



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeito dos androgénios na regulação do tónus da artéria umbilical, na hipertensão arterial da gravidez

Ana Filipa Silva Esteves

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

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues
Coorientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Covilhã, outubro de 2013

Dedicatória

À minha família pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero deixar aqui o meu sincero e especial agradecimento à Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues por me ter confiado este projeto, pela orientação ao longo do mesmo, pelos ensinamentos teóricos e práticos que me facultou e pela paciência e disponibilidade demonstrados ao longo da minha adaptação às novas técnicas laboratoriais.

Agradeço ao Professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños, pelo apoio e disponibilidade para esclarecer e ensinar, sempre que se revelou necessário.

Um obrigado ao Professor Doutor Cláudio Maia pela paciência, ajuda, dedicação e conhecimentos teóricos e práticos transmitidos sobre o PCR em tempo real. O sincero meu agradecimento.

Agradeço à Ana Martinho pelo tempo disponibilizado a ensinar e discutir os dados obtidos no PCR em tempo real ao longo deste trabalho.

A toda a equipa do Centro de Investigação, que se mostraram disponíveis para ajudar sempre que foi necessário, em particular aos colegas de laboratório, Melissa, Joana e Paulo por todo o apoio técnico e científico.

Um agradecimento especial á Joana minha colega de laboratório e acima de tudo amiga. Nada disto seria possível sem o teu olhar crítico, as nossas conversas, as nossas risadas, contigo cresci como investigadora e pessoa. Foste o meu porto de abrigo quando as coisas não corriam pelo melhor caminho. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas, Armanda Gonçalves, Cláudia Sousa, Tatiana Saraiva, por me ouvirem, ajudarem e apoiarem sempre que foi necessário. Vou ter muitas saudades dos nossos encontros nos corredores do CICS, dos nossos almoços, das nossas conversas e risadas. Um beijinho cheio de saudade.

Ao José Eduardo pela pessoa maravilhosa que é e por todo amor incondicional, carinho e força que me deu ao longo deste trabalho. És-me tudo!

Por fim um agradecimento especial a toda a minha família. Aos meus pais e à minha irmã, pela força e apoio que me deram, sem eles não seria possível concretizar esta longa caminhada. Também agradeço aos meus avós, tios e primos por me aconselharem e acreditarem em mim. Um beijinho para todos.

Resumo

Nas últimas décadas, vários investigadores têm sugerido uma associação entre os androgénios e a hipertensão. Os efeitos benéficos dos androgénios no sistema vascular estão associados com a sua capacidade para provocar vasorelaxamento vascular. Os efeitos não genómicos dos androgénios nas células vasculares do músculo liso parecem ser devidos à ativação dos canais de potássio ativados pelo Ca^{2+} de elevada condutância (BK_{Ca}) e dos canais de potássio sensíveis à voltagem (K_v) e/ou à inibição dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem tipo L (L-VOCC). Contudo os efeitos genómicos dos androgénios, nomeadamente na expressão destes canais iónicos, são pouco conhecidos. No entanto em estudos anteriores observou-se que os androgénios podem ser benéficos a nível cardiovascular pois têm efeitos vasodilatadores, e aumentam a expressão dos canais BK_{Ca} e dos K_v .

A hipertensão é um dos problema mais comuns na gravidez que complica 5% a 10% das situações de gravidez. Apesar da morbilidade significativa associada aos bebés nascidos de grávidas com hipertensão, a patogénese permanece por esclarecer, o que limita a capacidade de preveni-la e trata-la. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos genómicos dos androgénios na expressão de diferentes proteínas envolvidas na regulação da contratilidade vascular, nomeadamente da guanilato ciclase solúvel (sGC), do recetor do péptido natriurético-A (NPRA) e da proteína cinase G (PKG). Estas proteínas parecem estar envolvidas no mecanismo vasodilatador provocado pelos androgénios. Este trabalho também teve como objetivo a comparação entre os níveis de expressão destas proteínas em artérias umbilicais humanas (HUA) provenientes de grávidas normotensas e de grávidas hipertensas. Para atingir estes objetivos foi utilizada a técnica de PCR em tempo real em células do músculo liso de HUA, as quais foram pré-incubadas durante 24 horas com DHT (1-1000nM).

