



**Efeitos da disrupção endócrina do Bisfenol A
na artéria umbilical humana
Versão final após defesa**

Maria Inês Moreira Fonseca

**Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre em
Bioquímica
(2ºCiclo de Estudos)**

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

Coorientador: Mestre Margarida Ferreira Lorigo

Abril, 2022

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a sua realização.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de deixar o mais sincero agradecimento à minha orientadora, Prof. Dr^a Maria Elisa Cairrão. Obrigada, por sempre se ter mostrado disponível e me ter ajudado em tudo. Quero que saiba que a admiro como profissional e como pessoa, e que comigo levarei todos os seus conselhos. Nunca me irei esquecer que puxou por mim, me fez ir mais além e acreditar em mim, mesmo quando julgava não ser possível. Obrigada pela sua simpatia e companheirismo, foi um privilégio ter trabalhado consigo.

Queria também deixar um especial agradecimento à minha coorientadora Mestre Margarida Lorigo. Confesso que não sei bem por onde começar, porque foram muitos os momentos que passou comigo. Talvez comece por agradecer toda a disponibilidade, porque sei que muitas vezes tiveste de parar o teu trabalho para me auxiliar. Também agradeço todas as chamadas de atenção e aprendizagens, que levo para o meu futuro. Nunca me esquecerei também dos momentos de grande amizade, e sem dúvida da tua alegria contagiante e entusiasmo para com as mais pequenas coisas. Deixo por escrito que te considero a pessoa mais trabalhadora que conheço e que te admiro imenso.

Em seguida, agradeço aos meus colegas Carolina Mangana, Manuel Pouso e Rui Rodrigues. Obrigada por terem tornado esta experiência ainda melhor, principalmente pela vossa ajuda e amizade.

Como não podia deixar de ser, agradeço aos meus pais. Obrigada pelo vosso apoio incondicional e paciência. Agradeço por terem sempre acreditado em mim mesmo quando eu não acreditava. Sem vocês nada disto seria possível, não só por permitirem continuar os meus estudos, mas por todos os ensinamentos que me deram e que me fizeram estar onde estou hoje. Deixo também um especial agradecimento à minha restante família, irmãos, primas/os, tias/os e avós, que de alguma forma me auxiliaram nesta importante etapa da minha vida. Um agradecimento em particular à minha prima Ana e Sofia. Obrigada pela vossa ajuda*

Agradeço também à minha melhor amiga Gabriela Seara, que esteve sempre a meu lado e me deu uma força inexplicável. Tu sabes que sem ti eu não teria conseguido. Obrigada pela tua amizade incessável. Pelas chamadas e mensagens de desespero que tiveste de suportar e que no fim me davas sempre conforto e força para continuar. Obrigada*

O meu muito obrigada ao melhor companheiro que podia pedir, Flávio Fernandes. Obrigada pela tua compreensão e por todo o carinho que demonstraste comigo.

Agradeço por teres estado sempre a meu lado e me teres permitido partilhar os bons e não tão bons momentos desta experiência. Nunca me irei esquecer. Foste o meu grande pilar, muito obrigada *

A todos os meus restantes amigos, o meu mais sincero obrigada. Por toda a preocupação demonstrada e por estarem sempre lá quando mais precisei.

Abreviaturas e Acrónimos

1PEPentaethyleneglycol (Pentaetileno glicol)

5'AMPAdenosine 5'- Monophosphate (Adenosina 5'-Monofosfato)

5'GMP Guanosine 5'-Monophosphate (Guanosina 5'-Monofosfato)

5-HT Serotonin (Serotonina)

8YV 1,3 Bis(bromomethyl)benzene (1,3 Bis(bromometil)benzeno))

ACE 1 AngiotensinConvertingEnzyme 1 (Enzima conversora da angiotensina 1)

AhRArylHydrocarbonReceptor (Recetor Hidrocarboneto de Aril)

Ala Alanine (Alanina)

Apo E Apolipoprotein E (Apolipoproteína E)

ArgArginine (Arginina)

ARsAndrogenReceptors (Recetores Androgénicos)

AspAsparticacid(Ácido aspártico)

ATH Atherosclerose (Aterosclerose)

Bax B-cellslymphoma 2 Associated X Protein (Proteína X associada a linfoma de células B 2)

BKCa Large-conductancecalcium-activatedpotassiumchannels (Canais de potássio de alta condutância ativado por cálcio)

BPA Bisphenol A (Bisfenol A)

C/EBPs CCAAT-enhancer-bindingproteins (proteínas de ligação ao intensificador CCAAT)

Ca²⁺Calcium (Cálcio)

CAMKII Ca²⁺/Calmodulin-dependentproteinkinase II (Proteína quinase II dependente de Ca²⁺/ Calmodulina

cAMPCyclic Adenosinemonophosphate (Adenosina monofosfato cíclica)

Cav 1.2 L type Calcium channel subunit alpha-1C (Canal de cálcio do tipo L subunidade alfa 1-C)

CCAAT Cytosine-cytosine-adenosine-thymidine (citosina-citosina-adenosina-timidina)

CDCC Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controlo e Prevenção de Doenças)

cGMP Cyclic guanosine monophosphate (Monofosfato cíclico de guanosina)

CHUCB Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira

CLR Cholesterol (Colesterol)

Cn Calcineurin (Calcineurina)

CVD Cardiovascular disease (doenças cardiovasculares)

CX43 Connexin 43 (Conexina 43)

CYPs Cytochromes P450 (Citocromos P450)

Cys Cysteine (Cisteína)

DES Diethylstilbestrol (Dietilbestilbestrol)

DRP1 Dynamin-related protein 1 (Proteína dinamina-like 1)

DTT Dichlorodiphenyltrichloroethane (Diclorodifeniltricloroetano)

ECG Electrocardiogram (Eletrocardiograma)

EDC Endocrine Disrupting Chemicals (Químicos Disruptores Endócrinos)

EE Ethinylestradiol (Etinilestradiol)

EGCG Epigallocatechin gallate (Galato de Epigallocatequina)

eNOS Endothelial nitric oxide synthase 3 (óxido nítrico sintase 3 endotelial)

ERs Estrogen Receptors (Recetores de Estrogénio)

ER α Estrogen Receptor alpha (Recetor de Estrogénio alfa)

ER β Estrogen Receptor beta (Recetor de Estrogénio beta)

EtoH Ethanol (Etanol)

FP Prostaglandin F 2α receptor (Recetor de Prostaglandina F 2α)

GFP Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)

GRF Glomerular filtration rate (Taxa de filtração glomerular)

GSH Glutathione (Glutationa)

GTP GuanosineTriphosphate (Trifosfato de guanosina)

HA Hyaluronicacid (Ácido Hialurónico)

Hb Hemoglobin (Hemoglobina)

HCT Hematocrit (Hematócrito)

HEK239 HumanEmbryonickidney 293 cells (Células 293 de rim embrionárias humanas)

HEM Heme group (Grupo Heme)

His Histamine (Histamina)

hNAv1.5 Humanvoltage-gatedsodiumionchannelsubunit 1.5 (Subunidade 1.5 do canal de sódio dependente de voltagem)

HRV Heart Rate Variability (variabilidade da frequência cardíaca)

HSPsHeatShockProteins (Proteínas de Choque Térmico)

HUA Human umbilical artery (artéria umbilical humana)

HUASMC Human Umbilical ArterySmoothMuscleCells (Células do músculo liso da artéria umbilical humana)

HUC Human umbilical cord (Cordão umbilical humano)

HUVEC Human umbilical veinendothelialcells (Células endoteliais de veia umbilical humana)

IL-8 Interleukin 8 (Interleucina 8)

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

IUPACInternationalUnionofPureandAppliedChemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

KCl PotassiumChloride (Cloreto de Potássio)

Kv Voltage-gatedpotassiumchannels

LDL Low DensityLipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)

Leu Leucine (Leucina)

LTCC L typeCalciumChannel (Canal de Cálcio do tipo L)

LysLysine (Lisina)

MAP Mean Arterial Pressure (Pressão média arterial)

MBP 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl) pent-1-ene (4-Metil-2,4-bis(4-hidroxifenil) pent-1-eno)

mN miliNewton (miliNewton)

NCBI National Center of Biotechnology Information

NCX Na⁺/Ca²⁺exchanger (Permutador Na⁺/Ca²⁺)

NF-κB Nuclear Factor Kappa B (Factor Nuclear Kappa B)

Nfr2 Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Fator nuclear 2 relacionado a eritróide 2)

NHANES National Health and Nutrition Examination Survey (Inquérito Nacional de Exame de Saúde e Nutrição)

NHRs Nuclear Hormone Receptors (Recetores nucleares de hormonas)

Nif Nifedipine (Nifedipina)

NO Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NP Natriuretic Peptide (Péptido Natriurético)

NPP Natriuretic peptide (Péptido natriurético)

OMC Octylmethoxycinnamate (Octilmetoxicinamato)

OMP Oxidative modification of proteins (Proteínas modificadas por oxidação)

PBBs Polybrominated Biphenyl (Polibromato Bifenil)

PDB Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteína)

PDE Phosphodiesterases (Fosfodiesterases)

PFOS Perfluorooctanesulfonic acid (Ácido perfluorooctanossulfónico)

PGF_{2α} Prostaglandin F_{2α} (Prostaglandina F_{2α})

Phe Phenylalanine (Fenilalanina)

PHTPP 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (4-[2-Fenil-5,7-bis(trifluotometil)pirazol[1,5-a]pirimidina-3-il]fenol)

PKA Protein Kinase A (Proteína Quinase A)

PKG Protein Kinase G (Proteína Cinase G)
 PLB Phospholamban (Fosfolambano)
 PLC Phospholipase C (Fosfolipase C)
 PLC Phospholipase C (Fosfolipase C)E
 PMCA Plasma membrane Ca²⁺ATPase (Ca²⁺ATPase da membrana plasmática)
 PND PostNatalDay (Dia Após o Parto)
 PPAR γ Peroxisome proliferator-activated receptor (Receptores γ ativados por proliferadores de peroxissoma)
 PSS Physiological Saline Solution (Solução salina fisiológica)
 PXR Pregnane X Receptor (Recetor pregnano X)
 qPCR Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR quantitativo em tempo real)
 RBCs Red Blood Cells (Glóbulos Vermelhos)
 RMSD Root mean square deviation (Desvio quadrático médio)
 ROS Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigénio)
 RXRs Retinoid X Receptors (Recetores Retinóide X)
 RyR Ryanodine receptor (Recetor de rianodina)
 S.D Standard Deviation (Desvio Padrão)
 SERCA Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase (Retículo endoplasmático Cálcio-ATPase)
 sGC Soluble Guanylate Cyclase (guanilciclase solúvel)
 SMC Smooth Muscle Cells (Células do Músculo Liso)
 SNP Sodium nitroprusside (Nitroprussiato de sódio)
 SOD Superoxide dismutase (Superóxido dismutase)
 SR Sarcoplasmic Reticulum (Retículo Endoplasmático)
 TF Transcription Factors (Fatores de Transcrição)
 Thr Threonine (Treonina)
 TP Tromboxane A₂ Receptor (Recetor do Tromboxano A₂)

TRs ThyroidReceptors (Recetores da Tireoide)

TyrTyrosine (Tirosina)

UGT Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase (Uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferase)

UGT2b1Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 2B1 precursor (Uridine 5'-diphospho-glururonosiltransferase 2B1)

ValValine (Valina)

VEGF Vascular endothelialgrowthfactor (Factor de Crescimento Endotelial Vascular)

VEGFR2 Vascular endothelialgrowthfactorreceptor 2 (Recetor tipo 2 do factor de crescimento endotelial vascular)

VOCC VoltageOperatedCalciumChannel (Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem)

WHO World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

zfERα ZebrafishEstrogen Recetor α (Recetor de estrogénio α do peixe zebra)

Resumo

Atualmente o plastificante bisfenol A (BPA) é um dos químicos produzidos em maior volume mundialmente. O BPA está presente em plásticos policarbonatos e resinas epóxi, comumente utilizado em produtos de armazenamento alimentar, industriais, médicos, etc. Estudos recentes investigam as propriedades disruptivas do BPA, contudo no que diz respeito aos efeitos cardiotoxicos, a maioria são epidemiológicos, não existindo suficiente entendimento do modo de ação deste composto em modelos humanos.

Neste sentido, o objetivo geral do presente trabalho consistiu no estudo do efeito do BPA no tônus arterial e na análise dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Para atingir esse objetivo foram delineados os seguintes objetivos específicos: 1) Realização do isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC); 2) Analisar o efeito do BPA em artérias umbilicais humanas (HUA) sem endotélio-efeito direto; 3) Analisar possíveis mecanismos envolvidos no efeito do BPA em HUA, principalmente o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de cálcio- estudos de mecanística; 4) Analisar o efeito do bisfenol A na expressão de diferentes proteínas contrácteis nas HUASMC por Real time-PCR; 5) Analisar computacionalmente a interação do BPA com proteínas envolvidas nas vias de sinalização endotelial. Os nossos resultados demonstraram que a exposição a BPA pode modificar a resposta vasorelaxante do HUA, interferindo com a via NO (óxido nítrico) /sGC (guanilciclase solúvel) /cGMP (guanosina monofosfato cíclica) /PKG (proteína cinase G) através da modulação do sGC e ativação dos canais BKCa (canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio). Além disso, o BPA parece modular a atividade e expressão dos VOCC do tipo L. Portanto, as nossas descobertas sugerem que o BPA pode ser um indutor de perturbações hipertensivas da gravidez, tais como hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia.

Palavras-Chave

BPA, disruptor endócrino, toxicidade cardiovascular, contractilidade

Abstract

Currently the plasticizer bisphenol A (BPA) is one of the most widely produced chemicals worldwide. BPA is present in polycarbonate plastics and epoxy resins, commonly used in food storage, industrial, medical, etc. Recent studies investigate the disruptive properties of BPA, however regarding cardiotoxic effects, most are epidemiological, and there is insufficient understanding of the mode of action of this compound in human models.

In this sense, the aim of the present work was to study the effect of BPA on arterial tone and to analyze the possible mechanisms involved in this effect. To achieve this purpose, the following specific objectives were outlined: 1) Perform isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC); 2) Analyze the effect of BPA on human umbilical arteries (HUA) without endothelium- direct effect; 3) Analyze possible mechanisms involved in the effect of BPA on HUA, mainly the involvement of cyclic nucleotides and calcium channels- mechanistic studies; 4) To analyze the effect of bisphenol A on the expression of different contractile proteins in HUASMCs by Real time PCR; 5) To computationally analyze the interaction of BPA with proteins involved in endothelial signaling pathways. Our results demonstrated that BPA exposure can modify the vasorelaxant response of HUA by interfering with the NO (nitric oxide)/sGC (guanyl cyclase soluble)/cGMP (cyclic guanosine monophosphate)/PKG (protein kinase G) pathway through modulation of sGC and activation of BKCa (large conductance calcium-activated potassium channels). In addition, BPA appears to modulate L-type VOCC (voltage operated calcium channel) activity and expression. Therefore, our findings suggest that BPA may be an inducer of hypertensive disorders of pregnancy, such as gestational hypertension and preeclampsia.

Key words

BPA, Disrupting compound, cardiovascular toxicity, contractility

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Doenças Cardiovasculares	1
1.2. Compostos disruptores endócrinos	2
1.3. Bisfenol A (BPA)	5
1.3.1. Propriedades Físico-Químicas	5
1.3.2. Produção e aplicação	6
1.3.3. Detecção em amostras biológicas	6
1.3.4. Exposição.....	7
1.3.5. Conjugação, Metabolização e Excreção.....	7
1.3.6. Mecanismos de Ação	9
1.3.7. Efeitos e Legislação	9
1.4. Efeitos do BPA a nível cardiovascular	12
1.4.1. Estudos em animais.....	12
1.4.1.1. Estudos <i>In vivo</i>	12
1.4.1.1.1. Alterações morfo-fisiológicas e no desenvolvimento do coração ...	12
1.4.1.1.2. Aterosclerose	13
1.4.1.1.3. Pressão arterial e função vascular	14
1.4.1.1.4. Alteração da frequência cardíaca	14
1.4.1.1.5. Alterações Hematológicas	15
1.4.1.1.6. Miocardite e Pericardite.....	16
1.4.1.2. Estudos <i>In vitro</i>	17
1.4.1.2.1. Alterações morfo-fisiológicas e no desenvolvimento do coração ...	17
1.4.1.2.2. Pressão arterial e função vascular	18
1.4.1.2.3. Alteração da frequência cardíaca	20
1.4.2. Estudos <i>Ex vivo</i>	21
1.4.2.1.1. Alterações morfo-fisiológicas e no desenvolvimento do coração ...	21
1.4.2.1.2. Alteração da frequência cardíaca	22
1.4.3. Estudos Humanos- <i>In Vitro</i>	23
1.4.3.1. Estudos Epidemiológicos	26
1.5. Cordão Umbilical Humano.....	29

1.6.	Artéria Umbilical Humana	31
1.7.	Células Musculares Lisas do Cordão Umbilical.....	33
1.8.	Mecanismos de Contração e Relaxamento das células musculares lisas da HUA	34
1.8.1.	Mecanismos de Contração.....	35
1.8.2.	Mecanismo de Relaxação	36
2.	Enquadramento e Objetivos da investigação.....	39
3.	Materiais e Métodos.....	40
3.1.	Recolha dos cordões umbilicais.....	40
3.2.	Técnica de banho de órgãos.....	40
3.2.1.	Isolamento de artérias umbilicais humanas	40
3.2.2.	Medição das Tensões isométricas	41
3.2.3.	Procedimento experimental	41
3.3.	Cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana- HUASMC	42
3.4.	Genética	43
3.4.1.	Extração de mRNA	43
3.4.2.	Síntese de cDNA	43
3.4.3.	Quantificação da expressão de mRNA por qPCR em tempo real.....	44
3.5.	Docking Molecular.....	45
3.5.1.	Aquisição e preparação de estruturas proteicas e ligandos.....	45
3.5.2.	Simulações moleculares	46
3.6.	Análise Estatística.....	47
3.7.	Soluções e Materiais	47
3.7.1.	Soluções	47
3.7.2.	Químicos.....	48
3.7.3.	Materiais.....	48
4.	Resultados	48
4.1.	Estudos de contractilidade arterial.....	49

4.1.1	Efeitos do BPA na vasculatura de HUA nas contrações induzidas pela serotonina (5-HT) ou cloreto de potássio (KCl).....	50
4.1.2	Efeitos Vasculares diretos do BPA na contractilidade das HUA induzida pela serotonina (5-HT).....	52
4.1.3	Efeitos Vasculares diretos do BPA na contractilidade das HUA induzida pelo cloreto de potássio (KCl)	53
4.1.4.	Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo BPA.....	53
4.1.5.	Análise do envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação induzida pelo BPA.....	55
4.2.	Estudos genómicos – Efeito do BPA na expressão de genes envolvidos nas propriedades contrácteis das HUASMC.....	57
4.2.1	Quantificação de mRNA.....	57
4.2.2	Real time- PCR.....	58
4.3.	Docking Molecular.....	60
5.	Discussão geral.....	63
6.	Conclusão	68
7.	Bibliografia	69

Índice de Figuras

Figura 1-Estrutura química do Bisfenol A (ChemSketch).....	6
Figura 2-Glucuronidação do BPA em humanos.....	8
Figura 3-Efeitos provocados do BPA no ser humano	11
Figura 4-Resumo esquemático dos resultados de Gao et. al.....	23
Figura 5-Resumo esquemático de alguns mecanismos do BPA em humanos.....	26
Figura 6-Cordão umbilical humano	30
Figura 7-Representação esquemática de tabuleiro usado para o tratamento da artéria	41
Figura 8-Representação esquemática da técnica eletroforese em gel de agarose.	43
Figura 9- Percentagem (%) de relaxação de HUA pré-incubadas com BPA (0.002-100µmol/L), contraídas com 5-HT (Fig.4A) e KCl (Fig.4B) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP) (0.01-100µmol/L).	55
Figura 10- Percentagem(%) de relaxação em HUAs pré-incubadas com BPA(0.002-100µmol/L), contraídas com 5-HT (Fig.5A) e KCl (Fig.5B) sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina(Nif)(0.01-1 µmol/L).....	56
Figura 11-Bandas observadas após eletroforese em gel de Agarose.....	58
Figura 12 -Expressão relativa de mRNA em células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC) expostas a diferentes concentrações de BPA (0.002-20 µmol/L): (A) BKCa 1.1 α; (B) BKCa-β1; (C) subunidade β do canal de Ca ²⁺ do tipo L (Cav 1.2); (D) guanilciclase solúvel; e (E) PKG 1-α.	59
Figura 13- Visualização das interações entre ligando natural HEM e sGC (8A) e ligando de estudo BPA (8B). Os resultados dos complexos do docking molecular, interações e a conformação preferencial foram observadas utilizando o software Chimera 1.15, sGC co-complexado com HEM (8C) e BPA (8D).....	61
Figura 14- Visualização das interações entre ligando natural (9A), Nif (9B) e BPA (9C) com a subunidade α1.1 do LTCC. Visualização das interações entre o ligando natural 1PE e a subunidade β1 do LTCC (9D), Nif (9E), e o ligando em estudo BPA (9F). Os resultados dos complexos de docking molecular, interações e a conformação preferencial foram observados utilizando o software Chimera 1.15, LTCC-β1 co-complexado com 1PE (9G), Nif (9H), e BPA (9I).	62
Figura 15- Visualização das interações entre o ligando natural CLR e BKCa-α1 (10A) e o ligando em estudo BPA (10B). Os resultados dos complexos de docking molecular, interações e conformação preferencial foram observados utilizando o software Chimera 1.15, BKCa-α1 co-complexos com CLR (10C) e BPA (10D).	62

Índice de Tabelas

Tabela 1-Distinção de parâmetros fisiológicos com base no género.	2
Tabela 2-Primers utilizados para a quantificação da expressão de mRNA através de experiências de PCR em tempo-real.....	44
Tabela 3 Características de cada proteína utilizada para o docking molecular: abreviaturas comumente utilizadas, identificações PDB e o organismo.	46
Tabela 4 Características de cada ligando utilizado para o docking molecular: abreviaturas comumente utilizadas, IDs PubChem e número de registo do Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN).....	46
Tabela 5- Parâmetros da grelha (dimensões e tamanho) de cada centro activo das proteínas utilizadas para o docking molecular.....	46
Tabela 6-Soluções e respetiva composição utilizadas no presente trabalho.....	47
Tabela 7-Material utilizado para a realização das soluções e técnicas mencionadas anteriormente.....	48
Tabela 8-Tensões basais após adição de concentrações crescentes de BPA.....	50
Tabela 9-Valores da Absorbância e Concentração das amostras analisadas.	57
Tabela 10-Energias de ligação das simulações de docking molecular para as proteínas estudadas com os seus ligandos naturais(HEM,8yv,1PE e CLR), ligando experimental(BPA,1-10) e ligando auxiliar(Nif)	60

1. Introdução

1.1. Doenças Cardiovasculares

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) a primeira causa de morte mundial são as doenças cardiovasculares [1]. Estas doenças são todas aquelas que envolvem o coração e o sistema circulatório, um grupo heterogéneo cuja causa de desenvolvimento é muitas vezes a aterosclerose [2]. A maioria destas doenças é crónica e assintomática por um longo período de tempo. Geralmente só com a progressão da doença é que surgem os primeiros sintomas ou de imediato morte súbita, sendo esta a principal causa de mortalidade prematura em todo o mundo [3]. Até ao ano de 2030 estima-se que 23,6 milhões de pessoas morram de doenças cardiovasculares (CVD) por ano. Embora haja uma tendência suave para diminuir a mortalidade e a incidência de CVD no noroeste e sul da Europa [1, 4].

As doenças cardiovasculares são causadas por múltiplos fatores, alguns dos quais invariáveis, como é o caso da idade, género e herança genética e outros variáveis, ou seja, aqueles sobre os quais temos influência, tabagismo, inatividade física, pobres hábitos alimentares, elevada pressão sanguínea, diabetes tipo 2, dislipidemia e obesidade [4, 5].

Em países desenvolvidos, o controlo de fatores de risco e o tratamento apropriado para as doenças são responsáveis pela redução da taxa de mortalidade por CVD em cerca de 45-75% e 25-55% respetivamente [4].

A prevalência de doenças cardiovasculares nas mulheres é relativamente inferior à dos homens, quando a idade é inferior a 50 anos. Uma vez que, a mulher pré-menopausal possui um menor risco para doenças cardiovasculares do que o homem, contudo o risco depois da menopausa é idêntico em ambos [6, 7].

Relativamente às diferenças de género, é importante ressaltar que, embora o monitoramento geral das doenças seja similar para ambos, existem variações a nível patofisiológico, sintomas, eficácia de testes diagnóstico e resposta a intervenções farmacológicas [8]. Na tabela 1 estão algumas das características distintas entre o sexo feminino e masculino [8].

Tabela 1-Distinção de parâmetros fisiológicos com base no gênero.

Parâmetros	Diferenças de gênero
Características anatômicas	O tamanho dos vasos é menor nas mulheres do que nos homens; O ventrículo esquerdo das mulheres é menor do que o do homem; As mulheres têm melhor função sistólica e menor complacência diastólica relativamente aos homens.
Diferenças hormonais	O estrogênio é predominantemente influente na mulher e a testosterona no homem.
Diferenças na função cardiovascular	As mulheres têm uma atividade simpática menor e parassimpática maior comparando com os homens.
Adaptações cardiovasculares	O sexo feminino tem uma pulsação e um output cardíacos aumentados em relação ao masculino.
Achados eletrocardiográficos	O intervalo PR do ECG é menor nas mulheres do que nos homens.

Há um fator, que embora não tenha sido mencionado acima, merece ser destacado, uma vez que a sua conexão com as CVDs tem aumentado, que é a influência de contaminantes ambientais, como os compostos disruptores endócrinos na saúde humana [9].

1.2. Compostos disruptores endócrinos

Ao longo da vida, o ser humano está exposto a uma enorme variedade de produtos químicos que podem contribuir, como componentes não hereditários, para situações patológicas[10]. Entre todos esses compostos, aqueles que emergiram como potenciais moduladores da fisiologia cardiovascular são os disruptores endócrinos e dada a sua ubiquidade no ambiente torna-se importante o seu estudo [10-13].

Os compostos disruptores endócrinos (EDC) segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana são compostos sintéticos ou naturais, presentes no ambiente, que têm a capacidade de interferir em ações do sistema endócrino, pela mimetização ou antagonização da ação de hormonas endógenas, ações essas como a síntese, transporte, ligação ou eliminação de hormonas responsáveis pela homeostase, reprodução e/ou desenvolvimento [14-16]. Inicialmente pensava-se que os EDC atuavam principalmente em recetores nucleares hormonais, incluindo recetores de estrogénio (ERs), androgénios (ARs), progesterona, tiroide (TRs), retinoide (RXRs) entre outros [16, 17]. Contudo, atualmente, sabe-se, que os mecanismos são muito mais extensos do que se pensava originalmente [16]. Assim, os disruptores endócrinos podem atuar por meio de recetores nucleares, recetores de hormonas esteroides não nucleares (por exemplo, ERs de membrana), recetores não esteroides (recetores de neurotransmissores como o recetor de dopamina ou recetores adrenérgicos) e recetores órfão (por exemplo, recetor de hidrocarboneto de aril (AhR)). Os recetores órfãos caracterizam-se pela falta de ligandos fisiológicos específicos, no caso do AhR, a função ainda não foi clarificada, contudo modelos animais indicam que é importante para o desenvolvimento normal [18, 19]. Para além da atuação via recetores, também podem atuar por vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo de esteroides e vários outros mecanismos [16, 20].

A maioria dos efeitos prejudiciais dos EDCs é atribuída à sinalização hormonal mediada por recetores hormonais nucleares, dos quais se destacam o ER α e o ER β , estes recetores são ativados pela interação com pequenas hormonas lipofílicas como as hormonas esteroides sexuais. Sendo assim, como os EDCs também são pequenos compostos lipofílicos, uma via privilegiada de atuação é através da interação direta com os recetores nucleares, perturbando ou modulando a expressão génica [17]. Os efeitos dos compostos disruptores endócrinos que mais prejudicam a saúde são aqueles que envolvem a sua interferência com hormonas de sinalização mediadas por recetores hormonais nucleares (NHRs). Os NHRs regulam conjuntos de genes envolvidos em funções fisiológicas essenciais, como crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento, homeostase ou metabolismo [20]. Como consequência, a sinalização NHR disfuncional (ou seja, mutação do recetor ou exposição inadequada de contaminantes ambientes) muitas vezes leva a doenças reprodutivas, metabólicas e proliferativas incluindo cancro hormonal, infertilidade, obesidade, diabetes, entre outras [20].

