



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Isolamento, cultura e caracterização de células musculares lisas derivadas da artéria cerebral média de rato

Patrícia Alexandra Silveira Quelhas

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

Orientador: Prof^a. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues
Coorientador: Prof^a. Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

Covilhã, outubro de 2017

Aos meus pais e irmão

“Alguns homens vêem as coisas como são, e perguntam ‘Porquê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e pergunto ‘Porque não?’”

George Bernard Shaw

Agradecimentos

Em primeiro lugar expresso o meu profundo agradecimento à Professora Doutora Elisa Cairrão pela oportunidade de desenvolver este projeto e por toda a orientação, apoio e dedicação que demonstrou ao longo deste trabalho. Agradeço ainda todo o conhecimento que me transmitiu, que me ajudou a crescer como investigadora e do qual irei usufruir no futuro.

À Professora Doutora Graça Baltazar quero agradecer toda a orientação, atenção e paciência no desenrolar deste projeto. Saliento o apoio prestado e a forma interessada com que acompanhou a realização deste trabalho. As suas discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso e no desenvolvimento do meu sentido crítico.

Às minhas colegas de laboratório, Julieta, Melissa e Joana agradeço toda a paciência e atenção para comigo, bem como os momentos de aprendizagem e amizade partilhados. A todos os restantes colegas de laboratório agradeço os momentos de alegria e diversão. Um obrigado especial à Catarina, Nádía e Margarida por todos os momentos de companheirismo e amizade partilhados.

Aos meus Pais quero agradecer tudo aquilo que sou hoje. Mais do que a educação formal, se há algo que faz a diferença na vida e personalidade de uma pessoa é o amor. Obrigada por todo o amor e carinho e por fazerem os possíveis e impossíveis para me tornar a pessoa que sou hoje, uma pessoa capaz de seguir os seus sonhos.

Ao meu irmão Renato agradeço todo o amor, carinho e alegria que me deu nos momentos mais difíceis. Por ser um bom ouvinte e conselheiro e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço ainda a toda a família restante que me apoiou nesta fase tão importante, em especial à minha avó Conceição por ser um exemplo de força e perseverança e por sempre me amar e apoiar.

A todos os meus amigos que tornaram este ano mais leve, divertido e alegre, o meu muito obrigado. Destes destaco a minha amiga de coração, Margarida. Obrigada por seres a minha ouvinte nas horas de desabafo, por sempre me aconselhares com o que é certo e não com o que é fácil e por continuares a ser a pessoa com que sempre posso contar.

E por fim, o meu profundo agradecimento ao meu namorado e melhor amigo, Pedro. Obrigada por todo o apoio, amor, carinho e alegria que me dás todos os dias. Por acreditares sempre em mim mesmo quando eu não acredito, pelos conselhos que me dás, por seres o meu porto seguro e por nunca me deixares desistir. Obrigada por estares sempre presente e por me fazeres tão feliz.

Resumo

Embora o cérebro represente apenas 2% da massa corporal do ser humano consome cerca de 20% da energia do organismo. Este apresenta um armazenamento de energia limitado, tornando o correto funcionamento do suprimento sanguíneo de grande importância, pois é este que fornece todo o oxigênio e glicose necessário ao desempenho das suas funções. A irrigação sanguínea cerebral é feita a partir das duas artérias carótidas internas e das artérias vertebrais. Uma das artérias mais importantes é a artéria cerebral média, que deriva da carótida interna e recebe cerca de 60 a 80% do fluxo sanguíneo proveniente da mesma.

Os principais componentes das artérias são as células musculares lisas, consideradas as principais reguladoras do tônus vascular, do diâmetro dos vasos sanguíneos, pressão sanguínea e do fluxo sanguíneo. A sua principal função é a contração e o seu mediador principal o cálcio. Tendo em consideração o enorme impacto social e econômico que as doenças cerebrovasculares têm na sociedade ocidental é da maior importância desenvolver modelos experimentais que facilitem o estudo destas patologias. A informação atualmente disponível sobre o funcionamento das artérias cerebrais, e sobre as células que as constituem, é bastante escassa. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo *in vitro* de células musculares lisas derivadas da artéria cerebral média de rato.

Foram recolhidos explantes da artéria cerebral média de rato os quais foram aderidos a placas de cultura revestidas com colagénio. A partir destes explante foram obtidas células com morfologia típica de células musculares. Estas células expressavam a proteína α -actina, característica do fenótipo contrátil. Para além disso as células presentes na cultura não expressaram marcadores endoteliais. Para avaliar a funcionalidade destas células foi analisada a resposta aos agentes contráteis, serotonina e noradrenalina e ao agente relaxante, nitroprussiato de sódio, através da técnica de *Plannar Cell Surface Area*. Os resultados obtidos indicaram que as células se mantinham funcionais *in vitro*, contraindo em resposta à serotonina e noradrenalina e relaxando em resposta ao nitroprussiato de sódio. Assim, em conjunto os dados obtidos indicam que a cultura implementada pode ser utilizada como modelo para caracterização e estudo do comportamento funcional da artéria cerebral média, bem como estudos da interação entre o sistema vascular e neuronal.

Palavras-chave

Artéria cerebral média; células musculares lisas; doenças cerebrovasculares; cultura celular; contratilidade

Abstract

The human brain represents only 2% of the body mass, although it uses around 20% of the organism energy. It has a limited energy storage, making correct functioning of the blood supply of great importance, because it is this that provides all the oxygen and glucose necessary to perform its functions. The cerebral blood supply is made from the two internal carotid arteries and the vertebral arteries. One of the most important arteries is the middle cerebral artery, which derives from the internal carotid artery and receives about 60 to 80% of the blood flow from it.

The main components of the arteries are smooth muscle cells, which are considered the main regulators of vascular tone, blood vessel diameter, blood pressure and blood flow. The main function of smooth muscle cells is contraction and its main mediator is calcium. Taking into account the enormous social and economic impact of cerebrovascular diseases in Western society, it is of the utmost importance to develop experimental models that allows the study of these pathologies. The information currently available on the functioning of the cerebral arteries, and on the cells that make part of them, is greatly reduced. Thus, the aim of this work was to develop an in vitro model of smooth muscle cells derived from rat middle cerebral artery.

Explants were collected from rat middle cerebral artery and then adhered to collagen-coated culture dishes. From this explants were obtained cells with typical muscle cell morphology. These cells expressed the α -actin protein, characteristic of the contractile phenotype. In addition, cells in culture did not express endothelial markers. To evaluate the functionality of these cells the response to contractile agents, serotonin and noradrenaline, and to relaxing agent, sodium nitroprusside was analyzed by Plannar Cell Surface Area technique. The obtained results indicated that cells in vitro remained functional, contracting in response to serotonin and noradrenaline and relaxing in response to sodium nitroprusside. Together the data obtained show that the implemented culture can be used as a model for characterization and study of functional behavior of the middle cerebral artery, as well as interaction studies between vascular and neuronal system.

Keywords

Middle cerebral artery; smooth muscle cells; cerebrovascular diseases; cell culture; contractility

Índice

Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos	xxi
1 Introdução	3
1.1 Unidade Neurovascular.....	3
1.1.1 Principais Componentes da UNV	4
1.1.1.1 Neurónios	4
1.1.1.2 Astrócitos	5
1.1.1.3 Células Endoteliais	6
1.1.1.4 Células Musculares Lisas	7
1.1.1.4.1 Mecanismos envolvidos no processo contrátil.....	8
1.1.1.4.2 Mecanismos envolvidos no processo de relaxamento	13
1.1.2 Disrupções na Unidade Neurovascular.....	17
1.2 Sistema Vascular Cerebral	18
1.2.1 Artéria Cerebral Média	19
1.2.2 Estrutura dos Vasos Sanguíneos Cerebrais	20
2 Objetivos	25
3 Materiais e Métodos	29
3.1 Cultura Celular de SMC	29
3.2 Ensaio de Imunocitoquímica.....	30
3.3 Ensaio de <i>Planar Cell Surface Area</i> (PCSA).....	31
3.4 Análise Estatística	32
4 Resultados	35
4.1 Caracterização da cultura primária de células musculares obtida	35
4.1.1 Avaliação da pureza da cultura primária obtida.....	35
4.2 Avaliação da funcionalidade das células em cultura.....	38
4.2.1 Resposta celular à ação de agentes contráteis	38
4.2.1.1 Serotonina	38
4.2.1.2 Noradrenalina	39
4.2.1.3 Perfil temporal da contração induzida pela 5-HT e NA.....	40
4.2.2 Resposta celular à ação do agente relaxante - SNP	40

5	Discussão	45
6	Conclusão e Perspetivas Futuras	53
7	Referências Bibliográficas	57

Lista de Figuras

Figura 1. Componentes principais da Unidade Neurovascular.....	4
Figura 2. Mecanismos de regulação do TRPM4 e consequente contração	10
Figura 3. Principais Artérias Cerebrais	19
Figura 4. Artéria Cerebral Média e as suas principais ramificações.....	20
Figura 5. Representação das três camadas e respetivos constituintes dos vasos cerebrais ...	21
Figura 6. Principais diferenças entre as artérias extracranianas e intracranianas	22
Figura 7. Cérebro de um rato adulto	29
Figura 8. Cultura primária de SMC obtida a partir do explante da artéria cerebral média	35
Figura 9. Caracterização e avaliação da pureza da cultura primária de SMC	37
Figura 10. Imagem representativa de uma imunocitoquímica em que as células foram marcadas com anti-vWF	38
Figura 11. Efeito da 5-HT (1 μ M) nas SMC	39
Figura 12. Efeito da NA (1 μ M) nas SMC	39
Figura 13. Perfil temporal da contração induzida por 5-HT e NA (1 μ M)	40
Figura 14. Efeito do SNP (1 μ M) nas SMC pré-contraídas com serotonina (1 μ M) e noradrenalina (1 μ M)	41

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Soluções utilizadas nos processos experimentais da cultura celular e PCSA 30
- Tabela 2.** Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de Imunocitoquímica. .. 31

Lista de Acrónimos

[Ca ²⁺] _i	Concentração de Cálcio intracelular
20 - HETE	Ácido 20-hidroxicosetetranoico
5-HT	5-hidroxitriptamina ou Serotonina
ANV	Acoplamento Neurovascular
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira Hematoencefálica
BK	Canais de K ⁺ de alta condutância ativados pelo Ca ²⁺
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
Ca _v 1.2	Canais de Cálcio dependentes da voltagem do tipo-L
Ca _v 3.2	Canais de Cálcio dependentes da voltagem do tipo-T
DAG	Diacilglicerol
EET	Ácido eicosatrienoico
ERK 1/2	Cinase regulada por sinais extracelulares (do inglês <i>Extracellular signal-regulated Kinases</i>)
FBS	Soro Fetal Bovino (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
IP3	1,4,5 - Inositol Trifosfato
K _{2P}	Canais de Potássio de domínio 2 poros em tandem
K _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis ao ATP
Kca	Canais de Potássio ativados pelos Cálcio
Kir	Canais de Potássio Retificadores de Influxo
Kv	Canais de Potássio dependentes da voltagem
LEE	Lâmina Elástica Externa
LEI	Lâmina Elástica Interna
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCC	Meio de Cultura Completo
mitoK _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis ao ATP mitocondriais
NA	Noradrenalina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS-T	PBS contendo 0,1% de Tween
PCSA	<i>Planar Cell Surface Area</i>
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína Quinase dependente de cAMP (do inglês <i>cAMP dependent Protein Kinase</i>)
PKC	Proteína Quinase C (do inglês <i>Protein Kinase C</i>)

PLC	Fosfolipase C (do inglês <i>Phospholipase C</i>)
RS	Retículo Sarcoplasmático
RyR	Recetores de Rianodina
SAA	Solução antibiótico-antimicótico
SMC	Célula Muscular Lisa (do inglês <i>Smooth Muscle Cell</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Nitroprussiato de Sódio (do inglês <i>Sodium Nitroprusside</i>)
TRP	Canais recetores de potencial transitório (do inglês <i>Transient Receptor Potential Channels</i>)
UNV	Unidade Neurovascular
VDCC	Canais de Ca ²⁺ dependentes da voltagem (do inglês <i>Voltage-dependent calcium channels</i>)
V _m	Potencial de Membrana
α-SMA	α-actina do músculo liso

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução

1.1 Unidade Neurovascular

O cérebro representa apenas 2% da massa corporal do ser humano no entanto, em repouso, consome cerca de 20% da energia do organismo (Andreone et al., 2015). Este apresenta um armazenamento de energia limitado, levando com que o correto funcionamento da corrente sanguínea seja de grande importância, pois é esta que lhe fornece todo o oxigênio e glucose que necessita para o desempenho das suas funções (Venkat et al., 2016).

Para além de necessitar de energia, o cérebro também requer um ambiente bastante controlado, livre de toxinas e agentes patogénicos, de forma a garantir a composição química adequada para a transmissão sináptica, fundamental à sobrevivência. Este ambiente é controlado pela barreira hematoencefálica (BHE) que é caracterizada por uma fina camada contínua de células endoteliais que revestem as paredes dos vasos sanguíneos do sistema nervoso central (SNC) e que controlam o fluxo de substâncias entre o cérebro e a corrente sanguínea (Andreone et al., 2015). A BHE faz parte de uma unidade fisiológica chamada Unidade Neurovascular (UNV). A UNV engloba as células endoteliais constituintes da BHE, pericitos, células musculares lisas, astrócitos, neurónios (Jullienne and Badaut, 2013) e componentes da matriz extracelular (Muoio et al., 2014). Esta unidade fisiológica está envolvida num dos mecanismos mais importantes de regulação do fluxo sanguíneo cerebral, a hiperemia (Muoio et al., 2014). A hiperemia é o mecanismo a partir do qual o fluxo sanguíneo microscópico é regulado num determinado local, assegurando que a distribuição de oxigênio e nutrientes é a necessária consoante a atividade nos diferentes setores cerebrais e é um mecanismo ativado em situações fisiológicas, como a leitura, o cálculo ou outro tipo de atividades mentais (Muoio et al., 2014).

As células constituintes da UNV interagem continuamente entre si resultando numa regulação precisa da perfusão do tecido cerebral e da homeostasia, levando a uma correta hiperemia (Figura 1). A comunicação entre estas células dá-se através de moléculas de adesão como as caderinas e integrinas que, em conjunto com canais iónicos facilitam o influxo e efluxo de iões como o cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+) e de neuromoduladores como a adenosina trifosfato (ATP) (Muoio et al., 2014) contribuindo desta forma para um sistema de alta eficiência de regulação da corrente sanguínea cerebral.

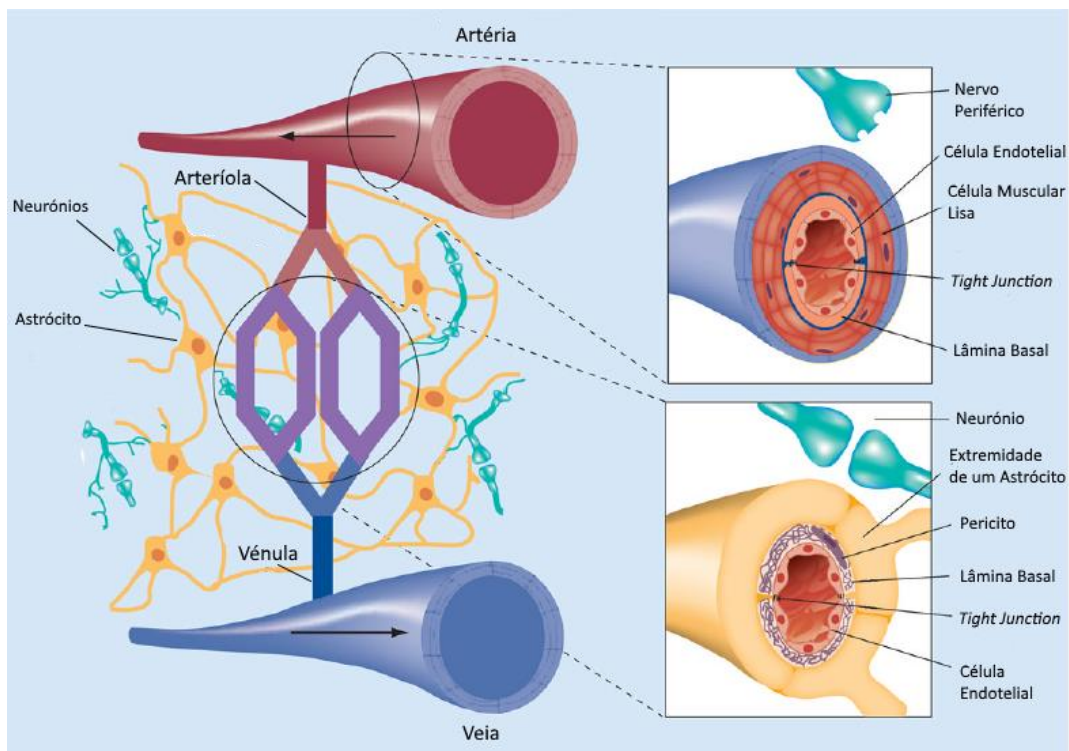


Figura 1. Componentes principais da Unidade Neurovascular. Os principais componentes desta unidade são as células endoteliais e musculares, constituintes das artérias, neurónios e astrócitos. Observa-se a interação contínua dos astrócitos e neurónios com os vasos sanguíneos de maior e menores dimensões. Adaptado de (Jullienne and Badaut, 2013).