Em células musculares de HUA provenientes de grávidas normotensas, os androgénios provocaram uma diminuição da expressão da sGC e da PKG, e um aumento na expressão do NPRA. No entanto, em células musculares de HUA provenientes de grávidas hipertensas os androgénios provocam uma diminuição da expressão da sGC, da NPRA e um aumento da expressão da PKG.

Em suma, podemos concluir que o DHT modula a expressão das proteínas analisadas, as quais estão envolvidas no mecanismo vasodilatador dos androgénios.

Palavras chave

Células musculares lisas vasculares, artéria umbilical humana, androgénios, hipertensão, efeitos genómicos, proteína cinase G, guanilato ciclase solúvel, recetor do péptido natriurético-A

Abstract

In recent decades, several researchers have suggested an association between androgens and hypertension. The beneficial effects of androgens in the vascular system are associated with their ability to cause vascular vasorelaxation. The non genomic effects of androgens in vascular smooth muscle appear to be due to activation of large conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) and voltage gated potassium channels (K_v) and/or the inhibition of L-type Ca^{2+} channels voltage dependent (L-VOCC). However, the genomic effects of androgens, particularly in the expression of these ion channels, are little known. However, in earlier studies it was observed that androgens may be beneficial to cardiovascular level because they have vasodilatory effects and increase the expression of BK_{Ca} channels and K_v .

Hypertension is one of the most common problem in pregnancy that complicates 5 % to 10 % of cases of pregnancy. Despite the significant morbidity associated with babies born to pregnant women with hypertension, the pathogenesis remains unclear, which limits the ability to prevent and treat it. The aim of this study was to analyze the genomic effects of androgens on the expression of different proteins involved in the regulation of vascular contractility, including soluble guanylate cyclase (sGC), the natriuretic peptide receptor-A (NPRA) and protein kinase G (PKG). These proteins appear to be involved in the vasodilator mechanism induced by androgens. This study also aimed to compare the expression levels of these proteins in human umbilical artery (HUA) from normotensive and hypertensive pregnant women. To achieve these goals was used the technique of real time PCR in smooth muscle cells of HUA, which were preincubated for 24 hours with DHT (1-1000nM).

HUA muscle cells from normotensive pregnant women, androgens caused a decreased expression of sGC and PKG and an increase in the NPRA expression. However, in HUA muscle cells from pregnant hypertensive women androgens cause a decrease in expression of sGC and NPRA and an increased expression of PKG.

In sum, we conclude that DHT modulates the expression of the analyzed proteins, which are involved in vasodilator mechanism of androgens.

Keywords

Vascular smooth muscle cells, human umbilical artery, androgens, hypertension, genomic effects, protein kinase C, soluble guanylate cyclase, natriuretic peptide receptor-A

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras.....	xiv
Lista de Tabelas	xvi
Lista de acrónimos.....	xvii
Capítulo I – Introdução	1
1.1. Cordão Umbilical.....	1
1.1.2. Artéria Umbilical Humana	2
1.2. Músculo Liso	4
1.2.1. Proteínas participantes no processo contrátil	6
1.3. Canais Iónicos	8
1.3.1. Canais de cálcio	8
1.3.1.1. <i>Canais De Cálcio Dependentes de Voltagem</i>	9
1.3.1.2. <i>Canais de Cálcio Independentes de Voltagem</i>	11
1.3.2. Canais de potássio	13
1.4. Mecanismos envolvidos no tónus vascular	15
1.4.1. Mecanismo contrátil.....	16
1.4.2. Mecanismo de relaxação.....	17
1.5. Nucleótidos Cíclicos	18
1.5.1. Guanilato Ciclase	18
1.5.2. Proteína cinase G.....	24
1.6. Androgénios.....	26
1.6.1. Generalidades.....	26
1.6.2. Mecanismo vasodilatador da testosterona.....	28
1.6.3. Androgénios e as Doenças Cardiovasculares	32
1.6.4. Androgénios e a Hipertensão	32
1.7. Patologias da Gravidez	33
1.7.1. Hipertensão	33