Este grupo de compostos disruptivos é altamente heterogêneo e inclui químicos sintéticos utilizados como solventes/lubrificantes industriais, plásticos (BPA, bisfenol A), plastificantes (ftalatos), pesticidas (DTT, diclorodifeniltricloroetano), fungicidas (vinclozolin), agentes farmacêuticos (DES, dietilestilbestrol) e cosméticos (OMC, octilmetoxicinamato) [16, 17, 21, 22]. Também alguns químicos naturais encontrados em alimentos humanos e animais (fitoestrogênios, incluindo genisteína e coumestrol) podem atuar como disruptores endócrinos. Embora na generalidade estas substâncias se julgassem possuir uma afinidade baixa para os receptores endócrinos, estas são consumidas em larga escala e fazem parte de fórmulas infantis de leite [16], o que constitui um motivo de alarme.

Considerando as características estruturais dos EDC, estas são muito distintas de uns para outros e por isso é difícil estabelecer uma relação entre eles, contudo a maioria possui uma pequena massa molecular (<1000 Daltons) [15, 16].

As fontes de exposição a compostos disruptores endócrinos é diversa e varia globalmente. A exposição humana aos EDCs está em constante evolução, uma vez que alguns destes foram banidos há décadas enquanto outros foram retirados mais recentemente, sendo essa seleção diferente de país para país [16]. Recentemente, o estado Norte-Americano Hawaii, banuiu a utilização de dois componentes principais dos protetores solares, oxibenzeno (BP-3) e OMC, de forma a proteger os recifes corais [23]. Contudo esta decisão está a ser alvo de contestação, uma vez que se julga que o uso de protetores solares venha a ser reduzido e consequentemente aumentem os problemas dermatológicos resultantes da exposição solar [24].

Alguns EDCs foram desenhados para ter longas semividas, o que era benéfico para o seu uso industrial, porém isso provocava deterioração da vida humana e animal. Como estas substâncias não são removidas do organismo facilmente, isso poderá significar que não são metabolizadas, ou podem ser metabolizadas ou quebradas em compostos mais tóxicos do que o composto do qual derivam, como é o caso do OMC cujos produtos resultantes da fotólise julgam-se mais tóxicos que o composto inicial. [15, 16, 22].

A exposição aos disruptores endócrinos pode ter diferentes consequências num adulto ou num feto em desenvolvimento, dependendo os efeitos também da fase da vida em que estiveram expostos. Outro dos problemas é a latência da exposição, conceito de que existe uma fase de latência entre o tempo de exposição e a manifestação da desordem endócrina, ou seja, as consequências da exposição a EDCs podem não ocorrer logo na fase inicial de desenvolvimento ou apenas na vida adulta [15, 16]. Há que ter também em consideração as misturas às quais estamos expostos, uma vez que diferentes classes

de EDCs podem ter efeitos aditivos ou até sinérgicos. No referente à dinâmica dose-resposta não tradicional, existem várias propriedades de compostos disruptores endócrinos que causaram controvérsia. Primeiro, níveis baixos infinitesimais de exposição, ou melhor qualquer nível de exposição pode causar anomalias endócrinas e reprodutivas, particularmente se a exposição ocorre durante uma janela crítica de desenvolvimento [16]. Notavelmente, doses baixas podem até exercer um efeito mais potente do que doses mais elevadas [16]. Em segundo lugar, os EDCs podem exercer funções não tradicionais em curvas dose-resposta, como U invertido ou curvas em forma de U [17]. Ambos os conceitos foram conhecidos pelas ações de hormonas e neurotransmissores, mas apenas na última década começaram a ser apreciados para os EDCs.

O processo de excreção dos EDCs está altamente dependente da natureza das substâncias químicas. Além disso os compostos tóxicos e/ou disruptivos podem ser classificados como persistentes ou não persistentes [15]. Se for considerada não persistente normalmente prevê-se que a sua metabolização ocorra no fígado e que os metabolitos sejam eliminados do corpo através da urina e fezes. No entanto, disruptores que persistem, acumulam-se em várias partes do corpo, especialmente em locais ricos em gordura, onde depois se libertam lentamente. Uma das vias de excreção destas substâncias (DDT, PBBs, entre outros) é através do leite materno, passando da mãe para o feto [15, 25].

1.3. Bisfenol A (BPA)

1.3.1. Propriedades Físico-Químicas

O bisfenol A (BPA), designado como 4,4'-(propano-2,2-diil) difenol pela IUPAC, é um fenol formado por um resíduo hidroxilo diretamente ligado a um anel aromático (Fig. 1), cuja fórmula química é $C_{15}H_{16}O_2$ e peso molecular 228.29 g/cm³. As suas propriedades conferem aos plásticos um aumento da resistência térmica e elasticidade e, por esse motivo continua a ser utilizado. Relativamente à sua aparência o BPA é uma substância sólida, branca e cristalina cujo ponto de fusão é 156°C e o de ebulição 220°C (a uma pressão de 5 hPa). Para além disso, este apresenta boa solubilidade em gorduras e o inverso em água. A presença de grupos hidroxilo determinam uma boa reatividade do BPA. Tal, como outros fenóis, o bisfenol pode ser convertido em éteres, esters e sais [26].

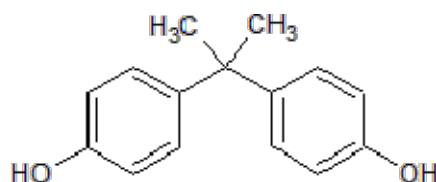


Figura 1-Estrutura química do Bisfenol A (ChemSketch)

1.3.2. Produção e aplicação

Em 1891 foi sintetizado pela primeira vez pelo químico Alexander P. Dianin, e cerca de 40 anos depois começaram a ser descobertos alguns efeitos estrogénicos [26].

Global e progressivamente o uso do BPA tem aumentado, de tal maneira que se produzem mais de 10 milhões de toneladas por ano [27]. O BPA está presente em 95 % dos produtos que contêm resinas epóxi e policarbonatos, como recipientes alimentares, garrafas, brinquedos, produtos dentários, CD, DVD e canos de água. Para além disso, também é usado na produção de cloroeteno e papel térmico utilizados na manufatura de roupa interior, livros, bilhetes, rolos de cozinha e papel higiénico [28-30]. O seu uso em produtos consumíveis e médicos, faz com que a exposição ao BPA seja contínua, tendo sido detetado na urina em mais de 90% da população norte-americana [10, 27, 31].

1.3.3. Detecção em amostras biológicas

A acumulação do BPA no corpo humano pensa-se que se deva à libertação dos polímeros para a comida e água, quando estes são expostos a elevadas temperaturas. Bem como a utilização de detergentes fortes, que causam alterações no pH e podem hidrolisar a ligação éster que liga os monómeros de BPA [32].

Esta acumulação verificou-se com a identificação do BPA no sêrum, urina, líquido amniótico, líquido folicular, (que se encontra no espaço intercelular do folículo de Graaf), tecido placentar e sangue do cordão umbilical [33-38]. Contudo, devido a este ser um químico não persistente, preferencialmente são utilizadas amostras de urina, uma vez que a concentração do composto é mais elevada nestas [10]. Alguns estudos realizados na Europa mostram que os noruegueses apresentam uma maior concentração de BPA na urina, cerca de 4.5 µg/dm³, quando esta é comparada a outras populações, como holandeses (2.5 µg/dm³) e belgas (2.55 µg/dm³) [26, 39, 40].

1.3.4. Exposição

O grau de exposição ao BPA pode variar drasticamente, dependendo de fatores socioeconômicos, estilo de vida, estatuto médico e vias de exposição [10]. A exposição oral é considerada a mais prevalente, com níveis de BPA associados às escolhas alimentares [10, 41]. No geral, diariamente os humanos estão expostos a concentrações entre 0.48 a 1.6 µg/kg peso corporal/dia de BPA através da alimentação [27]. Surpreendentemente, a autoridade Europeia de segurança Alimentar, EFSA, determinou, em 2006, que o nível de exposição seguro para os humanos era de 50 µg/kg peso corporal/dia, contudo em 2015 alterou esse limite para 5 µg/kg peso/dia [42, 43]. No entanto, mesmo este último valor está muito acima da exposição diária e vai em contra o que muitos estudos apontam, cujos efeitos adversos surgem a concentrações 70 a 5000 vezes inferiores a esse limite [44-46].

No que diz respeito à absorção cutânea e/ou inalação, estas podem estar associadas a um nível mais elevado de exposição de BPA não conjugado ou biologicamente ativo, que pode persistir por longos períodos de tempo na corrente sanguínea quando comparado ao ingerido, que é sujeito a um metabolismo de primeira passagem [10, 47].

1.3.5. Conjugação, Metabolização e Excreção

No que diz respeito ao plasma, cerca de 90% do BPA encontra-se ligado a proteínas séricas, no estado inativo [48]. Também foi demonstrado que o BPA pode penetrar e acumular-se na placenta humana, a níveis mais elevados do que os detectados no plasma materno, indicando que as enzimas placentares podem desconjugar o BPA para a sua forma ativa [10, 36, 49]. Para além disso, estudos posteriores sugerem que o BPA não conjugado ou ativo, pode atravessar prontamente através da placenta para a circulação fetal [50], e a expressão de enzimas metabólicas responsáveis pela glucuronidação para a sua forma inativa encontram-se reduzidas durante o período pré-natal [51]. Estudos adicionais são necessários para a compreensão da extensão da exposição fetal e dos infantes ao bisfenol A.

A glucurono-conjugação representa uma via de desintoxicação importante porque o BPA glucuronido, ao contrário do BPA livre, não se liga aos recetores de estrogénio e portanto são considerados biologicamente inativos [29, 52]. No entanto um estudo recente demonstrou que as formas conjugadas de BPA podem perturbar respostas celulares em células de prolactinomas, presumivelmente através de interações com o ERα da membrana [53].

Uma vez ingerido, o BPA é metabolizado no fígado em bisfenolA glucuronido, o principal metabolito reportado em ratos, pela uridina- 5'-difosfo-glucoronil transferase (UGT), isoforma UGT2B1, que apresenta uma maior solubilidade [27, 54]. O BPA nos humanos é rapidamente glucuronidado e excretado na urina, enquanto que nos ratos o BPA passa para a circulação entero-hepática [55]. No entanto ainda foi sugerido que ocorre a metabolização do BPA a 3-hidroxi BPA (BPA catecol) e a BPA o quinona pelo citocromo P450sCYPs) [56, 57]. Portanto as enzimas CYP e UGT estão intimamente relacionadas com o metabolismo e toxicidade nos mamíferos. O BPA glucuronidado é suficientemente estável e representa o biomarcador válido de exposição [41]. Para além disso, o BPA monoglucoronida foi identificada como sendo um metabolito in vivo predominante em ratos, macacos e humanos. [55, 58]. Ainda se destaca o sulfato do bisfenol A, um metabolito importante do BPA determinado in vivo, no entanto a sulfonação representa uma via metabólica minoritária [59].

O BPA não conjugado é excretado através da bÍlis ou urina, havendo ainda um estudo que aponta para que também possa ser excretado pelo suor [60].

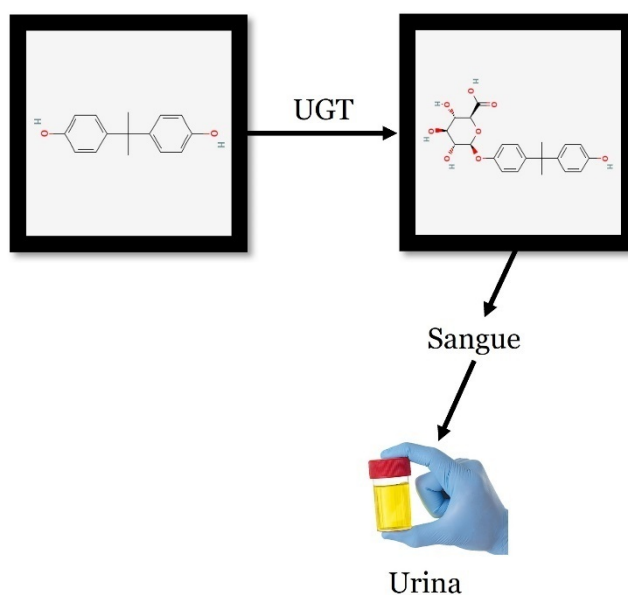


Figura 2-Glucuronidação do BPA em humanos

1.3.6. Mecanismos de Ação

O bisfenolA, tal como outros disruptores endócrinos interage com recetores estrogénicos, androgénicos, da hormona tiroideia e recetores ativados por proliferadores de peroxissoma, atua como agonista ou antagonista por uma via de sinalização dependente do recetor. Estas ações são atribuídas à sua estrutura fenólica [54, 61]. Relativamente aos efeitos relacionados com os recetores estrogénicos, destacam-se a proliferação e migração de cancros como o da mama e dos ovários e aumento do peso corporal [41]. A relação BPA-AR (recetor de androgénios) está associada a efeitos adversos na espermatogénese, esteroidogénese, atrofia dos testículos, e alterações dos parâmetros de esperma de adulto, como a contagem de espermatozoides, motilidade e densidade, em experiências com modelos animais e humanos [62, 63].

Outro dos mecanismos de patogenicidade do BPA, passa pela desregulação de fatores transcricionais (TF). Particularmente, alguns estudos mostram que a indução de TFs adipogénicos, como o PPAR γ , C/EBP β e Nrf2, desempenha um papel crucial no efeito obesogénico do BPA [41].

1.3.7. Efeitos e Legislação

Ao longo destes últimos anos tem sido uma preocupação crescente as consequências que a exposição continua ao BPA tem na saúde [14]. Até à data mais de 5000 estudos sobre a toxicidade do BPA foram publicados e indicam que baixas doses do composto podem levar a efeitos adversos na saúde humana. Vários artigos denotam a sua ação tóxica, endócrina, mutagénica e carcinogénica [26, 64]. A nível reprodutor há uma pesquisa exaustiva dos efeitos provocados pelo BPA entre eles está uma maior suscetibilidade para os cancros da próstata [65], ovário e do cérvix [66, 67] bem como aumentou o aparecimento de metástases [68]. Também há fortes indicadores que o bisfenol A esteja associado à endometriose e à síndrome dos ovários poliquísticos [69, 70, 71]. Tanto nas mulheres como nos homens foi identificada uma desregulação na secreção de hormonas sexuais, bem como degeneração dos oócitos [72] e diminuição de espermatozoides e da sua motilidade [73, 74], respetivamente.

Os elevados níveis de BPA também se encontram associados a uma função renal deteriorada bem como uma diminuição da taxa de filtração glomerular (GFR) [75]. Para além disso, o BPA contribui para o desenvolvimento de doenças hepáticas não alcoólicas, nomeadamente a doença do fígado gordo [76]. Adicionalmente o BPA pode

atuar na função imune e promover a ocorrência de algumas doenças relacionadas com alergias, como a asma, hiper-responsividade brônquica, diabetes mellitus tipo 1, doenças autoimunes da tiroide [77-79]. As doenças neurodesenvolvimentais, como desordens do espectro do autismo foram associadas à exposição do BPA[80]. Além disso, o BPA pode aumentar o perímetro abdominal, levar a obesidade e afetar o metabolismo ósseo através da disrupção do metabolismo cálcio-fosfato e da redução da densidade mineral óssea [81, 82]

Estes efeitos adversos levaram a que países como a Dinamarca e a Bélgica, restringissem o uso de BPA na constituição de embalagens alimentares de crianças entre os 0 e os 3 anos de idade. A Suécia também limitou o uso de BPA em vernizes e coberturas de embalagens alimentares para crianças na mesma faixa etária. Também, a Áustria restringiu o uso de BPA em chupetas e biberons desde Outubro de 2010 [83]. Assim o parlamento europeu estabeleceu uma Diretiva 2009/48/CE para os brinquedos, onde instituiu certos requisitos aplicáveis a substâncias químicas que são classificadas como cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução ao abrigo do Regulamento (CE) nº1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. O apêndice C do anexo II da respetiva diretiva estabelece valores-limite específicos para produtos químicos utilizados em brinquedos destinados a serem utilizados por crianças com menos de 36 meses ou outros brinquedos destinados a serem colocados na boca. O valor-limite específico para o bisfenol A é de 0,1 mg/L (limite de migração). A utilização do BPA em vernizes e coberturas em produtos que envolvem alimentos não deve exceder o valor limite de 0,05 mg por Kg de alimento (limite de migração) [84]. De acordo com o Instituto Português da Qualidade, foi posto em vigor o Decreto-Lei 43/2011 de 24 de março, que estabelece a segurança dos brinquedos e outros, transpondo a Diretiva acima descrita.

Na figura 3 estão esquematizados alguns dos efeitos disruptores do BPA no ser humano.

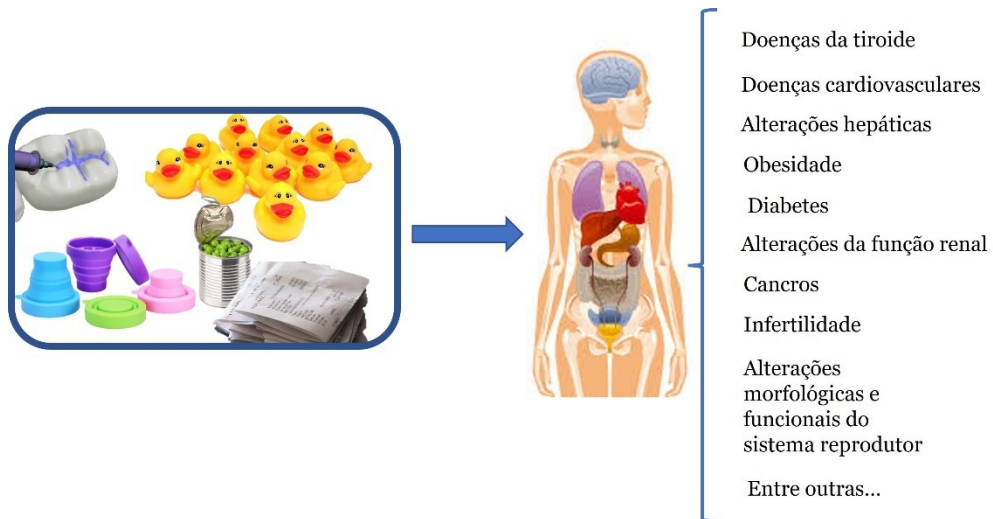


Figura 3-Efeitos provocados do BPA no ser humano

1.4. Efeitos do BPA a nível cardiovascular

1.4.1. Estudos em animais

1.4.1.1. Estudos *In vivo*

1.4.1.1.1. Alterações morfo-fisiológicas no desenvolvimento do coração

Vários fatores como condições médicas e estilo de vida, de acordo com a agência de controlo e prevenção de doenças, CDC, podem contribuir para o aumento do risco de doenças cardiovasculares incluindo: diabetes, sobrepeso e obesidade, dietas pouco saudáveis, sedentarismo e consumo excessivo de álcool. Tendo isto em conta, Patel et. al (2013) demonstrou que a exposição de BPA (0.5, 5.0 e 200 µg/kg/dia) afeta alguns parâmetros morfológicos, nomeadamente em ratos fêmeas e machos expostos a 5.0µg/Kg/dia que aumentaram o peso corporal, o índice de massa corporal, a área de superfície corporal e adiposidade. Adicionalmente a ecocardiografia identificou uma remodelação concêntrica em todos os machos tratados com BPA.

Gear et. al (2015) demonstrou que concentrações de BPA compreendidas entre 2.5-25000 µg/kg/dia administradas em murganhos com 90 (PND90) e 180 (PND180) dias provocaram diminuição do colagénio no coração de murganhos fêmeas e um aumento em murganhos machos com 21 dias (PND21). Para além disso, a incidência e gravidade de cardiomiopatia aumentaram significativamente em fêmeas tratadas com BPA em comparação com fêmeas controlo em PND21, com degeneração do miocárdio observada em machos e fêmeas PND21 e PND90[14].

Ainda sobre alterações morfológicas, foram observadas por Moreman et. al (2017) em embriões de peixe-zebra malformações no desenvolvimento das larvas expostas ao BPA(0.1 e 1.0 mg/L), que incluem edema cardíaco, malformações da espinha e deformidades craniofaciais [85]. No mesmo modelo animal, outros autores demonstraram que a exposição ao BPA(1000µg/L) e do seu metabolito, MBP (25µg/L) provoca alterações ultraestruturais nas secções da válvula auriculoventricular de embriões peixe-zebra 15 dpf(15 dias após fertilização). Para além disso, a exposição ao BPA(100 e 1000 µg/L) e MBP (2.5 e 25µg/L) em embriões 5 e 15 dpf resultou numa expressão diferencial significativa, principalmente diminuição da expressão quando comparada com os controlos, numa gama de genes responsáveis pelo desenvolvimento e função de válvulas cardíacas[86]. No que diz respeito à matriz extracelular existente entre a bicamada de células da válvula, verificou-se um estreitamento da matriz e falta de colagénio na mesma, nos tratamentos com exposição elevada de BPA e MBP [86].

Por outro lado, o processo de cardiogénese também ele, é prejudicado quando há exposição ao BPA na fase embrionária. Num estudo em peixes zebra adultos os machos foram expostos a BPA(100 e 2000µg/L) durante a espermatogénese e posteriormente acasalaram com fêmeas não tratadas [87]. Lombo et. al (2015) demonstrou um aumento na taxa de insuficiência cardíaca dos progenitores até a geração F2. Para além disso, foi mostrada uma regulação negativa de 5 genes envolvidos no desenvolvimento cardíaco em embriões F1. O BPA também causou uma diminuição nos mRNAs remanescentes relacionados com o desenvolvimento inicial em espermatozoides de F0 e F1 [87]. Anos mais tarde, o mesmo autor estudou a exposição de BPA(2000 e 4000µg/L) e de BPA combinada com EGCG (epigallocatequina galato)(50 e 100 µM), onde foram observadas malformações cardíacas, principalmente: edemas cardíacos, defeitos na posição das cavidades cardíacas e acumulação de sangue. Neste mesmo estudo foi verificado um aumento da acetilação de histonas (especialmente na H3K9 e H4K2) devido à promoção de um fator crucial da diferenciação de cardiomiócitos, Hand2, em embriões de peixes-zebra. Demonstrou-se assim que as exposições de BPA durante as fases iniciais da vida afetam o desenvolvimento do coração [88].

1.4.1.1.2. Aterosclerose

O processo de aterosclerose é um dos principais fatores indutores das doenças cardiovasculares. Tem início na disfunção endotelial e defeito estrutural, e posteriormente dá-se a acumulação de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL) causando lesões precoces de placas gordurosas [89]. Kim et. al (2014) demonstrou que baixas doses de BPA (50µg/kg de peso corporal/dia) aceleraram o progresso de aterosclerose num modelo de murganho sujeito a disfunção endotelial e inflamação vascular. Nos murganhos sem apolipoproteína E(ApoE-/-), alimentados com BPA via água potável por 12 semanas, verificou-se um aumento do número de lesões de aterosclerose na aorta, em comparação com o controlo (aqueles que não foram expostos ao BPA) [89]. Este artigo estabelece uma associação entre a baixa dose de BPA, consistente com a exposição crónica e contínua, e a aterosclerose.

A exposição perinatal ao BPA (50 mg/kg) foi apontada como causa do aumento da aterosclerose em murganhos com défice de apolipoproteína E2(ApoE2), em machos adultos de uma maneira dependente do receptorpregnano X humano (PXR) [90]. Este recetor foi utilizado pois a sua ativação pode causar um aumento da aterosclerose em murganhos com défice de ApoE2. A escolha do modelo animal do recetor baseou-se exclusivamente no facto de o BPA ser um potente agonista do PXR humano e não ativar

o PXR do murganho. A regulação epigenética de CD36 do ácido gordo transportador na aorta foi apontada como a causa do agravamento da ATH (aterosclerose) em murganhos machos com déficit de ApoE2 submetidos a tratamento com BPA, pois não foi afetado o nível de lípidos no plasma [90].

Estes estudos indicam que a exposição ao BPA pode aumentar a suscetibilidade de aterosclerose, contudo os mecanismos moleculares ainda não estão totalmente compreendidos.

1.4.1.1.3. Pressão arterial e função vascular

Relativamente, a parâmetros mais diretos indicadores de doenças cardiovasculares, temos também a pressão sanguínea. Saura et.al (2014) demonstrou em murganhos que a exposição oral a BPA (4nM- 400µM) provoca o aumento da pressão sanguínea, assim como prejudica a relaxação da carótida [91].

Por sua vez Belcher et. al (2015) e o seu grupo, mostraram que a exposição ao BPA resultou na diminuição das pressões sistólica e média auricular (MAP) em murganhos machos e fêmeas. Além do mais, os machos expostos a concentrações de BPA acima de 5µg/kg/dia apresentaram uma diminuição significativa da pressão arterial sistólica, o mesmo se verificou nas fêmeas do grupo de maior exposição ao BPA (5000µg/kg/dia)[92]. No mesmo artigo ainda são descritas experiências usando o agonista adrenérgico fenilefrina, que revelaram que o BPA aumentou a bradicardia reflexa em fêmeas, mas não em machos. Ainda se verificou um aumento da sensibilidade dos efeitos cardiotoxicos do agonista α -adrenérgicoisoproterenol em fêmeas expostas ao BPA e naquelas expostas a EE(~0.02, 0.2 e 0.15µg/kg.dia) (17 α -etinilestradiol). O mesmo não se verificou nos murganhos machos expostos ao BPA ou EE, estes foram protegidos de dano isquémico induzido por isoproterenol e hipertrofia [92].

1.4.1.1.4. Alteração da frequência cardíaca

A variabilidade da frequência cardíaca (HRV) reflete as mudanças de batimento em intervalos RR, que estão relacionados com a interação entre dois braços do sistema nervoso autónomo: o sistema nervoso parassimpático e simpático [93]. Alterações na HRV podem ocorrer como resposta a stress mental ou físico, a doenças cardíacas ou não cardíacas, ou ao tratamento farmacológico ou invasivo[94, 95].Para além disso, o desequilíbrio do sistema nervoso autónomo, com uma mudança para o aumento

simpático e diminuição do tônus vagal, foi associado a um maior risco de mortalidade cardíaca[94]. Por esta razão, a HRV tornou-se uma ferramenta importante para identificar pacientes em risco de morte cardiovascular.

1.4.1.1.5. Alterações Hematológicas

Variações em parâmetros, como o hematócrito (Hct), o volume de glóbulos vermelhos (RBCs) no sangue total, e hemoglobina(Hb) estão associados a um maior risco de doença cardiovascular. Além disso, há o fator α induzível por hipoxia, que desencadeia eritropoiese, angiogénese e aumenta as vias glicólicas durante a hipoxia, e cuja interação com o BPA *in vitro* está documentada[96, 97].

Num estudo realizado em embriões de peixe-zebra, Cypher et. al (2015) testou se a resposta cardiovascular era alterada pela presença de BPA. Os resultados mostraram que a densidade dos glóbulos vermelhos (RBC) aumentou 35 % nos casos onde se aplicou apenas a hipoxia, mas diminuiu 48% com a adição de 0,25 mg/L de bisfenol A. Embora a vascularização do tecido não tenha sido afetada pela própria hipoxia, esta diminuiu 37% com a adição da mesma concentração acima mencionada. Também é importante mencionar que o diâmetro e velocidade de hemácias nas artérias foram mais responsivos do que as das veias quando expostas ao BPA durante a normóxia e a hipoxia. Quando foi adicionado 1mg/L de BPA, a velocidade de hemácias arteriais diminuiu 40 % nos estados de normóxia e hipoxia. Em suma, Cypher et. al demonstrou que o BPA e a concentração baixa de oxigénio(hipoxia) induzem bradicardia grave e uma redução no débito cardíaco com uma curva dose-efeito em U invertido [96]. Após 3 anos deste estudo Cypher et. al estudou a exposição simultânea de BPA e hipoxia e se eles podem alterar a função cardiovascular de uma que difere dos efeitos individuais. A velocidade dos glóbulos foi 25 % menor com 0,01 μ g/L de BPA e hipoxia quando comparada ao controlo hipóxico. A concentração de bisfenol e oxigénio interagiram e afetaram parâmetros vasculares, particularmente a velocidade das hemácias arteriais [98].

1.4.1.1.6. Miocardite e Pericardite

A Organização Mundial da Saúde define a miocardite como uma doença inflamatória do miocárdio, músculo cardíaco, que pode ocorrer isoladamente ou como parte de distúrbios imunes mediados por múltiplos órgãos/sistêmicos ou por reações a substâncias exógenas/endógenas[99, 100]. Enquanto a pericardite é a inflamação do pericárdio, uma membrana dupla que envolve o coração e pode ser infecciosa ou secundária a uma doença sistêmica[101]. O pericárdio normal protege, restringe o coração e é um determinante importante dos padrões de enchimento cardíaco[102].