1.1.1 Principais Componentes da UNV

1.1.1.1 Neurónios

Os neurónios são considerados a unidade básica do sistema nervoso, responsáveis por todos os impulsos nervosos que comandam o organismo do ser humano. São células muito sensíveis, capazes de detetar variações muito pequenas na quantidade de nutrientes e oxigénio disponíveis. Através de sinais elétricos e químicos comunicam com neurónios adjacentes e astrócitos, passando desta forma as mensagens necessárias por todo o cérebro (Muio et al., 2014).

Ocorre também uma interação entre neurónios e os vasos sanguíneos. Esta comunicação envolve os astrócitos, influenciando o tónus vascular e conseqüentemente o fornecimento de sangue para a área circundante (Muio et al., 2014).

Esta comunicação entre a atividade neuronal e o fluxo sanguíneo é chamada de Acoplamento Neurovascular (ANV) e é este que permite com que a corrente sanguínea seja regulada com variações pontuais correspondentes à atividade funcional na área cerebral respetiva (Andreone et al., 2015). Estudos recentes, em humanos e roedores mostraram que o ANV só é funcional algumas semanas após o nascimento (três semanas nos roedores e sete/oito semanas nos humanos) e que a ausência de ANV implica que, durante o desenvolvimento pós-natal, o cérebro dependa de outros mecanismos para regular o suprimento de oxigénio e de nutrientes (Andreone et al., 2015). Um exemplo desses

mecanismos é a atividade neuronal. Esta afeta, diretamente a angiogénese através da libertação de neurotransmissores e de fatores de crescimento ou, indiretamente através de vias dependentes da ativação neuronal que envolvem interneurónios e células gliais (Andreone et al., 2015). Neurónios e astrócitos são capazes de libertar mediadores vasoativos que vão controlar o tónus vascular e o fluxo sanguíneo, bem como o correto desenvolvimento da vasculatura, necessária para um ANV funcional (Andreone et al., 2015).

1.1.1.2 Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais mais comuns no SNC. Elas apresentam diversos processos que estão em contacto tanto com as sinapses neuronais como com a vasculatura cerebral (Mishra, 2016). A nível das sinapses, estando estes em contacto com todas as partes dos neurónios (soma, dendrites, axónios e terminais sinápticos) formam uma barreira física chamada sinapse tripartida que limita a difusão de neurotransmissores na fenda sináptica (Liu and Chopp, 2016). Também controlam os níveis de neurotransmissores removendo o potássio acumulado durante a atividade neuronal, controlando desta forma a homeostase iónica (Filosa et al., 2016), removem o glutamato, limitando o seu efeito excitotóxico e convertem-no em glutamina, libertam ainda uma série de moléculas neuroatrativas como a D-Serina, ATP, adenosina, GABA, prostaglandinas, proteínas e péptidos que são capazes de regular a atividade e expressão de recetores nos neurónios pós-sinápticos (Liu and Chopp, 2016).

Vários estudos demonstram a importância dos astrócitos e os papéis cruciais que desempenham no funcionamento do cérebro, tais como na regulação da excitabilidade neuronal, no transporte de glucose dos vasos sanguíneos para os neurónios, na integração de informação para neurónios distantes, no controlo do fluxo sanguíneo (Mishra, 2016) e na regulação do tónus cerebrovascular (Filosa et al., 2016), sendo esta última função um tema bastante controverso. Alguns estudos afirmam que os astrócitos desempenham um papel vasodilatador enquanto outros demonstram possíveis ações vasoconstritoras levantando-se desta forma novas questões quanto às vias de sinalização existentes na unidade neurovascular e quanto à possibilidade da existência de subpopulações de astrócitos com diferentes características e funções (Filosa et al., 2016). Alguns autores sugerem que os astrócitos conseguem responder à atividade neuronal alterando a concentração de cálcio intracelular através da libertação de gliotransmissores e fatores tróficos, alguns dos quais vão agir no sentido de alterar o tónus vascular através da regulação de canais de K^+ , resultando numa hiperpolarização das células musculares lisas e consequente vasodilatação arterial. No entanto, outros estudos sugerem que os astrócitos são capazes de sintetizar e libertar agentes vasoativos como o ácido 20-hidroxiicosatetranóico (20-HETE) (Mishra, 2016) o qual exerce um papel vasoconstritor.

1.1.1.3 Células Endoteliais

As células endoteliais do SNC são os elementos fundamentais da BHE (Andreone et al., 2015). A função de barreira pode subdividir-se em três características principais: barreira física, barreira transportadora e barreira metabólica (Badaut and Bix, 2014).

A nível da barreira física, as células endoteliais encontram-se unidas por dois complexos juncionais diferentes que impedem a passagem de iões e nutrientes entre as células: *junções oclusivas*, compostas por claudinas e ocludinas, e *junções aderentes* (Badaut and Bix, 2014). Já na barreira transportadora as células endoteliais são compostas por proteínas específicas de transporte localizadas nas membranas luminal e apical (Badaut and Bix, 2014). Estas são responsáveis pela entrega de nutrientes, como a glucose, aminoácidos e iões metabólicos e pela remoção de metabolitos e substâncias neurotóxicas (Andreone et al., 2015). As células endoteliais do SNC expressam dois tipos de transportadores principais, os de efluxo e os específicos para nutrientes. Os transportadores de efluxo estão encarregues do transporte de uma ampla variedade de moléculas lipofílicas que de outro modo poderiam difundir-se através da membrana para o sangue (Daneman and Prat, 2015). Os transportadores específicos para nutrientes facilitam o transporte de nutrientes através da BHE para o SNC e removem os produtos tóxicos do SNC para o sangue (Daneman and Prat, 2015). Para além desta regulação feita pelos transportadores, nestas células existe um outro mecanismo regulatório de transporte, a transcitose, que facilita a passagem de proteínas maiores e de péptidos ao longo da BHE, como por exemplo a insulina e albumina (Badaut and Bix, 2014) mas que, em comparação com células endoteliais periféricas, ocorre em taxas muito baixas restringindo desta forma o movimento de solutos (Daneman and Prat, 2015). A barreira metabólica da BHE é uma combinação de enzimas intra e extracelulares, como a P450 e a monoaminaoxidase que inativam moléculas capazes de penetrar nas células endoteliais cerebrais (Badaut and Bix, 2014).

A nível do tónus vascular cerebral, as células endoteliais desempenham também um papel regulador bastante ativo, através da produção de fatores tróficos e vasoativos tanto vasodilatadores, como o óxido nítrico, como vasoconstritores, tais como a endotelina e tromboxano (Muio et al., 2014).

Apesar de serem componentes de todos os vasos sanguíneos cerebrais, existem variações na expressão proteica nas células endoteliais, dependendo do tipo de vaso em que se encontram (Badaut and Bix, 2014). Alguns estudos analisaram a taxa de transcitose, a organização dos complexos juncionais e a expressão de algumas enzimas como a Na^+/K^+ ATPase e concluíram que diferia entre arteríolas, capilares e vénulas (Badaut and Bix, 2014). Os transportadores também variam ao longo da vasculatura e esta variação pode depender da atividade sináptica. Após lesões cerebrais é provável que o endotélio vá reagir de forma diferente nas artérias, capilares e veias e também entre diferentes regiões cerebrais dependendo do fenótipo presente no início da lesão (Badaut and Bix, 2014).

1.1.1.4 Células Musculares Lisas

As células musculares lisas (SMC) fazem parte das paredes dos vasos sanguíneos cerebrais e contribuem para o tónus vascular e para a regulação do diâmetro dos vasos sanguíneos, pressão sanguínea e distribuição do fluxo sanguíneo (Badaut and Bix, 2014). Para além disso, durante o desenvolvimento vascular, as SMC contribuem para a secreção de moléculas que constituem a matriz extracelular, como o colagénio, importante nas propriedades mecânicas dos vasos sanguíneos (Badaut and Bix, 2014).

Na parede vascular estão presentes dois tipos de SMC, as sintéticas e as contráteis. O rácio entre estes dois tipos é alterado pelo ambiente vascular o qual varia com as situações fisiológicas. O fenótipo das SMC é alterado ainda em resposta a lesões cerebrais (Badaut and Bix, 2014). As SMC contráteis apresentam uma forma alongada, fusiforme e formam um aparelho contrátil com filamentos compostos com proteínas contráteis. As SMC sintéticas contêm um número elevado de organelos envolvidos na síntese proteica e apresentam uma taxa de crescimento e de migração maior que as SMC contráteis (Badaut and Bix, 2014). Quando em cultura e ao serem mantidas por um período de 24 horas em meio sem soro estas células exibem maioritariamente o fenótipo contráctil (Cairrão et al., 2009; Rensen et al., 2007).

As SMC, quando diferenciadas nos vasos sanguíneos adultos, proliferam numa taxa extremamente baixa e apresentam baixa atividade sintética, expressando um largo reportório de canais iónicos, de moléculas de sinalização e de proteínas contráteis, como a actina, miosina e calponina, necessárias à função contrátil das SMC (Badaut and Bix, 2014). É o seu fenótipo bem diferenciado, predominante nos vasos sanguíneos, que permite a correta regulação do fluxo e pressão sanguínea (Contard et al., 1993). As isoformas proteicas maioritariamente presentes no estado contrátil, e que são expressas em diversas espécies, como humanos, roedores e coelhos, são a α -actina e a miosina de cadeia pesada (Contard et al., 1993). A α -actina é expressa exclusivamente pelas SMC e outras células derivadas, como pericitos e células justaglomerulares, embora existam estudos que demonstram a sua expressão em estágios iniciais de diferenciação de miócitos cardíacos (Oishi et al., 2002).

A principal função das SMC é a contração e o seu mediador principal é o cálcio. No citosol, o cálcio liga-se à calmodulina criando o complexo cálcio-calmodulina que ativa a quinase de cadeia leve da miosina, uma enzima que fosforila as cadeias leves da miosina na presença de ATP (Yang et al., 2003). Esta fosforilação forma pontes cruzadas entre a cabeça da miosina e os filamentos de actina, criando a força necessária para que o músculo contraia (Yang et al., 2003). Como os filamentos de actina estão acoplados à membrana celular através de um sistema viscoelástico, variações nestes filamentos levam à alteração do comprimento da célula (Yang et al., 2003).

A elevação crônica da pressão sanguínea resultante de um tônus arterial elevado provoca lesões em diversos órgãos podendo levar à ocorrência de acidentes vasculares cerebrais (AVC), doenças cardiovasculares e doenças renais (Brenner et al., 2000). Torna-se então importante entender quais as moléculas envolvidas na regulação do tônus arterial de forma a desenvolver terapias mais eficazes e de combate a estas doenças.

1.1.1.4.1 Mecanismos envolvidos no processo contrátil

A nível cerebral, o fluxo sanguíneo é mantido relativamente constante, embora ocorram flutuações pontuais de pressão entre os 60 e 150 mmHg devido às propriedades miogénicas das artérias (Purkayastha and Raven, 2011). As artérias cerebrais dilatam ou contraem em resposta a diversos estímulos, como por exemplo variações na pressão arterial sistémica, na pressão de dióxido de carbono e oxigénio, no pH extracelular e na atividade metabólica cerebral (Yu et al., 2014).

A contração nas SMC pode ser iniciada por estímulos mecânicos, elétricos e químicos e, consoante o tipo de estímulo, diferentes vias de transdução de sinal e mecanismos contráteis são ativados (Yang et al., 2003). No entanto, embora os mecanismos sejam diferentes, todos levam a um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (Yang et al., 2003). Este aumento pode ser feito de duas formas distintas: através de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (VDCC) presentes na membrana plasmática e através da libertação de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares (como o retículo sarcoplasmático) (Yang et al., 2003).

A. *Despolarização da Membrana Celular*

Os canais iónicos presentes nas SMC são importantes na regulação do fluxo sanguíneo cerebral, uma vez que a variação da concentração iónica durante a atividade neuronal modula o potencial de membrana (V_m) que vai exercer um forte efeito no diâmetro das artérias (Longden et al., 2016). Quando ocorre um aumento gradual da pressão intravascular, ocorre uma despolarização, aumentando o Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e consequente vasoconstricção (Longden et al., 2016). Em contrapartida, a hiperpolarização causa vasodilatação. A despolarização/vasoconstricção causada pelo aumento da pressão é chamada de “resposta miogénica” e é uma propriedade de resistência intrínseca das arteríolas, importante para a autorregulação cerebral, onde os vasos contraem ou relaxam de forma a manter um nível constante da perfusão cerebral apesar de variações na pressão arterial periférica (Brayden et al., 2013; Longden et al., 2016). A regulação miogénica é também importante para definir o tônus basal a partir do qual as arteríolas contraem ou dilatam em resposta aos fatores libertados durante a atividade neuronal (Longden et al., 2016).

Existe uma relação muito direta entre o V_m das SMC e o tônus basal nos vasos sanguíneos, uma vez que variações muito pequenas no V_m leva a alterações significativas na contração arterial (Liu et al., 2002). Para gradientes iónicos fisiológicos normais, as artérias cerebrais

apresentam um V_m de aproximadamente -45 mV (Gonzales and Earley, 2013). Na membrana das SMC estão presentes canais permeáveis a cátions (influxo de Ca^{2+} e Na^+) e aniões (efluxo de Cl^-) que medeiam a despolarização da membrana, no entanto o mecanismo através do qual ocorre ainda não está totalmente esclarecido (Gonzales and Earley, 2013).

❖ Canais Recetores de Potencial Transitório

Os canais recetores de potencial transitório (TRP) são uma família de canais catiónicos não dependentes da voltagem e maioritariamente permeáveis ao Ca^{2+} que respondem a uma grande variedade de estímulos químicos e físicos (Grayson et al., 2017). São divididos em três famílias principais, TRPV (vaniloide), TRPC (canónico) e TRPM (melastatina) (Brayden et al., 2008). Um membro dos TRPM, o TRPM4, foi descrito como um regulador importante das SMC das artérias cerebrais, influenciando o V_m e a contratilidade celular (Earley, 2013). Estudos demonstram que a atividade dos canais TRPM4 são determinantes para a regulação do V_m de repouso, para a vasoconstrição induzida pelo aumento da pressão e para a autorregulação do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais (Earley, 2013). A inibição da expressão dos TRPM4 nas artérias cerebrais resulta numa redução substancial na despolarização da membrana das SMC e da vasoconstrição, acompanhada de um aumento da pressão intravascular (Earley and Brayden, 2015).

Relativamente à família dos TRP, o TRPM4 é único devido à sua fraca permeabilidade ao cálcio (Brayden et al., 2008) e elevada permeabilidade a cátions monovalentes (sódio e potássio), podendo desta forma regular a despolarização da membrana e consequentes funções celulares (Earley and Brayden, 2015). A sensibilidade ao Ca^{2+} dos TRPM4 é regulada por diversas vias intracelulares, tendo sido já demonstrado que este canal apresenta vários locais de ligação para os diferentes intervenientes da sua regulação, como o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), a calmodulina, a proteína quinase C (PKC) e ATP (Gonzales and Earley, 2013).

Os mecanismos através dos quais estes canais são regulados ainda não estão totalmente esclarecidos, embora já esteja descrito que os TRPM4 são ativados após uma elevação da $[Ca^{2+}]_i$ através da libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) (Earley, 2013). Esta libertação é iniciada pela atividade da fosfolipase C (PLC) que origina diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (Earley, 2013). O IP3 ativa os seus recetores no RS, libertando cálcio para o espaço intracelular (Gonzales and Earley, 2013), enquanto que o DAG estimula a atividade da PKC (Earley, 2013). Em conjunto, estas duas vias levam a ativação do TRPM4 e consequente translocação para a membrana plasmática, como demonstra a figura 2 (Earley, 2013).

Está também descrito um outro canal que influencia a atividade do TRPM4, o TRPC6 (Earley and Brayden, 2015). O TRPC6, em situações de *stress* é ativado pelo DAG e, uma vez que é permeável ao cálcio, aumenta a atividade dos recetores do IP3 que por sua vez ativam os TRPM4 nas proximidades (Earley and Brayden, 2015). Após a sua ativação, os TRPM4 permitem o influxo de Na⁺ promovendo a despolarização da membrana e ativação dos VDCC, ocorrendo vasoconstricção (Brayden et al., 2008).

