 que é codificada pelo gene MYLK1 de cópia única. As isoformas presentes em células não musculares são mais longas do que as existentes no músculo liso devido a uma extensão de aminoácidos (~900) no N-terminal. A MLCK não muscular é muitas vezes referida como isoforma longa e a do músculo liso isoforma curta (Hong et al., 2011).

A MLCK é uma cinase de serina/treonina (Thatcher et al., 2011), que ativa a miosina através da MLC20 (Mabuchi et al., 2010). A fosforilação da miosina II está envolvida em diversos fenómenos fisiológicos, incluindo a contração do músculo liso, motilidade celular e citocinese (Scotto-Lavino et al., 2010). Para isso o aumento de Ca^{2+} intracelular é fundamental uma vez que a ligação deste com a calmodulina ativa a MLCK, podendo posteriormente interagir com a actina (Nakamura et al., 2008). Um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular pode aumentar a atividade da MLCK aproximadamente 1000 vezes através da sua ligação à calmodulina (Takashima, 2009). O complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ é assim o principal regulador das MLCKs. Na sua ausência, a MLCK é cataliticamente inativa (Tsukamoto and Kitakaze, 2013).

Durante o processo de contração do músculo liso, uma MLCK fosforila rapidamente muitas moléculas de miosina, o que sugere que as taxas de ativação muscular são influenciados pela cinética de interações MLCK-miosina. No músculo liso, o nível de MLCK é menor do que o nível de miosina, apresentando um rácio molar de MLCK de ~1:20 (Hong et al., 2013).

Relativamente à estrutura da MLCK, consiste numa proteína alongada com 4 domínios: um domínio de ligação da actina localizado no N-terminal, um domínio catalítico (C-terminal)

autoinibido por pseudosubstratos, e os restantes regulatórios, importantes na ligação do complexo Ca^{2+}/CaM . Também é constituído por 5 módulos secundários, incluindo as repetições PEVK (repetições ricas em prolina), 3 superfamílias de imunoglobulinas (Ig1-3) e um motivo relacionado com fibronectina (Fn-3) (Cole and Welsh, 2011).

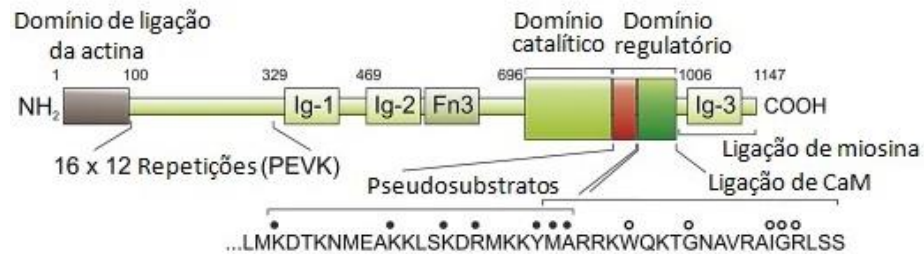


Figura 6 - Representação da estrutura da cinase das cadeias leves de miosina (MLCK). CaM: calmodulina; repetições PEVK: repetições ricas em prolina; Ig (1-3): imunoglobulinas; Fn3: motivo relacionado com fibronectina. Adaptado de (Cole and Welsh, 2011).

Fosfatase das cadeias leves de miosina

A fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP) é responsável pela desfosforilação da miosina fosforilada e consequentemente pelo relaxamento da musculatura lisa (Scotto-Lavino et al., 2010).

A MLCP consiste num complexo de 3 proteínas. A proteína fosfatase 1c- δ (PP1c- δ) que corresponde à subunidade catalítica da MLCP e as proteínas MYPT1 e M20 (envolvida na dinâmica dos microtúbulos) que correspondem às subunidades não catalíticas formam uma holoenzima heterotrimérica. A ligação de PP1c- δ e MYPT1 ocorre por um motivo RVxF adjacente a uma série de repetições de anquirinas que estão implicadas em interações proteína-proteína. Existe também um aglomerado de resíduos ácidos (D/E) e fechos de leucina na variante LZ+ MYPT1 (LZ). No que diz respeito à ligação da miosina, esta ocorre na região C-terminal que contém um dos 2 principais locais de fosforilação pela proteína cinase associada à Rho (ROCK) (Yamashiro et al., 2008; Cole and Welsh, 2011; Turner and Macdonald, 2013).

A PP1c- δ é uma fosfatase serina/treonina que regula uma enorme variedade de funções celulares através da interação da sua subunidade catalítica com inúmeras subunidades regulatórias (Xia et al., 2005). A MYPT1 é expressa a partir de um único gene em diversos tipos de células e está presente numa ampla variedade de tecidos, em maior concentração no músculo liso. Podem ser geradas outras isoformas desta proteína através de *splicing* alternativo, em que o padrão de expressão destas é específico de cada tecido (Matsumura and Hartshorne, 2008). É uma componente importante em funções celulares dependentes da fosforilação da miosina (Xia et al., 2005).

A atividade da MLCP no músculo liso vascular pode ser influenciada por diversos processos como *splicing* alternativo, modificações pós-traducionais e inibidores de proteínas (Turner and Macdonald, 2013).

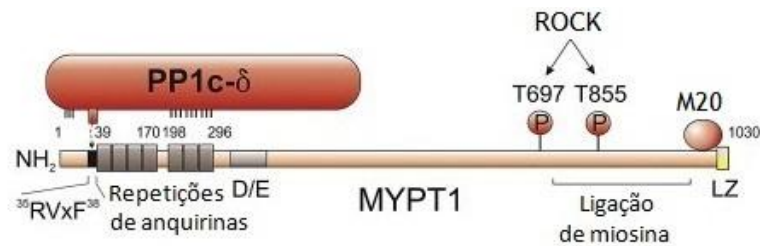


Figura 7 - Representação da estrutura da fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP). ROCK: proteína cinase associada à Rho; PP1c- δ : proteína fosfatase 1; RVxF: sequências como [R/K]-X1-[V/I]-X2-[F/W] onde X1 pode ser qualquer aminoácido e X2 pode ser qualquer aminoácido exceto a prolina; M20: pequena proteína de 20kDa cuja função ainda é desconhecida. Adaptado de (Cole and Welsh, 2011).

1.4. Ciclo das pontes cruzadas

A contração gerada através do ciclo de pontes cruzadas de actomiosina é reconhecido como o mecanismo fundamental para produzir energia e conduzir a alterações morfológicas, como a contração em células musculares e não musculares de organismos eucariontes (Thoresen et al., 2013).

O processo de contração do músculo liso inicia-se por um aumento de Ca^{2+} livre citosólico, que pode entrar na célula através de canais ou ser libertado a partir de armazenamentos citosólicos como o retículo sarcoplasmático (Martinsen et al., 2013).

O Ca^{2+} pode ligar-se à CaM e formar o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ que se liga à MLCK e proporciona a sua ativação. Este processo conduz à fosforilação da MLC20 na posição serina-19 que permite a sua interação com a actina. A ativação da ATPase da miosina e a presença de ATP permitem que se estabeleça o ciclo das pontes cruzadas e consequentemente contração (Mita et al., 2002).

A contração muscular ocorre quando as cabeças de miosina interagem ciclicamente com a actina, fazendo com que os filamentos deslizem uns sobre os outros resultando num encurtamento muscular (Graceffa and Mazurkie, 2005). Sendo um processo reversível, o relaxamento acompanha a saída de Ca^{2+} do citosol, há inativação da MLCK e a MLC20 pode então ser desfosforilada pela MLCP e induzir relaxamento (Sutherland and Walsh, 2012).

O nível de fosforilação de MLC20 é determinado pelo balanço entre as atividades opostas da MLCK e MLCP, regulando a produção de energia e o processo contrátil (Hirano, 2007).

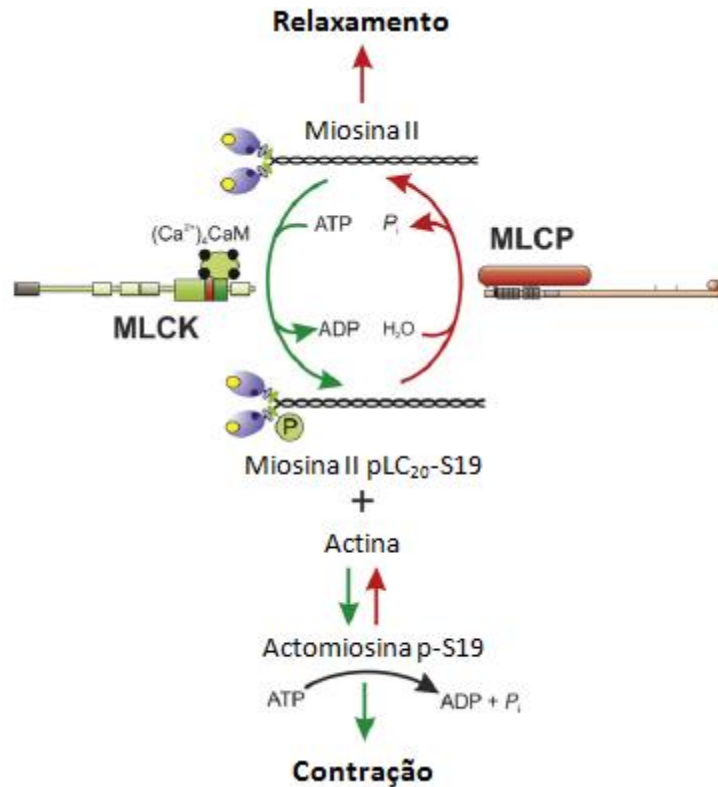


Figura 8 - Regulação da contração do músculo liso através de fosforilação-desfosforilação reversível das cadeias reguladoras de miosina II (MLC20). $(Ca^{2+})_2-CaM$: complexo Ca^{2+} /calmodulina; MLCK: cinase das cadeias leves de miosina; MLCP: fosfatase das cadeias leves de miosina; pLC₂₀-S19: cadeias reguladoras da miosina II fosforiladas na serina 19. Adaptado de (Cole and Welsh, 2011).

1.4.1. Contração dependente de cálcio

O Ca^{2+} é um dos elementos mais abundantes na terra e nos sistemas biológicos. O esqueleto humano adulto possui cerca de 1Kg de Ca^{2+} principalmente na forma de hidroxiapatite. Nos fluidos extracelulares e nas células atinge 10-15g. Consegue formar complexos estáveis e específicos com determinadas substâncias orgânicas (Schaub and Heizmann, 2008).

No início da década de 1950, foi reconhecida a expressão e importância fisiológica de fluxos transmembranares de Ca^{2+} , depois de Fatt e Katz descobrirem que fibras musculares de lagostim podiam gerar potenciais de ação na ausência de sódio extracelular, o que levou à conclusão que de facto o Ca^{2+} assume a responsabilidade pela despolarização da membrana (Nilius et al., 2006).

O cálcio é uma molécula sinalizadora extremamente versátil que afeta uma variedade de processos celulares. Os efeitos finais deste não dependem de fatores como o tipo de célula, ambiente em que esta se encontra, estágio de desenvolvimento ou estado patológico da mesma (Cribbs, 2006).

Normalmente as células possuem baixas concentrações de Ca^{2+} intracelulares comparando com o teor elevado no meio extracelular e intra-organelos como os retículos e

mitocôndria, estando assim as células preparadas para a qualquer momento existir um rápido influxo de Ca^{2+} (Yamniuk and Vogel, 2004).

Vários sinais químicos e físicos induzem um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, vindo principalmente de duas fontes, nomeadamente do meio externo e de reservas internas de Ca^{2+} como o retículo sarcoplasmático (Guerrero-Hernandez et al., 2010) e mitocôndria (Parekh and Putney, 2005).

Sob condições fisiológicas normais, um aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico conduz à contração. Isto pode resultar como foi referido anteriormente, quer por despolarização da membrana ou pela ligação de agonistas contráteis a recetores específicos da superfície celular. Um dos mecanismos mais importantes envolve a ativação da via do fosfatidilinositol, como resultado da interação entre um agonista vasoconstritor (por exemplo, norepinefrina, angiotensina II, serotonina, endotelina) e um recetor de membrana acoplado à fosfolipase C (PLC), através de uma proteína G heterotrimérica. Esta interação induz a formação de IP_3 e DAG. O IP_3 difunde-se a partir da membrana celular para o citoplasma, enquanto que o DAG permanece na membrana celular, sendo o ativador fisiológico da PKC, que atua em várias proteínas citoplasmáticas e de membrana, modulando assim diversos processos celulares, tais como a regulação do transporte de Ca^{2+} transmembranar e sensibilidade ao Ca^{2+} dos miofilamentos (Morgado et al., 2012).

Retículo Sarcoplasmático

O retículo sarcoplasmático (SR) é um organelo multifuncional formado por uma rede fusogénica de túbulos e cisternas interligados, distribuído por toda a célula eucariótica. A sua membrana (endomembrana) possui bombas de Ca^{2+} denominadas SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) e canais de libertação de Ca^{2+} (Guerrero-Hernandez et al., 2010).

As SERCA bombeiam o Ca^{2+} ativamente, contra o seu gradiente eletroquímico através da sua atividade ATPase, fazendo com que este não seja acumulado no interior do SR. A abertura dos canais de libertação de Ca^{2+} permitem a saída do Ca^{2+} do reservatório, fluindo para o citosol (Burdakov and Verkhratsky, 2006). A libertação de Ca^{2+} do SR pode ocorrer através do recetor de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3R) e do recetor de rianodina (RyR) (Rainbow et al., 2009).

O SR é espacialmente heterogéneo, o Ca^{2+} acumula-se apenas em determinadas regiões deste organelo uma vez que as bombas SERCA e os canais não estão uniformemente distribuídos na endomembrana. No estado estacionário existe um equilíbrio entre as bombas e os canais (Guerrero-Hernandez et al., 2010).

O SR é descrito como periférico quando está próximo da membrana plasmática e central quando está afastado. O SR periférico tem sido associado com a homeostase do Ca^{2+} , libertação local de Ca^{2+} e interações com os canais iónicos da membrana plasmática e, portanto, na excitabilidade. O SR central está envolvido na contração, fornecendo o Ca^{2+} para os miofilamentos (Wray and Burdyga, 2010).

O Ca^{2+} pode ser libertado do SR formando *puffs* de Ca^{2+} (aglomerados) que ocorrem quando este é libertado através de IP_3R ou pode ocorrer uma libertação espontânea e de curta duração conhecida como *sparks*, que surge através da abertura de recetores de rianodina (Wray et al., 2005). Os *sparks* de cálcio foram descritos pela primeira vez na musculatura lisa em 1995. Por ativação dos canais de potássio dependentes de Ca^{2+} (BK_{Ca}), os *sparks* de cálcio provocam correntes exteriores, conhecidas como STOCs (correntes exteriores transitórias espontâneas). A hiperpolarização resultante leva a uma redução na excitabilidade da membrana, fecha os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e leva ao relaxamento vascular (Noble et al., 2009).

Resumidamente, as principais funções do SR no músculo liso são: (1) Manutenção da homeostase do Ca^{2+} ; (2) Contribuição no relaxamento; (3) Contribuição na contração; (4) Contribuição na excitabilidade, através dos canais de K^+ e Cl^- ativados por Ca^{2+} ; (5) Auxílio no efluxo de Ca^{2+} na membrana plasmática através da bomba de Ca^{2+} ou permutador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Wray and Burdyga, 2010).

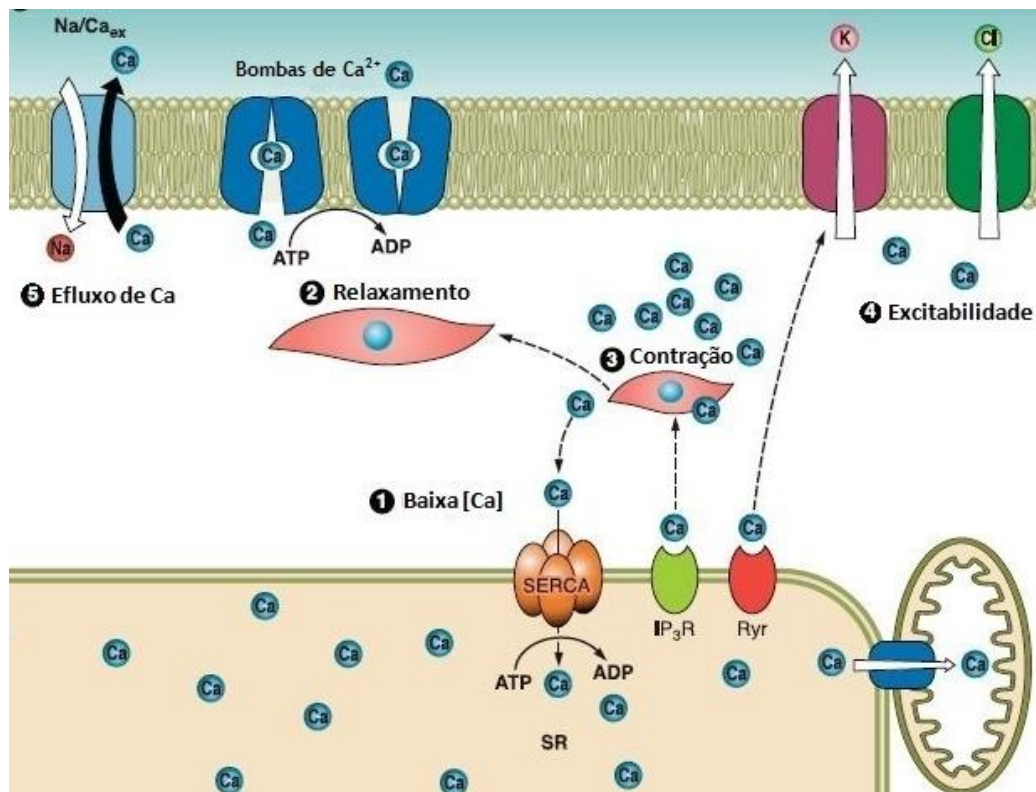


Figura 9 - Representação esquemática das funções do retículo sarcoplasmático (SR) no músculo liso. SERCA: bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; Ryr: recetor de rianodina; IP_3R : recetor de IP_3 ; $\text{Na}^+/\text{Ca}_{\text{ex}}$: Permutador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; Ca : cálcio. Adaptado de (Wray and Burdyga, 2010).

Potencial de membrana

A contração do músculo liso vascular está associada ao potencial de membrana. Uma despolarização conduz a um estado de contração enquanto que uma hiperpolarização leva a um relaxamento (Cox, 2002). O potencial de membrana depende do fluxo de íões que passa através da membrana celular, do gradiente eletroquímico de cada íão e da permeabilidade

relativa ao longo da membrana celular aos diferentes iões. Os canais de Cl^- , K^+ e de Ca^{2+} desempenham um papel importante na regulação de diversos vasos (Jackson, 2000).

Nas SMC vasculares o potencial de repouso é predominantemente regulado pela permeabilidade e pelo gradiente de concentração de K^+ . Como o potencial de repouso (-40 a -55mV) nas SMC não é igual ao potencial de equilíbrio do K^+ (~ -85mV) sugere que outros canais de catiões (como Na^+ e Ca^{2+}) e aniões (Cl^-) contribuem na regulação do potencial de membrana (Firth et al., 2011).

No músculo liso, o potencial eletroquímico do Cl^- é significativamente maior do que o potencial de repouso. Assim, a abertura de canais de Cl^- conduz a uma despolarização que pode ser suficientemente forte para promover um influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Jentsch et al., 2002), principalmente do tipo L. Há também um efluxo de Cl^- . Este processo conduz à contração (Salomonsson et al., 2004).

Normalmente, a concentração de K^+ intracelular (~140 mM) é muito superior à do espaço extracelular (~5mM), e a permeabilidade ao K^+ através da membrana plasmática é muito maior do que ao Na^+ e Cl^- , por isso, a corrente transmembranar de K^+ , gerada por um efluxo de K^+ através de canais K^+ , é um fator determinante no potencial de membrana em repouso nas SMC (Mandegar and Yuan, 2002). A abertura dos canais de K^+ conduz a uma hiperpolarização fazendo com que os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem encerrem, levando à vasodilatação. Assim, controlando o potencial de membrana e, por sua vez, a permeabilidade ao Ca^{2+} estes canais conseguem regular o tónus vascular (Salomonsson et al., 2004).

Tabela 1 - Relação entre a atividade dos canais de K^+ , potencial de membrana e a contratilidade no músculo liso. PO: Probabilidade de abertura; VOCC: canais de cálcio dependentes de voltagem; $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentração de cálcio intracelular; SMC: células musculares lisas. Adaptado de: (Martin et al., 2013)

EVENTOS INTRACELULARES				EVENTOS CELULARES	EVENTOS VASCULARES	
Atividade dos Canais de K^+	Potencial de Membrana	VOCC	$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Tamanho da célula	Diâmetro	Fluxo sanguíneo
Se a Po diminuir	Despolarização (Superior a -50mV)	Abertos	Aumenta	Reduz (Contraí)	Reduz (Vasoconstrição)	Diminui
Repouso (Po)	Repouso (cerca de -50mV nas SMC)	Repouso (atividade basal)	Basal (cerca de 100nM nas SMC)	Tamanho de Repouso	Repouso (tónus basal)	Basal
Se a Po aumentar	Hiperpolarização (Inferior a -50mV)	Fechados	Diminui	Aumenta (Relaxa)	Aumenta (Vasodilatação)	Aumenta

1.4.2. Contração independente de cálcio

Como foi referido anteriormente a contração do músculo liso é regulada principalmente pela fosforilação da MLC20. O grau de fosforilação é dependente do balanço entre a atividade

da MLCK e MLCP. Estudos recentes revelaram a importância de uma pequena proteína de ligação ao GTP, RhoA, e da ROCK, na regulação da atividade de MLCP e no aumento da sensibilidade do mecanismo contrátil (Bayguinov et al., 2011).

Para além dos processos previamente descritos, a diminuição ou aumento da atividade da MLCP pode promover contração ou relaxamento vascular independentemente de qualquer alteração na concentração de Ca^{2+} intracelular. Estes processos são denominados de sensibilização e dessensibilização ao Ca^{2+} , respetivamente (Connolly and Aaronson, 2011). A diminuição ou aumento da atividade da MLCP pode promover contração ou relaxamento vascular independentemente de qualquer alteração na concentração de Ca^{2+} intracelular (Connolly and Aaronson, 2011).

Sensibilização ao cálcio

Sensibilização ao cálcio é o termo utilizado para descrever o aumento da atividade contrátil produzido por agonistas acoplados à proteína G. Podem ser alcançados níveis superiores de contração e fosforilação de MLC20, mesmo com níveis baixos de Ca^{2+} intracelular, utilizando agonistas contráteis comparando com a despolarização de potássio. Um componente importante neste mecanismo é a RhoA/ROCK (Lincoln et al., 2001).

