



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Efeitos genómicos dos compostos orgânicos de estanho a nível vascular

Solange Isabel Alberto Glória

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues

Co-orientador: Prof. Doutora Ana Catarina Sousa

Covilhã, Outubro de 2016

Dedicatória

Aos meus pais.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues por toda a ajuda, pela orientação, por todos os ensinamentos transmitidos, por toda a paciência e disponibilidade demonstrados ao longo da realização deste trabalho, e pela simpatia com que sempre me abordou.

Agradeço ao Professor Doutor Ignacio Verde, pela inclusão no grupo de cardiovascular, pelos conhecimentos transmitidos e por toda a simpatia.

Agradeço também à minha co-orientadora, a Professora Doutora Ana Sousa por todos os conhecimentos relativamente aos disruptores endócrinos e ao TBT, e pelo seu tempo disponibilizado.

Um obrigado sincero ao Professor Doutor Cláudio Maia pela ajuda, pela simpatia, pelo tempo disponibilizado e todas as aprendizagens transmitidas sobre o PCR em tempo real.

Agradeço à Professora Doutora Luiza Granadeiro, e ao João Marques por todos os conhecimentos transmitidos e disponibilidade para a realização dos testes de viabilidade celular.

Um agradecimento especial às minhas colegas de laboratório por me terem recebido tão bem, por todos os conhecimentos transmitidos, por todas as horas disponibilizadas, e mais importante pela amizade.

Quero agradecer ao André por ser a pessoa que está sempre presente, para me apoiar e me dar força, e por acreditar em mim em todos os momentos.

Por fim, agradeço aos meus pais que desde sempre estiveram presentes para me apoiar, pela força, pelo amor, por sempre acreditarem em mim e principalmente pelo esforço para me permitirem chegar até aqui. Sem eles nada disto teria sido possível.

Resumo

O TBT ganhou ampla aplicação como biocida em tintas anti vegetativas para navios. Este composto é extremamente tóxico para uma grande variedade de organismos, desde bactérias a mamíferos, incluídos os humanos. Recentemente a toxicidade do TBT tem sido demonstrada a nível vascular, e os resultados obtidos até ao momento parecem sugerir que o TBT pode constituir um fator de risco para a doença cardiovascular.

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi averiguar os efeitos do TBT a nível vascular.

Através dos resultados verificou-se que uma exposição ao composto, a curto prazo, provoca nas HUA um efeito relaxante e dependente da concentração na presença dos agentes contrateis histamina e KCl.

Como resultados da exposição a longo prazo verificou-se que a maioria das artérias incubadas com 100 μM de TBT, aquando a adição de 5-HT, não têm capacidade de contrair e analisando o nível de expressão do gene 5-HT_{2A}, este encontra-se sub-regulado. Para a histamina verificou-se que o composto induz uma relaxação dependente da concentração. Analisando os níveis de expressão do mRNA do H₁ deparamo-nos com expressão génica reduzida.

Testes de viabilidade celular demonstram que a toxicidade do TBT para as HUASMC ocorre a partir da concentração de 1 μM .

Palavras-chave

Disruptores endócrinos; Organoestanhos; TBT; artéria umbilical humana; banho de órgãos; qPCR.

Abstract

Over the years, the TBT has gained a wide application as a biocide in antifouling paints for marine vessels. This compound is extremely toxic to an extensive range of organisms, from bacteria to mammals, including humans. Recently, TBT toxicity has been demonstrated in a vascular level, and the results obtained so far seem to suggest that TBT may constitute a risk factor for cardiovascular disease.

There so, the main purpose of this current work was to verify TBT effects at a vascular level.

Through the obtained results it was demonstrated that an exposure to the compound, at short term, induces concentration-dependent relaxation effect in the HUA in the presence of contractile agents, histamine and KCl.

As results of the long term exposure to the compound was demonstrated, the majority of the incubated arteries with 100 μM of TBT, when 5-HT is added, do not have contraction capacity, and analyzing the 5-HT_{2A} gene expression levels, showed that they are down-regulated. Regarding the histamine, it was demonstrated that the compound induces a concentration-dependent relaxation. The H₁ gene expression levels showed lack of regulation.

Viability tests demonstrated that toxicity of TBT to HUASMC occurs from concentrations of 1 μM .

Keywords

Endocrine disruptors; Organotins; TBT; Human umbilical artery; Organ bath; qPCR.

Índice

Conteúdo:

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-chave	vii
Abstract.....	ix
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Acrónimos.....	xvii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1. Estrutura e função do Cordão Umbilical Humano.....	1
1.1.1. Artérias umbilicais humanas.....	2
1.2. Músculo Liso	3
1.2.1. Proteínas envolvidas no processo contráctil.....	5
1.2.2. Canais de cálcio.....	7
1.2.3. Canais de potássio.....	9
1.2.4. Contração do músculo liso vascular	11
1.2.5. Relaxação do músculo liso vascular	15
1.2.6. Ação dos mensageiros químicos na HUA	17
1.3. Disruptores endócrinos	18
1.3.1. Organoestanhos (OTs)	18
1.3.2. Tributilestanho.....	19
CAPÍTULO II - Objetivo	20
CAPÍTULO III - Materiais e métodos.....	21
1.4. Soluções e Materiais.....	21
1.4.1. Soluções	21

1.4.2.	Químicos	22
1.4.3.	Materiais	22
1.5.	Métodos	24
1.5.1.	Recolha das amostras	24
1.5.2.	Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana	24
1.5.3.	Tratamento com TBT	25
1.5.4.	Extração de RNA	25
1.5.5.	Síntese de DNA complementar	27
1.5.6.	PCR em tempo real.....	27
1.5.7.	Ensaio de viabilidade celular - MTT	28
1.5.8.	Contractilidade - Câmara de banho de órgãos	29
1.5.9.	Análise estatística	30
CAPÍTULO IV - Resultados		31
1.6.	Análise da contratilidade das HUA.....	31
1.6.1.	Efeito do TBT em base.....	31
1.6.2.	Estudo dos efeitos do TBT a curto prazo	32
1.6.3.	Estudo do efeito do TBT na contratilidade das HUA realizado através da técnica de banho de órgãos.....	36
1.6.4.	Estudo do efeito do TBT em HUA sujeitas a três agentes contráteis, realizado através da técnica de banho de órgãos	39
1.7.	Ensaio de viabilidade celular - MTT	43
1.8.	Análise da expressão de mRNA.....	44
1.8.1.	Análise da expressão do mRNA do 5-HT _{2A}	44
1.8.2.	Análise da expressão do mRNA do H1	45
CAPÍTULO V - Discussão		46
Capítulo VI - Conclusões e Perspetivas futuras		50
CAPÍTULO VII - Bibliografia.....		51

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação da estrutura do cordão umbilical humano.....	2
Figura 2 - Representação das camadas que constituem a artéria umbilical humana	3
Figura 3 - Representação das células do músculo liso.....	4
Figura 4 - Representação do mecanismo de ação dos canais de K ⁺	10
Figura 5 - Representação dos mecanismos envolvidos na contração do músculo liso	14
Figura 6- Representação das fases presentes no eppendorf.	26
Figura 7 - Representação do banho de órgãos	29
Figura 8 - Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por 5-HT	33
Figura 9 - Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por histamina.	34
Figura 10 - Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por KCl.	35
Figura 11: Efeito genómico do TBT sobre a contração da HUA induzida pela 5-HT.....	36
Figura 12: Efeito genómico do TBT sobre a contração da HUA induzida pela histamina.....	37
Figura 13: Efeito genómico do TBT sobre a contração da HUA induzida pelo KCl.....	38
Figura 14- Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pela 5-HT na HUA.	39
Figura 15- Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pela histamina na HUA.	41
Figura 16- Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pelo KCl na HUA	42
Figura 17- Efeito das diferentes concentrações de TBT na viabilidade celular das HUASMC...	43
Figura 18 - Comparação da expressão relativa do mRNA do 5-HT _{2A}	44
Figura 19 - Comparação da expressão relativa do mRNA do H1	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - soluções utilizadas para a execução deste trabalho.	21
Tabela 2 - materiais e equipamentos e respectivas marcas.	22
Tabela 3 - Primers utilizados para qPCR.....	28
Tabela 4 - Tensões reais exercidas em anéis de artérias incubadas 24h com EtOH 0,1% quando submetidas às diferentes concentrações de TBT.....	31
Tabela 5 - Tensões reais exercidas em anéis de artérias incubadas 24h com DMEM quando submetidas às diferentes concentrações de TBT.....	32

Lista de Acrónimos

- [Ca²⁺]_i** - Concentração de cálcio intracelular
- (Ca²⁺)₄CaM** - Complexo Ca²⁺-Calmodulina
- 5-HT** - Serotonina
- CaM** - Calmodulina
- DAG** - Diacilglicerol
- DBT** - Dibutilestanho
- EDC** - Disruptor endócrino
- ELC** - Cadeias leves essenciais
- HUASMC** - Células musculares lisas da artéria umbilical humana
- HVA** - Canais de Ca²⁺ ativados por alta tensão
- K⁺** - Canais de potássio
- K_{ATP}** - Canais de K⁺ sensíveis ao ATP
- K_{Ca}** - Canais de K⁺ ativados por Ca²⁺
- K_{IR}** - Canais de K⁺ retificadores internos
- K_V** - Canais de K⁺ dependentes de voltagem
- LC17** - ELC de 17 kDa
- LC20** - RLC de 20 kDa
- LVA** - Canais de Ca²⁺ ativados por baixa tensão
- MBT** - Monobutilestanho
- MLC₂₀** - Cadeia leve de miosina de 20 kDa fosforilada
- MLCK** - Cinase das cadeias leves de miosina
- MLCP** - MLC fosfatase
- NO** - Óxido nítrico
- OT** - Organoestanho
- PDE** - Fosfodiesterase

pGC - Guanilil ciclase particulada

PKA - Proteína cinase A

PKC - Proteína cinase C

PVC - Policloreto de vinil

RLC - Cadeias leves reguladoras

ROCC - Canais de Ca^{2+} independentes de voltagem operados por recetores

ROCK - Proteína cinase dependente da Rho-A

RS - Retículo sarcoplasmático

SACC - Canais de Ca^{2+} independentes de voltagem ativados pelo *stress* físico

SERCA - Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático

SOCC - Canais de Ca^{2+} independentes de voltagem operados por depósitos intracelulares

TBT - Tributilestanho

TPT - Trifenilestanho

TRP - “transient receptor potential”

VOCCs - Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem

VSMC - Células do músculo liso vascular

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura e função do Cordão Umbilical

Humano

O cordão umbilical permite a ligação entre o embrião e a placenta, sendo um suporte para os vasos umbilicais, e possibilitando a passagem de sangue rico em oxigénio e nutrientes. [1] Este forma-se entre a 5ª semana e a 12ª semana de gestação. O anel umbilical primitivo, precursor do cordão umbilical, vem a partir da linha de flexão anterior da junção amnio-ectodérmica. [2] [3]

Quando surge no embrião, este anexo embrionário é mais curto e espesso e encontra-se inserido na parte inferior da região ventral. Com o desenvolvimento da parede abdominal anterior, a região de implantação umbilical contrai permitindo que o cordão se alonge, tornando-se assim mais delgado. [4]

Tem normalmente um comprimento que varia entre 50-60 cm e um diâmetro de cerca de 1,7 cm, tem uma estrutura espiral, estando bem estabelecida às 9 semanas, e tendo uma gama de 0-40 torções. Pode ocorrer, em alguns casos, o desenvolvimento de cordões muito compridos ou muito pequenos. Cordões longos estão maioritariamente associados a presença de nós ou prolapso do cordão umbilical. Cordões umbilicais muito curtos ou essencialmente ausentes estão associados a uma patologia denominada complexo de parede abdominal-membros, uma anomalia grave em que a parede abdominal anterior não se forma, os conteúdos abdominais estão expostos, o cordão é rudimentar ou ausente, e o feto está ligado diretamente às membranas. [2]

O cordão umbilical possui duas artérias e uma veia. Estes vasos encontram-se rodeados por um tecido mucoide denominado geleia de Wharton. [5, 6]. A meio da gestação a geleia de Wharton representa cerca de 70% da área do cordão umbilical. [3] Esta consiste em fibras de colagénio interlaçadas e pequenos feixes de tecido organizados, formando um exoesqueleto suave e contínuo que reveste os vasos umbilicais, protegendo-os da torção e compressão durante a gravidez e o parto. A geleia é composta por glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, proteoglicanos, carboidratos com grupos glicosil e manosil) distribuídos numa rede fina de microfibrilas. [5] [7] [8]

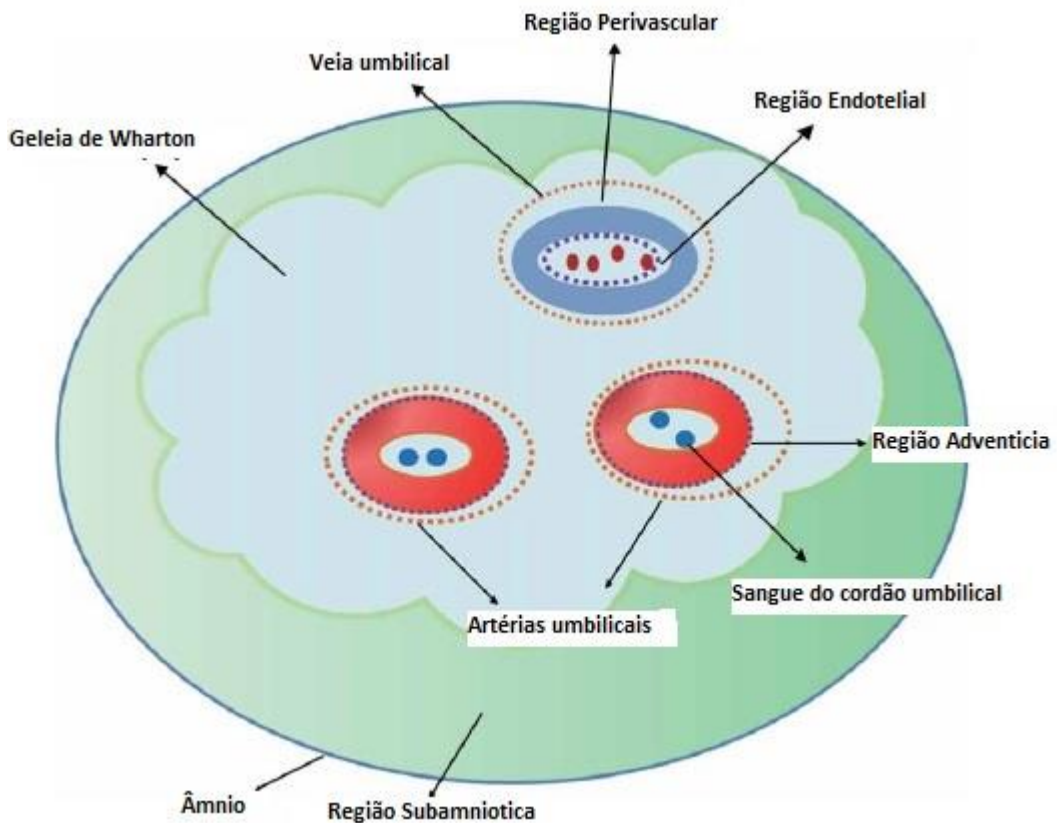


Figura 1- Representação da estrutura do cordão umbilical humano. Adaptado de Tan Li, M. X. et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy*. 2015. 15(8)

1.1.1. Artérias umbilicais humanas

As artérias umbilicais imergem a partir da aorta do embrião e após diferenciação e crescimento, estas tornam-se ramos das artérias ilíacas internas no feto. Numa pequena percentagem das gestações, ocorre a presença de apenas uma artéria umbilical, sendo mais frequente a ausência da artéria esquerda. Dentro dos mecanismos embriogénicos propostos, é de sublinhar agenesia dos vasos e atrofia ou atresia de uma das artérias. [2] Esta presença de apenas uma artéria está associada a malformações congénitas que incluem defeitos neuronais e cardíacos, anomalias respiratórias, gastrointestinais e do músculo esquelético. [9]

As artérias presentes no cordão umbilical têm normalmente um diâmetro médio de 3mm. Não possuem membrana elástica interna e têm muito menos elasticidade relativamente as outras artérias. São constituídas por 3 túnicas: a íntima, formada por células endoteliais; a média constituída por duas camadas de células do músculo liso vascular, e uma camada mais exterior que se assemelha à adventícia, a qual se dá o nome de geleia de Wharton, como referido anteriormente. A túnica média é constituída por duas camadas de células musculares lisas, a

mais externa que é constituída por uma musculatura lisa bem desenvolvida e disposta circularmente e a camada média mais interna em que a maioria das células musculares lisas aparecem dispostas longitudinalmente, numa abundante substância fundamental amorfa pobre em fibras elásticas, mas muito plásticas. A grande diferença morfológica entre as células musculares lisas destas duas camadas é que as da camada mais externa, ao contrário das da camada mais interna são muito ricas em miofilamentos. As artérias umbilicais não contém *nervi vasorum* (terminais nervosos) como acontece nas restantes artérias. [7, 10] [11] [12] [13]

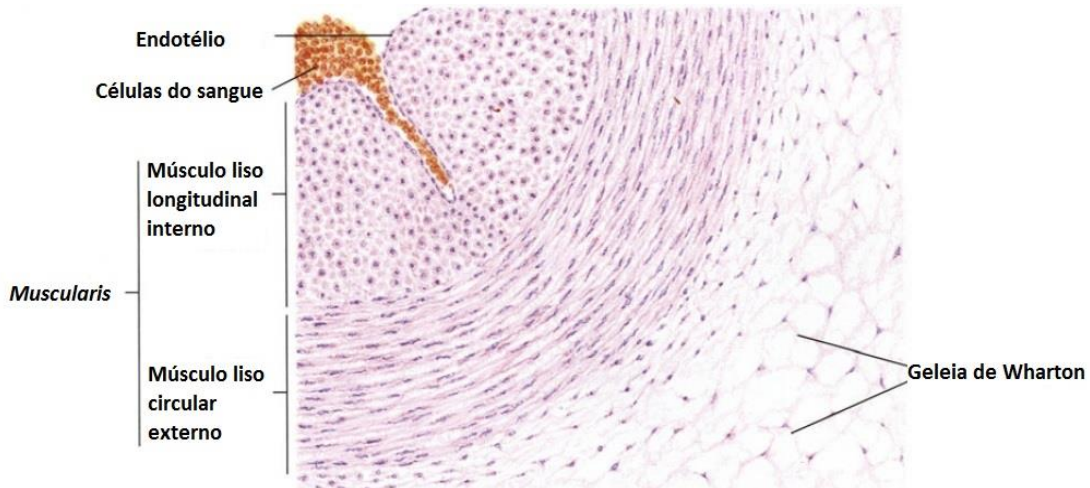


Figura 2 - Representação das camadas que constituem a artéria umbilical humana. Adaptado de Zhang S.-X. *An Atlas of Histology*. 1999. Springer Science+Business Media New York. Pag. 335

A artéria umbilical humana está envolvida na circulação feto-placentária e os mecanismos que regulam o estado contrátil desta artéria são muito importantes para otimizar a troca de nutrientes e oxigénio entre o feto e a placenta. Uma vez que os vasos sanguíneos umbilicais não são inervados, o controle do fluxo de sangue umbilical depende inteiramente de substâncias vasoativas quer libertadas localmente ou já existentes na circulação. [14] [15]

As células endoteliais das artérias umbilicais humanas produzem várias substâncias vasoativas, como serotonina, histamina, endotelina, neuropéptido Y, péptido atrial natriurético, (entre outros) e iões como cálcio e potássio que regulam o tónus vascular. [12] [15]