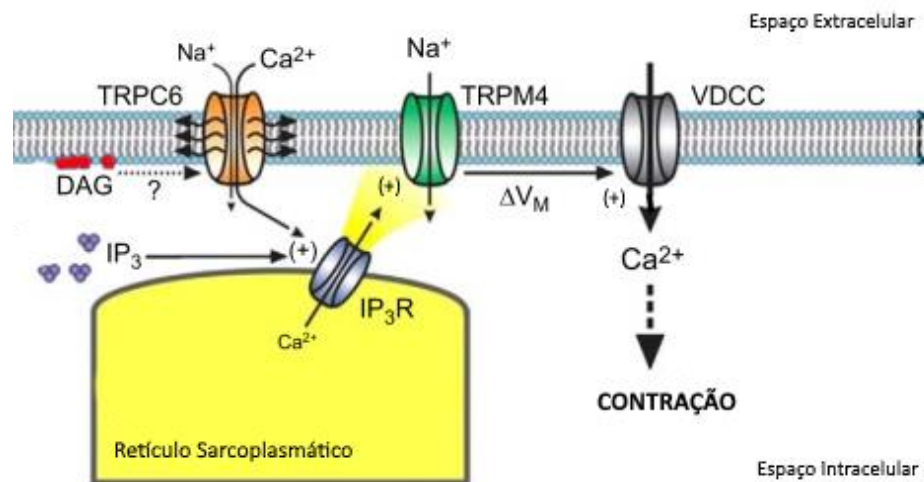


Figura 2. Mecanismos de regulação do TRPM4 e consequente contração. Em situações de *stress* o TRPC6 é ativado pela DAG permitindo a entrada de cálcio. O cálcio ativa os recetores de IP3 no RS com consequente libertação de cálcio. Estas correntes de cálcio provenientes dos reservatórios intracelulares ativam o TRPM4 que por sua vez despolariza a membrana e ativa os canais de cálcio dependentes da voltagem, levando à contração. Adaptado de (Earley and Brayden, 2015).

❖ Canais de Cálcio Dependentes da Voltagem

Nas SMC arteriais, os canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo-L (Cav 1.2), são a maior via de entrada de Ca²⁺ e regulam funções celulares como a contratilidade e expressão génica (Bannister et al., 2009). Estes canais são expressos em vários tipos de células, incluindo os neurónios, miócitos cardíacos, músculo-esquelético e músculo liso (Bannister et al., 2009). Estes canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem são complexos heteromultiméricos com uma subunidade α1 que forma um poro (Harraz et al., 2014) e outras subunidades auxiliares do tipo α2δ, β e γ (Bannister et al., 2009). Os canais Ca_v 1.2 desempenham um papel importante a nível da resposta miogénica pois, quando ativos, elevam a [Ca²⁺]_i provocando vasoconstricção de forma a manter a perfusão sanguínea cerebral constante (Narayanan et al., 2013). Os Ca_v 1.2 são capazes de transcrever as alterações no V_m nas SMC em alterações na [Ca²⁺]_i e, desta forma, ajustar o estado contrátil da célula (Longden et al., 2016). A sua função como reguladores está comprovada uma vez que, na presença de inibidores dos VDCC, alterações no V_m induzidas por diferenças de pressão ou por outros agentes não tem efeito no tónus vascular (Longden et al., 2016).

A ativação dos canais $Ca_v 1.2$ permite a entrada de cálcio para o citosol, o qual se liga a calmodulina, ativando o complexo cálcio-calmodulina (Ureña et al., 2013). Este complexo estimula a fosforilação da cadeia leve da miosina, ocorrendo desta forma a contração celular (Ureña et al., 2013).

Para além dos canais $Ca_v 1.2$, estudos em ratos e murganhos têm demonstrado que canais de Ca^{2+} do tipo T ($Ca_v 3.2$), que são ativados a baixas voltagens ou a voltagens transitórias, são também expressos nas artérias cerebrais, e desempenham um papel direto na elevação do Ca^{2+} citosólico (Harraz et al., 2014). A atividade destes canais parece variar com as diferenças de pressão, sendo que a baixas pressões, os canais tipo-T são os principais ativos e à medida que a pressão aumenta, a atividade dos canais tipo-L vai aumentando também (El-Rahman et al., 2013; Kuo et al., 2011).

B. Mensageiros Químicos

Os recetores acoplados a proteínas G são bastante importantes na regulação do tónus vascular pois conseguem sofrer mudanças conformacionais que facilitam a interação de certas proteínas sinalizadoras, as proteínas G, com as vias de sinalização intracelulares (Longo and Goyal, 2013). Aminas biogénicas, como as catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) e a serotonina (ou 5-hidroxitriptamina, 5-HT) ativam estes recetores (Longo and Goyal, 2013).

Tal como na vasculatura sistémica, os vasos cerebrais são bastante inervados por fibras nervosas simpáticas conectadas a recetores adrenérgicos $\alpha-1$ que parecem estar localizados nas arteríolas (Purkayastha and Raven, 2011). Embora os recetores adrenérgicos $\alpha-1$ sejam os mais abundantes no cérebro, o seu papel no sistema nervoso não está totalmente esclarecido (Purkayastha and Raven, 2011).

Os recetores adrenérgicos são membros dos recetores acoplados a proteínas G que medeiam as ações das catecolaminas endógenas (Piascik and Perez, 2001) e podem dividir-se em três grupos principais $\alpha-1A$, $\alpha-1B$ e $\alpha-1D$ (Purkayastha and Raven, 2011). Destes três tipos, o recetor mais abundante a nível cerebral é o $\alpha-1A$, tendo sido descrito como pós-sináptico e com papéis importantes e nível da libertação de neurotransmissores, nomeadamente do glutamato e acetilcolina (Piascik and Perez, 2001). De uma forma geral, estes recetores conseguem operar de forma dependente e independente de cálcio e para além do seu papel trófico, os recetores adrenérgicos parecem ter importância em condições de hipoxia e hipertensão (Longo and Goyal, 2013). Nas SMC vasculares, os recetores $\alpha 1$ ligam-se a norepinefrina, ou a outras aminas biogénicas e, através dos recetores acoplados a proteínas do tipo Gq estimulam a atividade da PLC que promove a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato originando IP3 e DAG (Purkayastha and Raven, 2011). Estas moléculas vão atuar como segundos mensageiros mediando a libertação de cálcio intracelular de reservatórios

intracelulares e a ativação da PKC que ativa a cascata de eventos sinalizadores necessários à vasoconstrição (Purkayastha and Raven, 2011).

Os recetores do IP₃ (IP₃R) consistem em 4 subunidades com um peso molecular de 310 KDa que podem apresentar três tipos diferentes tendo em conta as subunidades que apresentam, sendo a isoforma 1 que é predominante nas SMC (Dabertrand et al., 2013). Os astrócitos também parecem expressar recetores para o IP₃, sendo a isoforma predominante a do tipo 2 (Longden et al., 2016). Vários estudos têm levantando questões acerca do papel dos IP₃R nos astrócitos e consequente sinalização de cálcio no controlo do fluxo sanguíneo cerebral (Longden et al., 2016), mas mais estudos são necessários para entender qual a relação com as SMC.

Os IP₃R estão envolvidos na resposta a diversas moléculas endógenas vasoativas como a endotelina-1, acetilcolina, noradrenalina e 5-HT (Dabertrand et al., 2013). Apresentam uma elevada sensibilidade ao cálcio, sendo ativados a baixas concentrações deste ião e inibidos a concentrações muito elevadas (Dabertrand et al., 2013). Foi também demonstrado que, nas artérias piais, o cálcio libertado pelos IP₃R é capaz de ativar os TRPM4 e canais de potássio de larga condutância (Dabertrand et al., 2013).

Uma outra via importante no controlo do tónus vascular nas artérias cerebrais é a via que envolve a serotonina. A serotonina tem diversos efeitos a nível da vasculatura cerebral nomeadamente na hemóstase, na agregação plaquetária e no vasospasmo cerebral após uma hemorragia (Longo and Goyal, 2013). Os recetores de serotonina apresentam diversas famílias e subtipos, sendo que nas SMC vasculares são expressos os de tipo 1 e 2 os quais atuam através de proteínas G mediando respostas vasoconstritoras (Longo and Goyal, 2013).

C. Contração Independente de Cálcio

Para além da contração induzida pelo aumento do cálcio no citosol das células musculares, existem outras vias que têm como objetivo a contração celular e que não são diretamente influenciadas pelo cálcio. Embora a maior via de contração das SMC seja a via que envolve a fosforilação da cadeia leve da miosina, existem já evidências que uma outra via que envolve a proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) desempenha um papel importante na modulação do processo contração/relaxamento (Longo and Goyal, 2013).

As células respondem ao seu ambiente extracelular através de uma variedade de mediadores, incluindo hormonas e citocinas (Irving and Bamford, 2002). As cascatas de sinalização mediadas por proteínas cinases são elementos essenciais na comunicação do espaço extracelular com o ambiente intracelular. Estão caracterizadas três vias mediadas por cinases, a via da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) e as vias das cinases ativadas pelo *stress* (p38/SAPK2 e JNK/SAPK) (Irving and Bamford, 2002). Todas estas vias envolvem a MAPK que é capaz de interagir com substratos celulares e transporta-los para o

núcleo, modulando desta forma os fatores de transcrição e consequentes respostas biológicas (Irving and Bamford, 2002).

Nas artérias cerebrais, a via das ERK 1/2 que é ativada por fosforilação de resíduos de tirosina e treonina parece desempenhar um papel importante na regulação do tônus vascular (Longo and Goyal, 2013). Tem sido sugerido que a via da ERK 1/2, em vasos sanguíneos adultos, diminui a sensibilidade ao Ca^{2+} através da regulação da atividade da PKC (Longo and Goyal, 2013). Estudos sugerem que a nível cerebral as vias da MAPK estejam mais ativas em situações de lesão, como por exemplo a isquémia, uma vez que nestas situações são libertados fatores como citocinas, glutamato e radicais livres que vão estimular a sua ativação (Irving and Bamford, 2002).

1.1.1.4.2 Mecanismos envolvidos no processo de relaxamento

Para que as mudanças no diâmetro arterial sejam possíveis e para o início de um novo estímulo é necessário um controlo bastante preciso da extensão da resposta miogénica, através do controlo de influxo de Ca^{2+} (Chen et al., 2006). Para que este controlo ocorra, Chen e colaboradores dizem que existe um mecanismo de feedback negativo envolvendo a ativação de canais de K^+ existentes nas SMC permitindo a hiperpolarização da membrana plasmática, mas o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos e quais os tipos de canais presentes neste tipo de resposta ainda é limitado (Chen et al., 2006).

A. *Canais de Potássio*

O potencial de membrana nas SMC é um fator determinante para o tônus vascular e é regulado pelos canais de potássio (Dunn and Nelson, 2010). Como as células mantêm uma concentração intracelular de K^+ muito superior à concentração no meio extracelular, a abertura destes canais, na membrana das SMC, permite o efluxo de K^+ , resultando numa hiperpolarização da membrana (Haddy et al., 2006) e consequente inativação dos VDCC (Dunn and Nelson, 2010). Quando os VDCC fecham, ocorre uma diminuição da concentração de cálcio no interior da célula, levando à vasodilatação (Dunn and Nelson, 2010).

De acordo com a sua estrutura, os canais de potássio podem ser divididos em quatro classes principais, canais de potássio retificadores de influxo (Kir), canais de potássio dependentes da voltagem (Kv), canais de potássio ativados pelo cálcio (Kca) e canais de potássio de domínio 2 poros em tandem (K_{2p}) (Haddy et al., 2006; Rubaiy, 2016).

❖ Canais de Potássio Retificadores de Influxo

Os canais de potássio retificadores de influxo (Kir) são regulados pelos fosfolípidos da membrana, pelo PIP_2 e por outros ligandos, como o ATP e proteínas G (Rubaiy, 2016). De acordo com as suas características funcionais, podem ser divididos em quatro grupos distintos: clássicos, acoplados a proteínas G, sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e transportadores de K^+ (Longden and Nelson, 2015). Os Kir podem ser considerados sensores metabólicos, uma vez que aumentam o fluxo sanguíneo e provocam vasodilatação acumulando K^+ no fluido extracelular, durante o exercício físico e atividade neuronal (Haddy et al., 2006).

Os K_{ATP} são octómeros formados por 4 subunidades Kir6.1 e 4 subunidade SUR e não são dependentes da voltagem (Dunn and Nelson, 2010). Estes canais têm fraca capacidade de retificação de influxo e parecem desempenhar um papel importante na dilatação das artérias cerebrais em situações de acidose e isquemia (Longden et al., 2016). Em condições fisiológicas, são ativados por vasodilatadores que ativem a proteína quinase dependente de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP; PKA) e inibidos por vasoconstritores que ativam a PKC (Dunn and Nelson, 2010). A elevada sensibilidade dos K_{ATP} ao estado metabólico do organismo sugere que estão envolvidos no aumento do fluxo sanguíneo em função da necessidade metabólica dos tecidos (Rodrigo and Standen, 2005). Pensa-se que controlam diversos processos fisiológicos, como proteção neuronal, libertação de neurotransmissores, percepção da dor e secreção hormonal (Rodrigo and Standen, 2005). Estudos em órgãos intatos indicou a ativação destes canais na vasodilatação em caso de hipoxia na circulação cerebral (Rodrigo and Standen, 2005). Quando os K_{ATP} estão ativos, nota-se uma diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, levando ao relaxamento vascular (Yamada, 2016).

Estes canais são amplamente encontrados no cérebro, principalmente na *substantia nigra*, córtex, hipocampo e hipotálamo (Rodrigo and Standen, 2005). Foram também descobertos K_{ATP} nas membranas da mitocôndria (mito K_{ATP}) de miócitos ventriculares cardíacos. Os mito K_{ATP} diferem dos K_{ATP} na sua inibição, uma vez que os primeiros requerem magnésio para a inibição pelo ATP (Rodrigo and Standen, 2005). Os mito K_{ATP} parecem estar envolvidos na proteção cardiovascular em situação de isquemia cardíaca (Rodrigo and Standen, 2005). Uma vez que a nível cerebral, as mitocôndrias expressam um maior número destes canais que o coração (Rodrigo and Standen, 2005), torna-se importante entender a sua função e possível ação a nível de isquemia cerebral.

❖ Canais de Potássio ativados pelo Cálcio

Os K_{Ca} possuem uma elevada sensibilidade ao cálcio intracelular bem como a variações no potencial da membrana, fazendo com que estes canais sejam bastante importantes para o equilíbrio na função vascular (Tano and Gollasch, 2014). Tendo em conta a sequência de

aminoácidos na região do poro, os Kca podem ser divididos em três grupos distintos: baixa, intermédia e alta condutância (BKca) (Tano and Gollasch, 2014).

Dentro da família dos canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} , os BK são um dos principais intervenientes na regulação do tónus arterial, facilitando a criação de um mecanismo de feedback negativo que vai diminuir a vasoconstrição provocada pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Brenner et al., 2000; Longden et al., 2016). Os BK são os mais expressos nas SMC (Tano and Gollasch, 2014).

Estes canais apresentam 4 subunidades α e 4 subunidades β , sendo as segundas as mais importantes na sensibilidade ao Ca^{2+} (Howitt et al., 2011; Longden et al., 2016). Das 4 subunidades β , a subunidade β_1 é expressa nas SMC vasculares e a sua expressão está relacionada com um aumento de Ca^{2+} , conduzindo à ativação do canal e consequente efluxo de K^+ , provocando desta forma hiperpolarização da membrana e vasodilatação (Howitt et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que os BK podem também ser expressos nas mitocôndrias e que desempenham um papel cardioprotetor em situações de reperfusão isquémica, podendo esta proteção estar associada à ativação destes canais nas mitocôndrias dos cardiomiócitos (Singh et al., 2013; Tano and Gollasch, 2014). A nível cerebral, estudos mostraram que estes canais também podem oferecer proteção numa situação de AVC uma vez que a sua ativação pode reduzir a área de enfarte (Liao et al., 2010; Tano and Gollasch, 2014), mas serão necessários mais estudos para entender os mecanismos através dos quais operam.

❖ Canais de potássio dependentes da voltagem

Canais de K^+ dependentes da voltagem (Kv) são importantes na regulação da contração provocada pelo aumento da pressão intravascular, sendo ativados tanto nas SMC como nas células endoteliais e nos pés astrocitários (Longden et al., 2016). Os Kv são uma família de canais iónicos que formam correntes dependentes da voltagem quando ativados pela despolarização da membrana (Amberg and Santana, 2006). Estes canais apresentam 4 subunidades α , cada um com seis domínios transmembranares e ainda subunidades β adicionais (Longden et al., 2016).

Nas artérias cerebrais piás foi demonstrado que os Kv desempenham um papel importante na regulação do tónus miogénico em situações de pressão elevada e que podem ser inibidos pela atividade da PKC (Dunn and Nelson, 2010). Nas artérias do parênquima cerebral, quando os Kv são inibidos ocorre uma contração significativa, indicando que estes canais promovem a hiperpolarização por efluxo de K^+ que opõe à vasoconstrição a pressões fisiológicas normais (Longden et al., 2016). Ao longo dos anos, tem sido também demonstrado que, em situações de hipoxia, os Kv são inibidos e que esta inibição pode estar relacionada

com a vasoconstrição prolongada que ocorre em situações de isquemia, onde o período de repolarização do V_m é bastante elevado (Liu et al., 2014).

❖ Canais de potássio de domínio 2 poros em tandem

Os canais de potássio de domínio 2 poros em tandem (K_{2P}) são uma família de proteínas que desempenham um papel importante na manutenção do potencial negativo no interior da membrana de todos os tipos de células (Sepúlveda et al., 2015). Estes canais são formados por 4 segmentos transmembranares e dois poros em tandem que se pensa serem responsáveis por correntes de K^+ de fundo em células excitáveis (Borsotto et al., 2015). Os K_{2P} são regulados por várias sinalizações endógenas, fatores ambientais (Borsotto et al., 2015; Sepúlveda et al., 2015)

Os K_{2P} , de acordo com as suas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas são divididos em seis subfamílias: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK e TRESK (Borsotto et al., 2015). Da subfamília dos TASK, o TASK-1 e TASK-3 têm sido implicados com protetores contra a isquemia uma vez que ambos são inibidos em situações de redução de pH e privação de oxigénio (Borsotto et al., 2015).