A RhoA pertence a uma família de GTPases pequenas que incluem as isoformas RhoA, RhoB, e RhoC. A RhoA pode ter ligação de alta afinidade para trifosfato de guanosina (GTP), bem como para difosfato de guanosina (GDP). A forma ativa é ligada a GTP e localiza-se na membrana celular, enquanto que a forma inativa, ligada a GDP, localiza-se no citoplasma. A variação da forma inativa/ativa é controlada por reguladores específicos denominados de fatores de troca de nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas ativadores de GTPases (GAPs) e inibidores de dissociação do nucleótido de guanina (GDIs). A ativação da RhoA pode ser iniciada por GEFs específicas da RhoA e a inativação por GAPs. Após ativação da RhoA, a ROCK migra para a membrana celular e interage com a RhoA-GTP, resultando na sua autofosforilação e ativação (de Godoy and Rattan, 2011).

A ROCK é uma cinase serina/treonina, identificada como um efetor da RhoA que medeia a sensibilização ao cálcio. Existem duas isoformas, I e II, sendo a ROCKII predominante nas SMC vasculares, contribuindo na regulação da contratilidade celular (Nunes et al., 2011).

O principal substrato da ROCK é o MLCP. Diversos mecanismos têm sido sugeridos para inibir a atividade da MLCP, nomeadamente por uma alteração da estrutura heterotrimérica da MLCP, por fosforilação do MYPT1 num local específico e através da fosforilação da proteína inibitória CPI-17 (17 kDa, proteína inibitória potenciada pela PKC da proteína fosfatase tipo1) (Hirano et al., 2004). A CPI-17 pode também ser fosforilada pela PKC (Nunes et al., 2011).

Assim, a estimulação de recetores acoplados a proteínas G resulta na ativação da RhoA, que por sua vez estimula a ROCK. A subunidade não catalítica de MLCP é fosforilada pela ROCK, inativando-a. A fosforilação de MLC20 pela MLCK é então aumentada conduzindo a um estado de contração (Bayguinov et al., 2011).

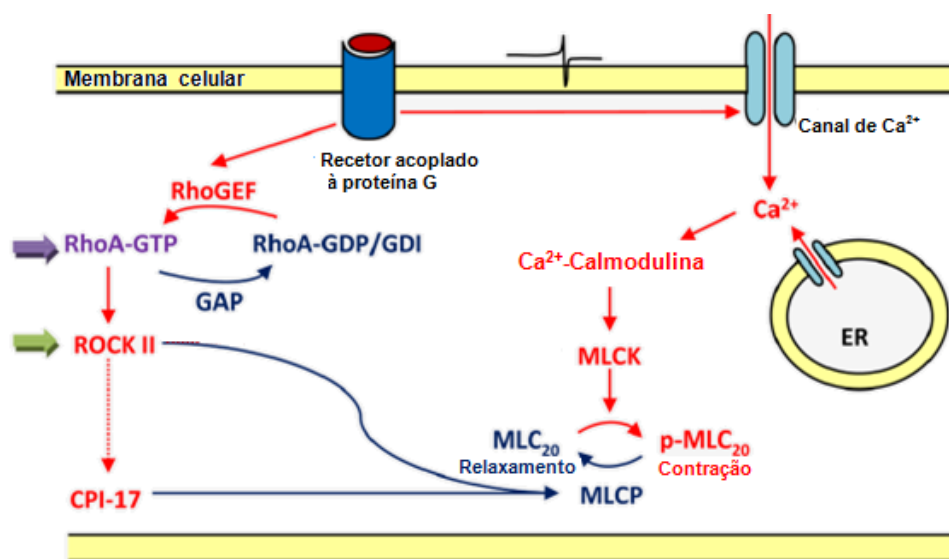


Figura 10 - Representação esquemática das vias moleculares envolvidas na contração do músculo liso. GEF: fator de troca de nucleótido de guanina; GAP: proteínas ativadoras de GTPases; ROCKII: proteína cinase II associada à Rho; CPI-17: proteína inibitória; MLCP: fosfatase das cadeias leves de miosina; MLCK: cinase das cadeias leves de miosina; ER: retículo endoplasmático; MLC20: cadeias reguladoras da miosina. O p significa fosforilada. Adaptado de (de Godoy and Rattan, 2011).

Dessensibilização ao cálcio - Via das MAPK

A família das MAPK (proteína cinase ativada por mitogénios) medeia respostas celulares a uma ampla gama de sinais extracelulares, como fatores de crescimento, hormonas, citocinas e *stress*. Regulam importantes processos, incluindo crescimento celular, diferenciação, sobrevivência celular, função neuronal e resposta imune (Yang et al., 2013).

As MAPK pertencem a uma grande família de cinases serina/treonina. São proteínas citoplasmáticas capazes de modular a atividade de outras proteínas intracelulares, por adição de grupos fosfato, fosforilação dos resíduos tanto de treonina (Thr) como tirosina (Tyr) (Hommes et al., 2003).

Nos mamíferos são expressos pelo menos quatro grupos de MAPKs que são distintamente regulados, nomeadamente as cinases relacionadas com sinais extracelulares (ERK, isoforma 1 e 2), cinase jun amino-terminal (JNK, isoforma 1, 2 ou 3), proteínas p38 (isoforma p38 α /B/ γ / δ) e ERK5 (Chang and Karin, 2001).

A atividade das MAPK é regulada através de uma cascata em que uma MAPK cinase cinase (MAPKKK) fosforila e ativa uma MAPK cinase (MAPKK) que pode ativar posteriormente a MAPK terminal através de uma dupla fosforilação nos resíduos de Thr e Tyr (Whitmarsh, 2007) modulando posteriormente a atividade de centenas de substratos (Plotnikov et al., 2011).

1.5. Canais iônicos

Os canais iônicos são proteínas integrais de membrana com elevada importância fisiológica e farmacológica. Formam poros nas membranas biológicas através dos quais passam íons inorgânicos de forma seletiva e rápida (Capener et al., 2002).

Os canais são fundamentais em todos os organismos vivos, desde organismos procariontes a animais superiores e intervêm na excitabilidade celular, contração muscular, transmissão sináptica e sinalização celular, entre outros processos (Poveda et al., 2013).

Mutações nos canais iônicos estão associadas a uma diversidade de doenças ao nível do sistema nervoso e cardíaco (canalopatias). Os estudos com canais são importantes uma vez que são potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos (Capener et al., 2002).

1.5.1. Canais de cálcio

A atividade contrátil do músculo liso correlaciona-se com os níveis de Ca^{2+} intracelular livre e disponível para o aparelho contrátil (Amberg et al., 2003b). Ao entrar nas células este íon pode desencadear uma cascata de eventos, tais como a libertação de cálcio de depósitos intracelulares, ativação de sistemas de segundos mensageiros e abertura de canais iônicos (Ghatta et al., 2006).

O Ca^{2+} pode atravessar a membrana plasmática através de diferentes canais de cálcio, tais como canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCC), canais operados por depósitos intracelulares (SOC) e canais operados por recetores (ROC). Os VOCC são ativados por despolarização da membrana, os ROC por uma série de pequenas moléculas mensageiras, sendo as mais comuns fosfatos de inositol, nucleótidos cíclicos, mensageiros derivados de lípidos e neurotransmissores. Os SOC são ativados quando há um esgotamento de Ca^{2+} das reservas intracelulares (Parekh and Putney, 2005). Existem também os canais de cálcio ativados por *stress* físico (SAC), ativados pelo *stress* físico da membrana (Carvalho-de-Souza et al., 2013).

Consoante a via de entrada de Ca^{2+} podem participar vias de sinalização distintas dentro da mesma célula, assim, conforme o tipo de músculo liso, as respostas contráteis são diferentes e especializadas de acordo com a sua localização e função (Cribbs, 2006).

Canais de cálcio dependentes de voltagem

Os canais de cálcio dependentes de voltagem são necessários para o acoplamento normal de excitação-contração no coração, no músculo-esquelético e em diversos tipos de músculo liso, incluindo o músculo liso vascular (Sonkusare et al., 2006).

Os VOCC são um complexo de diversas subunidades (Christel and Lee, 2012), formado por subunidades $\alpha 1$ formadoras do poro e subunidades auxiliares β , $\alpha 2\delta$ e por vezes γ (Cox, 2011). A subunidade $\alpha 1$ consiste em quatro repetições homólogas (domínios I-IV) cada uma com 6 segmentos transmembranares (S1-S6) ligados por *loops* citoplasmáticos e regiões C- e

N-terminal (Currie, 2010). O *loop* entre o segmento 5-6 determina a seletividade iônica do canal e as hélices do S4 possuem características de aminoácidos carregados positivamente que permitem detectar a despolarização da membrana e assim reagir com a abertura do canal (Tedford and Zamponi, 2006).

Estes canais podem ser classificados, com base nas suas características de ativação tendo em conta a voltagem, em canais ativados por alta voltagem (HVA) ou baixa voltagem (LVA). Podem ainda ser subdivididos com base na semelhança estrutural da subunidade $\alpha 1$, em Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3 ou ainda tendo em conta a sua sensibilidade ao bloqueio por agentes farmacológicos e então subdivididos em tipo L, N, P/Q, R e tipo T (Park and Luo, 2010).

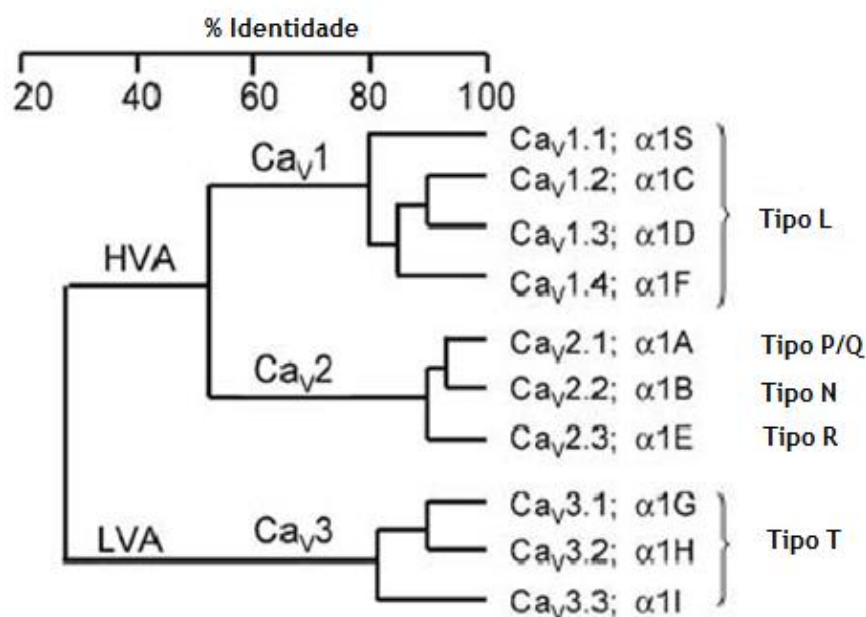


Figura 11 - Dendrograma dos VOCC. HVA: ativados por alta voltagem; LVA: ativados por baixa voltagem. Adaptado de (Dolphin, 2006).

Os subtipos dos VOCC diferem na sua distribuição, propriedades funcionais e perfis farmacológicos. Os canais de cálcio tipo T estão envolvidos na regulação da excitabilidade celular, os canais tipo N e P/Q medeiam a libertação rápida de neurotransmissores e os canais de cálcio tipo L mediam funções como o acoplamento de excitação-contração no coração e músculo, secreção de insulina e transcrição genética dependente de cálcio (Turner et al., 2011).

Os VOCC são capazes de criar grandes aumentos na concentração de Ca^{2+} intracelular em questão de milissegundos fazendo destes canais os mais rápidos e eficientes na resposta da sinalização ao Ca^{2+} . Uma vez que a regulação da quantidade de Ca^{2+} que entra e sai da célula é controlado por canais da membrana do plasma, a célula é capaz de criar um mecanismo eficiente para a manutenção de Ca^{2+} (Karlstad et al., 2012).

Canais de cálcio tipo T

Os canais de Ca^{2+} tipo T são ativados por baixa voltagem, por potenciais de membrana muito mais negativos que os do tipo L, são caracterizados pela sua rápida ativação e rápida inativação de correntes "transitórias", condutâncias relativamente pequenas ou unitárias (Catterall, 2011). Estes canais fazem parte de uma família composta por 3 membros, conhecidos como $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ e $\text{Ca}_v3.3$ (também denominados de $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ e $\alpha 1I$). Os canais tipo T $\text{Ca}_v3.1$ e $\text{Ca}_v3.2$ são os principais canais LVA no sistema cardiovascular e embora tenha sido detetado mRNA de $\text{Ca}_v3.3$ em SMC vasculares, esta isoforma é comumente encontrada no cérebro (Cribbs, 2006).

Canais de cálcio tipo L

Os canais de Ca^{2+} tipo L são os principais VOCC expressos nas células do músculo liso. São ativados por alta voltagem e caracterizados pela sua elevada condutância e a sua inativação lenta, sendo por isso de longa duração (Kudryavtseva et al., 2013). São ativados com despolarização na ordem dos -20mV (Lacinova, 2005).

O conhecimento cardiovascular de canais de Ca^{2+} tipo L foi revolucionado nas últimas duas décadas devido aos avanços da biologia molecular, técnica de *Patch-clamp* (Sonkusare et al., 2006) e cristalografia de proteínas (Tang et al., 2014).

Existem quatro isoformas de canais tipo L ($\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, e $\text{Ca}_v1.4$), todas elas caracterizadas por uma elevada sensibilidade a diidropiridínicos (DHP). Esta sensibilidade distingue estes canais dos restantes VOCC. Os canais $\text{Ca}_v1.1$ são quase exclusivamente expressos no músculo-esquelético enquanto que os $\text{Ca}_v1.2$ e $\text{Ca}_v1.3$ são amplamente distribuídos, encontrando-se em neurónios, células sensoriais da retina e do ouvido interno, células endócrinas, músculo liso e coração. Os $\text{Ca}_v1.4$ apresentam um perfil de expressão restrita e são encontrados principalmente na retina. Recentemente, esta isoforma foi também encontrada em células do sistema imunitário (Striessnig et al., 2004).

No músculo liso vascular, os canais de Ca^{2+} tipo L ($\text{Ca}_v1.2$) têm um papel fundamental na determinação da pressão sanguínea (Cribbs, 2006).

1.5.2. Canais de Potássio

Os canais de potássio pertencem a uma família de proteínas de membrana que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos. Podem ser ativados por diversos fatores, como voltagem, libertação e entrada de Ca^{2+} intracelular, proteínas G e ATP (Ghatta et al., 2006).

Os canais de potássio têm um papel fundamental na regulação do diâmetro de pequenas artérias e arteríolas (Hill et al., 2010) e contribuem para a regulação do potencial de membrana em células eletricamente excitáveis, incluindo aquelas encontradas no músculo liso (Ko et al., 2008). São fundamentais na manutenção do tónus do músculo liso através dos

seus efeitos no potencial de membrana e uma variedade de agonistas pode modificar o tónus por alteração da atividade destes canais (Wareing et al., 2006).

Como já foi referido, no geral, a abertura dos canais de potássio na membrana celular em resposta a estímulos endógenos ou agentes farmacológicos leva a um aumento do efluxo de K^+ que provoca uma hiperpolarização da membrana. Os VOCC encerram e há uma diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico, levando à vasodilatação. Quando fecham ocorre o fenómeno contrário, há despolarização da membrana, abertura dos VOCC, aumento de Ca^{2+} intracelular e consequentemente vasoconstrição (Sobey, 2001).

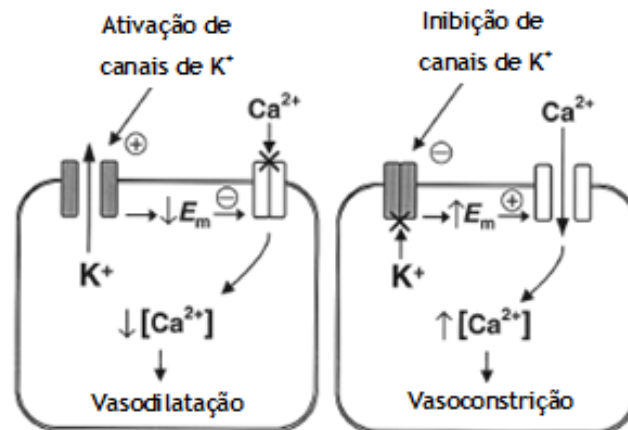


Figura 12 - Representação esquemática do mecanismo geral de ação dos canais de potássio. Em: potencial de membrana; $[Ca^{2+}]$: concentração de cálcio. Adaptado de (Sobey, 2001).

A alteração da função dos canais de potássio desempenha um papel importante na gênese de diversas doenças vasculares como hipertensão pulmonar e sistêmica, diabetes e complicações de aterosclerose, sendo por isso importante o seu estudo. São também potenciais alvos para novos fármacos, por exemplo, para restaurar os níveis normais da reatividade vascular em hipertensão (Korovkina and England, 2002).

Nas células do músculo liso estão identificados quatro classes de canais de potássio, nomeadamente os canais de potássio dependentes de voltagem (K_V) os canais de potássio dependentes de cálcio (BK_{Ca}), os retificadores de influxo (K_{ir}) e os sensíveis a ATP (K_{ATP}) (Park et al., 2008).

Canais de potássio dependentes de voltagem

Os canais de potássio dependentes de voltagem pertencem a um grupo de proteínas de membrana que regulam o fluxo de iões de potássio para dentro e fora das células em resposta a alterações no potencial de membrana. Quando ativados permitem um efluxo de K^+ (Ko et al., 2008; Blunck and Batulan, 2012). Estes canais são encontrados em todo o corpo e em diferentes tipos de células (Blunck and Batulan, 2012). No músculo liso vascular, estes canais são essenciais na regulação do potencial de membrana e do tónus vascular (Coppock et al., 2001), sendo ativados por uma despolarização de membrana na ordem dos -35 a 55mV (Sobey, 2001).

Os canais K_V consistem num tetrâmero de dois tipos de subunidades proteicas, as designadas α que contêm a via de condução de iões e as acessórias que modificam as propriedades intrínsecas das anteriores. Cada subunidade α possui seis segmentos transmembranares (S1-S6) e regiões citoplasmáticas N- e C- terminal. A região do poro é formada pelos segmentos S5 e S6 unidos por um *loop* e o domínio S4 apresenta-se como um sensor de voltagem. O N-terminal da subunidade α interage com o C terminal das subunidades acessórias β , que estão envolvidas na tetramerização das subunidades α . Relativamente às subunidades acessórias existem 3 famílias (β 1-3) que interagem com as subunidades α alterando as propriedades básicas ou o seu nível de expressão na superfície celular. Existem ainda outras proteínas que podem atuar como subunidades acessórias (Cox, 2005; Cheng and Claydon, 2012).

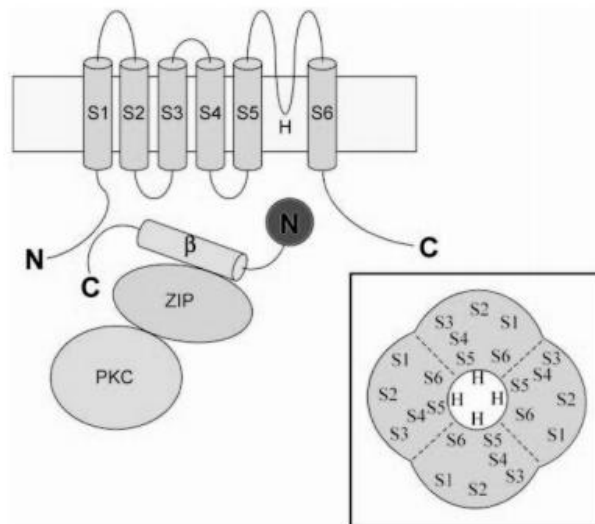


Figura 13 - Representação da estrutura dos canais K_V . PKC: proteína cinase C; ZIP: proteínas adaptadoras ZIP1 e ZIP2; β : subunidades acessórias; S1-6: segmentos transmembranares das subunidades α . Adaptado de (Cox, 2005).

Um canal K_V funcional consiste em quatro subunidades α que podem ser iguais ou de diferentes isoformas da mesma família de genes, formando homo ou hétero-tetrâmeros, que fazem diferir as propriedades biofísicas, a regulação fisiológica e as propriedades farmacológicas destes canais (Joseph et al., 2013).

Os canais K_V foram divididos em grupos com base na sua voltagem e dados farmacológicos. Existem mais de 30 genes que codificam uma variedade de subfamílias de subunidades α dos K_V . Muitos canais K_V apresentam propriedades cinéticas e farmacológicas similares o que torna difícil determinar qual o gene do canal K_V expresso numa célula particular.

Os canais K_V podem ser alvo de fosforilação pela proteína cinase A (PKA) e pela PKC. A sinalização pela PKC leva ao encerramento de canais K_V e consequente vasoconstrição do músculo liso. A PKA pode ser ativada tanto pela adenilato ciclase como pela guanilato ciclase num processo de *cross-activation* que provoca o aumento tanto de AMPc como GMPc,

respetivamente, e pode abrir canais K_V para hiperpolarizar a membrana e facilitar o relaxamento do músculo liso (Joseph et al., 2013).

Em resposta à despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz uma repolarização nas SMC em direção ao potencial de membrana de repouso (Korovkina and England, 2002). Uma despolarização em pequena escala nas células do músculo liso vascular leva a um influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} tipo L e ativação do mecanismo contrátil. A inativação de canais K_V resulta numa despolarização sustentada. Comparado com o processo de ativação, a inativação de K_V é um processo mais lento (Ko et al., 2008).

Como inibidor dos canais K_V usa-se a 4-aminopiridina (4-AP) pois é um clássico antagonista farmacológico destes canais (Albarwani et al., 2003).

Canais de potássio dependentes de cálcio

Os canais de potássio dependentes de Ca^{2+} são encontrados em neurónios, células cromafins, células ciliadas internas da cóclea, no músculo liso, esquelético (Cui et al., 2009) e cardíaco (Brenner et al., 2000).

Atualmente existem três grandes categorias de canais de potássio dependentes de Ca^{2+} classificadas de acordo com sua condutância unitária: grande condutância, com 100-300pS (BK_{Ca}); condutância intermédia, com 25-100pS (IK_{Ca}), e pequena condutância, com 2-25pS (SK_{Ca}) (Ghatta et al., 2006).

Tal como os canais K_V , estes influenciam o potencial de membrana e regulam o tónus vascular, a sua estrutura é também semelhante, são compostos por subunidades α e β , tendo um sensor de voltagem (S4), um poro (S5 e S6) e um domínio citosólico que contém locais de ligação para metais (Lee and Cui, 2010).