1.2. Músculo Liso

O músculo liso é um tecido que se encontra amplamente distribuído por todo o corpo, podendo encontrar-se nas paredes dos órgãos ocos, nos vasos sanguíneos, nos olhos e nas glândulas da pele, sendo as suas funções variáveis de acordo com o local em que se encontra. Tem habilidade para contrair espontaneamente. [16] [17] As células musculares lisas são pequenas

comparativamente às células do músculo esquelético e apresentam uma forma espiral, possuindo apenas um núcleo único cilíndrico que se encontra localizado no centro da célula. Apresentam uma constituição em miofilamentos de actina e miosina e filamentos intermediários, e contém mais miofilamentos de actina do que de miosina. Os miofilamentos de actina estão ligados a corpos densos, que se encontram distribuídos no citoplasma da célula, e a áreas densas na membrana plasmática. [16] [17]

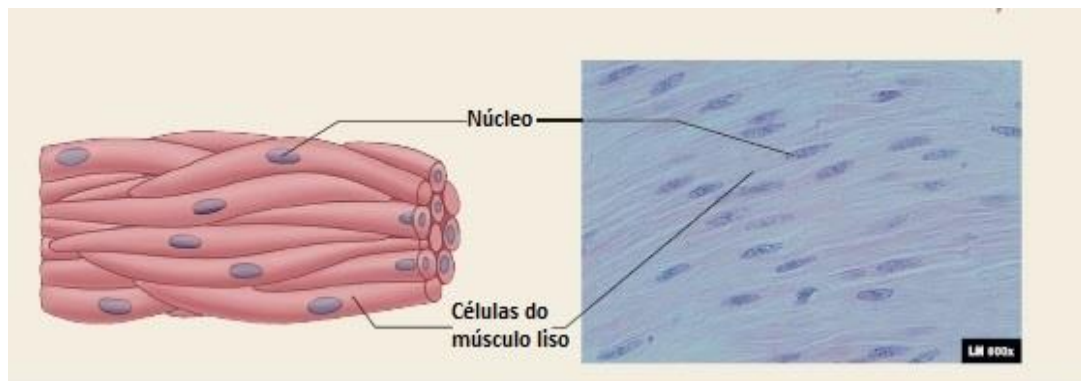


Figura 3 - Representação das células do músculo liso. Adaptado de Seeley R. R., et al. *Anatomy & Physiology. Eight Edition. 2008. Pag. 308*

Um tipo de músculo liso é o músculo liso vascular. Este é o componente contrátil das artérias e das veias e controla a contração e a relaxação, sendo dependente de vários sinais intra e extracelulares. [18] Como descrito anteriormente, as artérias possuem três túnicas, sendo a túnica média que contém as células do músculo liso vascular (VSMC) e sendo assim a principal camada contrátil das artérias. Estas VSMC depositam elastina e colagénio contribuindo para a matriz extracelular da camada média. Esta matriz extracelular fornece a elasticidade crítica para uma função vascular adequada. [19]

As VSMC são responsáveis pelas contrações tónicas das artérias permitindo a perpetuação do fluxo sanguíneo. [19] Estas células apresentam uma estrutura fusiforme com um comprimento de 15-200 μm e uma largura de 5-8 μm . O interior destas células é constituído por miofilamentos, compostos por actina e miosina. Os filamentos são dispostos longitudinalmente, com filamentos intermediários livres de miosina, contendo desmina, vimentina, e filamina, ou com filamentos contráteis compostos de actina, miosina, tropomiosina e caldesmona. As VSMC após diferenciação expressam pelo menos quatro isoformas de actina: α -actina do músculo liso, β -actina não muscular, γ -actina não muscular e γ -actina do músculo liso. Sendo a mais abundante nas VSMC, a isoforma α -actina do músculo liso. Estas células possuem um retículo (RS) sarcoplasmático pouco desenvolvido e este serve como um depósito de cálcio. Estas células estão agrupadas em feixes de espessura variável, em que os proteoglicanos das membranas basais se encontram ligados às fibrilas de colagénio e às fibrilas elásticas no espaço extracelular. Estas VSMC empacotadas estão eletricamente acopladas por gap junctions. [20]

São células com elevada plasticidade e têm habilidade de modular o seu fenótipo baseado em estímulos ambientais. [19]

As células musculares lisas vasculares são responsáveis pelo tónus vascular e respondem a vários estímulos hormonais e hemodinâmicos. Ao realizar-se culturas das células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC), tem vindo a ser possível estudar os mecanismos celulares envolvidos na regulação do tónus da artéria umbilical. Assim têm vindo a ser essenciais para o estudo de todos os processos de sinalização envolvidos no tónus, incluindo o metabolismo do cálcio e as diferentes vias envolvidas na modulação da reatividade vascular. Podem existir alguns problemas na realização destas culturas, sendo um dos principais, o facto de estas células terem a capacidade de se diferenciar em dois padrões fenotípicos diferentes, um contráctil e um sintético, levando a alterações na morfologia e uma proliferação e expressão de proteínas diferentes. VSMC maduras totalmente diferenciadas apresentam uma baixa taxa de proliferação e atividade sintética. São células altamente especializadas que expressam proteínas contráteis específicas, como, α -actina do músculo liso, miosina de cadeia pesada do músculo liso, SM22- α , SM-calponina, h-caldesmona e desmina. Expressam também diferentes tipos de canais iónicos (como canais de cálcio e de potássio) e recetores de membrana que regulam a função contrátil. [10] [21]

A contração do músculo liso vascular desempenha um papel decisivo na regulação e manutenção da pressão arterial, e sua desregulação está associada a várias síndromes clínicas, incluindo hipertensão, vasoespasma coronário e insuficiência cardíaca congestiva. [22]

1.2.1. Proteínas envolvidas no processo contráctil

O músculo liso tem características diferentes, de acordo com o tipo de função e do local onde se encontra. Filamentos finos, grossos e intermédios fazem parte do músculo liso vascular e são essenciais a nível estrutural e funcional, e apenas se distinguem pelo facto dos filamentos finos e grossos fazerem parte do aparelho contráctil e filamentos intermédios fazerem parte do citoesqueleto. [17]

Filamentos finos

A actina é uma proteína de 375 aminoácidos, que se encontra amplamente distribuída em todas as células eucarióticas e que tem um papel crítico na motilidade e na contração muscular. Tem a capacidade de polimerizar os seus monómeros de G-actina para formar uma macromolécula filamentosa, a F-actina. Apresenta uma estrutura altamente conservada e tem seis isoformas que são produto de seis genes diferentes, sendo expressas em tecidos específicos. No músculo liso, a actina apenas expressa 4 isoformas distintas, sendo elas a α e γ -actina do músculo liso e a α e γ -actina não musculares, sendo as isoformas musculares associadas ao aparelho contráctil e as isoformas não musculares associadas à estrutura do isoesqueleto. A isoforma α -actina está

relacionada com o músculo liso tónico e a γ -actina com o músculo liso fásico. [23] [24] [25] [26]

Os filamentos finos são construídos principalmente por actina mas também se encontra na sua constituição, tropomiosina, caldesmona e calponina. [17]

- A tropomiosina é um dímero de duas cadeias α -helicoidais idênticas que apresenta uma estrutura conservada, e está localizada nos sulcos entre duas cadeias de dupla hélice da actina. [17] Funciona como uma proteína regulatória da actina e participa cooperativamente na ativação e inibição das interações cruzadas entre os filamentos finos e a miosina. Por sua vez, este processo resulta em transições para actomiosina ATPase e consequente atividade contráctil. [27] Por semelhanças estruturais com a miosina, a tropomiosina pode bloquear o local de ligação da actina com a miosina e causa a estabilização e rigidez do filamento de actina. [28]

- A Caldesmona é uma proteína de ligação à actina e que interage com a miosina, tropomiosina e calmodulina. Existe em duas isoformas que derivam de splicing alternativo de um único gene, a isoforma pesada que diz respeito à muscular (h-caldesmona) e a isoforma leve (l-caldesmona) que está presente em todas as células. [29] [30]

- A Calponina é uma proteína (34 kDa) que se pode ligar à actina, tropomiosina e calmodulina e participa na regulação da contração do músculo liso. Esta proteína, in vitro, pode inibir a atividade ATPase da miosina, bem como o movimento dos filamentos de actina sobre a miosina. [31]

Filamentos grossos

A miosina presente no músculo liso é uma molécula composta por seis cadeias polipeptídicas. É composta por duas cadeias pesadas de aproximadamente 220 kDa cada e dois pares de cadeias leves. [32] Dentro das cadeias leves existem dois tipos, cadeias leves reguladoras (RLC) e cadeias leves essenciais (ELC), cada “cabeça” de miosina contém uma RLC e uma ELC. Na miosina do músculo liso, a massa molecular da RLC é de 20 kDa (LC20) e a da ELC é de 17 kDa (LC17). LC20 é fosforilável e a sua fosforilação é o evento-chave na regulação da contração do músculo liso. [33]

Os filamentos grossos são grandes agregados de moléculas de miosina, e são relativamente cilíndricos, medindo cerca de 14-18 nm de diâmetro. A miosina convencional (miosina II) é a principal encontrada nos filamentos grossos do músculo liso. A forma hexamérica nativa da miosina organiza-se numa cauda formada por duas hélices alfa entrelaçadas e duas regiões de cabeça globular, onde ocorre a ligação com a actina. [17]

1.2.2. Canais de cálcio

O tónus vascular refere-se à atividade contrátil das células do músculo liso vascular e é o fator determinante para a resistência ao fluxo sanguíneo. Desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial e na distribuição do fluxo de sangue dentro dos tecidos e órgãos do corpo. A regulação da atividade contrátil das células do músculo liso vascular na circulação sistêmica é dependente de uma interação complexa entre vasodilatadores e vasoconstritores, sendo estes estimulados por hormonas circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, e pela pressão sanguínea. Todos estes sinais são integrados por células musculares vasculares de forma a determinar a atividade do aparelho contrátil das células musculares. Os canais iónicos desempenham um papel central neste processo. O músculo liso vascular usa o cálcio como ponto de partida para a contração. [34]

O cálcio (Ca^{2+}) é uma molécula de sinalização extremamente versátil, tendo capacidade para afetar e modular uma série de processos decorrentes nas células. [35] [36] Os efeitos do Ca^{2+} dependem de vários fatores como o tipo de célula onde vai atuar, o ambiente celular, o estágio de desenvolvimento ou o potencial estado patológico da célula, entre outros. Para ocorrer a distinção do tipo de sinal de Ca^{2+} a ser despoletado, as células utilizam um conjunto complexo de vias e mecanismos moleculares. Os mecanismos de sinalização do cálcio são importantes em todos os tipos de músculo, sendo o elemento chave da contração muscular. [35]

Nas VSMC, um aumento da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) é um passo fundamental na iniciação da contração. A entrada do Ca^{2+} no citosol envolve uma variedade de canais que podem ser divididos em dois tipos: canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCCs) (que incluem ao canais de Ca^{2+} do tipo L e T) e canais de Ca^{2+} independentes de voltagem (que incluem canais operados por recetores (ROCC), canais operados por depósitos intracelulares (SOCC) e canais ativados pelo *stress* físico (SACC)). [37]

Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCCs)

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem medeiam o influxo de Ca^{2+} em resposta a uma despolarização da membrana e regulam diversos processos decorrentes no interior das células, tais como a contração, neurotransmissão e expressão de genes. [38] [39]

A primeira abordagem referente aos VOCCs foi feita por Hagiwara et al. em 1975 quando estudavam a membrana celular de ovos de estrela-do-mar. Sugeriram a existência de tipos distintos de canais de Ca^{2+} que funcionariam com limites de voltagem e cinéticas de abertura e fecho diferentes. [40] Estes canais de Ca^{2+} foram então divididos em duas classes: canais de Ca^{2+} ativados por alta tensão, HVA, e canais de Ca^{2+} ativados por baixa tensão (LVA) [41]. Os HVA foram divididos nos subtipos L, N, P/Q e R, enquanto os LVA são compostos apenas pelo subtipo T. [40] [35]

Os VOCCs são compostos por 4 ou 5 subunidades distintas, sendo a $\alpha 1$ a de maior dimensão (190-250 kDa) incorporando o poro de condução, o sensor de voltagem e um aparelho de

propagação. A subunidade $\alpha 1$ está organizada em 4 domínios homólogos (I-IV), com 6 segmentos transmembranares (S1-S6) cada um, sendo o segmento S4 o sensor de voltagem. [38] Dez genes distintos (CACNA1A-S) codificam o poro do canal, dando origem a tipos distintos de canais: os canais tipo L (Cav1), os canais tipo P/Q, N e R (Cav2) e os canais tipo T (Cav3). Cav1 e Cav2 incluem subunidades auxiliares: β (quatro genes: $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$), $\alpha 2\delta$ (quatro genes) e γ (oito genes). [39]

- Canais de cálcio do tipo L

Os canais de cálcio do tipo L são caracterizados pela sua ativação dependente de alta tensão e requerem tipicamente uma forte despolarização para que sejam ativados, sendo denominados de longa duração pelo facto do seu tempo de abertura ser mais prolongado. [35] [38] Após despolarização das VSMCs, estes canais abrem, conduzindo a um aumento do Ca^{2+} intracelular, contração celular e vasoconstrição. [35]

Os canais de Ca^{2+} do tipo L têm 4 isoformas (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4) e podem ser bloqueadas por antagonistas, que incluem dihidropiridinas (DHPs), fenilalquilaminas e benzotiazepinas, devido à sua alta sensibilidade. Os canais do tipo L do músculo liso têm a isoforma Cav1.2 e desempenham um papel importante na determinação da pressão arterial. [35] [38] [39]

- Canais de cálcio do tipo T

Os canais de Ca^{2+} do tipo T são caracterizados pela sua ativação dependente de potenciais de membrana baixos, próximos do potencial de repouso [41] [35], e funcionam com uma rápida ativação/rápida inativação, sendo definidos como transitórios. Proporcionam assim uma corrente transiente em vez de persistente, em comparação com os canais tipo L. São insensíveis aos bloqueadores de canais de Ca^{2+} do tipo L. [35] [38]

Canais de Ca^{2+} independentes de voltagem

Como descrito anteriormente, canais de Ca^{2+} independentes de voltagem incluem canais de cálcio operados por recetores (ROCC) que são regulados pela interação agonista-recetor e por algumas proteínas de transdução de sinal, canais de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares (SOCC) que são ativados após a libertação de cálcio dos depósitos intracelulares, e canais de cálcio ativados pelo *stress* físico (SACC) que são ativados por estiramento da membrana. Estudos sugeriram que os diferentes tipos de canais podem ser estruturalmente relacionadas através da mesma família de proteínas: as proteínas TRP (“transient receptor potential”). [37]

- ROCs

Os canais ROC representam os canais de Ca^{2+} independentes de voltagem nos quais a ligação de um agonista ao seu recetor desencadeia a abertura do canal, sendo esta independente de qualquer alteração no potencial de membrana. Nas VSMCs, os agonistas não só têm capacidade

para abrir estes canais, com permeabilidade significativa para o Ca^{2+} , como a concentração deste íão que entra nestas células, é suficiente para produzir a sua contração. [37]

- SOCs

Os canais SOC representam os canais de Ca^{2+} independentes de voltagem em que a sua abertura é induzida pela libertação de cálcio dos depósitos intracelulares, não estando ainda bem definida a via de sinalização envolvida no mecanismo. Os SOCs estão envolvidos na contração muscular, controlo da proliferação das VSMCs e apoptose celular mediada pelo CD95. [34] [42]

- SACs

Os canais SAC representam os canais de Ca^{2+} independentes de voltagem que são ativados pelo *stress* e têm a capacidade de transformar este stress em fluxo de catiões através da membrana. Têm também capacidade de ativar os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem provocando uma despolarização da membrana via influxo de catiões [3] e induzindo um aumento de Ca^{2+} citosólico. Podem aumentar o Ca^{2+} citosólico, por promoverem a entrada do mesmo pelos SACs, abrindo os BKCa ou pela libertação das reservas. [37]

1.2.3. Canais de potássio

Os canais de potássio (K^+) têm a capacidade de regular o tónus vascular e o diâmetro arterial através de mudanças no potencial de membrana das células. Quando ocorre a abertura dos canais de K^+ nas VSMC, dá-se o efluxo deste íão, provocando uma hiperpolarização do potencial de membrana e o fecho dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, o que leva à vasodilatação. Quando acontece o oposto, isto é, o fecho dos canais de K^+ , dá-se a despolarização do potencial de membrana, ocorrendo uma vasoconstrição ou vasoespasmos, comprometendo a habilidade da artéria para dilatar. [43] [44] [45] [34] [46]

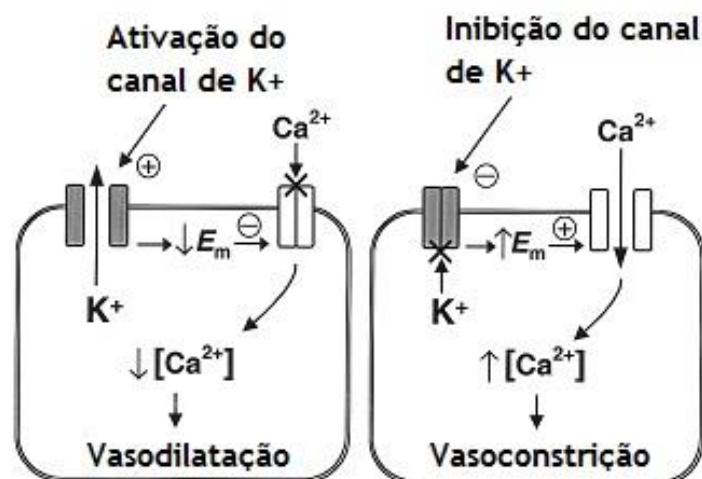


Figura 4 - Representação do mecanismo de ação dos canais de K⁺. Adaptado de Sobey, C. G., Potassium channel function in vascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 2001. 21(1): pag. 28-38

Alterações nos canais de K⁺ do músculo liso podem estar envolvidos em certas patologias como vasoespasmos, hipertensão, isquemia, entre outras. [43]

Existem 4 tipos de canais de K⁺: Canais de K⁺ dependentes de voltagem (K_V), canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ (K_{Ca}), canais de K⁺ retificadores internos (K_{IR}), e canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}). [43] [45] [34]

Canais de K⁺ dependentes de voltagem (K_V)

A abertura dos canais K_V ocorre quando há uma despolarização do potencial de membrana e dá-se o efluxo de K⁺ pelos K_V. [43] [34] [44] Assim é possível a repolarização do potencial de ação e o retorno ao estado de repouso. [43] [45] A despolarização do potencial da membrana nas VSMC conduz a um influxo de Ca²⁺ pelos canais do tipo L e na ativação do processo contrátil. Estes dois processos indicam que os canais K_V funcionam de forma a limitar a despolarização da membrana e manter o tônus vascular em repouso. Comparativamente ao processo de ativação, a inibição destes canais é um processo lento. [43] [45]

Cairrão et al. demonstraram que a testosterona e o péptido natriurético auricular estimulam a atividade deste canal através do aumento dos níveis intracelulares de cGMP. [47]

Canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ (BK_{Ca})

Canais BK_{Ca}, como o nome indica, são ativados pelo Ca²⁺ neste caso pelo seu aumento intracelular e também por uma despolarização da membrana. [44] [48] O efluxo de K⁺ resultante da ativação destes canais pode ser utilizado de forma a neutralizar a despolarização e a vasoconstrição em resposta a vasoconstritores, aumento da pressão intravascular e produtos químicos. [45] [34]