A nível cerebral, vários estudos demonstraram a expressão de um canal da família dos TREK, o TREK-1, tanto nas SMC como nas células endoteliais da artéria basilar, envolvidos na regulação do tónus vascular (Enyedi and Czirjak, 2010). Estes estudos também demonstraram que, durante um ataque isquémico, os TREK atuam de forma a ocorrer uma hiperpolarização da membrana e promover a circulação sanguínea em torno da região afetada, protegendo desta forma os neurónios, no entanto mais estudos são necessários para entender o mecanismo pelo qual atuam (Enyedi and Czirjak, 2010)

B. Canais Recetores de Potencial Transitório

Para além de estarem envolvidos na contração das SMC, os TRP desempenham também um papel importante no processo de relaxamento, sendo a família dos TRPV a principal envolvida. O TRPV4 apresenta seis domínios transmembranares e consegue interagir com proteínas como os recetores do IP3, filamentos de actina, proteínas associadas a microtúbulos (MAP), aquaporinas e canais BK (Filosa et al., 2013). Estes canais são não seletivos mas possuem uma grande permeabilidade ao cálcio (Longden et al., 2016) e são ativados pelo ácido eicosatrienoico (EET) (Earley et al., 2005). Os EETs são agonistas endógenos dos TRPV4 e promovem a hiperpolarização das SMC vasculares, levando ao relaxamento vascular (Filosa et al., 2013).

Estudos de Earley e colaboradores mostraram que a estimulação dos TRPV4 pelos EETs promove a entrada de cálcio para a célula e que este influxo vai ativar os recetores de

rianodina que promove *sparks* de cálcio dos reservatórios intracelulares causando vasodilatação (Earley et al., 2005; Longden et al., 2016). As *sparks* de cálcio provenientes dos RyR ativam os canais BK que por sua vez promovem a hiperpolarização da membrana e consequente vasodilatação e relaxamento vascular (Earley and Brayden, 2015).

Um *spark* de cálcio é caracterizado por uma liberação local, rápida e transitória de cálcio do RS, através dos recetores de rianodina (RyR) (Essin and Gollasch, 2009). O cálcio proveniente do RS vai ativar os BK das proximidades, iniciando assim o processo de hiperpolarização que vai reverter o estado de vasoconstrição (Brenner et al., 2000). Nas artérias cerebrais, a atividade dos BK é modulada por proteínas cinases endógenas e por fosfatases, sendo esta regulação variável ao longo do crescimento (Longo and Goyal, 2013). Em comparação ao estado adulto, no feto as SMC têm uma atividade maior das fosfatases e das proteínas cinase G (PKG) e menor da PKA (Longo and Goyal, 2013). Estas diferenças relacionadas com a idade na atividade das proteínas sugerem que, num estado fetal, a sensibilidade dos BK ao cálcio é maior, permitindo especular que em idades mais avançadas, a $[Ca^{2+}]_i$ aumenta e que existe um potencial de repouso mais despolarizado (Longo and Goyal, 2013).

1.1.2 Disrupções na Unidade Neurovascular

Como a UNV é uma estrutura de elevada importância para a regulação da homeostasia cerebral, o incorreto funcionamento de um ou mais dos seus constituintes poderá ter graves consequências (Muio et al., 2014). Vários autores têm vindo a demonstrar que, em condições agudas, como a lesão cerebral traumática, hemorragia subaracnoide, AVC e condições crónicas, como a doença de Alzheimer, os componentes da UNV apresentam diversos tipos de lesões (Muio et al., 2014). Em todos estes processos patológicos é possível observar-se uma perda na permeabilidade e seletividade da BHE, a degradação da matriz extracelular e uma resposta inflamatória (Muio et al., 2014).

Para que a BHE mantenha as suas propriedades é necessária uma comunicação correta e sustentada entre os componentes da UNV, através de diversos fatores libertados e recetores celulares (Keaney and Campbell, 2015). A disfunção de qualquer componente desta unidade fisiológica poderá levar a uma desregulação transcelular e das vias paracelulares das células endoteliais cerebrais, contribuindo desta forma para uma situação patológica na BHE (Keaney and Campbell, 2015).

Os mecanismos de disrupção da BHE têm diferentes características em cada patologia (Muio et al., 2014) e a questão que permanece é se existe algum mecanismo comum que leva ao comprometimento da BHE ou se cada patologia apresenta mecanismos celulares e moleculares diferentes (Daneman and Prat, 2015). O que já está demonstrado e que é comum na disfunção da BHE em muitas patologias é um aumento do transporte vesicular, a disrupção

das junções oclusivas e as alterações no transporte endotelial e nos processos metabólicos, embora não se entenda ainda quais as interações presentes nestes processos (Daneman and Prat, 2015). Já foi descrito, por exemplo, que os pericitos são suscetíveis a lesões, como a isquemia, e que este fenómeno pode relacionar-se com a doença de Alzheimer, levando a que os pericitos se tornem um alvo terapêutico (Muioio et al., 2014). Desta forma, torna-se importante estudar os mecanismos entre os componentes da UNV, de forma a poder desenvolver-se uma estratégia para futuros tratamentos das doenças cerebrovasculares

1.2 Sistema Vascular Cerebral

O cérebro é totalmente dependente de um suprimento contínuo de sangue oxigenado e glucose, como tal os mecanismos de controlo da corrente sanguínea cerebral são extremamente sofisticados e sensíveis a variações (FitzGerald and Folan-Curran, 2002). Calcula-se que, por minuto, circula pelo encéfalo uma quantidade de sangue aproximadamente igual ao seu próprio peso e que o fluxo sanguíneo é diretamente proporcional à pressão arterial e inversamente proporcional à resistência cerebrovascular (Machado, 2006). O fluxo sanguíneo é maior nas áreas mais ricas em sinapses e, conseqüentemente, existe um maior fluxo sanguíneo na substância cinzenta do que na substância branca, uma vez que a cinzenta apresenta uma maior atividade metabólica (Machado, 2006).

A irrigação sanguínea do cérebro humano é feita a partir de duas artérias carótidas internas e duas artérias vertebrais, originárias do pescoço e que, na base do crânio formam o polígono de *Willis*, de onde saem as principais artérias para a vascularização cerebral (Figura 3) (Machado, 2006; Snell, 2001). Uma das artérias mais importantes é a artéria cerebral média, que deriva da carótida interna e recebe cerca de 60 a 80% do fluxo sanguíneo proveniente da mesma (FitzGerald and Folan-Curran, 2002).

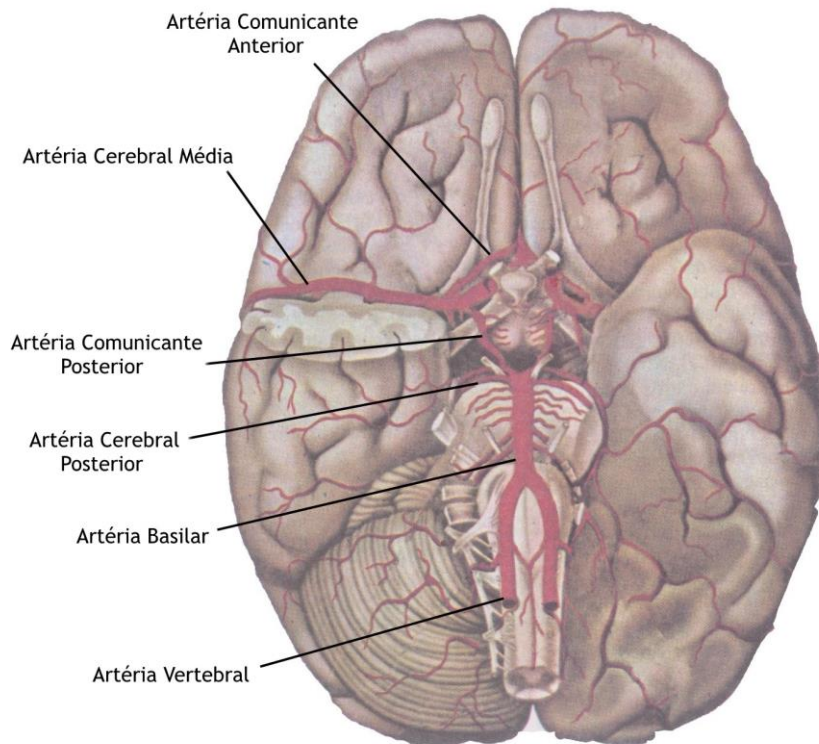


Figura 3. Principais Artérias Cerebrais. O cérebro contém artérias base a partir das quais existem ramificações que permitem o suprimento sanguíneo a todo o encéfalo. Adaptado de (Machado, 2006).

1.2.1 Artéria Cerebral Média

A artéria cerebral média irriga todo o sulco lateral até à zona da ínsula onde se divide em ramificações superiores que distribuem para o lobo frontal e em ramificações inferiores que irrigam uma zona que engloba o lobo parietal, os lobos temporais (Esperança Pina, 2000; FitzGerald and Folan-Curran, 2002) e o nervo ótico (Snell, 2001) (figura 4). Estas zonas compreendem áreas corticais importantes como a área motora, a área da sensibilidade somática (ou somestésica), a área de Broca entre outras (Machado, 2006), realçando a importância do bom funcionamento desta artéria.

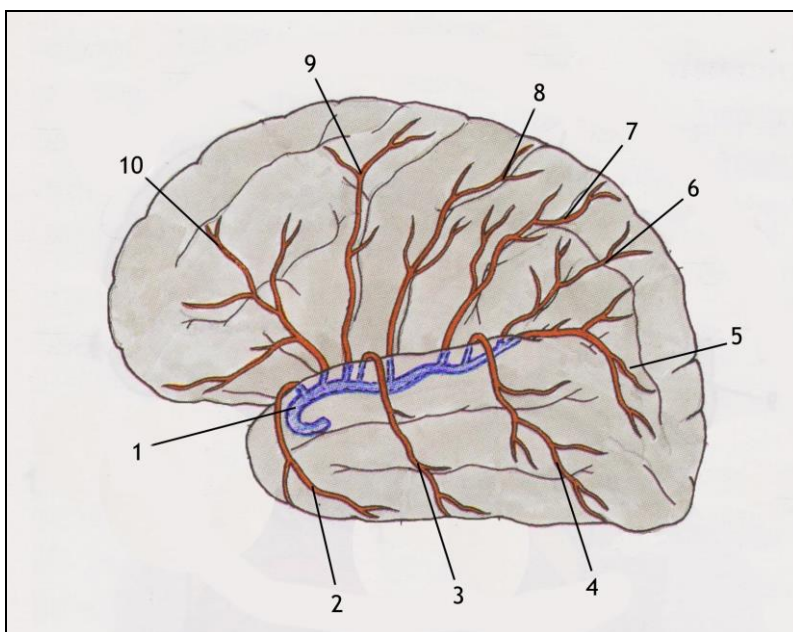


Figura 4. Artéria Cerebral Média e as suas principais ramificações. A artéria cerebral média, a azul (1) ramifica-se nas artérias temporal anterior (2), temporal média (3), temporal posterior (4), prega curva (5), parietal anterior (6), Rego de Rolando (7), pré-frontal (8), frontal anterior (9) e frontal anterior (10). Adaptado de (Esperança Pina, 2000).

As ramificações centrais desta artéria incluem as artérias que irrigam o corpo estriado, a cápsula interna e o tálamo (FitzGerald and Folan-Curran, 2002). Desta forma, obstruções na artéria cerebral média são a causa principal do acidente vascular cerebral clássico, resultando em episódios de hemiplegia, isto é, paralisia do braço, perna e parte inferior do rosto (FitzGerald and Folan-Curran, 2002), podendo ainda haver graves distúrbios na linguagem (Machado, 2006).

1.2.2 Estrutura dos Vasos Sanguíneos Cerebrais

A vasculatura cerebral apresenta determinadas características que a diferencia dos restantes vasos sanguíneos. Um exemplo disso é que ao contrário da vasculatura periférica, onde os chamados esfíncteres pré-capilares medem os gradientes de pressão, na circulação cerebral não existem tais estruturas, sendo a pressão regulada pelas artérias e arteríolas (Liebeskind and Caplan, 2016). Também o fluxo sanguíneo é regulado pelas artérias, principalmente pelas que pertencem ao Ciclo de *Willis*, tornando-se desta forma evidente a importância de reconhecer o papel da vasculatura cerebral como um elemento fisiológico ativo na homeostase metabólica (Liebeskind and Caplan, 2016).

Os vasos cerebrais são compostos por três camadas distintas, cada uma com uma função específica (Figura 5), tal como ocorre nos restantes vasos sanguíneos do corpo (Jullienne et al., 2016). A camada mais interna é chamada de túnica íntima e é composta por uma camada de células endoteliais rodeadas por uma membrana e, no caso de vasos

de menor calibre como os capilares, podem existir também pericitos (Figura 5C) (Jullienne et al., 2016). A envolver esta primeira camada, encontra-se a túnica média, que contém as SMC e o número de camadas celulares que contém depende do tamanho do vaso, tendo as artérias piais duas ou três camadas enquanto as artérias penetrantes têm apenas uma ou duas (Jullienne et al., 2016). Por último, a camada mais exterior é a túnica adventícia, a camada mais forte, composta por tecido conjuntivo, colagénio e fibroblastos, fornecendo desta forma a resistência necessária para as forças que atuam nas paredes dos vasos (Jullienne et al., 2016). De uma forma geral, as artérias cerebrais distribuem as suas camadas em 17% da espessura total pertencente à túnica íntima, 52% a média e 31% a adventícia (Liebeskind and Caplan, 2016).

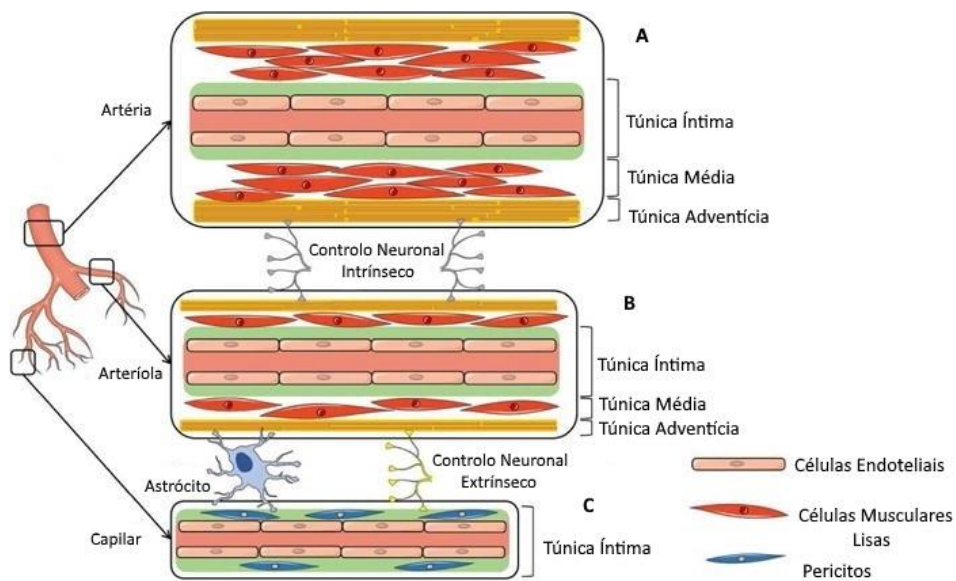


Figura 5. Representação das três camadas e respetivos constituintes dos vasos cerebrais. A - Nas artérias, as três camadas, íntima, média e adventícia estão bem diferenciadas e apresentam uma camada de SMC maior. **B-** Nas arteriolas, a túnica média é menos espessa que a das artérias uma vez que apresenta menor quantidade de SMC. **C-** Constituição dos capilares, que apresenta apenas uma camada, a túnica íntima e pericitos. Adaptado de (Jullienne et al., 2016).

Existem já muitas diferenças entre as artérias intracranianas e extracranianas descritas (Figura 6). No caso das artérias do cérebro, estas possuem uma lâmina elástica interna bem desenvolvida, não apresentam lâmina elástica externa, têm junções oclusivas endoteliais com poucas vesículas pinocíticas, apresentam uma distribuição enzimática diferente e a camada adventícia é mais fina do que nos vasos periféricos (Chen and Fisher, 2016; Liebeskind and Caplan, 2016).