1.7.2. Pré-eclampsia	34
Capítulo II – Objetivo	35
Capítulo III – Materiais e Métodos	36
2.1. Preparação do tecido	36
2.2. Cultura de células.....	36
2.3. Tratamento com 5 α -DHT	37
2.4. Extração do RNA total	37
2.5. Síntese de DNA complementar	38
2.6. PCR convencional	39
2.7. PCR em tempo real	39
2.8. Análise estatística.....	40
Capítulo IV – Resultados	41
4.1. Análise da expressão do mRNA da sGC	41
4.2. Análise da expressão do mRNA do NPRA	44
4.3. Análise da expressão do mRNA da PKG	47
Capítulo V – Discussão	50
Capítulo VI - Conclusões e Perspetivas Futuras	54
Capítulo VII - Bibliografia	55

Lista de figuras

FIGURA 1 - CORTE TRANSVERSAL DO CORDÃO UMBILICAL.	2
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA GERAL DE UMA ARTÉRIA.	3
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA CÉLULA MUSCULAR LISA	4
FIGURA 4 - CARATERÍSTICAS ULTRAESTRURAS DAS SMC COM FENÓTIPO CONTRÁTIL E SINTÉTICO	5
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DOS FILAMENTOS FINOS E GROSSOS.	7
FIGURA 6 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA PROPOSTA PARA OS VOCC	9
FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EVENTOS CHAVE ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS À ATIVAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO OU INIBIÇÃO	13
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO....	17
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA SGC.	19
FIGURA 10 - REGULAÇÃO DA SGC PELOS SEUS LIGANDOS.....	20
FIGURA 11 - ESTRUTURA DA PGC.....	22
FIGURA 12 - ESTRUTURA DOS RECETORES DOS NP.	23
FIGURA 13 - MODELO HIPOTÉTICO DA ATIVAÇÃO E DESENSIBILIZAÇÃO DOS RECETORES NPR-A E B.	24
FIGURA 14 - PAPEL DO PKGI NA MODULAÇÃO DO NÍVEL DO CÁLCIO INTRACELULAR NA PROMOÇÃO DA RELAXAÇÃO DO MÚSCULO LISO.....	25
FIGURA 15 - MECANISMO DA FORMAÇÃO DA DIHIDROTESTOSTERONA, UM POTENTE METABOLITO DA TES	27
FIGURA 16 - EFEITOS NÃO GENÓMICOS (ESQUERDA) E EFEITOS GENÓMICOS (DIREITA) DOS ANDROGÉNIOS.	28
FIGURA 17 - MECANISMO RÁPIDO DA TESTOSTERONA NAS HUASMC	31
FIGURA 19 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DA SGC NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS NORMOTENSAS	41
FIGURA 20 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DA SGC NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS HIPERTENSAS	42
FIGURA 21 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DA SGC NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS NORMOTENSAS <i>VERSUS</i> CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS HIPERTENSAS.....	43
FIGURA 22 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DO NPRA NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS NORMOTENSAS	44
FIGURA 23 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DO NPRA NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS HIPERTENSAS	45
FIGURA 24 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DO NPRA NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS NORMOTENSAS <i>VERSUS</i> CORDÕES PROVENIENTES DE GRÁVIDAS HIPERTENSAS	46
FIGURA 25 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DA PKG NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS NORMOTENSAS	47
FIGURA 26 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DA PKG NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS HIPERTENSAS	48
FIGURA 27 - EFEITO DA 5A-DHT NA EXPRESSÃO DO mRNA DA PKG NAS HUASMC DE CORDÕES PROCEDENTES DE GRÁVIDAS NORMOTENSAS <i>VERSUS</i> CORDÕES PROVENIENTES DE GRÁVIDAS HIPERTENSAS	49

Lista de Tabelas

TABELA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VOCC.....	10
TABELA 2 - FENÓTIPOS DE RATOS E SERES HUMANOS COM MUTAÇÕES QUE LEVAM À INATIVAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA OS RECETORES DOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS.....	23
TABELA 3 - PRIMERS UTILIZADOS PARA PCR EM TEMPO REAL.....	40