A subunidade α pode sofrer processos de *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais que contribuem para as diferenças nas propriedades reguladoras dos canais, devido à variabilidade nas respostas a esteróides, nucleótidos cíclicos e disponibilidade de sítios de fosforilação e conferem diferentes sensibilidades, por exemplo à voltagem (Hill et al., 2010).

As subunidades α são compostas por 11 domínios hidrofóbicos dos quais 7 são transmembranares (S0-S6), região denominada de núcleo, e 4 citoplasmáticos (S7-S10) que compõem a região da cauda. As subunidades β são compostas por 2 segmentos transmembranares com um longo *loop* extracelular e terminais -N e -C citoplasmáticos. Estão identificadas 8 proteínas de subunidades β que alteram as propriedades fenotípicas dos canais BK_{Ca} . No músculo liso, as subunidades α encontram-se associadas a subunidades β 1, conferindo maior sensibilidade ao Ca^{2+} dos canais BK_{Ca} aqui presentes do que aqueles de tecidos neuronais ou do músculo-esquelético. O nível de associação com as subunidades β específicas confere funções específicas ao canal num determinado tecido (Korovkina and England, 2002).

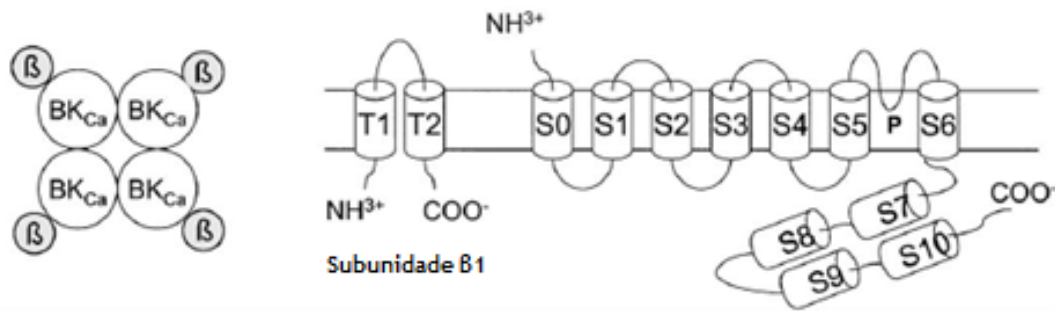


Figura 14 - Representação da estrutura dos canais BK_{Ca}. T1 e T2: domínios transmembranares das subunidades α ; S0-S10: domínios da subunidades α . Adaptado de (Korovkina and England, 2002).

A abertura destes canais é determinada pela voltagem e pelo aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ (Martin et al., 2013). A sua ativação conduz a uma rápida repolarização da membrana e, por conseguinte, encerramento dos VOCC e diminuição do influxo de Ca²⁺ na célula. Provoca ainda um aumento do efluxo de Ca²⁺ através do permutador Na⁺/Ca²⁺. Assim, a sua principal função é exercer um *feedback* negativo sobre o potencial de membrana e na concentração de Ca²⁺ intracelular (Carvalho-de-Souza et al., 2013).

De acordo com a sua importância fisiológica, um mau funcionamento dos canais BK_{Ca} pode provocar epilepsia, compromisso motor, perda auditiva induzida por ruído, hipertensão arterial, incontinência urinária, bexiga hiperativa e asma (Cui et al., 2009).

Para além dos K_v, os canais BK_{Ca} são também ativados por despolarização da membrana o que torna difícil distinguir a corrente produzida por eles (Ko et al., 2008). Como inibidores dos canais BK_{Ca} temos a iberiotoxina e a caribdotoxina. O Clotrimazol e também a caribdotoxina são inibidores dos IK_{Ca} e a apamina dos SK_{Ca} (Martin et al., 2013).

Canais retificadores de influxo

Em organismos multicelulares, as células são caracterizadas por um gradiente energeticamente favorável, que se traduz no movimento de íões K⁺ do meio intracelular para o meio extracelular. Os canais retificadores de influxo (K_{IR}) favorecem o oposto, o influxo de potássio mais do que o seu efluxo, mantendo assim a homeostase de potássio. Desempenham também um papel crucial na manutenção do potencial de membrana e regulam diversas funções celulares como a excitabilidade da membrana, frequência cardíaca e tónus vascular (Pattnaik et al., 2012). Quando existe efluxo de K⁺ estes canais tendem a fechar e em situações de influxo os canais abrem (Logothetis et al., 2007).

As correntes produzidas pelos canais K_{IR} foram identificadas pela primeira vez no músculo-esquelético e mais tarde foram encontrados numa grande variedade de células como cardiomiócitos, neurónios, osteoclastos, células endoteliais (Hibino et al., 2010), células do músculo liso vascular, entre outras (Martin et al., 2013).

Os canais K_{IR} estão classificados em 7 subfamílias (K_{IR} 1-7) com 15 membros que podem ser distinguidas através das suas propriedades biofísicas como o grau de corrente de retificação, condutância unitária e sensibilidade a diferentes mediadores (Levitan, 2009).

Estes canais podem ser modulados por fosforilação pela PKA, por proteínas auxiliares como recetores sulfonilureia, subunidades $\beta\gamma$ da proteína G, Na^+ e ATP, bloqueadores de poros como Mg^{2+} , poliamina e etanol (Lee et al., 2013b). Como exemplo, os $\text{K}_{\text{IR}3}$ (GIRK) são retificadores fortes e são ativados pelas subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G, enquanto que os $\text{K}_{\text{IR}6}$ (K_{ATP}) são retificadores fracos e são influenciados pelo rácio intracelular de ATP/ADP (Logothetis et al., 2007).

A ativação destes canais é independente do potencial de membrana por si só e da voltagem, mas depende da diferença entre o potencial de membrana e o potencial de equilíbrio para o K^+ quando a concentração de K^+ extracelular é alterada. Isto deve-se a iões citoplasmáticos como o Mg^{2+} e poliaminas que são conectados à via de despolarização e impedem assim o efluxo de K^+ (Logothetis et al., 2007).

Todos os canais K_{IR} partilham de uma estrutura comum, que consiste num tetrâmero com 2 domínios transmembranares denominados de TM1 e TM2 que se conectam e entre eles formam a região do poro. Possuem também domínios citoplasmáticos C- e N- terminal e alguns membros das subfamílias requerem subunidades adicionais, sendo que a maioria não necessita (Stanfield and Sutcliffe, 2003).

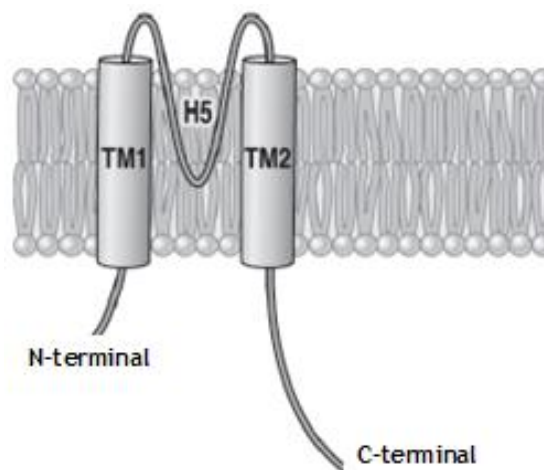


Figura 15 - Representação da estrutura dos canais K_{IR} . TM 1 e 2: domínios transmembranares; H5: região do poro. Adaptado de (Hibino et al., 2010).

Através do estudo da estrutura cristalina dos canais K_{IR} verificou-se a existência de um outro poro, citoplasmático, formado pelos terminais -C e -N, que é uma extensão do poro transmembranar para o citoplasma. A região citoplasmática do poro forma o sítio de ligação para ligandos e outros reguladores controlando assim o acesso ao poro transmembranar (Xie et al., 2007).

Fosfoinosítídeos, como fosfatidil inositol-4,5 bifosfato (PIP_2), controlam a atividade de diversos canais iónicos. Os canais K_{IR} foram os primeiros que evidenciaram ser dependentes de interações diretas com fosfoinosítídeos (Logothetis et al., 2007).

A interação direta entre os grupos fosfatos negativos e resíduos positivos dos terminais C e N são essenciais para a sua ativação. Embora ainda seja controverso, parece que a ligação

de PIP₂ se dá na região citoplasmática e proporciona uma alteração conformacional global do poro que conduz à abertura do canal (Xie et al., 2007).

Para inibir estes canais pode usar-se por exemplo o Ba⁺ (Martin et al., 2013).

Canais sensíveis a ATP

Os canais sensíveis a ATP (K_{ATP}) foram inicialmente identificados em miócitos cardíacos. Atualmente sabe-se que existem em diversos tecidos como células β pancreáticas, células do músculo liso, esquelético e neurónios (Suzuki et al., 2001). Desempenham um papel fundamental na fisiologia e fisiopatologia de vários tecidos por acoplamento do estado metabólico da célula com a atividade elétrica da célula. São também importantes nas respostas celulares de vários tecidos sob estados metabólicos alterados, como hiperglicemia, hipoglicemia, isquemia, e hipoxia (condições de *stress* metabólico) (Seino and Miki, 2003).

Como foi referido anteriormente, alguns membros das subfamílias dos canais K_{IR} requerem subunidades adicionais, como é o caso dos canais K_{IR6}. Com a ligação de proteínas de membrana, pertencentes à família de *ATP-binding cassette transporter* (ABC), subunidades acessórias de recetor de sulfoliureia (SUR), originam complexos proteicos hétero-octaméricos denominado de canais K_{ATP}. Estes canais são funcionais apenas quando estão ligadas 4 subunidades SUR a 4 canais K_{IR6} (Flagg et al., 2010).

Os canais K_{ATP} diferem dos canais K_{IR} na sua sensibilidade à concentração intracelular de ATP (Shi et al., 2012).

A subunidade K_{IR6} possui duas hélices transmembranares (M1 e M2), terminais citoplasmáticos -N e -C e um *loop* formador do poro com glicina-fenilalanina-glicina, que confere a seletividade ao K⁺. As subunidades SUR possuem 3 domínios transmembranares, TMD1 e TMD2 cada um com 6 segmentos transmembranares e o TMD0 um domínio transmembranar N- terminal com 5 segmentos transmembranares. Têm 2 largos *loops* intracelulares que conectam com os TMD adjacentes. Cada *loop* contém um domínio de ligação a nucleótidos (NBD1 e NBD2). A regulação dos canais K_{ATP} vasculares é composta numa fase imediata pela maioria dos metabolitos, hormonas e neurotransmissores, através do canal de propagação e numa fase tardia, com mecanismos de transcrição. Estão, por exemplo, sujeitos a uma regulação direta e rápida pelo ATP e ADP intracelular (Shi et al., 2012). Com o aumento intracelular de ATP os canais K_{ATP} são inativados, enquanto que na presença de Mg²⁺ e ADP ficam ativos (Insuk et al., 2003).

Os canais K_{ATP} em células do músculo liso podem ser ativados através de inibição metabólica e substâncias endógenas, tais como a adenosina, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e prostaciclina (Suzuki et al., 2001).

Para inibir estes canais pode-se usar glibenclamida ou elevadas concentrações intracelulares de ATP (Martin et al., 2013).

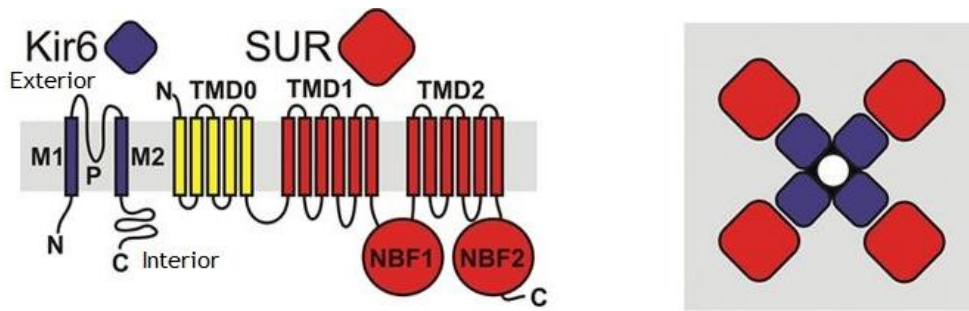


Figura 16 - Representação da estrutura dos canais K_{ATP} . SUR: subunidades acessórias de recetor de sulfoliureia; K_{IR6} : subunidades de canais K_{IR6} ; TMD0: domínio transmembranar; M1 e M2: hélices transmembranares; P: poro; NBF 1 e 2: sítio de ligação a nucleótido. Adaptado de (Nichols et al., 2013).

1.6. Regulação do relaxamento

O relaxamento do músculo liso pode ocorrer como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por ação direta de substâncias que estimulam a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente disso, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e um aumento da atividade da MLCP (Webb, 2003).

A diminuição do Ca^{2+} citosólico envolve o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática. Através especialmente de proteínas de ligação ao Ca^{2+} do SR (calsequestrina e calreticulina), da SERCA (Webb, 2003), da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) que medeia o efluxo de Ca^{2+} para o espaço extracelular e desempenha um papel crucial na redução excessiva dos níveis de Ca^{2+} citosólico em condição de repouso ou na mediação da ação vasodilatadora de vários agentes endógenos, do permutador Na^+/Ca^{2+} (NCX), localizado na membrana plasmática, impulsionado pelo gradiente transmembranar de Na^+ e mantido pela Bomba Na^+ (Na^+/K^+ ATPase), pode contribuir para o influxo ou efluxo de Ca^{2+} dependendo das condições. Para além disto, o relaxamento pode ainda ser promovido por nucleótidos cíclicos (Morgado et al., 2012).

1.6.1. Nucleótidos cíclicos

Os nucleótidos cíclicos, 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e 3',5'-monofosfato cíclico adenosina (AMPc) foram identificados há mais de quatro décadas. O AMPc é sintetizado a partir do ATP pela adenilato ciclase (AC) enquanto que o GMPc a partir de GTP pela guanilato ciclase (GC). Os níveis intracelulares destes nucleótidos são regulados não só pela sua síntese mas também pela sua degradação, através por exemplo de fosfodiesterases (PEDs) (Fischmeister et al., 2006) que são enzimas que hidrolisam o GMPc e/ou AMPc, através da clivagem de ligações fosfodiéster (Allanore, 2012).

Os segundos mensageiros AMPc e GMPc regulam uma variedade de funções celulares e processos morfológicos no sistema cardiovascular. Pequenas alterações nos níveis destes nucleótidos podem causar doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca e cardiomiopatia (Rao and Xi, 2009).

GMP cíclico

O GMPc é um importante segundo mensageiro intracelular (Dolphin, 2003) descrito pela primeira vez em 1963 (Burley et al., 2007). Regula uma ampla variedade de processos fisiológicos no sistema cardiovascular, incluindo a contratilidade cardíaca, o tónus vascular, a função plaquetária e a remodelação cardíaca e vascular (Takimoto, 2012).

Existem dois tipos de guanilato ciclase que sintetizam GMPc e diferem na sua localização e nos compostos que levam à sua ativação, nomeadamente a guanilato ciclase membranar (pGC) que está presente na membrana e é ativada, por exemplo, pela ligação de péptidos natriuréticos a recetores de membrana (Potter et al., 2006) e a guanilato ciclase solúvel (sGC) que pode ser ativada por óxido nítrico (NO) e dadores de NO (Cary et al., 2006).

A distribuição de GMPc no interior das células não é uniforme, uma vez que este nucleótido pode ser funcionalmente compartimentado, sendo responsável por diferentes efeitos dependendo se é gerado a partir da sGC ou pGC (Piggott et al., 2006; Fischmeister et al., 2006; Takimoto et al., 2007; Burley et al., 2007; Buxton et al., 2010; Tsai et al., 2012).

A sGC foi purificada pela primeira vez em 1980 (Poulos, 2006). É uma enzima heterodimérica composta por subunidades α e β e um grupo heme prostético com um ferro ferroso (Takimoto, 2012). Existem duas isoformas de cada subunidade, α_1 , α_2 e β_1 , β_2 , respetivamente. A isoforma mais abundante é a α_1/β_1 (Pyriochou and Papapetropoulos, 2005).

As sGC são divididas em três domínios: um domínio N-terminal, também designado de domínio regulador, um domínio central que contém a região de dimerização e um domínio C-terminal, responsável pelo reconhecimento do substrato e a atividade catalítica da sGC (Pyriochou and Papapetropoulos, 2005).

Relativamente à pGC, é um homodímero que possui um único sítio de ligação ao ligando, localizado entre os domínios extracelulares N-terminal. É composto também por um domínio transmembranar, um domínio homólogo de cinase, uma região de articulação e finalmente um domínio catalítico de GC na região C-terminal (Lucas et al., 2000).

Existem 7 isoformas da pGC (GC-A a GC-G), que diferem nos péptidos natriuréticos que ligam, por exemplo a GC-A ou recetor do péptido natriurético A ou 1 (NPRA ou NPR1), é o recetor para péptidos natriuréticos auriculares e cerebrais (ANP e BNP) enquanto que a GC-B ou recetor de péptidos natriuréticos B ou 2 (NPRB ou NPR2) é ativada principalmente pelo péptido natriurético tipo C (CNP) (Wunder et al., 2012).

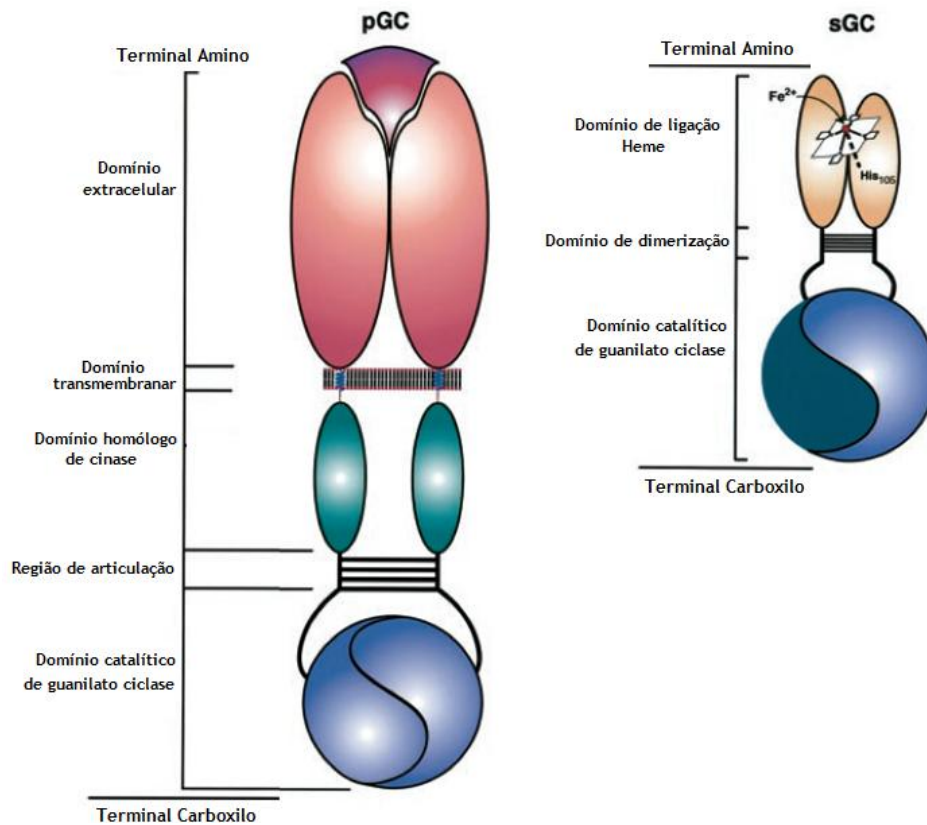


Figura 17 - Estrutura da guanilato ciclase solúvel (sGC) e membranar (pGC). Adaptado de (Lucas et al., 2000).

Tanto a sGC como a pGC têm como substrato o GTP que é posteriormente convertido em GMPc (Ghofrani et al., 2006). Os efeitos fisiológicos do GMPc são em grande parte mediados pela fosforilação de vários efetores através de proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG) (Castro et al., 2010), que são ativadas pelo GMPc (Kukreja et al., 2005).

A PKG é uma cinase de serina/treonina que consiste num homodímero de subunidades idênticas. Cada subunidade detém três domínios funcionais, nomeadamente, um domínio autoinibitório localizado no terminal amino onde existe um fecho de leucina, importante para homodimerização e direcionamento, um domínio regulatório com um local de ligação de alta e baixa afinidade para o GMPc importante para a ativação da enzima e um domínio catalítico para a ligação de ATP que catalisa a transferência de resíduos de fosfato para o motivo serina/treonina (Wolfertstetter et al., 2013).

Existem duas famílias de PKG, PKGI e PKGII, que derivam dos genes *prkg1* e *prkg2*, respetivamente (Francis et al., 2010). A PKGI consiste em duas isoformas α e β , variantes de *splicing* de um único gene. O tipo I da PKG é a principal isoforma no sistema cardiovascular, encontra-se em elevadas concentrações em SMC vasculares, células endoteliais e plaquetas (Birschmann and Walter, 2004). Promove a abertura dos canais de potássio ativados por cálcio que levam à hiperpolarização e por conseguinte relaxamento das células do músculo liso (Wolfertstetter et al., 2013). O N-terminal da PKGI é responsável pelas variantes PKGI α e PKGI β e confere diferentes sensibilidades ao GMPc, por exemplo, a PKGI α apresenta maior

sensibilidade ao GMPc que a PKGIB (Takimoto, 2012). A PKGII é expressa principalmente no intestino, rim e cérebro (Birschmann and Walter, 2004).

A PKG pode fosforilar várias proteínas alvo, nomeadamente canais iónicos que levam à diminuição da concentração de cálcio citosólico (Kukreja et al., 2005). Este processo conduz ao relaxamento do músculo liso vascular e consequentemente à vasodilatação (Ghofrani et al., 2006; Morgado et al., 2012).

A nível cardiovascular, a PKG-I apresenta importantes substratos entre os quais canais BK_{Ca} que promovem a hiperpolarização da membrana e encerramento dos VOCC; o recetor de IP_3 tipo 1 (IP_3RI), cuja fosforilação da isoforma IP_3RI-S1 leva à libertação de cálcio de reservas sensíveis a IP_3 ; o IRAG (*IP_3R -associated cGMP-kinase substrate*) que promove a diminuição da libertação de Ca^{2+} das reservas sensíveis a IP_3 ; a MYPT1 que ativa a MLCP levando a dessensibilização ao cálcio; o fosfolambam (proteína fosforilável e componente do SR do músculo liso) que reforça a captação de Ca^{2+} através das bombas SERCA nas reservas intracelulares e a RhoA que provoca uma redução da fosforilação de MLC20 (Schlossmann and Desch, 2011).

AMP cíclico

O AMPc foi descrito pela primeira vez em 1956 por Earl Sutherland. A nível cardíaco desempenha um papel importante no processo de excitação-contração (Lee et al., 2013a).