Bruno et. al (2019) demonstrou que a exposição a elevadas doses de BPA aumenta o risco de murganhos fêmeas sofrerem de miocardite, com uma curva dose-efeito em forma de U invertido. Acredita-se que certas drogas exógenas/radiação/quimioterapia tenham curvas de dose-resposta lineares; no entanto esse não é o caso das hormonas. Os EDCs têm as mesmas características das hormonas, uma delas é uma curva dose-efeito em forma de sino, U invertido, que é denominada hormesis, uma vez que baixas e altas concentrações de EDC têm um efeito prejudicial à saúde, enquanto um nível médio ou moderado é o mais indicado para a saúde[15, 103]. O risco aumentado de miocardite deve-se a uma diminuição significativa de $ER\alpha$ (receptores alfa de estrogénio) e um aumento da expressão de $ER\beta$ no coração de ratos fêmeas. O que está de acordo com outro estudo que disse que o BPA provocava aumento dos níveis de $ER\beta$ promove arritmias e piora a função cardíaca, enquanto o $ER\alpha$ possuía um efeito protetor. Além do mais, verificou-se um risco aumentado de pericardite viral, uma inflamação das camadas pericárdicas devido à desgranulação dos mastócitos [103, 104].

Conclui-se pela análise dos estudos *in vivo* que o BPA parece provocar alterações morfológicas desde edemas cardíacos à acumulação/ ou diminuição de colagénio em tecido cardíaco de forma sexualmente dimórfica, ao aumento de peso corporal e inclusive do coração. Para além disso, verificou-se que o BPA altera a pressão arterial de forma dimórfica. No que diz respeito a doenças cardiovasculares, o BPA apresenta uma associação positiva com o surgimento de aterosclerose, miocardite e pericardite. E, não menos importante verificou-se uma ligação entre o BPA e as arritmias cardíacas.

1.4.1.2. Estudos *In vitro*

1.4.1.2.1. Alterações morfo-fisiológicas e no desenvolvimento do coração

Para além das doenças propriamente ditas, o BPA (5000µg/kg•dia) pode causar também alterações a nível tecidual como Belcher et. al (2015) verificou. No mesmo estudo o autor observou alterações sexualmente dimórficas na composição da matriz extracelular de colagénio, aumento da fibrose e evidências de remodelação relacionada à exposição ao composto [92].

Patel et. al (2013) ainda estudou algumas proteínas essenciais no processo de contração e relaxação como é o caso da ATPase2a proteína do reticulo sarcoendoplásmico (SERCA), permutador de Na⁺ e Ca²⁺, fosfolambano (PLB) e calsequestrina2. Nesse estudo foram observadas em corações de ratos alterações na expressão destas proteínas, que sugerem um aumento da mobilidade do cálcio nos machos e uma redução da mobilidade nas fêmeas, achados que suportam as alterações da função cardíaca. Também foi verificado um aumento da expressão da DNA metiltransferase 3a em todos os machos expostos ao BPA e em fêmeas expostas a 0.5 µg/kg/dia, e que essa expressão diminui em fêmeas expostas a 100µg/kg/dia. A metilação global do DNA foi aumentada em machos expostos a 0.5 µg/kg/dia. Para além disso, verificou-se que o BPA afetou a metilação epigenética do DNA da ilha de calsequestrina 2 CpG de uma forma dependente do sexo [105]. Este estudo sugere então, que a exposição contínua ao BPA tem impacto na estrutura/função cardíaca, expressão de proteínas e mecanismos de metilação de DNA.

O papel do BPA no stress tecidual foi avaliado por Filice et. al 2021 no coração de peixes-dourados, ao analisar o stress e os marcadores pró-apoptóticos, como HSPs, Bax e citocromo C em extratos cardíacos. Os resultados mostraram que apesar da expressão inalterada de Hsp70 e Hsp90 na presença de BPA 10µM, esta diminuiu significativamente em animais expostos a 25µM no mesmo período de tempo. No entanto, eles revelam a hipótese de que a apoptose é ativada em baixas concentrações do composto disruptor endócrino, explicada pelos níveis aumentados dos marcadores pró- apopticos Bax e Citocromo, detetados após a exposição a 10µM de BPA, mas não a 25µM. Este mesmo estudo mostrou níveis de peroxidação lipídica inalterados, níveis aumentados de OMP (proteínas modificadas por oxidação) e atividade aumentada de SOD (superóxido dismutase) em corações de peixinhos dourados expostos a 10µM, o que sugere que, na presença de baixas concentrações de BPA, um aumento de SOD pode contribuir para neutralizar a peroxidação lipídica. Por outro lado, em altas concentrações de BPA, não apenas a peroxidação e o OMP diminuíram, mas também a

atividade da enzima antioxidante [106]. Assim sendo, ficou demonstrado que o BPA pode ser indutor de condições de stress para o coração resultando em alterações morfo-funcionais deletérias dependentes da concentração e do tempo de exposição.

Em 2020, Zhou et. al mostrou que 100µg/L de BPA quando combinados com 2000µg/L de perfluorooctanosulfonato (PFOS), um poluente orgânico persistente, resultaram num espessamento interventricular relevante em corações fetais de rato e um aumento significativo nos níveis gerais de colagénio. Além disso, exposições individuais e combinadas a 10 ng/mL de BPA e 100 ng/mL de PFOS durante a diferenciação de células embrionárias podem aumentar o tamanho dos cardiomiócitos, aumentar a expressão do colagénio e danificar as mitocôndrias. Para resumir, a exposição combinada destes compostos pode levar a efeitos adversos no desenvolvimento do coração e a interação entre PFOS e BPA pode afetar o coração fetal de rato [107].

No que toca a mecanismos epigenéticos, Patel et al. realizou um estudo onde verificou mudanças na expressão de proteínas da homeostase do cálcio, sugerindo um aumento da mobilidade do cálcio nos ratos machos e redução da mobilidade do cálcio nas fêmeas, corroborando as alterações do BPA na função cardíaca. A expressão da DNA metiltransferase 3a foi aumentada em todos os machos expostos ao BPA (0.5, 5.0 e 200 µg/kg/dia) e fêmeas expostas a 0.5µg/kg/dia e reduzida em fêmeas expostas a 200µg/kg/dia. Finalmente, a metilação global do DNA foi aumentada em machos expostos a 0.5µg/kg/dia[105]. Este estudo sugere assim, que a exposição contínua ao BPA altera a estrutura e funções cardíacas, expressão proteica e marcadores de metilação epigenéticos de DNA em machos e fêmeas.

1.4.1.2.2. Pressão arterial e função vascular

A pressão arterial elevada, também designada de hipertensão, de acordo com a WHO e a CDC, dá-se quando esta é maior que o valor de referência dado como “normal”. Geralmente a pressão sanguínea é escrita como dois números, o primeiro deles corresponde à pressão sistólica, quando o coração contraí e o segundo, pressão diastólica quando o coração relaxa. O diagnóstico é atribuído, quando após dois dias de medições, a pressão sistólica foi superior a 140 mmHg e a diastólica superior a 90 mmHg. Relativamente à hipotensão, esta é uma diminuição da pressão arterial sistémica abaixo dos valores aceites. Embora, não esteja estabelecido um valor hipotensivo padrão aceite, as pressões inferiores a 90/60 mmHg são consideradas hipotensivas [108].

Saura et. al (2014) demonstrou *in vivo* uma associação positiva entre a exposição ao BPA e o aumento da pressão sanguínea. Porém no mesmo estudo realizou experiências *in vitro* de forma a descobrir o mecanismo envolvido. Os resultados mostraram um aumento dependente da dose, de angiotensina II e de marcadores do stress oxidativo em murganhos tratados com BPA (4nM a 40µM em água consumível) [91]. Os processos inflamatórios e o stress oxidativo podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão, remodelação cardíaca e doenças cardiovasculares [10]. Assim Saura et. al também sugeriu que a exposição ao BPA em modelos animais provocou um aumento da pressão sanguínea, mediado pelo desacoplamento de AngII/CAMK II pela síntese de óxido nítrico endotelial [91].

O BPA é considerado um agonista de estrogénio, contudo, trabalhos recentes realçam que a atividade estrogénica pode induzir quer a vasodilatação quer a vasoconstrição, dependendo do produto do óxido nítrico sintase, óxido nítrico ou superóxido [109]. Contudo, esta é uma área que requer uma atenção adicional, uma vez que a exposição ao BPA provocou efeitos distintos na pressão sanguínea em modelos roedores. Embora essa discrepância possa ser atribuída ao design experimental, que inclui diferentes doses, duração do tratamento, e animais de diferentes idades [10].

A relação entre insuficiência cardíaca e doenças vascular é marcada pelo stress oxidativo, causado por isquemia, disfunção ventricular esquerda e ativação neuroendócrina [110]. É posta a hipótese de que o BPA tenha influência no mesmo, uma vez que pode alterar parâmetros como os níveis de óxido nítrico (NO). O grupo de Ezz. Et. al estudou o efeito da exposição ao BPA nos níveis de NO de ratos albinos machos. Os efeitos adversos do BPA no coração de rato são principalmente causados pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). A excessiva concentração de ROS resulta na oxidação e danos no DNA, membranas, proteínas e outras macromoléculas [111]. Em concordância os resultados revelaram um aumento da peroxidação lipídica, diminuição do nível de redução de glutatona (GSH), bem como diminuição da atividade da catalase, indicando que a exposição ao BPA induziu a produção de ROS. Além disso, é postulado que o nível diminuído de NO e a redução das defesas antioxidantes do coração podem resultar em vasoconstrição, o que, consequentemente pode levar à diminuição do suprimento de sangue ao tecido cardíaco, resultando num quadro de isquemia miocárdica [112].

No que diz respeito a canais iónicos, Asano et. al, realizou um estudo com células musculares lisas da artéria descendente anterior provenientes de cães, para avaliar o efeito do BPA nos canais K⁺ (Maxi-K) sensíveis ao Ca²⁺ de alta condutância. Primeiramente, o BPA 10 µM ativa uma corrente externa nas células do músculo liso que foi inibida pelo

penitrem (1 μM), um bloqueador dos canais Maxi-K. Adicionalmente mostrou que células AD-293 com canais Maxi-K compostos por única subunidade, α , o BPA 10 μM não afetou a atividade dos canais. No entanto quando estas continham subunidades β_1 , o BPA 10 μM aumentou a atividade do canal. Os efeitos do bisfenol A foram rápidos e reversíveis [113]. Em suma, o BPA aumentou a atividade dos canais Maxi-K e pode representar uma base para os efeitos toxicológicos deste composto. O estudo de Rottgen et. al veio corroborar os resultados anteriores, uma vez que demonstraram que o BPA ativa os canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK) através do aumento da expressão das subunidades α e β_1 que os constituem [114]. Portanto, ambos os autores deixam como hipótese de que ativação dos canais pelo BPA é feita de maneira não genômica.

Os canais de cálcio do tipo L estão associados particularmente, embora não exclusivamente ao sistema cardiovascular e estão bem caracterizados por ligandos que são pequenas moléculas, os bloqueadores de canais de cálcio, são uma grande classe terapêutica nas doenças cardiovasculares [115]. Feiteiro et. al demonstrou que as concentrações de 0,005, 1,10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de BPA inibiam a corrente dependente de cálcio basal, e que essa inibição foi rápida e reversível após lavagem do composto. A inibição mais pronunciada ocorreu para as concentrações mais elevadas, 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Adicionalmente excluiu-se a hipótese de o efeito vasorelaxante do BPA advir da produção de NO, uma vez que o endotélio foi removido, no entanto atribui-se esse efeito à diminuição do influxo de cálcio pelo bloqueio dos LTCC [116].

1.4.1.2.3. Alteração da frequência cardíaca

No referente ao efeito do BPA na frequência cardíaca, podemos destacar o estudo de Belcher et. al, de 2012, onde foi observada a contractilidade em cardiomiócitos de ratos Sprague-Dawley. A curva de concentração vs. resposta para os efeitos estimulatórios (contractilidade e arritmogénico) do BPA e do E2 em miócitos de fêmea tem a forma de um “U” invertido”, isto é as concentrações intermédias de BPA utilizadas têm um efeito maior em relação às concentrações mais baixas e mais altas, neste caso, maior toxicidade. Relativamente a efeitos na contractilidade, observaram-se a partir da concentração 10^{-12}M , porém a concentração mais eficaz foi de 10^{-9}M , isto para cada um dos compostos, BPA e E2. Contrariamente não foi observada sensibilidade ao E2 e ao BPA em miócitos masculinos e esta foi abolida em miócitos de fêmeas ovariectomizadas [117]. Os resultados deste estudo são indicadores que a atividade arritmogénica do BPA e do estradiol no coração feminino é regulada pelo equilíbrio da sinalização entre $\text{ER}\alpha$ e $\text{Er}\beta$.

Adicionalmente, as arritmias de acordo com Yan et. al 2011 são o resultado dos efeitos do BPA e E2 mediados pela sinalização ER β , em que ocorre uma rápida alteração na manipulação de Ca²⁺ no miócito, particularmente pelo aumento da libertação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (SR). Os efeitos mencionados anteriormente foram abolidos quando as amostras foram pré-tratadas com um antagonista do recetor de estrogénio (ER)[118].

Finalmente, Posnack et. al realizou em 2015 um estudo com tecido de corações de rato, previamente expostos a 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M de BPA. Verificou-se que, a exposição ao BPA, durante o ritmo sinusal em corações femininos, diminuiu a pressão do ventrículo esquerdo e apresentava um efeito inotrópico, sendo estes efeitos dependentes da concentração do BPA. A contratilidade diminuída foi exacerbada em taxas de estimulação mais altas. Os efeitos induzidos pelo BPA no desempenho contráctil também foram observados em corações masculinos, embora em menor extensão [119]. A exposição ao BPA parece prejudicar a condução elétrica, a regulação de Ca²⁺ intracelular, bem como a contractilidade ventricular.

Os efeitos do BPA observados em modelos animais *in vitro*, passam desde alterações morfológicas, como o aumento da fibrose no tecido cardíaco, a um aumento do stress oxidativo, que pode desencadear isquemia do miocárdio, bem como aumento de marcadores pró apópticos. Adicionalmente, alterações dos canais iónicos também foram reportadas, como o aumento da atividade de canais Maxi-K e o bloqueio de canais de cálcio do tipo L. Também se verificou uma associação positiva com a hipertensão e com o surgimento de arritmias cardíacas.

1.4.2. Estudos *Ex vivo*

1.4.2.1.1. Alterações morfo-fisiológicas e no desenvolvimento do coração

No referente a alterações morfológicas *ex vivo*, Filice et. al no mesmo estudo descrito anteriormente utilizou preparações de coração de peixe dourado em *ex vivo*, onde mostrou que elevadas concentrações de BPA afetam negativamente a hemodinâmica cardíaca, revelada por uma resposta Frank-Starling prejudicada. A resposta Frank-Starling consiste na habilidade do coração para ajustar a força das suas contrações em resposta a alterações de preenchimento ventricular, isto é, variações no volume sanguíneo. A nível morfológico verificou-se alterações estruturais do miocárdio e índices cardiossômáticos aumentados [106].

1.4.2.1.2. Alteração da frequência cardíaca

Os resultados obtidos por SujuanYan et. al, num estudo que envolveu corações de ratos adultos Sprague-Dawley expostos a 1nM de BPA e/ou 17 β -estradiol(E2) mostraram uma indução rápida da atividade arritmogénica em fêmeas, mas não em machos. Os efeitos do BPA foram pronunciados quando combinados com o estradiol, o que sugere uma relação sinérgica entre eles [118].

Em seguimento do artigo anterior, a exposição de apenas BPA e de BPA e E2(1nM) em corações de ratos adultos Sprague-Dawley durante a reperfusão provocou um aumento da duração de arritmias ventriculares, em fêmeas. A combinação de BPA e E2 resultou num aumento da duração da fibrilação ventricular. SujuanYan et. al (2013) verificou que os efeitos pro-arrítmicos estrogénicos foram abolidos pelo MPP (1,3-bis(4-hidroxi-fenil) -4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoxi) fenol] -1H-pirazole dicloridrato) combinado com PHTPP(4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-il]fenol), bloqueadores do ER α e ER β , respetivamente. Apesar dos seus efeitos pró-arrítmicos, o BPA e o E2 reduziram o tamanho do enfarte, o que está em concordância com o efeito protetor do estrogénio contra o enfarte cardíaco [120].

No mesmo período, Gao et. al (2013) examinaram corações de ratos fêmeas. Neste estudo verificaram que o BPA ativou as vias de sinalização de proteína cinase A (PKA) e Ca²⁺/proteína cinase II dependente de cálcio ou calmodulina(CAMKII). O mesmo grupo ainda verificou que a exposição a 1nM de BPA aumentou rapidamente a produção de cAMP e também aumentou rápida, mas transientemente a fosforilação dos recetores de rianodina(RyR), canais que permitem a libertação de Ca²⁺ do reticulo sarcoplasmático nos cardiomiócitos, pela PKA, mas não pela CAMKII [121]. Para além disso, Gao et. al demonstrou ainda que o bisfenol A aumentou rapidamente a fosforilação do fosfolambano(PLN), um regulador proteico, que permite a recaptura de Ca²⁺ para o SR, pela CAMKII, mas não pela PKA. O aumento na CAMKII da fosforilação de PLN foi mediado pela fosfolipase C (PLC) e a libertação de Ca²⁺ do reticulo endoplasmático mediada pelo recetor do inositol trifosfato. Estes dois mecanismos são rápidos, mas transientes e ambos mediados pela sinalização do ER β . [121]. Por fim, a análise funcional, de pontos fulcrais como a libertação de Ca²⁺, atividade arritmogénica e a contractilidade de miócitos, demonstrou que a ativação da PKA mas não a CAMKII contribuíram para a libertação de Ca²⁺ do reticulo sarcoplasmático, e ambas, PKA e CAMKII contribuíram para o efeito estimulante do BPA na arritmogénese [121]. Na fig.4 é possível ver esquematizado o mecanismo de ação do BPA proposto por Gao et. al.

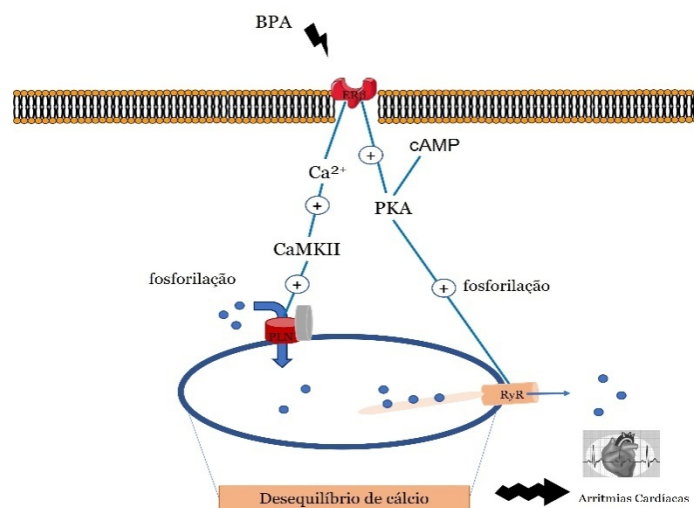


Figura 4-Resumo esquemático dos resultados de Gao et. al. (2013)

Ainda sobre a função cardíaca, Posnack et.al verificou que a exposição ao BPA (0.1-100 μ M), em corações de ratos Sprague-Dawley resultou em segmentos PR prolongados e numa diminuição da velocidade epicardial, duração do potencial de ação aumentada para as concentrações compreendidas entre 1 e 100 μ M e um atraso da condução auriculoventricular (10-100 μ M). A concentração mais elevada de BPA usada (100 μ M) resultou em intervalos QRS prolongados e batimentos ventriculares fracos, e conseqüentemente bloqueio cardíaco completo [122].

Os estudos ex-vivos resumem-se em alterações da função cardíaca, nomeadamente no surgimento de arritmias cardíacas, quer por meio dos recetores $ER\alpha$ e $ER\beta$, quer por alterações nas concentrações intracelulares de cálcio e, em alterações morfológicas do miocárdio. Desta forma, corroboram alguns dos estudos *in vivo* e *in vitro* acima descritos.

1.4.3. Estudos Humanos- *In Vitro*

Relativamente a marcadores da função cardíaca, Klint et. el realizou um estudo em cardiomiócitos humanos, que foram expostas a 1×10^{-4} nM. Aí demonstrou que essa exposição resultou no aumento da expressão de mRNA eNOS, ACE1, bem como de IL-8 e $NF\kappa\beta$, conhecidos como mediadores da resposta inflamatória[123]. Assim sendo, Klint. et. al propõe que doses baixas de BPA incrementam a expressão de genes envolvidos na angiogênese e na regulação do tónus vascular.

Como está descrito na literatura, o BPA provoca alterações epigenéticas. Ribeiro-Varandas et. al realizou uma análise de qPCR (reação de cadeia de polimerização quantitativa em tempo real), em que mostrou que o BPA induz uma desregulação

transcricional global, com efeito pronunciado nas HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana). Embora também as células HT29 (adenocarcinoma do colon humano) também tenham sofrido alterações transcricional, estas foram exclusivamente após 24 horas de exposição, os efeitos foram mais duradouros nas HUVEC. Além do mais, ensaios transcricionais e ensaios de viabilidade celular indicam que a exposição prolongada de BPA afeta processos de envelhecimento em HUVEC senescentes [124].

Se por um lado o VEGF é um factor pró-angiogénico extremamente potente e esteja envolvido em processos de angiogénese, sendo fundamental, principalmente após o nascimento, em certos processos fisiológicos (ciclo menstrual, gravidez, cura de feridas e reparação, etc.), onde são formadas novas redes vasculares a partir de vasos preexistentes (neoangiogenesis). Por outro também se encontra associado a processos de angiogénese patológicos, induzindo o desenvolvimento e progressão de certas condições como: o crescimento tumoral e metástases, degeneração macular, retinopatia diabética, processos inflamatórios, processos isquémicos, pré-eclampsia, entre outros [125]. Um estudo em HUVEC verificou que o BPA aumentou a expressão de mRNA do recetor do VEGF (VEGFR-2), e também de eNOS e Cx43 (conexina 43) para as concentrações de 1nM, 10 nM e 1 µM de BPA [126]. A eNOS é responsável pela síntese de NO (óxido nítrico) cuja função é a regulação do tónus vascular e a CX43 é a junção comunicante mais abundante e a sua expressão anormal está associada a condução irregular e arritmias [127]. O estudo de Andersson et. al sugere que o endotélio humano é um alvo do BPA e alterações da função endotelial desempenham um papel nos efeitos cardiovasculares e do sistema metabólico induzidos pelo BPA.

Ainda sobre a expressão de genes, a exposição a uma dose não tóxica de BPA (8ng/mL), elevou significativamente os níveis de expressão de mRNAs relacionados com a hipertrofia cardíaca, como o NPPA (péptidonatriurético A) e NPPB (péptidonatriurético B). Também se verificou um aumento da área celular e redução da suplementação de ATP, consistente com o fenótipo hipertrófico observado in vitro nas células estaminais humanas). Adicionalmente, a nível molecular, Cheng et. al demonstrou que o aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico com baixas doses de BPA permitiu discriminar o cariótipo XY (H1) do cariótipo XX (H9), o que pode sugerir um risco de hipertrofia em cardiomiócitos humanos específico do sexo [128]. A excessiva fissão mitocondrial desencadeada pelo BPA foi promovida pela desfosforilação dependente de cálcio do DRP1 (proteína dinamina 1) e mediada pelo CnA β , subtipo da calcineurina [128]. Por conseguinte, este demonstrou com recurso a células humanas, que o BPA, mesmo em pequenas doses, pode provocar hipertrofia dos cardiomiócitos.

Os canais iônicos desempenham um papel importante na geração do potencial de ação cardíaco e propagação elétrica, onde a disrupção de canais iônicos, quer na localização, expressão ou função podem provocar disritmias cardíacas [10].

A interação entre o BPA e o canal hNav1.5 foi estudada de forma a perceber se a toxicidade cardíaca poderia derivar da eletrofisiologia cardíaca modificada. O hNav1.5 é o subtipo de canal de voltagem de sódio mais rápido e é predominantemente expresso no coração humano [10, 129]. Estudos eletrofisiológicos realizados em células HEK mostraram que o BPA bloqueia hNav1.5 ($IC_{50} = 25 \mu M$) [129]. Os resultados sugerem que o BPA inibe a corrente de sódio pela interação direta com o local de ligação, que é compartilhado pelas anestésias locais, como o mexiletino. Em tecido cardíaco, tal efeito na corrente do canal de sódio causa uma redução da taxa de despolarização e uma diminuição da velocidade de condução cardíaca. A exposição ao BPA também demonstrou inibir a corrente de canais de sódio em neurônios ganglionares isolados da raiz dorsal de ratos [129].

Para além disso, um estudo de Michaela et. al em células HEK 293 mostrou que a exposição ao BPA inibe a corrente de canais de cálcio do tipo T, que são importantes na despolarização nodal das células, condução atrioventricular e na fase “plateau” do potencial de ação cardíaco, dependendo da concentração. Na discussão sugerem que o BPA modifica os canais e atua como antagonista dos canais de cálcio a concentrações mais elevadas. [130]

Ainda sobre os canais de cálcio, Deutschmann et. al demonstrou que o BPA inibe os canais de cálcio do tipo L em células endócrinas GH3 de rato, miócitos cardíacos e células embrionárias renais humanas (células HEK 293). Essa inibição é dependente de dose e reversível. Por fim, concluem que o BPA possivelmente exerce a sua ação pela ligação aos canais no seu estado de repouso, num local exterior fora da região do poro [131].

No que diz respeito a canais de K^+ (Maxi-K) sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância, estes foram utilizados por Asano et. al, uma vez que são um excelente modelo para testar as interações com BPA, já que são conhecidos por serem sensíveis ao estrogénio. Experiências em Patch-Clamp demonstraram que as concentrações baixas (1 a $10 \mu M$) de BPA não aumentaram a corrente Maxi-K. Contudo, para a concentração $100 \mu M$ de BPA a corrente aumentou significativamente [113]. Na verdade, foi posta a hipótese de a ativação dos canais Maxi-K em células de músculo liso coronário humano em cultura, por uma concentração mínima de 100 nM de BPA seja devida a uma falta de expressão de KCNMB1, gene que codifica para subunidade $\beta 1$ do canal.

Na figura 3 estão resumidos os possíveis mecanismos de ação do BPA na função cardiovascular em humanos, contudo estão apenas alguns, uma vez que muitos deles não são consensuais e, até contrários, para além de não haver estudos suficientes que os corroborem.

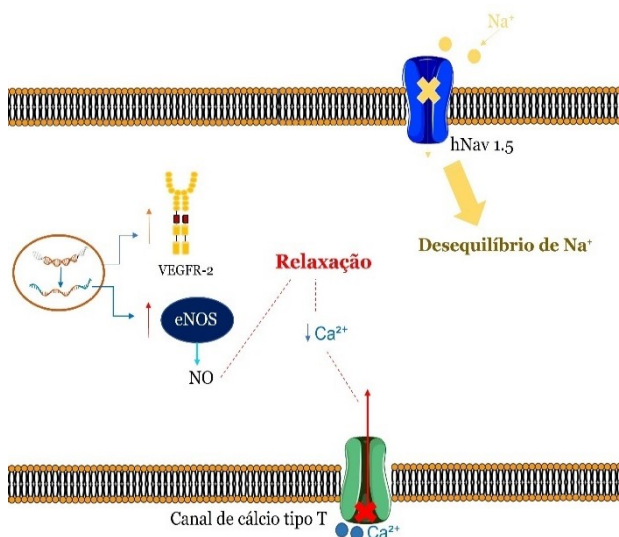


Figura 5-Resumo esquemático de alguns mecanismos do BPA em humanos.

A análise dos estudos humanos in vitro indicou que o BPA provoca alterações no processo normal da angiogénese bem como na regulação do tónus vascular. Para além disso, verificaram-se desregulações transcricionais globais, hipertrofia dos cardiomiócitos e arritmias cardíacas devido ao bloqueio e/ou ativação de determinados canais iónicos.

1.4.3.1. Estudos Epidemiológicos

A presença de bisfenol A é global e não escolhe idades, uma vez que é encontrada em fetos e crianças, até à idade sénior [132]. Vários estudos denotam que o BPA tem múltiplos efeitos disruptores endócrinos e que causam um vasto número de doenças, nomeadamente a nível cardiovascular [132, 133].