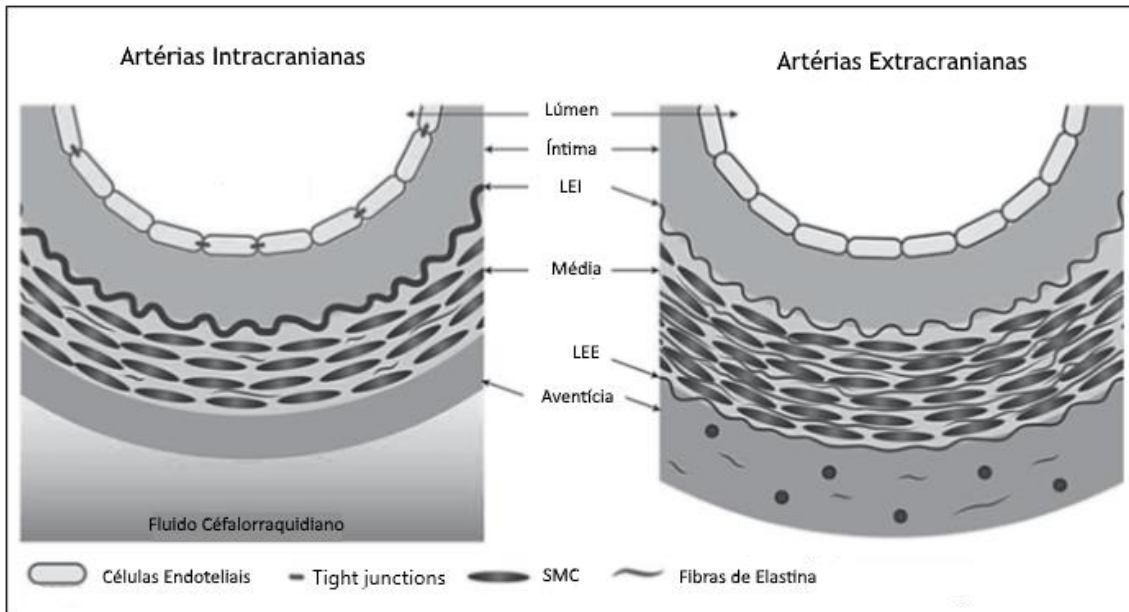


Figura 6. Principais diferenças entre as artérias extracranianas e intracranianas. As artérias extracranianas apresentam uma lâmina elástica interna (LEI) mais fina e apresentam lâmina elástica externa (LEE), ao contrário das artérias intracranianas. A túnica adventícia é de maior espessura e apresentam ainda uma maior quantidade de SMC que as artérias cerebrais. Já as artérias intracranianas têm junções oclusivas nas células endoteliais e a túnica adventícia apresenta-se em contacto com o fluido cefalorraquidiano. Adaptado de (Chen and Fisher, 2016).

Capítulo 2

Objetivos

2 Objetivos

As doenças cerebrovasculares são, hoje em dia, uma das principais causas de mortalidade e de sequelas da população ocidental. Com o contínuo aumento da taxa de incidência destas patologias, torna-se importante desenvolver métodos que facilitem a investigação nesta área, uma vez que os recursos de estudo que existem são bastante limitados.

Estas doenças afetam principalmente os vasos sanguíneos cerebrais, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo a certas partes do cérebro. Esta diminuição induz a uma redução dos níveis de oxigénio que pode conduzir à morte celular. As principais células reguladoras do fluxo sanguíneo são as SMC, sendo estas as células maioritariamente lesadas nas doenças cerebrovasculares.

Desta forma, foram definidos diferentes objetivos específicos para este trabalho:

- 1) Desenvolvimento de um modelo de cultura de SMC derivadas da artéria cerebral média;
- 2) Caracterização fenotípica das células presentes na cultura;
- 3) Análise da funcionalidade das células em cultura por estudo da resposta a agentes contráteis e relaxantes.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultura Celular de SMC

Todos os animais utilizados na preparação da cultura celular foram tratados de acordo com os requisitos éticos de pesquisa animal e com a convenção europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados para fins experimentais ou outros propósitos científicos (Decreto-Lei nº 113/2013). O método de cultura utilizado foi adaptado de um modelo anteriormente estabelecido por Cairrão e colaboradores (Cairrão et al., 2009) e de um modelo de Martin e colaboradores (Martin de Llano et al., 2007) para isolamento de SMC da artéria umbilical humana.

Fêmeas Wistar foram anestesiadas (quetamina 87,5 mg/Kg e xilazina 12,5 mg/Kg) e posteriormente sacrificadas por deslocamento cervical. O cérebro foi cuidadosamente removido e colocado em tampão fosfato salino (PBS: 1400mM de NaCl, 81mM de Na₂HPO₄, 27mM de KCl e 15mM de KH₂PO₄, pH 7,4) (Tabela 1). Utilizando material cirúrgico adequado procedeu-se ao explante das artérias cerebrais médias que foram também colocadas em PBS (Figura 7). Seguidamente as artérias foram aderidas a uma placa de cultura com 6 poços previamente revestida com colagénio (5 µg/cm²) e colocadas na incubadora a 37° C numa atmosfera com 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂. Após 3 minutos foi adicionado 1 ml de meio de cultura completo (DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS - 5%); Albumina de soro bovino (BSA - 0,5%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5µg/mL); fator de crescimento fibroblástico (FGF, 0,5 ng/mL); heparina (2µg/mL), insulina (5µg/mL) e SAA (1%), pH 7,4) (Tabela 1) e colocada novamente na incubadora durante 24h, após as quais foi adicionado mais 1 ml de meio de cultura completo. O meio de cultura foi mudado a cada 2 dias sendo obtidas culturas confluentes após 10-20 dias em cultura. Subculturas destas células foram mantidas até à sexta passagem. Posteriormente à primeira passagem, o meio de cultura utilizado foi alterado para meio de cultura completo com 10% FBS (Tabela 1) e mudado a cada 2 dias.



Figura 7. Cérebro de um rato adulto. A região assinalada inclui a artéria cerebral média esquerda. Ambas as artérias (direita e esquerda) foram explantadas e colocadas em cultura.

Tabela 1. Soluções utilizadas nos processos experimentais da cultura celular e PCSA

Solução	Composição
PBS	1400mM de NaCl, 81mM de Na ₂ HPO ₄ , 27mM de KCl e 15mM de KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Solução antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000 U); estreptomicina (10 mg) e anfotericina (25 mg)
Solução de BSA (Albumina de soro bovino)	250g BSA e 10mL H ₂ O
Solução de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> /F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 Liofilizado, NaHCO ₃ (1,2g/L) e ácido L-ascórbico (20mg/L), pH 7,4
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS - 5%); Albumina de soro bovino (BSA -0,5%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5µg/mL); fator de crescimento fibroblástico (FGF, 0,5 ng/mL); heparina (2µg/mL), insulina (5µg/mL) e SAA (1%), pH 7,4
MCC com 10% FBS	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS - 10%); Albumina de soro bovino (BSA -0,5%) e SAA (1%), pH 7,4
Meio de cultura sem soro	DMEM-F12; Albumina de soro bovino (BSA - 0,5%) e SAA (1%), pH 7,4
Krebs	119 mM de NaCl, 5mM de KCl, 1,5mM de CaCl ₂ ·2H ₂ O, 1,2mM de MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1,2mM de KH ₂ PO ₄ , 25mM de NaHCO ₃ , 0,03mM EDTA-Na ₂ , 0,6mM de Ácido L-(+)-ascórbico e 11mM de glucose, pH 7,4.

3.2 Ensaio de Imunocitoquímica

O protocolo utilizado nesta técnica foi adaptado do modelo estabelecido por Mendes-Oliveira e colaboradores (Mendes-Oliveira et al., 2017).

Para a caracterização da cultura celular e identificação das células presentes na cultura foi usada a técnica de imunocitoquímica. Culturas entre a segunda e a quarta passagem em confluência foram colocadas em meio de cultura completo sem soro durante 24 e 48 horas, para alteração do fenótipo sintético para contrátil. Após remoção do meio de cultura e lavagem com PBS as células foram fixadas com PFA 4% durante 10 minutos e depois permeabilizadas por incubação com 1% Triton X-100 em PBS durante 5 min. Para que as ligações não específicas fossem bloqueadas adicionou-se PBS contendo 0,1% de Tween (PBS-T) e 20% de FBS e deixou-se em incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois do bloqueio as células foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas durante a noite, a 4°C, com os anticorpos primários dirigidos para a α -actina e para células endoteliais (Tabela 2). Posteriormente à incubação dos anticorpos primários, efetuaram-se 6 lavagens com PBS-T com uma duração de cerca 15 min e adicionaram-se os anticorpos secundários (Tabela 2), igualmente diluídos em PBS-T com 1% de FBS, e deixou-se em incubação durante 1h à temperatura ambiente. Procedeu-se novamente a 6 lavagens com PBS-T com uma duração de

cerca 15 min e à marcação dos núcleos por incubação durante 10 min à temperatura ambiente com Hoescht 2 μ M (Invitrogen), preparado com a mesma solução de diluição de anticorpos usada anteriormente. Após mais três lavagens com PBS-T, montaram-se as lamelas utilizando o meio de montagem DAKO. As imagens fluorescentes foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axioobserver Z1, Zeiss) com uma ampliação de 40X. Em cada experiência quantificaram-se 3 lamelas por condição experimental e analisaram-se 20 campos por lamela.

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de Imunocitoquímica.

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário	Diluição	Empresa
α -actina	Monoclonal Rato Anti- α -actina	1:1000	Sigma Aldrich	Cabra anti-rato conjugado com alexa 488	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
Fator de Von Willebrand	Policlonal Coelho Anti - Von Willebrand Factor	1:1000	Chemicon International	Cabra anti-coelho conjugado com alexa 546	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes

3.3 Ensaio de *Planar Cell Surface Area (PCSA)*

O protocolo utilizado nesta técnica foi baseado num previamente estabelecido por Mariana e colaboradores (Mariana et al., 2016). Para a realização desta técnica foi necessário que as células entre a segunda e a sexta passagem atingissem a confluência para posteriormente serem colocadas em meio de cultura sem soro (Tabela 1), 24 ou 48 horas antes da realização da experiência. Após o tempo de incubação, as células são tripsinizadas e colocadas em caixas de Petri previamente revestidas com 5 μ L de colagénio. A cultura nestas caixas é deixada durante 4 horas na incubadora a 37°C, com 95% de ar atmosférico e 5% de dióxido de carbono. Seguidamente, o meio sem soro foi retirado e as células foram lavadas 4 vezes com meio de Krebs (Tabela 1) mantendo-se o meio da última lavagem na caixa, que foi posteriormente levada para o microscópio.

As células foram observadas através do microscópio invertido de fluorescência da marca *Zeiss Axio Observer Z1*. Este é um microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade (*Axio Cam Hsm*) e possui um sistema de incubação incorporado, que permite o controlo da temperatura, necessário à correta manutenção da viabilidade celular no decorrer das experiências.

Após uma primeira observação, tirou-se uma primeira fotografia a um bom plano de células para servir de controlo. Durante 20 minutos as células são deixadas no microscópio

sem qualquer adição de agentes contráteis ou relaxantes. Após esses 20 minutos iniciais, é tirada mais uma fotografia, para observação da contração basal. Posteriormente é adicionado o agente contrátil (serotonina, 5-HT - 1 μ M ou noradrenalina, NA - 1 μ M) e o agente relaxante (Nitroprussiato de Sódio, SNP - 1 μ M), que é deixado atuar durante 20 min, após os quais é tirada uma terceira fotografia. Realizou-se a análise e o tratamento das imagens através do programa *AxioVision 4.8 software*, recorrendo ao suplemento *Automatic measurement programs*, que permitiu medir a diferença de área das células após a adição dos agentes contráteis e relaxantes.

3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos encontram-se expressos em percentagem de controlo, percentagem de células totais ou percentagem de contração induzida pela 5-HT e NA (de acordo com o referido no texto e legenda das figuras) e representam a média \pm SEM do número de experiências independentes indicadas nas legendas das figuras, realizadas em triplicado ou quadruplicado. Análise estatística foi realizada no *GraphPad Prism 6 Demo*. A significância estatística entre dois grupos foi analisada utilizando o teste *t-Student* e a comparação entre mais de dois grupos de dados foi analisada segundo o método de *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Bonferroni*. Os níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos ($p < 0,05$)

Capítulo 4

Resultados

4 Resultados

4.1 Caracterização da cultura primária de células musculares obtida

Numa primeira fase estabeleceu-se um protocolo para a cultura primária de SMC com base num modelo pré-estabelecido por Martin e colaboradores (Martin de Llano et al., 2007) e Cairrão e colaboradores (Cairrão et al., 2009). A cultura foi obtida através de explantes da artéria cerebral média. A figura 8A mostra a artéria em cultura após 8 dias onde se pode observar o crescimento das SMC. A figura 8B mostra a cultura após 20 dias, em estado de confluência.

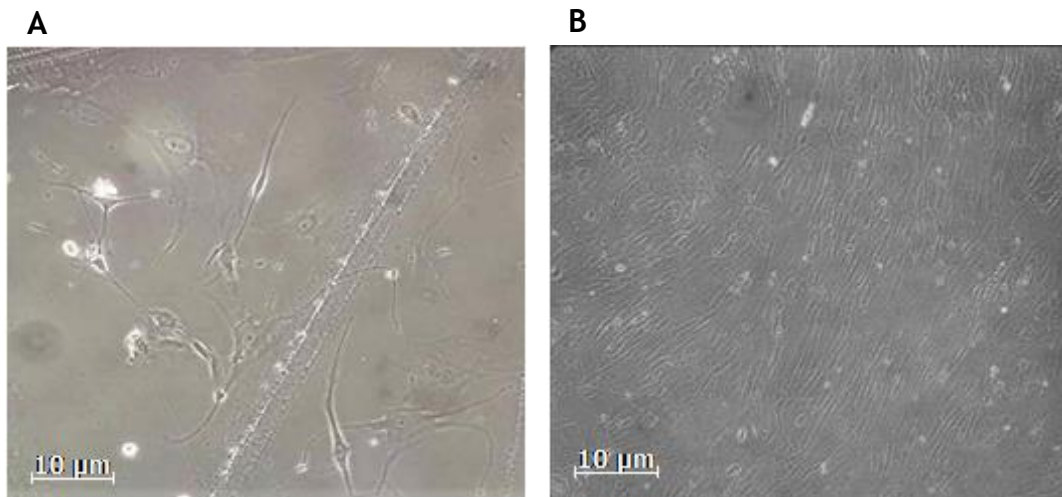


Figura 8. Cultura primária de SMC obtida a partir do explante da artéria cerebral média. **A**- Imagem representativa da cultura após 8 dias. **B** - Imagem representativa da cultura após 20 dias, num estado de confluência. As imagens foram adquiridas no microscópio ótico utilizando a objetiva 10x.

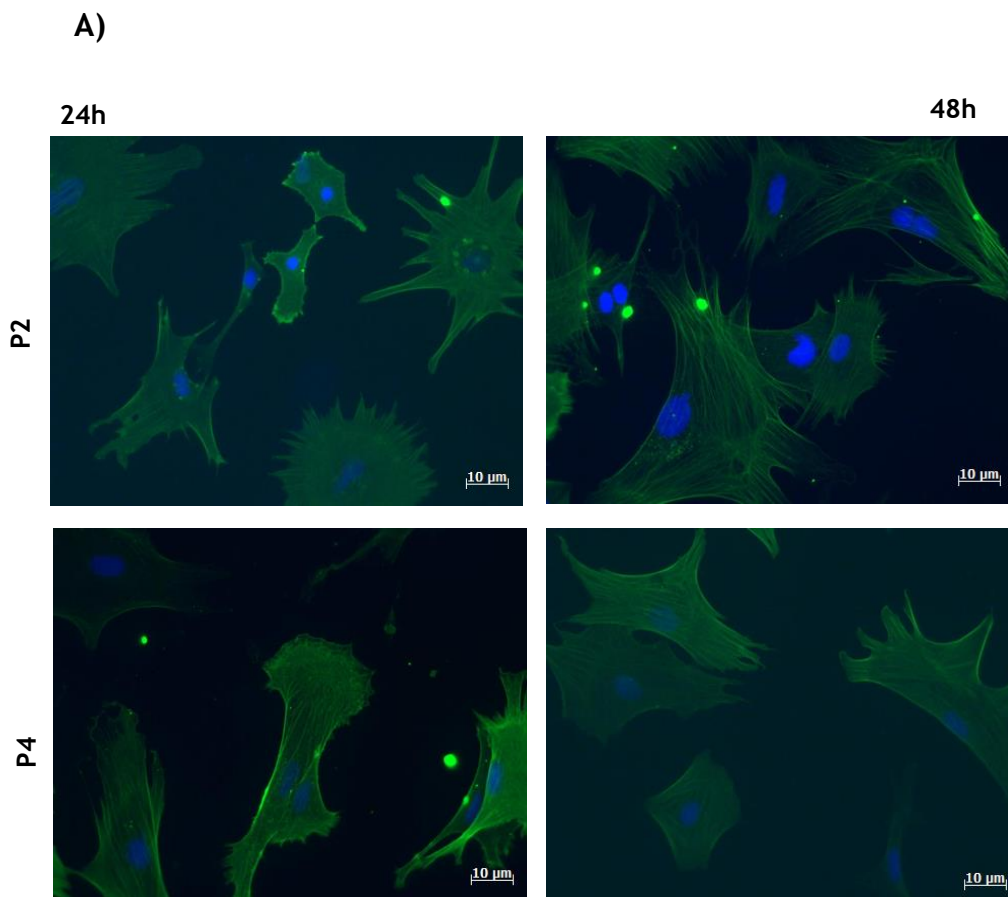
4.1.1 Avaliação da pureza da cultura primária obtida

Uma vez conseguidas as células, foi necessário caracterizar as células presentes na cultura. Para além disso, uma vez que as SMC em cultura apresentam um fenótipo sintético, foi necessário verificar se o fenótipo contrátil era conseguido através de incubações com meio sem soro. Para avaliar a pureza da cultura foi realizada uma imunocitoquímica com anticorpos dirigidos contra α -actina (figura 9A), um conhecido marcador para células musculares e com Fator de *Von Willebrand* (vWF), um marcador para células endoteliais (figura 10). As marcações foram feitas em diferentes passagens

da cultura e a diferentes tempos de incubação com meio sem soro, uma vez que as SMC apenas marcam para α -actina no fenótipo contrátil.