O AMPc é sintetizado pela AC e pode ser degradado pelas PDEs (Kritzer et al., 2012). A AC pode existir numa isoforma solúvel (sAC) ou transmembranar (tmAC). Existem nove genes que codificam a tmAC, localizada principalmente na membrana, e um único gene que codifica várias isoformas da sAC. A tmAC é regulada por proteínas G heterotriméricas e pode ser ativada por forskolina, enquanto que a sAC é regulada diretamente por cálcio, alterações fisiológicas de ATP e bicarbonato de sódio (Valsecchi et al., 2013).

O AMPc tal como o GMPc está compartimentado por barreiras físicas ou funcionais, onde intervêm PDEs ou outras proteínas (Kritzer et al., 2012; Feinstein et al., 2012; Murray, 2012; Mika et al., 2012; Saucerman et al., 2014; Conti et al., 2014).

Os alvos diretos do AMPc incluem a proteína cinase A (PKA) (Kritzer et al., 2012), que é uma cinase serina/treonina, de estrutura tetramétrica, que consiste em duas subunidades catalíticas (C) que se mantêm inativas por associação a um dímero de subunidades regulatórias (R) (Diviani et al., 2011). Existem duas classes gerais de PKA, designadas de PKAI e PKAII, devido exclusivamente a diferenças nas subunidades R (RI e RII) que interagem com a subunidade C idêntica (Cheng et al., 2008). Conhecem-se três genes que codificam as subunidades catalíticas (C α , C β e C γ) e quatro as subunidades reguladoras (RI α , RI β , RII α e RII β) (Dodge-Kafka et al., 2006).

As subunidades catalíticas são as porções de fosforilação ativa da enzima. Quando o nível de AMPc aumenta, este nucleótido liga-se às subunidades reguladoras da PKA, fazendo com que esta sofra uma alteração conformacional e liberte as subunidades catalíticas ativas permitindo fosforilar os seus substratos (Kandel, 2012).

A PKA pode fosforilar várias proteínas como RyR2 e canais de Ca^{2+} tipo L. Além disso, a fosforilação por PKA de troponina I regula a sensibilidade ao Ca^{2+} de miofilamentos (Wagner et al., 2013).

Para além disto, pode haver um mecanismo de *cross-activation*. Neste processo a PKG pode ser ativada por AMPc quando este existe em concentrações 10 vezes superiores às de GMPc e de igual modo pode suceder ativação da PKA por GMPc quando a concentração deste nucleótido é 10 vezes superior à de AMPc. No músculo liso, os níveis citosólicos de AMPc normalmente existem nesta proporção. Assim, um aumento no nível citosólico de AMPc poderá ativar tanto a PKA como a PKG, enquanto que o GMPc só ativa a PKG (Morgado et al., 2012).

1.7. Androgénios

Globalmente, as doenças cardiovasculares são consideradas umas das principais causas de mortalidade. Nos últimos anos tem havido um interesse crescente no papel dos androgénios a nível cardiovascular uma vez que as diferenças de género na incidência destes problemas de saúde têm sido atribuídas a diferentes padrões de hormonas sexuais encontrados nos homens e nas mulheres (Kaushik et al., 2010).

Os androgénios são a principal família de hormonas esteroides presentes nos homens. Consistem num grupo de quatro hormonas: dihidrotestosterona (DHT), testosterona, androstenediona e dehidroepiandrosterona (DHEA) (Marchetti and Barth, 2013).

A testosterona é considerada o androgénio mais importante. Pode ser encontrada na forma de testosterona livre ou ligada a outras proteínas. Apenas 2-3% de toda a testosterona circulante está presente na forma livre e é responsável por maior parte dos efeitos fisiológicos. Cerca de 60-70% de toda a testosterona está ligada à globulina que liga hormonas sexuais (SHBG) e cerca de 30% está ligada à albumina. Qualquer alteração nestas proteínas poderá afetar os níveis de testosterona circulante (Kaushik et al., 2010).

Os androgénios desempenham um papel crucial no desenvolvimento, manutenção e regulação do fenótipo masculino e fisiologia reprodutiva (Gobinet et al., 2002). A testosterona é responsável pelas características sexuais masculinas. Ao contrário de outros órgãos endócrinos, os testículos têm uma posição visível, estão expostos, pelo que são de fácil acesso e manipulação. Sendo este órgão uma fonte de testosterona, os efeitos desta hormona, ou melhor a sua ausência, desde cedo se tornaram alvo de grande estudo (Nieschlag and Nieschlag, 2014).

1.7.1. Síntese de Testosterona

A testosterona é sintetizada principalmente nas gónadas (Kang, 2013), no homem pelos testículos e na mulher pelos ovários e glândulas adrenais ou pela conversão de androstenediona. Pode ser posteriormente convertida, irreversivelmente, a DHT pela enzima dependente de NADPH, 5 α redutase, ou a estradiol pela aromatase (Marchetti and Barth, 2013).

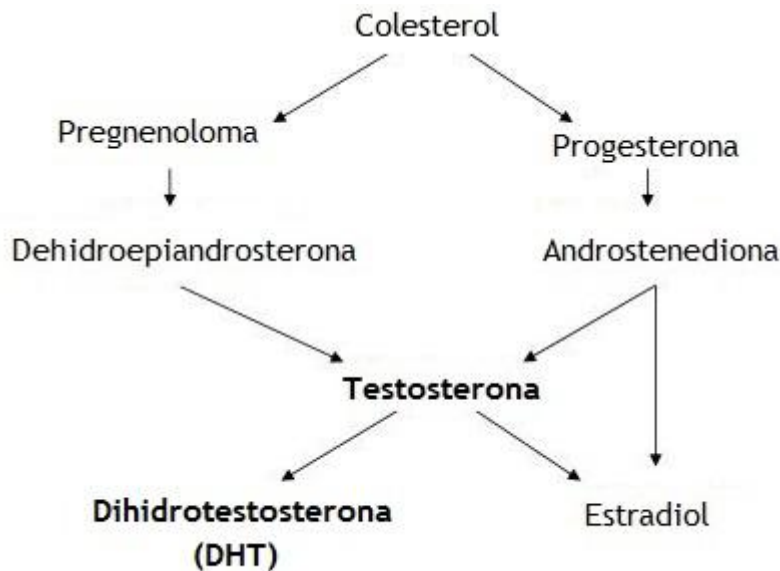


Figura 18 - Diagrama simplificado da síntese de esteroides sexuais. Adaptado de (Michels and Hoppe, 2008).

O DHT foi descrito pela primeira vez em 1930 e durante muito tempo foi considerado um metabolito ineficaz. Passados 30 anos o seu efeito foi descoberto e atualmente, é considerado o androgénio mais potente e com afinidade 5 vezes superior para o recetor de androgénio (AR) do que a testosterona (Uemura et al., 2008; Duskova and Pospisilova, 2011).

Em mamíferos placentários o DHT existe a partir de sexta semana de vida intra-uterina e existe em duas isoformas, tipo I e II. Ambas são expressas de forma diferente em vários tecidos e durante as fases de desenvolvimento (Duskova and Pospisilova, 2011).

A concentração de DHT no soro masculino é normalmente menor do que a concentração de testosterona (Brambilla et al., 2009).

Durante a gravidez, existe um aumento dos níveis de hormonas esteroides (como os androgénios) nas artérias umbilicais, mais do que na veia, o que indica que os androgénios são produzidos principalmente no compartimento fetal (Pasqualini, 2005). Alguns autores sugerem que estas hormonas desempenham um papel primordial na regulação da função destas artérias, tornando-se importante uma vez que níveis de androgénios aumentados no soro materno de androgénios em circulação durante a gravidez podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial ou pré-eclampsia (Saldanha et al., 2013).

Os compartimentos placentários e fetais humanos possuem todo o sistema enzimático necessário para a biossíntese e transformação de todas as hormonas esteroides importantes durante a gestação. Estes sistemas evoluem com o desenvolvimento da gravidez e embora tenham atividades distintas (diferenças na qualidade e quantidade de enzimas nestes compartimentos) são também complementares. O potencial biossintético hormonal fetal aparece precocemente durante a gestação e a taxa de produção de alguns esteroides aumenta drasticamente com a evolução fetal (por exemplo, o estradiol aumenta 500-1000 vezes em relação às mulheres não grávidas). Recetores destas hormonas estão presentes na fase inicial da gestação e são funcionais para atividades fisiológicas importantes (Pasqualini, 2005).

1.7.2. Ação da testosterona

Os androgénios possuem um anel esteroide e tal como todos os esteroides atuam principalmente através de recetores localizados no núcleo da célula. Os AR quando ativados pela testosterona ou DHT mediam os seus efeitos através da modulação da transcrição de genes, por isso mesmo, estes efeitos são denominados de efeitos genómicos ou efeitos a longo prazo, os quais são inibidos por bloqueadores de transcrição e por bloqueadores específicos de AR (Kaushik et al., 2010).

Para além dos efeitos genómicos, os androgénios podem modificar os níveis de segundo mensageiro no interior das células e/ou ligarem-se a complexos de sinalização associados à membrana, estes efeitos são denominados de curto prazo ou efeitos rápidos e não sofrem influência de bloqueadores de AR intracelulares. Estes efeitos têm um início muito mais rápido e são notados em poucos minutos, enquanto os efeitos genómicos são notados depois de um intervalo de algumas horas (Simoncini et al., 2003; Kaushik et al., 2010; Andric et al., 2010).

Mecanismo vasodilatador da testosterona

Existem cada vez mais evidências científicas que sugerem que a testosterona possui um efeito vasodilatador sobre os diversos vasos sanguíneos (Herring et al., 2013) incluindo artérias humanas (Yildiz et al., 2005).

Efeito no endotélio

O envolvimento do endotélio no mecanismo vasorelaxante da testosterona tem sido analisado por diversos autores. Estudos em animais suportam a hipótese que a ação da testosterona no relaxamento vascular pode ter efeitos vasodilatadores dependentes ou independentes do endotélio. Relativamente às ações da testosterona dependentes do endotélio sabe-se que aumentam a expressão ou atividade da sintetase de óxido nítrico endotelial e da produção de óxido nítrico (NO) que por sua vez ativa a GC e induz vasodilatação nas células musculares lisas (Kang, 2013).

Por outro lado, um dos estudos conduzido por Yue et al. (1995) incidiu em examinar artérias coronárias de coelho com e sem endotélio. O NO é um potente vasodilatador sintetizado no endotélio. Ao ser retirada esta camada e ao aplicar um fármaco, este atua diretamente sobre a túnica média (células do músculo liso) da artéria, através de um mecanismo independente do endotélio. Então, expuseram artérias a prostaglandina para contrair a túnica média. Após 7 minutos, as artérias foram lavadas e expostas a testosterona ou a uma solução de controlo. Observaram um aumento do relaxamento. Isto sugere que a testosterona possui um efeito vasorelaxante direto no músculo liso e não requer o endotélio para induzir vasodilatação (Yue et al., 1995; Herring et al., 2013).

Também Deenadayalu et al. (2001) examinaram artérias coronárias de suínos e usaram a prostaglandina como agente contrátil. Novamente foi avaliado o efeito da remoção do endotélio e ainda adicionado um inibidor da produção de NO. Observou-se que um aumento na concentração de testosterona promoveu um aumento na percentagem de relaxamento em comparação com os grupos de controlo, o que comprova o efeito vasodilatador da testosterona. Apesar disto, demonstraram que a remoção do endotélio e o tratamento com o inibidor não teve qualquer influência (Deenadayalu et al., 2001; Herring et al., 2013).

Outro estudo de Jones et al. (2004) com artérias coronárias e aorta torácica de ratos machos tratadas também com prostaglandina afirma que não houve diferença entre a percentagem de relaxamento de vasos com e sem endotélio testados com diferentes concentrações de testosterona (Jones et al., 2004; Herring et al., 2013).

Os estudos atrás mencionados sugerem que a testosterona possui um efeito vasodilatador não apenas dependente do NO mas também independente do endotélio.

Modulação dos canais iónicos

Como atrás foi referido, a testosterona induz vasodilatação em diferentes vasos sanguíneos, sendo este efeito mediado pela ação de diferentes canais iónicos nomeadamente pela inativação de canais de Ca^{2+} e/ou pela abertura de canais de K^+ (Kelly and Jones, 2013).

Ativação de canais de potássio

Diversos estudos apontam para um papel modulador da testosterona sobre a função dos canais de potássio, sendo o primeiro deles de Yue et al. (1995). Neste estudo, artérias coronárias de coelho foram pré-contraídas com prostaglandina e quando submetidas a glibenclamida não houve qualquer alteração, já ao adicionar cloreto de bário ($BaCl_2$) houve uma redução da vasodilatação produzida pela testosterona, também quando pré-contraídas com KCl. Uma vez que a glibenclamida não inibiu o relaxamento provocado pela testosterona, a vasodilatação ocorreu apenas por abertura dos canais K_V e BK_{Ca} (Yue et al., 1995; Jones et al., 2003).

Mais tarde Ding e Stallone (2001) utilizando artérias torácicas de rato pré-contraídas com noradrenalina e submetidas aos inibidores TEA, apamina, glibenclamida e 4-AP, apenas houve diminuição do relaxamento com o 4-AP, sugerindo o envolvimento apenas dos canais K_V

neste processo (Ding and Stallone, 2001). No mesmo ano, em estudos de *Patch-clamp* com células coronárias, Deenadayalu et al. (2001) identificaram os canais BK_{Ca} como responsáveis pelo mecanismo de vasodilatação da testosterona (Deenadayalu et al., 2001).

No que concerne à artéria umbilical humana, foram efetuados estudos com artérias pré-contraídas com KCl, 5-HT e histamina sugerindo que os efeitos vasodilatadores da testosterona são mediados parcialmente pela ativação de canais de potássio do tipo K_V e BK_{Ca} (Cairrao et al., 2008).

Estudos recentes mostram que na HUA os efeitos genómicos dos androgénios promovem alterações nas subunidades dos canais iónicos, nomeadamente na subunidade β_1 dos canais BK_{Ca} e na α_{1c} dos canais de Ca^{2+} tipo L. Estas modificações parecem influenciar a funcionalidade destes canais. Sendo assim, a longo prazo os androgénios induzem relaxamento nesta artéria apenas pela ativação dos canais K_V sendo que os canais BK_{Ca} perdem ou alteram a sua atividade (Saldanha et al., 2013).

Zhou et al. (2008) sugerem que na aorta de rato os efeitos genómicos dos androgénios aumentam a expressão de canais de K_V (Zhou et al., 2008).

Inibição de canais cálcio

Diversos estudos efetuados em vasos isolados apoiam a ideia de que a testosterona atua como antagonista dos canais de Ca^{2+} , inibindo nomeadamente os VOCC. Foi demonstrado que a testosterona inibe estes canais em artérias pulmonares de rato (Jones et al., 2002), artérias coronárias de rato (English et al., 2002) e artérias coronárias suínas (Crews and Khalil, 1999; Yildiz and Seyrek, 2007).

Scragg et al. (2004) em experiências de *Patch-clamp* com linhas celulares A7r5 do músculo liso e em células HEK 293 (células embrionárias de rim) que expressam os canais de Ca^{2+} tipo T e L, mostraram que a testosterona é um inibidor seletivo e eficaz dos canais de Ca^{2+} tipo L, tanto na forma nativa como recombinante, dentro da gama fisiológica. O efeito observado foi rápido pelo que rejeitam a possibilidade de ser um efeito genómico, mas sim por uma ação direta no canal (Scragg et al., 2004). Outro estudo com a linhagem celular A7r5 foi realizado por Hall et al. (2006) em que usaram a técnica de microfluorimetria como meio não invasivo de examinar o efeito da testosterona nesta linha. Tal como o estudo anterior, este corrobora que a testosterona, em concentrações fisiológicas pode suprimir a entrada de Ca^{2+} nas células através da inibição dos canais de Ca^{2+} tipo L (Hall et al., 2006).

Montano et al. (2008) estudaram o efeito vasodilatador da testosterona e da 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) em aorta torácica de rato. Este estudo demonstrou que o relaxamento induzido pelo 5 β -DHT em concentrações na ordem de nM a μ M, se deve ao bloqueio seletivo dos canais de Ca^{2+} tipo L. Já o mecanismo vasodilatador da testosterona difere consoante a concentração em que é utilizada. Em baixas concentrações, na ordem dos nM, a testosterona torna-se um eficiente antagonista dos canais de Ca^{2+} tipo L, mas em concentrações na ordem dos μ M torna-se um agonista dos mesmos. Também provoca um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e produção de AMPc (Montano et al., 2008).

Diversos estudos indicam que os androgénios induzem alterações nos canais de Ca^{2+} . A longo prazo aumentam a expressão de canais de Ca^{2+} em células musculares lisas da artéria coronária de porco (Bowles et al., 2004). Em miócitos ventriculares de rato os efeitos genómicos dos androgénios após aplicação de testosterona são antagonizados pelos efeitos não genómicos (Er et al., 2007). O tratamento com DHT em miócitos ventriculares humano aumenta a corrente de canais de Ca^{2+} tipo L (Er et al., 2009) e o tratamento crónico com testosterona aumenta a corrente de canais de Ca^{2+} tipo T em cardiomiócitos de ratos neonatais (Michels et al., 2006).

Efeitos relacionados com os nucleótidos cíclicos

Deenadayalu et al. (2001) sugerem que o efeito da testosterona pode ser devido ao aumento de GMPc (Deenadayalu et al., 2001). Este aumento ativa a PKG resultando no relaxamento do músculo liso vascular (Francis and Corbin, 1994; Tanaka et al., 1998).

Cairrão et al. (2010) usando a técnica de *Patch-clamp* com HUASMC e banho de órgãos com artéria umbilical humana sem endotélio, testaram diferentes fármacos que interagem com a via do GMPc para analisar o papel deste nucleótido no efeito vasodilatador da testosterona. Este estudo comprova que a testosterona ativa a PKG e estimula os canais BK_{Ca} e K_v . Uma vez que o ANP, ativador da pGC estimula os mesmos canais por ativação da PKG, os dados obtidos sugerem que a testosterona tem o mesmo mecanismo de ação do ANP ou age por meio de duas vias interligadas, ao contrário do efeito produzido pelo outro agente vasorelaxante testado, o SNP, que possuem vias diferentes (Cairrao et al., 2010).

Feiteiro et al. (2014) confirmaram recentemente a teoria acima descrita, sendo assim, ficou provado que a testosterona assim como o ANP ativam a pGC e induzem vasodilatação na artéria umbilical humana (Feiteiro et al., 2014) através de um mecanismo que envolve a PKG e o GMPc (Feiteiro, 2013).

Há alguns anos, foi sugerida a existência de compartimentos intracelulares distintos de nucleótidos cíclicos (Houslay and Milligan, 1997) e neste processo estariam envolvidas diversas proteínas como a CG (Piggott et al., 2006) e algumas isoformas de fosfodiesterases (Castro et al., 2006).

O processo de compartimentação do GMPc é menos estudado que o do AMPc, ainda assim, diversos trabalhos de investigação indicam que sGC e a pGC podem formar *pools* distintos de GMPc por diversos mecanismos. (Arora et al., 2013)

Castro et al. (2006) analisou a compartimentação de GMPc e o papel das PDEs em cardiomiócitos de rato e demonstrou que existe um *pool* de GMPc produzido pela pGC junto à membrana e outro produzido pela sGC no interior da célula. Também demonstrou que a regulação do GMPc compartimentado junto à membrana é da responsabilidade da PDE2 e do GMPc do interior da célula é regulado pela PDE5. Esta distribuição de GMPc pode contribuir para os efeitos específicos de péptidos natriuréticos e dadores de NO sobre a função cardíaca. (Castro et al., 2006)

Outro mecanismo de compartimentação é demonstrado pela associação da PKG com o NPRA em células HEK293 de mamíferos por Airhart et al. (2003). A ativação do recetor pelo ANP e não pelo NO induziu a translocação da PKG do citosol para a membrana plasmática (Airhart et al., 2003).

Moltzau et al. (2014) ao estudar como as PDEs regulam o aumento de GMPc induzido pelo CNP em cardiomiócitos ventriculares de rato com insuficiência cardíaca, demonstraram que os níveis de GMPc são regulados principalmente pela PDE2 após estimulação do CNP, enquanto que as respostas funcionais são modestamente reguladas pela PDE2 e PDE3. Isto indica que a compartimentação de GMPc pelas PDEs afeta as respostas induzidas pelo CNP em insuficiência cardíaca (Moltzau et al., 2014).

Recentemente, Feiteiro (2013) analisou os níveis de nucleótidos cíclicos em HUASMC infetadas com o WT CNGA2 (Ad-CNGA2). Estas células possuem canais de CNG funcionais que abrem com o aumento de GMPc. Através da técnica de *Patch-clamp* estudou o efeito da ativação da GC solúvel e membranas pelos agentes vasodilatadores SNP e ANP e de inibidores de PDEs específicos na corrente de CNG. Demonstrou pela primeira vez que o GMPc é produzido em compartimentos distintos. Pode ocorrer junto à membrana plasmática por estimulação do ANP e regulado pela PDE3 e PDE5 ou no interior das células pelo SNP regulado apenas pela PDE3 (Feiteiro, 2013).

Diversos estudos indicam que o efeito da testosterona induz uma alteração na expressão de algumas proteínas relacionadas com sinalização por GMPc como a sGC, o NPRA e a PKG. Esteves (2013) demonstrou que os efeitos genómicos dos androgénios alteram a expressão destas proteínas em HUASMC. Evidenciou que a incubação com 5 α -DHT provoca uma diminuição da expressão da sGC e da PKG e um aumento da expressão do NPRA (Esteves, 2013).

Também Liu et al. (2013) verificaram que em próstatas de rato tratadas com testosterona ocorre uma inibição da expressão de sGC- α 1 (Liu et al., 2013). Cai et al. (2006) demonstraram que em linhas celulares cancerígenas da próstata humana (LNCaP cells) o DHT induz o aumento da expressão de mRNA da sGC- α 1 e estimula a síntese de GMPc, sendo que o aumento é proporcional ao estágio do cancro da próstata (Cai et al., 2007). Oka et al. (2007) reportaram que a DEAH aumenta a expressão da sGC em artérias pulmonares de rato com hipertensão pulmonar (Oka et al., 2007)

1.7.3. Papel da testosterona a nível cardiovascular

Os androgénios podem apresentar efeitos benéficos a nível cardiovascular e vários estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos com doenças cardiovasculares possuem baixos níveis desta hormona (Cairrao et al., 2008).

Os níveis de testosterona em circulação também diminuem com o avançar da idade e variam consoante o género. Diversos estudos sugerem que baixos níveis de testosterona endógena estão associados ao aumento da mortalidade. Em relação aos seus metabolitos, DHT

e estradiol, a sua relação com o risco de doença cardiovascular não está totalmente esclarecido. Num quadro de isquemia do miocárdio induzida pelo exercício em homens com doença arterial coronária, a terapia com testosterona exógena tem demonstrado efeitos benéficos a nível da função vascular. No entanto, foram relatados efeitos adversos em alguns indivíduos pelo que é necessário realizar mais estudos sobre esta temática (Yeap, 2013) .