Um estudo que analisou o possível efeito deste EDC foi realizado por Bae et. al, no qual foram analisados 521 idosos, que pretendia investigar a associação do BPA com alguns parâmetros cardiovasculares, e, portanto, foram medidas as concentrações de BPA na urina, variabilidade do ritmo cardíaco e pressão sanguínea. O foco na

população idosa deve-se ao facto se serem considerados mais suscetíveis a efeitos adversos provocados por exposições ambientais [134]. Assim, nesse estudo foi observado que o bisfenol A afeta a variabilidade do ritmo cardíaco e a pressão sanguínea, de forma independente. Em suma, é sugerido que o BPA pode afetar o sistema cardiovascular não apenas pelo sistema nervoso autónomo, mas também diretamente, através da regulação da pressão sanguínea[11].

No que diz respeito a uma outra faixa etária, novamente Bae et.al, analisou o efeito do BPA em 645 crianças, que foram seguidas desde o momento em que nasceram até aos 4 anos de idade, bem como as respetivas mães durante a metade final da gestação. Assim, observou que existe uma associação positiva entre a pressão sanguínea diastólica e a concentração urinária de BPA da mãe acima do nível padrão (4.5µg/g creatinina) medido por volta das 20 semanas de gestação. Os níveis de BPA na urina parecem estar associados a um aumento da pressão sanguínea nas crianças, com um efeito mais significativo no sexo masculino comparando com as raparigas [135]. Evidências anteriores sugerem que esta associação está diretamente ligada à exposição de BPA, como demonstrado num ensaio realizado com 60 participantes por Bae & Hong et. al, onde lhes eram dadas 2 porções da bebida em 3 combinações diferentes de cada vez; 2 garrafas de vidro (GC), 2 latas de leite de soja (CC) ou 1 lata e 1 garrafa de vidro (CG) [10, 136]. Posteriormente foi medida a concentração de BPA, pressão sanguínea e a variabilidade da frequência cardíaca 2 horas após o consumo de cada produto. A concentração de BPA aumentou cerca de 16 vezes após o consumo dos produtos em lata comparando com os de vidro. A pressão sanguínea sistólica aumentou aproximadamente 4.5 mm Hg após o consumo de 2 embalagens de lata comparando com o consumo das duas embalagens de vidro, e verificaram-se diferenças estatísticas [136]. Em resumo, foi demonstrado que o consumo de latas e o consequente aumento da exposição ao BPA parece estar associado com o aumento agudo da pressão sanguínea [136].

Alguns estudos também reportaram uma relação entre a exposição ao BPA e doença arterial periférica e/ou coronária, bem como um risco aumentado de enfarte do miocárdio [137]. No ano de 2012, destacaram ainda que a exposição ao bisfenol estava associada com a severidade da estenose aórtica e futuro risco de doença arterial coronariana na população adulta [138, 139]. Ainda Melzer et. al com recurso aos dados do NHANES (national health and nutrition examination survey), pesquisa nacional de exames de saúde e nutrição, averiguou que elevadas concentrações de BPA parecem estar associadas à doença coronária, bem como ao enfarte do miocárdio [140, 141].

Uma conclusão semelhante foi reportada num estudo na população geral dos 15 aos 89 anos de idade. Nesse estudo, Arkplakorn et.al analisou amostras de sangue e, verificou que para concentrações aproximadas de 0.34 ng/mL de BPA não foi determinada uma interação entre o bisfenol A no sangue e os níveis de estradiol. Todavia foi observado que a média de BPA foi significativamente maior em indivíduos hipertensos, comparando com os normotensos, especialmente em mulheres [142].

Relativamente a mulheres grávidas, concentrações de BPA foram determinadas em 58 gestações, incluindo 35 mulheres normotensivas e 23 pré eclâmpticas, com recurso a uma altamente sensível cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS)[143]. O bisfenol A foi detetado em sangue materno, sangue fetal e tecido placentar e as concentrações do mesmo foram determinadas. Em relação ao sangue materno foi encontrada uma concentração em média de 3.00 ng/mL, a mesma média para o tecido placentar e cerca de 2.17 ng/mL no sangue fetal [143]. Surpreendentemente, foi revelada uma significativa acumulação de BPA nas mulheres que apresentavam pré-eclampsia comparando com as mulheres normotensivas. Deste modo, estabeleceu-se uma relação entre a pré-eclampsia e a elevada acumulação de BPA na placenta [143]. Por outras palavras, a acumulação de bisfenol na placenta pode explicar a diminuição dos níveis sistémicos de estrogénio revelados na pré-eclampsia [143].

Xiong et. al verificou que os níveis de BPA no grupo de cardiomiopatia dilatada eram superiores aos do controlo. Para além disso, verificou-se uma diferença significativa na globulina de ligação às hormonas sexuais (SHBG) e no índice de andrógeno livre, entre os pacientes com a doença e o controlo: um aumento e diminuição, respetivamente. A análise de regressão linear mostrou que os incrementos dos níveis de BPA no sêrum estão significativamente associados com o aumento dos níveis de SHBG [144].

Atualmente o stress oxidativo é descrito como um evento transiente ou permanente, em que há uma perturbação no estado de equilíbrio oxidativo, gerando consequências fisiológicas na célula, dependendo do alvo específico e das concentrações das espécies reativas de oxigénio (ROS) [145]. Quando se dá uma falha do estado homeostático, como ocorre na hipertensão, dislipidemia, diabetes, obesidade e condições agudas como septicemia e insuficiência respiratória, os níveis de ROS aumentam [145].

Em conformidade a inflamação e o stress oxidativo são potenciais mediadores da elevada pressão sanguínea e hipertensão em adultos e crianças com exposições elevadas de BPA [10]. Estudos transversais também demonstraram uma relação entre a exposição materna ao BPA e a pressão diastólica elevada em crianças [135, 146].

Estudos realizados na população também denotaram uma associação entre a exposição de BPA e a inflamação, marcadores do stress oxidativo, incluindo níveis elevados de isoprostano F2 em crianças [75, 147]. Num outro estudo, em 11 humanos foram recolhidas amostras de urina, onde se estabeleceu uma relação entre os elevados níveis de BPA e um aumento dos marcadores de stress oxidativo, nomeadamente o isoprostano F2 [148].

Finalmente, salienta-se para a importância das células musculares lisas vasculares (VSMC) na patogénese das doenças cardiovasculares, uma vez que estas células constituem a maior parte da parede dos vasos sanguíneos [149]. Por sua vez, as lesões vasculares desencadeiam a desdiferenciação e posteriormente resulta na remodelação vascular, explicada adiante, que é a maior causa de reestenose, aterosclerose e hipertensão [149]. Ainda foi reportado que os disruptores endócrinos podem regular a proliferação das VSMC [150, 151]. Como foi demonstrado pelo aumento da expressão de Angiotensina II (Ang II) após o tratamento com BPA [151]. A angiotensina II está associada ao sistema renina-angiotensina, envolvido na regulação pressão sanguínea, vasoconstrição, absorção de sódio e excreção de potássio [152]. Portanto, o estudo do efeito do BPA nestas células torna-se fundamental para o melhor entendimento do mecanismo de atuação deste disruptor endócrino.

Em suma, a análise epidemiológica do efeito do BPA aponta para que exerça funções disruptivas no sistema cardiovascular nomeadamente hipertensão, doença coronária, enfarte do miocárdio, cardiomiopatia dilatada e stress oxidativo.

1.5. Cordão Umbilical Humano

Para a obtenção de SMC (smoothmusclecells, células musculares lisas), o cordão umbilical humano (CUH) é uma das amostras biológicas mais úteis [153]. Do ponto de vista fisiológico, o CUH é um canal desenvolvido do saco amniótico ao alantoide, permitindo a comunicação vital entre o embrião em desenvolvimento e a placenta [154]. Este é uma das partes da unidade fetoplacentar mais importante, embora seja possivelmente o único órgão que morre quando a vida inicia. Para além disso desempenha também, um papel fundamental na determinação de como se inicia a vida extrauterina [155].

No fim da gestação, esta ligação embrionária tem aproximadamente 1-2 cm de diâmetro e 35 a 70 centímetros de comprimento, mas há exceções podendo ser mais comprido ou curto [156]. Os cordões muito longos tendem a prolapsar e a enrolar à

volta do feto formando nós, enquanto cordões pequenos, por outro lado, podem levar à separação prematura da placenta da parede uterina antes ou durante o parto. Para evitar situações de hipoxia ou anoxia é importante e necessário um controle rigoroso [156, 157].

O cordão umbilical caracteriza-se por ser muito flexível e apresentar, geralmente, uma aparência esbranquiçada e brilhante, uma vez que é revestido por um epitélio simples derivado do âmnio (membrana)(Fig.6)[158, 159].



Figura 6-Cordão umbilical humano

Para além da descrição anterior, é importante referir que o CUH apresenta tipicamente uma forma em hélice, devido ao enrolamento em espiral dos vasos sanguíneos [160]. Os vasos umbilicais diferem na estrutura e função quando comparados com os maiores vasos do corpo humano, e uma vez que são maiores que o cordão em si, a torção ou flexão destas podem ocorrer[161]. Este órgão fetal é composto, maioritariamente por tecido conectivo, designado por geleia de Wharton, responsável pela sua aparência gelatinosa. Esta geleia consiste em células do tecido conjuntivo dispersas numa matriz amorfa superficial de glicosaminoglicanos (como ácido hialurónico e sulfato de condroitina) e diferentes tipos de colagénio, apresentando a particularidade de não possuir *vasa vasorum* ou *nervivascularum*. Esta substância que circunda os vasos umbilicais, assume a função de protegê-los da aglomeração e dando-lhes flexibilidade. O seu conteúdo fibroso e poroso composto por fibras de colagénio e elastina é responsável por dar uma certa firmeza ao cordão[160, 161].

Geralmente, o cordão umbilical tem duas artérias e uma única veia, que como previamente referido estão rodeadas pela gelatina Wharton, um tecido conectivo poroso e uma única camada exterior de células de âmnio[160, 162, 163]. Por vezes, entre 0.4 a 0.6 % dos partos, o cordão apenas conter uma única artéria, estando normalmente associado a complicações vasculares para o recém-nascido [154]. Na circulação fetoplacental, a veia umbilical é o vaso mais largo responsável pelo

transporte de sangue rico em oxigênio do feto para a placenta. Normalmente, não há mistura do sangue fetal e sangue materno, mas pode acontecer que pequenas quantidades de sangue fetal entrem na circulação materna através de pequenos defeitos que se podem formar na membrana da placenta. Quer a veia umbilical quer as artérias possuem uma estrutura similar, contudo as suas paredes são mais finas que as das artérias. Em adição, as artérias umbilicais são mais facilmente identificadas, uma vez, que são de menor calibre (3mm) comparada com a veia (6 mm)[161]. As artérias umbilicais não possuem uma membrana elástica interna e contêm pouca elastina, enquanto a veia contém uma camada elástica subintimal[160]. A proteína colagénio, rígida mecanicamente, geralmente serve para limitar a distensão radial dos vasos sujeitos a altas cargas. A elastina, por sua vez, é altamente extensível em pressões baixas [160]. Esta tem a função de fornecer extensibilidade elástica recuperável e subsequente contração nas artérias durante o fluxo sanguíneo pulsátil[160].

A geleia de Wharton consiste numa estrutura porosa baseada na matriz extracelular. Essa estrutura fibrosa e porosa é feita de fibras de colagénio e elastina e pensa-se que contribuía para a firmeza do cordão umbilical. Os poros dentro da geleia de Wharton formam estruturas canaliculares que abrigam proteoglicanos, ácido hialurónico (HA) e outras moléculas que interagem com a água para formar um fluido mucóide altamente viscoso. Nesta geleia encontram-se miofibroblastos, células que possuem características ultraestruturais de fibroblastos e células do músculo liso, que formam colagénio e outras proteínas e se podem contrair ativamente para auxiliar na regulação do fluxo sanguíneo umbilical[160].

As células endoteliais que residem nas artérias e veias são excepcionalmente ricas em organelos que podem desempenhar um papel na formação do líquido amniótico[160].

1.6. Artéria Umbilical Humana

A artéria umbilical humana (HUA) é um dos vasos encontrados no cordão umbilical e está envolvido na circulação fetoplacentar[159]. Além do seu fácil acesso através do cordão umbilical, esta artéria é considerada de uma grande importância, uma fonte única e muito útil para estudos humanos vasculares [162].

A nível fisiológico, a HUA é uma artéria de médio calibre (1 a 10 mm), cujas paredes são predominantemente constituídas por fibras musculares. Estruturalmente, esta artéria possui três túnicas, como a maioria das artérias, e que se distinguem umas das outras

pela morfologia. A túnica íntima é a mais interna, em seguida a média e a mais exterior a adventícia[161].

A túnica íntima, também designada de endotélio, é formada por uma única camada de células endoteliais. Esta túnica não tem camada sub-endotelial ou lâmina elástica interna. Portanto, o endotélio está em contacto direto com a camada muscular. Uma vez que não possui essa membrana interna elástica, a HUA é muito menos elástica comparada com outras artérias. Esta camada tem como principais funções, o controlo da permeabilidade e da regulação do tónus vascular. No caso do endotélio, este funciona como um sensor para alterações hemodinâmicas e sinais ou estímulos da corrente sanguínea, e transmite-os às células musculares lisas vasculares [155, 161]. As artérias umbilicais não se destacam apenas pelo descrito anteriormente, mas também pelo facto de possuírem duas camadas distintas de SMC: uma delas dentro do feixe muscular e a outra no exterior. A camada exterior é menos definida do que a camada mais interna, e tem uma estrutura tipicamente caracterizada por um arranjo circular, conferido pelas SMC que estão dispostas circularmente. Esta camada é extremamente importante porque há fortes indícios de que origina as contrações que levam ao encerramento fisiológico das artérias umbilicais [164]. Em contraste, a camada mais interna tem uma aparência mais franzida. A maior parte das SMC nesta camada estão dispostas linearmente ou longitudinalmente (relativamente ao eixo da artéria) e desordenadas/dispersas numa substância fundamental amorfa pobre em elasticidade, mas com muitas fibras plásticas. Esta plasticidade aparenta ser o modo de cooperação entre as duas camadas, onde o processo de encerramento das artérias umbilicais é completo: a contração das células musculares empurra a substância amorfa para o lúmen da artéria, ocluindo-a. Portanto, esta plasticidade da parte interna da camada muscular parece ser responsável pela oclusão fisiológica da HUA no pós-parto[161].

Destaca-se o facto de os vasos sanguíneos da HUA não serem inervados (sem nervos). O controlo da corrente sanguínea, bem como o tónus vascular da HUA são modulados apenas por substâncias vasoativas endócrinas (hormona vasopressina e epinefrina) e parácrinas (tromboxano, óxido nítrico, prostaciclina, etc...) que regulam a resposta contráctil das SMC[165-167]. Em que algumas dessas substâncias apresentam um efeito vasodilatador ou vasoconstritor. As diferentes funções vasculares da HUASMC são o resultado da multiplicidade de fenótipos com características estruturais bem definidas e cuja modulação fenotípica parece desempenhar um papel importante na hipertensão gestacional e pré-eclampsia[153].

As artérias umbilicais humanas padecem de uma camada adventícia na forma que é observada nos restantes vasos cardiovascular. No entanto, a geleia rígida de Wharton desempenha a função de adventícia[160].

1.7. Células Musculares Lisas do Cordão Umbilical

As células do musculo liso (SMC) são componentes celulares essenciais dos vasos sanguíneos, e desempenham um papel fundamental na patogénese de doenças vasculares [168]. Estas são responsáveis pelo tónus vascular, respondendo a vários estímulos hormonais e hemodinâmicos[153, 169]. Quando um vaso sanguíneo é exposto a stress mecânico leva a uma expressão diferencial de genes que, posteriormente induzem hipertrofia e hiperplasia das células, alterações ao nível das proteínas da matriz e a nível fenotípico: as SMC passam de um fenótipo contráctil para um fenótipo sintético, fundamental para a reparação da lesão vascular [149, 170]

A este fenómeno de transição fenotípica dá-se a designação de “modulação fenotípica” ou “remodelação vascular”. As SMC do fenótipo contráctil apresentam-se como células alongadas e fusiformes, que quando alteram para um fenótipo sintético são menos alongadas e morfológicamente semelhantes a paralelepípedos [149].

As artérias do cordão umbilical humano representam uma fonte fácil e de baixo custo de SMC vasculares, uma vez que em alternativa recorre-se a tecido vascular humano, que é limitado ao material obtido por operação cirúrgica, mas o seu isolamento é dificultado pela falta de um marcador de perfil completo [171]. O cordão umbilical, rico em SMC constitui pelo descrito anteriormente, uma boa amostra a ser utilizada.

As células musculares lisas do cordão umbilical desempenham uma função muito importante no controlo do fluxo sanguíneo fetoplacental [169]. A nível fisiológico, estas células encontram-se envolvidas por tecido fino de fibroelastina e organizadas em camadas. As células musculares lisas podem ser encontradas na túnica média, onde estão depósitos de elastina e colagénio contribuindo para a matriz extracelular. Para além de que a túnica media pode fornecer a elasticidade critica necessária para as funções vasculares, sendo a principal camada contráctil destas artérias e por isso úteis no estudo da regulação do tónus da arterial umbilical [169]. Nos vasos umbilicais, in vivo, as SMC encontram-se predominantemente no fenótipo contráctil. Morfológicamente, estas células são alongadas e têm a forma de um fuso, com comprimento entre os 15-200 μm e diâmetro de 5-8 μm [161, 172, 173]. Estas células são completamente diferenciadas e maduras, caracterizadas ainda, pela sua baixa “taxa” de

proliferação e atividades sintéticas e proliferativas. No seu interior, elas têm um grande núcleo cilíndrico no centro, rodeado por retículo sarcoplasmático que funciona como armazenamento intracelular de cálcio (Ca^{2+}) e um complexo de Golgi. Nestas células os organelos envolvidos na síntese proteica são, em larga extensão substituídos por filamentos contrácteis. No citoplasma é possível encontrar três tipos de filamentos: 1) fino- formado por actina e três proteínas acessórias: tropomiosina, caldesmona e calponina; 2) grossa- formada por miosina e 3) intermédia- livre de miosina, mas composta por desmina, vimentina e filamina. Os filamentos estão arranjados obliquamente, e ancorados na membrana citoplasmática por densas placas e fora do citoplasma por corpos densos. Geralmente, as SMC contêm mais filamentos de actina do que miosina, que juntos formam unidades contrácteis. O desencadeamento da força mecânica nas HUASMC é baseada no deslizamento dos filamentos livres de actina sobre os filamentos de miosina adjacentes em direções opostas durante o ciclo “cross-bridge” (um mecanismo contráctil bem estabelecido para todas as SMC)[161].

Quando se utilizam HUASMC há que ter muito cuidado para evitar contaminações por células estromais da gelatina de Wharton, que é facilitada pela falta de fronteiras bem delineadas entre o músculo liso vascular e o tecido mucoso perivascular da gelatina de Wharton [171]. De forma a evitar contaminações por células endoteliais da túnica íntima e/ou fibroblastos da túnica adventícia alguns autores procedem à remoção do endotélio[169, 174]. Embora a remoção da túnica adventícia seja um procedimento comum no isolamento das artérias, este não garante a remoção completa dos fibroblastos, uma vez que a túnica média apresenta algumas porções estritamente associadas à adventícia. Sendo assim alguns autores removem apenas a camada intermédia que está em contacto com o endotélio[169, 174].

1.8. Mecanismos de Contração e Relaxamento das células musculares lisas da HUA

A artéria umbilical humana tem uma particularidade, uma vez que não possui terminações nervosas, a regulação do seu tónus não depende do sistema nervoso autónomo [175]. Ao invés o tónus da HUA é mediado por substâncias vasoativas como prostaglandinas e serotonina (5-HT) e alguns iões como o cálcio e o potássio[161].

1.8.1. Mecanismos de Contração

Várias agentes provocam um efeito de constrição nas artérias umbilicais humanas, de salientar, a serotonina (5-HT), histamina (His), tromboxano, bradicinina, endotelina 1, a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e o cloreto de potássio [175-181]. No referente ao controlo do endotélio na regulação do tónus vascular, podemos referir que os mais importantes são endotelina, bradicinina uma vez que atuam diretamente em recetores endoteliais. Para além disso, a desregulação dos níveis destes dos agentes vasoativos parece estar relacionada com o surgimento de pré-eclampsia [178, 182].

No que concerne à endotelina esta provoca vasodilatação via recetores endoteliais de endotelina ET_B ou uma vasoconstrição via recetores de endotelina ET_A do músculo liso [176, 183-185]. As ativações destes dois subtipos de recetores nas células musculares lisas parecem estar acoplados à proteína Gq [186]. Em respostas de ação rápida, há ativação da fosfolipase C (PLC), que leva à libertação de Ca²⁺ devido ao aumento dos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) resultandona contração do músculo liso vascular [187]. Ainda sobre o endotélio, atua uma substância vasoativa, a bradicinina, que também induz contração nas HUA, sendo este efeito dependente da ativação do recetor B₂ [188]. O efeito da bradicinina envolve canais de cálcio dependentes de voltagem e Na⁺/K⁺-ATPase na contração e regulação do tónus vascular basal, respetivamente, bem como canais de potássio que parecem limitar a vasoconstrição excessiva devido à sua inativação [178].

No que diz respeito à serotonina, relativamente a outros agentes possui um elevada potência e eficiência na contractilidade, o que pode indicar que desempenha um papel crucial no encerramento fisiológico da artéria umbilical após o parto [180]. Os efeitos contracteis da serotonina nas HUA sem endotélio, foram atribuídos à ativação dos recetores 5-HT_{2A} e parcialmente devidos à ativação dos recetores 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}, presentes no músculo liso da artéria umbilical humana [189]. O recetor 5-HT_{2A} está acoplado à proteína Gq e ativa a fosfolipase C (PLC), resultando no aumento dos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e a ativação dos recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, acoplados à proteína G_{i/o} inibe a adenilciclase [189]. A ativação de qualquer um dos recetores resulta na contração vascular [190, 191]. Um outro recetor de serotonina, 5-HT₇, foi identificado no músculo liso de HUA e está associado a uma proteína Gs e a dois outros recetores de His (H₂ e H₃). A ativação destes recetores estimula a adenilciclase, o que leva a uma vasorelaxação [175, 179, 190].

Em relação à histamina, a contração é alcançada pela ativação dos recetores H₁ presentes no músculo liso. A ativação do recetor, que está acoplado à proteína Gq ativa

a cascata de sinalização PLC/IP₃, levando a um aumento de IP₃ e cálcio intracelular, que resulta na contração[189, 190].

Ainda sobre substâncias vasoativas, que provocam vasoconstrição, temos o tromboxano e a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), contudo até à data apenas se sabe que se deverá aos recetores TP_α e TP_β e pelos recetores FPA e FPB, respetivamente[192].

Inevitavelmente, para que ocorra a contração das SMC é necessário o aumento da concentração de cálcio intracelular. Os canais iónicos expressos nas SMC regulam o potencial de membrana, a concentração de cálcio intracelular e a contractilidade das células. Estes canais podem ser divididos em quatro grupos: canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem (VOCCs), que incluem os canais de cálcio do tipo L, T e do tipo P/Q, e os canais de Ca²⁺ independentes de voltagem (como os canais operados por recetores (ROCC), canais operados por depósitos intracelulares (SOCC) e canais ativados pelo stress físico (SACC)) [193]. Apenas o envolvimento dos canais de cálcio do tipo L e T na contractilidade das HUA se encontra bem documentado, no que diz respeito aos outros canais é necessário uma elucidação do mesmo [161]. Relativamente aos canais de cálcio do tipo L sabe-se que o subtipo Cav 1.2 predominante em relação ao subtipo Cav 1.3 em tecidos vasculares e cardíaco [194]. Para além disso os Cav 1.2 são determinantes na regulação do tónus vascular, uma vez que fornecem uma via de influxo do Ca²⁺ extracelular e desempenham um papel crucial no estabelecimento da [Ca²⁺] na contração do músculo liso[194]. Por outro lado, os canais de cálcio do tipo T aparentam estar envolvidos na proliferação das SMC [195].

Finalmente, o agente contráctil KCl, atua principalmente pelo influxo de cálcio extracelular, por via dos VOCC [175]. A contração induzida pelo cloreto de potássio pode ser inibida por antagonistas específicos do canal de cálcio do tipo L (LTCC), nomeadamente a nifedipina [196].

1.8.2. Mecanismo de Relaxação

O mecanismo de relaxação tem sido descrito como o resultado da diminuição da concentração de Ca²⁺ intracelular, seguido pela perda ou diminuição de um estímulo contráctil [153]. Todavia, a relaxação muscular ainda pode ser atribuída à remoção de Ca²⁺ do citosol e à diminuição da sensibilidade do sistema contráctil ao Ca²⁺[197]. A recaptação de cálcio do citosol para o retículo sarcoplasmático, o principal local de armazenamento de cálcio intracelular, é feita principalmente pela ATPase de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) [198]. Quando a remoção é feita para o meio extracelular através da membrana plasmática estão envolvidos outros transportadores, neste caso a Ca²⁺-ATPase (PMCA) e a bomba Na⁺/Ca²⁺ (NCX)[153, 199]. No caso da

artéria umbilical humana o NCX parece funcionar de modo reverso [200]. Para além disso, o relaxamento do músculo liso pode ser provocado por vários compostos endógenos e exógenos. Geralmente, estes agentes provocam a relaxação por diferentes vias, incluindo a inibição da síntese de agonistas da contração, bloqueio dos recetores que medeiam a contração no músculo liso e o fecho de canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática [197]. Estes compostos também podem interagir com recetores específicos localizados quer na membrana celular do músculo liso ou no citoplasma, para gerar segundos mensageiros intracelulares, como os nucleótidos cíclicos que, iniciam uma cascada de eventos moleculares levando à relaxação [197]. Os nucleótidos cíclicos monofosfato cíclico 3'5'- Adenosina (cAMP) e mono fosfato cíclico 3'5'-Guanosina (cGMP) são os principais segundos mensageiros ligados à vasodilatação e os seus níveis intracelulares são o resultado balanceado entre a sua síntese e degradação[201]. Se por um lado o aumento de cAMP é conseguido por ativação de um recetor acoplado a uma proteína G_s ou por inibição de um recetor acoplado a uma proteína $G_{i/o}$, por outro o aumento dos níveis de cGMP é alcançado por ação de vasodilatadores endógenos, como é o caso do óxido nítrico. Consequentemente, o aumento dos níveis de cAMP e cGMP provoca uma ativação das proteínas cinases A (PKA) e G (PKG) respetivamente, o que resulta na redução da concentração de Ca^{2+} intracelular e sensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} nas SMC, culminando numa relaxação [201]. No que diz respeito às HUA, já foi demonstrado que o aumento dos níveis destes nucleótidos cíclicos (cAMP e cGMP) nas HUASMC provoca vasorelaxação[202]. Essa vasorelaxação também foi verificada em HUA desprovidas de endotélio, como foi mostrado por um estudo realizado pelo nosso grupo de investigação [190].

No referente ao endotélio vascular, alguns estudos têm sugerido que também ele parece ter um papel importante na relaxação da HUA. A substância mais importante sintetizada pelo endotélio, no que toca aos mecanismos de contractilidade vascular é o óxido nítrico (NO) [203]. Nas HUA foi demonstrada a existência da enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), que produz NO a partir do aminoácido L-arginina. Posteriormente, o NO vai atuar nas SMC pela ativação da guanilciclase solúvel (sGC) resultando no aumento da produção de cGMP [204]. Atualmente o papel relevante do NO na regulação do tónus vascular da HUA encontra-se bem descrito e alguns estudos, inclusive, demonstraram o seu efeito vasodilatador nesta artéria [190, 205, 206]. No entanto, apesar da sua relevância na regulação do tónus vascular, o presente estudo foi realizado com artérias umbilicais humanas desprovidas de endotélio, desta forma foi possível determinar com maior clareza e exatidão os mecanismos que regulam a contractilidade nesta artéria, exercidos pelo BPA.

Os níveis dos nucleótidos cíclicos podem ser aumentados por inibição das fosfodiesterases (PDE)- enzimas que degradam os referidos nucleótidos para os seus metabolitos ativos 5' adenosina monofosfato (5'-AMP) e 5' guanosina monofosfato (5'-GMP) respetivamente [201, 207]. Um estudo de Santos Silva e seus colaboradores demonstrou que nas HUASMC encontram-se expressas isoformas de quatro famílias de fosfodiesterases: PDE1, PDE3, PDE4 e PDE5. Num nível mais aprofundado, foi demonstrado que as PDE4 e PDE5 são as principais enzimas envolvidas na regulação do relaxamento associado ao cAMP e cGMP, respetivamente [190].