O aumento dos níveis de Ca²⁺ no subsarcolema devido à libertação deste ião através dos recetores de rianodina no retículo sarcoplasmático, parecem desempenhar um papel importante na regulação da atividade dos canais K_{Ca} e portanto na regulação da membrana plasmática e do tônus vascular. [34]

Canais de K⁺ retificadores internos (K_{IR})

Os canais K_{IR} estão presentes em várias células excitáveis e não excitáveis, incluindo as VSMC. Estes, ao contrário dos canais K_V e K_{Ca}, são ativados pela hiperpolarização da membrana. [43]

Nas células do músculo liso vascular, a função dos canais K_{IR} não está completamente definida, havendo no entanto duas possibilidades básicas: em primeiro lugar, os canais K_{IR} podem contribuir para o potencial de membrana em repouso e pelo estado de repouso do tônus, em

segundo lugar, a ativação dos canais K_{IR} em resposta a pequenos aumentos na concentração de K^+ extracelular pode causar vasodilatação. [45]

Canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Os canais K_{ATP} foram inicialmente identificados no músculo cardíaco, e estudos posteriores demonstraram que podem ser encontrados em várias células, incluindo as do músculo liso vascular. [43, 45] Estes canais consistem em 8 subunidades, sendo 4 delas α e pertencem à família dos K_{IR} , as outras 4 são subunidades regulatórias. [34] Os K_{ATP} fecham por ação do aumento da concentração de ATP intracelular, resultando numa despolarização da membrana e consequente vasoconstrição. [43, 45] [34]

1.2.4. Contração do músculo liso vascular

A contração do músculo liso vascular pode ser provocada por diversos fatores, sendo estes, estímulos elétricos, químicos ou mecânicos. Por estimulação elétrica pode ocorrer uma despolarização da membrana plasmática, provocando contração principalmente através da abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (canais de Ca^{2+} do tipo L), levando consequentemente a um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Uma despolarização da membrana pode também ocorrer através de alterações nas concentrações de iões (por uma despolarização induzida por concentrações elevadas de potássio extracelular) ou por a abertura acoplada do recetor de canais de iões, em particular os canais de Ca^{2+} . Em relação aos estímulos químicos, podem enunciar-se a atividade da noradrenalina, adrenalina, angiotensina II, vasopressina, endotelina-1 e o tromboxano A₂, que podem provocar contração. Estas substâncias atuam por ligação a recetores específicos nas VSMC, levando a uma convergência de diferentes vias de transdução de sinal e aumentando a concentração de Ca^{2+} intracelular, provocando assim, contração. Por fim, os estímulos mecânicos ocorrem sob a forma de alongamento do músculo liso, por ação espontânea, provocando uma contração e que é denominada de resposta miogénica. Isto resulta provavelmente na ativação de canais de Ca^{2+} , induzida e consequentemente ao seu influxo. [13]

Regulação do potencial de membrana

Ao longo dos anos, o papel do Ca^{2+} na contração do músculo liso tem sido reconhecido como sendo muito importante. Um aumento da sua concentração intracelular pode ser consequência de vários fatores, tais como, um aumento do influxo do Ca^{2+} extracelular; uma alteração na concentração do ião que é sequestrado; e uma diminuição no seu efluxo celular. [49]

As VSMC mantêm uma $[Ca^{2+}]_i$ baixa (~100 nmol/L). Com abertura dos canais de Ca^{2+} ocorre um aumento da sua concentração intracelular, sendo suficiente para ativar os processos contrateis. Os canais mais permeáveis são os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, sendo estes regulados pelo potencial de membrana, abrindo quando ocorre uma despolarização do mesmo. Consequentemente, o potencial de membrana é determinante do influxo deste ião nas VSMC.

O potencial de membrana no músculo liso vascular é regulado pela permeabilidade da membrana a 4 iões distintos, sendo estes, o potássio (K^+), o cloro (Cl^-), o sódio (Na^+) e o cálcio (Ca^{2+}), sendo o K^+ o principal determinante sob condições de repouso. Porém, existem outros determinantes para o potencial de membrana, como a bomba de Na-K-ATPse, ou o permutador Na/Ca. [49]

Ciclo das pontes cruzadas

A contração do músculo liso vascular é controlada pela concentração de Ca^{2+} intracelular, desencadeando o ciclo das pontes cruzadas das duas principais proteínas contrateis, actina e miosina. [50]

Quando ocorre um aumento do Ca^{2+} intracelular livre pode resultar tanto num aumento do ião na célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L ou na libertação deste ião das reservas internas. Quando se encontra na forma livre liga-se a uma proteína de ligação denominada de calmodulina (CaM). A CaM é uma proteína intracelular amplamente distribuída (17 kDa) que possui alta afinidade para o Ca^{2+} . Uma molécula de calmodulina liga-se a quatro moléculas de Ca^{2+} . Isto resulta numa alteração conformacional nos locais hidrofóbicos expostos da CaM que interagem com as moléculas alvo. Formam assim o complexo Ca^{2+} -Calmodulina ($(Ca^{2+})_4CaM$). Este complexo tem capacidade de ativar a cinase das cadeias leves de miosina (MLCK), uma cinase de serina/treonina de 130-150 kDa que fosforila as cadeias leves de miosina na presença de ATP, por ligação do domínio de regulação da MLCK a uma cadeia leve de miosina de 20 kDa fosforilada (MLC_{20}). As cadeias leves da miosina são subunidades reguladoras encontradas nas “cabeças” de miosina. A fosforilação da cadeia leve de miosina leva à formação de pontes cruzadas entre as cabeças de miosina e os filamentos de actina, levando assim a contração do músculo liso. [13] [51] [52] [49]

O Ca^{2+} do músculo liso não tem capacidade para ativar diretamente a interação actina-miosina e portanto é sempre necessária a formação do complexo com a MLCK. Quando o complexo $(Ca^{2+})_4CaM$ não está formado, a MLCK encontra-se no estado inativo. Isso pode dever-se ao facto da MLCK apresentar homologia considerável com a miosina e efetivamente atua como pseudosubstrato inibidor. O complexo $(Ca^{2+})_4CaM$ liberta esta inibição e permite que a MLCK interaja com a miosina. [49]

Contração dependente de cálcio

O cálcio é, portanto, uma das moléculas de sinalização mais importantes na fisiologia do músculo liso e as suas alterações espaciais e temporais na concentração intracelular são fortemente regulados. Dentro das reservas de cálcio intracelular do RS das VSMC e no espaço extracelular a concentração de Ca^{2+} é elevada. [49]

As concentrações de cálcio intracelular são então muito importantes na regulação da contração do músculo liso. A $[Ca^{2+}]_i$ depende do equilíbrio entre o cálcio que entra nas células, o que é libertado pelos armazenamentos intracelulares, e o movimento do ião quer de volta para locais

de armazenamento intracelular quer para fora da célula. O cálcio é armazenado pelo RS por uma bomba de cálcio dependente de ATP. [13]

A noradrenalina, a adrenalina, a angiotensina II, endotelina-I, a vasopressina e a acetilcolina ligam-se a recetores acoplados a proteínas G heterotriméricas ativam a fosfolipase C através da proteína Gq, causando a formação de IP₃ a partir de PIP₂. O IP₃ liga-se a recetores no retículo sarcoplasmático e resulta na libertação do cálcio para o citosol. A partir da PIP₂ também se dá a formação de diacilglicerol (DAG) que em conjunto com o cálcio ativa a proteína cinase C (PKC), os quais podem modular a contração do músculo liso vascular. [13, 53]

Existem alguns compostos sintéticos, como os ésteres de forbol, que têm a capacidade de ativar a PKC, imitando a ação do DAG e provocando a contração do músculo liso. [53]

Contração independente de cálcio

Quando uma maior contração é produzida para um dado aumento da $[Ca^{2+}]_i$, este fenómeno é referido como "sensibilização do aparelho contráctil ao cálcio". Como resultado, a contração do músculo liso vascular está assim sujeita a uma dupla regulação por sinais de cálcio e pela alteração da sensibilidade a este ião. [54] Existem dois mecanismos que vão desencadear este tipo de contração. [55]

- Sensibilização ao cálcio

A contração do músculo liso independente da concentração de Ca^{2+} envolve agonistas que têm a capacidade de provocar contração. Esta contração é maior do que a provocada pela despolarização da membrana. [56]

Além da ativação da MLCK dependente de Ca^{2+} , o estado de fosforilação da cadeia leve de miosina é também regulado por uma MLC fosfatase (ou fosfatase de miosina) (MLCP) que promove a remoção do fosfato de alta energia a partir da cadeia leve de miosina, promovendo o relaxamento do músculo liso. [53]

Na ausência de Ca^{2+} , a contração do músculo liso inicia-se quando a MLCP se encontra inibida. [56]

Existem três sub-unidades da MLCP: uma subunidade catalítica de 37 kDa, uma subunidade de 20 kDa variável, e uma de 110- de 130 kDa de ligação à miosina. Esta última quando fosforilada, inibe a atividade enzimática da fosfatase de miosina, permitindo que a cadeia leve permaneça fosforilada, ocorrendo assim a contração muscular. O mecanismo de sensibilização ao cálcio envolve a ativação da uma pequena proteína, a Rho-A que se pode ligar ao GTP e ao GDP e com atividade GTPase, e o seu alvo a jusante Rho cinase [57] que desempenham um papel importante na regulação da atividade da fosfatase de miosina e consequentemente na contração muscular. A ROCK é uma cinase de serina/treonina que fosforila a subunidade de ligação à miosina da MLC fosfatase, inibindo a sua atividade e, promovendo o estado fosforilado da cadeia leve da miosina. [53] [58] [59]

- Via das MAPK

O segundo mecanismo envolvido na contração muscular independente de Ca^{2+} é a via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK). A via das MAPK é uma via de sinalização envolvida em muitos processos celulares tais como, diferenciação celular, sobrevivência celular, *stress* físico, e contração do músculo liso. [32]

A via das MAPK consiste numa cascata de sinalização que envolve a MAPK cinase cinase (MAPKKK), a MAPK cinase (MAPKK) e a MAPK terminal [60] [32]. Devido a variados estímulos estas MAPK são ativadas por uma fosforilação sequencial entre si e fosforilam substratos em resíduos de serina ou treonina seguidos por uma prolina. [61] As MAPK podem ser desativadas por várias fosfatases de serina/treonina ou tirosina, ou por uma fosfatase denominada MAPK que desfosforila os resíduos da MAPK. [62] [32]

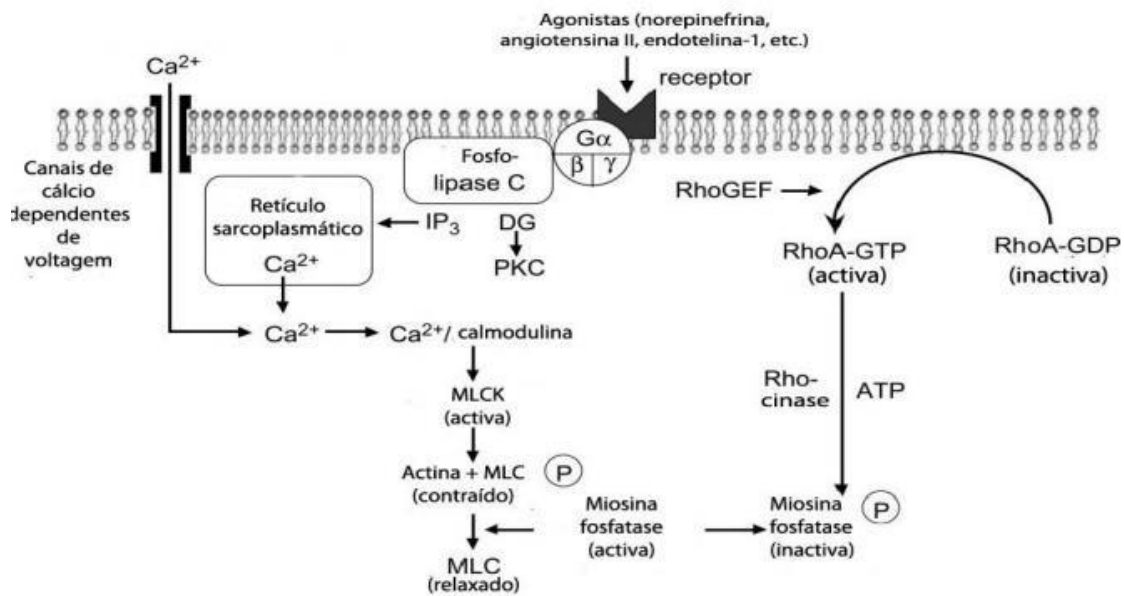


Figura 5 - Representação dos mecanismos envolvidos na contração do músculo liso. Adaptado de Webb, R. C., *Smooth muscle contraction and relaxation. Advances in physiology education*, 2003. 27(4): p. 201-206

1.2.5. Relaxação do músculo liso vascular

A relaxação do músculo liso pode ser devido a uma multiplicidade de fatores, quer endógenos quer exógenos. [63] Esta relaxação do músculo liso pode ocorrer de duas formas: por remoção do agente contráctil ou pela ativação de vias de sinalização dependentes de segundos mensageiros, na presença continuada de um agente contráctil [64] [53] Devido à perda do estímulo contráctil, pode ocorrer uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular que resulta na relaxação. Mas esta também pode ser devida a outros fatores como redução da sensibilidade da maquinaria contráctil ao Ca^{2+} . [63] [65]

Os segundos mensageiros intracelulares envolvidos na relaxação são os nucleótidos cíclicos, o cAMP e o cGMP, que são formados pela atividade da adenilato e guanilato ciclases, respetivamente. [63] [48] [59] Os níveis intracelulares destes dois segundos mensageiros são o resultado do equilíbrio entre a taxa de sua síntese e a taxa de sua degradação.

O AMP cíclico é sintetizado a partir de ATP intracelular por adenilato-ciclases, que são geralmente ativadas por uma primeira mensagem externa (neurotransmissor, hormona, medicamento) que se liga a um receptor acoplado a uma proteína G. [48] [63]

O GMP cíclico pode ser sintetizado em células VSMC por dois tipos distintos de guanilato ciclases que diferem na sua localização celular e na sua ativação por compostos específicos: uma guanilil ciclase particulada (pGC), presente na membrana plasmática, a qual é ativada por peptídeos natriuréticos, como auricular [66], cerebral (BNP), e peptídeo natriurético tipo C (CNP); e uma guanilato ciclase solúvel (sGC), que pode ser ativada pelo óxido nítrico (NO) e por dadores de NO. [48] [63]

Estes nucleótidos exercem os seus efeitos através da ativação de proteínas específicas, proteína cinase dependente do cGMP (PKG) e proteína cinase dependente do cAMP (PKA). [48] [63]

Estruturalmente, o PKA é uma proteína cinase de serina/treonina heterotrimérica composta por uma subunidade catalítica α e subunidades reguladoras, β e γ . A subunidade γ contém o local de ligação ao AMP, onde esta ligação induz uma alteração conformacional numa subunidade levando à ativação do PKA. O PKG é uma proteína cinase de serina/treonina que pode ser ativado pelo cGMP. Estes têm na sua composição um domínio NH_2 -terminal, um domínio de regulação e um domínio catalítico. O domínio de regulação contém sítios de ligação ao cGMP e a ocupação de ambos os locais de ligação, liberta a inibição do centro catalítico e permite a fosforilação de resíduos de serina/treonina de proteínas-alvo, e da autofosforilação do local aminoterminal. A ativação da heterofosforilação e autofosforilação aumenta a atividade basal de PKG. [48]

O primeiro mecanismo proposto para o relaxamento dependente de nucleótidos cíclicos é a redução da $[Ca^{2+}]_i$. Sendo que para que ocorra fosforilação da MLC_{20} e posterior contração, são necessários aumentos na $[Ca^{2+}]_i$, a redução da mesma por nucleótidos cíclicos e a desfosforilação subsequente da MLC_{20} são vistas principalmente como uma inversão do mecanismo contráctil. A diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelulares pode ser alcançada por

diversas vias, como: diminuindo a libertação do RS através da fosforilação do receptor IP3 e/ou da inibição da sua síntese; aumentando o sequestro no RS, via fosforilação da fosfolambam e ativação da Ca^{2+} -ATPase; diminuído o influxo de Ca^{2+} extracelular, através dos canais LTCC; aumentando o efluxo de Ca^{2+} intracelular, por estimulação da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática. [48] [63]

O fosfolambam é um componente proteico fosforilável do RS do músculo liso que inibe reversivelmente a atividade do Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e o transporte do Ca^{2+} do mesmo. A fosforilação do fosfolambam pela PKA ou pela PKG no resíduo Ser16 alivia esta inibição, aumentando assim a atividade da ATPase e a taxa de absorção de Ca^{2+} pelo RS. A estimulação da captação do Ca^{2+} pelo RS via fosforilação da fosfolambam e ativação de Ca^{2+} -ATPase do RS, com o efeito relaxante resultante pode ser mediada por agentes de elevação do cGMP e cAMP. [48]

Como visto anteriormente, também os canais de K^+ desempenham um papel importante na regulação do tónus vascular, quer na contração quer na relaxação através de alterações no potencial de membrana. Especificamente, o bloqueio dos canais de K^+ resulta numa despolarização do potencial de membrana, ocorrendo influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs, conduzindo a vasoconstrição. Em contraste, a ativação dos canais de K^+ resulta em efluxo deste ião, ocorrendo hiperpolarização da membrana, e reduzido assim o influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs, levando a vasodilatação. Pela sua influência no potencial de membrana, os canais de K^+ desempenham um papel central na determinação e regulação do tónus vascular e sua abertura é um mecanismo muito importante que medeia a vasodilatação em condições fisiológicas. [48] [63]

As fosfodiesterases (PDE) são enzimas que promovem a degradação do cAMP e cGMP para os seus metabolitos biologicamente inativos o 5'-AMP e 5'-GMP, respetivamente. Estas enzimas catalisam a hidrólise seletiva de 3' do fosfato cíclico ligado a adenosina e/ou guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico, limitando assim a atividade destas moléculas sobre os seus substratos, tais como PKA e PKG. Existem 11 famílias de PDE diferentes que podem ser encontrados numa variedade de células e, de um modo geral, cada família tem diferentes isoformas e variantes de splicing. [48] [63] No músculo liso da HUA são expressas 4 famílias de PDEs: PDE1, PDE3, PDE4 e PDE5. A PDE4 está descrita como sendo a enzima chave envolvida na regulação da relaxação da HUA associado ao cAMP, já a PDE5 está associada à regulação da relaxação pelo cGMP. [59]

1.2.6. Ação dos mensageiros químicos na HUA

Como já descrito anteriormente, os mecanismos que regulam o estado contrátil das HUA são bastante importantes para a troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta. Sendo que as artérias umbilicais não são enervadas, o controlo do fluxo sanguíneo depende de substâncias libertadas localmente ou existentes na circulação, tais como prostaglandinas, a serotonina (5-HT), a histamina e iões como o cálcio e o potássio. Vários estudos realizados comprovaram que a 5-HT, a histamina, a bradicinina, o KCl entre outros, induzem contrações significativas na HUA. [67, 68] [15]

Neste trabalho estudou-se apenas o efeito contrátil da 5-HT, da histamina e do KCl.