Para além disto, baixos níveis de testosterona estão associados a fatores de risco para diabetes mellitus e obesidade. Atualmente, não está inteiramente comprovado que os baixos níveis de testosterona são a causa da doença cardiovascular ou consequência da mesma.

Face a este contexto, recomenda-se precaução na interpretação dos resultados uma vez que muitos estudos efetuados abrangem uma amostra populacional reduzida (Oskui et al., 2013). É necessário continuar a estudar este fenómeno visando fundamentar e sustentar a associação entre a incidência de doenças cardiovasculares e os níveis de testosterona endógena biodisponível assim como estabelecer o uso de terapia de substituição hormonal com androgénios em diversas patologias.

Capítulo II - Objetivos

As doenças cardiovasculares são hoje consideradas umas das principais causas de morbidade e mortalidade na espécie humana. O papel dos androgénios no envolvimento destas doenças tem vindo a ser estudado e tudo aponta para que tenham efeito protetor sobre o sistema cardiovascular. Diversos estudos indicam que a testosterona possui um efeito vasodilatador sobre os diversos vasos sanguíneos, incluindo a artéria umbilical humana. Este efeito é mediado pela ativação da PKG que posteriormente ativa os canais BK_{Ca} e K_v . Estudos recentes demonstram que os efeitos genómicos dos androgénios promovem alterações nas subunidades dos canais iónicos, nomeadamente na subunidade β_1 dos canais BK_{Ca} e na subunidade α_{1c} dos canais de Ca^{2+} tipo L. Estas modificações parecem influenciar a funcionalidade dos canais atrás referidos.

O objetivo geral deste trabalho é analisar os efeitos genómicos dos androgénios nas células musculares lisas de artérias umbilicais humanas a nível da atividade dos canais de potássio. Para a prossecução deste objetivo foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar o efeito genómico dos androgénios nos canais de potássio em HUASMC
- Análisar o efeito genómico dos androgénios na função contrátil das HUASMC.

Capítulo III - Materiais e Métodos

3.1. Soluções e Materiais

3.1.1. Soluções

Nas seguintes tabelas estão representadas as soluções utilizadas durante a realização deste trabalho.

Tabela 2 - Soluções utilizadas na realização do estudo.

Soluções	Composição
Solução antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000U), estreptomicina (10mg) e anfotericina (25µg)
Solução de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> /F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 Liofilizado, NaHCO ₃ (14mM) e ácido L-ascórbico (81,8µM) pH=7,4
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS-5%); albumina de soro bovino (BSA - 0,5%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5µg/mL); fator de crescimento fibroblástico (FGF, 0,5ng/mL); heparina (2µg/mL); insulina (5µg/mL) pH=7,4
Solução <i>phosphate buffered saline</i> - PBS (solução fosfato-salino)	NaCl (137mM); KCl (2,7mM); NaH ₂ PO ₄ (10mM); KH ₂ PO ₄ (2mM) pH=7,4
Solução de Tripsina-EDTA	0,5g de tripsina de porco e 0,2g de EDTA
Meio de Cultura sem soro	DMEM-F12, BSA (0,5%) pH=7,4
Meio 20%	DMEM-F12; BSA (0,5%); FBS (20%) pH=7,4
PSS concentrado (10x)	EDTA (0,5mM), KCl (5mM), HEPES (10mM), MgCl ₂ (2mM), NaHCO ₃ (10mM), KH ₂ PO ₄ (0,5mM), NaH ₂ PO ₄ (0,5mM) e glicose (10mM) pH=7,4
PSS diluído	PSS concentrado, NaCl (110mM) e CaCl ₂ (0,16mM) pH=7,4

Tabela 3 - Composição da solução interna (MIM K7) utilizada no *Patch-clamp* (adequada para medir correntes de K⁺).

Reagente	Concentração (mM)
HEPES	10
EGTA	0,1
CaCl ₂	0,06
MgCl ₂ .6H ₂ O	4
KCl	129
Glicose	10
pH (CsOH) = 7,3	

Tabela 4 - Composição da solução externa (RCS K_v1) utilizada no *Patch-clamp* (adequada para medir correntes de K⁺) e no PCSA como solução de lavagem.

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	134,3
HEPES	5
KCl	5,4
Glicose	6
CaCl ₂	1
pH(NaOH) = 7,4	

3.1.2. Fármacos e químicos

Todos os fármacos e produtos químicos utilizados foram adquiridos na Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal), exceto 4-aminopiridina (4-AP), KT5823 (KTg) e iberiotoxina da farmacêutica Tocris, e o tetraetilamónio (TEA) da farmacêutica Merck. O DHT, o KTg e o KT5720 (KTa) foram inicialmente dissolvidos em etanol com concentração final não superior a 0,1%. A histamina, serotonina (5-HT), nitropussiato de sódio (SNP), péptido natriurético auricular (ANP), glibenclamida, 4-AP, iberiotoxina, apamina e TEA foram dissolvidos em água destilada. As soluções finais foram obtidas por diluição em meio externo (RCS K_v1).

3.1.3. Material

Na seguinte tabela estão descritos alguns materiais e equipamentos utilizados durante este trabalho.

Tabela 5 - Descrição do material/equipamento e as respetivas marcas, usados neste trabalho.

Material	Marca
Balança digital	Sartorius
Medidor de pH	Metrohm
Material cirúrgico específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless;
Frasco de cultura (T25) e multiwells (6 wells)	Orange scientific
Sistema de incubação	Pecon
Caixas de <i>Petri</i> (35x10mm)	Sarstedt
Eléttodos do <i>Patch-Clamp</i>	Reagente 5, Portugal
Amplificador Axopatch 200B	Axon Instruments, EUA
Conversor analógico-digital de interface de Digidata 1322A	Axon Instruments, EUA
Computador compatível com o <i>software</i> de Pclamp8	Axon Instruments, EUA
Microscópio de Fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
<i>Software</i> Específico do microscópio de fluorescência	Axio Vision program 4,8

3.2. Métodos

3.2.1. Amostra

Neste trabalho, foram utilizados pedaços de cordão umbilical de 3-7cm obtidos de gestações normais (gravidez de termo), após parto vaginal e com o consentimento das mães doadoras. Todos os procedimentos realizados com os cordões foram aprovados pela comissão de ética do Centro Hospitalar Cova da Beira.

As amostras de cordão umbilical foram colocadas numa solução salina fisiológica estéril - PSS. Para evitar contaminações ou degradação de tecidos adicionou-se à solução anterior: penicilina (5U/mL), estreptomina (5µg/mL), anfotericina B (12,5ng/mL) e anti-proteases (leupeptina 0,45mg/L, benzamidina 26mg/L e inibidor de tripsina 10mg/L). As amostras de cordão foram mantidas nesta solução a -4°C durante 4-24h.

A amostra utilizada neste estudo foi de 38 cordões umbilicais.

3.2.2. Isolamento e cultura de HUASMC

Para a realização deste trabalho experimental foi seguido o protocolo de isolamento e cultura de HUASMC desenvolvido por Cairrão et al. (2009) e Martin de Llano et al. (2007).

Todos os procedimentos realizados até à obtenção das camadas foram efetuados sobre gelo em placas de *Petri* contendo solução de PSS em condições estéreis, no interior de uma câmara de fluxo laminar e com todo o material previamente esterilizado.

O cordão foi colocado numa placa de *Petri* com PSS e SAA. Inicialmente foi removida a Geleia de *Wharton* com o auxílio de uma tesoura e pinças cirúrgicas. Após as artérias estarem isoladas, foram seccionadas em pedaços retangulares e de seguida longitudinalmente. A túnica íntima (endotélio) foi removida mecanicamente através de fricção suave com um cotonete e colocaram-se os pedaços de artérias numa nova placa com PSS e SAA.

Para a cultura celular foi utilizada a técnica de explantes. Foram extraídas camadas de músculo liso vascular da parte interna da túnica média com o auxílio de pinças cirúrgicas.

Os explantes foram lavados em PSS com agitação mecânica, repetindo o procedimento 4 vezes. Posteriormente foram dispostos em frascos de cultura (T25) previamente revestidos com colagénio ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e colocados na incubadora a 37°C numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO_2 . Após 10 minutos adicionou-se 3mL de meio completo e colocou-se novamente na incubadora. Passadas 24 horas foram adicionados mais 2mL do mesmo meio.

O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias e obtiveram-se culturas confluentes cerca de 1 mês depois. Foram realizadas subculturas destas células através de sucessivas tripsinizações até à sexta passagem. Depois de algumas passagens, as células foram transferidas para placas *multiwells* e quando atingiram novamente o estado confluyente, os pocetos foram colocados em meio sem soro 24 horas antes de serem utilizados nas técnicas propostas. Esta incubação permitiu que as células estivessem no estado sintético.

O procedimento para obtenção de SMC descrito é rápido e permite a criopreservação de alíquotas de HUASMC que podem ser posteriormente descongeladas e expandidas verificando-se um normal crescimento celular. Como resultado final consegue-se obter células com expressão de proteínas contráteis e com canais iónicos funcionais.

Tratamento com 5α -DHT

Para alguns ensaios foi necessário uma pré-incubação com DHT. Para isso foram colocados pocetos com culturas confluentes em meio sem soro durante 24 horas. Após este tempo foi colocado DHT (10nM) de um *stock* dissolvido em etanol e incubou-se durante outras 24 horas.

3.2.3. Patch-clamp na configuração “whole-cell”

Princípios teóricos

A técnica de *Patch-clamp* é uma técnica de eletrofisiologia importante na investigação de canais iônicos. Para além de demonstrar a existência de canais pode também fornecer informações importantes sobre as suas propriedades eletrofisiológicas, estruturas moleculares e mecanismos de ação de fármacos (Ai and Zheng, 2005).

Esta técnica consiste em pressionar uma pipeta de vidro que faz ligação com um eléctrodo contra a superfície da célula de modo a formar um selo de elevada resistência (giga-Ohm) entre uma porção da membrana celular (*patch*) e a pipeta. A corrente que flui através da membrana é idêntica à corrente que flui através dos canais de iões da célula e pode ser medida diretamente através do controlo da voltagem aplicada à membrana (Yajuan et al., 2012).

Existem diversas configurações de *Patch-clamp* e dependendo da configuração utilizada é possível medir as correntes de uma célula inteira ou de canais individuais (Bebarova, 2012).

Todas as configurações partem da configuração *cell-attached* caracterizada pela formação do selo *giga-Ohm*. No *Patch-clamp* na configuração “*whole-cell*” podem ser adicionados antibióticos à solução interna da pipeta como a nistatina ou anfotericina B que perfuram a membrana celular, denominando-se perfurado. A formação de poros na membrana proporciona uma continuidade elétrica entre a solução da pipeta e o interior da célula (Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2004). Esta técnica é útil quando se estuda a atividade de todos os canais iônicos de uma célula (Kornreich, 2007).

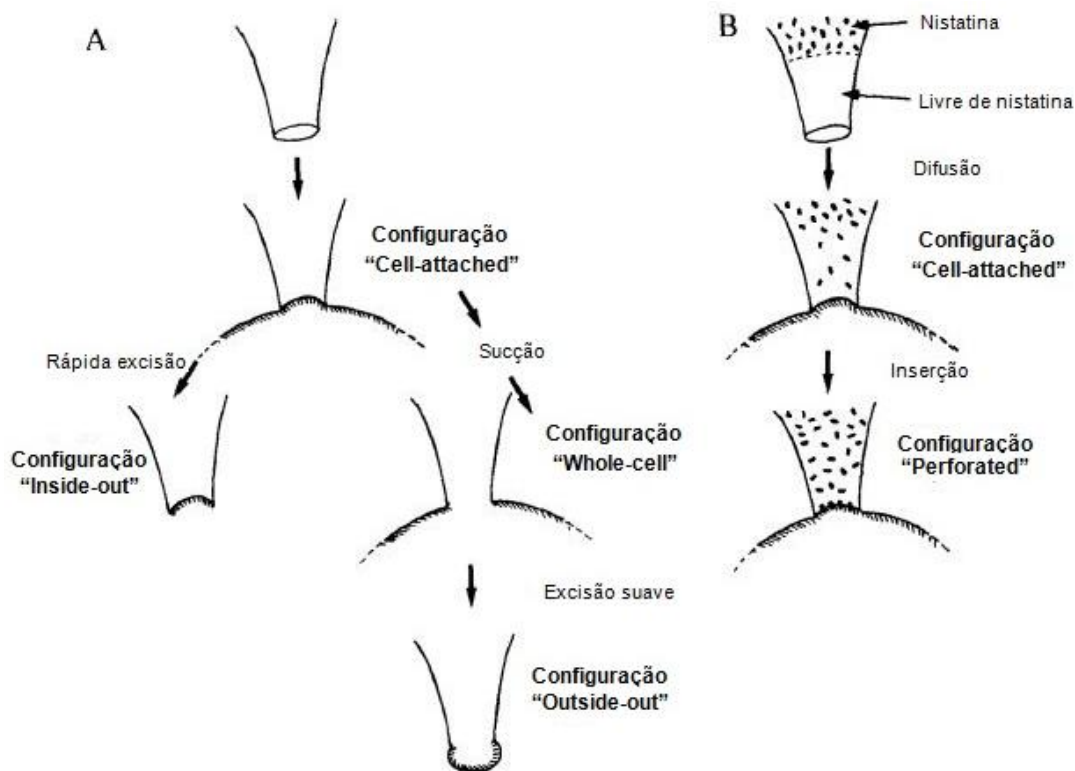


Figura 19 - Diferentes configurações do *Patch-clamp*. Adaptado de (Leech and Holz, 1994).

Medição da corrente de potássio

Para analisar a corrente de potássio (I_K) em HUASMC foi utilizada a técnica de *Patch-clamp* na configuração "whole-cell" com anfotericina B. As células foram mantidas a um potencial de repouso de -80mV e despolarizadas a cada 8 segundos a 60mV durante 350ms. As correntes não foram compensadas por capacitância e correntes de fuga. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (21-25°C) não variando mais que 1°C.

Através de um amplificador de voltagem Axopatch 200B de *Patch-clamp* (Axon instruments, USA) criou-se um potencial para as células. As correntes foram medidas a uma frequência de 10kHz e filtradas a 0,05kHz através da interface analógica-digital Digidata 1322A (Axon instruments, USA) ligada a um computador compatível com o *software* Pclamp8 (Axon instruments, USA). Os elétrodos do *patch* (2-4MΩ) foram feitos a partir de capilares de vidro borossilicato (GC150T-15 no aparelho de Harvard, UK). Para a experiência foram preenchidos com solução interna MIM K7 e anfotericina B.

Para analisar a presença dos diferentes canais de K^+ na I_K foram usados inibidores destes, nomeadamente, 4-AP (1mM) inibidor de canais K_v , TEA (100μM) inibidor de canais BK_{Ca} , iberiotoxina (0,1μM) inibidor seletivo de canais BK_{Ca} , apamina (10μM) inibidor de canais SK_{Ca} e glibenclamida (1μM) inibidor de canais K_{ATP} .

O efeito estimulador ou inibidor da I_K provocado pelos fármacos foi traduzido percentualmente em aumento ou diminuição da I_K basal.

Todos os procedimentos anteriormente referidos foram realizados de forma idêntica em células pré-incubadas com DHT, para posterior comparação.

3.2.4. Planar Cell Surface Area

Com o intuito de analisar a contratilidade em HUASMC foi utilizada a técnica *Planar Cell Surface Area* (PCSA). As células foram tripsinizadas e colocadas em caixas de *Petri* (que possuem na base um vidro específico para a técnica) revestidas com colagénio. Colocaram-se novamente na incubadora a 37° C numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂, durante 2 horas. Após este período de incubação, o meio foi removido e fizeram-se duas lavagens com a solução de RCS K_v1.

Levaram-se as células para o ensaio microscópico na mesma solução e foram analisadas através do microscópio invertido de fluorescência da marca *Zeiss Axio Observer Z1*. Este é um microscópio totalmente monitorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade (*Axio Cam Hsm*) e possui um sistema de incubação incorporado, que permite o controlo da temperatura, determinante para a manutenção e viabilidade das células.

Após a primeira observação das células, tirou-se uma fotografia que serviu de controlo. Foi adicionado o agente contrátil (serotonina - 0,1µM ou histamina - 10µM) e passados 20 minutos tirou-se uma nova fotografia. De seguida adicionou-se o agente vasodilatador (SNP - 100µM e ANP - 0,1µM), esperou-se novamente 20 minutos e tirou-se outra fotografia.

Para analisar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos foi adicionado o KTg e o KTa a seguir a esta pré-contracção/relaxamento e passados 20 minutos tirou-se a última fotografia.

A análise e o tratamento das imagens realizou-se com o 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.

Foram realizados procedimentos análogos em células pré-incubadas com DHT, para posterior comparação.

3.2.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos em função da média ± S.E.M. de n experiências. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *SigmaStat Statistical Analysis System*, versão 3.5 (2007). A significância estatística entre dois grupos de dados foi analisada utilizando o teste t-Student e Mann-Whitney (teste não paramétrico). A comparação entre mais de dois grupos de dados foi analisada segundo o método One-way ANOVA seguido do teste Dunnet's post hoc e teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre as médias. Os níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos (P <0,05).

Capítulo IV - Resultados

4.1. Efeito dos androgénios na corrente de potássio

Inicialmente, foi utilizada a técnica de *Patch-clamp* na configuração “*whole-cell*” usando anfotericina B para perfurar a membrana com o objetivo de identificar os diferentes canais de K^+ presentes nas células HUASMC. Este estudo foi realizado com células normais e posteriormente comparado com células incubadas com DHT a fim de analisar o efeito genómico dos androgénios sobre estes canais.

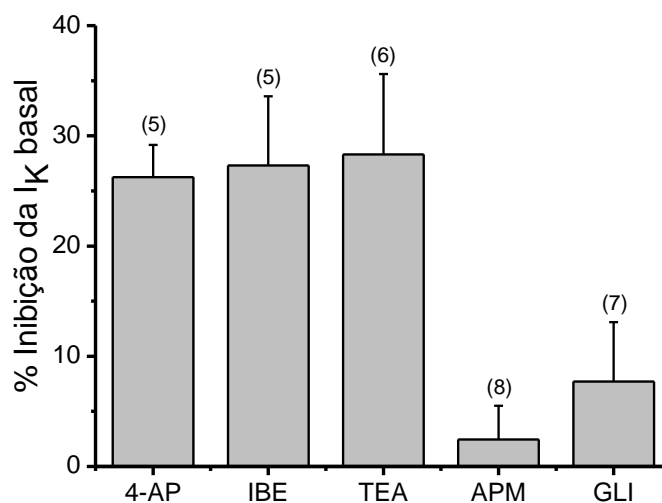


Figura 20 - Efeitos dos inibidores 4-aminopiridina (4-AP; 1mM), apamina (APM; 10 μ M), glibenclamida (GLI; 1 μ M), iberioxina (IBE; 0,1 μ M) e tetraetilamônio (TEA; 0,1mM) sobre a corrente basal de K^+ em HUASMC não incubadas. Utilizou-se a técnica de *Patch-clamp* “*whole-cell*” com anfotericina B. Os dados foram expressos em percentagem de inibição da corrente basal de K^+ . As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras.

Em relação à Fig. 20, verificou-se a inibição da corrente basal de K^+ quando aplicados os inibidores 4-AP, iberiotoxina e TEA. A apamina e a glibenclamida não inibiram a corrente de potássio. A iberiotoxina e a TEA são inibidores dos canais BK_{Ca} e o 4-AP é um inibidor dos canais K_V , assim podemos observar que a corrente de potássio nestas células é devida a ativação dos canais BK_{Ca} e K_V . A apamina é um inibidor dos canais SK_{Ca} e a glibenclamida é um inibidor dos canais K_{ATP} , uma vez que a inibição da corrente foi fraca, estes canais não parecem ser relevantes nas HUASMC.

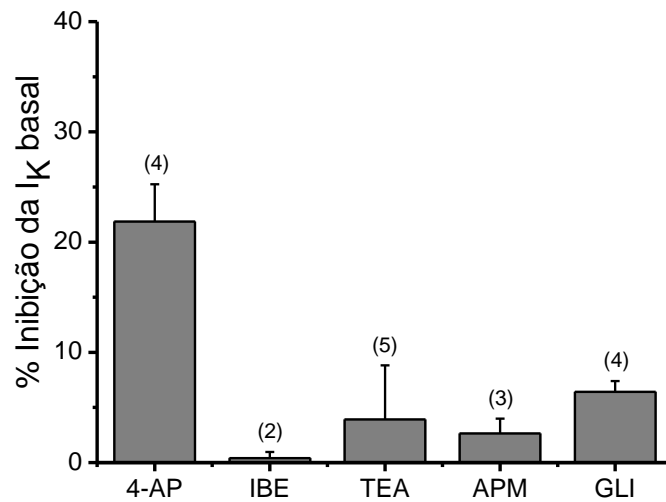


Figura 21 - Efeitos dos inibidores 4-aminopiridina (4-AP; 1mM), apamina (APM; 10 μ M), glibenclamida (GLI; 1 μ M), iberiotoxina (IBE; 0,1 μ M) e tetraetilamônio (TEA; 0,1mM) sobre a corrente basal de K^+ em HUASMC incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM, 24h). Utilizou-se a técnica de *Patch-clamp* “whole-cell” com anfotericina B. Os dados foram expressos em percentagem de inibição da corrente basal de K^+ . As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras.

Relativamente ao efeito dos inibidores de canais de K^+ sobre a corrente basal de K^+ em HUASMC incubadas com DHT (Fig. 21), observou-se que quando as células foram submetidas a uma incubação com DHT (10nM, 24h) houve inibição da corrente basal de K^+ apenas com o inibidor 4-AP. Os inibidores iberiotoxina, TEA, glibenclamida e apamina não inibiram a corrente basal de K^+ .