Destaca-se ainda para a importância dos canais de potássio na regulação do tónus da HUA. Estes canais são habitualmente predominantes nas membranas das células musculares lisas vasculares e desempenham um papel crucial na regulação do potencial de membrana controlando diretamente a concentração de K^+ e indiretamente a concentração de Ca^{2+} [208-210]. De forma mais específica, a abertura dos canais de K^+ nas SMC provoca uma hiperpolarização da membrana celular, um encerramento dos VOCC e uma diminuição da entrada de iões de Ca^{2+} para o interior da célula, resultando numa vasodilatação [211, 212]. A atividade dos vários tipos de canais de K^+ pode ser alterada também por uma serie de fatores fisiológicos, que incluem o Ca^{2+} intracelular, os nucleótidos cíclicos e diversos mecanismos de transdução de sinal. Desta forma apresentam-se como um alvo promissor de atuação de substâncias vasodilatadoras como o NO, os péptidos natriuréticos (NP) e as prostaciclina [210].

Nas artérias umbilicais humanas foram implicados vários canais de potássio nos mecanismos de regulação do tónus vascular, de entre eles os BKCa, canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância, que respondem a alterações dos níveis de Ca^{2+} intracelular, bem como os canais de potássio operados por voltagem (K_v) capazes de regular o potencial de membrana em resposta à despolarização da membrana [209, 213]. Na generalidade a ativação dos canais de potássio parece ser responsável pela vasodilatação verificada nas SMC da HUA [179, 214].

2. Enquadramento e Objetivos da investigação

O bisfenol A (BPA) é um composto orgânico, que tem sido utilizado sobretudo no fabrico de materiais plásticos, em vários produtos como embalagens de alimentos e bebidas, biberons, e materiais industriais, como canos de água. Para além disso, pode ser encontrado em tintas, vernizes e produtos dentários, como próteses. O BPA é considerado um disruptor endócrino, uma vez que tem a capacidade de se comportar como algumas hormonas, causando alterações na sua função fisiológica e também alteram o normal funcionamento dos órgãos alvo onde estas atuam. Existem estudos que provaram que o BPA possui atividades estrogénicas, androgénicas e consegue ainda ligar-se a recetores localizados na tiroide. Estudos recentes demonstraram que o BPA aumenta a produção de interleucinas pró-inflamatórias envolvidas em doenças cardiovasculares e, está associado a cardiotoxicidade. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é analisar o efeito genómico do BPA na função vascular. Assim, a artéria umbilical humana (HUA) previamente isolada será exposta (24h) a diferentes concentrações de BPA para análise da contractilidade e será feita cultura de células musculares lisas da HUA para posteriores estudos de expressão génica. Bem como será feita a análise da expressão de proteínas contrácteis. Para além disso, também serão realizados estudos computacionais, através do docking molecular, entre proteínas envolvidas no processo de contractilidade e o bisfenol A.

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

1. Realização com sucesso do isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC);
2. Análise do efeito direto do BPA, em artérias umbilicais humanas (HUA) sem endotélio
3. Análise dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito do BPA na HUA, principalmente os envolvimentos dos nucleótidos cíclicos e dos canais de cálcio (efeitos genómicos).
4. Análise do efeito do bisfenol A na expressão de diferentes proteínas contrácteis nas HUASMC por Real time- PCR;
5. Análise computacional da interação do BPA com proteínas envolvidas nas vias de sinalização endotelial.

3. Materiais e Métodos

3.1. Recolha dos cordões umbilicais

A recolha dos cordões umbilicais (HUC) (n= 42) foi realizada a partir do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB). As amostras dos HUC tinham aproximadamente 3 a 7 cm e foram recolhidas de mães doadoras saudáveis que não estavam sob outra medicação que não fosse ácido fólico durante as primeiras 21 semanas ou suplemento de ferro durante a gravidez. Os cordões umbilicais foram recolhidos após o consentimento escrito das mulheres grávidas. As peças dos HUC foram armazenadas numa solução salina fisiológica estéril (PSS), com a seguinte composição 110 mmol/L NaCl; CaCl₂ 0,15 mmol/L; KCl 5 mmol/L; MgCl₂ 2 mmol/L; NaHCO₃ 10 mmol/L; KH₂PO₄ 0,5 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; Glucose 10 mmol/L; e EDTA 0,49 mmol/L. Para prevenir a contaminação foram adicionados à solução de PSS antibióticos (penicilina, 5U/mL, estreptomicina, 5ug/mL e anfotericina B, 12,5 ng/mL).

Todos os procedimentos realizados com estas amostras descritas acima foram aprovados pelo Comité de Ética para a Saúde da CHUCB E.P.E (No.33/2018, 18 de Julho de 2018) e estavam de acordo com os princípios da declaração deHelsinki.

3.2. Técnica de banho de órgãos

3.2.1. Isolamento de artérias umbilicais humanas

As experiências de contractilidade em HUA foram realizadas como descrito por Cairrao et. al (2009) e Lorigo et. al (2021) [169, 215]. Em resumo, as HUA foram isoladas do tecido conjuntivo circundante (geleia de Wharton), numa placa de Petri de vidro com solução de PSS e foram cortadas em pequenos anéis com 3-5 mm. Para estudar os efeitos do BPA apenas no músculo liso, o endotélio vascular foi mecanicamente removido com uma agulha de fio de algodão introduzida através do lúmen arterial.

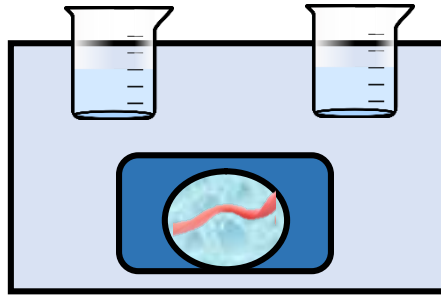


Figura 7-Representação esquemática de tabuleiro usado para o tratamento da artéria

3.2.2. Medição das Tensões isométricas

As HUA foram colocadas em câmaras de banho de órgãos LE01.004 contendo 10 mL de solução de Krebs-bicarbonato (NaCl 119 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, KH₂PO₄ 12 mmol/L, CaCl₂ 0,5 mmol/L, MgSO₄ 1,2 mmol/L, EDTA 0,03 mmol/L e glucose 11 mmol/L (pH 7,4) a 37°C e continuamente gaseadas com carbogénio (95 % O₂ e 5% CO₂). Esta mistura gasosa permitiu que a pressão de CO₂ e o valor de pH no banho de órgãos fossem semelhantes aos valores no plasma humano [216]. Os anéis das artérias foram suspensos entre dois fios paralelos de aço inoxidável e a medição da tensão em milinewton (mN) foi realizada com transdutores isométricos TR1201 (PanlabSA, Espanha), amplificador ML118 (ADInstruments), interface PowerLab/4SP Ml750 (ADInstruments) e sistema computadorizado com o software Chart5 PowerLab (ADInstruments). Os anéis foram colocados sob uma pré-tensão (20-25 mN) e foram submetidos a um período de equilíbrio durante 45 min para que os anéis atingissem uma tensão basal de 20-25 mN. Durante este período, a solução do banho de órgãos foi mudada a cada 15 min. Posteriormente, os anéis foram submetidos a um teste de viabilidade através de uma pré-contração com uma concentração supramaximal de 5-HT (1 µmol/L). Para as experiências, só foram incluídos anéis com uma contração máxima > 10 mN[169, 216].

3.2.3. Procedimento experimental

Em primeiro lugar, foram avaliados os efeitos das concentrações cumulativas de BPA (0,002, 0,02, 0,2, 2, 20 e 100 µmol/L) sobre o tónus basal da HUA. Em seguida, as HUA foram contraídas com serotonina (5-HT, 1 µmol/L) e a resposta vascular foi analisada. As concentrações de BPA utilizadas foram baseadas num estudo anterior com SMC de rato do nosso grupo de investigação [116].

Posteriormente, foram analisados os efeitos do BPA a curto prazo (ou seja, os efeitos do BPA sobre HUA não-incubadas). Para tal, as HUA foram contraídas com um agente vasoativo (serotonina, 5-HT, 1 µmol/L) e por despolarização com cloreto de potássio

isomótico (KCl 60 mmol/L). Depois, as HUA foram sujeitas a concentrações cumulativas de BPA (0,002 - 100 $\mu\text{mol/L}$) e o efeito produzido foi investigado. Ao longo das experiências, foram sempre efetuados controlos com etanol (o solvente utilizado para dissolver o BPA).

O passo seguinte foi a análise dos efeitos do BPA a longo prazo sobre as HUA. Para este efeito, as HUA foram primeiro incubadas (24 horas) com diferentes concentrações de BPA (0, 0,002, 0,2, 20,100 $\mu\text{mol/L}$). As artérias foram contraídas com 5-HT e KCl e o modo de ação do BPA foi analisado. O envolvimento dos canais Ca^{2+} e da via de sinalização do cGMP foram escolhidos para estudar uma vez que estas duas vias são as principais envolvidas no relaxamento do músculo liso da HUA [215]. Assim, após uma contração estável com os diferentes agentes contráteis, o envolvimento dos canais Ca^{2+} na vasorelação induzida por BPA foi analisado utilizando nifedipina (Nif; 0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{mol/L}$) e o agente contrátil KCl (60mmol/L). Nif é um inibidor específico dos LTCC e o KCl induz uma despolarização da membrana SMC através da abertura dos LTCC. Além disso, para testar o envolvimento do BPA na via de sinalização do cGMP, foi utilizado nitroprussiato de sódio (SNP, 0,01-100 $\mu\text{mol/L}$). O SNP é um estimulador da sGC. Uma vez que o SNP e Nif são agentes fotodegradáveis, todos os procedimentos foram realizados na ausência de luz.

Cada experiência foi realizada em vários anéis de HUA de pelo menos três artérias diferentes, para garantir a variabilidade genética.

Após o banho e para assegurar a remoção de componentes residuais do aparelho, procedeu-se à passagem de água corrente e posteriormente de água destilada, pelos poços e pelo sistema, três vezes.

3.3. Cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana- HUASMC

As células musculares lisas foram isoladas da HUA de acordo com o método de explantes e cultivadas como descrito anteriormente [169, 216] Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas dentro de uma câmara de fluxo laminar e utilizando materiais, soluções e instrumentos esterilizados. As células foram cultivadas em 37°C sob atmosfera de 95% de ar e 5% de CO_2 num meio de cultura com a composição: DMEM F-12, contendo albumina de soro bovino (BSA, 0,25%), soro fetal bovino inativado por calor (FBS, 5%), factor de crescimento epidérmico (EGF, 5 $\mu\text{g/mL}$), factor de crescimento fibroblasto (FGF, 0. 5 ng/mL), heparina (2 $\mu\text{g/mL}$), insulina (5 $\mu\text{g/mL}$) e uma mistura de antibióticos: penicilina (5 U/mL), estreptomina

(5 µg/mL), e anfotericina B (12,5 ng/mL). Foram obtidas células confluentes em cerca de 20-30 dias, e subculturas destas células foram realizadas utilizando uma solução comercial de tripsina-EDTA (0,025%). Para as experiências, foram utilizadas células de pelo menos cinco HUC em passagens diferentes (ver abaixo).

3.4. Genética

3.4.1. Extração de mRNA

As HUASMC foram expostas a diferentes concentrações de BPA (0,002-20 µmol/L) durante 24 horas e a extração do RNA foi realizada de acordo com Lorigo et. al (2021) [215]. Para este efeito, foi utilizado o reagente Tri (Ambion, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria (Nanophotometer TH, Implen GmbH, Munique, Alemanha) a uma absorvância 260/280 nm. Este rácio permite determinar se existe contaminação da amostra quer por proteínas ou por DNA. Entre as medições a cuvete e o microdrop foram limpos 3 vezes com água mili-Q, para que não houvesse risco de contaminação da concentração anteriormente analisada. Adicionalmente, a integridade do RNA extraído foi avaliada utilizando uma eletroforese em gel de agarose (1%).

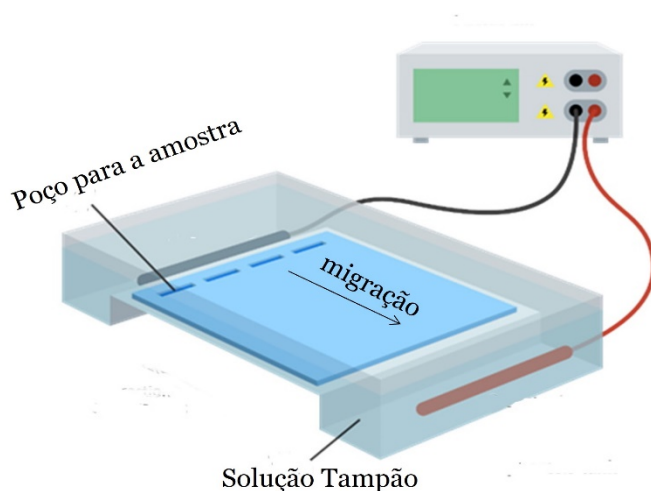


Figura 8-Representação esquemática da técnica eletroforese em gel de agarose.

3.4.2. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando 1 µg de RNA total extraído. Primeiro, o RNA foi desnaturado durante 5 min a 65°C numa reação contendo dNTPs (10 mmol/L) e

uma mistura aleatória de hexamer (0,5 µg/UL) (NZYset, Lisboa, Portugal). O RNA foi reversamente transcrito durante 60 min (a 37°C) num volume final de 20 µL contendo tampão de reação (10x) e M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µL) e seguindo as instruções do fabricante (NZYTech, Lisboa, Portugal). Foi utilizado um termociclador (T100TH ThermalCycler, BioRad) para a síntese de cDNA. A reação foi interrompida a 70°C durante 15 min.

3.4.3. Quantificação da expressão de mRNA por qPCR em tempo real

Os estudos de expressão genética tiveram por base trabalhos anteriores de Saldanha et. al (2013) e Lorigo et. al (2021) [215, 217]. Foram avaliados os níveis de mRNA de diferentes genes (BKCa-α 1.1, BKCa-β1, Cav1.2, sGC, PKG) (Tabela 1). Para o PCR quantitativo em tempo real, foi utilizado SYBRGreen/FluoresceinqPCR Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal) e cada reação foi realizada usando 1 µL do cDNA sintetizado (volume final de 20 µL). As experiências foram realizadas noCFX Connect Real-Time PCR System (BioRad), onde foram programadas as seguintes condições: desnaturação inicial 95°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 10 segundos, 30 segundos à temperatura de annealing (60°C) e os últimos 10 segundos a 72°C. Todas as amostras foram executadas em triplicado para cada PCR em tempo real e os níveis de expressão genética foram padronizados com o gene humano β-actina. A expressão relativa do mRNA foi calculada utilizando o modelo matemático padrão pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [218].

Tabela 2-Primers utilizados para a quantificação da expressão de mRNA através de experiências de PCR em tempo-real

	Sequência de primers (5'-3')	Temperatura de Annealing(°C)	no. acesso GenBank
B-actina	Fw: 5-CAT CCT CAC CCT GAA GTA CCC-3 Rv: 5-AGC CTG GAT AGC AAC GTA CAT G-3	60	NM_00110 1.5
BKCa 1.1 αsubunit	Fw: 5-AAG CAA CGG AAT GGA GGC AT-3 Rv: 5-CCA GTG AAA CAT CCC AGT AGA GT-3	60	XM_03493 0944.1
BKCa β1 subunit	Fw: 5-CAA TGT GGT GAA CGC AGC C-3 Rv: 5-TGT GAT GCT GAG GCG TGA A-3	60	XM_00383 0649.4
L-type Ca ²⁺ channels (LTCC) α1C- subunit	Fw: 5-CAT CAT CAT CTA CGC CAT CAT CGC -3 Rv: 5-GGT CAT CTT CTG CTG GAA CAT CTG-3	60	XM_03493 5167.1

Soluble guanyl cyclase (sGC)	Fw: 5-GAT AGC ACT GAT GGC CCT GAA-3 Rv: 5-GTA GTC CAA TTC GCA TCT TGA TAG G-3	60	NM_00137 9671.1
protein kinase cGMP-dependent 1 α -subunit (PRKG 1 α)	Fw: 5-GGC TGT CAG AGA AGG AGG AAG -3 Rv: 5-GGA AGG ACC TGT ACG TCT GC -3	60	NM_00109 8512

3.5. Docking Molecular

3.5.1. Aquisição e preparação de estruturas proteicas e ligandos

Simulações computacionais (por docking molecular) foram realizadas pelo programa Autodock4 para revelar os modos de interação do BPA com as proteínas envolvidas nas vias de sinalização de contractilidade. As coordenadas estruturais em 3D das proteínas estudadas foram descarregadas do Protein Data Bank (PDB) como ficheiros .pdb (Tabela 3). A estrutura cristalina de LTCC- α 1 e LTCC- β 2 (PDB ID:5V2P) a 2,00 Å co-complexadas com o seu ligando natural, 1,3 bis(bromometil)benzeno (8YV) e pentaetilenoglicol (1PE) foram obtidos, respetivamente. Além disso, foi descarregada a estrutura cristalina dos canais de iões K⁺ de alta condutância ativados por Ca²⁺ (BKCa- α 1, PDB: ID: 6V35) a 3,50 Å co-complexado com o seu ligando natural, colesterol (CLR). Além disso, a sGC (PDB:6JTo) a 4,00 Å co-complexada com o seu ligando natural, grupo heme (HEM) foi recuperado. Todas as proteínas mencionadas disponíveis no PDB (na altura do estudo) eram do organismo Homo sapiens, com exceção do LTCC- β 2 que era de Rattusnorvegicus. Por esta razão, antes das simulações moleculares, a homologia foi calculada utilizando a ferramenta NCBI blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com as sequências de proteínas recuperadas da UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (alinhamentos de sequências). Posteriormente, a individualização de proteínas dos respetivos ligandos naturais foi realizada utilizando o Chimera USCF versão 1.15. As características de cada ligando utilizado para o acoplamento molecular estão presentes na Tabela 4. Uma vez que a BPA não foi encontrada no PDB, as suas estruturas foram concebidas usando ChemDraw, e depois de minimizar a energia dos ficheiros .pdb da molécula foram exportados do programa. A preparação das proteínas, dockprep, foi realizada para todos os ficheiros pelo software Autodocktools v.1.5.6. Neste processo, as moléculas de água que poderiam ter persistido foram removidas. Além disso, foram adicionados hidrogénios apolares e

cargas parciais de Gasteiger. Finalmente, o mapa tridimensional da proteína foi convertido de formato .pdb para .pdbqt para utilização em simulações em silico.

Tabela 3 Características de cada proteína utilizada para o docking molecular: abreviaturas comumente utilizadas, identificações PDB e o organismo.

Nome da Proteína	Abreviação	PDB ID	Organismo
L-type Ca ²⁺ channels (LTCC) α 1C-subunit	LTCC- α 1	5V2P	<i>Homo sapiens</i>
L-type Ca ²⁺ channels (LTCC) β 2-subunit	LTCC- β 2	5V2P	<i>Rattus Norvegicus</i>
Large-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ ion channels	BKCa- α 1	6V35	<i>Homo sapiens</i>
Soluble Guanyl Cyclase	sGC	6JT0	<i>Homo sapiens</i>

Tabela 4 Características de cada ligando utilizado para o docking molecular: abreviaturas comumente utilizadas, IDs PubChem e número de registo do Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN).

Nome do Ligando	Abreviação	PubChem ID	CASRN
1,3 bis(bromomethyl)benzene	8YV	69373	626-15-3
Pentaethylene glycol	1PE	62551	4792-15-8
Cholesterol	CLR	5997	57-88-5
Heme group	HEM	444097	14875-96-8
Bisphenol A	BPA	6623	80-05-7

3.5.2. Simulações moleculares

O Autogrid 4 foi utilizado para realizar os cálculos do mapa da grid com base nas coordenadas de cada centro activo da estrutura de proteínas cristalina. Os tamanhos das grid estão especificados na Tabela 5. Primeiro, o docking molecular foi validado pelo desvio quadrático médio de raiz (RMSD) ≤ 2.0 Å e posteriormente confirmado utilizando o Autodock Vina. Os cálculos do docking foram feitos de acordo com o algoritmo genético Lamarckian pelo Autodock 4 e os outros parâmetros foram mantidos como padrão. Para a análise do docking, 10 conformações foram agrupadas e classificadas pela menor energia de ligação (ΔG , kcal/mol). A conformação com a melhor pontuação e ΔG foi selecionada para análise as interações com BPA utilizando o software Chimera 1.15.

Tabela 5- Parâmetros da grelha (dimensões e tamanho) de cada centro activo das proteínas utilizadas para o docking molecular.

Parâmetros da Grid		Proteínas			
		sGC	LTCC- α	LTCC- β	BKCa
Dimensão da Grid	X	36	8	12	17
	Y	32	10	22	10

	Z	24	12	16	42
Centro da Grid	X	123.342	9.388	38.098	130.873
	Y	113.269	-16.13	20.916	154.304
	Z	135.037	120.46	137.695	195.507
Spacing		0.375			

3.6. Análise Estatística

A análise dos dados dos estudos de contratilidade arterial foi realizada por medições da tensão isométrica expressa em milinewton (mN) de força desencadeada pelas artérias contraídas. Para a análise das respostas relaxantes induzidas pelo BPA, foi considerada uma % de redução da contração máxima induzida por cada agente contráctil. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (S.D.) do número (n) das artérias umbilicais humanas.

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaStatStatisticalAnalysisSystem versão 3.5 (2006). Neste processo, os testes t-student foram realizados em análise para significância estatística entre dois grupos. Foram comparados vários grupos através do método one-way ou two-way ANOVA, seguido dos testes post-hoc de Holm-Sidak. As diferenças na expressão do mRNA foram calculadas por uma one-way ANOVA através do método de Dunnett's. A conceção gráfica dos dados estatísticos foi conseguida com Software Origin 2021 9.8.0.200.

3.7. Soluções e Materiais

3.7.1. Soluções

As soluções utilizadas para a realização desta investigação estão mencionadas na Tabela 6, bem como discriminadas as respetivas composições.

Tabela 6-Soluções e respetiva composição utilizadas no presente trabalho.

Solução	Composição
Solução sterile physiological saline (PSS) ou solução salina fisiológica estéril diluída	NaCl 110mM; CaCl ₂ 0.16mM; KCl 5mM; MgCl ₂ 2mM; Hepes 10 mM; NaHCO ₃ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 0.5 mM; NaH ₂ PO ₄ 0.5 mM; Glicose 10 mM e EDTA 0.5 mM (pH=7.4)

Solução de Dulbecco's modificado Eagle's médium/F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 liofilizado sigma; NaHCO ₃ (1.2 g/L) e ácido L-ascórbico (20 mg/L) (pH=7.4)
Krebs Básico Concentrado	KCl 5.0 mM; EDTA 0.03 mM; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.2 mM; KH ₂ PO ₄ 1.2 mM e ácido L-ascórbico 0.6 mM
Krebs diluído	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0.5 mM; NaCl 119 mM; NaHCO ₃ 25 mM; Glicose 11 mM (pH = 7.4)
Krebs despolarizante (KCl 60 mM)	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0.5 mM; NaCl 64 mM; KCl 60.0 mM; NaHCO ₃ 25 mM e glicose 11 mM (Ph=7.4)
Meio de cultura HUASMC	DMEM-F12; Albumina de soro bovino (BSA 0.25%); vários fatores de crescimento (GSP); antibiótico (AB) e insulina (pH=7.4)

3.7.2. Químicos

De forma a dar seguimento a este projeto foi necessária a utilização de diversos compostos químicos e drogas, nomeadamente o bisfenol A (BPA), a serotonina (5-HT), o nitroprussiato de sódio(SNP), a nifedipina(Nif) e o etanol (EtOH). Todos eles foram adquiridos por Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal). O BPA foi cedido pelas professoras Dr^{as} Isabel Theriaga e Cecília Santos, às quais deixo o meu agradecimento.

Inicialmente a serotonina e o SNP foram dissolvidos em água destilada, enquanto o BPA e a Nif foram dissolvidos em etanol. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C. Para as diversas metodologias realizadas foi necessário preparar diluições de BPA e EtOH. Nos estudos de contractilidade arterial as diluições foram realizadas em Krebs diluído e realizadas no próprio dia da experiência, e respeitando todas as normas laboratoriais necessárias para o efeito. De modo a não influenciar os resultados, a concentração final de EtOH nunca excedeu 0.05%.

3.7.3. Materiais

Tabela 7-Material utilizado para a realização das soluções e técnicas mencionadas anteriormente.

Preparação de soluções	
Material/Equipamento	Marca

Balança digital	PLJ-K510-3M, Kern
Medidor de pH	Metrohm
Banho de Órgãos	
Material/Equipamento	Marca
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Material Específico de laboratório	-
Câmara de Banho de órgãos	Letica
Transdutor de força	Panlab
Amplificador	ADInstruments
Interface PowerLab/4SP	ADInstruments
Cultura de células musculares lisas HUA	
Material/Equipamento	Marca
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Material Específico de laboratório	-
Frascos de Cultura	Orange Scientific
Sistema de incubação	Pecan
Câmara de Fluxo Laminar	NuAir
Genética	
Material	Marca
Material específico de laboratório	-
CFX Connect Real-Time PCR system	Bio-Rad
Espetrofotômetro- OD600 Diluphotometer	Implen
Docking molecular	
Material/Equipamento	Marca
Computador portátil	Asus VivoBook

4. Resultados

4.1. Estudos de contractilidade arterial

Para a realização dos estudos de contractilidade arterial das artérias umbilicais humanas recorreu-se à técnica de Banho de Órgãos.

4.1.1 Efeitos do BPA na vasculatura de HUA nas contrações induzidas pela serotonina (5-HT) ou cloreto de potássio (KCl).

Concentrações crescentes de BPA foram adicionada na HUA sem incubação e em seguida foi adicionado um agente contráctil (Tabela 8). Os resultados demonstraram que o BPA não induz qualquer efeito no tónus basal.

Tabela 8-Tensões basais após adição de concentrações crescentes de BPA

Tensões Basais do BPA (mN)					
BPA ($\mu\text{mol/L}$)	Sem incubação (n=9)	Incubação de 0.002 $\mu\text{mol/L}$ (n=7)	Incubação de 0.2 $\mu\text{mol/L}$ (n=8)	Incubação de 20 $\mu\text{mol/L}$ (n=10)	Incubação de 100 $\mu\text{mol/L}$ (n=9)
0.002	-0.04 \pm 0.18	0.03 \pm 0.08	-0.05 \pm 0.04	-0.04 \pm 0.08	-0.03 \pm 0.05
0.02	-0.22 \pm 0.23	-0.03 \pm 0.01	-0.03 \pm 0.04	-0.07 \pm 0.14	-0.07 \pm 0.05
0.2	-0.33 \pm 0.37	-0.07 \pm 0.21	-0.08 \pm 0.06	-0.13 \pm 0.26	-0.17 \pm 0.11
2	-0.54 \pm 0.59	-0.10 \pm 0.16	-0.16 \pm 0.09	-0.12 \pm 0.19	-0.25 \pm 0.23
20	-0.72 \pm 1.11	-0.18 \pm 0.25	-0.25 \pm 0.17	-0.19 \pm 0.23	-0.54 \pm 0.37
100	-0.92 \pm 1.05	-0.14 \pm 0.30	-0.31 \pm 0.16	-0.12 \pm 0.20	-0.74 \pm 0.46

Para analisarmos os efeitos genómicos do BPA, os anéis vasculares de HUA foram incubados durante 24 horas com diferentes concentrações de BPA. No gráfico 1 e 2 podemos observar as tensões dos anéis pré-incubados com BPA e contraídos com 5-HT e KCl, respetivamente. Para as HUA contraídas por qualquer um dos dois agentes vasoativos foram obtidas tensões semelhantes para as incubadas com BPA em comparação com o grupo controlo ($p > 0.05$).

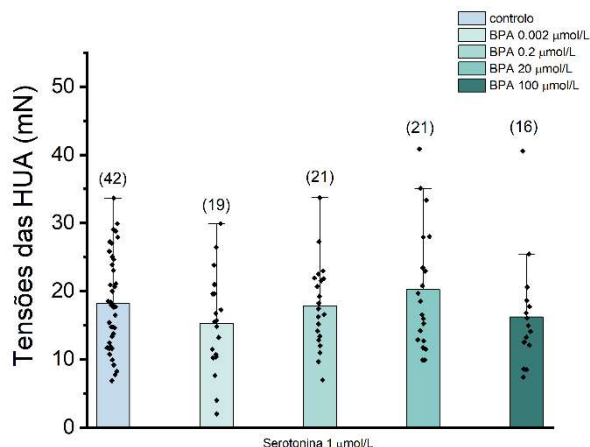


Gráfico 1-Tensão (expressa em milinewtons, mN) das artérias umbilicais humanas (HUA) pré-incubadas com bisfenol A (BPA; 0 µmol/L- 100 µmol/L) e contraídas com serotonina (5-HT, 1 µmol/L) Cada barra representa o valor médio, as linhas verticais o S.D. (desvio padrão) e n entre parênteses é o número de anéis de artéria utilizados. Representa a dispersão de pontos.