A 5-HT é uma monoamina capaz de mediar a contração por ativação de 7 recetores diferentes (5-HT₁ - 5-HT₇). Os recetores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ e 5-HT₇ expressam-se em vasos sanguíneos. [69] [15] Os efeitos contrácteis da 5-HT na HUA foram considerados como sendo devidos à ativação dos recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A} [70] [15] [14]. Os recetores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} são acoplados a proteínas G_i/G_o, as quais inibem a adenilato ciclase. O recetor 5-HT_{2A} estimula a fosfolipase C, aumentando os níveis do IP₃. O recetor 5-HT₇ é acoplado a G_s, a qual estimula a adenilato ciclase. [71] [72] [67] [15] [21]

De acordo com Santos-Silva et. al (2008) o recetor 5-HT_{2A} é a chave para a resposta contrátil induzida pela serotonina. Relativamente aos recetores 5-HT_{1B/1D} estes induzem um efeito duplo, isto é, em algumas artérias provocavam efeitos contrácteis pequenos e em alguns casos contrações maiores foram observadas. Já a ativação do recetor 5-HT₇ induz relaxação da HUA contraída. [15]

Relativamente à histamina, esta é uma substância vasoativa que ativa vários recetores (H₁ - H₄). Estudos realizados demonstraram que a ativação do recetor H₁ induz contração da HUA pela ativação da fosfolipase C e o aumento dos níveis de IP₃; está acoplado a G_q e provoca a mobilização de cálcio intracelular; [73] [15] [21] a ativação do recetor H₂ provoca acúmulo de cAMP devido à ativação do G_s e conseqüentemente a relaxação da HUA [15] [14]. Em relação ao recetor H₃ este também está associado à relaxação da HUA mas o seu mecanismo ainda está sob estudo, apesar de alguns investigadores pensarem estar acoplado a G_i/G_o. No que diz respeito ao recetor H₄, pode ser funcionalmente acoplado a uma proteína G_i/G_o, causando ou a mobilização de cálcio intracelular ou a inibição da atividade da adenilato ciclase. A histamina pode induzir a contratilidade ou relaxamento de acordo com a expressão e/ou a participação de diferentes tipos de recetores de histamina em cada vaso vascular específico. [15]

1.3. Disruptores endócrinos

As atividades humanas são responsáveis pela produção e transformação de milhares de compostos químicos que têm a capacidade de se dispersar e acumular, afetando negativamente o meio ambiente, animais e humanos. Alguns destes químicos têm capacidade de afetar o sistema endócrino e são definidos como disruptores endócrinos (EDCs). [74] Segundo a definição da WHO (2013) um disruptor endócrino é definido como uma substância ou mistura de substâncias exógenas que têm a capacidade de alterar funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, provocar efeitos adversos para a saúde de um organismo e da sua descendência. [75] Os humanos e os animais podem estar expostos a estes EDCs por uma variedade de vias de exposição, incluindo digestiva, inalatória, dérmica e por transferência da mãe para o feto (pela placenta). Também por uma variedade de fontes de exposição, como por exemplo, a comida, a água ou o pó das habitações. [76]

Os EDCs têm capacidade de perturbar o sistema endócrino de diversas formas e dois exemplos são pela mimetização ou pelo bloqueio de diversas hormonas. No caso da mimetização, os EDCs conseguem ligar-se aos recetores das hormonas, podendo levar a uma ativação inapropriada deste recetor. Em relação ao bloqueio, os disruptores ligam-se aos recetores das hormonas bloqueando-os e não permitindo que estes sejam ativados. [76]

1.3.1. Organoestanhos (OTs)

Os organoestanhos são geralmente de origem antropogénica, e são comercializados desde 1936 para uso como estabilizadores de polímeros sintéticos como o policloreto de vinil (PVC). Devido às suas propriedades como biocidas, a sua comercialização ascendeu e foram aplicados durante anos como biocidas, antivegetativos, agroquímicos e preservantes de madeira. O uso dos compostos orgânicos de estanho trissubstituídos, particularmente o tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) como biocidas em tintas antivegetativas contribuiu de uma forma muito significativa para a sua introdução a larga escala no ambiente, particularmente no ambiente aquático [74]. Vários tipos de organoestanhos foram utilizados para diversas funções, o monobutilestanho (MBT) e o dibutilestanho (DBT) eram usados principalmente como estabilizadores do PVC mas também como catalisadores na produção de espumas de poliuretano, silicones, e outros processos industriais; o TBT e o TPT tal como referidos anteriormente como biocidas em tintas antivegetativas. [74]

Os humanos estão expostos a OTs de múltiplas maneiras, como é o caso de consumo de sumos e bebidas alcoólicas, incluindo vinho, cerveja e bebidas espirituosas; através do consumo de água transportada através de tubos de PVC; através de plásticos de armazenamento de comida, que contém também PVC; e diretamente de produtos de aplicação médica (como os implantes mamários) ou de lixo contaminado; mas geralmente a ingestão de alimentos contaminados é a via mais comum, principalmente o consumo de marisco e bivalves. [74]

Vários estudos foram já realizados de forma a evidenciar os efeitos deletérios dos OTs. Em estudos *in vitro* e *in vivo* com animais foi possível demonstrar que os OTs são disruptores endócrinos, citotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunotóxicos e obesogênicos. [77] [78] Relativamente aos seres humanos não existem estudos epidemiológicos disponíveis, pelo que as informações de toxicidade é limitada a experiências em animais de laboratório e em observações na vida selvagem [74].

1.3.2. Tributilestanho

O TBT ganhou ampla aplicação como biocida em tintas anti vegetativas para navios e outras estruturas submersas nos anos 60, tendo sido utilizado à escala global durante décadas, e só em 1970 foi descoberto o seu impacto ambiental. Alzieu e colegas foram os pioneiros da descoberta do impacto negativo desta substância em ostras e estudos posteriores confirmaram o risco geral para o ecossistema aquático. Um dos efeitos deletérios do TBT mais conhecidos é o fenómeno do imposexo em gastrópodes. Este fenómeno é considerado o melhor exemplo da atuação de um disruptor endócrino na vida selvagem e caracteriza-se pela imposição de órgãos sexuais masculinos em fêmeas, alterando o desenvolvimento sexual e a reprodução. [79] [80] O imposexo é de momento descrito como afetando mais de 200 espécies de gastrópodes, sendo um fenómeno a nível mundial. [74]

Este composto é extremamente tóxico para uma grande variedade de organismos, desde bactérias a mamíferos, incluídos os humanos e foi considerado a substância mais tóxica introduzida deliberadamente no meio ambiente. [81] [74]

Vários estudos evidenciaram diversos efeitos deste OT em várias espécies: danos no sistema endócrino causados pelo TBT estendem-se à função tiroideia em anfíbios, peixes e ratos; [82] [83] [84] em concentrações de nM pode apresentar efeitos similares ao estrogénio em adipócitos de mamíferos; [85] vários estudos indicam também que o TBT inibe a atividade da aromatase, que converte a testosterona em estradiol, e leva a uma diminuição do 17 β - estradiol e a um aumento dos níveis de testosterona em animais do sexo masculino, particularmente moluscos. [86]

Efeitos do TBT a nível cardiovascular

Recentemente a toxicidade do TBT tem sido demonstrada a nível vascular em modelos animais [87], e os resultados obtidos até ao momento parecem sugerir que o TBT pode constituir um fator de risco para a doença cardiovascular. O TBT altera a reatividade vascular coronária para o estradiol alterando a morfologia e funcionalidade da artéria aorta em modelos de roedores [88] [89] e em células endoteliais de suínos. [90] [91] Dos Santos et al. (2012) viram também que o TBT prejudica a resposta vasodilatadora induzida pelo 17 β -estradiol em artérias coronárias de rato. [88]

CAPÍTULO II - Objetivo

Como descrito anteriormente, a toxicidade do TBT tem sido demonstrada a nível vascular, em modelos animais, principalmente em roedores. Já relativamente aos efeitos em humanos não existem estudos nesta área. Portanto o objetivo principal deste trabalho foi averiguar os efeitos do TBT a nível vascular.

Para o cumprimento do objetivo principal, várias tarefas foram definidas:

- 1- Estudo da contratilidade da artéria umbilical humana através da técnica de banho de órgãos;
- 2- Isolamento e cultura de células HUASMC;
- 3- Estudo da viabilidade celular das HUASMC;
- 4- Estudo da expressão do mRNA de 5-HT_{2A} e H₁ após incubação com diferentes concentrações de TBT, através de qPCR.

CAPÍTULO III - Materiais e métodos

1.4. Soluções e Materiais

1.4.1. Soluções

Tabela 1 - Na tabela representada estão descritas as soluções utilizadas para a execução deste trabalho.

Cultura de células do músculo liso	
Soluções	Composição
Solução de Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 Liofilizado, NaHCO ₃ (1,2 g/L) e ácido L-ascorbico (20 mg/L); pH 7,4
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS); Albumina de soro bovino (BSA -0,5%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5 µg/ml); fator de crescimento fibroblástico (FGF 0,5 ng/ml); heparina (2 µg/ml) e insulina (5 µg/ml); pH 7,4.
Meio de cultura sem soro	DMEM-F12; Albumina de soro (BSA - 0,5%
Solução salina fisiológica (PSS)	NaCl 110 mM; CaCl ₂ 0,15 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 2 mM; HEPES 10 mM; NaHCO ₃ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 0,5 mM; NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM; glicose 10 mM e EDTA 0.49 mM
Solução de Tripsina-EDTA	0,5 g de tripsina de porco e 0,2 g de EDTA
Banho de órgãos	
Soluções	Composição
Solução de Krebs	NaCl 119 mM; KCl 5mM; CaCl ₂ 2H ₂ O 0,5 mM; MgSO ₄ .7H ₂ O 1,2 Mm; KH ₂ PO ₄ 1,2 mM; NaHCO ₃ 25 mM; EDTA-Na ₂ 0,03 mM; L-(+)-ascórbico 0,6 mM e glicose 11 mM; pH=7,4
KCl 60 mM	NaCl 119 mM; KCl 5mM; CaCl ₂ 2H ₂ O 0,5 mM; MgSO ₄ .7H ₂ O 1,2 Mm; KH ₂ PO ₄ 1,2 mM; NaHCO ₃ 25 mM; EDTA-Na ₂ 0,03 mM; L-(+)-ascórbico 0,6 mM e glicose 11 mM; KCl 60 mM; pH 7,4
MTT e BCA	
Soluções	Composição
Solução de MTT	0,5 mg/mL de MTT diluído em PBS
Solução <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) ou solução fosfato-salino diluído	NaCl 110 mM; CaCl ₂ 0,15 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 2 mM; HEPES 10 mM; NaHCO ₃ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 0,5 mM; NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM; glicose 10 mM e EDTA 0.49 mM NaCl; KCl; Na ₂ HPO ₄ e KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4

1.4.2. Químicos

Durante a realização do procedimento experimental foram utilizados vários químicos. De entre os químicos utilizados para a preparação das várias soluções, todos foram adquiridos por Sigma-Aldrich. Em relação à serotonina, à histamina e ao TBT (TBTCl, 96%) ambos foram adquiridas à Sigma-Aldrich.

1.4.3. Materiais

Tabela 2 - Na tabela representada estão descritos os materiais e equipamentos e respetivas marcas.

Cultura de células do músculo liso	
Material	Marca
Material cirúrgico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Frascos de cultura e multiwells (6 poçetos)	Orange scientific
Material específico de laboratório	
Equipamento	Marca
Câmara de fluxo laminar	
Banho de órgãos	
Material	Marca
Material cirúrgico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Material específico de laboratório	
Equipamento	Marca
Camara de banho de órgãos	Letica
Transdutor de força	Panlab
Amplificador	ADInstruments
Interface PowerLab/4SP	ADInstruments
Software específico do banho de órgãos	ADInstruments
MTT e BCA	
Material	Marca
Multiwells (96 poçetos)	Orange scientific
Equipamento	Marca
Espectrofotómetro com leitor de microplacas	EZ Read 400, Microplate Reader, biochrom
Preparação de soluções	
Equipamento	Marca
Balança digital	Sartorius
Mediador de pH	Metrohm
Extração de RNA Total	
Equipamento	Marca
Centrífuga	Mikro 200R, Hettich zentrifugen

Placa de aquecimento	Block heater, SBH130D, Stuart
Nanofotometro	NanoPhotometer™, IMPLEN
cDNA	
Equipamento	Marca
Termociclador	T100™ Thermal Cycler, BIO-RAD
qPCR	
Equipamento	Marca
Termociclador	iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD

1.5. Métodos

1.5.1. Recolha das amostras

As amostras biológicas utilizadas para a realização deste estudo foram cordões umbilicais humanos. Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo Bloco de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB), e o protocolo utilizado para as amostras foi aprovado pela Comissão de Ética do mesmo. As amostras cedidas foram obtidas com o consentimento informado das mães e foram excluídas amostras das quais não fosse possível determinar se seriam portadoras de alguma patologia.

As amostras de cordão umbilical após recolha foram colocadas numa solução fisiológica salina (PSS) com a seguinte composição: penicilina (5 U/mL), estreptomicina (5 µg/mL) e anfotericina B (12.5 ng/mL), sendo estes antibióticos e evitando assim possíveis contaminações, e as seguintes antiproteases: leupeptina (0.45 mg/L), benzamidina (26 mg/L) e inibidor da tripsina (10 mg/L) de forma a evitar a possível degradação das células.

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

A remoção da artéria do cordão umbilical foi realizada a partir de procedimentos previamente descritos, primeiramente por Martin et al. e mais tarde por Cairrão et al. (Cairrão et al., 2010; Martin de Llano et al., 2007).

Todo o procedimento foi levado a cabo numa sala de cultura celular, utilizando uma câmara de fluxo laminar, com todos os procedimentos de esterilidade, incluindo o uso de material, soluções e instrumentos estéreis.

Primeiramente o cordão umbilical passou por processos de limpeza que incluíram a sua lavagem em solução de PSS com antibiótico, em recipientes diferentes. Seguidamente o cordão foi passado para uma caixa de Petri com cerca de 30 mL de PSS e antibiótico, onde se isolaram as artérias por remoção da geleia de Wharton envolvente. Toda a extração foi realizada com material cirúrgico apropriado.

Finalizada a extração das artérias, estas foram cortadas em pequenas porções e seguidamente trespassando-se uma tesoura, abriu-se as artérias, ficando a túnica íntima exposta. Procedeu-se então à remoção do endotélio através do uso de um cotonete estéril. Após remoção do endotélio, efetuou-se a extração das camadas de músculo liso vascular, sendo depois transferidas para uma nova caixa de petri contendo 3 mL de PSS e antibiótico.

Seguidamente, procedeu-se à lavagem das camadas usando para o efeito falcons contendo 5 mL de PSS sem antibiótico, repetindo 4 vezes o procedimento. Após lavagem, as camadas foram colocadas em frascos de cultura celular, tendo estes sido inicialmente revestidos com colagénio ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), e estes frascos foram colocados numa incubadora a uma temperatura de 37°C numa atmosfera de ar de 95% e CO_2 a 5%. Após cerca de 15 minutos, retirou-se os frascos da incubadora e adicionou-se 3 mL de meio de cultura, voltando-se a colocar nas condições anteriores. Após 24h, foram adicionados mais 2 mL de meio de cultura.

Realizou-se mudanças do meio de cultura de 2 em 2 dias.

Quando as culturas se encontraram em confluência por volta de 90-95 % (cerca de 20-30 dias após cultura) foram realizadas tripsinizações sucessivas para obtenção de subculturas até a um máximo de 6 passagens.

1.5.3. Tratamento com TBT

Após se encontrarem em confluência total, as células do músculo liso foram transferidas para placas de 6 poços, onde se esperou que entrassem em confluência novamente. Após este processo, as placas foram incubadas com diferentes concentrações de tributilestano ($0,1 \text{ nM}$, 1 nM , 10 nM , $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) em diferentes poços, e com etanol 0,1% que serviu como controlo. O TBT foi inicialmente diluído em etanol para as diferentes concentrações.

1.5.4. Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o TRIzol[®] Reagent (Ambion) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Inicialmente, aspirou-se todo o meio dos poços, adicionou-se 200 μL de PBS para lavar, voltou-se a aspirar e adicionou-se então 200 μL de TRIzol em cada poço, sendo que este tem como função a lise celular, visto que consiste numa solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, libertando assim o RNA sem que a sua integridade seja comprometida. De seguida procedeu-se a uma raspagem dos poços, utilizando para o efeito, um *cell scraper*, o que permite soltar as células. Retirou-se então o líquido de cada poço para um eppendorf específico e deixou-se 5 min à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionou-se 80 μL de clorofórmio (de forma a separar o DNA do RNA), homogeneizou-se no vórtex e deixou-se 2 min à temperatura ambiente. Procedeu-se então a uma centrifugação a $12000g$, a 4° durante 15 min, o que permitiu a separação do DNA do RNA.

Após a centrifugação, o eppendorf apresentava 3 fases distintas: uma fase aquosa superficial que contem o RNA (transparente), uma fase intermédia que contem o DNA (branca) e no fundo, uma fase orgânica cor de rosa que contem as proteínas, resíduos de fenol e de clorofórmio, como representado na figura 6.

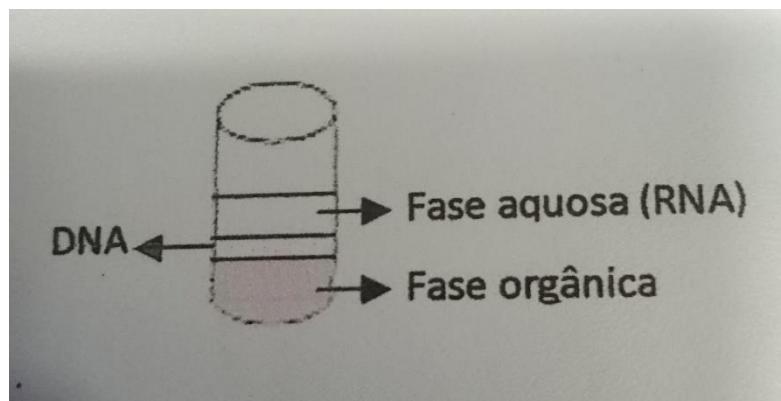


Figura 6- Representação das fases presentes no eppendorf.

Realizou-se então a separação das fases e transferiu-se o conteúdo em RNA para um novo eppendorf. Neste, adicionou-se 100 μL de isopropanol, que permite a precipitação do RNA, e homogeneizou-se a solução por inversão, deixando-se repousar 10 min à temperatura ambiente. Realizou-se uma nova centrifugação a 12000g a 4°C durante 10 min. Desta, obteve-se um pequeno pellet e um sobrenadante, e procedeu-se à remoção do sobrenadante. Adicionou-se posteriormente 200 μL de etanol frio a 75% e agitou-se no vórtex. Realizou-se novamente uma centrifugação, desta vez a 7500g a 4° durante 5 min.

O processo anterior de remoção do sobrenadante, adição de etanol e centrifugação foi repetido, e após esta repetição retirou-se então todo o excesso de etanol e procedeu-se à evaporação do excesso de etanol através da secagem dos eppendorfs à temperatura ambiente durante cerca de 3 min.

De seguida, realizou-se uma ressuspensão do pellet em 20 μL de H_2O tratada com DEPC (sendo este um inibidor de RNAses), e colocou-se os eppendorfs a 57° durante 5 min. Após este processo, realizaram-se as leituras espectrofotométricas a 260 e 280nm utilizando um nanoespectrofotômetro (Nanophotometer TM , Implen, Germany) para quantificar a concentração de RNA das amostras. Este aparelho facultava diretamente a concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o rácio entre a A_{260}/A_{280} , que determina a qualidade do RNA com base na absorvência a 260 nm, comprimento de onda ao qual os ácidos nucleicos têm pico de absorção, e a 280 nm, comprimento de onda ao qual as proteínas têm pico de absorção. Para determinar uma boa qualidade e pureza de RNA, o rácio em causa deverá estar no intervalo de 1,8 a 2,1. Os rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou com fenol e os rácios superiores a 2,1 indicam contaminação com DNA.