A figura 9A mostra a marcação da cultura com a α -actina, a verde, e os núcleos marcados com Hoescht, a azul, em diferentes passagens (P2 e P4) e em diferentes tempos de incubação com meio sem soro (24h e 48h), não havendo diferenças significativas entre condições. Cerca de 90% das células presentes na cultura expressaram a α -actina, não se observando diferenças significativas entre as condições testadas (Figura 9 B).

De modo a confirmar a especificidade da marcação obtida com o anticorpo contra a α -actina este foi testado numa cultura de células gliais de rato (astrócitos e microglia) (Figura 9C). Neste caso não se observou qualquer marcação.



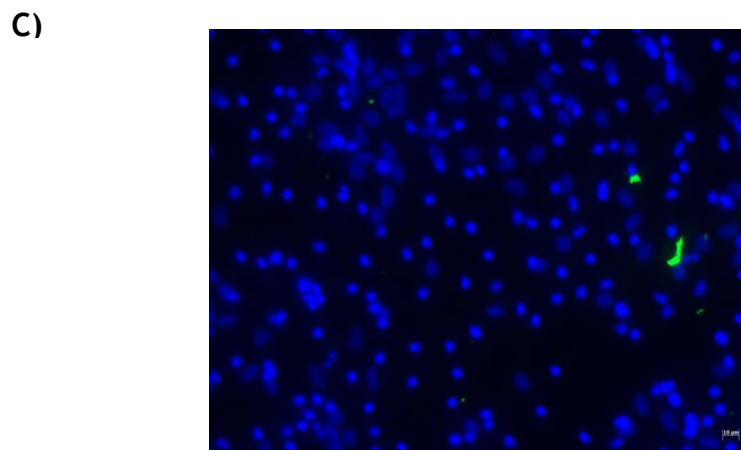
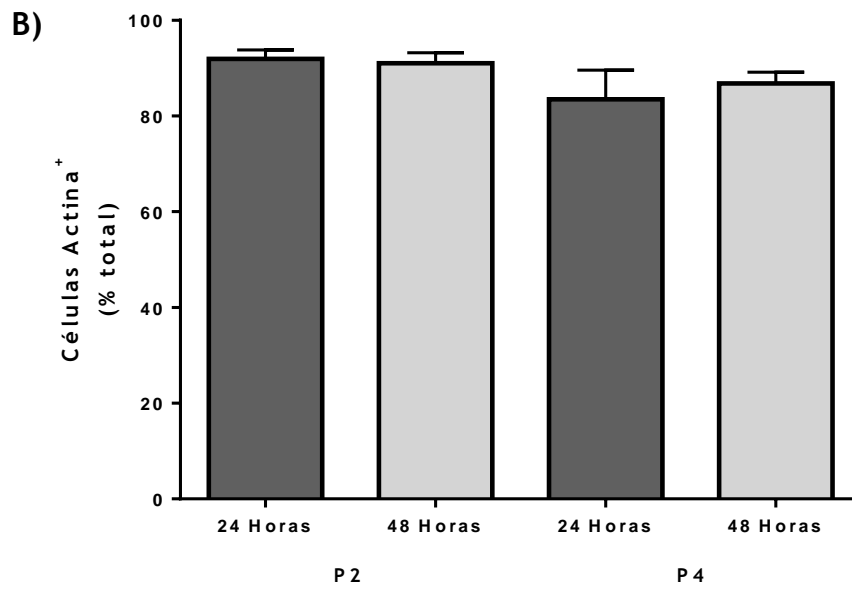


Figura 9. Caracterização e avaliação da pureza da cultura primária de SMC. **A** - Imagem representativa de uma imunocitoquímica em que as SMC foram marcadas com anti- α -actina (verde). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul) e permitiram avaliar o nº total de células. As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva 40x. **B** - Quantificação da porcentagem de células com marcação para α -actina. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado. **C**- Imagem representativa de uma Imunocitoquímica em que células gliais foram marcadas com anti- α -actina e os núcleos com Hoescht. A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva 40x.

De modo a analisar-se a presença de células endoteliais na cultura procedeu-se a marcação para vWF. Como pode ser observado na Figura 10, uma imagem representativa dos resultados obtidos, não se verificou qualquer marcação para o vWF, indicando que não estavam presentes células endoteliais na cultura.

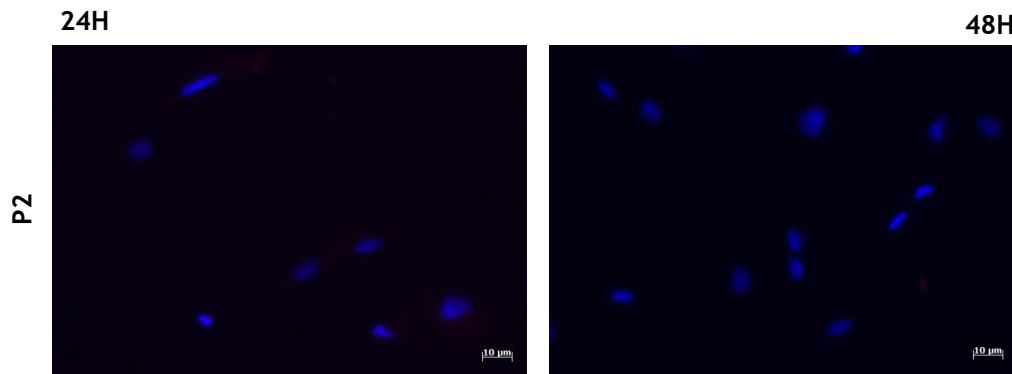


Figura 10. Imagem representativa de uma imunocitoquímica em que as células foram marcadas com anti-vWF (vermelho). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva 40x.

4.2 Avaliação da funcionalidade das células em cultura

Após a confirmação da presença e enriquecimento da cultura em SMC e ainda que estas apresentavam fenótipo contrátil após incubação em meio sem soro, foi necessário avaliar se as células se mantinham funcionais. Para tal utilizamos a técnica de PCSA, de acordo com Mariana et al., de forma a avaliar a contratilidade das células em resposta a agentes contráteis (5-HT e NA) e relaxantes (nitroprussiato de sódio - SNP) (Mariana et al., 2016).

4.2.1 Resposta celular à ação de agentes contráteis

4.2.1.1 Serotonina

Foi analisado o efeito da 5-HT numa concentração de $1\mu\text{M}$ nas SMC, após 24h e 48h em meio sem soro e comparado com um controlo onde não houve qualquer adição de 5-HT (figura 11). Células incubadas em meio sem soro durante 24h ou 48h apresentaram resposta semelhante à 5-HT contraíndo cerca de 20% após uma exposição de 20 min.

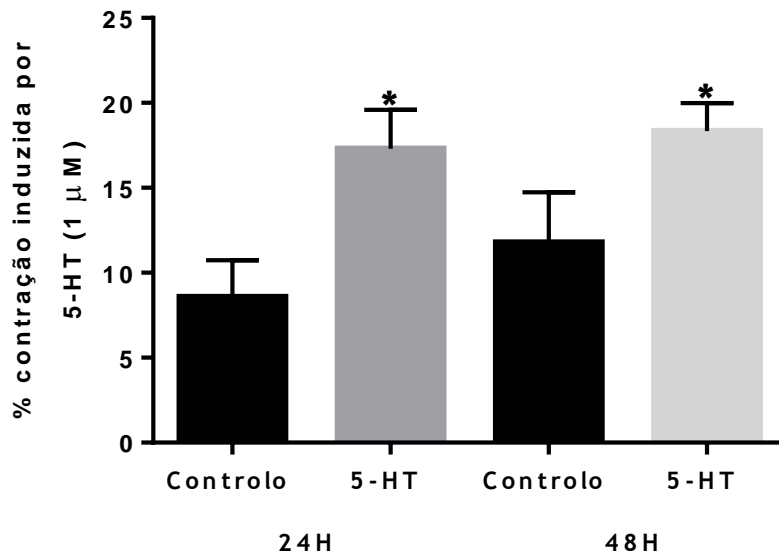


Figura 11. Efeito da 5-HT (1 μM) nas SMC. Percentagem de contração induzida pela serotonina após 24 e 48h de incubação em meio sem soro. Os dados foram expressos em percentagem de contração celular em relação à área inicial de cada célula. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em quadruplicado. * P <0,05 versus o controlo. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-Way ANOVA*.

4.2.1.2 Noradrenalina

De modo a estudar o efeito da NA nas SMC em cultura, células previamente incubadas durante 24h ou 48h em meio sem soro foram estimuladas com NA (1 μM) durante 20 min (Figura 12). Como se observa na figura 12, as células incubadas durante 24h em meio sem soro apresentaram uma maior contração (20%) que células incubadas durante 48h nesse meio (15%).

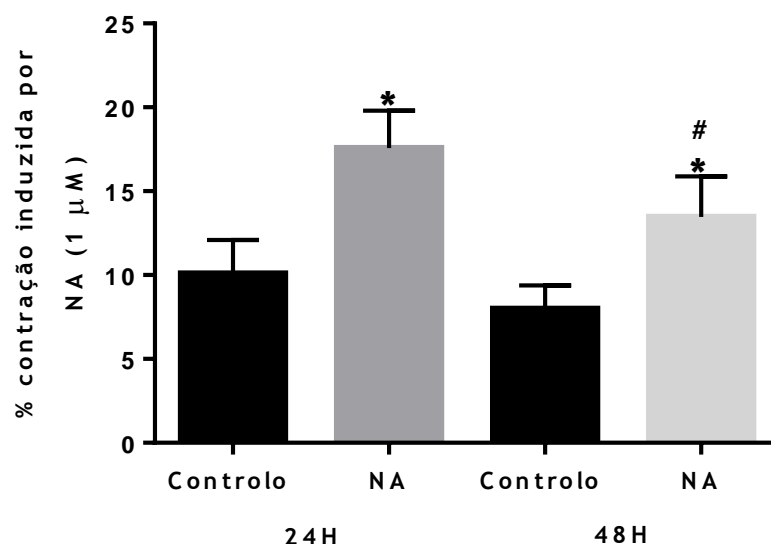


Figura 12. Efeito da NA (1 μM) nas SMC. Percentagem de contração induzida pela noradrenalina após 24 e 48h de incubação em meio sem soro. Os dados foram expressos em percentagem de contração celular em relação à área inicial de cada célula. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em quadruplicado. * P <0,05 versus o controlo; # P <0,05 Incubação 24h versus Incubação 48h. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA*.

4.2.1.3 Perfil temporal da contração induzida pela 5-HT e NA

O perfil de contração das SMC nos 20 minutos após adição de 5-HT e NA foi também analisado, às 24h de incubação com meio sem soro (figura 13).

Ao fazer-se a análise do perfil temporal da contração em células previamente incubadas em meio sem soro durante 24h verificou-se que 4min após a adição de 5-HT se observa já um efeito contrátil o qual aumenta até aos 16 min. A partir deste período registou-se uma estabilização. No caso das células previamente contraídas com NA registaram-se alterações na área celular 2 minutos após a adição do agente contrátil, continuando a aumentar a percentagem de contração até aos 16 minutos, onde atingem a contração máxima.

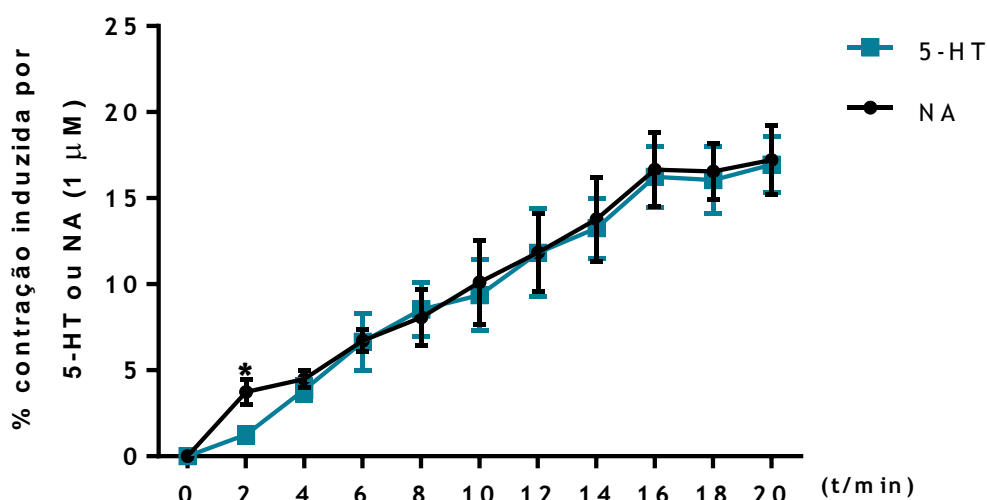


Figura 13. Perfil temporal da contração induzida por 5-HT e NA (1 μ M). Azul - Perfil de contração celular provocada pela serotonina nos 20 minutos experimentais em células previamente incubadas durante 24h em meio sem soro; Preto - Perfil de contração celular provocada pela noradrenalina nos 20 minutos experimentais em células previamente incubadas durante 24h em meio sem soro. *P <0,05 versus contração induzida por 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*.

4.2.2 Resposta celular à ação do agente relaxante - SNP

A total funcionalidade das células musculares requer que estas mantenham a capacidade de relaxar após uma contração. Para verificar se após uma pré-contração com serotonina ou noradrenalina as células mantinham a capacidade de relaxar, foi analisado o efeito do SNP (1 μ M), um conhecido dador de óxido nítrico.

Como podemos observar na figura 14 após pré-contrações com noradrenalina e serotonina foi observado um relaxamento significativo quando as células foram expostas a SNP. A percentagem de relaxamento após contração com noradrenalina foi de cerca de 45%, sendo

significativamente maior que o relaxamento de após contração com a serotonina (aproximadamente 35%).

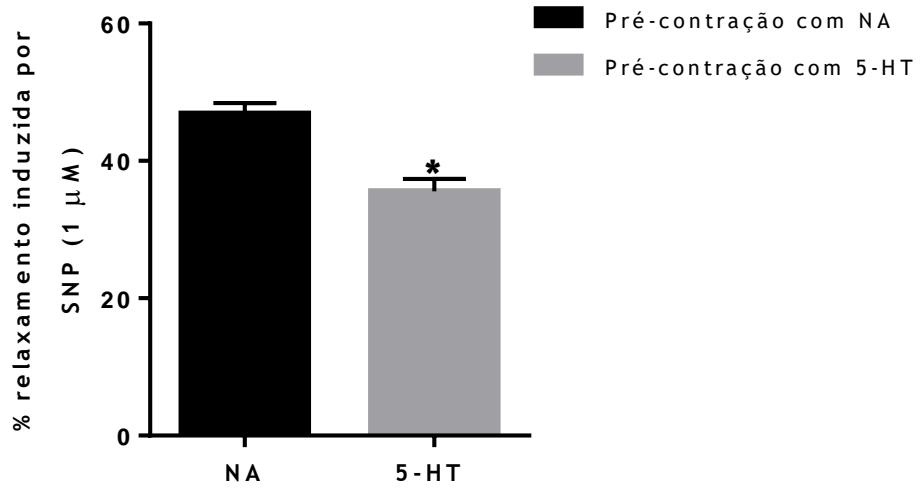


Figura 14. Efeito do SNP (1 μM) nas SMC pré-contraídas com serotonina (1 μM) e noradrenalina (1 μM). Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em quadruplicado. *P <0,05 versus relaxamento após pré-contracção com NA. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*. Os efeitos são expressos em percentagem de relaxamento em relação à área celular após contração com noradrenalina ou serotonina.

Capítulo 5

Discussão

5 Discussão

As lesões cerebrovasculares são das principais causas de morte na população ocidental e têm vindo a aumentar a sua taxa de incidência. Contudo as alterações clínicas que ocorrem nestas patologias estão pouco estudadas devido à falta de conhecimento sobre o funcionamento das artérias cerebrais. Esta falta de conhecimento está em grande parte relacionada com a falta de modelos *in vitro* para estudo e investigação nestas artérias. As culturas celulares são caracterizadas pela sua simplicidade, controlo e capacidade de fornecer informação detalhada de como responde essa população celular a estímulos ou lesões específicas (Roque and Baltazar, 2017). Este conjunto de vantagens leva a que estas sejam bastante utilizadas no estudo das interações moleculares, constituindo desta forma uma ferramenta importante no estudo de diferentes patologias. Assim sendo, o desenvolvimento de uma cultura primária de células musculares derivada da artéria cerebral média é de grande importância, devido há grande aplicabilidade desta nos estudos das diferentes patologias vasculares cerebrais.