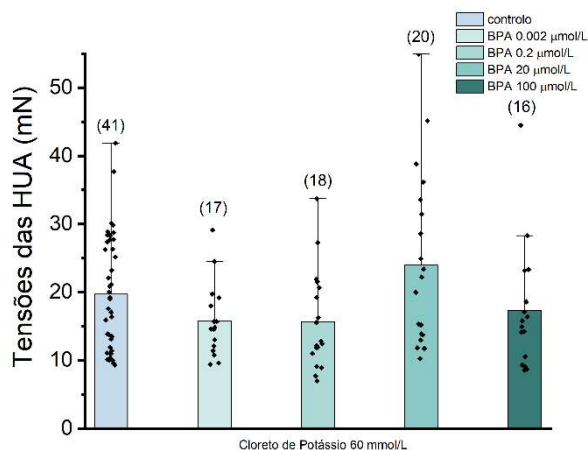


Gráfico 2-Tensão (expressa em milinewtons, mN) das artérias umbilicais humanas (HUA) pré-incubadas com bisfenol A (BPA; 0 µmol/L- 100 µmol/L) e contraídas com cloreto de potássio (KCl, 60 mmol/L) Cada barra representa o valor médio, as linhas verticais o S.D. (desvio padrão) e n entre parênteses é o número de anéis de artéria utilizados. Representa a dispersão de pontos.

4.1.2 Efeitos Vasculares diretos do BPA na contractilidade das HUA induzida pela serotonina (5-HT)

Para analisarmos os efeitos diretos do BPA, os anéis vasculares de HUA foram primeiramente contraídos por serotonina (1 μM) e posteriormente foram adicionadas concentrações crescente de BPA. Conforme evidenciado no gráfico 3, o BPA induziu uma vasorelaxação para todas as concentrações utilizadas (0.002-100 $\mu\text{mol/L}$). Também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle (Veh, veículo), etanol, e o grupo de teste, BPA. Estas diferenças verificaram-se para concentrações de BPA de 0.002, 0.02 e 20 μM ($p < 0.05$, teste t-student), 0.2 e 2 μM ($p < 0.01$, teste t-student). Para além disso o BPA provocou um efeito vasorelaxante mais proeminente para a maior concentração (100 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0.001$, one-way ANOVA com teste Holm-Sidak).

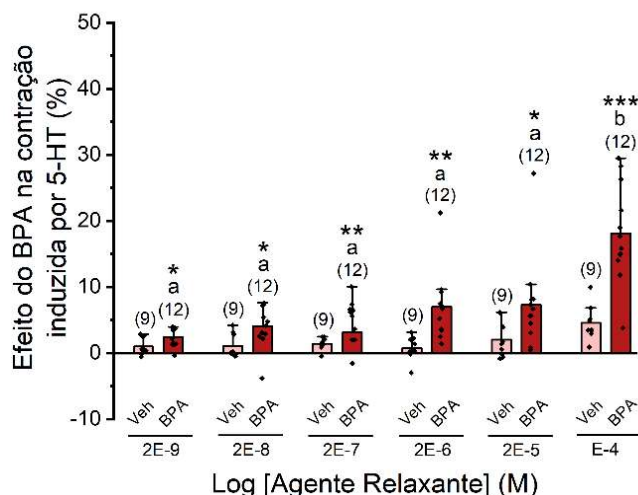


Gráfico 3- Efeito do BPA (0.002-100 μM) sobre as contrações induzidas por serotonina (5-HT, 1 μM) em artérias umbilicais humanas. Os resultados encontram-se expressos em percentagem (%) de relaxação obtida após contração provocada pela 5-HT. As barras representam o valor médio dos dados, as linhas verticais o desvio padrão (S.D) e entre parênteses encontra-se o número de anéis utilizado (n). A análise estatística foi realizada pelo teste t-student, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p \leq 0.001$ versus o controle e pelo teste one-way ANOVA com teste Holm-Sidak, onde diferentes letras significam significâncias diferentes. ♦ Representa a dispersão de pontos

4.1.3 Efeitos Vasculares diretos do BPA na contractilidade das HUA induzida pelo cloreto de potássio (KCl)

O gráfico 4 resume os resultados obtidos para o efeito cumulativo de BPA sobre a HUA contraída com KCl. Os resultados mostraram que o BPA induziu uma vasorelaxação para todas as concentrações utilizadas (0.002-100 μmol/L). O efeito mais pronunciado ocorreu para as concentrações 2, 20 e 100 μmol/L de bisfenol A ($p < 0.001$, one-way ANOVA com teste Holm-Sidak).

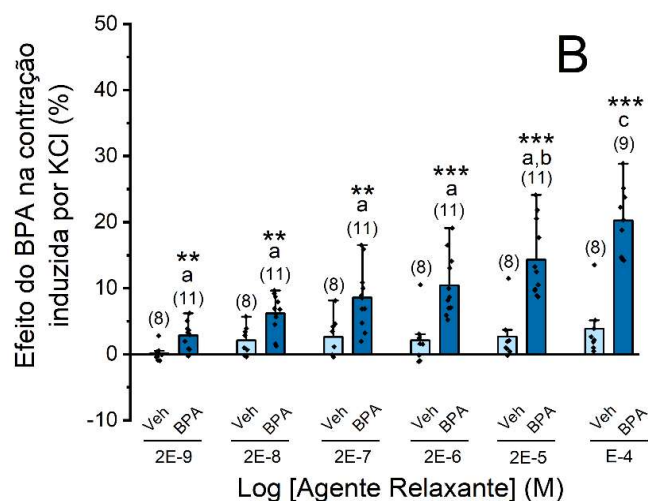


Gráfico 4-Efeito do BPA (0.002-100 μM) sobre as contrações induzidas por cloreto de potássio (KCl, 60 mM) em HUA. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de relaxação após contração por KCl. As barras representam o valor médio dos dados, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e entre parênteses, o número de anéis (n). A análise estatística foi realizada pelo teste t-student, onde ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ versus o controle e pelo teste oneway ANOVA pelo método Holm-Sidak onde diferentes letras significam significâncias diferentes. ♦ Representa a dispersão de pontos

4.1.4. Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo BPA

Para analisarmos os efeitos genômicos do BPA, os anéis vasculares de HUA foram incubados durante 24 horas com diferentes concentrações de BPA. O envolvimento dos nucleótidos cíclicos na resposta vascular induzida pelo BPA foi analisado usando SNP (0,001 μmol/L-100 μmol/L) em HUA contraídas com 5-HT (Fig. 4A) e KCl (Fig. 4B).

Os resultados mostraram uma interação entre a incubação de BPA e as concentrações de SNP ($p \leq 0,001$). No grupo de controlo (sem incubação de BPA), foi observado um relaxamento induzido pelo SNP após a contração por 5-HT (Fig. 4A). As HUA incubadas com 0,002 e 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de BPA mostraram um aumento significativo no relaxamento induzido por todas as concentrações de SNP analisadas ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) quando comparado com o controlo, exceto para a maior concentração de SNP, em que o relaxamento foi menor. Relativamente aos anéis HUA incubados com 20 $\mu\text{mol/L}$ de BPA, o relaxamento induzido pelo SNP diminuiu significativamente em comparação com o controlo, com exceção da concentração de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de SNP. Além disso, as artérias incubadas com 100 $\mu\text{mol/L}$ de BPA mostraram um aumento significativo no relaxamento induzido por todas as concentrações de SNP analisadas, exceto para a concentração mais elevada (100 $\mu\text{mol/L}$) onde se observou um efeito vasorelaxante inferior (66,73%) em relação ao HUA de controlo (78,97%).

Em relação às HUA contraídas com cloreto de potássio, não foram encontradas interações estatisticamente significativas entre HUA incubadas com concentrações de BPA e SNP ($p = 0,212$) (Fig. 4B). No entanto, foram encontradas diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações de SNP e o grupo de controlo. As artérias incubadas com 0,002 $\mu\text{mol/L}$ de BPA mostraram um relaxamento significativamente maior quando comparadas com o controlo de HUA para SNP 0,1 a 100 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,01$, $p < 0,05$). A menor concentração de SNP utilizada (0,01 $\mu\text{mol/L}$) induziu uma resposta vasorelaxante inferior à HUA de controlo. Relativamente aos anéis de HUA incubados com BPA 100 $\mu\text{mol/L}$, os dados mostraram um efeito significativamente relaxante para 0,01-1 $\mu\text{mol/L}$ de SNP, embora para as concentrações mais elevadas de SNP (10 e 100 $\mu\text{mol/L}$) tenha sido observado um efeito vasorelaxante inferior (47,66% e 59,91%, respetivamente) quando comparado com o grupo de controlo (48,70% e 68,29%). Em relação às HUA incubadas com BPA 0,2 $\mu\text{mol/L}$ e BPA 20 $\mu\text{mol/L}$, a vasorelaxação induzida por 0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{mol/L}$ de SNP foi significativamente mais elevada em comparação com o grupo de controlo (sem incubação). Ao contrário do observado para SNP 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$, onde o efeito vasorelaxante do SNP foi inferior ao do controlo de HUA.

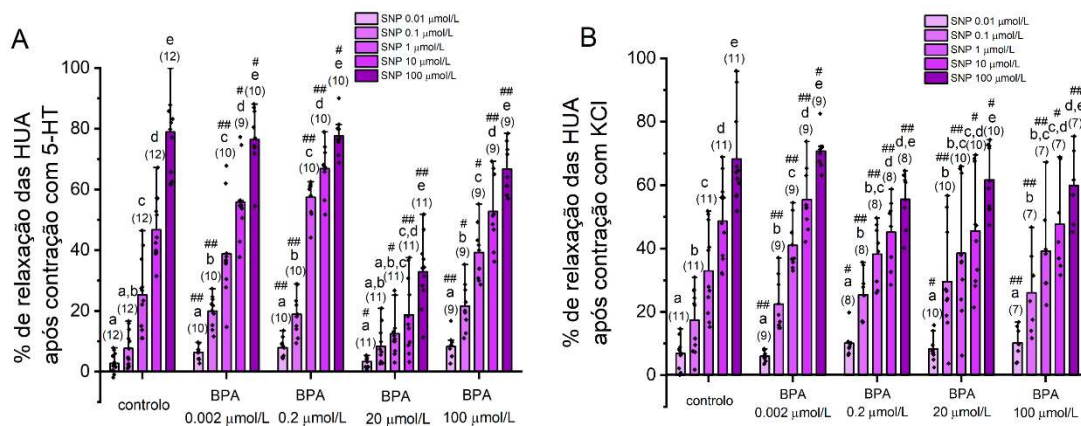


Figura 9- Percentagem (%) de relaxação de HUA pré-incubadas com BPA (0.002-100μmol/L), contraídas com 5-HT (Fig.4A) e KCl (Fig.4B) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP) (0.01-100μmol/L). Cada uma das barras representa a média, as linhas verticais o erro padrão e entre parenteses o n. # (p<0.05), ## (p<0.01) representam diferenças significativas em comparação com o controlo; as letras por sua vez, representam diferenças significativas entre as concentrações de SNP (p<0.05): método two-way ANOVA seguido por teste Holm-Sidak. ♦ Representa a dispersão de pontos

4.1.5. Análise do envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação induzida pelo BPA

O envolvimento dos canais de cálcio na resposta vascular induzida pelo BPA foi analisado usando Nifedipina, Nif (0,01 μmol/L-1 μmol/L) em HUA contraídas com 5-HT (Fig. 5A) e KCl (Fig.5B). Os resultados mostraram uma interação entre a incubação de BPA e as concentrações de Nif em anéis de HUA contraídos com 5-HT (p<0,001). O relaxamento induzido pela nifedipina dos anéis contraídos com 5-HT do grupo de controlo com o efeito máximo foi observado para 1 μmol/L de Nif (61,00%). Globalmente, o relaxamento induzido por todas as concentrações de Nif utilizadas (0,01, 0,1 e 1 μmol/L) foi significativamente maior (p<0,001, p<0,01 e p<0,05) para todas as HUA incubadas com concentrações de BPA (0,002, 0,2, 20 e 100 μmol/L) do que para o grupo de controlo. Relativamente às HUA incubadas com 0,2 μmol/L de BPA, o relaxamento induzido por Nif 0,01 μmol/L foi significativamente maior (-12,91%, p<0,05) do que o observado no grupo de controlo (-2,90%), ao contrário do observado para as outras concentrações analisadas.

Em relação à contracção de HUA com KCl, foi observada uma interacção significativa entre a incubação de BPA e a concentração de Nif ($p < 0,001$). Tal como observado para a serotonina, todas as concentrações de Nif analisadas induziram relaxamento no grupo de controlo com o efeito máximo observado para Nif 1 $\mu\text{mol/L}$ (96,41%, $p = 0,05$). Em HUA incubado com 0,002 $\mu\text{mol/L}$ de BPA o relaxamento induzido por Nif 0,01 $\mu\text{mol/L}$ foi significativamente maior (30,81%, $p < 0,05$) do que o observado no grupo de controlo (20,45%), ao contrário do observado para as outras concentrações analisadas. A incubação com 0,2 $\mu\text{mol/L}$ bisfenol A induziu um relaxante significativamente menor com concentrações mais elevadas de Nif 0,1 e 1 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) do que o grupo de controlo. Para a incubação de 20 $\mu\text{mol/L}$ BPA, o efeito da nifedipina foi maior para o Nif 0,01 $\mu\text{mol/L}$ e menor para o Nif 1 $\mu\text{mol/L}$ do que o observado para o respectivo controlo. A incubação com 100 $\mu\text{mol/L}$ de BPA induz uma vasorelaxação de Nif significativamente mais elevada para todas as concentrações analisadas, quando comparada com o grupo de controlo.

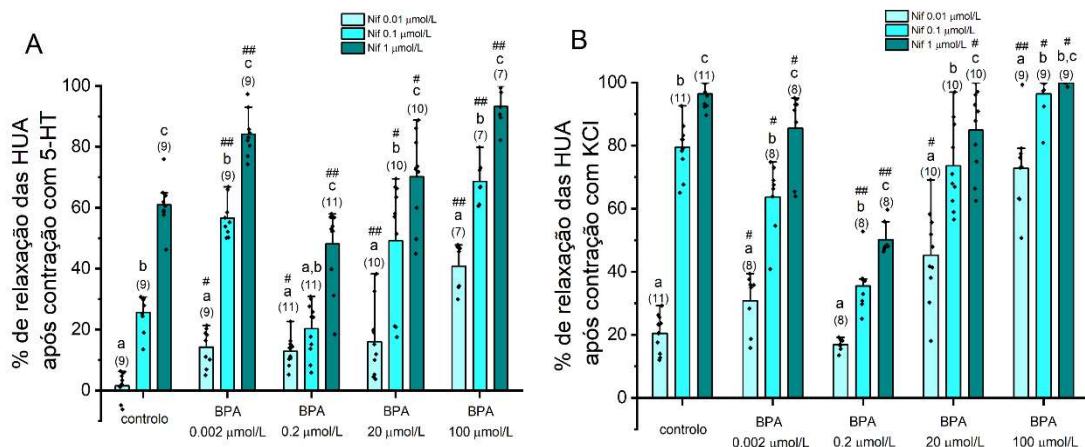


Figura 10- Percentagem(%) de relaxação em HUAs pré-incubadas com BPA(0.002-100 $\mu\text{mol/L}$), contraídas com 5-HT (Fig.5A) e KCl (Fig.5B) sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina(Nif)(0.01-1 $\mu\text{mol/L}$).Cada uma das barras representa a média, as linhas verticais o erro padrão e entre parenteses o n. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) representam diferenças significativas em comparação com o controlo; as letras por sua vez, representam diferenças significativas entre as concentrações de Nif ($p < 0.05$); método two-way ANOVA seguido por teste Holm-Sidak. ♦Representa a dispersão de pontos

4.2. Estudos genómicos – Efeito do BPA na expressão de genes envolvidos nas propriedades contrácteis das HUASMC

4.2.1 Quantificação de mRNA

Para a realização dos estudos genómicos foi necessário quantificar as amostras de mRNA e posteriormente proceder-se ao PCR em tempo real. Os seguintes valores foram retirados do espectrofotómetro:

Tabela 9-Valores da Absorbância e Concentração das amostras analisadas.

Amostra	Concentração de BPA μM	Absorbância (260/280 nm)	Concentração de mRNA
n=1	Controlo	1,938	0,338
	0,002	1,965	0,332
	0,02	1,838	0,427
	0,2	1,935	0,246
	2	1,879	0,099
	20	1,875	0,515
n=2	Controlo	1,772	0,174
	0,002	1,860	0,217
	0,02	1,965	0,178
	0,2	2,040	0,224
	2	1,991	0,262
	20	1,906	0,252
n=3	Controlo	-	-
	0,002	1,932	0,457
	0,02	1,923	0,400
	0,2	1,919	0,455
	2	1,878	0,352
	20	1,863	0,414

Posteriormente foi realizada uma eletroforese, tendo se obtido as bandas representadas na figura abaixo (Fig.6).

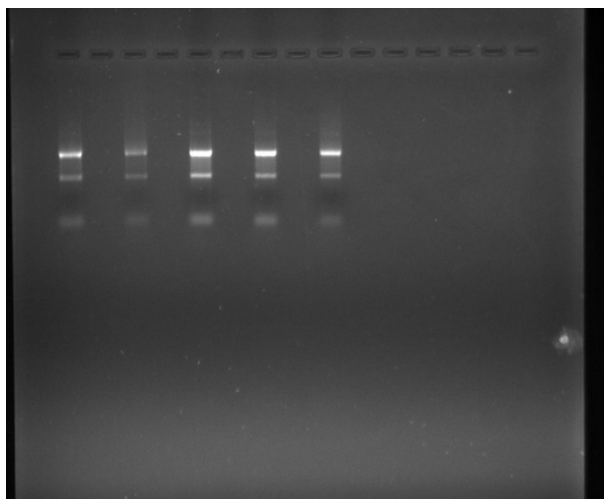


Figura 11-Bandas observadas após eletroforese em gel de Agarose.

As bandas bem definidas são indicadoras de que o mRNA estava intacto, não possuindo uma degradação visível.

4.2.2 Real time- PCR

A figura 7 mostra os efeitos do BPA na expressão da proteína mRNA envolvida nas vias de sinalização de contractilidade das HUASMC, nomeadamente BKCa1.1 α (Fig. 7A) e β 1 (Fig. 7B) subunidades, o canal L- Tipo Ca^{2+} β 1- subunidade (Cav1.2)(Fig. 7C), sGC (Fig. 7D) e PKG 1 α -subunidade (Fig. 7E).

Relativamente à expressão relativa do mRNA do canal da subunidade BKCa1.1 α , os resultados mostraram uma diminuição significativa nas HUASMC para todas as concentrações incubadas de BPA em comparação com o grupo de controlo (Fig.7A). Pelo contrário, a expressão da subunidade β 1 do canal BKCa foi significativamente aumentada nas HUASMC incubadas com 0,02 $\mu\text{mol/L}$ de BPA quando comparado com o grupo de controlo (Fig.7B). Em relação à expressão mRNA dos canais Cav 1.2, os resultados mostraram uma diminuição apenas na concentração de 2 $\mu\text{mol/L}$ de BPA (Fig.7C). Em relação à expressão sGC, a expressão relativa do mRNA foi significativamente maior para 0,02 e 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de BPA (Fig.7D), enquanto não foram observadas diferenças para a expressão relativa do mRNA da PKG (Fig.7E).

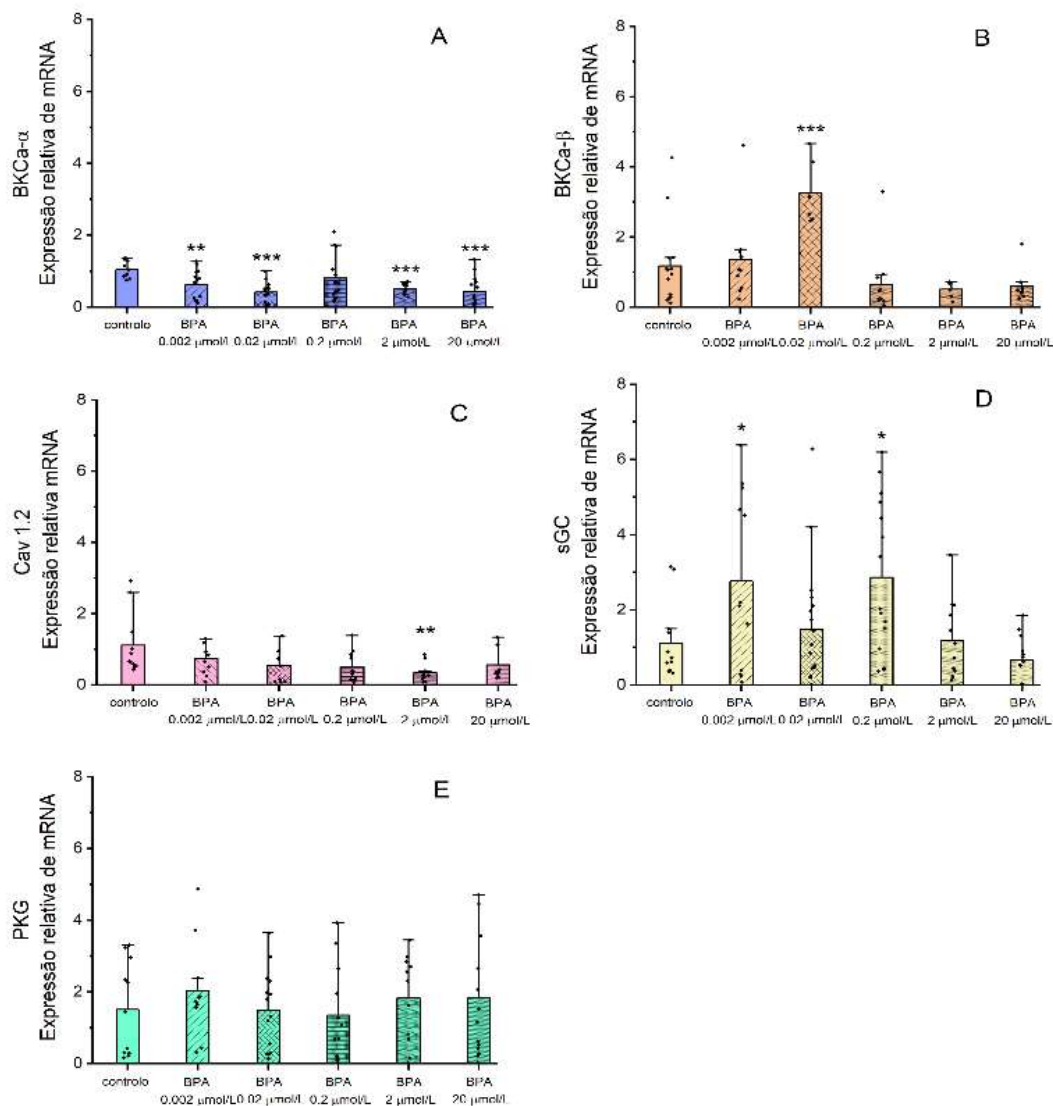


Figura 12 -Expressão relativa de mRNA em células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC) expostas a diferentes concentrações de BPA(0.002-20 μmol/L): (A) BKCa 1.1 α; (B) BKCa-β1; (C) subunidade β do canal de Ca²⁺do tipo L (Cav 1.2); (D) guanilciclase solúvel; e (E) PKG 1-α gene de controle utilizado foi a β-actina humana , de forma a normalizar a expressão de mRNA. Cada barra representa a média e as linhas verticais o desvio padrão (S.D) da média.*Representa as diferenças estatísticas entre o grupo de controle: * (p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,001); (ANOVA com oDunnett´ sPost Hoc test).

4.3. Docking Molecular

Simulações computacionais (*insilicomolecular docking*) foram realizadas como descrito abaixo, para revelar os modos de interação do BPA com as proteínas envolvidas nas vias de sinalização de contractilidade. Antes das simulações moleculares, foi calculado um alinhamento da sequência entre LTCC- β 2 de *Rattusnorvegicus* com a sequência proteica de *Homo sapiens* retirada do UniProt (Q08289). O alinhamento das sequências por pares apresentou 93,34% de identidade. Portanto, a sequência de LTCC- β 2 retirada pela PBD (Q8VGC3) poderia ser utilizada nas simulações.

Os resultados de todas as simulações estão descritos na tabela 9 e podem ser vistos nas Figuras 6, 7 e 8.

Tabela 10-Energias de ligação das simulações de docking molecular para as proteínas estudadas com os seus ligandos naturais (HEM, 8yv, 1PE e CLR), ligando experimental (BPA, 1-10) e ligando auxiliar (Nif)

Ligand	Guanyl cyclase	LTCC- α 1	LTCC- β 2	BKCa- α 1
HEM	-17.04	-	-	-
8YV	-	-1.91	-	-
NIF	-	15200	-1.95	-
1PE	-	-	-0.10	-
CLR	-	-	-	-2.43
BPA_1	-7.16	91200	-3.94	-2.73
BPA_2	-7.09	91300	-3.90	-2.71
BPA_3	-7.08	91300	-3.90	-2.66
BPA_4	-7.06	91300	-3.87	-2.65
BPA_5	-6.96	91300	-3.81	-2.65
BPA_6	-6.89	91300	-3.80	-2.65
BPA_7	-6.86	91400	-3.80	-2.60
BPA_8	-6.82	92300	-3.78	-2.58
BPA_9	-6.80	92400	-3.75	-2.55
BPA_10	-6.73	92600	-3.70	-2.54

Relativamente às simulações para a sGC, os resultados mostram que o ligando natural HEM com a guanilciclase, teve interações envolvendo três resíduos de aminoácidos tais como Arg 116 e um de Tyr 2. Além disso, foi encontrado uma ponte de hidrogênio com o resíduo Arg 116 a 1,922 Å. A energia entre sGC e o ligando natural, foi de -17,04 kcal/mol, uma reação de ligação muito espontânea (Fig. 8A, C). Em relação ao docking molecular de BPA com sGC, as interações encontradas envolveram os seguintes resíduos de aminoácidos: Phe 4, Val 5 e em comum com o ligando HEM a Arg 116. Em

última análise, BPA ligou ao centro ativo da sGC com uma energia de ligação de -7,16 kcal/mol e não foram encontradas pontes de hidrogênio (Fig. 8B, D).

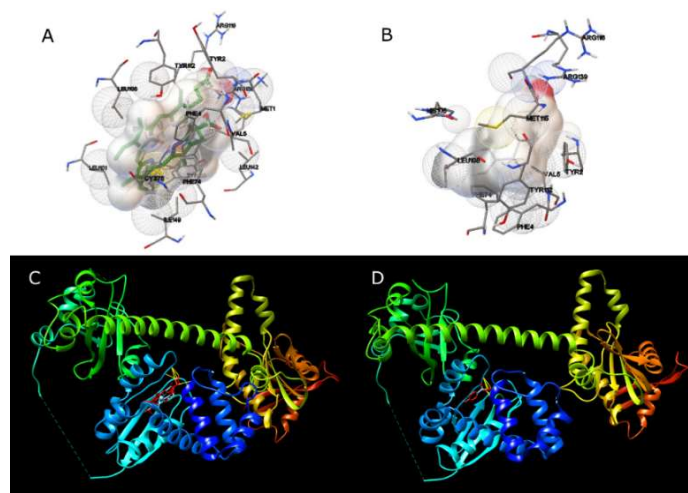


Figura 13- Visualização das interações entre ligando natural HEM e sGC (8A) e ligando de estudo BPA (8B). Os resultados dos complexos do docking molecular, interações e a conformação preferencial foram observadas utilizando o software Chimera 1.15, sGC co-complexado com HEM (8C) e BPA (8D).

Relativamente às simulações de docking do canal LTCC (Figura 9), o Autodocktools mostrou interações entre a subunidade α e todos os ligandos estudados, o controle apresenta Leu 438, Cys 435 e Cys 439 (9A) igual à Nif, que apresenta mais uma interação Thr 442 (9B). Além disso, o BPA e subunidade α mostrou a seguinte interação Cys 435, Cys 439 e Thr 442 (7C). A visualização de complexos de docking molecular no Chimera não foi possível para a subunidade α porque nenhuma conformação estava inteiramente dentro do espaço de pesquisa.