Lista de acrónimos

- ANP** péptido natriurético auricular (atrial natriuretic peptide)
- AR** recetor de androgénios (androgen receptor)
- BNP** péptido natriurético do cérebro (brain natriuretic peptide)
- BK_{Ca}** Canal de potássio ativado por cálcio de elevada condutância (Large conductance calcium-activated potassium channel)
- CaM** Calmodulina (Calmodulin)
- cGMP** Monofosfato cíclico de guanosina ou Guanosina monofosfato cíclico (Cyclic Guanosine monophosphate)
- CNP** péptido natriurético do tipo C (C-type natriuretic peptide)
- CVD** Doença Cardiovascular (Cardiovascular disease)
- DAG** Diacilglicerol (Diacylglycerol)
- DHP** Di-hidropiridina
- GC** Guanilato ciclase (Guanylate cyclase)
- HVA** Canais de alta voltagem (high voltage activated)
- HUA** Artéria umbilical humana (Human Umbilical Artery)
- HUASMC** Células Musculares Lisas da Artéria Umbilical Humana (Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells)
- HT** Hipertensão (Hypertension)
- IP3** 1,4,5-Trifosfato de Inositol (Inositol-1,4,5-Triphosphate)
- K_{ATP}** Canais de potássio sensíveis a ATP (ATP -Sensitive Potassium Channels)
- K_{Ca}** Canais de potássio activados por Ca²⁺ (Calcium-Activated Potassium channels)
- K_{IR}** Canais de potássio rectificadores internos (Inwardly Rectifying Potassium Channels)
- K_V** Canais de K⁺ Operados por Voltagem (Voltage-Gated Potassium Channels)
- LVA** Canais de baixa voltagem (low voltage activated)
- L-VOCC** Canal de cálcio dependente da voltagem do tipo-L (L Type voltage operated calcium channels)
- MLC₂₀** Cadeias Leves Reguladoras da Miosina (Myosin Regulatory Light Chains)
- MLCK** Proteína Cinase da Cadeia Leve da Miosina (Myosin-Light-Chain Kinase)
- MLCP** Proteína Fosfatase da Cadeia Leve da Miosina (Myosin-Light-Chain Phosphatase)
- NCX** Permutador Na⁺/Ca²⁺ (Na⁺/Ca²⁺Exchanger)
- NO** Óxido Nítrico (Nitric Oxide)
- NPs** Péptidos Natriuréticos (Natriuretic Peptides)
- NPRA** recetor do péptido natriurético-A (natriuretic peptide receptor-A)
- NPRB** recetor do péptido natriurético-B (natriuretic peptide receptor-B)
- NPRC** recetor do péptido natriurético-C (natriuretic peptide receptor-C)
- PE** Pré-eclampsia
- pGC** Guanilato Ciclase Membranar (Particulate Guanylyl Cyclase)

PKC Proteína Cinase C (Protein Kinase C)
PKG Proteína Cinase G (protein Kinase G or Cyclic GMP-dependent Protein Kinase)
PLC Fosfolipase C (Phospholipase C)
PMCA Ca^{2+} ATPase da Membrana Plasmática (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPases)
ROC Canais Operados por Receptores (Receptor-Operated Channels)
ROCK Proteína cinase dependente da Rho-A (Rho-activated Kinase)
SERCA Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmática (Sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -activated ATPase)
sGC Guanilato ciclase solúvel (Soluble guanylyl cyclase)
SMC - células musculares lisas (Smooth Muscle Cells)
SOC Canal ativado pela depleção sarcoplasmática de cálcio (Store-operated channels)
SUA Artéria umbilical única (single umbilical artery)
Tes Testosterona
T-VOCC Canal de cálcio dependente da voltagem tipo-T (T-type voltage operated calcium channels)
VOCC Canais de cálcio dependentes de voltagem (voltage operated calcium channels)

Capítulo I - Introdução

1.1. Cordão Umbilical

Durante a gravidez existe uma estrutura que permite a ligação entre a mãe e o feto, e é responsável pelo transporte de sangue e nutrientes [1]. O cordão umbilical é uma estrutura vital para o crescimento e bem-estar do feto, começa a formar-se simultaneamente com a placenta na primeira semana de gestação e, apesar de provavelmente ser o único órgão que morre quando a vida começa, é uma das partes mais importantes da união feto-placentária [2]. Tem sido demonstrado que as alterações na morfologia e na constituição do cordão umbilical podem influenciar o curso da gravidez e o nascimento. Vários estudos demonstraram que a composição e o metabolismo alterado do cordão umbilical é frequentemente encontrado em certas doenças da gravidez como a pré-eclampsia (PE), diabetes, hipertensão (HT) entre outras [1, 2]. Esta é uma amostra biológica ideal para o estudo de patologias, pois é de fácil obtenção logo após o nascimento, e pode ser recolhida, sem riscos adicionais para a mãe ou para o feto [3].