Os dois métodos mais utilizados para cultura de células passam por digestões enzimáticas ou explantes (Campbell and Campbell, 1993), tendo já ambos os métodos sido descritos para culturas de células vasculares provenientes do cérebro (Gauthier et al., 2012) e do cordão umbilical (Cairrão et al., 2009; Martin de Llano et al., 2007; Patel et al., 2016). Alguns autores descrevem que o método por digestões enzimáticas origina um pequeno número de SMC e que é útil para aplicação em estudos com curta duração, apesar de existir uma grande destabilização da membrana plasmática, o que pode ser prejudicial para a realização de algumas técnicas, enquanto que o método por explantes origina uma maior quantidade de SMC após 2 a 3 semanas e é melhor para culturas de longo-termo (Patel et al., 2016). Em relação à pureza da cultura, estudos sugerem que culturas celulares realizadas pelo método de explantes apresenta percentagens de pureza menores, havendo uma maior contaminação destas com fibroblastos (Pokrywczynska et al., 2016). Em contrapartida, existem já evidências que a pureza conseguida pelo método de digestões enzimáticas não se mantém ao longo da cultura, devido à fraca adesão celular e baixa proliferação (Mazza et al., 2016). Esta baixa proliferação e adesão pelo método de digestão pode ser explicada pela literatura, uma vez que está descrito que este método tem maior tendência a apresentar células apenas no fenótipo contrátil, enquanto que o método por explantes apresenta uma mistura dos dois fenótipos, sintético e contrátil (Patel et al., 2016). Como as SMC no estado sintético apresentam uma taxa de crescimento e migração maior (Badaut and Bix, 2014), é mais vantajoso o método por explantes, uma vez que tem maior rendimento e permite a obtenção de camadas confluentes. Para além disso, a manipulação do fenótipo das SMC é possível

através da privação de soro na cultura (Cairrão et al., 2009; Han et al., 2006), o que facilita a utilização das células obtidas pelos explantes uma vez que garante a presença de SMC apenas no fenótipo contrátil. Deste modo, seguindo o modelo estabelecido por Martin *et al.* (2007), os explantes da artéria cerebral média foram aderidos a uma placa de cultura com seis poços e colocados no mesmo meio utilizado na cultura de SMC do cordão umbilical do modelo implementado por Cairrão *et al.* (2009), obtendo células após 8 a 10 dias em cultura (Cairrão et al., 2009; Martin de Llano et al., 2007). No que diz respeito à adesão das células às placas de cultura, existem várias substâncias para revestimento, tais como colagénio, fibronectina e polilisina (Campbell and Campbell, 1993; Martin de Llano et al., 2007). No presente trabalho foi usado colagénio como substância de revestimento e resultou numa morfologia celular concordante com o típico padrão habitualmente descrito para as SMC. As sub-passagens da cultura também apresentaram morfologias semelhantes, indicando que o colagénio é uma boa opção de revestimento para células vasculares. Uma das principais dificuldades no isolamento de SMC é a presença de células endoteliais e fibroblastos nas artérias. Para evitar contaminações com fibroblastos e células endoteliais provenientes das túnica adventícia e íntima, respetivamente, Cairrão e colaboradores (2009) removeram o endotélio, no entanto, devido ao pequeno calibre da artéria cerebral média de rato, isso não foi possível, o que poderá contribuir para uma maior contaminação com estes tipos celulares (Cairrão et al., 2009).

No cérebro, a árvore vascular é constituída pelas SMC vasculares e das arteríolas e por pericitos constituintes dos capilares (Hill et al., 2015). Para além disso, também apresenta células endoteliais. Desta forma, foi necessário avaliar se as células presentes na cultura estabelecida correspondiam a SMC vasculares como pretendido, ou outro tipo celular que se encontra na UNV em constante comunicação. Para isso recorremos a técnica de imunocitoquímica contra a α -actina, um conhecido marcador para SMC no estado contrátil e vWF, conhecido por marcar o fator de Von-Willebrand, um complexo expresso por células endoteliais. Os resultados obtidos confirmaram a presença de células musculares na cultura numa percentagem de cerca de 90% em relação ao número total de células, determinado através da marcação dos núcleos com Hoescht, um composto que intercala a cadeia de DNA. A ausência de marcação para vWF foi indicativo da ausência de contaminação da cultura com células endoteliais. O controlo negativo realizado para o anticorpo da α -actina mostrou que este é específico para células musculares. Era também importante realizar um controlo positivo para o anticorpo de células endoteliais de forma a ter a certeza que este se encontrava em bom estado e que era específico para células endoteliais, contudo a validação deste anticorpo já tinha sido previamente realizada pelo nosso grupo (Cairrão et al., 2009). Segundo Rensen *et al.* e Patel *et al.* o marcador por nós utilizado para marcação das células musculares é específico para a proteína contrátil α -actina (Patel et al., 2016; Rensen et al., 2007). Como as SMC em cultura detêm um fenótipo de proliferação (Rensen et al., 2007), foi necessário estimular a passagem para um estado contrátil através de incubações com meio de

cultura sem soro. Para caracterizarmos a cultura de uma forma mais completa, testámos diferentes tempos de incubações com meio sem soro e em diferentes passagens da cultura celular. Como se observa nos resultados obtidos não houve diferenças significativas entre condições, indicando que 24h em meio sem soro são suficientes para cerca de 90% da cultura passar de um estado sintético para contrátil e que a percentagem de células com esse fenótipo não se altera com o incremento do número de horas que as células permanecem em meio sem soro. No entanto, alguns autores indicam que o marcador α -actina também pode ser expresso por outro tipo de células, nomeadamente miofibroblastos (Pokrywczynska et al., 2016) e que é recomendado o uso de um maior número de marcadores de diferenciação para melhor caracterização do fenótipo específico das SMC em cultura (Adhikari et al., 2015). Deste modo, teria sido importante a analisar a expressão de outras proteínas específicas do estado contrátil nas SMC.

Uma vez confirmado que a cultura era de SMC e que estas eram capazes de mudar do fenótipo sintético para contrátil através de incubações com meio de cultura sem soro, foi necessário avaliar a funcionalidade das células. *In vivo*, as SMC fazem parte das paredes dos vasos sanguíneos e contribuem para o tónus vascular e para a regulação do diâmetro dos vasos sanguíneos, pressão sanguínea e distribuição do fluxo sanguíneo (Badaut and Bix, 2014), contraindo ou relaxando em resposta a diversos estímulos. Deste modo, foi necessário verificar se *in vitro* as SMC em cultura mantinham a mesma capacidade de responder a agentes contráteis e relaxantes, tal como acontece *in vivo*. Para isso recorreremos à técnica de PCSA utilizando dois agentes contráteis bastante conhecidos, 5-HT e NA e como agente relaxante o SNP. A escolha dos agentes utilizados foi com base em estudos previamente realizados em artérias cerebrais de rato que mostram que estas contraem na presença de serotonina, através da ativação dos seus principais recetores expressos no cérebro 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A} (Edvinsson et al., 2014; Hoel et al., 2001; Kovacs et al., 2012) e na presença de noradrenalina pelo recetor adrenérgico α ₁ (Goyal et al., 2010). Estes autores sugerem que os recetores maioritariamente envolvidos na contração induzida pela serotonina nas artérias cerebrais são os 5-HT_{1B}, enquanto os 5-HT_{2A} estão mais envolvidos nas respostas vasoconstritoras periféricas (Kovacs et al., 2012; Longo and Goyal, 2013). Kovacs *et. al* mostraram ainda que os recetores 5-HT_{2A} são mais ativos na presença de uma elevada concentração de serotonina e que pelo contrário os 5-HT_{1B} são mais sensíveis e conseguem ativar-se a baixas concentrações (Kovacs et al., 2012). Para além dos recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A} que estão envolvidos na vasoconstrição, a serotonina tem também o 5-HT₇ que é um recetor vasodilatador acoplado a proteína G_s, estimuladora da adenilato ciclase (Santos-Silva et al., 2009). O efeito geral da serotonina é mediado pela combinação destes recetores. Também na presença de noradrenalina existem autores que demonstram a contração da artéria cerebral média, num efeito mediado pela ativação dos recetores adrenérgicos α ₁, dos quais a NA é agonista (Goyal et al., 2010). No entanto, o efeito que a noradrenalina apresenta nas artérias cerebrais não é apenas vasoconstritor. Estudos indicam que as artérias cerebrais

expressam também recetores adrenérgicos β_1 cuja ativação provoca vasodilatação num mecanismo que envolve os K_v (Longo and Goyal, 2013; Moore et al., 2015). Estes recetores são acoplados à proteína Gs que ativa a adenilato ciclase, mediando desta forma o vasorelaxamento (Longo and Goyal, 2013; Mariana et al., 2016).

Os dados da técnica de *PCSA* são obtidos através de fotografias processadas por um programa específico que torna possível a medição da área celular. Desta forma, uma maior percentagem de contração corresponde a uma maior diminuição da área, enquanto que uma maior percentagem de relaxamento, indica um aumento da área. Em cada experiência foi tirada uma foto inicial após a qual foram esperados 20 minutos sem qualquer adição de agentes. No fim desses 20 minutos é tirada uma nova fotografia. A diferença de áreas entre a primeira e segunda fotografia corresponde à contração controlo, a área que a célula reduziu sem qualquer influência de agentes contráteis. Tanto os controlos efetuados para a 5-HT como para a NA, têm uma percentagem de contração na ordem dos 10%, com exceção do controlo efetuado para a 5-HT às 48h. Isto pode indicar que esta variação corresponde a adaptações morfológicas da célula à mudança de meio e não uma percentagem de contração real, pois antes da experiência, as células são mudadas de um meio de cultura sem soro, para o meio de Krebs. Quando adicionamos 5-HT, a percentagem de contração é significativa tanto às 24h como às 48h, sendo esta na ordem dos 20%. Estes resultados indicam que as células em cultura são responsivas à serotonina, provavelmente através dos seus recetores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}. A atividade contrátil mediada por estes dois recetores depende de mecanismos diferentes. O 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} envolvem a ligação da proteína G_i que inibe a adenil ciclase enquanto que o 5-HT_{2A} envolve a ligação da proteína $G_q/11$ que ativa a PLC aumentando os níveis de IP₃ (Longo and Goyal, 2013; Santos-Silva et al., 2009; Verheggen et al., 2006).

No caso da contração com noradrenalina, os resultados indicam que as células são mais responsivas após 24h de incubação com meio sem soro do que após 48h. Na incubação às 24h, as células contraem cerca de 20% em resposta à NA, enquanto que às 48h contraem apenas cerca de 15%. Isto pode indicar que uma maior incubação com meio sem soro influencia a expressão e atividade dos recetores adrenérgicos α_1 , tornando as células menos responsivas à NA. Os recetores α_1 ligam-se à NA, ou a outras amins biogénicas e, através de recetores acoplados a proteínas do tipo G_q estimulam a atividade da PLC (Purkayastha and Raven, 2011). A PLC promove a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato originando IP₃ e DAG que vão atuar como segundos mensageiros na libertação de cálcio dos reservatórios intracelulares. Este aumento de cálcio promove a ativação da PKC que ativa a cascata de eventos sinalizadores que culminam na vasoconstrição (Purkayastha and Raven, 2011). Desta forma, observando os resultados obtidos, um maior tempo de incubação com meio sem soro pode afetar a via de sinalização dos recetores α_1 , levando a uma resposta vasoconstritora menor. A

expressão e atividade dos recetores e canais referentes aos agentes contráteis utilizados será um fator de análise importante para melhor compreender a responsividade das SMC.

O perfil temporal da resposta contrátil a cada agente foi também analisado. No perfil de contração da serotonina podemos observar que a partir dos 16 minutos as células atingem uma contração máxima a partir da qual estabilizam, indicando que o período ao qual foi analisada a contração (20 min) foi suficiente para determinar o efeito máximo induzido pela 5-HT. A resposta à noradrenalina foi similar à da 5-HT. Após os 16 minutos, as células atingiram a contração máxima em resposta à NA. O perfil de contração induzida por cada agente é similar. A única diferença significativa entre os dois perfis está relacionada com o tempo que cada agente demora a iniciar a resposta celular, isto é, aos 2 minutos após adição de NA já é possível observar diminuição da área celular, enquanto que as células induzidas por 5-HT aos 2 minutos ainda não apresentam uma resposta celular significativa. Estas diferenças observadas podem dever-se aos diferentes mecanismos envolvidos no processo de contração de cada agente.

As SMC, como principais reguladoras do tónus vascular, têm de contrair e relaxar para manter um fluxo sanguíneo constante. Assim foi importante verificar se após a contração com 5-HT e NA, as SMC continuavam responsivas e capazes de relaxar perante estímulos vasodilatadores. Para isso, utilizamos como agente relaxante o nitroprussiato de sódio. O SNP é um dador de óxido nítrico que induz relaxamento vascular através da ativação da guanilato ciclase solúvel e, consequentemente, o aumento de GMP cíclico (Cogolludo et al., 2001; Stewart et al., 2013). O GMP cíclico promove o relaxamento ao diminuir a concentração de cálcio intracelular pela ativação da ATPase no RS e na membrana plasmática ou de canais de potássio (Cogolludo et al., 2001). A resposta das artérias cerebrais ao SNP é ainda contraditória. Estudos realizados em artérias cerebrais humanas indicam que, na presença de SNP, o diâmetro das artérias e o fluxo sanguíneo não se alteram (Joshi et al., 2002). Em contrapartida, estudos em babuínos e porcos mostram o efeito vasodilatador do SNP nas artérias cerebrais, inclusive na artéria cerebral média (Cogolludo et al., 2001; Schumann-Bard et al., 2005; Stewart et al., 2013). Os dados obtidos no presente estudo mostraram que após uma primeira contração com serotonina ou noradrenalina as SMC em cultura foram capazes de relaxar quando expostas a SNP. O relaxamento induzido é significativamente maior quando as células são pré-contraídas com NA (cerca de 45%) do que quando são contraídas com 5-HT (cerca de 35%). Tendo em conta que a percentagem de contração induzida por cada agente é similar, as diferenças no relaxamento podem ser explicadas pelas diferentes ações vasculares que a NA e a 5-HT apresentam.

Em conjunto estes resultados demonstram que o modelo desenvolvido para cultura de SMC da artéria cerebral média é viável, uma vez que origina SMC capazes de alterar de fenótipo sintético para contrátil e posteriormente responder a estímulos vasoconstritores ou vasorelaxantes tal como acontece *in vivo*.

Capítulo 6

Conclusão e Perspetivas Futuras

6 Conclusão e Perspetivas Futuras

As doenças cerebrovasculares são cada vez mais frequentes e uma das principais causas de morte na população ocidental. Com o aumento das ocorrências, a ciência tem procurado desenvolver métodos para facilitar a investigação nesta área. As culturas celulares são cada vez mais utilizadas, pois são de fácil utilização e até certo ponto permitem mimetizar o que ocorre *in vivo*. Deste modo, o desenvolvimento de uma cultura de SMC derivadas da artéria cerebral média é de grande importância para a investigação nesta área, podendo por exemplo ser aplicada em estudos de interações celulares entre as células do sistema vascular e neuronal. Os resultados obtidos com este trabalho mostram que a cultura implementada, uma cultura de SMC, não se encontrada contaminada por células endoteliais ou fibroblastos. As células obtidas marcaram para a proteína contrátil α -actina, característica de um fenótipo contrátil. No entanto, será necessário utilizar um maior número de marcadores para proteínas expressas no estado contrátil, para uma melhor caracterização, por exemplo através da técnica de real-time PCR ou de Western-blot.

As células obtidas foram capazes de contrair em resposta à 5-HT e à NA e de relaxar em resposta ao SNP. Para um estudo mais completo, e de forma a comprovar os resultados obtidos, seria interessante utilizar a técnica de *Patch-Clamp* para estudar o efeito dos agentes contráteis e relaxantes nas correntes mediadas por canais de cálcio e de potássio. Analisar a expressão dos recetores nas SMC, seria também um ponto importante na caracterização da cultura.

Em conclusão, a cultura obtida é muito enriquecida em SMC e as células são funcionais, o que suporta o seu uso como modelo *in vitro* da artéria cerebral média e em estudos de interação entre o sistema vascular e neuronal.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

- Adhikari, N., K. C. Shekar, R. Staggs, Z. Win, K. Steucke, Y. W. Lin, L. N. Wei, P. Alford, and J. L. Hall, 2015, Guidelines for the Isolation and Characterization of Murine Vascular Smooth Muscle Cells. A Report from the International Society of Cardiovascular Translational Research: *J Cardiovasc Transl Res*, v. 8, p. 158-63.
- Amberg, G. C., and L. F. Santana, 2006, Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 291, p. C348-56.
- Andreone, B. J., B. Lacoste, and C. Gu, 2015, Neuronal and vascular interactions: *Annu Rev Neurosci*, v. 38, p. 25-46.
- Badaut, J., and G. J. Bix, 2014, Vascular neural network phenotypic transformation after traumatic injury: potential role in long-term sequelae: *Transl Stroke Res*, v. 5, p. 394-406.
- Bannister, J. P., A. Adebijiyi, G. Zhao, D. Narayanan, C. M. Thomas, J. Y. Feng, and J. H. Jaggard, 2009, Smooth muscle cell alpha2delta-1 subunits are essential for vasoregulation by CaV1.2 channels: *Circ Res*, v. 105, p. 948-55.
- Borsotto, M., J. Veysiére, H. Moha ou Maati, C. Devader, J. Mazella, and C. Heurteaux, 2015, Targeting two-pore domain K⁺ channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept: *Br J Pharmacol*, v. 172, p. 771-84.
- Brayden, J. E., S. Earley, M. T. Nelson, and S. Reading, 2008, Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow: *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 35, p. 1116-20.
- Brayden, J. E., Y. Li, and M. J. Tavares, 2013, Purinergic receptors regulate myogenic tone in cerebral parenchymal arterioles: *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 33, p. 293-9.
- Brenner, R., G. J. Pérez, A. D. Bonev, D. M. Eckman, J. C. Kosek, S. W. Wiler, A. J. Patterson, M. T. Nelson, and R. W. Aldrich, 2000, Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel: *Nature*, v. 407, p. 870-6.
- Cairrão, E., A. J. Santos-Silva, E. Alvarez, I. Correia, and I. Verde, 2009, Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels: *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v. 45, p. 175-84.
- Campbell, J. H., and G. R. Campbell, 1993, Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle: *Clin Sci (Lond)*, v. 85, p. 501-13.
- Chen, T. T., K. D. Luykenaar, E. J. Walsh, M. P. Walsh, and W. C. Cole, 2006, Key role of Kv1 channels in vasoregulation: *Circ Res*, v. 99, p. 53-60.
- Chen, X. Y., and M. Fisher, 2016, Pathological Characteristics: *Front Neurol Neurosci*, v. 40, p. 21-33.