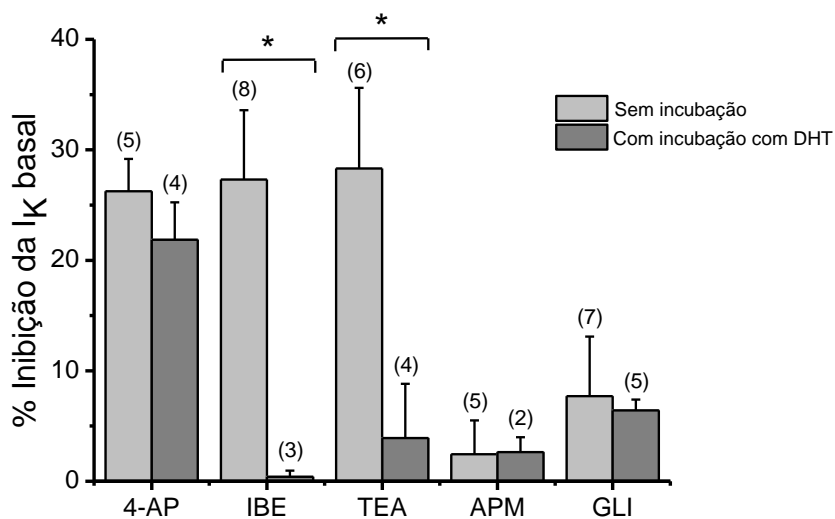


Figura 22 - Efeitos dos inibidores 4-aminopiridina (4-AP; 1mM), apamina (APM; 10 μ M), glibenclamida (GLI; 1 μ M), iberiotoxina (IBE; 0,1 μ M) e tetraetilamônio (TEA; 0,1mM) sobre a corrente basal de K⁺ em HUASMC incubadas e não incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM, 24h). Utilizou-se a técnica de *Patch-clamp* "whole-cell" com anfotericina B. Os dados foram expressos em percentagem de inibição da corrente basal de K⁺. As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras. *P<0,05 efeito em células não tratadas versus o efeito em células tratadas com DHT. A análise estatística foi realizada segundo o teste t-student.

Quando comparamos os resultados de células não incubadas com os de células incubadas com DHT (Fig. 22) verifica-se que houve diferenças significativas quando utilizado o inibidor iberiotoxina e a TEA. Na ausência de DHT as correntes presentes estão relacionadas com os canais K_v e BK_{Ca}. Na presença de DHT, as correntes de potássio são unicamente dependentes dos canais K_v.

4.2. Efeitos dos androgénios na contratilidade celular

Relativamente aos estudos de contratilidade celular realizados através da técnica de PCSA, foram utilizados agentes contráteis (5-HT e HIS) e também vasodilatores (ANP E SNP). Foi igualmente testado o efeito dos inibidores de proteínas cinase, nomeadamente a KTa (inibidor da PKA) e a KTg (inibidor da PKG) a fim de verificar se o envolvimento da PKG e PKA seria diferente em efeitos genómicos e não genómicos.

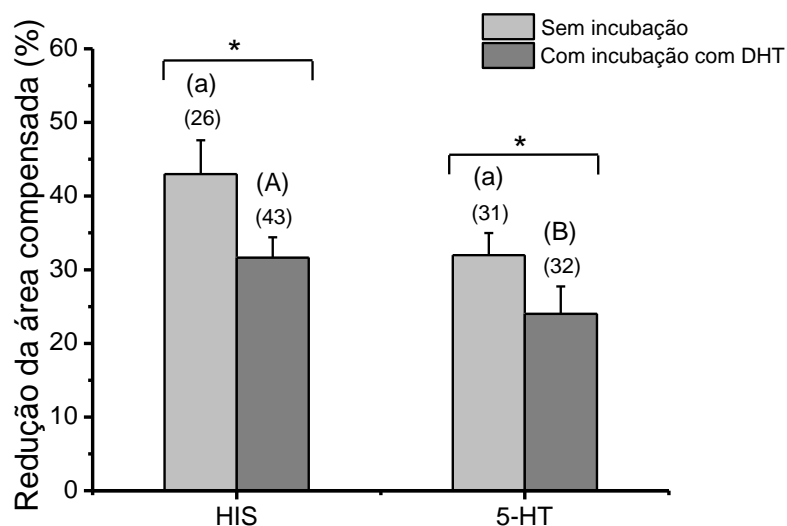


Figura 23 - Contrações induzidas pela serotonina (5-HT; $0,1\mu\text{M}$) e histamina (HIS; $10\mu\text{M}$) em HUASMC incubadas e não incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM , 24h). Utilizou-se a técnica de PCSA. Os dados foram expressos em percentagem de redução da área compensada. As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras. * $P < 0,05$ efeito em células não tratadas versus efeito em células tratadas com DHT (teste t-student). Letras diferentes correspondem a significâncias diferentes. Letras minúsculas - efeito em células não incubadas e letras maiúsculas - efeito em células incubadas com DHT (teste t-student e Mann-Whitney).

Ao analisar o efeito dos agentes contráteis, HIS e 5-HT, na ausência e presença de DHT (Fig. 23), verifica-se que a contração induzida por eles é significativamente menor em células incubadas com DHT.

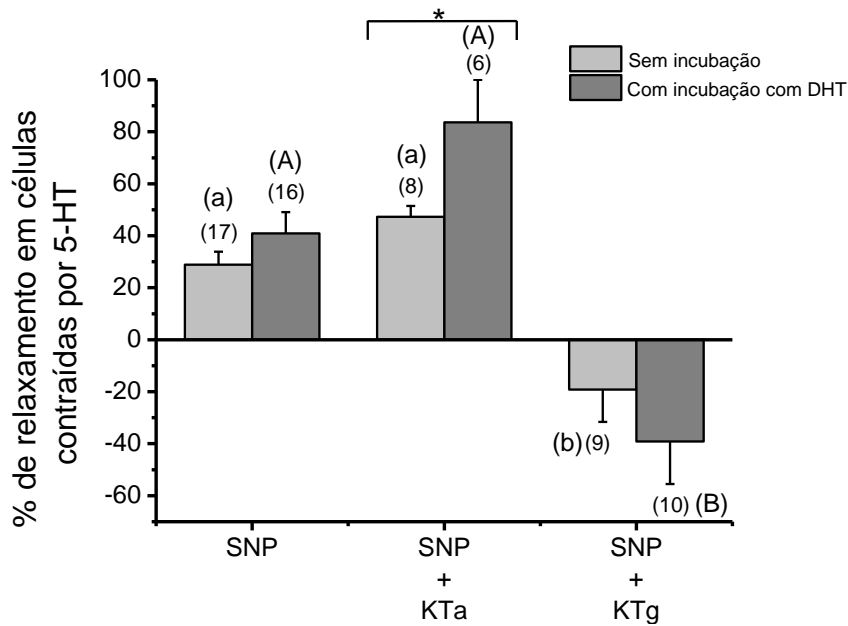


Figura 24 - Efeito do nitropussiato de sódio (SNP; 100 μ M), do KT5720 (KTa; 1 μ M) e do KT5823 (KTg; 0,3 μ M) sobre contrações induzidas por serotonina (5-HT; 0,1 μ M) em HUASMC incubadas e não incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM, 24h). Utilizou-se a técnica de PCSA. Os dados foram expressos em percentagem de relaxamento. As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras. * $P < 0,05$ efeito em células não tratadas versus efeito em células tratadas com DHT (teste t-student e Mann-Whitney). Letras diferentes correspondem a significâncias diferentes. Letras minúsculas - efeito em células não incubadas e letras maiúsculas - efeito em células incubadas com DHT (One way ANOVA e teste de Tukey).

Ao analisar o efeito de KTg e KTa sobre o efeito vasorelaxante do SNP (Fig.24), podemos observar que em células não submetidas a DHT a adição de KTg anula o relaxamento induzido pelo SNP, enquanto que a adição de KTa não induz alteração no relaxamento induzido pelo SNP. Em células incubadas com DHT verifica-se que o resultado é semelhante, o KTg provoca uma anulação do relaxamento e o KTa não afeta o efeito do SNP. Ao comparar o efeito genómico dos androgénios em células incubadas com DHT ou sem incubação, observa-se que o KTa aumentou o efeito do SNP.

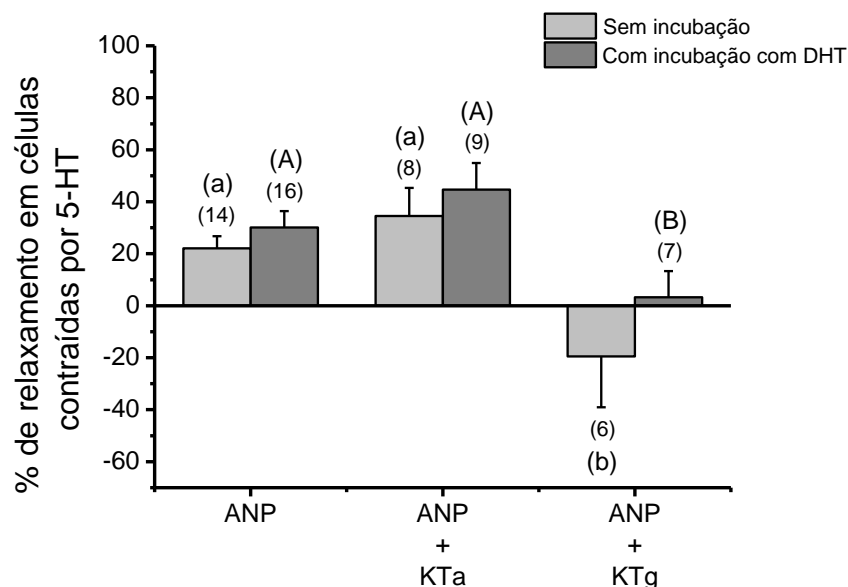


Figura 25 - Efeito do péptido natriurético auricular (ANP; 0,1 μ M), KT5720 (KTa; 1 μ M) e do KT5823 (KTg; 0,3 μ M) sobre contrações induzidas por serotonina (5-HT; 0,1 μ M) em HUASMC incubadas e não incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM, 24h). Utilizou-se a técnica de PCSA. Os dados foram expressos em percentagem de relaxamento. As barras representam as médias e as linhas o padrão do número de experiências indicadas perto das barras. A análise estatística do efeito em células não tratadas versus efeito em células tratadas com DHT foi realizada segundo o teste t-student. Letras diferentes correspondem a significâncias diferentes. Letras minúsculas - efeito em células não incubadas e letras maiúsculas - efeito em células incubadas com DHT (One way ANOVA e teste de Tukey).

Relativamente à Fig.25, podemos observar que em células não incubadas com DHT a adição de KTg promove uma anulação do relaxamento induzido pelo ANP, enquanto que a adição de KTa não induz alteração no relaxamento induzido pelo ANP. Em células incubadas com DHT verifica-se que o resultado é semelhante, o KTg provoca uma anulação do relaxamento e o KTa não afeta o efeito do ANP. Ao comparar células incubadas com DHT ou não incubadas, não ocorreram alterações.

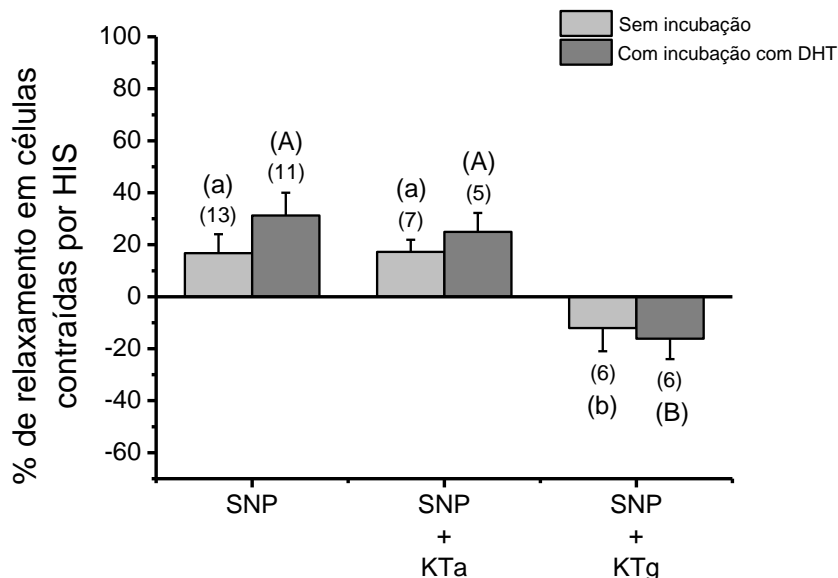


Figura 26 - Efeito do nitropussiato de sódio (SNP; 100 μ M), do KT5720 (KTa; 1 μ M) e do KT5823 (KTg; 0,3 μ M) sobre contrações induzidas por histamina (HIS; 10 μ M) em HUASMC incubadas e não incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM, 24h). Utilizou-se a técnica de PCSA. Os dados foram expressos em percentagem de relaxamento. As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras. A análise estatística do efeito em células não tratadas versus efeito em células tratadas com DHT foi realizada segundo o teste t-student. Letras diferentes correspondem a significâncias diferentes. Letras minúsculas - efeito em células não incubadas e letras maiúsculas - efeito em células incubadas com DHT (One way ANOVA, Dunn's Method e teste de Tukey).

Ao analisar o efeito da KTg e KTa sobre o relaxamento induzido pelo SNP (Fig.26), podemos observar que em células não submetidas a DHT a adição de KTg promove uma anulação do relaxamento induzido pelo SNP enquanto que a adição de KTa não induz alteração no relaxamento induzido pelo SNP. Em células incubadas com DHT verifica-se que o resultado é semelhante, o KTg provoca uma anulação do relaxamento e o KTa não afeta o efeito do SNP. Ao comparar células incubadas com DHT ou não incubadas, não ocorreram alterações.

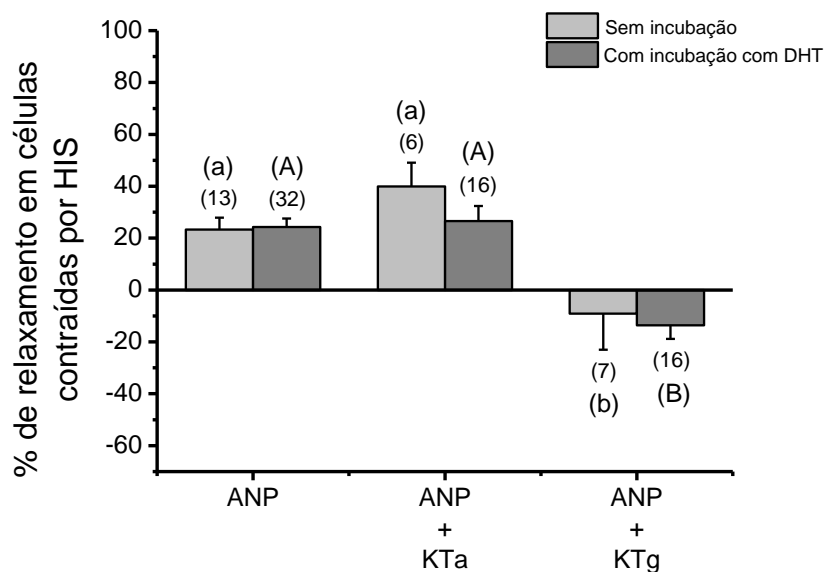


Figura 27 - Efeito do péptido natriurético auricular (ANP; 0,1 μ M), do KTa (KT5720) e KTg (KT5823) sobre contrações induzidas por histamina (HIS; 10 μ M) em HUASMC incubadas e não incubadas com dihidrotestosterona (DHT; 10nM, 24h). Utilizou-se a técnica de PCSA. Os dados foram expressos em percentagem de relaxamento. As barras representam as médias e as linhas o erro padrão do número de experiências indicadas perto das barras. A análise estatística do efeito em células não tratadas versus efeito em células tratadas com DHT foi realizada segundo o teste t-student. Letras diferentes correspondem a significâncias diferentes. Letras minúsculas - efeito em células não incubadas e letras maiúsculas - efeito em células incubadas com DHT (One way ANOVA e teste de Tukey).

No que diz respeito à Fig.27, podemos observar que em células não tratadas a adição de KTg promove uma anulação do relaxamento induzido pelo ANP enquanto que a adição de KTa não induz alteração no relaxamento induzido pelo ANP. Em células incubadas com DHT verifica-se que o resultado é semelhante, o KTg provoca uma anulação do relaxamento e o KTa não afeta o efeito do ANP. Ao comparar células incubadas ou não com DHT, não ocorreram alterações.

Capítulo V - Discussão

5.1. Efeito dos androgénios na corrente de potássio

A testosterona possui um efeito vasodilatador sobre diferentes vasos sanguíneos (Herring et al., 2013) nomeadamente em artérias prostáticas de porco (Navarro-Dorado et al., 2008), artéria mamária interna humana (Yildiz et al., 2005) e na artéria umbilical humana (Perusquia et al., 2007).

Diversos estudos demonstram que os androgénios exercem efeito vasodilatador por modulação de canais iónicos nomeadamente pela inativação de canais de Ca^{2+} (Michels and Hoppe, 2008) e/ou pela abertura de canais de K^+ (Chou et al., 1996; Deenadayalu et al., 2001; Seyrek et al., 2007; Han et al., 2008). Na artéria umbilical humana este mecanismo é mediado pela ativação da guanilato ciclase membranar que provoca um aumento de GMPc e ativa a PKG. Posteriormente, estimula os canais BK_{Ca} e K_V (Cairrao et al., 2008; Cairrao et al., 2010; Feiteiro et al., 2014).

Neste trabalho analisou-se a corrente de K^+ em células não incubadas com DHT e observou-se uma inibição da corrente basal de K^+ pela iberiotoxina, a TEA e o 4-AP, pelo que podemos afirmar que os canais presentes nas HUASMC são os canais BK_{Ca} e K_V . A glibenclamida e apamina não inibiram a corrente basal de K^+ pelo que os canais K_{ATP} e os canais SK_{Ca} não estão presentes nestas células. Verificou-se também que o efeito destes fármacos sobre a célula é reversível após lavagem dos mesmos.

Estes resultados estão de acordo com o esperado e demonstrado por Cairrao et al. (2010). Neste estudo, através da técnica de *Patch-clamp*, analisaram o efeito dos inibidores glibenclamida, TEA, iberiotoxina, 4-AP e apamina em HUASMC e demonstraram a participação apenas dos canais BK_{Ca} e K_V na corrente destas células (Cairrao et al., 2010). Assim, ficou provado que a corrente de K^+ observada em HUASMC é devida aos canais BK_{Ca} e K_V .

Os androgénios podem modificar os níveis de segundos mensageiros ou ligarem-se a complexos de sinalização associados à membrana levando a efeitos rápidos que não dependem da inibição do AR intracelular (Kaushik et al., 2010). Deenadayalu et al. (2012) utilizando a técnica de *Patch-clamp* e estudos de tensão arterial demonstraram que o efeito rápido da testosterona em concentrações na ordem dos nM em artérias coronárias de porco envolve a estimulação de canais BK_{Ca} (Deenadayalu et al., 2012). No relaxamento de artérias coronárias e aorta de coelho este processo envolve os canais BK_{Ca} e K_V (Yue et al., 1995); na aorta torácica de rato ocorre via ativação dos K_V (Ding and Stallone, 2001); no leito arterial mesentérico de ratos por ativação de canais BK_{Ca} (Tep-areenan et al., 2002); na artéria mamária interna humana (Yildiz et al., 2005) e em miócitos de artérias coronárias de porco (White et al., 2000) pela ativação dos BK_{Ca} .

Outro mecanismo de ação dos androgénios processa-se através da ativação do AR que por sua vez regula a expressão de proteínas. Os efeitos que derivam deste processo são

chamados efeitos genómicos ou de longo prazo (Kaushik et al., 2010). Para averiguar este efeito dos androgénios sobre os canais de K^+ , utilizaram-se células submetidas a uma incubação com DHT (10nM, 24h) e verificou-se que houve apenas inibição da corrente basal de K^+ pelo 4-AP, demonstrando assim que a corrente de K^+ observada nas HUASMC incubadas com DHT é devida unicamente aos canais K_V , diferente do que ocorria na ausência de DHT.

Estes resultados encontram-se de acordo com Saldanha et al. (2013) que em estudos de banho de órgãos utilizando inibidores de canais de K^+ observaram que a glibenclamida não influencia o efeito vasodilatador da testosterona, contrariamente ao que acontece quando utiliza o inibidor 4-AP que reduz o relaxamento provocado pela testosterona em células incubadas ou não com DHT e a TEA que produz o mesmo efeito apenas em células não incubadas. Para além disto, através da técnica de PCR *real-time* observaram que, a longo prazo (DHT 10nM, 24h), os androgénios modificam a expressão de proteínas envolvidas na regulação da contração vascular, nomeadamente um aumento da expressão da subunidade β_1 dos canais BK_{Ca} e diminuição da subunidade α_{1c} dos canais de Ca^{2+} tipo L (Saldanha et al., 2013).

As subunidades β_1 reguladoras dos canais BK_{Ca} (Morrow et al., 2006; Lee and Cui, 2010) são responsáveis pela sensibilidade ao Ca^{2+} e o rácio entre estas subunidades e as α são importantes para a atividade dos canais BK_{Ca} , havendo uma modulação positiva pela subunidade β_1 destes canais (Yang et al., 2008; Yang et al., 2009; Sweet and Cox, 2009).

Os resultados obtidos sugerem que o aumento da expressão da subunidade β_1 conduz a uma redução na atividade do canal BK_{Ca} e não a um aumento da atividade, reduzindo assim a contribuição dos canais BK_{Ca} na vasodilatação induzida pela testosterona.

Outros estudos indicam uma diminuição da atividade da subunidade β_1 dos canais BK_{Ca} em ratos hipertensos (Amberg and Santana, 2003; Amberg et al., 2003a) e diminuição da funcionalidade dos canais K_V e/ou elevada atividade dos canais BK_{Ca} em artérias de ratos hipertensos (Rusch et al., 1992; England et al., 1993; Martens and Gelband, 1996), isto indica que a testosterona pode exercer efeitos benéficos sobre a hipertensão.

Posto isto, os efeitos genómicos dos androgénios promovem a ativação apenas de canais K_V .

Ao comparar os resultados de células não incubadas com células incubadas com DHT verificou-se a inibição da corrente de K^+ pela iberiotoxina e pela TEA. Todos os inibidores são seletivos em função da sua concentração. As concentrações dos inibidores utilizados neste trabalho foram previamente estudadas de forma a serem específicas para os diferentes canais de K^+ . Tanto a iberiotoxina (0,1 μ M) (Giangiaco et al., 1992) como a TEA (1nM) (Martin et al., 2013) são inibidores específicos de canais BK_{Ca} .

Estes resultados sugerem que os canais BK_{Ca} não intervêm no processo de vasodilatação induzido pelos androgénios a longo prazo.

5.2. Efeitos dos androgénios na contratilidade celular

Para analisar os efeitos dos androgénios na contratilidade celular, utilizou-se a técnica de PCSA com HUASMC. As células foram sujeitas a agentes contráteis (5-HT e HIS) e a agentes vasodilatadores (ANP e SNP). Posteriormente analisou-se o efeito do KTg e do KTa. As experiências foram realizadas com células não incubadas e incubadas com DHT para posterior comparação.

Durante a realização da técnica, houve células que não responderam aos fármacos utilizados. Como forma de controlo da qualidade das células, foram utilizados agentes contráteis e vasodilatadores que permitiram verificar se as células contraíam e posteriormente relaxavam, sendo usadas só as células que mostravam viabilidade para a análise de propriedades contráteis e relaxantes.