Todo o procedimento foi realizado utilizando material estéril, e em gelo devido à sensibilidade do RNA.

1.5.5. Síntese de DNA complementar

O cDNA obtém-se a partir da transcrição reversa do mRNA pela ação da enzima transcriptase reversa. De início foi preparada uma MIX 1 com a seguinte constituição: Random hexamer mix (0.5 µg /µL) (NZYset, Portugal), e dNTP's (10 mM) (NZYset, NzyTech, Portugal) a uma proporção de 2 para 1 respetivamente. Realizaram-se as misturas para n+1 reações e para um volume final de cDNA de 20 µL. De seguida adicionou-se 3 µL da MIX 1 e o volume adequado para 1µg de RNA aos tubos de PCR e perpez-se o volume com água estéril livre de nucleases.

Seguidamente colocou-se os tubos no termociclador a 65°C durante 5 minutos. No decorrer deste passo, preparou-se uma MIX 2 com a seguinte constituição: 10x reaction buffer (nzytech, Portugal), e M-MuLV a uma proporção de 2 para 1 respetivamente. No final dos 5 minutos adicionou-se 3 µL da MIX 2 a cada tudo de PCR e voltou-se a colocar no termociclador seguindo uma série de incubações: 25°C durante 10 minutos, a 37°C durante 50 minutos e a 70°C durante 15 minutos. No final da reação os cDNAs foram armazenados a -20°C.

1.5.6. PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes 5-HT_{2A} e H₁, foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o kit NZY qPCR Green Master MIX (NZYtech). O gene Housekeeping usado foi a β-2-microglubulina para normalizar os níveis de expressão (tabela 3). A eficiência do PCR em tempo real foi determinada para o primer usando diluições de amostras de cDNA (1:1, 1:3, 1:9). As reações de amplificação do gene foram preparadas para um volume final de 20 µL, para tal adicionou-se 10 µL de NZY qPCR Green Master MIX (NZYtech), 0,4 µL de Primer Fw e de Primer Rv, 1 µL de cDNA e por fim perpez-se com água estéril (Thermo Scientific). As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, temperatura de annealing durante 30 segundos, e 72°C durante 10 segundos. A formação de dímeros de primers e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das curvas melting do PCR em tempo real. As diferenças entre experiências foram calculadas usando o modelo matemático de Pfaffl usando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. [92]

Tabela 3 - Primers utilizados para qPCR

Nome do primer	Gene	Sequência do primer	Fragmento (bp)	Temperatura (°C)	Nº gene bank
B2M	B2M	Fw 5'-ATG AGT ATG CCT GCC GTG TG-3' Rv 5'-CAA ACC TCC ATG ATG CTG CTT AC-3'	92	60	NM_004048.2
5-HT _{2A}	5-HT _{2A}	Fw 5'-TCT TTC AGC TTC CTC CCT CA -3' Rv 5'-TGC AGG ACT CTT TGC AGA TG-3'	223	60	NM_000621
H ₁	H ₁	Fw 5'-CAC ACT GAA CCC CCT CAT CT -3' Rv 5'-GGC CTT CGT CCT CTA TTT CC-3'	151	60	NM_000861

1.5.7. Ensaio de viabilidade celular - MTT

O MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) é reduzido a formazano por ação de enzimas desidrogenases e agentes redutores, ocorrendo uma alteração da cor amarelo para roxo. A quantidade de formazano pode ser determinada por espectrofotometria após a sua solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO).

O ensaio de MTT permite avaliar a viabilidade e proliferação celular em ensaios *in vitro* de uma população celular em resposta a um fator externo.

Para a realização deste ensaio, células confluentes em placas de 96 poços foram incubadas durante 24h com as diferentes concentrações de TBT e com os controlos. Após o período de exposição, e na ausência de luz, aspirou-se o meio de cultura e adicionaram-se a cada poço 200 µL de MTT 0,5 mg/mL e incubou-se as placas numa atmosfera húmida com 5% de CO₂ a 37°C e 95% de humidade durante 3h. Decorrido o período de incubação com MTT voltou-se a aspirar o conteúdo dos poços e adicionaram-se 200 µL de DMSO, para a solubilização dos cristais de formazano. Posteriormente o conteúdo de cada poço foi colocado numa nova placa de 96 poços sendo de seguida lida a absorvância num espectrofotómetro com leitor de microplacas a 570 nm.

A solução de MTT 0,5 mg/mL em PBS 1% foi previamente preparada e posteriormente armazenada na ausência de luz a 4°C.

1.5.8. Contractilidade - Câmara de banho de órgãos

Após isolamento das artérias, estas foram mantidas aproximadamente 12h em DMEM-F12. Finalizadas estas 12h, o endotélio foi mecanicamente removido em PSS diluído e recorrendo ao uso de um fio de algodão. De seguida as artérias foram cortadas em pequenos segmentos de cerca de 3-5 mm e incubadas 24h em meio DMEM F-12 juntamente com as diferentes concentrações usadas de tributilestanho, e com controlos de etanol 0,1% e só em meio DMEM-F12.

Passadas as 24h realizaram-se então os ensaios de banho de órgãos. O banho é composto por 4 poços contendo solução modificada de Krebs. Os segmentos de artéria foram suspensos entre fios de aço inoxidável paralelos e introduzidos na solução modificada de Krebs. Esta solução foi mantida a 37°C e gaseificada continuamente com carbogénio (95% O₂ e 5% CO₂). Inicialmente, as artérias foram submetidas a uma tensão que pode variar entre 1,5-2g e foram equilibradas durante cerca de 45 min, com mudança do meio de Krebs de 15-15 min. De seguida procedeu-se a adição de diferentes agentes contracteis, sendo estes, 5-HT, histamina e KCl. As artérias foram seguidamente submetidas à presença das várias concentrações de tributilestanho (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) por ordem crescente (da menos concentrada para a mais concentrada) e a controlos de etanol, de forma a avaliar o possível efeito destes na contractilidade das artérias.

A tensão foi medida a partir de um transdutor de força (TRI201, Panlab SA, Espanha), um amplificador (ML118/D Quad Bridge, ADInstruments) e uma interface Power-Lab/4SP (ML750, ADInstruments) ligada a um sistema computadorizado com o programa "PowerLab Chart5".

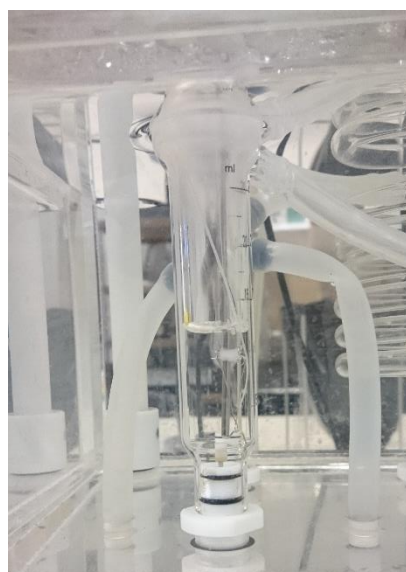


Figura 7 - Representação do banho de órgãos

1.5.9. Análise estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média das experiências, para cada condição experimental analisada. A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat Statistical Analysis System versão 3.5 (Systat Software, London. UK). A significância estatística entre as diferentes concentrações e o controle foi analisada usando a one-way ANOVA. A significância estatística entre os dois tipos de amostra foi analisada usando o Student's t-test. As diferenças entre os grupos foi considerada significativa quando ($P < 0,05$).

CAPÍTULO IV - Resultados

1.6. Análise da contratilidade das HUA

1.6.1. Efeito do TBT em base

Primeiramente quantificou-se as tensões reais exercidas em anéis de artérias incubadas com o controlo (EtOH 0,1% e DMEM) durante 24h, quando submetidas às diferentes concentrações de TBT. Este procedimento teve como objetivo verificar se o composto em base, isto é, na ausência de um agente contrátil, provocava alguma alteração na contratilidade das HUA. Estas experiências foram realizadas através da técnica de banho de órgãos.

Tabela 4 - Tensões reais exercidas em anéis de artérias incubadas 24h com EtOH 0,1% quando submetidas às diferentes concentrações de TBT.

EtOH 0,1% 24h							
Tensão Real (mg)							
TBT 0,1 nM	TBT 1 nM	TBT 10 nM	TBT 0,1 μ M	TBT 1 μ M	TBT 10 μ M	TBT 100 μ M	
83	22	35	77	113	222	304	
132	44	0	-12	113	184	235	
101	69	104	-15	15	138	262	
345	271	67	90	154	118	432	
237	10	-27	-97	-68	-90	-3	
27	-23	-48	-60	-130	-77	-35	
N=	6	6	6	6	6	6	
Média	154,1667	65,5	21,83333	-2,83333	32,83333	82,5	199,1667
Erro padrão	47,55097	43,01531	23,59579	30,19869	46,38061	54,55868	74,41748

Tabela 5 - Tensões reais exercidas em anéis de artérias incubadas 24h com DMEM quando submetidas às diferentes concentrações de TBT.

DMEM 24h							
Tensão Real (mg)							
	TBT 0,1 nM	TBT 1 nM	TBT 10 nM	TBT 0,1 μM	TBT 1 μM	TBT 10 μM	TBT 100 μM
	-45	-27	-18	-3	94	101	136
	19	153	98	101	121	207	288
	236	164	163	165	202	193	269
	79	32	6	17	36	59	115
	-34	21	-51	16	87	-68	77
	75	65	67	0	110	111	136
N=	6	6	6	6	6	6	6
Média	55	68	44,16667	49,33333	108,3333	100,5	170,16666
Erro padrão	42,01349	31,08054	32,61842	27,91495	22,23311	40,87522	35,454587

Através destes resultados verifica-se que o TBT em base não provoca alterações na HUA, não existindo diferenças significativas. (Oneway ANOVA ($p < 0.05$))

Para a execução deste estudo, dois controlos foram utilizados: o EtOH 0,1% e o DMEM, com o objetivo de comprovar que o EtOH se comporta de igual forma que o DMEM, visto que todas as diluições de TBT foram realizadas em EtOH. Através de análise estatística (Oneway ANOVA verificou-se que estes dois controlos não apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$) e assumiram-se como um controlo geral.

1.6.2. Estudo dos efeitos do TBT a curto prazo

O segundo procedimento realizado teve como objetivo o estudo dos efeitos do TBT a curto prazo, em HUA contraídas com três agentes contráteis (5-HT, histamina e KCl). Para isso, artérias sem incubação foram sujeitas a duas condições, adição sucessiva de EtOH e adição de concentrações crescentes de TBT, após contração com os agentes contráteis.

Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por 5-HT

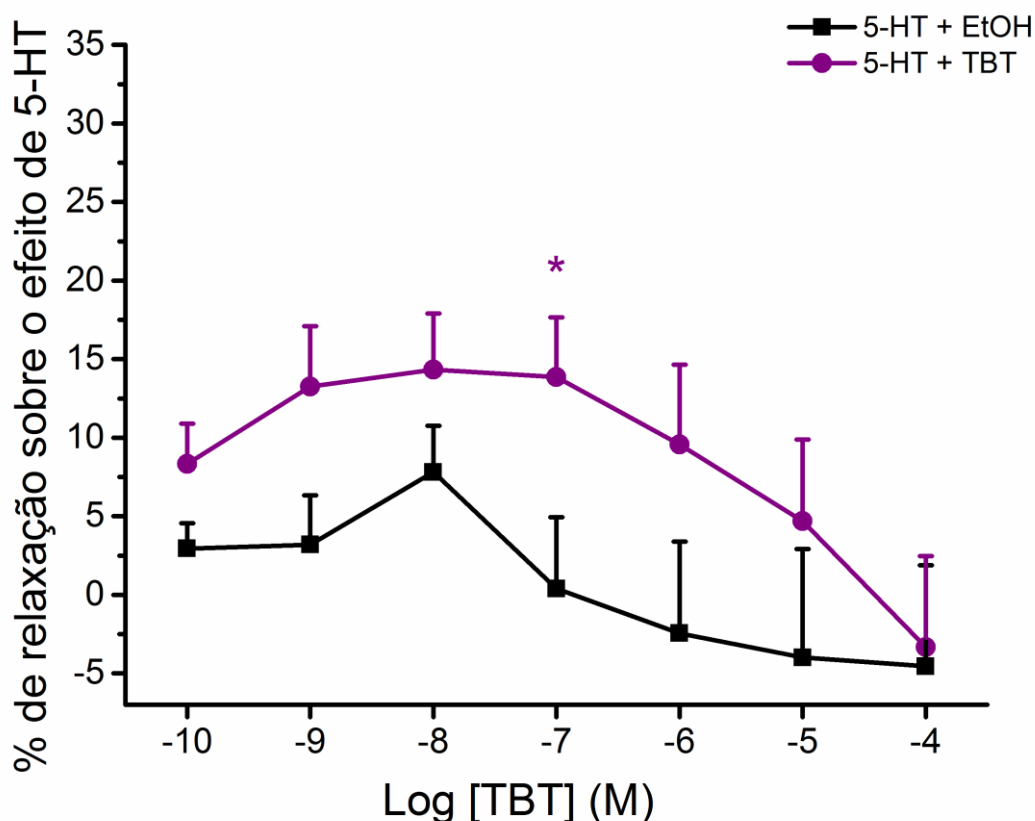


Figura 8 - Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por 5-HT. A linha preta representa a adição sucessiva de EtOH (n=15) e a linha púrpura representa a adição das concentrações crescentes de TBT (n=19). Cada ponto representa o valor médio e a barra vertical indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA, e testes t-student.

Analisando os dados obtidos para as HUA sujeitas a adição sucessiva de EtOH deparamo-nos com um pequeno efeito relaxante, tendo um pico até cerca de 7% e decrescendo depois até cerca de -5%. Apesar da ocorrência destes efeitos, não houve diferenças significativas comparativamente ao controlo.

Relativamente aos dados referentes às HUA sujeitas a concentrações crescentes de TBT, é possível observar uma relaxação até cerca de 15%, ocorrendo de seguida um total decréscimo, chegando até -5%. Apesar destes efeitos, também não houve diferenças significativas entre as concentrações de TBT adicionadas. É de notar que existe uma diferença estatística entre a concentração de 10 nM e o controlo.

Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por histamina

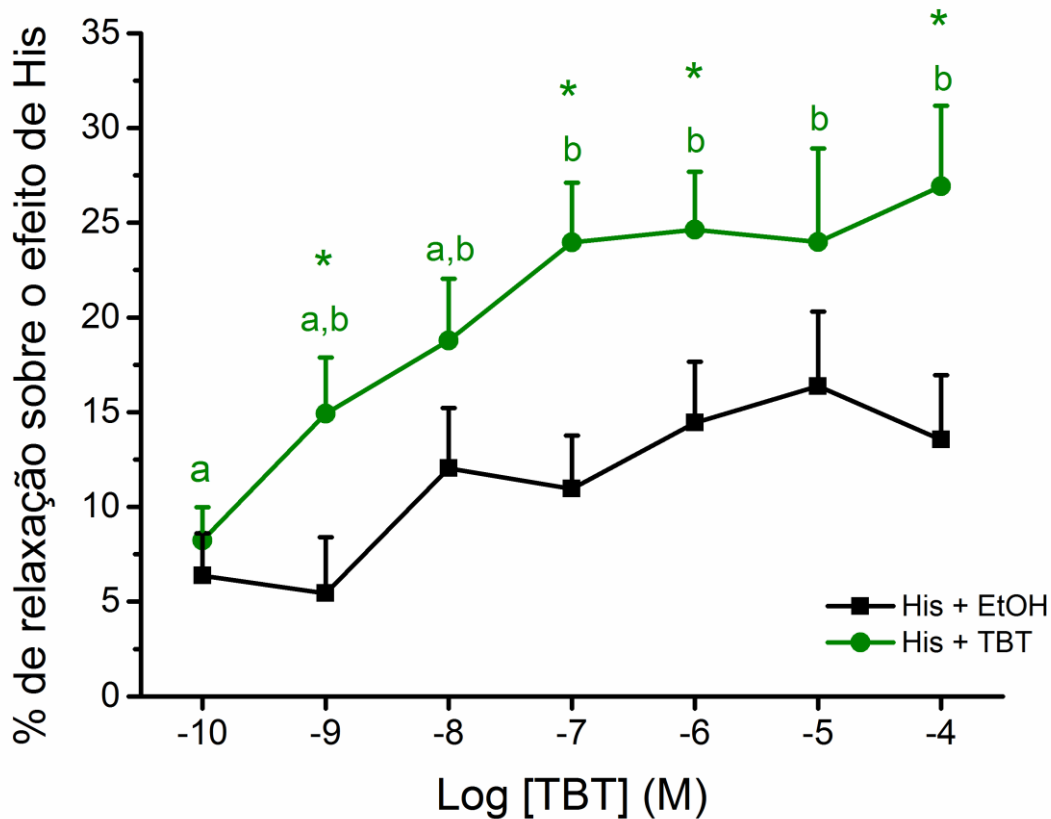


Figura 9 - Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por histamina. A linha preta representa a adição sucessiva de EtOH (n=11) e a linha verde representa a adição das concentrações crescentes de TBT (n=18). Cada ponto representa o valor médio e a barra vertical indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controle. As diferentes letras (a e b) indicam diferenças significativas entre cada concentração de TBT adicionada. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA, e testes t-student.

Analisando os dados obtidos para as HUA sujeitas a adição sucessiva de EtOH com uma relaxação que chega até cerca de 15%, não havendo diferenças significativas.

Relativamente aos dados referentes às HUA sujeitas a concentrações crescentes de TBT, é possível observar uma relaxação até cerca de 25%, e ocorrência de várias diferenças estatísticas. É de notar que a concentração de 0,1 nM é estatisticamente diferente de 0,1 μM, 1 μM, 10 μM e 100 μM.

No que diz respeito a diferenças entre as duas condições analisadas, existem diferenças estatísticas entre as concentrações de 1 nM, 0,1 μM, 1 μM e 100 μM em relação ao controle.

Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por KCl

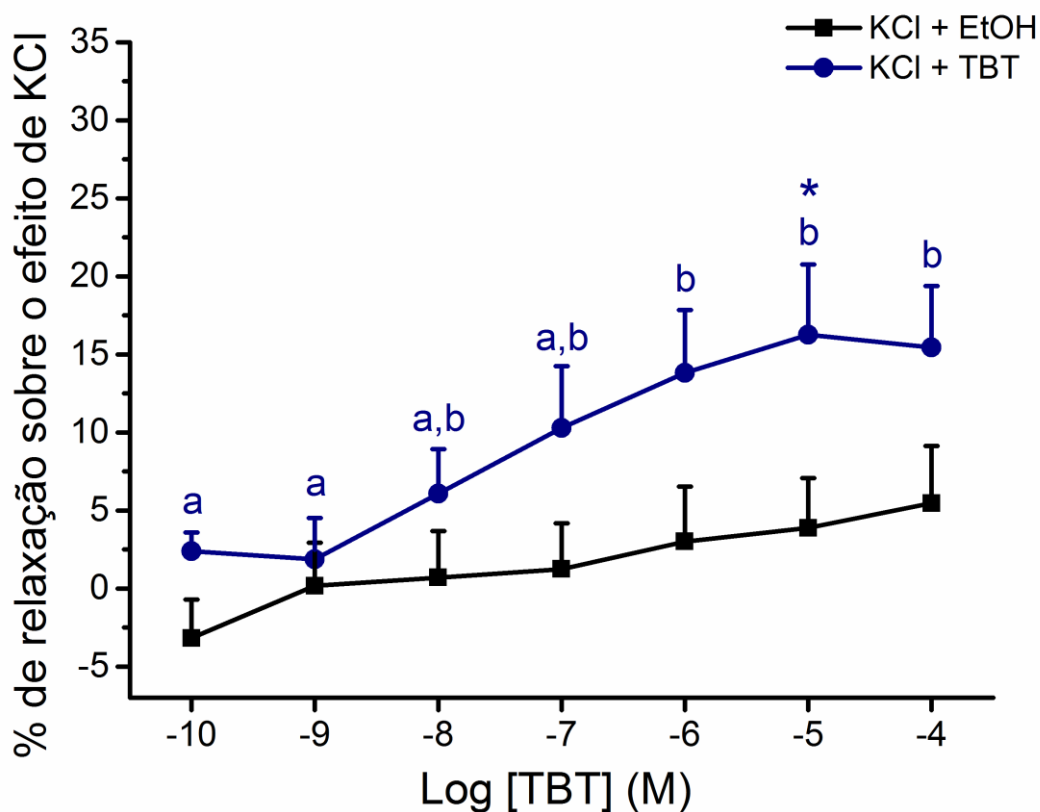


Figura 10 - Estudo do efeito da adição de concentrações crescentes de TBT, em artérias sem incubação e sujeitas a contração por KCl. A linha preta representa a adição sucessiva de EtOH (n=18) e a linha azul representa a adição das concentrações crescentes de TBT (n=17). Cada ponto representa o valor médio e a barra vertical indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. As diferentes letras (a e b) indicam diferenças significativas entre cada concentração de TBT adicionada. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA, e testes t-student.