No geral, um cordão umbilical normal tem um comprimento médio de 50 a 60 cm, e 1 a 2 cm de diâmetro, e pesa aproximadamente 40g. Porém, podem existir cordões umbilicais de diferentes tamanhos, podendo ser curtos ou longos, não sendo a sua ocorrência comum [1, 3]. Os cordões muito curtos podem causar a separação prematura da placenta da parede do útero, enquanto os cordões excessivamente compridos tem tendência a sofrer prolapso e/ou enrolarem-se em torno do feto e a formarem nós, sendo a sua identificação bastante importante de forma a evitar morte fetal resultante de anóxia fetal [4].

O cordão umbilical tem um aspeto esbranquiçado e é normalmente constituído por três vasos sanguíneos; duas artérias e uma veia, envolvidas por um tecido conjuntivo mucoso - a geleia de Wharton (figura 1) [1]. Contudo, já foram observados cordões umbilicais com apenas uma artéria. A presença de apenas uma artéria umbilical é a anomalia do cordão umbilical menos frequente, estimando-se que afete 0,5 a 2,5% de todas as gestações, e está associada a uma alteração cromossómica e a malformações cardíacas [5].

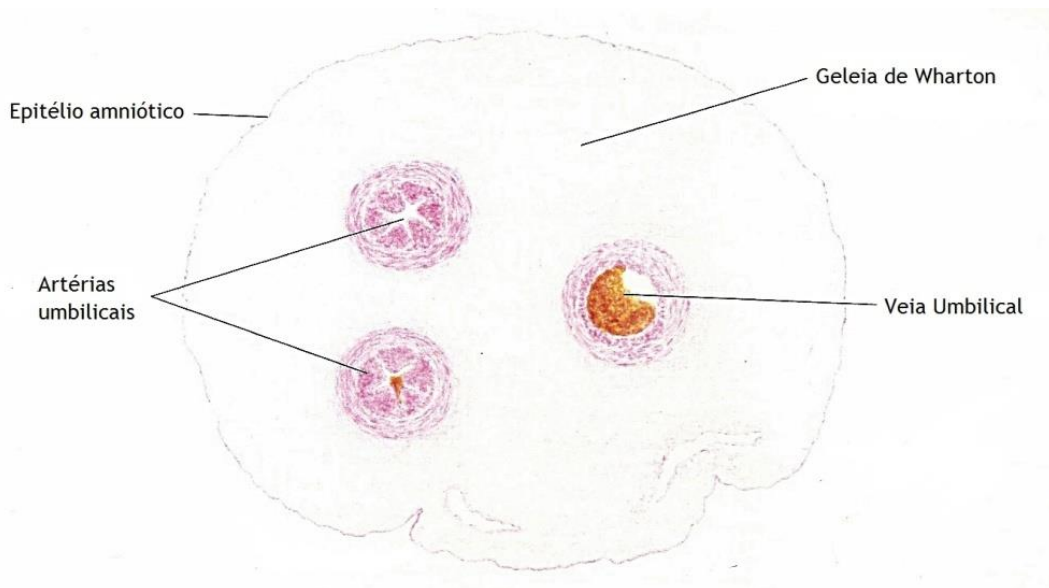


Figura 1 - Corte transversal do cordão umbilical. Adaptado de [6].

A geleia de Wharton constitui a maior parte do cordão umbilical humano e age como uma camada protetora. Apresenta um aspeto gelatinoso e é composta por algumas células estromais mesenquimais e uma matriz extracelular rica em água, glicosaminoglicanos, proteoglicanos (ácido hialurónico e condroitina sulfato) e diferentes tipos de colagénio [7, 8]. Quanto aos vasos umbilicais estes diferem na sua estrutura e na sua função, em comparação com os vasos principais do corpo. A veia umbilical tem maior diâmetro, e a parede mais fina, enquanto que as artérias, são mais estreitas e tem paredes mais espessas. As duas artérias umbilicais enrolam-se em volta da veia de um modo helicoidal e o sangue flui de um modo pulsátil do feto para a placenta, através destas. O retorno do sangue para o feto é feito através da veia umbilical [9].