No que diz respeito às simulações para o LTCC- β , os resultados mostram que a energia de ligação entre LTCC- β e o ligando natural 1PE foi de -0,1 kcal/mol, enquanto para BPA foi muito superior (em módulo), -3,94 kcal/mol, o que nos indica que o composto se liga mais espontaneamente do que o próprio ligando. A interação de 1PE com o centro ativo LTCC- β envolve os resíduos de aminoácidos Lys 305, Phe 303 e Asp 302 (7D). Além disso, não foi encontrada uma única ligação H para a distância definida de 2 Å, bem como interações entre a proteína e o ligante, utilizando a Chimera 1.15 (7G). Resultados semelhantes foram obtidos para o estudo computacional com o BPA (7F), onde não foram encontrados confrontos/contactos, nem ligações H à distância estudada. Em relação à Nif e a subunidade β o Chimera não mostrou quaisquer interações de aminoácidos e ligações H (7H). No entanto, o AutodockTools revelou o envolvimento do Asp 302, o His 306, Phe 303 e Leu 443 (7E).

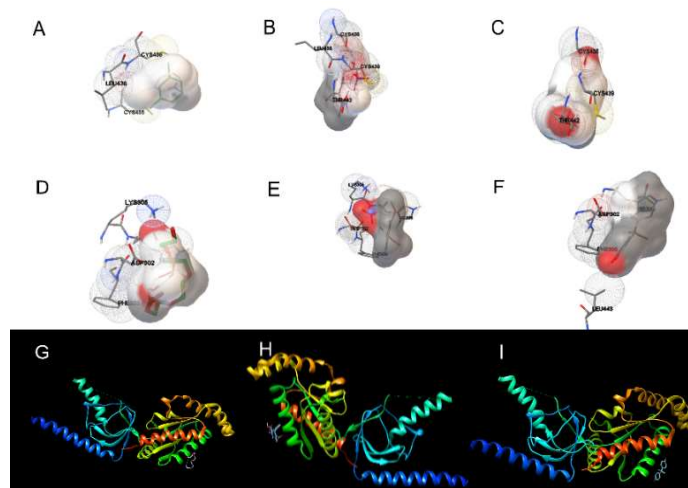


Figura 14- Visualização das interações entre ligando natural (9A), Nif (9B) e BPA (9C) com a subunidade $\alpha 1.1$ do LTCC. Visualização das interações entre o ligando natural 1PE e a subunidade $\beta 1$ do LTCC (9D), Nif (9E), e o ligando em estudo BPA (9F). Os resultados dos complexos de docking molecular, interações e a conformação preferencial foram observados utilizando o software Chimera 1.15, LTCC- $\beta 1$ co-complexado com 1PE (9G), Nif (9H), e BPA (9I).

Em relação às simulações para o canal BKCa- $\alpha 1$ (Figura 10), as energias de ligação do ligando natural e BPA com o centro ativo do canal foram de -2,43 e -2,73 kcal/mol, respetivamente. O programa Autodocktools mostrou duas interações entre a proteína e o ligando natural, com o resíduo Trp 2176 e o His 2172 (Figura 10A). As mesmas interações foram verificadas para BKCa- $\alpha 1$ e BPA (Fig.10B). No entanto a análise realizada através do programa Chimera não mostrou qualquer interação e pontes de hidrogénio entre o BKCa- $\alpha 1$ eo ligando natural ou BPA.

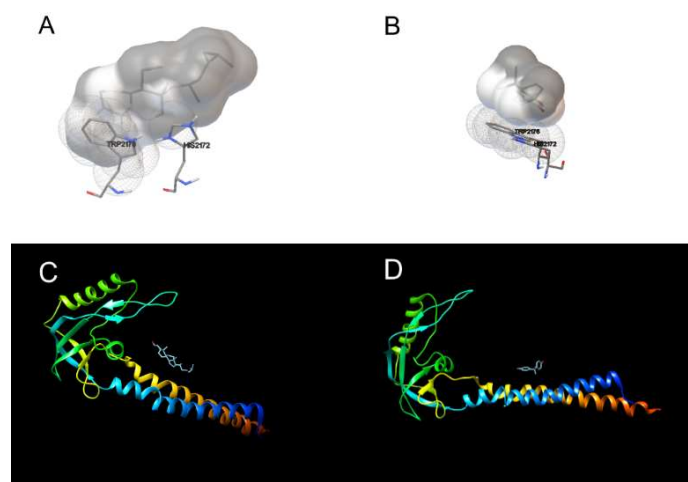


Figura 15- Visualização das interações entre o ligando natural CLR e BKCa- $\alpha 1$ (10A) e o ligando em estudo BPA (10B). Os resultados dos complexos de docking molecular, interações e conformação preferencial foram observados utilizando o software Chimera 1.15, BKCa- $\alpha 1$ co-complexos com CLR (10C) e BPA (10D).

5. Discussão geral

Neste estudo, foi analisado o efeito da exposição do BPA sobre a vasculatura das mulheres grávidas. Para este fim, foi utilizada em primeiro lugar a técnica do banho de órgãos. A remoção do endotélio da HUA foi previamente realizada para estudar apenas o efeito da BPA ao nível do músculo liso. O efeito do BPA no tônus basal da HUA foi analisado adicionando diferentes concentrações deste EDC. Os resultados mostraram que o BPA não induz uma resposta contrátil no tônus basal. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores com EDCs e hormonas sexuais nesta artéria [169, 177, 216].

O passo seguinte foi analisar os efeitos do BPA na vasculatura da HUA em contrações induzidas por 5-HT ou KCl. Relativamente aos efeitos da pré-incubação com várias concentrações de BPA sobre os efeitos máximos induzidos por 5-HT e KCl, os dados mostram que qualquer incubação com BPA não alterou a resposta vasocontrátil.

Posteriormente, anéis de HUA não incubados foram contraídos quer com 5-HT ou KCl e sujeitos a concentrações cumulativas de BPA ou etanol (veículo). O BPA induz um relaxamento a curto prazo e dependente da concentração nas artérias sem endotélio contraídas por ambos os agentes vasoativos. Além disso, os efeitos do BPA demonstraram ser rápidos e reversíveis. Uma vez que os efeitos do BPA foram observados em anéis sem endotélio, podemos inferir que este efeito vasorelaxante não se deve à síntese de óxido nítrico (NO), ou seja, ocorre um efeito independente do endotélio. O relaxamento máximo induzido pelo BPA em todas as contrações analisadas foi observado para a concentração mais elevada estudada (100 $\mu\text{mol/L}$). Estes resultados estão de acordo com Feiteiro et al. (2018) que observaram o efeito relaxante máximo na aorta de rato contraída com KCl [116]. Contudo, o efeito máximo observado foi maior na HUA do que o observado na aorta do rato, e o efeito relaxante na HUA é significativamente diferente na concentração mais baixa (2 nmol/L BPA) para ambos os agentes contráteis.

O BPA está presente no sangue materno, urina materna, líquido amniótico, tecido placentário, sangue do cordão umbilical, leite materno, e colostro humano. No soro materno, os níveis de BPA encontrados são de 0,2 a 20 ng/ml e superiores a 100 ng/g num estudo de tecido placentário [219]. Além disso, vários estudos já relataram que o BPA pode penetrar e acumular-se na placenta humana, e a sua concentração na placenta era maior do que no plasma materno [10]. Contudo, uma vez que o BPA é um químico não persistente, a concentração em amostras de urina varia de 1,6 a 946 $\mu\text{g/L}$

[10, 44]. Neste sentido, podemos concluir que o efeito vasorelaxante induzido pelo BPA é induzido por concentrações detectadas em mulheres grávidas.

Um estudo recente em artéria uterina de rato mostra pela primeira vez que a exposição materna ao BPA (2,5 a 250 µg/kg/dia), durante 30 dias antes da gravidez e nos primeiros 20 dias de gravidez, prejudica o desenvolvimento fetoplacentário ao impedir o normal fluxo sanguíneo uteroplacentário. Os autores demonstraram que o mecanismo envolvido neste efeito negativo inclui a diminuição de NOS₃, ERα e PPARγ [220]. Além disso, vários estudos relatam que o BPA tem uma atividade estrogénica [221-224]. Neste sentido, o passo seguinte deste trabalho foi analisar como a exposição à BPA prejudica a resposta da vasorelaxação nesta artéria humana. Os principais mecanismos envolvidos na vasorelaxação HUA são a via cGMP/NO/sGC/PKG e a ativação/inibição de canais iónicos [153, 210].

Por estas razões, foi investigado o envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo BPA. O efeito de diferentes concentrações de SNP- um estimulador sGC foi analisado em HUA pré-incubado com BPA (0,002-100 µmol/L). O SNP induziu um efeito relaxante em artérias sem incubação de BPA. Estes resultados foram obtidos para artérias contraídas por 5-HT ou KCl, que estão de acordo com estudos anteriores [205, 215]. Relativamente às artérias pré-incubadas com BPA, os resultados mostraram que o efeito induzido pelo SNP depende da concentração de BPA incubada, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (pré-incubação de BPA vs. concentração de SNP). A HUA incubada com BPA (0,002, 0,2, e 100 µmol/L) mostrou um aumento significativo no relaxamento induzido pelo SNP, exceto na maior concentração de SNP onde o relaxamento observado foi menor. Pelo contrário, nas artérias incubadas com BPA (20 µmol/L), o relaxamento induzido pelo SNP diminuiu em comparação com o controlo, com exceção da concentração de 0,1 µmol/L de SNP.

Relativamente às artérias contraídas com cloreto de potássio, os resultados mostraram que o efeito induzido pelo SNP não depende da concentração de BPA incubada, uma vez que não foi observada interação entre os dois fatores (pré-incubação de BPA vs. concentração de SNP). Contudo, a HUA incubada com BPA (0,002 µmol/L) demonstrou um relaxamento significativamente maior para SNP 0,1 a 100 µmol/L, enquanto a menor concentração de SNP utilizada (0,01 µmol/L) induziu uma resposta vasorelaxante inferior. Relativamente às HUA incubadas com BPA (0,2 e 20 µmol/L), a vasorelaxação induzida pelo SNP (0,01, 0,1, e 1 µmol/L) foi significativamente superior ao grupo de controlo, enquanto o SNP (10 e 100 µmol/L) induziu um efeito vasorelaxante inferior. O HUA incubado com BPA (100 µmol/L) mostrou um efeito significativamente relaxante para 0,01-1 µmol/L de SNP, enquanto para as

concentrações mais elevadas de SNP (10 e 100 $\mu\text{mol/L}$) foi observado um efeito vasorelaxante inferior.

Portanto, nas artérias contraídas com 5-HT, o mecanismo vascular do BPA parece ativar a via de sinalização cíclica dos nucleótidos, cGMP/NO/sGC/PKG nas concentrações pré-incubadas de 0,002, 0,2, e 100 $\mu\text{mol/L}$. Por outro lado, em HUA incubadas com 20 $\mu\text{mol/L}$ de BPA parece ocorrer uma diminuição da atividade desta via, induzindo uma diminuição na resposta vasorelaxante. Do mesmo modo, nas artérias contraídas com KCl, o mecanismo vascular da BPA parece também ativar a via de sinalização cíclica do nucleótido cGMP/NO/sGC/PKG. Contudo, apenas nas pré-incubações mais altas com BPA (0,2, 20 e 100 $\mu\text{mol/L}$), esta via de sinalização foi menos ativada induzindo uma resposta vasorelaxante inferior para as concentrações mais elevadas de SNP (10 e 100 $\mu\text{mol/L}$). Recentemente, Barberio et al (2021) relataram que o BPA diminui a síntese de NO através de uma diminuição da expressão de NOS₃, ER α e PPAR γ em artérias uterinas de ratos grávidas. Os autores sugeriram que a BPA comprometia o desenvolvimento fetoplacentário normal [220]. Assim, e segundo Barberio et al (2021), os nossos resultados também sugeriram que a BPA pode ser um promotor de doenças cardiovasculares durante a gravidez, principalmente pré-eclâmpsia. Além disso, estes resultados são semelhantes aos observados para outro EDC, OMC, nas mesmas artérias humanas [215].

De acordo com os dados do banho de órgãos, a expressão de mRNA da sGC foi significativamente mais elevada para 0,02 e 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de BPA. As diferenças para a expressão relativa do mRNA do PKG não foram observadas. Tanto quanto sabemos, não existem dados sobre a expressão destas moléculas após incubação com BPA, contudo o sGC parece desempenhar um papel importante na hipertensão [225-227]. A falta de sGC demonstrada por níveis mais baixos de mRNA e expressão de proteínas na aorta de ratos hipertensivos em comparação com ratos normotensos, pode contribuir para a hipertensão [227-229]. Adicionalmente, no tecido peniano de ratos hipertensivos, a exposição de BPA pode modular a disfunção erétil através da via de sinalização NOS/cGMP/PKG [230]. Por outro lado, os nossos resultados de simulações de docking molecular, mostraram que o BPA apresenta uma ligação estável à subunidade sGC β_1 (-7,16 kcal/mol) mesmo que inferior ao ligando natural HEM (-17,04 kcal/mol). A sGC é a enzima primária que medeia as ações biológicas do NO [231]. A subunidade β_1 contém um grupo heme, que permite que o NO se ligue ao centro Fe²⁺. Conseqüentemente, esta ligação que se traduz numa mudança conformacional, leva a um aumento de várias centenas de vezes na produção de cGMP a partir do trifosfato de guanosina (GTP). Neste sentido, estes resultados mostram

claramente uma modulação de BPA na via de sinalização de NO/sGC/cGMP/PKG em HUA. Esta modulação parece depender da concentração de BPA, do tempo de exposição e do agente contráctil envolvido, bem como das suas respetivas vias ativadas. Além disso, estudos realizados na HUA demonstraram que a ativação dos canais K^+ , nomeadamente os canais K_v e BKCa, se deveu a um aumento da ativação de cGMP e proteína cinase G (PKG) [232]. Assim, a expressão do canal da subunidade BKCa1.1 α foi também analisada e, os resultados mostraram uma diminuição significativa no HUASMC para todas as concentrações incubadas de BPA em comparação com o grupo de controlo. Pelo contrário, a expressão da subunidade β_1 do canal BKCa foi significativamente aumentada no HUASMC incubado com 0,02 $\mu\text{mol/L}$ de BPA quando comparado com o grupo de controlo. Asano et al (2010) já demonstraram em células musculares lisas coronárias, que a BPA ativa o BKCa [113] e esta ativação parece envolver uma ligação extracelular e intracelular, que se deve principalmente à subunidade β_1 [114]. Contudo, os nossos resultados não corroboram estes dados, uma vez que a BPA exibe uma energia de ligação ao centro ativo dos canais BKCa que é tão estável (-2,73 kcal/mol) como o ligando natural (-2,43 kcal/mol). Além disso, estruturalmente, existem canais BKCa funcionais como tetrâmeros de α -subunidades formando o poro do canal iónico juntamente com subunidades específicas de tecido β -subunidades [233]. O acoplamento da subunidade α com a subunidade reguladora β_1 [234], aumenta a sensibilidade Ca^{2+} dos canais, permitindo a vasoregulação do músculo liso [234, 235]. Neste sentido, os nossos resultados parecem indicar que a BPA pode ativar os canais BKCa via $\alpha + \beta_1$ subunidades e modulou a resposta da BPA na vasculatura humana. Além disso, o aumento da expressão de BKCa foi observado durante a hipertensão [236-238]. Além disso, Zhang et. al (2017) mostram nas artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensivos (SHR) uma regulação desigual das subunidades BKCa com a subunidade β_1 a aumentar mais do que a subunidade α . Os autores também sugeriram que em condições patológicas de tensão arterial elevada há um aumento dos rácios de BKCa β_1/α [133]. Por conseguinte, os nossos resultados sugerem que o BPA pode estar envolvido no desenvolvimento da hipertensão por modulação da ativação dos canais de BKCa.

Relativamente aos outros principais mecanismos envolvidos na vasorelaxação HUA, a atividade dos canais Ca^{2+} tipo L (LTCC), o efeito da BPA foi também investigado nesta via utilizando Nif, para inibir especificamente o LTCC. Os dados do banho de órgãos mostraram que o Nif (0,01 $\mu\text{mol/L}$ -1 $\mu\text{mol/L}$) relaxou HUA contraído por 5-HT ou KCl, e o seu efeito é maior nas artérias contraídas com KCl, como também demonstrado pelo nosso grupo de investigação em trabalhos anteriores [215, 217]. Relativamente às incubações de BPA em HUA com 5-HT, o relaxamento induzido por todas as

concentrações de Nif utilizadas foi significativamente superior ao do grupo de controlo, com a exceção da concentração 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de incubação de BPA. Nesta incubação de BPA o relaxamento induzido por Nif 0,1 e 1 $\mu\text{mol/L}$ não foi significativamente maior do que o observado no grupo de controlo. No que diz respeito às incubações de BPA em HUA com KCl, para a incubação com 0,002 $\mu\text{mol/L}$ de BPA o relaxamento induzido por Nif 0,01 $\mu\text{mol/L}$ foi significativamente maior do que o observado no grupo de controlo, ao contrário do observado para as outras concentrações analisadas. Como observado para as concentrações de 5-HT, na incubação com 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de BPA induziu um relaxante significativamente mais baixo com concentrações mais elevadas de Nif 0,1 e 1 $\mu\text{mol/L}$. Para a incubação com 20 $\mu\text{mol/L}$ BPA, o efeito do Nif foi maior para a concentração de 0,01 $\mu\text{mol/L}$ e menor para a concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. A resposta observada na HUA contratada com KCl foi uma resposta típica de não-monotonicidade, ou seja, existe uma relação não linear entre dose e efeito (o sinal da curva muda, na forma de U ou U invertido) [239]. Este efeito do BPA como EDC, é um dos aspetos mais difíceis no estudo da exposição da gravidez, uma vez que pequenas doses podem ter efeitos mais nocivos, tornando difícil definir o limite de dose "seguro" [219].

De acordo com os dados do banho de órgãos, o BPA parece bloquear os canais VOCC do tipo L. Em simulações de docking molecular, os resultados mostram que o BPA apresentou uma energia de ligação muito superior à subunidade $\alpha\text{-1C}$ do canal VOCC do tipo L (91 200,0 kcal/mol) da mesma forma nifedipina (15 200,0 kcal/mol). No entanto, ao contrário, quer a BPA quer a NIF ligam-se mais espontaneamente ao centro ativo da subunidade β2 do canal VOCC do tipo L (com energias de ligação de -3,94 kcal/mol e -1,95 kcal/mol respetivamente) do que o ligando natural (-0,10 kcal/mol). Globalmente, as energias de ligação inferiores revelam uma ligação mais estável ao centro ativo das proteínas [240]. A inativação do VOCC Tipo L requer uma interação específica entre as subunidades α e β e as subunidades acessórias citoplasmáticas [241, 242]. Como relatado na literatura, Nif é um inibidor específico do VOCC de tipo L. Portanto, com base nos nossos resultados, o BPA parece bloquear o VOCC do Tipo L pelo mesmo modo de ação do Nif, atuando como um inibidor competitivo do mesmo, e induzindo a vasorelaxação humana. Estes resultados concordam com o estudo estrutural de Deutschmann et al. (2013) no qual os autores relataram que o BPA atua como um potente bloqueador do VOCC do tipo L, mas discordam dos seus resultados para o VOCC recombinante humano do tipo R no rim embrionário humano [131]. Ao contrário dos nossos resultados, os autores sugeriram que a BPA interage com o sítio externo fora da região de formação de poros (α subunidade) não requerendo vias de sinalização intracelular, não dependente da voltagem e não afetada por canais de alimentação [131]. Por outro lado, as nossas conclusões são consistentes com um

estudo anterior em SMC da linha de células A7r5 em que a BPA evidenciou uma resposta de não-monotonicidade nas correntes Ca^{2+} . Nesta investigação, Feiteiro et al observaram, através de experiências de patch-clamp, que o BPA inibe a atividade do VOCC tipo L nestas células por uma forma não linear e dependente da concentração de BPA utilizada [116]. Assim, os efeitos inibidores do BPA nas correntes de canal Ca^{2+} podem resultar em alterações notáveis na eletrofisiologia cardiovascular, como observado em modelos experimentais *ex vivo* e *in vivo*[10]. No entanto são necessários mais estudos para descobrir a ligação deste composto a alterações vasculares, uma vez que a maioria dos estudos são sobre cardiomiócitos e/ou coração. Contudo, o BPA foi associado a alterações da pressão arterial que resultaram principalmente em hipertensão [91, 105, 135, 137]. De acordo com os resultados da nossa expressão, o BPA apenas na concentração de 2 $\mu\text{mol/L}$ diminui a expressão de mRNA dos canais Cav 1.2. Na literatura foi relatado que em ratos hipertensivos (em comparação com ratos normotensos), há um aumento da expressão [243] e da atividade[244] de VOCC do tipo L. Os nossos resultados concordam com estas observações nas quais se observou um aumento da atividade dos VOCC do tipo L nos dados do banho de órgãos, mas não se verificou um aumento da expressão destes canais. Portanto, a pré-incubação com BPA parece promover o aumento de atividade dos VOCC Tipo L, que pode ser a via de sinalização envolvida no desenvolvimento de perturbações hipertensivas induzidas por BPA.

6. Conclusão

O presente trabalho mostrou que a exposição ao BPA pode modificar a resposta vasorelaxante da HUA. Os dados revelam que o BPA pode interferir com a via NO/sGC/cGMP/PKG através da modulação da sGC e ativação dos canais BKCa. Além disso, o BPA parece bloquear os VOCC do tipo L ligando-se à subunidade β a curto prazo. Contudo, a exposição alongo prazo ao BPA parece aumentar a atividade destes canais através da modulação da expressão genética. Portanto, as nossas descobertas sugerem que o BPA pode ser um indutor de perturbações hipertensivas da gravidez, tais como hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia. Estas perturbações hipertensivas da gravidez são um problema muito grave saúde humana, devido ao aumento da morbidade e mortalidade materna e neonatal. Além disso, o tratamento para estas complicações é controverso e ainda não totalmente compreendido. Neste sentido, as vias de sinalização intracelulares envolvidas na resposta dos EDCs vasculares humanos podem representar um progresso valioso no conhecimento destas perturbações hipertensivas.

7. Bibliografia

1. Organization, W.H. *Cardiovascular Disease(CVDs)*. 2017; Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Frostegard, J., *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease*. BMC Med, 2013. **11**: p. 117.
3. Wong, C.X., et al., *Epidemiology of Sudden Cardiac Death: Global and Regional Perspectives*. Heart Lung Circ, 2019. **28**(1): p. 6-14.
4. Francula-Zaninovic, S. and I.A. Nola, *Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors*. Curr Cardiol Rev, 2018. **14**(3): p. 153-163.
5. Organization, W.H., *Prevention of cardiovascular disease- Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*. W.H. Organization. 2007. 86.
6. Balakumar, P., U.K. Maung, and G. Jagadeesh, *Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus*. Pharmacol Res, 2016. **113**(Pt A): p. 600-609.
7. Chrysohoou, C., et al., *Cardiovascular disease in women: Executive summary of the expert panel statement of women in cardiology of the hellenic cardiological society*. Hellenic J Cardiol, 2020. **61**(6): p. 362-377.
8. Saeed, A., J. Kampangkaew, and V. Nambi, *Prevention of Cardiovascular Disease in Women*. Methodist DeBakey Cardiovasc J, 2017. **13**(4): p. 185-192.
9. Encarnacao, T., et al., *Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment*. Sci Prog, 2019. **102**(1): p. 3-42.
10. Ramadan, M., B. Cooper, and N.G. Posnack, *Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes*. Birth Defects Res, 2020. **112**(17): p. 1362-1385.
11. Bae, S., et al., *Associations of bisphenol A exposure with heart rate variability and blood pressure*. Hypertension, 2012**60**(3): p. 786-93.
12. Mariana, M., et al., *The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review*. Environ Int, 2016. **94**: p. 758-776.
13. Posnack, N.G., *The adverse cardiac effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate and Bisphenol A*. Cardiovasc Toxicol, 2014. **14**(4): p. 339-57.
14. Gear, R., J.A. Kendzioriski, and S.M. Belcher, *Effects of bisphenol A on incidence and severity of cardiac lesions in the NCTR-Sprague-Dawley rat: A CLARITY-BPA study*. Toxicol Lett, 2017. **275**: p. 123-135.
15. Kabir, E.R., M.S. Rahman, and I. Rahman, *A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health*. Environmental Toxicology Pharmacology 2015. **40**(1): p. 241-58.
16. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement*. Endocr Rev, 2009. **30**(4): p. 293-342.
17. Casals-Casas, C. and B. Desvergne, *Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 135-62.
18. Mlynarczuk, J. and R. Rekawiecki, *The role of the orphan receptor SF-1 in the development and function of the ovary*. Reproductive Biology, 2010. **10**(3): p. 177-193.
19. Kung, T., K.A. Murphy, and L.A. White, *The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 536-46.

20. le Maire, A., W. Bourguet, and P. Balaguer, *A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(8): p. 1219-37.
21. De Coster, S. and N. van Larebeke, *Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action*. J Environ Public Health, 2012. **2012**: p. 713696.
22. Lorigo, M., M. Mariana, and E. Cairrao, *Photoprotection of ultraviolet-B filters: Updated review of endocrine disrupting properties*. Steroids, 2018. **131**: p. 46-58.
23. Suh, S., et al., *The banned sunscreen ingredients and their impact on human health: a systematic review*. Int J Dermatol, 2020. **59**(9): p. 1033-1042.
24. Sirois, J., *Examine all available evidence before making decisions on sunscreen ingredient bans*. Sci Total Environ, 2019. **674**: p. 211-212.
25. Stefanidou, M., C. Maravelias, and C. Spiliopoulou, *Human exposure to endocrine disruptors and breast milk*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2009. **9**(3): p. 269-76.
26. Michalowicz, J., *Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation*. Environ Toxicol Pharmacol, 2014. **37**(2): p. 738-58.
27. Santangeli, S., et al., *Effects of BPA on female reproductive function: The involvement of epigenetic mechanism*. General And Comparative Endocrinology, 2016. **245**: p. 122-126.
28. Liao, C. and K. Kannan, *High levels of bisphenol A in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure*. Environ Sci Technol, 2011. **45**(16): p. 6761-8.
29. Quesnot, N., et al., *Modulation of metabolizing enzymes by bisphenol a in human and animal models*. Chem Res Toxicol, 2014. **27**(9): p. 1463-73.
30. Berge, T.L.L., et al., *Bisphenol A in human saliva and urine before and after treatment with dental polymer-based restorative materials*. Eur J Oral Sci, 2019. **127**(5): p. 435-444.
31. Schug, T.T., et al., *Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **127**(3-5): p. 204-15.
32. Hafezi, S.A. and W.M. Abdel-Rahman, *The Endocrine Disruptor Bisphenol A (BPA) Exerts a Wide Range of Effects in Carcinogenesis and Response to Therapy*. Curr Mol Pharmacol, 2019. **12**(3): p. 230-238.
33. Sajiki, J., K. Takahashi, and J. Yonekubo, *Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999. **736**(1-2): p. 255-261.
34. Brock, J.W., et al., *Measurement of bisphenol A levels in human urine*. J Expo Anal Environ Epidemiol, 2001. **11**(4): p. 323-8.
35. Ikezuki, Y., et al., *Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure*. Hum Reprod, 2002. **17**(11): p. 2839-41.
36. Schonfelder, G., et al., *Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(11): p. A703-7.
37. Todaka, E. and C. Mori, *Necessity to establish new risk assessment and risk communication for human fetal exposure to multiple endocrine disruptors in Japan*. Congenit Anom (Kyoto), 2002. **42**(2): p. 87-93.
38. Vandenberg, L.N., et al., *Human exposure to bisphenol A (BPA)*. Reprod Toxicol, 2007. **24**(2): p. 139-77.
39. Ye, X., et al., *Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)*. Int J Hyg Environ Health, 2009. **212**(5): p. 481-91.