Primeiramente, foram usados os agentes contráteis histamina e serotonina uma vez que em estudos anteriores realizados em HUASMC foram testados (Quan et al., 2003; Cairrao et al., 2008; Santos-Silva et al., 2009; Saldanha et al., 2013).

Com o uso destes agentes observou-se que a contração induzida pela HIS foi superior à induzida pela 5-HT. Este resultado não se encontra de acordo com o demonstrado em HUA por Quan et al. (2003), Cairrao et al. (2008), Santos Silva et al. (2010), Saldanha et al. (2013). Esta discrepância pode dever-se ao facto de a concentração de serotonina utilizada neste trabalho (0,1 μ M) ser inferior à utilizada nos estudos referidos (1 μ M), resultando numa contração percentual inferior.

Ao observar o efeito dos agentes contráteis em células incubadas e não incubadas com DHT, verifica-se que a contração induzida por eles é significativamente menor em células incubadas com DHT.

Posteriormente foi induzido um relaxamento pelo SNP e pelo ANP. O SNP é um dador de NO que ativa a sGC. Esta produz GMPc que por ativação da PKG induz relaxamento. O ANP possui também efeitos vasodilatadores mas que envolvem a ativação da pGC (Potter et al., 2006; Cary et al., 2006; Sharma and Duda, 2014). A concentração de GMPc nas células não é homogénea, encontra-se compartimentado em *pools*, no interior da célula quando produzido pela sGC ou junto à membrana quando produzido pela pGC (Feiteiro, 2013).

De seguida, analisou-se o efeito destes agentes vasodilatores nas células pré-contraídas com 5-HT e HIS e de inibidores de proteínas cinase, nomeadamente a KTa (inibidor da PKA) e a KTg (inibidor da PKG) de modo a averiguar se o envolvimento da PKG e PKA seria diferente em efeitos genómicos e não genómicos.

Primeiramente, observou-se que tanto o SNP como o ANP induziram relaxamento, situação idêntica demonstrada por Santos-Silva et al. (2008) e Cairrao et al. (2010). Uma vez que estes fármacos ativam a GC e promovem a ativação de PKG seria de esperar que ao adicionar o inibidor desta proteína cinase houvesse uma diminuição no relaxamento induzido pelos agentes vasodilatadores, o que se veio a confirmar.

De acordo com Deenadayalu et al. (2012) a ativação da PKG em miócitos de artérias coronárias de porco está envolvida na estimulação de canais BK_{Ca} induzida pela testosterona.

Ao testar o KTg verificou que o efeito vasorelaxante da testosterona diminuiu. (Deenadayalu et al., 2012). A testosterona age por um mecanismo semelhante ao ANP, ambos ativam a pGC que produz GMPc e induz vasodilatação na artéria umbilical humana (Feiteiro, 2013; Feiteiro et al., 2014). Cairrão et al. (2010) também demonstrou que o KTg induziu uma diminuição no relaxamento provocado pela testosterona e uma inibição da corrente basal de K^+ após adição de ANP e testosterona (Cairrao et al., 2010). Tamaoki et al. (1997), em células musculares lisas de artéria pulmonar canina demonstraram que o relaxamento nestas células ocorre por um mecanismo dependente da PKG uma vez que ao adicionar o SNP induziu vasodilatação, efeito anulado com a adição de KTg (Tamaoki et al., 1997).

Então, a adição da KTg promoveu uma anulação do relaxamento induzido pelo ANP e SNP, de tal modo o efeito destes agentes envolve a ativação da PKG.

O não envolvimento da PKA é demonstrado pelos valores semelhantes de relaxamento provocado pelos agentes vasodilatadores e os valores após adição de KTa. De acordo com Cairrão et al. (2010) em experiências de banho de órgãos e de *Patch-clamp*, verificaram que o KTa não altera o estado de relaxamento provocado pela testosterona em artérias pré-contraídas com 5-HT e histamina, assim como não inibe a corrente basal de K^+ após adição de testosterona ou ANP (Cairrao et al., 2010).

Assim, o KTa não influenciou o relaxamento induzido pelo ANP e SNP, o efeito destes agentes vasodilatadores não envolve a PKA.

Ao comparar os resultados obtidos em células incubadas e não incubadas com DHT demonstraram ser similares. Tal não era de esperar uma vez que Esteves (2013), através da técnica de PCR *real-time* em HUASMC, analisou a expressão de várias proteínas que intervêm na regulação da contratilidade vascular, nomeadamente a sGC, o NPRA e a PKG. Em relação à sGC, a exposição a 5 α -DHT a longo prazo provocou uma diminuição da sua expressão quando utilizada a concentração de 10nM, assim como a PKG foi significativamente diminuída, pelo contrário, a expressão do NPRA aumentou (Esteves, 2013).

De acordo com estes dados o esperado seria haver uma diminuição do relaxamento após a incubação com DHT (10nM, 24h) uma vez que a expressão das principais proteínas envolvidas neste processo também diminuem.

Outros estudos de efeitos genómicos de androgénios demonstram que em próstatas de rato tratadas com testosterona ocorre uma inibição da expressão da sGC- α 1 (Liu et al., 2013). Por outro lado, em linhas celulares cancerígenas da próstata humana (LNCaP cells) o DHT induz o aumento da expressão de mRNA da sGC- α 1 e estimula a síntese de GMPc, sendo que este aumento é proporcional ao estágio do cancro da próstata (Cai et al., 2007), e a DEAH aumenta a expressão da sGC em artérias pulmonares de rato com hipertensão pulmonar (Oka et al., 2007).

O conhecimento existente e estudos realizados sobre os efeitos genómicos dos androgénios são em número reduzido e controversos. O aumento da concentração de androgénios pode induzir efeitos rápidos ou de longo prazo, sendo que os efeitos genómicos podem modular os efeitos rápidos. O primeiro estudo realizado sobre esta temática, foi

elaborado por Er et al. (2007) em miócitos ventriculares de rato e mostraram que os efeitos a longo prazo da testosterona nos canais de Ca^{2+} tipo L são completamente antagonizados pela adição de testosterona. Os estudos realizados por Saldanha et al. (2013) sugerem também que existe um equilíbrio entre os efeitos de curto e longo prazo dos androgénios. A incubação com DHT pode modificar os efeitos vasorelaxantes da testosterona, mas em ambos os casos estes levam a um relaxamento que pode ser benéfico e apresentar um papel protetor a nível vascular.

Assim, com base neste trabalho, verificou-se pela primeira vez que os efeitos genómicos vasodilatadores dos androgénios são exercidos pela ativação dos canais K_V e o seu efeito é similar aos encontrados em células não tratadas com androgénios. Apesar de não se esperar é possível que haja um aumento da expressão de canais BK_{Ca} mas que a sua atividade diminua, isto sugere que os efeitos genómicos podem ser compensados pelos efeitos rápidos dos androgénios.

Capítulo VI - Conclusões e perspectivas futuras

Tendo como base de trabalho estudos anteriormente realizados, foi motivo de interesse e preocupação aprofundar aspetos concetuais, a sua cientificidade, técnicas e metodologias de trabalho utilizadas, contribuindo para confirmar, inovar e potenciar os seguintes aspetos:

- A corrente de K^+ observada em HUASMC é devida aos canais BK_{Ca} e K_v .
- Os efeitos genómicos dos androgénios envolvem a ativação de canais K_v .
- A adição da KTg anula o relaxamento induzido pelo ANP e SNP, de tal modo o efeito vasodilatador do SNP e ANP envolve a ativação da PKG.
- Os efeitos genómicos dos androgénios são similares aos efeitos não genómicos.

No futuro, será importante dar continuidade ao trabalho a nível de *Patch-clamp*, de forma a complementar os dados obtidos com a técnica de PCSA, utilizando os mesmos agentes vasodilatadores e inibidores das proteínas cinases.

Será de grande utilidade continuar a realizar mais estudos dos efeitos dos androgénios, genómicos e não genómicos, uma vez que os efeitos genómicos parecem ser compensados pelos efeitos não genómicos. Esta análise é fundamental para determinar as repercussões do uso da terapia de longa duração com androgénios.

Em processos de investigação a realizar, será pertinente adicionar células musculares lisas provenientes de grávidas hipertensas uma vez que quadros patológicos como hipertensão arterial e pré-eclampsia estão associados a elevados níveis de androgénios.

Capítulo VII - Bibliografía

Ai, P., Zheng, J.Q., 2005. [Advancement of patch-clamp technique and its application in drug high-throughput screening]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 36, 125-129.

Airhart, N., Yang, Y.F., Roberts, C.T., Jr., Silberbach, M., 2003. Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *J Biol Chem* 278, 38693-38698.

Albarwani, S., Nemetz, L.T., Madden, J.A., Tobin, A.A., England, S.K., Pratt, P.F., Rusch, N.J., 2003. Voltage-gated K⁺ channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. *J Physiol* 551, 751-763.

Allanore, Y., 2012. Phosphodiesterase 5 inhibitors in vascular systemic disorders. *Joint Bone Spine* 79, 338-340.

Amberg, G.C., Bonev, A.D., Rossow, C.F., Nelson, M.T., Santana, L.F., 2003a. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca²⁺ activated K⁽⁺⁾ channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest* 112, 717-724.

Amberg, G.C., Koh, S.D., Imaizumi, Y., Ohya, S., Sanders, K.M., 2003b. A-type potassium currents in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C583-595.

Amberg, G.C., Santana, L.F., 2003. Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension. *Circ Res* 93, 965-971.

Andric, S.A., Janjic, M.M., Stojkov, N.J., Kostic, T.S., 2010. Testosterone-induced modulation of nitric oxide-cGMP signaling pathway and androgenesis in the rat Leydig cells. *Biol Reprod* 83, 434-442.

Andruchov, O., Andruchova, O., Wang, Y., Galler, S., 2004. Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in mouse skeletal muscle: comparison with rat, rabbit, and human and correlation with amino acid sequence. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1725-1732.

Arora, K., Sinha, C., Zhang, W., Ren, A., Moon, C.S., Yarlagadda, S., Naren, A.P., 2013. Compartmentalization of cyclic nucleotide signaling: a question of when, where, and why? *Pflugers Arch* 465, 1397-1407.

Bayguinov, O., Dwyer, L., Kim, H., Marklew, A., Sanders, K.M., Koh, S.D., 2011. Contribution of Rho-kinase to membrane excitability of murine colonic smooth muscle. *Br J Pharmacol* 163, 638-648.

Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K., Marchant, R.E., 2010. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 467-491.

Bebarova, M., 2012. Advances in patch clamp technique: towards higher quality and quantity. *Gen Physiol Biophys* 31, 131-140.

Birschmann, I., Walter, U., 2004. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochim Pol* 51, 397-404.

Blanco, M.V., Vega, H.R., Giuliano, R., Grana, D.R., Azzato, F., Lerman, J., Milei, J., 2011. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 13, 30-34.

Blunck, R., Batulan, Z., 2012. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol* 3, 166.

- Bowles, D.K., Maddali, K.K., Ganjam, V.K., Rubin, L.J., Tharp, D.L., Turk, J.R., Heaps, C.L., 2004. Endogenous testosterone increases L-type Ca²⁺ channel expression in porcine coronary smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2091-2098.
- Brambilla, D.J., Matsumoto, A.M., Araujo, A.B., McKinlay, J.B., 2009. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 907-913.
- Brenner, R., Perez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T., Aldrich, R.W., 2000. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-876.
- Burdakov, D., Verkhratsky, A., 2006. Biophysical re-equilibration of Ca²⁺ fluxes as a simple biologically plausible explanation for complex intracellular Ca²⁺ release patterns. *FEBS Lett* 580, 463-468.
- Burley, D.S., Ferdinandy, P., Baxter, G.F., 2007. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol* 152, 855-869.
- Buxton, I.L., Milton, D., Barnett, S.D., Tichenor, S.D., 2010. Agonist-specific compartmentation of cGMP action in myometrium. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 256-263.
- Cai, C., Chen, S.Y., Zheng, Z., Omwancha, J., Lin, M.F., Balk, S.P., Shemshedini, L., 2007. Androgen regulation of soluble guanylyl cyclase α 1 mediates prostate cancer cell proliferation. *Oncogene* 26, 1606-1615.
- Cairrao, E., Alvarez, E., Santos-Silva, A.J., Verde, I., 2008. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376, 375-383.
- Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., Alvarez, E., Correia, I., Verde, I., 2009. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45, 175-184.
- Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., Verde, I., 2010. PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol* 640, 94-101.
- Capener, C.E., Kim, H.J., Arinaminpathy, Y., Sansom, M.S., 2002. Ion channels: structural bioinformatics and modelling. *Hum Mol Genet* 11, 2425-2433.
- Carvalho-de-Souza, J.L., Varanda, W.A., Tostes, R.C., Chignalia, A.Z., 2013. BK Channels in Cardiovascular Diseases and Aging. *Aging Dis* 4, 38-49.
- Cary, S.P., Winger, J.A., Derbyshire, E.R., Marletta, M.A., 2006. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci* 31, 231-239.
- Castro, L.R., Schittl, J., Fischmeister, R., 2010. Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 107, 1232-1240.
- Castro, L.R., Verde, I., Cooper, D.M., Fischmeister, R., 2006. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113, 2221-2228.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.
- Chakraborty, S.K., Banu, L.A., 2013. Microscopic impacts of gestational diabetes mellitus on the umbilical cord. *Mymensingh Med J* 22, 755-760.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., Mei, F., 2008. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 651-662.
- Cheng, Y.M., Claydon, T.W., 2012. Voltage-dependent gating of HERG potassium channels. *Front Pharmacol* 3, 83.
- Chi, M., Zhou, Y., Vedamoorthyrao, S., Babu, G.J., Periasamy, M., 2008. Ablation of smooth muscle myosin heavy chain SM2 increases smooth muscle contraction and results in postnatal death in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18614-18618.
- Chin, D., Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10, 322-328.
- Chou, T.M., Sudhir, K., Hutchison, S.J., Ko, E., Amidon, T.M., Collins, P., Chatterjee, K., 1996. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 94, 2614-2619.
- Christel, C., Lee, A., 2012. Ca²⁺-dependent modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Biochim Biophys Acta* 1820, 1243-1252.
- Cole, W.C., Welsh, D.G., 2011. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys* 510, 160-173.
- Connolly, M.J., Aaronson, P.I., 2011. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 24, 1-14.
- Conti, M., Mika, D., Richter, W., 2014. Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Gen Physiol* 143, 29-38.
- Coppock, E.A., Martens, J.R., Tamkun, M.M., 2001. Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1-12.
- Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Corsello, T., Farina, F., Anzalone, R., 2013. Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol* 28, 1235-1244.
- Cox, D.H., 2011. Ca²⁺-regulated ion channels. *BMB Rep* 44, 635-646.
- Cox, R.H., 2002. Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vascul Pharmacol* 38, 13-23.
- Cox, R.H., 2005. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 42, 167-195.
- Crews, J.K., Khalil, R.A., 1999. Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 707-715.
- Cribbs, L.L., 2006. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium* 40, 221-230.
- Cui, J., Yang, H., Lee, U.S., 2009. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* 66, 852-875.
- Currie, K.P., 2010. G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)* 4, 497-509.
- de Godoy, M.A., Rattan, S., 2011. Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trends Pharmacol Sci* 32, 384-393.

- Deenadayalu, V., Puttabyatappa, Y., Liu, A.T., Stallone, J.N., White, R.E., 2012. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H115-123.
- Deenadayalu, V.P., White, R.E., Stallone, J.N., Gao, X., Garcia, A.J., 2001. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H1720-1727.
- Di Naro, E., Ghezzi, F., Raio, L., Franchi, M., D'Addario, V., 2001. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96, 150-157.
- Ding, A.Q., Stallone, J.N., 2001. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol* (1985) 91, 2742-2750.
- Diviani, D., Dodge-Kafka, K.L., Li, J., Kapiloff, M.S., 2011. A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1742-1753.
- Dodge-Kafka, K.L., Langeberg, L., Scott, J.D., 2006. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res* 98, 993-1001.
- Dolphin, A.C., 2003. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 55, 607-627.
- Dolphin, A.C., 2006. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S56-62.
- Dominguez, R., Holmes, K.C., 2011. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 40, 169-186.
- Duskova, M., Pospisilova, H., 2011. The role of non-aromatizable testosterone metabolite in metabolic pathways. *Physiol Res* 60, 253-261.
- England, S.K., Wooldridge, T.A., Stekiel, W.J., Rusch, N.J., 1993. Enhanced single-channel K⁺ current in arterial membranes from genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 264, H1337-1345.
- English, K.M., Jones, R.D., Jones, T.H., Morice, A.H., Channer, K.S., 2002. Testosterone acts as a coronary vasodilator by a calcium antagonistic action. *J Endocrinol Invest* 25, 455-458.
- Er, F., Gassanov, N., Brandt, M.C., Madershahian, N., Hoppe, U.C., 2009. Impact of dihydrotestosterone on L-type calcium channels in human ventricular cardiomyocytes. *Endocr Res* 34, 59-67.
- Er, F., Michels, G., Brandt, M.C., Khan, I., Haase, H., Eicks, M., Lindner, M., Hoppe, U.C., 2007. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* 41, 467-477.
- Esteves, A., 2013. Efeito dos androgénios na regulação do tónus da artéria umbilical, na hipertensão arterial da gravidez. Universidade da Beira Interior, Covilhã. 62pp
- Feinstein, W.P., Zhu, B., Leavesley, S.J., Sayner, S.L., Rich, T.C., 2012. Assessment of cellular mechanisms contributing to cAMP compartmentalization in pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C839-852.
- Feiteiro, J., 2013. Efeito da Testosterona na compartimentação do cGMP a nível vascular. Universidade da Beira Interior, Covilhã. 71pp.
- Feiteiro, J., Santos-Silva, A.J., Verde, I., Cairrao, E., 2014. Testosterone and atrial natriuretic peptide share the same pathway to induce vasorelaxation of human umbilical artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 63, 461-465.
- Ferguson, V.L., Dodson, R.B., 2009. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144 Suppl 1, S108-113.

- Firth, A.L., Remillard, C.V., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E.A., Yuan, J.X., 2011. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulm Circ* 1, 48-71.
- Fischmeister, R., Castro, L.R., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevicius, J., Leroy, J., Vandecasteele, G., 2006. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99, 816-828.
- Flagg, T.P., Enkvetchakul, D., Koster, J.C., Nichols, C.G., 2010. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 90, 799-829.
- Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D., Sibley, D., 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62, 525-563.
- Francis, S.H., Corbin, J.D., 1994. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56, 237-272.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., O'Rourke, S.T., 2006. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110, 103-116.
- Ghofrani, H.A., Osterloh, I.H., Grimminger, F., 2006. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5, 689-702.
- Giangiacomo, K.M., Garcia, M.L., McManus, O.B., 1992. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 31, 6719-6727.
- Gobinet, J., Poujol, N., Sultan, C., 2002. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198, 15-24.
- Gomez, D., Owens, G.K., 2012. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 95, 156-164.
- Graceffa, P., Mazurkie, A., 2005. Effect of caldesmon on the position and myosin-induced movement of smooth muscle tropomyosin bound to actin. *J Biol Chem* 280, 4135-4143.
- Guerrero-Hernandez, A., Dagnino-Acosta, A., Verkhatsky, A., 2010. An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca²⁺ pool. *Cell Calcium* 48, 143-149.
- Gunst, S.J., Zhang, W., 2008. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C576-587.
- Hall, J., Jones, R.D., Jones, T.H., Channer, K.S., Peers, C., 2006. Selective inhibition of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology* 147, 2675-2680.
- Han, D.H., Chae, M.R., Jung, J.H., So, I., Park, J.K., Lee, S.W., 2008. Effect of testosterone on potassium channel opening in human corporal smooth muscle cells. *J Sex Med* 5, 822-832.
- Haugen, G., Mellembakken, J., Stray-Pedersen, S., 1997. Characterization of the vasodilatory response to serotonin in human umbilical arteries perfused in vitro. The influence of the endothelium. *Early Hum Dev* 47, 185-193.
- Herring, M.J., Oskui, P.M., Hale, S.L., Kloner, R.A., 2013. Testosterone and the cardiovascular system: a comprehensive review of the basic science literature. *J Am Heart Assoc* 2, e000271.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y., 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90, 291-366.

- Hill, M.A., Meininger, G.A., 2012. Arteriolar vascular smooth muscle cells: mechanotransducers in a complex environment. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1505-1510.
- Hill, M.A., Yang, Y., Ella, S.R., Davis, M.J., Braun, A.P., 2010. Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett* 584, 2033-2042.
- Hirano, K., 2007. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* 104, 109-115.
- Hirano, K., Hirano, M., Kanaide, H., 2004. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* 40, 219-236.
- Holmes, K.C., 2004. Introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 1813-1818.
- Hommel, D.W., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J., 2003. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52, 144-151.
- Hong, F., Facemyer, K.C., Carter, M.S., Jackson del, R., Haldeman, B.D., Ruana, N., Sutherland, C., Walsh, M.P., Cremo, C.R., Baker, J.E., 2013. Kinetics of myosin light chain kinase activation of smooth muscle myosin in an in vitro model system. *Biochemistry* 52, 8489-8500.
- Hong, F., Haldeman, B.D., Jackson, D., Carter, M., Baker, J.E., Cremo, C.R., 2011. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys* 510, 135-146.
- Hong, F., Haldeman, B.D., John, O.A., Brewer, P.D., Wu, Y.Y., Ni, S., Wilson, D.P., Walsh, M.P., Baker, J.E., Cremo, C.R., 2009. Characterization of tightly associated smooth muscle myosin-myosin light-chain kinase-calmodulin complexes. *J Mol Biol* 390, 879-892.
- Houslay, M.D., Milligan, G., 1997. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22, 217-224.
- Igarashi, M., Watanabe, M., 2007. Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci Res* 58, 226-233.
- Inan, S., Sancı, M., Can, D., Vatanserver, S., Oztekin, O., Tinar, S., 2002. Comparative morphological differences between umbilical cords from chronic hypertensive and preeclamptic pregnancies. *Acta Med Okayama* 56, 177-186.
- Insuk, S.O., Chae, M.R., Choi, J.W., Yang, D.K., Sim, J.H., Lee, S.W., 2003. Molecular basis and characteristics of KATP channel in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res* 15, 258-266.
- Jackson, W.F., 2000. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35, 173-178.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A., 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82, 503-568.
- Jones, R.D., English, K.M., Jones, T.H., Channer, K.S., 2004. Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond)* 107, 149-158.
- Jones, R.D., English, K.M., Pugh, P.J., Morice, A.H., Jones, T.H., Channer, K.S., 2002. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol* 39, 814-823.
- Jones, R.D., Pugh, P.J., Jones, T.H., Channer, K.S., 2003. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 138, 733-744.