1.1.2. Artéria Umbilical Humana

A artéria umbilical humana (HUA) está envolvida na circulação feto-placentária e os mecanismos que regulam o estado contrátil desta artéria são muito importantes para otimizar a troca de nutrientes e oxigénio entre o feto e a placenta [10]. A HUA é considerada uma fonte única, útil e de fácil acesso através do cordão umbilical [11]. É uma artéria muscular de calibre médio, entre 1 e 10mm, onde na parede predominam as fibras musculares [12], e é constituída por três túnicas concêntricas, a túnica interna ou íntima, a túnica média, e a túnica externa ou adventícia (figura 2) [13].

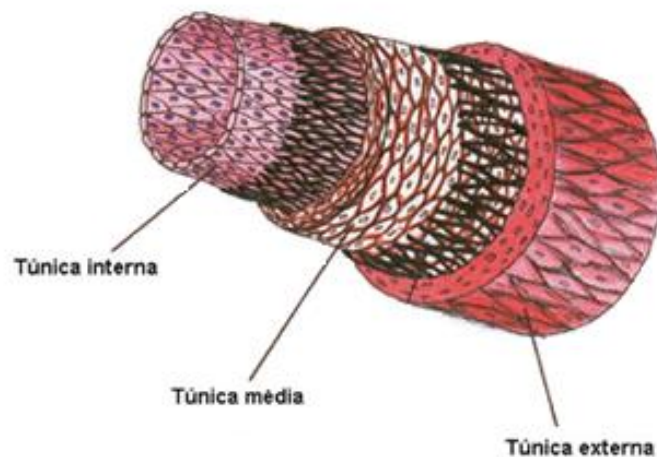


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura geral de uma artéria. Adaptado de [13]

A túnica íntima ou interna é constituída por uma única camada de células endoteliais que está em contato direto com a camada muscular. A túnica média é formada por duas camadas de células musculares lisas uma por dentro e outra por fora dos feixes musculares constituindo a; membrana interna elástica e a membrana externa elástica. A membrana interna elástica separa a túnica média da íntima, apresenta um aspeto enrugado e as células musculares lisas (SMC) estão dispostas linear ou longitudinalmente [12-14]. A membrana externa elástica separa a túnica média da túnica externa e está menos definida que a interna. As SMC nesta camada estão dispostas circularmente e as contrações que levam ao início do fecho das artérias umbilicais têm origem nesta camada [15]. A presença de uma túnica média muscular bem desenvolvida permite que estas artérias possam variar no seu calibre segundo as necessidades metabólicas da região irrigada [12-14]. As artérias umbilicais não têm adventícia nem *vasa vasorum* da mesma forma que é observado nas outras artérias. Em vez disso, a rígida geleia de Wharton executa a função de adventícia. Este *scaffold* fibroso e poroso contribui para a firmeza do cordão. A espessura e a turgidez da geleia de Wharton variam com a expansão e contração dos vasos e pode deste modo suportar estruturalmente e prevenir a hiperdistensão dos vasos [6, 9]. Uma vez que os vasos sanguíneos umbilicais não são inervados, o controlo do fluxo do sangue umbilical depende inteiramente de substâncias vasoativas libertadas localmente ou na circulação. A compreensão dos mecanismos intracelulares que modulam a contração da HUA pode oferecer um valor terapêutico para o tratamento de algumas patologias como a PE [10].

1.2. Músculo Liso

O músculo liso vascular é uma estrutura altamente especializada e tem como principais funções a contração, regulação da pressão sanguínea, do fluxo sanguíneo e do tónus vascular [16, 17]. O músculo liso encontra-se nas paredes de órgãos ocos, tais como nos vasos sanguíneos, na bexiga, no útero e no trato gastrointestinal e contrai-se lenta e involuntariamente. O músculo liso vascular é composto por células longas e fusiformes, com um único núcleo central. Estas SMC estão envolvidas num tecido fino fibroelástico, e fazem parte da porção contrátil de muitos órgãos, estando dispostas em camadas na parede do tubo digestivo, útero, vasos sanguíneos entre outros. As SMC têm entre 20-50 μm de comprimento e 5-10 μm de largura (figura 3) [6].