40. Pirard, C., et al., *Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population*. *Environ Int*, 2012. **48**: p. 78-83.
41. Cimmino, I., et al., *Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(16).
42. Welshons, W.V., S.C. Nagel, and F.S. vom Saal, *Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure*. *Endocrinology*, 2006. **147**(6 Suppl): p. S56-69.
43. Halimi, A., et al., *A systematic study of the release of bisphenol A by orthodontic materials and its biological effects*. *Int Orthod*, 2016. **14**(4): p. 399-417.
44. Rochester, J.R., *Bisphenol A and human health: a review of the literature*. *Reprod Toxicol*, 2013. **42**: p. 132-55.
45. Melzer, D., et al., *Bisphenol A exposure is associated with in vivo estrogenic gene expression in adults*. *Environ Health Perspect*, 2011. **119**(12): p. 1788-93.
46. Wang, H.X., et al., *Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: a cross-sectional study*. *Environ Health*, 2012. **11**: p. 79.
47. Mattison, D.R., et al., *Pharmaco- and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: a review of the data and identification of knowledge gaps*. *Crit Rev Toxicol*, 2014. **44**(8): p. 696-724.
48. Teeguarden, J.G., et al., *Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach*. *Toxicol Sci*, 2005. **85**(2): p. 823-38.
49. Nishikawa, M., et al., *Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus*. *Environ Health Perspect*, 2010. **118**(9): p. 1196-203.
50. Tang, Z.R., et al., *Oestrogenic Endocrine Disruptors in the Placenta and the Fetus*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(4).
51. Hines, R.N., *The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events*. *Pharmacol Ther*, 2008. **118**(2): p. 250-67.
52. Thayer, K.A., et al., *Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration*. *Environ Int*, 2015. **83**: p. 107-15.
53. Viñas, R., R.M. Goldblum, and C.S. Watson, *Rapid estrogenic signaling activities of the modified (chlorinated, sulfonated, and glucuronidated) endocrine disruptor bisphenol A*. *Endocrine Disruptors*, 2014. **1**(1).
54. Aleksandra, K., R. Aleksandra, and R. Dominik, *Health risk of exposure to bisphenol A (BPA)* 2015. p. 5-11.
55. Volkel, W., et al., *Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration*. *Chem Res Toxicol*, 2002. **15**(10): p. 1281-7.
56. Yoshihara, S., et al., *Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction*. *Toxicol Sci*, 2001. **62**(2): p. 221-7.
57. Yoshihara, S., et al., *Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency*. *Toxicol Sci*, 2004. **78**(1): p. 50-9.
58. Kurebayashi, H., H. Betsui, and Y. Ohno, *Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide*. *Toxicol Sci*, 2003. **73**(1): p. 17-25.
59. Gramec Skledar, D. and L. Peterlin Masic, *Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity?* *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016. **47**: p. 182-199.
60. Genuis, S.J., et al., *Human excretion of bisphenol A: blood, urine, and sweat (BUS) study*. *J Environ Public Health*, 2012. **2012**: p. 185731.

61. Acconcia, F., V. Pallottini, and M. Marino, *Molecular Mechanisms of Action of BPA*. Dose Response, 2015. **13**(4): p. 1559325815610582.
62. Wang, H., et al., *Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway*. Toxicology, 2017. **387**: p. 10-16.
63. Manfo, F.P., et al., *Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function*. Rev Environ Contam Toxicol, 2014. **228**: p. 57-82.
64. Gassman, N.R., *Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects*. Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(2): p. 60-71.
65. Cheong, A., et al., *DNA methylome changes by estradiol benzoate and bisphenol A links early-life environmental exposures to prostate cancer risk*. Epigenetics, 2016. **11**(9): p. 674-689.
66. Keri, R.A., et al., *An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A*. Reprod Toxicol, 2007. **24**(2): p. 240-52.
67. Ma, X.F., et al., *IKKbeta/NF-kappaB mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells*. Arch Biochem Biophys, 2015. **573**: p. 52-8.
68. Kim, Y.S., et al., *Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway*. Chem Res Toxicol, 2015. **28**(4): p. 662-71.
69. Buck Louis, G.M., et al., *Bisphenol A and phthalates and endometriosis: the Endometriosis: Natural History, Diagnosis and Outcomes Study*. Fertil Steril, 2013. **100**(1): p. 162-9 e1-2.
70. Upson, K., et al., *A population-based case-control study of urinary bisphenol A concentrations and risk of endometriosis*. Hum Reprod, 2014. **29**(11): p. 2457-64.
71. Vahedi, M., et al., *Metabolic and endocrine effects of bisphenol A exposure in market seller women with polycystic ovary syndrome*. Environ Sci Pollut Res Int, 2016. **23**(23): p. 23546-23550.
72. Machtinger, R., et al., *Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro*. Hum Reprod, 2013. **28**(10): p. 2735-45.
73. Liu, C., et al., *Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e676.
74. Wang, C., et al., *The role of Pten/Akt signaling pathway involved in BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells*. Environ Toxicol, 2015. **30**(7): p. 793-802.
75. Kataria, A., et al., *Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children*. Pediatr Res, 2017. **81**(6): p. 857-864.
76. Verstraete, S.G., et al., *Bisphenol a increases risk for presumed non-alcoholic fatty liver disease in Hispanic adolescents in NHANES 2003-2010*. Environ Health, 2018. **17**(1): p. 12.
77. Donohue, K.M., et al., *Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and asthma development among inner-city children*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(3): p. 736-42.
78. Chailurkit, L.O., W. Aekplakorn, and B. Ongphiphadhanakul, *The Association of Serum Bisphenol A with Thyroid Autoimmunity*. Int J Environ Res Public Health, 2016. **13**(11).
79. Zhou, A., et al., *Prenatal exposure to bisphenol A and risk of allergic diseases in early life*. Pediatr Res, 2017. **81**(6): p. 851-856.
80. Rahbar, M.H., et al., *Environmental Exposure to Dioxins, Dibenzofurans, Bisphenol A, and Phthalates in Children with and without Autism Spectrum Disorder Living near the Gulf of Mexico*. Int J Environ Res Public Health, 2017. **14**(11).

81. Amin, M.M., et al., *Association of exposure to Bisphenol A with obesity and cardiometabolic risk factors in children and adolescents*. Int J Environ Health Res, 2019. **29**(1): p. 94-106.
82. Vitku, J., et al., *Endocrine disruptors of the bisphenol and paraben families and bone metabolism*. Physiol Res, 2018. **67**(Suppl 3): p. S455-S464.
83. Boudalia, S. and M. Oudir, *Bisphenol-A: Legislation in Industrials Countries and in Algeria*. Research Journal of Environmental Toxicology, 2016. **10**(3): p. 189-192.
84. Commission, E., *On the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials*. Official Journal of the European Union, 2018.
85. Moreman, J., et al., *Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae*. Environ Sci Technol, 2017. **51**(21): p. 12796-12805.
86. Brown, A.R., et al., *Cardiovascular Effects and Molecular Mechanisms of Bisphenol A and Its Metabolite MBP in Zebrafish*. Environ Sci Technol, 2019. **53**(1): p. 463-474.
87. Lombo, M., et al., *Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure*. Environ Pollut, 2015. **206**: p. 667-78.
88. Lombo, M., et al., *Cardiogenesis impairment promoted by bisphenol A exposure is successfully counteracted by epigallocatechin gallate*. Environ Pollut, 2019. **246**: p. 1008-1019.
89. Kim, M.J., et al., *Chronic exposure to bisphenol A can accelerate atherosclerosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice*. Cardiovasc Toxicol, 2014. **14**(2): p. 120-8.
90. Sui, Y., et al., *Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Atherosclerosis in Adult Male PXR-Humanized Mice*. Endocrinology, 2018. **159**(4): p. 1595-1608.
91. Saura, M., et al., *Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS*. FASEB J, 2014. **28**(11): p. 4719-28.
92. Belcher, S.M., R.B. Gear, and E.L. Kendig, *Bisphenol A alters autonomic tone and extracellular matrix structure and induces sex-specific effects on cardiovascular function in male and female CD-1 mice*. Endocrinology, 2015. **156**(3): p. 882-95.
93. Lopresti, A.L., *Association between Micronutrients and Heart Rate Variability: A Review of Human Studies*. Adv Nutr, 2020. **11**(3): p. 559-575.
94. Cygankiewicz, I. and W. Zareba, *Heart rate variability*. Handb Clin Neurol, 2013. **117**: p. 379-93.
95. Sessa, F., et al., *Heart rate variability as predictive factor for sudden cardiac death*. Aging (Albany NY), 2018. **10**(2): p. 166-177.
96. Cypher, A.D., J.R. Ickes, and B. Bagatto, *Bisphenol A alters the cardiovascular response to hypoxia in Danio rerio embryos*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2015. **174-175**: p. 39-45.
97. Byrnes, J.R. and A.S. Wolberg, *Red blood cells in thrombosis*. Blood, 2017. **130**(16): p. 1795-1799.
98. Cypher, A.D., B. Fetterman, and B. Bagatto, *Vascular parameters continue to decrease post-exposure with simultaneous, but not individual exposure to BPA and hypoxia in zebrafish larvae*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2018. **206-207**: p. 11-16.
99. Leone, O., et al., *The spectrum of myocarditis: from pathology to the clinics*. Virchows Arch, 2019. **475**(3): p. 279-301.
100. Olejniczak, M., et al., *Viral Myocarditis-Incidence, Diagnosis and Management*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2020. **34**(6): p. 1591-1601.

101. Perez-Brandao, C., C. Trigo, and F.P. F, *Pericarditis - Clinical presentation and characteristics of a pediatric population*. Rev Port Cardiol (Engl Ed), 2019. **38**(2): p. 97-101.
102. Troughton, R.W., C.R. Asher, and A.L. Klein, *Pericarditis*. The Lancet, 2004. **363**(9410): p. 717-727.
103. Bruno, K.A., et al., *BPA Alters Estrogen Receptor Expression in the Heart After Viral Infection Activating Cardiac Mast Cells and T Cells Leading to Perimyocarditis and Fibrosis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 598.
104. Imazio, M., *Pericarditis: pathophysiology, diagnosis, and management*. Curr Infect Dis Rep, 2011. **13**(4): p. 308-16.
105. Patel, B.B., et al., *Lifelong exposure to bisphenol a alters cardiac structure/function, protein expression, and DNA methylation in adult mice*. Toxicol Sci, 2013. **133**(1): p. 174-85.
106. Filice, M., et al., *The heart of the adult goldfish Carassius auratus as a target of Bisphenol A: a multifaceted analysis*. Environmental Pollution, 2021. **269**.
107. Zhou, R., et al., *Combined effects of BPA and PFOS on fetal cardiac development: In vitro and in vivo experiments*. Environ Toxicol Pharmacol, 2020. **80**: p. 103434.
108. Sharma, S., M. Sharma, and P.T. Bhattacharya, *Hypotension*, T. Island, Editor. 2021, StatPearls Publishing.
109. Fardoun, M., et al., *The hypertensive potential of estrogen: An untold story*. Vascul Pharmacol, 2020. **124**: p. 106600.
110. Kibel, A., et al., *Oxidative Stress in Ischemic Heart Disease*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 6627144.
111. D'Oria, R., et al., *The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 5732956.
112. Aboul Ezz, H.S., Y.A. Khadrawy, and I.M. Mourad, *The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats*. Cytotechnology, 2015. **67**(1): p. 145-55.
113. Asano, S., J.D. Tune, and G.M. Dick, *Bisphenol A activates Maxi-K (K(Ca)_{1.1}) channels in coronary smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(1): p. 160-70.
114. Rottgen, T.S., et al., *Bisphenol A activates BK channels through effects on alpha and beta1 subunits*. Channels (Austin), 2014. **8**(3): p. 249-57.
115. Triggle, D.J., *L-type calcium channels*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(4): p. 443-57.
116. Feiteiro, J., et al., *Inhibition of L-type calcium channels by Bisphenol A in rat aorta smooth muscle*. J Toxicol Sci, 2018. **43**(10): p. 579-586.
117. Belcher, S.M., et al., *Rapid estrogen receptor-mediated mechanisms determine the sexually dimorphic sensitivity of ventricular myocytes to 17beta-estradiol and the environmental endocrine disruptor bisphenol A*. Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 712-20.
118. Yan, S., et al., *Bisphenol A and 17beta-estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25455.
119. Posnack, N.G., et al., *Physiological response of cardiac tissue to bisphenol A: alterations in ventricular pressure and contractility*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **309**(2): p. H267-75.
120. Yan, S., et al., *Low-dose bisphenol A and estrogen increase ventricular arrhythmias following ischemia-reperfusion in female rat hearts*. Food Chem Toxicol, 2013. **56**: p. 75-80.
121. Gao, X., et al., *Molecular mechanisms underlying the rapid arrhythmogenic action of bisphenol A in female rat hearts*. Endocrinology, 2013. **154**(12): p. 4607-17.
122. Posnack, N.G., et al., *Bisphenol A exposure and cardiac electrical conduction in excised rat hearts*. Environ Health Perspect, 2014. **122**(4): p. 384-90.

123. Klint, H., et al., *Low-dose exposure to bisphenol A in combination with fructose increases expression of genes regulating angiogenesis and vascular tone in juvenile Fischer 344 rat cardiac tissue*. Ups J Med Sci, 2017. **122**(1): p. 20-27.
124. Ribeiro-Varandas, E., et al., *Bisphenol A disrupts transcription and decreases viability in aging vascular endothelial cells*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 15791-805.
125. Melincovici, C.S., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(2): p. 455-467.
126. Andersson, H. and E. Brittebo, *Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells*. Arch Toxicol, 2012. **86**(3): p. 465-74.
127. Fontes, M.S., et al., *Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(8): p. 2020-9.
128. Cheng, W., et al., *Low doses of BPA induced abnormal mitochondrial fission and hypertrophy in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes via the calcineurin-DRP1 signaling pathway: A comparison between XX and XY cardiomyocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2020. **388**: p. 114850.
129. O'Reilly, A.O., et al., *Bisphenol A binds to the local anesthetic receptor site to block the human cardiac sodium channel*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41667.
130. Michaela, P., et al., *Bisphenol A differently inhibits CaV3.1, Ca V3.2 and Ca V3.3 calcium channels*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2014. **387**(2): p. 153-63.
131. Deutschmann, A., et al., *Bisphenol A inhibits voltage-activated Ca(2+) channels in vitro: mechanisms and structural requirements*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(2): p. 501-11.
132. Zhang, Y.F., et al., *Cardiovascular toxicity and mechanism of bisphenol A and emerging risk of bisphenol S*. Sci Total Environ, 2020. **723**: p. 137952.
133. Zhang, Y.F., et al., *Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo*. Environ Pollut, 2018. **237**: p. 1072-1079.
134. Risher, J.F., et al., *The elderly as a sensitive population in environmental exposures: making the case*. Rev Environ Contam Toxicol, 2010. **207**: p. 95-157.
135. Bae, S., et al., *Maternal Urinary Bisphenol A Concentration During Midterm Pregnancy and Children's Blood Pressure at Age 4*. Hypertension, 2017. **69**(2): p. 367-374.
136. Bae, S. and Y.C. Hong, *Exposure to bisphenol A from drinking canned beverages increases blood pressure: randomized crossover trial*. Hypertension, 2015. **65**(2): p. 313-9.
137. Shankar, A. and S. Teppala, *Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults*. J Environ Public Health, 2012. **2012**: p. 481641.
138. Melzer, D., et al., *Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women*. Circulation, 2012. **125**(12): p. 1482-90.
139. Lind, P.M. and L. Lind, *Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly*. Atherosclerosis, 2011. **218**(1): p. 207-13.
140. Melzer, D., et al., *Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8673.
141. Melzer, D., et al., *Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43378.
142. Aekplakorn, W., L.O. Chailurkit, and B. Ongphiphadhanakul, *Association of serum bisphenol a with hypertension in thai population*. Int J Hypertens, 2015. **2015**: p. 594189.

143. Leclerc, F., M.F. Dubois, and A. Aris, *Maternal, placental and fetal exposure to bisphenol A in women with and without preeclampsia*. Hypertens Pregnancy, 2014. **33**(3): p. 341-8.
144. Xiong, Q., et al., *Elevated serum Bisphenol A level in patients with dilated cardiomyopathy*. Int J Environ Res Public Health, 2015. **12**(5): p. 5329-37.
145. Pignatelli, P., et al., *Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights*. Kardiol Pol, 2018. **76**(4): p. 713-722.
146. Warembourg, C., et al., *Early-Life Environmental Exposures and Blood Pressure in Children*. J Am Coll Cardiol, 2019. **74**(10): p. 1317-1328.
147. Steffensen, I.L., et al., *Bisphenols and Oxidative Stress Biomarkers-Associations Found in Human Studies, Evaluation of Methods Used, and Strengths and Weaknesses of the Biomarkers*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(10).
148. Wang, Y.X., et al., *Urinary levels of bisphenol A, F and S and markers of oxidative stress among healthy adult men: Variability and association analysis*. Environ Int, 2019. **123**: p. 301-309.
149. Huang, C.H., et al., *Identify potential drugs for cardiovascular diseases caused by stress-induced genes in vascular smooth muscle cells*. PeerJ, 2016. **4**: p. e2478.
150. Pellegrini, M., et al., *Endocrine disruptors differently influence estrogen receptor beta and androgen receptor in male and female rat VSMC*. J Cell Physiol, 2014. **229**(8): p. 1061-8.
151. Gao, F., et al., *Involvement of estrogen receptor and GPER in bisphenol A induced proliferation of vascular smooth muscle cells*. Toxicol In Vitro, 2019. **56**: p. 156-162.
152. Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi, *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(7): p. 247-57.
153. Lorigo, M., et al., *How is the human umbilical artery regulated?* J Obstet Gynaecol Res, 2018. **44**(7): p. 1193-1201.
154. Muniraman, H., T. Sardesai, and S. Sardesai, *Disorders of the Umbilical Cord*. Pediatr Rev, 2018. **39**(7): p. 332-341.
155. Di Naro, E., et al., *Umbilical cord morphology and pregnancy outcome*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001. **96**(2): p. 150-157.
156. Bosselmann, S. and G. Mielke, *Sonographic Assessment of the Umbilical Cord*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2015. **75**(8): p. 808-818.
157. Moshiri, M., et al., *Comprehensive imaging review of abnormalities of the umbilical cord*. Radiographics, 2014. **34**(1): p. 179-96.
158. Benirschke, K., *Remarkable placenta*. Clinical Anatomy, 1998. **11**(3): p. 194-205.
159. Kellow, Z.S. and V.A. Feldstein, *Ultrasound of the placenta and umbilical cord: a review*. Ultrasound Q, 2011. **27**(3): p. 187-97.
160. Ferguson, V.L. and R.B. Dodson, *Bioengineering aspects of the umbilical cord*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009. **144** Suppl 1: p. S108-13.
161. Lorigo, M., et al., *Horizons in World Cardiovascular Research*, B.E. H., Editor. 2019.
162. Roffino, S., et al., *Premature birth is associated with not fully differentiated contractile smooth muscle cells in human umbilical artery*. Placenta, 2012. **33**(6): p. 511-7.
163. Arutyunyan, I., et al., *Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 6901286.
164. Meyer, W.W., et al., *Structure and closure mechanism of the human umbilical artery*. Eur J Pediatr, 1978. **128**(4): p. 247-59.
165. Clark, M.G., et al., *Vascular and endocrine control of muscle metabolism*. Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 1): p. E797-812.

166. Okatani, Y., K. Watanabe, and Y. Sagara, *Effect of nitric oxide, prostacyclin, and thromboxane on the vasospastic action of hydrogen peroxide on human umbilical artery*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1997. **76**(6): p. 515-20.
167. Henriques, M., *O Sistema Endócrino*. 2008, Universidade de Lisboa Repositório Universidade de Lisboa.
168. Nheu, L., et al., *Physiological effects of androgens on human vascular endothelial and smooth muscle cells in culture*. *Steroids*, 2011. **76**(14): p. 1590-6.
169. Cairrao, E., et al., *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2009. **45**(3-4): p. 175-84.
170. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(3): p. 767-801.
171. Mazza, G., et al., *Marker profile for the evaluation of human umbilical artery smooth muscle cell quality obtained by different isolation and culture methods*. *Cytotechnology*, 2016. **68**(4): p. 701-11.
172. Sandison, M.E., J. Dempster, and J.G. McCarron, *The transition of smooth muscle cells from a contractile to a migratory, phagocytic phenotype: direct demonstration of phenotypic modulation*. *J Physiol*, 2016. **594**(21): p. 6189-6209.
173. Wang, G., et al., *Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells*. *J Physiol*, 2015. **593**(14): p. 3013-30.
174. Ribeiro, M.P., et al., *Isolation of human umbilical arterial smooth muscle cells (HUASMC)*. *J Vis Exp*, 2010(41).
175. Tufan, H., et al., *Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levcromakalim*. *Life Sciences*, 2003. **72**(12): p. 1321-1329.
176. Bodelsson, G. and M. Stjernquist, *Characterization of endothelin receptors and localization of 125I-endothelin-1 binding sites in human umbilical artery*. *European Journal of Pharmacology*, 1993. **249**(3): p. 299-305.
177. Leung, S.W., et al., *Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions*. *Early Hum Dev*, 2006. **82**(7): p. 457-62.
178. Radenkovic, M., et al., *Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy*. *Pharmacol Rep*, 2007. **59**(1): p. 64-73.
179. Cairrao, E., et al., *Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008. **376**(5): p. 375-83.
180. Quan, A., et al., *5-Hydroxytryptamine and Thromboxane A₂ as Physiologic Mediators of Human Umbilical Artery Closure*. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2016. **10**(8): p. 490-495.
181. Gloria, S., et al., *Tributyltin role on the serotonin and histamine receptors in human umbilical artery*. *Toxicol In Vitro*, 2018. **50**: p. 210-216.
182. Saleh, L., et al., *The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia*. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2016. **10**(5): p. 282-93.
183. Bogoni, G., et al., *Characterization of endothelin receptors in the human umbilical artery and vein*. *Br J Pharmacol*, 1996. **119**(8): p. 1600-4.
184. Rizzi, A., et al., *Contractile activity of endothelins and their precursors in human umbilical artery and vein: identification of distinct endothelin-converting enzyme activities*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998. **31 Suppl 1**: p. S58-61.
185. Takeji, T., et al., *Effect of a novel vasoconstrictor endothelin-1 (1-31) on human umbilical artery*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **270**(2): p. 622-4.
186. Davenport, A.P., et al., *Endothelin*. *Pharmacol Rev*, 2016. **68**(2): p. 357-418.

187. Unic, A., et al., *Endothelins -- clinical perspectives*. Biochem Med (Zagreb), 2011. **21**(3): p. 231-42.
188. Tiritilli, A., et al., *BK2 but not BK1 receptors mediating contractile response in human umbilical arteries: role of thromboxane A2*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2004. **26**(4): p. 247-52.
189. Santos-Silva, A.J., et al., *Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors*. Reprod Sci, 2009. **16**(12): p. 1175-85.
190. Santos-Silva, A.J., et al., *PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries*. Eur J Pharmacol, 2008. **582**(1-3): p. 102-9.
191. Lovren, F., et al., *Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery*. Br J Pharmacol, 1999. **127**(5): p. 1247-55.
192. Zhang, J., Y. Gong, and Y. Yu, *PG F(2alpha) Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease*. Front Pharmacol, 2010. **1**: p. 116.
193. Salemme, S., et al., *L, P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(1-4): p. 55-64.
194. Fan, G., et al., *Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle*. Channels (Austin), 2019. **13**(1): p. 505-519.
195. Cribbs, L.L., *T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 221-30.
196. Sato, N., et al., *The Vasodilatory Effects of Hydralazine, Nicardipine, Nitroglycerin, and Fenoldopam in the Human Umbilical Artery*. 2003. **96**(2): p. 539-544.
197. Carvajal, J.A., et al., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. Journal of Cellular Physiology, 2000. **184**(3): p. 409-420.
198. Primeau, J.O., et al., *The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase*. Subcell Biochem, 2018. **87**: p. 229-258.
199. Stammers, A.N., et al., *The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA)*. Can J Physiol Pharmacol, 2015. **93**(10): p. 843-54.
200. Rebolledo, A., et al., *The Na⁺/Ca²⁺ exchanger is active and working in the reverse mode in human umbilical artery smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(3): p. 840-5.
201. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 247-66.
202. Clyman, R.I., et al., *Guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate content of human umbilical artery*. J Clin Invest, 1975. **55**(5): p. 1020-5.
203. Tousoulis, D., et al., *The role of nitric oxide on endothelial function*. Curr Vasc Pharmacol, 2012. **10**(1): p. 4-18.
204. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. J Pharmacol Sci, 2015. **129**(2): p. 83-94.
205. Lovren, F. and C. Triggle, *Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(3): p. 521-9.
206. Provitera, L., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation in human umbilical vessels*. J Physiol Pharmacol, 2019. **70**(4).
207. Bobin, P., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective*. Arch Cardiovasc Dis, 2016. **109**(6-7): p. 431-43.
208. Ko, E.A., et al., *Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells*. J Smooth Muscle Res, 2008. **44**(2): p. 65-81.
209. Martin, P., et al., *Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: a review of their roles in human umbilical artery contraction*. Reprod Sci, 2014. **21**(4): p. 432-41.

210. Lorigo, M., N. Oliveira, and E. Cairrao, *Clinical Importance of the Human Umbilical Artery Potassium Channels*. Cells, 2020. **9**(9).
211. Burg, E.D., C.V. Remillard, and J.X. Yuan, *Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S99-S111.
212. Jackson, W.F., *KV channels and the regulation of vascular smooth muscle tone*. Microcirculation, 2018. **25**(1).
213. Melnyk, M.I., et al., *Liposomal quercetin potentiates maxi-K channel openings in smooth muscles and restores its activity after oxidative stress*. J Liposome Res, 2019. **29**(1): p. 94-101.
214. Milesi, V., et al., *Potassium channels in human umbilical artery cells*. J Soc Gynecol Investig, 2003. **10**(6): p. 339-46.
215. Lorigo, M., et al., *UV-B filter octylmethoxycinnamate impaired the main vasorelaxant mechanism of human umbilical artery*. Chemosphere, 2021. **277**: p. 130302.
216. Lorigo, M., et al., *UV-B Filter Octylmethoxycinnamate Induces Vasorelaxation by Ca(2+) Channel Inhibition and Guanylyl Cyclase Activation in Human Umbilical Arteries*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
217. Saldanha, P.A., et al., *Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2013. **40**(3): p. 181-9.
218. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
219. Lorigo, M. and E. Cairrao, *Fetoplacental vasculature as a model to study human cardiovascular endocrine disruption*. Mol Aspects Med, 2021: p. 101054.
220. Barberio, L., et al., *Bisphenol a Interferes with Uterine Artery Features and Impairs Rat Feto-Placental Growth*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(13).
221. Lindholm, C., K.L. Pedersen, and S.N. Pedersen, *Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquatic Toxicology, 2000. **48**(2-3): p. 87-94.
222. Lee, H.S., et al., *Bisphenol A exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity*. Biosci Biotechnol Biochem, 2014. **78**(8): p. 1371-5.
223. Le Fol, V., et al., *In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays*. Ecotoxicol Environ Saf, 2017. **142**: p. 150-156.
224. Pinto, C., et al., *Differential activity of BPA, BPAF and BPC on zebrafish estrogen receptors in vitro and in vivo*. Toxicol Appl Pharmacol, 2019. **380**: p. 114709.
225. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase*. Brain Research Bulletin, 2004. **62**(6): p. 505-515.
226. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Structure and regulation of soluble guanylate cyclase*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 533-59.
227. Zhong, C., et al., *Age Impairs Soluble Guanylyl Cyclase Function in Mouse Mesenteric Arteries*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(21).
228. Ruetten, H., et al., *Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 1999. **85**(6): p. 534-41.
229. Groneberg, D., et al., *Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice*. Circulation, 2010. **121**(3): p. 401-9.
230. Akintunde, J.K., et al., *Naringin regulates erectile dysfunction by abolition of apoptosis and inflammation through NOS/cGMP/PKG signalling pathway on exposure to Bisphenol-A in hypertensive rat model*. Reprod Toxicol, 2020. **95**: p. 123-136.

231. Kang, Y., et al., *Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase*. Nature, 2019. **574**(7777): p. 206-210.
232. Cairrao, E., A.J. Santos-Silva, and I. Verde, *PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Eur J Pharmacol, 2010. **640**(1-3): p. 94-101.
233. Nourian, Z., et al., *Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (BKCa) alpha-subunit splice variants in resistance arteries from rat cerebral and skeletal muscle vasculature*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98863.
234. Szteyn, K. and H. Singh, *BKCa Channels as Targets for Cardioprotection*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(8).
235. Hill, M.A., et al., *Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling*. FEBS Lett, 2010. **584**(10): p. 2033-42.
236. Rusch, N.J. and Y. Liu, *Potassium channels in hypertension: homeostatic pathways to buffer arterial contraction*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1997. **130**(3): p. 245-251.
237. Wang, R. and L. Wu, *The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8222-6.
238. Faraci, F.M. and D.D. Heistad, *Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 53-97.
239. Vandenberg, L.N., et al., *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses*. Endocr Rev, 2012. **33**(3): p. 378-455.
240. Ao, J., et al., *Organic UV filters exposure induces the production of inflammatory cytokines in human macrophages*. Sci Total Environ, 2018. **635**: p. 926-935.
241. Van Petegem, F., et al., *Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain*. Nature, 2004. **429**(6992): p. 671-5.
242. Findeisen, F., et al., *Stapled Voltage-Gated Calcium Channel (CaV) alpha-Interaction Domain (AID) Peptides Act As Selective Protein-Protein Interaction Inhibitors of CaV Function*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(6): p. 1313-1326.
243. Sonkusare, S., et al., *Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications*. Vascul Pharmacol, 2006. **44**(3): p. 131-42.
244. Pinterova, M., J. Kunes, and J. Zicha, *Altered neural and vascular mechanisms in hypertension*. Physiol Res, 2011. **60**(3): p. 381-402.