- Cogolludo, A. L., F. Pérez-Vizcaíno, F. Zaragoza-Arnáez, M. Ibarra, G. López-López, V. López-Miranda, and J. Tamargo, 2001, Mechanisms involved in SNP-induced relaxation and $[Ca^{2+}]_i$ reduction in piglet pulmonary and systemic arteries, *Br J Pharmacol*, v. 132, p. 959-67.
- Contard, F., A. Sabri, M. Glukhova, S. Sartore, F. Marotte, J. P. Pomies, P. Schiavi, D. Guez, J. L. Samuel, and L. Rappaport, 1993, Arterial smooth muscle cell phenotype in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: *Hypertension*, v. 22, p. 665-76.
- Dabertrand, F., M. T. Nelson, and J. E. Brayden, 2013, Ryanodine receptors, calcium signaling and regulation of vascular tone in the cerebral parenchymal microcirculation: *Microcirculation*, v. 20, p. 307-16.
- Daneman, R., and A. Prat, 2015, The blood-brain barrier: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 7, p. a020412.
- Dunn, K. M., and M. T. Nelson, 2010, Potassium Channels and Neurovascular Coupling: *Circ J*, v. 74, p. 608-16.
- Earley, S., 2013, TRPM4 channels in smooth muscle function: *Pflugers Arch*, v. 465, p. 1223-31.
- Earley, S., and J. E. Brayden, 2015, Transient receptor potential channels in the vasculature: *Physiol Rev*, v. 95, p. 645-90.
- Earley, S., T. J. Heppner, M. T. Nelson, and J. E. Brayden, 2005, TRPV4 forms a novel Ca^{2+} signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels: *Circ Res*, v. 97, p. 1270-9.
- Edvinsson, L., G. K. Povlsen, H. Ahnstedt, and R. Waldsee, 2014, CaMKII inhibition with KN93 attenuates endothelin and serotonin receptor-mediated vasoconstriction and prevents subarachnoid hemorrhage-induced deficits in sensorimotor function: *J Neuroinflammation*, v. 11, p. 207.
- El-Rahman, R. R. A., O. F. Harraz, S. E. Brett, Y. Anfinogenova, R. E. Mufti, D. Goldman, and D. G. Welsh, 2013, Identification of L- and T-type Ca^{2+} channels in rat cerebral arteries: role in myogenic tone development, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 304, p. H58-71.
- Enyedi, P., and G. Czirjak, 2010, Molecular background of leak K^+ currents: two-pore domain potassium channels: *Physiol Rev*, v. 90, p. 559-605.
- Esperança Pina, A., 2000, *Anatomia Humana da Relação - Parte II*, v. II, LIDEL, 571-582 p.
- Essin, K., and M. Gollasch, 2009, Role of Ryanodine Receptor Subtypes in Initiation and Formation of Calcium Sparks in Arterial Smooth Muscle: Comparison with Striated Muscle: *J Biomed Biotechnol*, v. 2009.
- Filosa, J., X. Yao, and G. Rath, 2013, TRPV4 and the regulation of vascular tone: *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 61, p. 113-9.
- Filosa, J. A., H. W. Morrison, J. A. Iddings, W. Du, and K. J. Kim, 2016, Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone: *Neuroscience*, v. 323, p. 96-109.

- FitzGerald, M. J. T., and J. Folan-Curran, 2002, *Clinical Neuroanatomy and Related Neuroscience*, W.B. Saunders, 43-54 p.
- Gauthier, S. A., S. Sahoo, S. S. Jung, and E. Levy, 2012, Murine cerebrovascular cells as a cell culture model for cerebral amyloid angiopathy: isolation of smooth muscle and endothelial cells from mouse brain: *Methods Mol Biol*, v. 849, p. 261-74.
- Gonzales, A. L., and S. Earley, 2013, Regulation of cerebral artery smooth muscle membrane potential by Ca²⁺-activated cation channels: *Microcirculation*, v. 20, p. 337-47.
- Goyal, R., A. Mittal, N. Chu, L. Zhang, and L. D. Longo, 2010, α 1-Adrenergic receptor subtype function in fetal and adult cerebral arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 298, p. H1797-806.
- Grayson, T. H., T. V. Murphy, and S. L. Sandow, 2017, Transient receptor potential canonical type 3 channels: Interactions, role and relevance - A vascular focus: *Pharmacol Ther*.
- Haddy, F. J., P. M. Vanhoutte, and M. Feletou, 2006, Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 290, p. R546-52.
- Han, M., J. K. Wen, B. Zheng, Y. Cheng, and C. Zhang, 2006, Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 291, p. C50-8.
- Harraz, O. F., R. R. Abd El-Rahman, K. Bigdely-Shamloo, S. M. Wilson, S. E. Brett, M. Romero, A. L. Gonzales, S. Earley, E. J. Vigmond, A. Nygren, B. K. Menon, R. E. Mufti, T. Watson, Y. Starreveld, T. Furstenhaupt, P. R. Muellerleile, D. T. Kurjiaka, B. D. Kyle, A. P. Braun, and D. G. Welsh, 2014, Ca(V)_{3.2} channels and the induction of negative feedback in cerebral arteries: *Circ Res*, v. 115, p. 650-61.
- Hill, R. A., L. Tong, P. Yuan, S. Murikinati, S. Gupta, and J. Grutzendler, 2015, Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes: *Neuron*, v. 87, p. 95-110.
- Hoel, N. L., J. Hansen-Schwartz, and L. Edvinsson, 2001, Selective up-regulation of 5-HT(1B/1D) receptors during organ culture of cerebral arteries: *Neuroreport*, v. 12, p. 1605-8.
- Howitt, L., S. L. Sandow, T. H. Grayson, Z. E. Ellis, M. J. Morris, and T. V. Murphy, 2011, Differential effects of diet-induced obesity on BKCa β 1-subunit expression and function in rat skeletal muscle arterioles and small cerebral arteries: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 301, p. H29-40.
- Irving, E. A., and M. Bamford, 2002, Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury: *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 22, p. 631-47.
- Joshi, S., W. L. Young, H. Duong, B. A. Aagaard, N. D. Ostapkovich, E. S. Connolly, and J. Pile-Spellman, 2002, Intracarotid nitroprusside does not augment cerebral blood flow in human subjects: *Anesthesiology*, v. 96, p. 60-6.
- Jullienne, A., and J. Badaut, 2013, Molecular contributions to neurovascular unit dysfunctions after brain injuries: lessons for target-specific drug development: *Future Neurol*, v. 8, p. 677-689.

- Jullienne, A., A. Obenaus, A. Ichkova, C. Savona-Baron, W. J. Pearce, and J. Badaut, 2016, Chronic cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury: *J Neurosci Res*, v. 94, p. 609-22.
- Keaney, J., and M. Campbell, 2015, The dynamic blood-brain barrier: *FEBS J*, v. 282, p. 4067-79.
- Kovacs, A., L. G. Harsing, Jr., and G. Szenasi, 2012, Vasoconstrictor 5-HT receptors in the smooth muscle of the rat middle cerebral artery: *Eur J Pharmacol*, v. 689, p. 160-4.
- Kuo, I. Y., S. E. Wölfle, and C. E. Hill, 2011, T-type calcium channels and vascular function: the new kid on the block?: *J Physiol*, v. 589, p. 783-95.
- Liao, Y., A. M. Kristiansen, C. P. Oksvold, F. A. Tuvnes, N. Gu, E. Rundén-Pran, P. Ruth, M. Sausbier, and J. F. Storm, 2010, Neuronal Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Limit Brain Infarction and Promote Survival, *PLoS One*, v. 5.
- Liebeskind, D. S., and L. R. Caplan, 2016, Intracranial Arteries - Anatomy and Collaterals: *Front Neurol Neurosci*, v. 40, p. 1-20.
- Liu, W., D. Wang, K. Song, L. Chen, Y. Zhu, and P. Liu, 2014, Inhibition of 15-lipoxygenase (15-LOX) reverses hypoxia-induced down-regulation of potassium channels Kv1.5 and Kv2.1: *Int J Clin Exp Med*, v. 7, p. 4147-53.
- Liu, Y., D. R. Harder, and J. H. Lombard, 2002, Interaction of myogenic mechanisms and hypoxic dilation in rat middle cerebral arteries: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 283, p. H2276-81.
- Liu, Z., and M. Chopp, 2016, Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: *Prog Neurobiol*, v. 144, p. 103-20.
- Longden, T. A., D. C. Hill-Eubanks, and M. T. Nelson, 2016, Ion channel networks in the control of cerebral blood flow: *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 36, p. 492-512.
- Longden, T. A., and M. T. Nelson, 2015, Vascular Inward Rectifier K⁺ Channels as External K⁺ Sensors in the Control of Cerebral Blood Flow: *Microcirculation*, v. 22, p. 183-96.
- Longo, L. D., and R. Goyal, 2013, Cerebral Artery Signal Transduction Mechanisms: Developmental Changes in Dynamics and Ca²⁺ Sensitivity: *Curr Vasc Pharmacol*, v. 11, p. 655-711.
- Machado, A., 2006, *Neuroanatomia Funcional*, Atheneu, 87-92 p.
- Mariana, M., J. Feiteiro, E. Cairrao, and I. Verde, 2016, Mifepristone is a Vasodilator Due to the Inhibition of Smooth Muscle Cells L-Type Ca²⁺ Channels: *Reprod Sci*, v. 23, p. 723-30.
- Martin de Llano, J. J., G. Fuertes, C. Garcia-Vicent, I. Torro, J. L. Fayos, and E. Lurbe, 2007, Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels: *Transl Res*, v. 149, p. 1-9.
- Mazza, G., E. Roßmanith, I. Lang-Olip, and D. Pfeiffer, 2016, Marker profile for the evaluation of human umbilical artery smooth muscle cell quality obtained by different isolation and culture methods, *Cytotechnology*, v. 68, p. 701-11.

- Mendes-Oliveira, J., F. Lopes Campos, R. A. Videira, and G. Baltazar, 2017, GPER activation is effective in protecting against inflammation-induced nigral dopaminergic loss and motor function impairment: *Brain Behav Immun*, v. 64, p. 296-307.
- Mishra, A., 2016, Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature: *J Physiol*.
- Moore, C. L., S. J. McClenahan, H. M. Hanvey, D. S. Jang, P. L. Nelson, B. K. Joseph, and S. W. Rhee, 2015, Beta1-adrenergic receptor-mediated dilation of rat cerebral artery requires Shaker-type KV1 channels on PSD95 scaffold: *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 35, p. 1537-46.
- Muoio, V., P. B. Persson, and M. M. Sendeski, 2014, The neurovascular unit - concept review: *Acta Physiol (Oxf)*, v. 210, p. 790-8.
- Narayanan, D., S. Bulley, M. D. Leo, S. K. Burris, K. S. Gabrick, F. A. Boop, and J. H. Jaggar, 2013, Smooth muscle cell transient receptor potential polycystin-2 (TRPP2) channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries: *J Physiol*, v. 591, p. 5031-46.
- Oishi, K., Y. Ogawa, S. Gamoh, and M. K. Uchida, 2002, Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells: *J Physiol*, v. 540, p. 139-52.
- Patel, J. J., S. Srivastava, and R. C. Siow, 2016, Isolation, Culture, and Characterization of Vascular Smooth Muscle Cells: *Methods Mol Biol*, v. 1430, p. 91-105.
- Piascik, M. T., and D. M. Perez, 2001, Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions: *J Pharmacol Exp Ther*, v. 298, p. 403-10.
- Pokrywczynska, M., D. Balcerczyk, A. Jundzill, M. Gagat, M. Czapiewska, T. Kloskowski, M. Nowacki, A. M. Gastecka, M. Bodnar, A. Grzanka, A. Marszalek, and T. Drewa, 2016, Isolation, expansion and characterization of porcine urinary bladder smooth muscle cells for tissue engineering, *Biol Proced Online*, v. 18.
- Purkayastha, S., and P. B. Raven, 2011, The functional role of the alpha-1 adrenergic receptors in cerebral blood flow regulation: *Indian J Pharmacol*, v. 43, p. 502-6.
- Rensen, S. S., P. A. Doevendans, and G. J. van Eys, 2007, Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity: *Neth Heart J*, v. 15, p. 100-8.
- Rodrigo, G. C., and N. B. Standen, 2005, ATP-sensitive potassium channels: *Curr Pharm Des*, v. 11, p. 1915-40.
- Roque, C., and G. Baltazar, 2017, Impact of Astrocytes on the Injury Induced by In Vitro Ischemia: *Cell Mol Neurobiol*.
- Rubaiy, H. N., 2016, The therapeutic agents that target ATP-sensitive potassium channels: *Acta Pharm*, v. 66, p. 23-34.
- Santos-Silva, A. J., E. Cairrao, B. Marques, and I. Verde, 2009, Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors: *Reprod Sci*, v. 16, p. 1175-85.
- Schumann-Bard, P., O. Touzani, A. R. Young, J. Toutain, J. C. Baron, E. T. Mackenzie, and E. A. Schmidt, 2005, Cerebrovascular effects of sodium nitroprusside in the

- anaesthetized baboon: a positron emission tomographic study: *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 25, p. 535-44.
- Sepúlveda, F. V., L. Pablo Cid, J. Teulon, and M. I. Niemeyer, 2015, Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K2P and Kir K⁺-transport channels: *Physiol Rev*, v. 95, p. 179-217.
- Sepúlveda, F. V., L. Pablo Cid, J. Teulon, and M. I. Niemeyer, 2015, Molecular Aspects of Structure, Gating, and Physiology of pH-Sensitive Background K2P and Kir K⁺-Transport Channels, *Physiol Rev*, v. 95, p. 179-217.
- Singh, H., R. Lu, J. C. Bopassa, A. L. Meredith, E. Stefani, and L. Toro, 2013, mitoBKCa is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location, *Proc Natl Acad Sci U S A*, p. 10836-41.
- Snell, R., 2001, *Clinical Neuroanatomy for Medical Students: USA*, Lippincott Williams & Wilkins, 474-476 p.
- Stewart, J. M., M. S. Medow, A. DelPozzi, Z. R. Messer, C. Terilli, and C. E. Schwartz, 2013, Middle cerebral O₂ delivery during the modified Oxford maneuver increases with sodium nitroprusside and decreases during phenylephrine: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 304, p. H1576-83.
- Tano, J. Y., and M. Gollasch, 2014, Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update: *Front Physiol*, v. 5, p. 381.
- Ureña, J., M. Fernández-Tenorio, C. Porras-González, P. González-Rodríguez, A. Castellano, and J. López-Barneo, 2013, A new metabotropic role for L-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle contraction: *Curr Vasc Pharmacol*, v. 11, p. 490-6.
- Venkat, P., M. Chopp, and J. Chen, 2016, New insights into coupling and uncoupling of cerebral blood flow and metabolism in the brain: *Croat Med J*, v. 57, p. 223-8.
- Verheggen, R., I. Werner, A. Lucker, M. Bruss, M. Gothert, and A. J. Kaumann, 2006, 5-Hydroxytryptamine-induced contraction of human temporal arteries coexpressing 5-HT_{2A} receptors and wild-type or variant (Phe124Cys) 5-HT_{1B} receptors: increased contribution of 5-HT_{1B} receptors to the total contractile amplitude in arteries from Phe124Cys heterozygous individuals: *Pharmacogenet Genomics*, v. 16, p. 601-7.
- Yamada, K., 2016, Vascular potassium channels in NVC: *Prog Brain Res*, v. 225, p. 63-73.
- Yang, J., J. W. Clark, R. M. Bryan, and C. Robertson, 2003, The myogenic response in isolated rat cerebrovascular arteries: smooth muscle cell model: *Med Eng Phys*, v. 25, p. 691-709.
- Yu, G. X., M. Mueller, B. E. Hawkins, B. P. Mathew, M. A. Parsley, L. A. Vergara, H. L. Hellmich, D. S. Prough, and D. S. Dewitt, 2014, Traumatic brain injury in vivo and in vitro contributes to cerebral vascular dysfunction through impaired gap junction communication between vascular smooth muscle cells: *J Neurotrauma*, v. 31, p. 739-48.