Analisando os dados obtidos para as HUA sujeitas a adição sucessiva de EtOH denota-se dados quase constantes ao longo da experiência, não havendo diferenças significativas.

Relativamente aos dados referentes às HUA sujeitas a concentrações crescentes de TBT, é possível observar uma relaxação até cerca de 15%, e ocorrência de várias diferenças estatísticas. É de notar que as concentrações 0,1 nM e 1nM são estatisticamente diferentes de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M.

No que diz respeito a diferenças entre as duas condições analisadas, existem diferenças estatísticas entre a concentração de 10 μ M e o controlo.

1.6.3. Estudo do efeito do TBT, a longo prazo, na contratilidade das HUA realizado através da técnica de banho de órgãos

Seguidamente foi então analisado o efeito do TBT na contratilidade das HUA, para isso os anéis arteriais sem endotélio foram incubados durante 24h com o controlo e com as diferentes concentrações de TBT (0,1 nM; 0,1 μ M; 100 μ M). De seguida foram submetidos a três agentes contrateis (5-HT, histamina e KCl) e as tensões reais (mg) foram medidas, de forma a verificar se o TBT provocava alguma alteração na capacidade contrátil das HUA.

Estudo do efeito induzido pela 5-HT nos anéis de HUA após incubação dos mesmos durante 24h com o controlo e com TBT (0,1 nM; 0,1 μ M; 100 μ M).

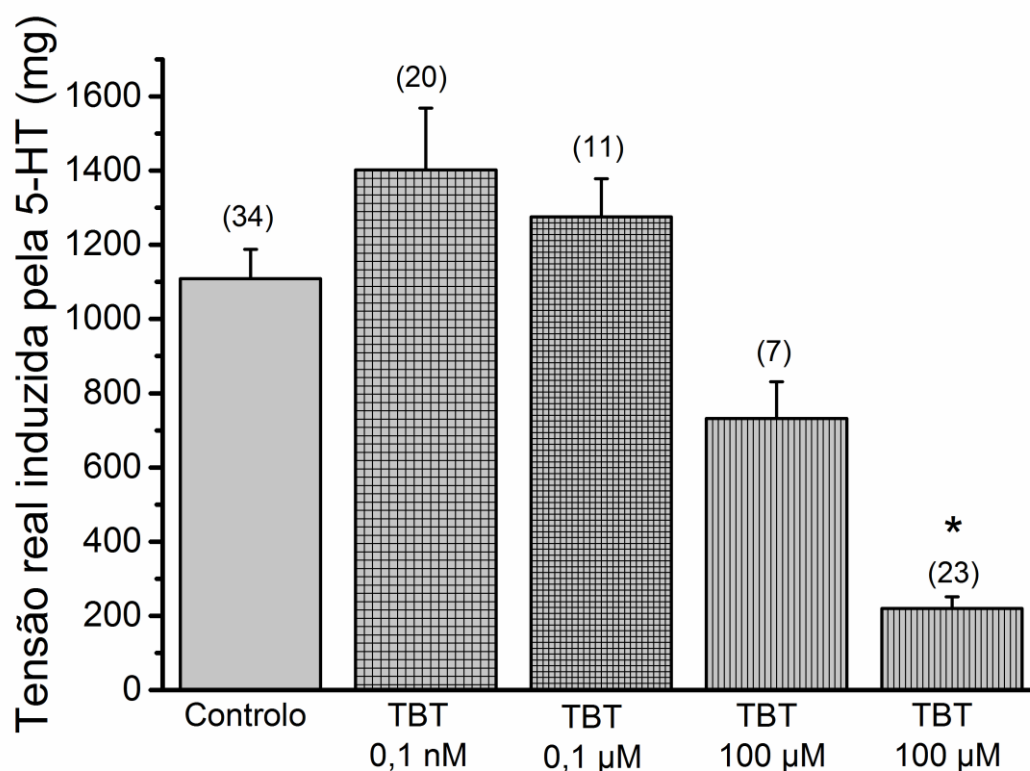


Figura 11: Efeito genómico do TBT sobre a contração da HUA induzida pela 5-HT. Cada barra representa o valor médio e a linha vertical indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA ($p < 0.05$).

Os anéis de HUA incubados durante 24h com TBT (0,1 nM e 0,1 μ M) e contraídas na presença de 5-HT (1 μ M) não apresentam valores de tensões reais significativamente diferentes dos obtidos com o controlo. Relativamente às HUA incubadas com concentrações mais elevadas de TBT (100 μ M), a maioria não contraíram na presença de 5-HT (23) apresentado uma média de tensão real de 200 mg. Somente 23,3% dos anéis tiveram capacidade contrátil, e sem diferença estatística comparativamente ao controlo.

Estudo do efeito induzido pela histamina nos anéis de HUA após incubação dos mesmos durante 24h com o controlo e com TBT (0,1 nM; 0,1 μ M; 100 μ M).

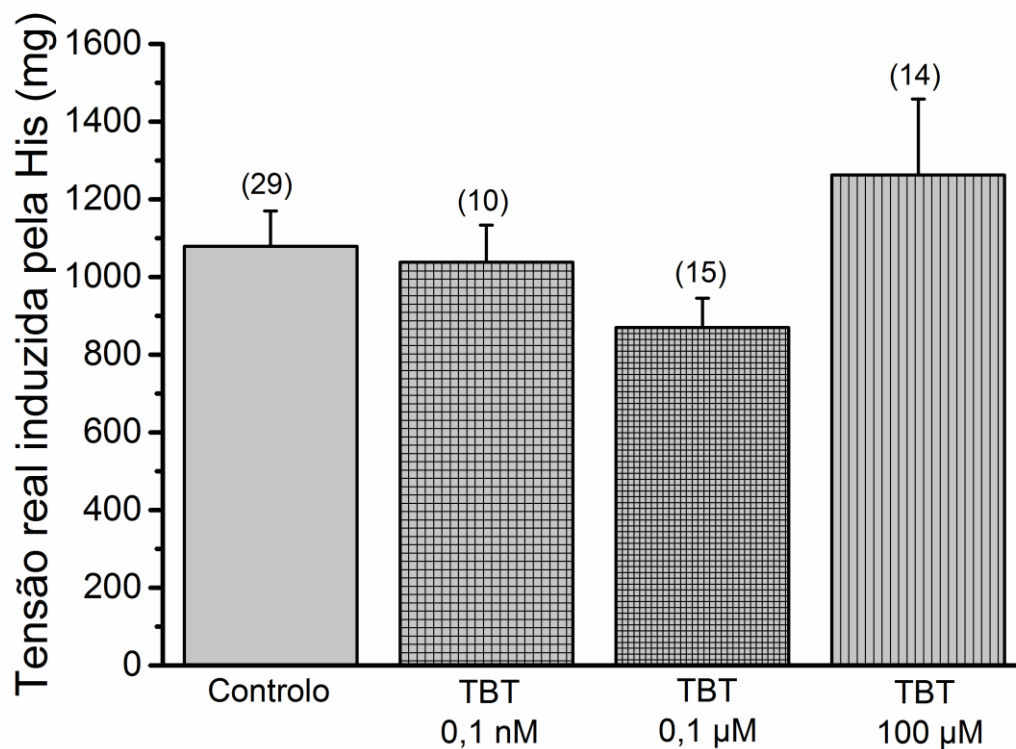


Figura 12: Efeito genómico do TBT sobre a contração da HUA induzida pela histamina. Cada barra representa o valor médio e a linha vertical indica o erro padrão. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA.

Os anéis de HUA incubados 24h com as diferentes concentrações de TBT e na presença de histamina apresentaram habilidade contrátil e as tensões reais obtidas não foram significativamente diferentes do controlo.

Estudo do efeito induzido pelo KCl nos anéis de HUA após incubação dos mesmos durante 24h com o controlo e com TBT (0,1 nM; 0,1 μ M; 100 μ M).

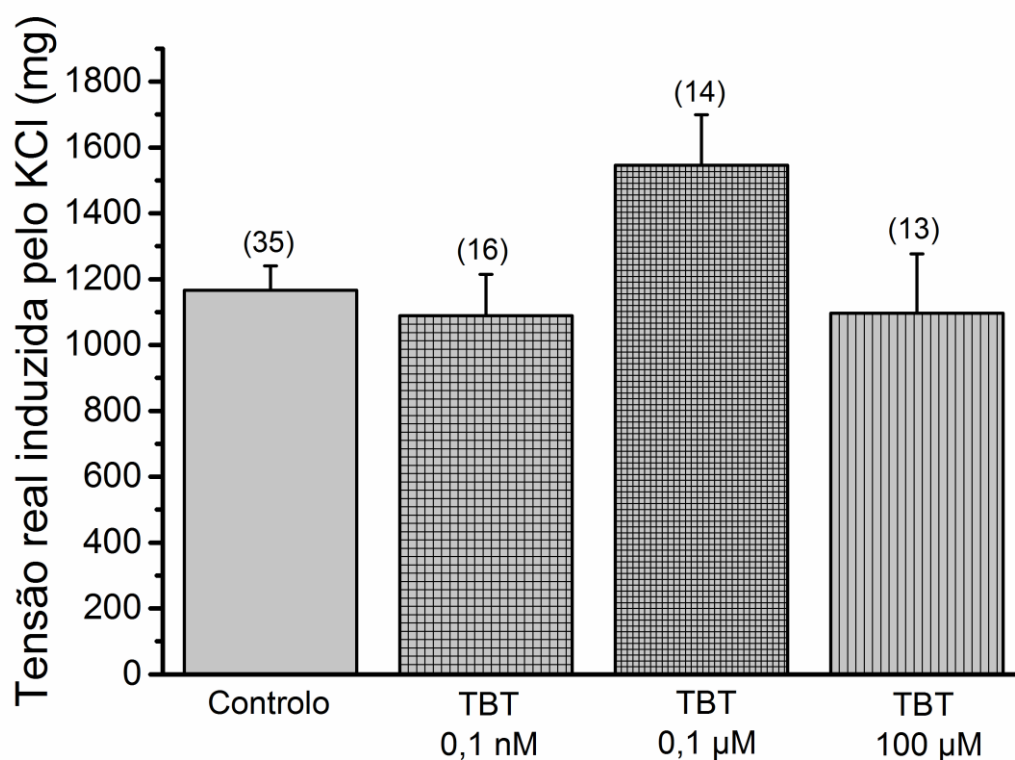


Figura 13: Efeito genómico do TBT sobre a contração da HUA induzida pelo KCl. Cada barra representa o valor médio e a linha vertical indica o erro padrão. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA.

Os anéis de HUA incubados 24h com as diferentes concentrações de TBT e na presença de KCl apresentaram habilidade contrátil e as tensões reais obtidas não foram significativamente diferentes do controlo.

1.6.4. Estudo do efeito do TBT, a longo prazo, em HUA sujeitas a três agentes contráteis, e a adição de concentrações crescentes do composto realizado através da técnica de banho de órgãos

Os anéis arteriais sem endotélio foram incubados durante 24h com o controlo e com as diferentes concentrações de TBT (0,1 nM; 0,1 μ M; 100 μ M). Posteriormente foram submetidos a três agentes contráteis (5-HT, histamina e KCl) e de seguida a concentrações crescentes de TBT (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M). Este procedimento teve como objetivo verificar o efeito das diferentes concentrações nas contrações provocadas pelos agentes contráteis.

Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pela 5-HT na HUA

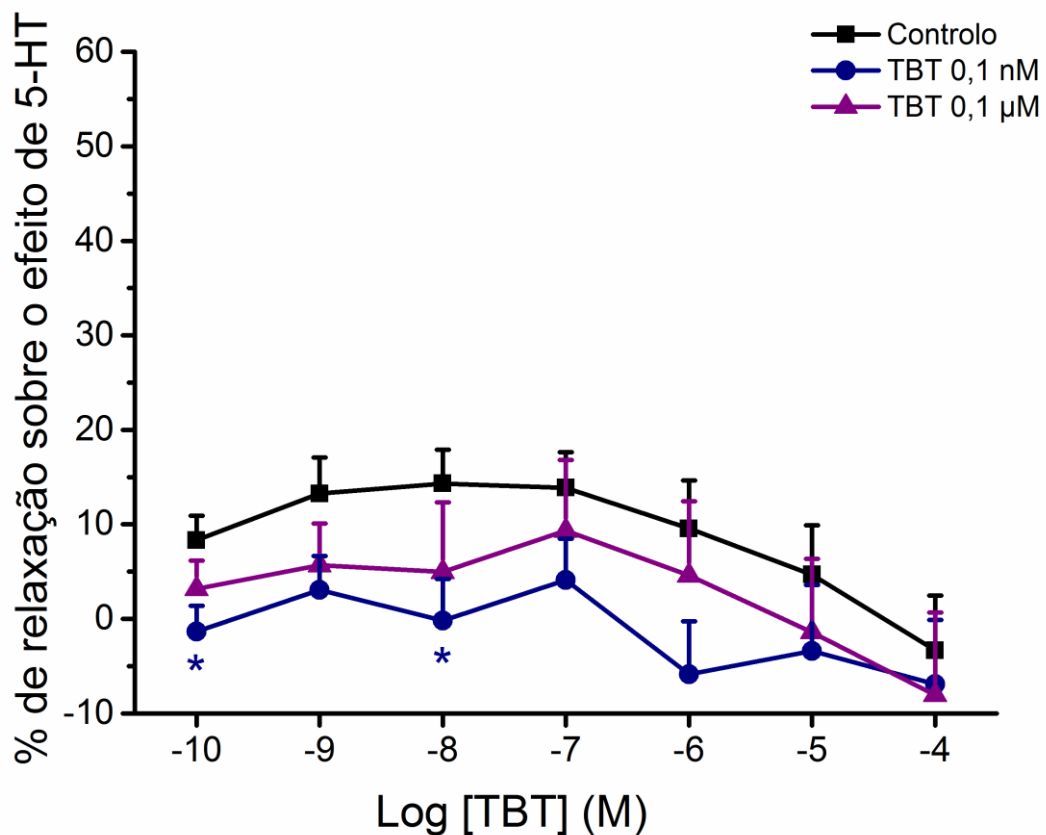


Figura 14- Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pela 5-HT na HUA, em anéis arteriais incubados 24h com o controlo (linha preta, n=19, com TBT (0,1 nM) (linha azul, n=12) e com TBT (0,1 μ M) (linha púrpura, n=6). Cada ponto representa o valor médio e a barra vertical

indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA, e testes t-student.

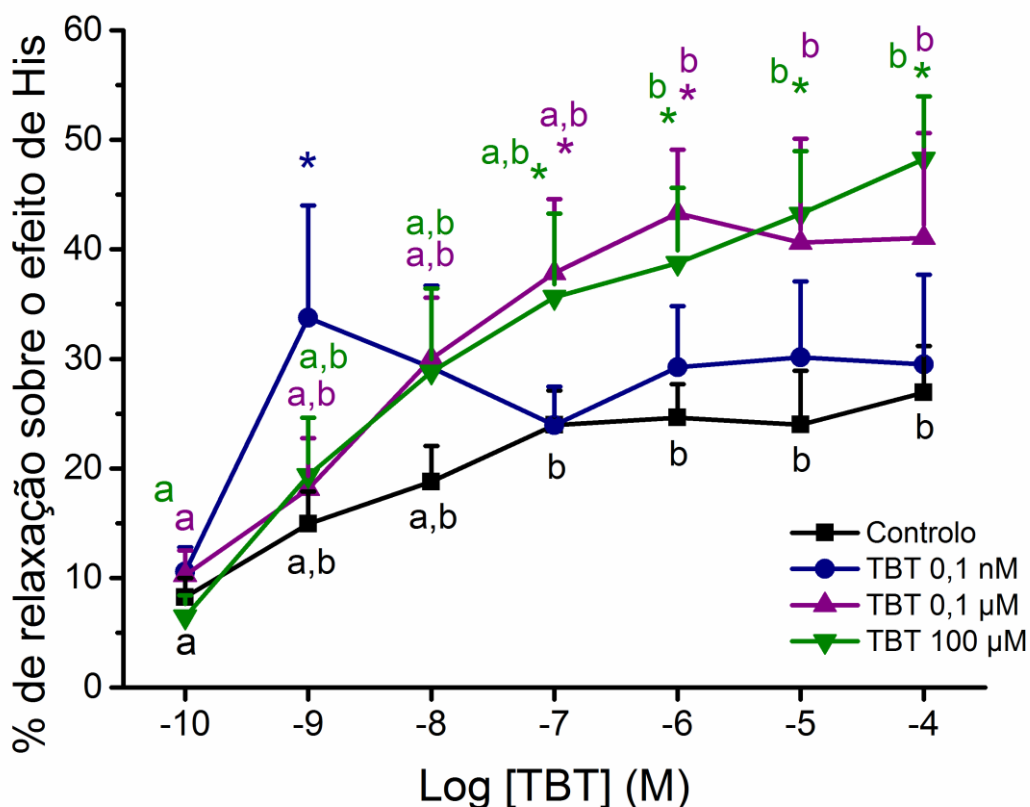
Relativamente ao controlo observa-se que a concentrações mais baixas já ocorre um relaxamento de cerca de 10% que chega a alcançar um máximo de 15%, descendo depois até 0% nas concentrações mais altas. Não sendo esta diferença entre as concentrações significativa.

Referente às HUA incubadas 24h com a concentração 0,1 nM de TBT, as concentrações de 0,1 nM e 10 nM são significativamente diferentes do controlo, e as restantes não apresentam diferenças.

Já as incubadas 24h com a concentração 0,1 μ M não apresentam diferenças comparativamente ao controlo.

Dentro de cada incubação não houve diferenças significativas com a adição das concentrações crescentes de TBT.

Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pela histamina na HUA



*Figura 15- Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pela histamina na HUA, em anéis arteriais incubados 24h com o controlo (linha preta, n=18), com TBT (0,1 nM) (linha azul, n=6), com TBT (0,1 µM) (linha púrpura, n=8), e com TBT (100 µM) (linha verde, n=8). Cada ponto representa o valor médio e a barra vertical indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. As diferentes letras (a e b) indicam diferenças significativas dentro da mesma incubação. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA, e testes t-student.*

Relativamente ao controlo observa-se que ocorreu um efeito relaxante até cerca de 25% e as várias concentrações apresentam diferenças entre si, sendo a concentração mais baixa diferente das 0,1 µM, 1 µM, 10 µM e 100 µM.