- Joseph, B.K., Thakali, K.M., Moore, C.L., Rhee, S.W., 2013. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches. *Pharmacol Res* 70, 126-138.
- Junek, T., Baum, O., Lauter, H., Vetter, K., Matejevic, D., Graf, R., 2000. Pre-eclampsia associated alterations of the elastic fibre system in umbilical cord vessels. *Anat Embryol (Berl)* 201, 291-303.
- Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., 2004. The patch clamp technique in ion channel research. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 387-395.
- Kalish, R.B., Hunter, T., Sharma, G., Baergen, R.N., 2003. Clinical significance of the umbilical cord twist. *Am J Obstet Gynecol* 189, 736-739.
- Kandel, E.R., 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* 5, 14.
- Kang, H.Y., 2013. Beyond the male sex hormone: deciphering the metabolic and vascular actions of testosterone. *J Endocrinol* 217, C1-3.
- Karlstad, J., Sun, Y., Singh, B.B., 2012. Ca(2+) signaling: an outlook on the characterization of Ca(2+) channels and their importance in cellular functions. *Adv Exp Med Biol* 740, 143-157.
- Kaushik, M., Sontineni, S.P., Hunter, C., 2010. Cardiovascular disease and androgens: a review. *Int J Cardiol* 142, 8-14.
- Kelly, D.M., Jones, T.H., 2013. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol* 217, R47-71.
- Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D., Park, W.S., 2008. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44, 65-81.
- Kornreich, B.G., 2007. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol* 9, 25-37.
- Korovkina, V.P., England, S.K., 2002. Detection and implications of potassium channel alterations. *Vascul Pharmacol* 38, 3-12.
- Kritzer, M.D., Li, J., Dodge-Kafka, K., Kapiloff, M.S., 2012. AKAPs: the architectural underpinnings of local cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 52, 351-358.
- Kudryashov, D.S., Stepanova, O.V., Vilitkevich, E.L., Nikonenko, T.A., Nadezhdina, E.S., Shanina, N.A., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P., 2004. Myosin light chain kinase (210 kDa) is a potential cytoskeleton integrator through its unique N-terminal domain. *Exp Cell Res* 298, 407-417.
- Kudryavtseva, O., Aalkjaer, C., Matchkov, V.V., 2013. Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca²⁺-dependent transcription factors. *FEBS J* 280, 5488-5499.
- Kukreja, R.C., Salloum, F., Das, A., Ockaili, R., Yin, C., Bremer, Y.A., Fisher, P.W., Wittkamp, M., Hawkins, J., Chou, E., Kukreja, A.K., Wang, X., Marwaha, V.R., Xi, L., 2005. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 42, 219-232.
- Lacinova, L., 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1, 1-78.
- Lee, L.C., Maurice, D.H., Baillie, G.S., 2013a. Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. *Future Med Chem* 5, 451-464.
- Lee, S.H., Dominguez, R., 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 29, 311-325.

- Lee, S.J., Wang, S., Borschel, W., Heyman, S., Gyore, J., Nichols, C.G., 2013b. Secondary anionic phospholipid binding site and gating mechanism in Kir2.1 inward rectifier channels. *Nat Commun* 4, 2786.
- Lee, U.S., Cui, J., 2010. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci* 33, 415-423.
- Leech, C.A., Holz, G.G.t., 1994. Application of patch clamp methods to the study of calcium currents and calcium channels. *Methods Cell Biol* 40, 135-151.
- Levitan, I., 2009. Cholesterol and Kir channels. *IUBMB Life* 61, 781-790.
- Lincoln, T.M., Dey, N., Sellak, H., 2001. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 91, 1421-1430.
- Liu, C.M., Fan, Y.C., Lo, Y.C., Wu, B.N., Yeh, J.L., Chen, I.J., 2013. Cyclic guanosine monophosphate-enhancing reduces androgenic extracellular regulated protein kinases-phosphorylation/Rho kinase II-activation in benign prostate hyperplasia. *Int J Urol* 21, 87-92.
- Logothetis, D.E., Jin, T., Lupyán, D., Rosenhouse-Dantsker, A., 2007. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch* 455, 83-95.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., Waldman, S.A., 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375-414.
- Mabuchi, Y., Mabuchi, K., Stafford, W.F., Grabarek, Z., 2010. Modular structure of smooth muscle Myosin light chain kinase: hydrodynamic modeling and functional implications. *Biochemistry* 49, 2903-2917.
- Mandegar, M., Yuan, J.X., 2002. Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* 38, 25-33.
- Marchetti, P.M., Barth, J.H., 2013. Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Ann Clin Biochem* 50, 95-107.
- Margariti, A., Zeng, L., Xu, Q., 2006. Stem cells, vascular smooth muscle cells and atherosclerosis. *Histol Histopathol* 21, 979-985.
- Martens, J.R., Gelband, C.H., 1996. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res* 79, 295-301.
- Martin, A.F., Bhatti, S., Pyne-Geithman, G.J., Farjah, M., Manaves, V., Walker, L., Franks, R., Strauch, A.R., Paul, R.J., 2007. Expression and function of COOH-terminal myosin heavy chain isoforms in mouse smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C238-245.
- Martin, P., Rebolledo, A., Palomo, A.R., Moncada, M., Piccinini, L., Milesi, V., 2013. Diversity of Potassium Channels in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells: A Review of Their Roles in Human Umbilical Artery Contraction. *Reprod Sci*.
- Martinez-Luis, S., Perez-Vasquez, A., Mata, R., 2007. Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry* 68, 1882-1903.
- Martinsen, A., Schakman, O., Yerna, X., Dessy, C., Morel, N., 2013. Myosin light chain kinase controls voltage-dependent calcium channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch*.
- Matsumura, F., Hartshorne, D.J., 2008. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 149-156.
- Mennan, C., Wright, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J., Roberts, S., 2013. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int* 2013, 916136.

- Meyer, W.W., Rumpelt, H.J., Yao, A.C., Lind, J., 1978. Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *Eur J Pediatr* 128, 247-259.
- Michels, G., Er, F., Eicks, M., Herzig, S., Hoppe, U.C., 2006. Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 147, 5160-5169.
- Michels, G., Hoppe, U.C., 2008. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29, 182-198.
- Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G., Fischmeister, R., 2012. [Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the cAMP compartmentation in cardiac cells]. *Biol Aujourd'hui* 206, 11-24.
- Mita, M., Yanagihara, H., Hishinuma, S., Saito, M., Walsh, M.P., 2002. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J* 364, 431-440.
- Moltzau, L.R., Meier, S., Aronsen, J.M., Afzal, F., Sjaastad, I., Skomedal, T., Osnes, J.B., Levy, F.O., Qvigstad, E., 2014. Differential regulation of C-type natriuretic peptide-induced cGMP and functional responses by PDE2 and PDE3 in failing myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 387, 407-417.
- Montano, L.M., Calixto, E., Figueroa, A., Flores-Soto, E., Carbajal, V., Perusquia, M., 2008. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology* 149, 2517-2526.
- Morano, I., 2003. Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. *J Mol Med (Berl)* 81, 481-487.
- Morgado, M., Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., Verde, I., 2012. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 69, 247-266.
- Morrow, J.P., Zakharov, S.I., Liu, G., Yang, L., Sok, A.J., Marx, S.O., 2006. Defining the BK channel domains required for beta1-subunit modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5096-5101.
- Murray, F., 2012. The interplay of multiple molecular and cellular components is necessary for compartmentalization of cAMP. Focus on "Assessment of cellular mechanisms contributing to cAMP compartmentalization in pulmonary microvascular endothelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C837-838.
- Nakamura, A., Xie, C., Zhang, Y., Gao, Y., Wang, H.H., Ye, L.H., Kishi, H., Okagaki, T., Yoshiyama, S., Hayakawa, K., Ishikawa, R., Kohama, K., 2008. Role of non-kinase activity of myosin light-chain kinase in regulating smooth muscle contraction, a review dedicated to Dr. Setsuro Ebashi. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 135-143.
- Navarro-Dorado, J., Orensanz, L.M., Recio, P., Bustamante, S., Benedito, S., Martinez, A.C., Garcia-Sacristan, A., Prieto, D., Hernandez, M., 2008. Mechanisms involved in testosterone-induced vasodilatation in pig prostatic small arteries. *Life Sci* 83, 569-573.
- Nichols, C.G., Singh, G.K., Grange, D.K., 2013. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. *Circ Res* 112, 1059-1072.
- Nieschlag, E., Nieschlag, S., 2014. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J Androl*.
- Nilius, B., Talavera, K., Verkhatsky, A., 2006. T-type calcium channels: the never ending story. *Cell Calcium* 40, 81-88.

- Noble, K., Matthew, A., Burdyga, T., Wray, S., 2009. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144 Suppl 1, S11-19.
- Nunes, K.P., Rigsby, C.S., Webb, R.C., 2011. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? *Cell Mol Life Sci* 67, 3823-3836.
- Oda, T., Maeda, Y., 2010. Multiple Conformations of F-actin. *Structure* 18, 761-767.
- Oka, M., Karoor, V., Homma, N., Nagaoka, T., Sakao, E., Golembeski, S.M., Limbird, J., Imamura, M., Gebb, S.A., Fagan, K.A., McMurtry, I.F., 2007. Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 74, 377-387.
- Oskui, P.M., French, W.J., Herring, M.J., Mayeda, G.S., Burstein, S., Kloner, R.A., 2013. Testosterone and the cardiovascular system: a comprehensive review of the clinical literature. *J Am Heart Assoc* 2, e000272.
- Parekh, A.B., Putney, J.W., Jr., 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85, 757-810.
- Park, J., Luo, Z.D., 2010. Calcium channel functions in pain processing. *Channels (Austin)* 4, 510-517.
- Park, W.S., Han, J., Earm, Y.E., 2008. Physiological role of inward rectifier K(+) channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 457, 137-147.
- Pasqualini, J.R., 2005. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 401-415.
- Pattnaik, B.R., Asuma, M.P., Spott, R., Pillers, D.A., 2012. Genetic defects in the hotspot of inwardly rectifying K(+) (Kir) channels and their metabolic consequences: a review. *Mol Genet Metab* 105, 64-72.
- Perusquia, M., Navarrete, E., Gonzalez, L., Villalon, C.M., 2007. The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci* 81, 993-1002.
- Piggott, L.A., Hassell, K.A., Berkova, Z., Morris, A.P., Silberbach, M., Rich, T.C., 2006. Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments. *J Gen Physiol* 128, 3-14.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1619-1633.
- Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., Dickey, D.M., 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27, 47-72.
- Poulos, T.L., 2006. Soluble guanylate cyclase. *Curr Opin Struct Biol* 16, 736-743.
- Poveda, J.A., Giudici, A.M., Renart, M.L., Molina, M.L., Montoya, E., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Encinar, J.A., Gonzalez-Ros, J.M., 2013. Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim Biophys Acta*.
- Pyriochou, A., Papapetropoulos, A., 2005. Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* 17, 407-413.
- Quan, A., Leung, S.W., Lao, T.T., Man, R.Y., 2003. 5-hydroxytryptamine and thromboxane A2 as physiologic mediators of human umbilical artery closure. *J Soc Gynecol Investig* 10, 490-495.

- Rainbow, R.D., Macmillan, D., McCarron, J.G., 2009. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store arrangement in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 46, 313-322.
- Rao, Y.J., Xi, L., 2009. Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts. *Acta Pharmacol Sin* 30, 1-24.
- Reymann, A.C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.L., Guerin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Thery, M., Blanchoin, L., 2012. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* 336, 1310-1314.
- Rockelein, G., Schneider, R., 1992. [Three-dimensional analysis of the tunica media of umbilical arteries. Scanning electron microscopy study]. *Z Geburtshilfe Perinatol* 196, 266-272.
- Romanowicz, L., Bankowski, E., 2009. Lipid compounds of the umbilical cord artery and their alterations in preeclampsia. *Atherosclerosis* 204, e44-51.
- Romanowicz, L., Galewska, Z., 2011. Extracellular matrix remodeling of the umbilical cord in pre-eclampsia as a risk factor for fetal hypertension. *J Pregnancy* 2011, 542695.
- Rusch, N.J., De Lucena, R.G., Wooldridge, T.A., England, S.K., Cowley, A.W., Jr., 1992. A Ca(2+)-dependent K⁺ current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension* 19, 301-307.
- Saldanha, P.A., Cairrao, E., Maia, C.J., Verde, I., 2013. Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40, 181-189.
- Salomonsson, M., Sorensen, C.M., Arendshorst, W.J., Steendahl, J., Holstein-Rathlou, N.H., 2004. Calcium handling in afferent arterioles. *Acta Physiol Scand* 181, 421-429.
- Santos-Silva, A.J., Cairrao, E., Marques, B., Verde, I., 2009. Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reprod Sci* 16, 1175-1185.
- Saucerman, J.J., Greenwald, E.C., Polanowska-Grabowska, R., 2014. Mechanisms of cyclic AMP compartmentation revealed by computational models. *J Gen Physiol* 143, 39-48.
- Schaub, M.C., Heizmann, C.W., 2008. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 247-264.
- Schlossmann, J., Desch, M., 2011. IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H672-682.
- Schoenenberger, C.A., Mannherz, H.G., Jockusch, B.M., 2011. Actin: from structural plasticity to functional diversity. *Eur J Cell Biol* 90, 797-804.
- Scotto-Lavino, E., Garcia-Diaz, M., Du, G., Frohman, M.A., 2010. Basis for the isoform-specific interaction of myosin phosphatase subunits protein phosphatase 1c beta and myosin phosphatase targeting subunit 1. *J Biol Chem* 285, 6419-6424.
- Scragg, J.L., Jones, R.D., Channer, K.S., Jones, T.H., Peers, C., 2004. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca(2+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 503-506.
- Seino, S., Miki, T., 2003. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 133-176.
- Seyrek, M., Yildiz, O., Ulusoy, H.B., Yildirim, V., 2007. Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci* 103, 309-316.
- Sharma, R.K., Duda, T., 2014. Membrane guanylate cyclase, a multimodal transduction machine: history, present, and future directions. *Front Mol Neurosci* 7, 56.
- Shi, W.W., Yang, Y., Shi, Y., Jiang, C., 2012. K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao* 64, 1-13.

- Shi, Z.D., Tarbell, J.M., 2011. Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Ann Biomed Eng* 39, 1608-1619.
- Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Varone, G., Caruso, A., Genazzani, A.R., 2003. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology* 144, 3449-3455.
- Skubiszak, L., 2011. Geometrical conditions indispensable for muscle contraction. *Int J Mol Sci* 12, 2138-2157.
- Sobey, C.G., 2001. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 28-38.
- Sonkusare, S., Palade, P.T., Marsh, J.D., Telemaque, S., Pesic, A., Rusch, N.J., 2006. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. *Vascul Pharmacol* 44, 131-142.
- Stanfield, P.R., Sutcliffe, M.J., 2003. Spermine is fit to block inward rectifier (Kir) channels. *J Gen Physiol* 122, 481-484.
- Striessnig, J., Hoda, J.C., Koschak, A., Zaghetto, F., Mullner, C., Sinnegger-Brauns, M.J., Wild, C., Watschinger, K., Trockenbacher, A., Pelster, G., 2004. L-type Ca²⁺ channels in Ca²⁺ channelopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1341-1346.
- Sutherland, C., Walsh, M.P., 2012. Myosin regulatory light chain diphosphorylation slows relaxation of arterial smooth muscle. *J Biol Chem* 287, 24064-24076.
- Suzuki, M., Li, R.A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marban, E., Nakaya, H., 2001. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 88, 570-577.
- Sweet, T.B., Cox, D.H., 2009. Measuring the influence of the BKCa β 1 subunit on Ca²⁺ binding to the BKCa channel. *J Gen Physiol* 133, 139-150.
- Takashima, S., 2009. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ J* 73, 208-213.
- Takimoto, E., 2012. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* 76, 1819-1825.
- Takimoto, E., Belardi, D., Tocchetti, C.G., Vahebi, S., Cormaci, G., Ketner, E.A., Moens, A.L., Champion, H.C., Kass, D.A., 2007. Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* 115, 2159-2167.
- Tamaoki, J., Tagaya, E., Nishimura, K., Isono, K., Nagai, A., 1997. Role of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾ ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 122, 112-116.
- Tanaka, Y., Aida, M., Tanaka, H., Shigenobu, K., Toro, L., 1998. Involvement of maxi-K(Ca) channel activation in atrial natriuretic peptide-induced vasorelaxation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357, 705-708.
- Tang, L., Gamal El-Din, T.M., Payandeh, J., Martinez, G.Q., Heard, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., Catterall, W.A., 2014. Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature* 505, 56-61.
- Tedford, H.W., Zamponi, G.W., 2006. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev* 58, 837-862.
- Tep-areenan, P., Kendall, D.A., Randall, M.D., 2002. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 135, 735-740.

- Thatcher, S.E., Fultz, M.E., Tanaka, H., Hagiwara, H., Zhang, H.L., Zhang, Y., Hayakawa, K., Yoshiyama, S., Nakamura, A., Wang, H.H., Katayama, T., Watanabe, M., Lin, Y., Wright, G.L., Kohama, K., 2011. Myosin light chain kinase/actin interaction in phorbol dibutyrate-stimulated smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci* 116, 116-127.
- Thoresen, T., Lenz, M., Gardel, M.L., 2013. Thick filament length and isoform composition determine self-organized contractile units in actomyosin bundles. *Biophys J* 104, 655-665.
- Togni, F.A., Araujo Junior, E., Vasques, F.A., Moron, A.F., Torloni, M.R., Nardoza, L.M., 2007. The cross-sectional area of umbilical cord components in normal pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 96, 156-161.
- Tsai, E.J., Liu, Y., Koitabashi, N., Bedja, D., Danner, T., Jasmin, J.F., Lisanti, M.P., Friebe, A., Takimoto, E., Kass, D.A., 2012. Pressure-overload-induced subcellular relocalization/oxidation of soluble guanylyl cyclase in the heart modulates enzyme stimulation. *Circ Res* 110, 295-303.
- Tsukamoto, O., Kitakaze, M., 2013. Biochemical and physiological regulation of cardiac myocyte contraction by cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ J* 77, 2218-2225.
- Tuna, B.G., Bakker, E.N., VanBavel, E., 2011. Smooth muscle biomechanics and plasticity: relevance for vascular calibre and remodelling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110, 35-41.
- Turner, R.W., Anderson, D., Zamponi, G.W., 2011. Signaling complexes of voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)* 5, 440-448.
- Turner, S.R., Macdonald, J.A., 2013. Novel contributions of the smoothelin-like 1 protein in vascular smooth muscle contraction and its potential involvement in myogenic tone. *Microcirculation*.
- Uemura, M., Tamura, K., Chung, S., Honma, S., Okuyama, A., Nakamura, Y., Nakagawa, H., 2008. Novel 5 alpha-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci* 99, 81-86.
- Valsecchi, F., Ramos-Espiritu, L.S., Buck, J., Levin, L.R., Manfredi, G., 2013. cAMP and mitochondria. *Physiology (Bethesda)* 28, 199-209.
- Villalobo, A., Garcia-Palmero, I., Stateva, S.R., Jellali, K., 2013. Targeting the calmodulin-regulated ErbB/Grb7 signaling axis in cancer therapy. *J Pharm Pharm Sci* 16, 177-189.
- Wagner, S., Rokita, A.G., Anderson, M.E., Maier, L.S., 2013. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* 18, 1063-1077.
- Wang, T.F., Lai, N.S., Huang, K.Y., Huang, H.L., Lu, M.C., Lin, Y.S., Chen, C.Y., Liu, S.Q., Lin, T.H., Huang, H.B., 2012. Identification and characterization of the actin-binding motif of phostensin. *Int J Mol Sci* 13, 15967-15982.
- Wareing, M., Bai, X., Seghier, F., Turner, C.M., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Taggart, M.J., Fyfe, G.K., 2006. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R437-446.
- Webb, R.C., 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201-206.
- White, R.E., Kryman, J.P., El-Mowafy, A.M., Han, G., Carrier, G.O., 2000. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 86, 897-905.
- Whitmarsh, A.J., 2007. Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1285-1298.
- Wolfertstetter, S., Huettner, J.P., Schlossmann, J., 2013. cGMP-Dependent Protein Kinase Inhibitors in Health and Disease. *Pharmaceuticals (Basel)* 6, 269-286.

- Wray, S., Burdyga, T., 2010. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* 90, 113-178.
- Wray, S., Burdyga, T., Noble, K., 2005. Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium* 38, 397-407.
- Wunder, F., Woermann, A., Geerts, A., Milde, M., 2012. Pharmacological characterization of receptor guanylyl cyclase reporter cell lines. *Eur J Pharmacol* 698, 131-136.
- Xia, D., Stull, J.T., Kamm, K.E., 2005. Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly. *Exp Cell Res* 304, 506-517.
- Xie, L.H., John, S.A., Ribalet, B., Weiss, J.N., 2007. Activation of inwardly rectifying potassium (Kir) channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂): interaction with other regulatory ligands. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 320-335.
- Yajuan, X., Xin, L., Zhiyuan, L., 2012. A comparison of the performance and application differences between manual and automated patch-clamp techniques. *Curr Chem Genomics* 6, 87-92.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., Hartshorne, D.J., Matsumura, F., 2008. Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell* 14, 787-797.
- Yamniuk, A.P., Vogel, H.J., 2004. Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Mol Biotechnol* 27, 33-57.
- Yang, H., Zhang, G., Shi, J., Lee, U.S., Delaloye, K., Cui, J., 2008. Subunit-specific effect of the voltage sensor domain on Ca²⁺ sensitivity of BK channels. *Biophys J* 94, 4678-4687.
- Yang, S.H., Sharrocks, A.D., Whitmarsh, A.J., 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 513, 1-13.
- Yang, Y., Murphy, T.V., Ella, S.R., Grayson, T.H., Haddock, R., Hwang, Y.T., Braun, A.P., Peichun, G., Korthuis, R.J., Davis, M.J., Hill, M.A., 2009. Heterogeneity in function of small artery smooth muscle BKCa: involvement of the beta1-subunit. *J Physiol* 587, 3025-3044.
- Yeap, B.B., 2013. Sex steroids and cardiovascular disease. *Asian J Androl*.
- Yildiz, O., Seyrek, M., 2007. Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115, 1-6.
- Yildiz, O., Seyrek, M., Gul, H., Un, I., Yildirim, V., Ozal, E., Uzun, M., Bolu, E., 2005. Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 45, 580-585.
- Yue, P., Chatterjee, K., Beale, C., Poole-Wilson, P.A., Collins, P., 1995. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 91, 1154-1160.
- Zhang, L., Zhou, Y., Zhu, J., Xu, Q., 2012. An updated view on stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol* 56, 280-287.
- Zhou, P., Fu, L., Pan, Z., Ma, D., Zhang, Y., Qu, F., Guo, L., Cao, J., Gao, Q., Han, Y., 2008. Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 593, 87-91.