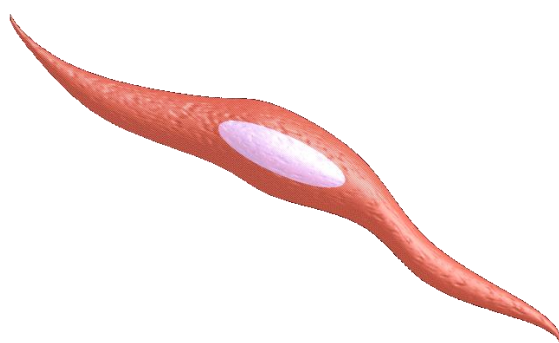


Figura 3 - Representação esquemática de uma célula muscular lisa [18].

Nas SMC o núcleo é cilíndrico e localiza-se no centro da célula e o citoplasma está ocupado por filamentos de actina, miosina e filamentos intermédios [18-20].

Ao contrário das células do músculo-esquelético ou do músculo cardíaco que são totalmente diferenciadas, as SMC têm uma plasticidade notável e podem sofrer modificações profundas e reversíveis no seu fenótipo, como resposta a alterações de estímulos locais [20]. Através da contração ou relaxação alteram o diâmetro luminal dos vasos sanguíneos regulando a pressão arterial. Estas células têm um papel fundamental na morfogénese do vaso sanguíneo e apresentam altos índices de proliferação, migração e produção de componentes da matriz extracelular, como colagénio, elastina, e proteoglicanos. Deste modo, em resposta à lesão vascular, as SMC aumentam dramaticamente a sua taxa de proliferação celular, migração e capacidade sintética, desempenhando um papel primordial na reparação vascular [11, 20]. É importante afirmar que o elevado grau de plasticidade exibido pelas SMC, predispõe estas células a estímulos ambientais anormais que podem levar a uma mudança fenotípica adversa, isto é, à aquisição de características que podem contribuir para o desenvolvimento e/ou progressão de doenças vasculares. Com efeito, há uma forte evidência de que a mudança fenotípica das SMC, desempenha um papel importante nomeadamente na aterosclerose, no cancro, e na HT [20].

A morfologia é um parâmetro importante para a definição de fenótipos das SMC, contudo a utilização de proteínas marcadoras para este fim tornou-se frequente e indispensável para uma caracterização aprofundada destas células [11]. As proteínas marcadoras das SMC que são normalmente usadas para definir os fenótipos são: α -actina do músculo liso, cadeia pesada da miosina do músculo liso, SM22- α , SM-calponina, h-caldesmona, smoothlina, telokina, meta-vinculina, e a desmina. Muitas destas proteínas estão envolvidas na contração das SMC, ou são um componente estrutural do aparelho contrátil. Quando os níveis de expressão destas proteínas marcadoras contráteis diminuem gradualmente, isso é geralmente adotado como uma característica do fenótipo sintético [19, 21]. O fenótipo contrátil e sintético das SMC apresentam duas morfologias diferentes (figura 4).

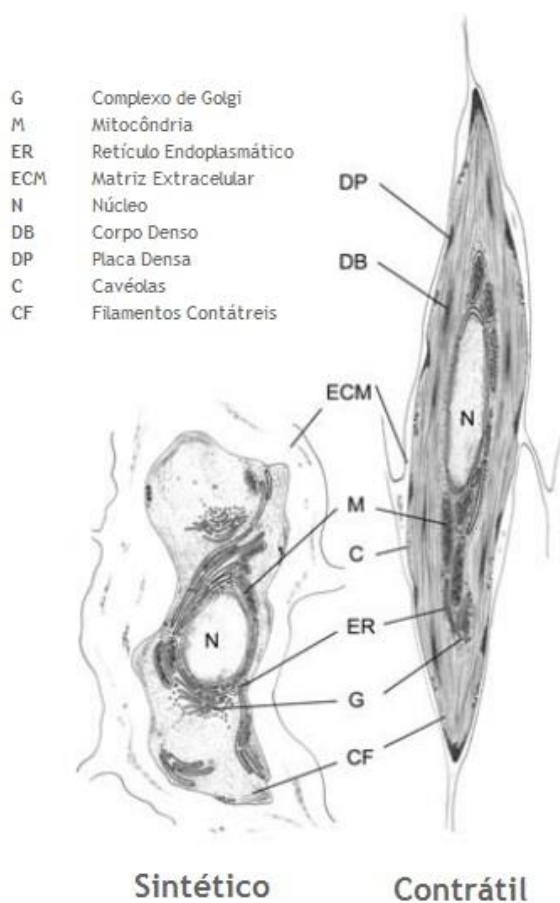


Figura 4 - Características ultraestruturais das SMC com fenótipo contrátil e sintético. Adaptado de [19].