Verifica-se ainda que nas HUA incubadas 24h com a concentração 0,1 nM de TBT, ocorreu um efeito relaxante com um pico de relaxação de cerca de 30% decrescendo depois para cerca de 25%. Comparativamente ao controlo, a concentração de 1 nM é significativamente diferente e as restantes não apresentam diferenças. De entre as concentrações crescentes não há diferenças entre elas.

Já nas artérias incubadas 24h com a concentração 0,1 µM, ocorreu um efeito relaxante até cerca de 40%. Comparando com o controlo, as concentrações de 0,1 µM e 1 µM são significativamente diferentes deste. Comparando as concentrações crescentes verifica-se que 1 µM, 10 µM, 100 µM de TBT é significativamente diferente de 0,1 nM.

Por fim, observa-se que nas HUA incubadas 24h com a concentração 100 µM, ocorreu um efeito relaxante até cerca de 45%. Comparando com o controlo as concentrações 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM são significativamente diferentes deste. Já nas concentrações crescentes existe diferenças significativas entre 1 µM, 10 µM, 100 µM de TBT relativamente a 0,1 nM.

Observa-se então um efeito relaxante e dependente das concentrações.

Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pelo KCl na HUA

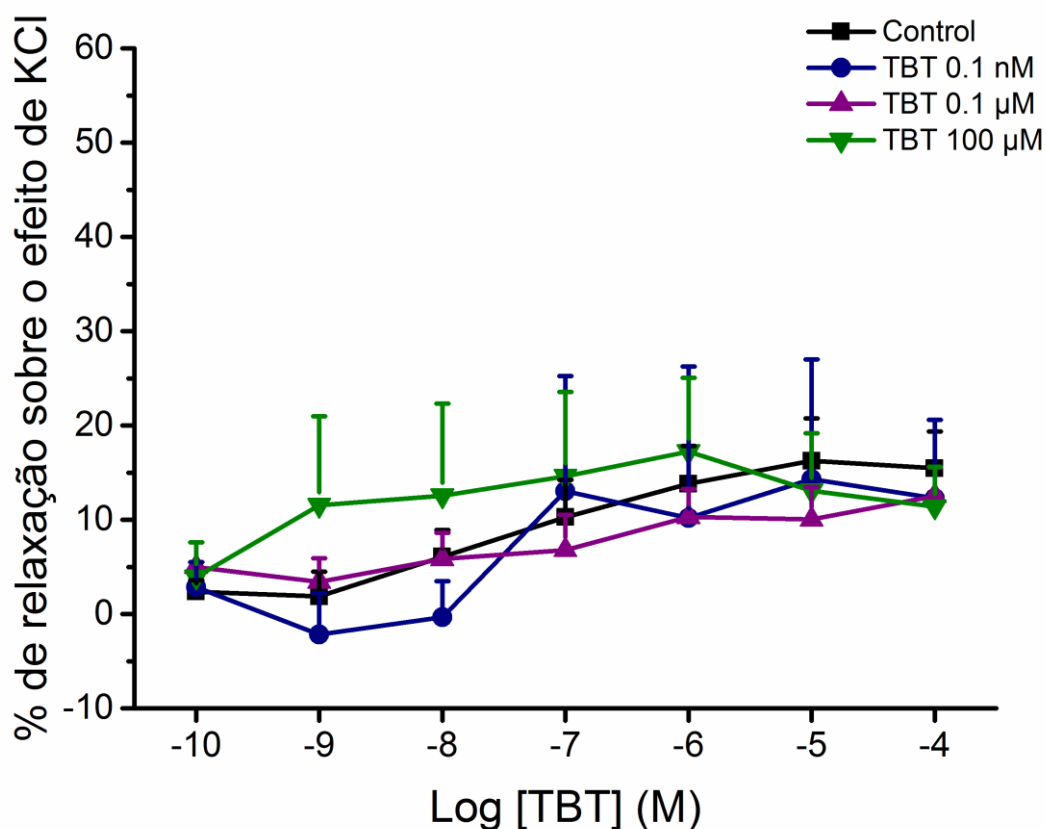


Figura 16- Efeito da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pelo KCl na HUA, em anéis arteriais incubados 24h com o controlo (linha preta, n=17), com TBT (0,1 nM) (linha azul, n=8), com TBT (0,1 µM) (linha púrpura, n=7), e com TBT (100 µM) (linha verde, n=6). Cada ponto representa o valor médio e a barra vertical indica o erro padrão. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA, e testes t-student.

Analisando os efeitos da adição de concentrações crescentes de TBT em contrações provocadas pelo KCl é denotar a semelhança dos dados obtidos tanto para o controlo como para as 3 incubações de TBT, observando-se um efeito relaxante de cerca de 15% para todos. Verifica-se assim, que não existem diferenças significativas das diferentes concentrações perante o controlo, e também não existem diferentes quando as concentrações crescentes são adicionadas.

1.7. Ensaio de viabilidade celular - MTT

Outro passo crucial para a realização deste trabalho, foi a prática de análise da viabilidade das HUASMC. Para a realização deste ensaio, células confluentes foram incubadas durante 24h com as diferentes concentrações de TBT e com os controlos e seguidamente sujeitas a um teste de MTT, de forma a analisar o efeito do TBT na viabilidade celular das HUASMC.

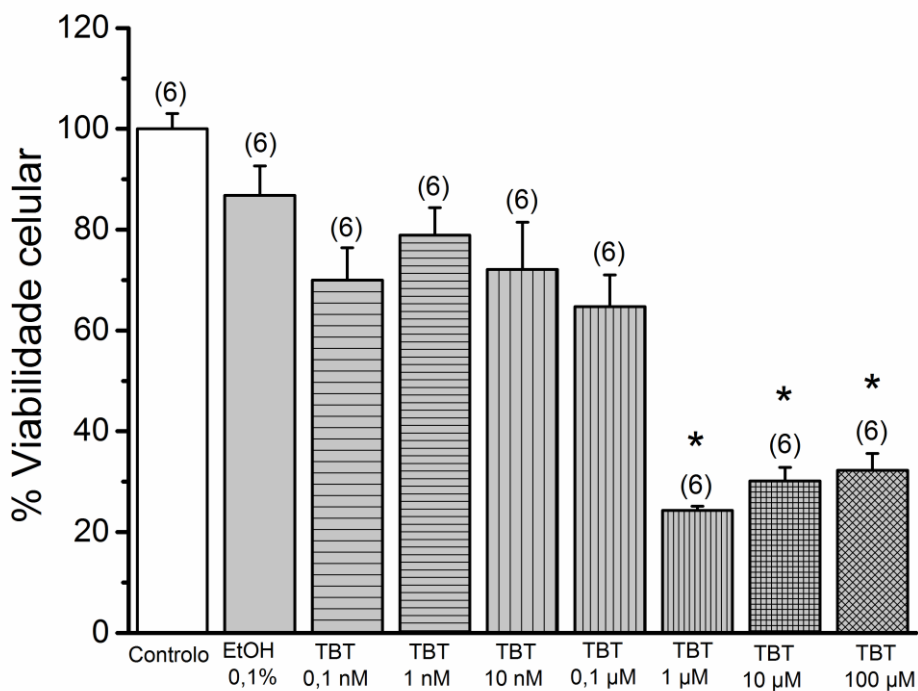


Figura 17- Efeito das diferentes concentrações de TBT na viabilidade celular das HUASMC. Cada barra representa o valor médio e a linha vertical indica o erro padrão. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA ($p < 0.05$).

Analisando o gráfico verifica-se que as concentrações de 0,1 nM, 1 nM, 10 nM e 0,1 µM não apresentam diferenças relativamente aos controlos (DMEM e EtOH 0,1%), pelo que a viabilidade celular das HUASMC incubadas com estas concentrações não se encontra condicionada. Relativamente às concentrações de 1 µM, 10 µM e 100 µM, estas apresentam diferenças significativas quando comparadas aos controlos, pelo que a viabilidade das HUASMC incubadas com estas concentrações encontra-se extramente condicionada.

1.8. Análise da expressão de mRNA

Por fim foi realizada a análise dos níveis de expressão do mRNA dos genes 5-HT_{2A} e H₁ através da técnica de qPCR. As células testadas foram tratadas com as diferentes concentrações de TBT e as não tratadas serviram como controlo. A β -2M foi utilizada como gene de referência interna de forma a normalizar os níveis de expressão do mRNA do gene estudado.

1.8.1. Análise da expressão do mRNA do 5-HT_{2A}

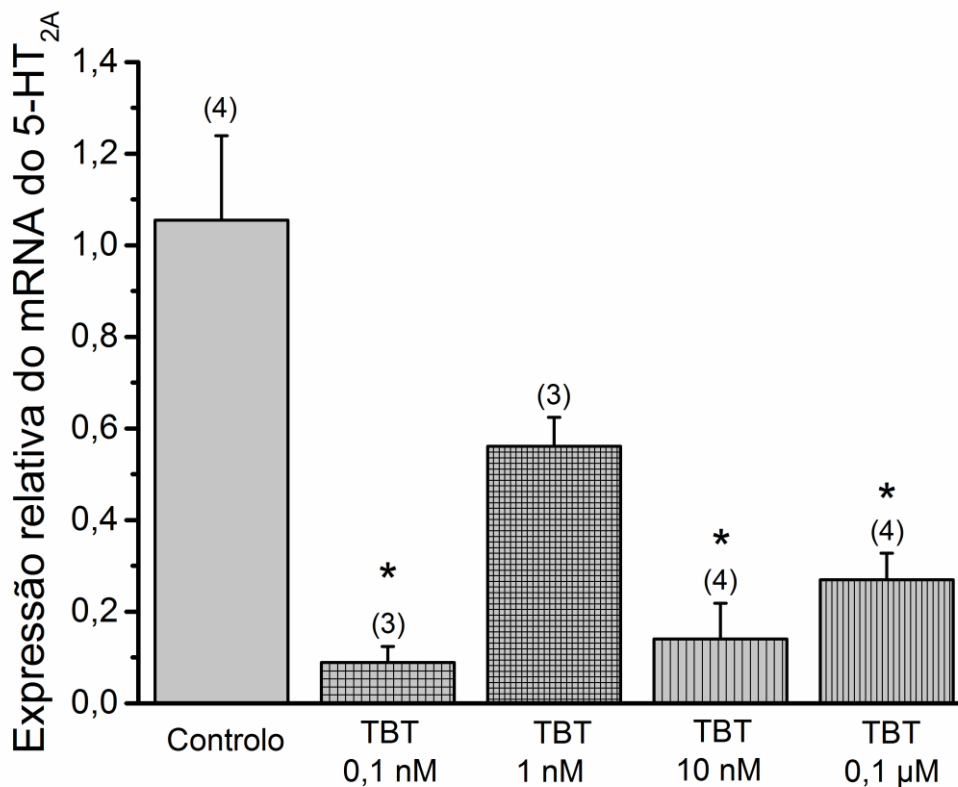


Figura 18 - Comparação da expressão relativa do mRNA do 5-HT_{2A} entre o controlo (n=4 e as diferentes concentrações de TBT (0,1 nM, n=3; 1 nM, n=3; 10 nM, n=4, 0,1 µM, n=4). Os resultados são expressos em média \pm SEM. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. A análise estatística foi realizada por t-student ($p < 0.05$).

Os níveis da expressão do mRNA do 5-HT_{2A} demonstraram significância estatística entre o controlo e as concentrações de TBT 0,1 nM, 10 nM e 0,1 µM, ocorrendo uma notável diminuição da expressão génica, estando o gene sub-regulado nas três concentrações.

1.8.2. Análise da expressão do mRNA do H1

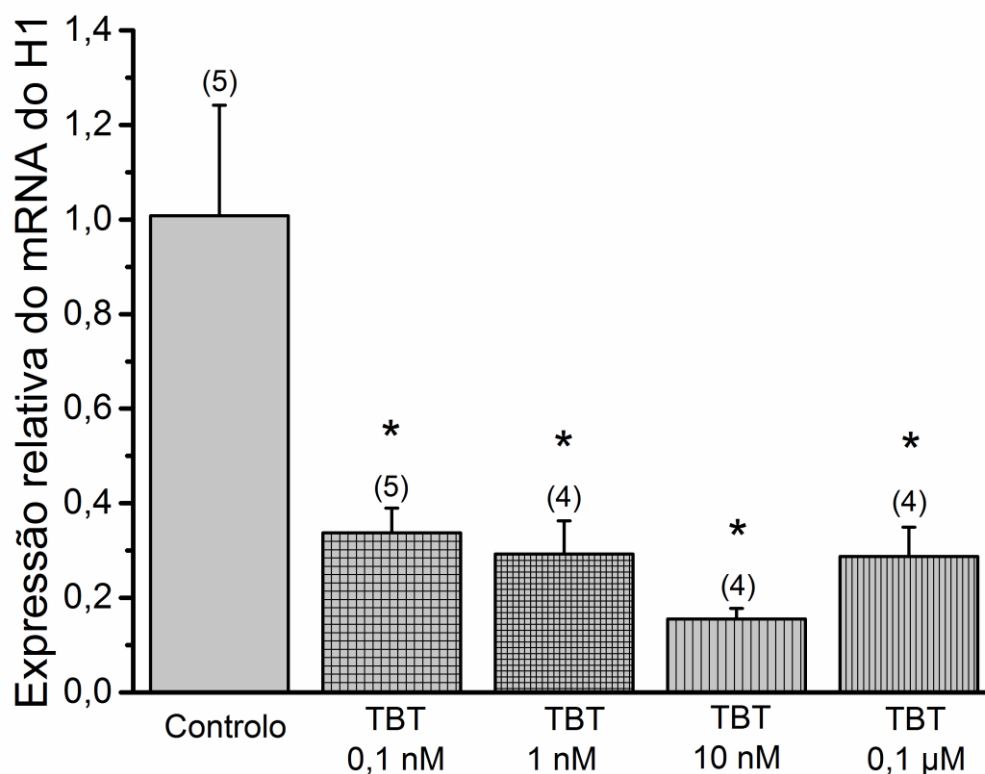


Figura 19 - Comparação da expressão relativa do mRNA do H1 entre o controlo (n=5) e as diferentes concentrações de TBT (0,1 nM, n=5; 1 nM, n=4; 10 nM, n=4, 0,1 μM, n=4). Os resultados são expressos em média ± SEM. Os * representam as diferenças significativas de cada concentração relativamente ao controlo. A análise estatística foi realizada por Oneway ANOVA ($p < 0.05$).

Os níveis de expressão do mRNA do gene H1 demonstraram significância estatística entre o controlo e todas as diferentes concentrações de TBT, mostrando uma notável diminuição da expressão, estando o gene sub-regulado.

CAPÍTULO V - Discussão

Para a concretização do objetivo principal deste trabalho, múltiplos objetivos secundários foram definidos e realizados através de 3 técnicas diferentes, de forma a chegar a resultados concisos e que permitam alcançar uma conclusão final.

A técnica de banho de órgãos permite analisar variados mecanismos contracteis ou relaxantes. A aplicação de agentes contracteis, possibilita a análise do efeito de alguns compostos (como o TBT) sob estas contrações. Para iniciar o estudo sobre o efeito do TBT na contratilidade das HUA foi necessário saber se este composto poderia afetar a contratilidade das artérias, através da análise da contração em base (como descrito anteriormente). Para responder a esta questão, usando a técnica de banho de órgãos, submeteu-se várias amostras de HUA ($n \pm 6$) incubadas 24h com dois controlos diferentes (EtOH 0,1% e DMEM), a concentrações crescentes de TBT e as tensões reais foram registadas. Analisando os dados obtidos tanto para o EtOH como para o DMEM, é possível verificar que a adição das diferentes concentrações de TBT não afetou a tensão real das artérias, isto é, não induziram contração.

Seguidamente, analisou-se o efeito do TBT na contratilidade das HUA sem incubação, com o objetivo de analisar se este composto a curto prazo poderá induzir vasorelaxação. Para o efeito, várias amostras de artéria sem incubação prévia, foram sujeitas aos três agentes contracteis e de seguida a duas condições diferentes: adição sucessiva de EtOH e adição de concentrações crescentes de TBT. A adição de EtOH é o controlo da experiência e serve portanto, como comparação para os dados obtidos para o TBT.

Relativamente às contrações induzidas pelo 5-HT, podemos concluir que o TBT apresenta um pequeno efeito relaxante até à concentração de 10 nM, o qual só é significativo à concentração de 0,1 μM . Podemos ainda dizer que as concentrações mais elevadas de TBT não induziram efeito relaxante.

Perante os dados obtidos para a histamina, denota-se que para o controlo ocorreu um efeito relaxante das artérias sem diferenças significativas. Já para as artérias sujeitas a TBT, ocorreu um efeito relaxante e dependente da concentração, havendo diferenças significativas entre a contração de 0,1 nM e as concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100 μM . Podendo então dizer-se que o TBT, a curto prazo poderá provocar a vasodilatação das HUA contraídas com histamina e esta é dependente da concentração do composto.

Como observado anteriormente na histamina, também na presença de KCl as artérias sujeitas a TBT, apresentaram um efeito relaxante e dependente da concentração. Contudo, as diferenças apresentadas foram entre as concentrações de 0,1 nM, 1 nM e as concentrações de 1 μM , 10 μM e 100 μM . Perante isto, podemos supor que a curto prazo o TBT poderá provocar

vasodilatação das HUA quando contraídas com KCl, e também esta é dependente da concentração do composto.

Posteriormente deu-se seguimento ao estudo dos efeitos do TBT na contratilidade das HUA, cujo objetivo era prever as consequências da exposição ao composto a longo prazo. Estes ensaios passam a ser estudos genómicos, pelo facto da exposição prolongada ao composto puder provocar modificações a nível do genoma. Para isso, várias amostras de artéria foram incubadas 24h com 3 concentrações de TBT (0,1 nM; 0,1 μ M; 100 μ M), sendo estas a mais baixa, a intermédia e a mais alta, e com o controlo, e sujeitas a 3 agentes contrateis (5-HT, histamina e KCl). A segunda parte deste objetivo consistiu em analisar se a exposição a diferentes concentrações de TBT altera o seu efeito a curto prazo, isto é o efeito rápido.

Estudos anteriores demonstraram que existem recetores específicos envolvidos na capacidade contrátil destes 3 agentes. Foi visto que a capacidade contrátil do 5-HT está associada à ativação de dois recetores específicos, o 5-HT_{1B/1D} e 5-HT_{2A} [70] [15] [14]. O recetor 5-HT_{2A} estimula a fosfolipase C, aumentando os níveis do IP₃ e o 5-HT_{1B/1D} está acoplado a proteínas G_i/G_o, as quais inibem a adenilato ciclase. [72] [67] [15] [21] Como visto anteriormente, Santos-Silva et. al demonstrou que os recetores 5-HT_{1B/1D} induzem um efeito duplo sendo que em algumas artérias provocava efeitos contrateis pequenos e em alguns casos contrações maiores eram observadas. [15] Já a capacidade contrátil da histamina é relacionada com a ativação do recetor H₁ que induz contração da HUA pela ativação da fosfolipase C e o aumento dos níveis de IP₃ [73] [15] [21], já a ativação do recetor H₂ provoca aumento da concentração intracelular de cAMP devido à ativação do G_s e consequentemente a relaxação da HUA [15] [15] [14]. Relativamente ao mecanismo envolvido na contração pelo KCl é principalmente devido ao influxo de cálcio pelos canais de cálcio dependentes de voltagem. [67]

Perante estes estudos e realizando a análise dos resultados, verifica-se que: artérias incubadas com 100 μ M de TBT, aquando a adição de 5-HT, não têm capacidade de contrair ou apresentam contrações muito baixas comparativamente com o controlo. Representando uma percentagem de 23,3% das artérias com capacidade contrátil, e 76,6% sem. Estes resultados parecem indicar que pode existir uma alteração no recetor 5-HT_{2A}, passando só a estar ativo o recetor 5-HT_{1B/1D} que corresponde a um efeito duplo.

Verificando as incubações com as concentrações de 0,1 nM e 0,1 μ M, estas não prejudicam a atividade contrátil das artérias, podendo dizer-se que o efeito observado de incapacidade contrátil provocado pelo TBT, está associado a concentrações superiores a 0,1 μ M.

Seguidamente fomos observar se o efeito genómico do TBT também interfere com o efeito rápido. E deparamo-nos com duas diferenças relativamente ao controlo que não são conclusivas podendo tratar-se apenas do facto de existir muita variedade genética nas amostras. Assim concluímos que a exposição ao TBT não influencia a resposta rápida do TBT após contração com serotonina.

Perante este acontecimento foi necessário realizar estudos genéticos para analisar os níveis de expressão do mRNA do 5-HT_{2A}, de maneira a verificar se realmente esta estaria reduzida e de forma a confirmar o facto das artérias no banho de órgãos não terem capacidade contrátil. De acordo com os resultados deparamo-nos com um decréscimo da expressão do gene para as concentrações de 0,1 nM, 10 nM e 0,1 μM estando o gene sub-regulado e sendo estas significativamente diferentes do controlo. Assim, podemos inferir que o TBT altera a capacidade contrátil da serotonina devido a diminuição da expressão do recetor 5-HT_{2A}.

Testando os efeitos do TBT na presença de histamina, verifica-se que as HUA incubadas com as 3 concentrações do composto têm capacidade contrátil semelhante ao controlo.

Seguidamente fomos observar se o efeito genómico do TBT também interfere com o efeito rápido, na presença de histamina, verificou-se que o composto induz uma relaxação dependente da concentração, isto é, a adição das concentrações de TBT aumentam o efeito relaxante. A relaxação máxima foi obtida com a concentração de 100 μM (45%), seguindo-se da concentração de 0,1 μM (40%) e por fim a concentração de 0,1 nM (30%), também o controlo apresentou relaxação (25%). Como referido anteriormente, o recetor H₂ provoca a relaxação da HUA através da estimulação da adenilil ciclase e do aumento do cAMP [15] [15] [14], pelo que na presença dos resultados obtidos é de supor que o TBT provocará uma possível alteração neste recetor ou no seu mecanismo de ação, levando a que ocorra a vasodilatação das HUA. Outra possível explicação para este mecanismo é uma alteração/diminuição do efeito contrátil, isto é uma alteração genómica no recetor H₁.

De forma a chegar mais perto do mecanismo pelo qual o TBT afeta a contratilidade das artérias na presença de histamina realizaram-se estudos genéticos para analisar os níveis de expressão do mRNA do H₁. De acordo com os resultados, deparamo-nos com expressão génica reduzida e estatisticamente diferente do controlo para todas as concentrações analisadas, havendo uma sub-regulação do gene.

Seguidamente fomos observar se o efeito genómico do TBT também interfere com o efeito rápido na presença de KCl, e verificou-se que as HUA incubadas com as 3 concentrações do composto têm capacidade contrátil semelhante ao controlo, podendo então concluir-se que o TBT não parece influenciar a atividade dos canais de cálcio. De seguida pela adição das concentrações crescentes do composto, averiguou-se que ocorreu um pequeno efeito relaxante (cerca de 15%) sendo mais proeminente na concentração de 100 μM, não sendo estatisticamente significativo. Estudos realizados pelo grupo em anéis de artéria aorta de ratos, demonstraram que o TBT provocava a vasorelaxação das artérias contraídas com KCl (dados não publicados).

Sendo que estes estudos nunca foram realizados para este ED neste tipo de amostra e de células, não temos como comparar os nossos resultados, mas foi visto noutros estudos que coelhos expostos a alquiestanhos apresentavam vasodilatação. [93] Estudos realizados por Nath et al. (2008) demonstraram também que complexos de organoestanhos podiam actuar como vasodilatores diretos em células do músculo liso em modelos animais. [87] Dos Santos et al.

(2012) investigaram a influência do TBT na função coronária de ratas fêmeas e foi demonstrado que este composto prejudica a vasodilatação induzida pelo 17 β -estradiol em corações isolados de ratas. [88]

Perante os resultados anteriores, achamos importante realizar testes de viabilidade celular às HUASMC de forma a testar a toxicidade do TBT e a partir de que concentração este composto se torna tóxico para estas células. Para isso, células HUASMC confluentes foram incubadas durante 24h com as diferentes concentrações do composto e submetidas a testes de MTT. Verificou-se que quando submetidas a concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M, as células têm uma viabilidade muito baixa, que vai de cerca de 20% a 30%, podendo-se afirmar que estas são tóxicas para as células musculares lisas. Podemos ainda afirmar que estes resultados estão concordantes com os do banho de órgãos, em que a concentração de 100 μ M apresenta diferenças perante as outras, e também perceber que a toxicidade do composto para estas células ocorre a partir de uma concentração de 1 μ M. Estudos realizados por Rohl et al. (2001) demonstraram citotoxicidade dependente da concentração do TBT, em culturas primárias de astrócitos de ratos, realizados pelo método do MTT. [94]

CAPÍTULO VI - Conclusões e Perspetivas futuras

Este trabalho analisa pela primeira vez os efeitos do TBT a nível vascular em humanos, e contribui para um conhecimento mais aprofundado dos efeitos deste ED a nível vascular

Com a realização deste trabalho foi então demonstrado que:

Uma exposição ao composto, a curto prazo, provoca nas HUA um efeito relaxante e dependente da concentração na presença dos agentes contrateis histamina e KCl.

Relativamente aos efeitos genómicos, verificou-se que numa exposição prolongada a uma concentração de 100 μM de TBT as HUA apresentam um efeito duplo, e o gene 5-HT_{2A} encontra-se sub-regulado apresentando níveis de expressão diminuídos. Já perante o agente contrátil histamina, as HUA apresentam um efeito relaxante e dependente da concentração de TBT, e o gene H₁ encontra-se sub-regulado apresentando níveis de expressão baixos.

Testes de viabilidade celular demonstram que a toxicidade do TBT para as HUASMC ocorre a partir da concentração de 1 μM .

Perante os resultados obtidos várias conclusões são retiradas mas, ainda existe um longo caminho a percorrer nesta área. Futuramente, sugere-se a análise da expressão genética dos recetores envolvidos nos mecanismos da serotonina e da histamina, sendo eles o 5-HT_{1B/1D} e o H₂ de forma a chegar ao mecanismo pelo qual o TBT influencia a atividade destes recetores.

CAPÍTULO VII - Bibliografía

1. Sypecka, J. and A. Sarnowska, *Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors*. Life Sciences, 2015. **139**: p. 24-29.
2. Dudiak, C.M., Salomon, C. G., Posniak, H. V., Olson, M. C., Flisak, M. E., *Sonography of the umbilical cord*. Radiographics, 1995. **15**(5): p. 1035-1050.
3. Togni, F.A., Junior, E. A., Vasques, F. A. P., Moron, A. F., Torloni, M. R., Nardoza, L. M. M., *The cross-sectional area of umbilical cord components in normal pregnancy*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2007. **96**(3): p. 156-161.
4. Oppenheimer, J., *Illustrated Human Embryology. Volume 1: Embryogenesis*. H. Tuchmann-Duplessis, G. David, P. Haegel, Lucille S. Hurley. The Quarterly Review of Biology, 1973. **48**(2): p. 365-366.
5. Wang, H.S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., Chen, C. C., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1330-1337.
6. Cunningham, *Williams obstetrics*. Vol. 24. 2014: McGraw-Hill Education.
7. Kurt Benirschke, G.J.B., Rebecca N Baergen, *Pathology of the Human Placenta*. Vol. 6. 2012: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
8. Skulstad, S.M., Ulriksen, M., Rasmussen, S., Kiserud, T., *Effect of umbilical ring constriction on Wharton's jelly*. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2006. **28**(5): p. 692-698.
9. Lynn Murphy-Kaulbeck, L.D., K.S. Joseph, Michiel Van den Hof, *Single Umbilical Artery Risk Factors and Pregnancy Outcomes*. OBSTETRICS & GYNECOLOGY, 2010. **116**: p. 843-850.
10. Cairrao, E., Santos-Silva, A. J., Alvarez, E., Correia, I., Verde, I., *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.
11. Meyer, W.W., et al., *Structure and closure mechanism of the human umbilical artery*. Eur J Pediatr, 1978. **128**(4): p. 247-59.
12. Sexton, *A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels*. J. Anat., 1996. **188**: p. 75-85.
13. Klabunde, R.E., *Cardiovascular Physiology Concepts*. Vol. 2. 2005: Lippincott
14. Cairrao, E., Alvarez, E., Santos-Silva, A. J., Verde, I., *Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **376**(5): p. 375-83.

15. Santos-Silva, A.J., Cairrao, E., Morgado, M., Alvarez, E., Verde, I., *PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries*. Eur J Pharmacol, 2008. **582**(1-3): p. 102-9.
16. Seeley, T.D.S.P.R., *Anatomy and Physiology*. Vol. 8. 2007: McGraw-Hill.
17. Kao, C.Y., *Cellular Aspects of Smooth Muscle Function*. 2005: Cambridge University Press.
18. Clark, J.F. and G. Pyne-Geithman, *Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction*. Pathophysiology, 2005. **12**(1): p. 35-45.
19. Pfaltzgraff, E., *Heterogeneity in Vascular Smooth Muscle Cell Embryonic Origin in Relation to Adult Structure, Physiology, and Disease*. 2015.
20. Wolf, G., *Cell physiology of vascular smooth muscle cell and mesangial cell and the impact of this on the control of renal circulation*. Vol. 9. 2000: Advances in Organ Biology. 35-61.
21. Cairrao, E., et al., *Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2008. **376**(5): p. 375-83.
22. Ogut, O., *Regulation of force in vascular smooth muscle*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2003. **35**(4): p. 347-355.
23. Hodgkinson, J.L., *Actin and the smooth muscle regulatory proteins: a structural perspective*. J Muscle Res Cell Motil, 2000. **21**(2): p. 115-30.
24. Weymouth, N., Z. Shi, and D.C. Rockey, *Smooth muscle alpha actin is specifically required for the maintenance of lactation*. Dev Biol, 2012. **363**(1): p. 1-14.
25. Arnoldi, R., et al., *Smooth muscle actin isoforms: a tug of war between contraction and compliance*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(6-7): p. 187-200.
26. Hilbert, L., *Molecular Mechanical Differences between Isoforms of Contractile Actin in the Presence of Isoforms of Smooth Muscle Tropomyosin*. PLoS Comput Biol, 2003. **9**(10).
27. Orzechowski, M., et al., *An atomic model of the tropomyosin cable on F-actin*. Biophys J, 2014. **107**(3): p. 694-9.
28. Zimmern, P., *Smooth-Muscle physiology*. Urologic clinics of North America, 1996. **23**.
29. Guo, H., et al., *Ablation of smooth muscle caldesmon affects the relaxation kinetics of arterial muscle*. Pflugers Arch, 2013. **465**(2): p. 283-94.
30. Jiang, Q., *Caldesmon regulates the motility of vascular smooth muscle cells by modulating the actin cytoskeleton stability*. Journal of biomedical Science, 2010. **17**:6.
31. Sirenko, V.V., et al., *Calponin-Like Protein from Mussel Smooth Muscle Is a Competitive Inhibitor of Actomyosin ATPase*. Biochemistry (Mosc), 2016. **81**(1): p. 28-33.
32. Orton, R.J., et al., *Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 2): p. 249-61.
33. Báirány, M., *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. Vol. 1. 1995: Academic Press.

34. Jackson, W.F., *Ion channels and vascular tone*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 173-8.
35. Cribbs, L.L., *T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 221-30.
36. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
37. Guibert, C., T. Ducret, and J.P. Savineau, *Voltage-independent calcium influx in smooth muscle*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. **98**(1): p. 10-23.
38. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 411-25.
39. Bidaud, I. and P. Lory, *Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: a focus on the Timothy mutations in Ca(v)1.2 channels*. Biochimie, 2011. **93**(12): p. 2080-6.
40. Yamakage, M., *Calcium channels - basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels - a review*. Canadian Journal of Anesthesia, 2001. **49**:2: p. 151-164.
41. Ribeiro, M.P., et al., *Isolation of Human Umbilical Arterial Smooth Muscle Cells (HUASMC)*. 2010(41): p. e1940.
42. Xu, S.Z. and D.J. Beech, *TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca²⁺ channels in native vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2001. **88**(1): p. 84-7.
43. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
44. Jackson, W.F., *Potassium channels and regulation of the microcirculation*. Microcirculation, 1998. **5**(2-3): p. 85-90.
45. 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.
46. Sobey, C.G., *Potassium channel function in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 28-38.
47. Cairrao, E., Santos-Silva, A. J., Verde, I., *PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Eur J Pharmacol, 2010. **640**(1-3): p. 94-101.
48. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. **69**(2): p. 247-66.
49. Beverley J. Hunt, L.P., Michael Schachter, Alison W. Halliday, *An introduction to vascular biology*. Vol. 2. 2002: Cambridge University Press.
50. Dietrich, A., et al., *Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(3): p. 744-60.

51. Gao, Y., et al., *Myosin light chain kinase stimulates smooth muscle myosin ATPase activity by binding to the myosin heads without phosphorylating the myosin light chain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **305**(1): p. 16-21.
52. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone*. J Anesth, 2007. **21**(2): p. 220-31.
53. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
54. Hirano, K., *Current Topics in the Regulatory Mechanism Underlying the Ca²⁺ Sensitization of the Contractile Apparatus in Vascular Smooth Muscle*. Journal of Pharmacological Sciences, 2007. **104**(2): p. 109-115.
55. Takizawa, N., N. Niuro, and M. Ikebe, *Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17*. FEBS Lett, 2002. **515**(1-3): p. 127-32.
56. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
57. Akingbemi, B.T., et al., *Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate*. Biol Reprod, 2001. **65**(4): p. 1252-9.
58. Amano, M., et al., *Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase)*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(34): p. 20246-20249.
59. Santos-Silva, A.J., E. Cairrao, and I. Verde, *Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility*. Health, 2010. **2**(4): p. 321-331.
60. Muslin, A.J., *MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets*. Clin Sci (Lond), 2008. **115**(7): p. 203-18.
61. Roux Pp Fau - Roux, P.P. and J. Blenis J Fau - Blenis, *ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions*. (1092-2172 (Print)).
62. Farooq, A. and M.-M. Zhou, *Structure and regulation of MAPK phosphatases*. Cellular Signalling, 2004. **16**(7): p. 769-779.
63. Carvajal, J.A., et al., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. J Cell Physiol, 2000. **184**(3): p. 409-20.
64. Woodrum, D.A. and C.M. Brophy, *The paradox of smooth muscle physiology*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **177**(1-2): p. 135-43.
65. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 247-66.
66. Werner, E.F., et al., *The association between maternal urinary phthalate concentrations and blood pressure in pregnancy: The HOME Study*. Environ Health, 2015. **14**(1): p. 75.

67. Tufan, H., et al., *Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim*. Life Sci, 2003. **72**(12): p. 1321-9.
68. 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.
69. Neubig, R.R., et al., *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(4): p. 597-606.
70. 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.
71. Pauwels, P.J., *Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(12): p. 1743-50.
72. Steinert, J.R., et al., *Preeclampsia is associated with altered Ca²⁺ regulation and NO production in human fetal venous endothelial cells*. Faseb J, 2002. **16**(7): p. 721-3.
73. Hawley, J., P.C. Rubin, and S.J. Hill, *Distribution of receptors mediating phosphoinositide hydrolysis in cultured human umbilical artery smooth muscle and endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 1995. **49**(7): p. 1005-11.
74. Sousa ACA, P.M., Takahashi S, Tanabe S, *History on organotin compounds, from snails to humans*. Environmental Chemistry Letters, 2014. **12**: p. 177-137.
75. Åke Bergman, J.J.H., Susan Jobling, Karen A. Kidd, Zoeller RT, *WHO (2013) State of the science of endocrine disrupting chemicals*. United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 2013: p. ISBN 978-92-807-3274-0.
76. Andrea C. Gore, P., et al., *Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs)*. 2014: IPEN.
77. Antizar-Ladislao, B., *Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review*. Environment International, 2008. **34**(2): p. 292-308.
78. Pagliarani, A., S. Nesci, and V. Ventrella, *Toxicity of organotin compounds: shared and unshared biochemical targets and mechanisms in animal cells*. Toxicol In Vitro, 2013. **27**(2): p. 978-90.
79. Matthiessen P, G.P., *Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998. **17**: p. 37-43.
80. SMITH, B.S., *SEXUALITY IN THE AMERICAN MUD SNAIL, NASSARIUS OBSOLETUS SAY*. Journal of Molluscan Studies, 1971. **39**(5): p. 377-378.
81. Goldberg, E., *TBT: an environmental dilemma*. Environment ENTVAR, 1986. **28**: p. 17-20.

82. Cao, Q.Z., Zhu, P., Yuan, J., Zhang, X.L., Liu, J., Huang, M.S., Shi, H.H., *Effects of tributyltin on mRNA expressions of thyroid hormone response genes in Xenopus tropicalis tadpoles*. Journal of East China Normal University, 2011. **6**: p. 65-74.
83. Zhang, J., Zuo, Z., He, C., Wu, D., Chen, Y., Wang, C., *Inhibition of thyroidal status related to depression of testicular development in Sebasticus marmoratus exposed to tributyltin*. Aquatic Toxicology 2009. **94**: p. 62-67.
84. Cooke, G.M., Tryphonas, H., Pulido, O., Caldwell, D., Bondy, G.S., Forsyth, D., *Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1. Toxicology, histopathology and clinical chemistry*. Food Chemistry and Toxicology, 2004. **42**: p. 211-220.
85. Grün F, B.B., *Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling*. Endocrinology, 2006. **147**: p. s50-s55.
86. Sousa ACA, P.M., Takahashi S, Tanabe S., *Organotin Compounds from Snails to Humans.*, in *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling*, S.J. Lichtfouse E, Robert D, Editor. 2013, Springer International Publishing: Switzerland. p. 215-275.
87. Nath, M., *Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: a review*. Applied Organometallic Chemistry, 2008. **22**(10): p. 598-612.
88. dos Santos, R.L., et al., *Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in isolated rat heart*. J Toxicol Environ Health A, 2012. **75**(16-17): p. 948-59.
89. Rodrigues, S.M., et al., *Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats*. Toxicol Lett, 2014. **225**(3): p. 378-85.
90. Botelho, G., et al., *Effect of tributyltin on mammalian endothelial cell integrity*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2015. **176-177**: p. 79-86.
91. Bernardini, C., et al., *Deleterious effects of tributyltin on porcine vascular stem cells physiology*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2016. **185-186**: p. 38-44.
92. Kenneth, J.L., T. D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta C_t$ method*. Methods, 2001. **25**: p. 402-408.
93. Nath, M., *Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: a review*. Applied Organometallic Chemistry, 2008. **22**: p. 98-612.
94. C. Rohl, M.G.a.H.S., *Toxicity of organotin compounds in primary cultures of rat cortical astrocytes*. Cell Biology and Toxicology, 2001. **17**: p. 23-32.