As SMC contráteis são alongadas e fusiformes, enquanto as SMC sintéticas são menos alongadas e têm uma morfologia parecida a um paralelepípedo, que é referido como epitelióide ou romboide. O fenótipo sintético contém um elevado número de organelos envolvidos na síntese de proteínas que são substituídas posteriormente por filamentos contráteis nas SMC contráteis. As SMC sintéticas e contráteis têm diferentes características proliferativas e migratórias, sendo as sintéticas as que apresentam taxas de crescimento mais

elevadas e maior atividade migratória [19]. Quando ocorre uma lesão arterial, as SMC passam do estado contrátil para sintético.

[19, 21]. Um dos maiores problemas da realização de culturas primárias de SMC vasculares é o facto de este tipo de células apresentar múltiplos fenótipos, desde o contrátil ao sintético. Contudo Li et al (1999) demonstrou que após 24 horas em meio sem soro, estas células apresentam principalmente o fenótipo contrátil [21, 22].

1.2.1. Proteínas participantes no processo contrátil

O tecido muscular liso é formado por três tipos de filamentos, os filamentos grossos contendo principalmente miosina, os filamentos finos contendo principalmente actina e os filamentos intermédios que consistem principalmente de vimentina. Pensa-se que os filamentos intermédios desempenham uma função a nível estrutural [23]. No entanto, ao contrário do músculo-esquelético os filamentos estão dispostos obliquamente dentro das SMC e ancorados à membrana citoplasmática por placas densas e dentro do citoplasma por corpos densos [24, 25]. As proteínas participantes no mecanismo contrátil encontram-se agrupadas apenas em filamentos finos e filamentos grossos.

Filamentos finos

Os filamentos finos possuem aproximadamente 6-8 nm de diâmetro e são compostos principalmente por actina filamentosa ou fibrosa (F-actina) e mais três proteínas acessórias: a tropomiosina, a caldesmona e a calponina (figura 5) [26].

A actina é uma proteína scaffold e tem aproximadamente 42kDa. Ela é capaz da sua automontagem a partir da sua forma monomérica G-actina numa macro-molécula filamentosa conhecida como a F-actina [27]. Existem quatro isoformas da actina conhecidas no músculo liso, a alfa-actina e a gama-actina que são geralmente referidas como isoformas contráteis, estando a alfa actina predominantemente no músculo liso vascular e a gama actina predominante no músculo liso gastrointestinal. As duas isoformas não-musculares da actina citoplasmáticas, ou seja, do citoesqueleto, são as isoformas beta e gama [28]. A alfa-actina e a gama-actina estão associadas à miosina e à caldesmona e participam na contração, enquanto que a beta actina está associada com a calponina e tem um papel estrutural importante nas SMC [29]. A tropomiosina é uma proteína longa e fina, constituída por duas cadeias polipeptídicas enroladas em forma de hélices α para formar filamentos que correm ao longo do microfilamento de F-actina, e está envolvida na regulação da interação actina-miosina. Esta proteína liga-se à actina e impede a ligação actina/miosina bloqueando o sítio de ligação. A troponina é um complexo de 3 subunidades (dispõe-se em forma descontínua ao longo do microfilamento) que se une à tropomiosina, e permite a união dos iões cálcio à actina. A caldesmona é uma proteína de ligação à actina, tropomiosina, miosina e calmodulina que interage com os filamentos de actina. Estão identificadas duas isoformas da caldesmona, a h-caldesmona (150 KDa) e l-caldesmona (89KDa), mas só a isoforma h-

caldesmona é expressa nas SMC vasculares diferenciadas. Evidências sugerem assim, que esta proteína está envolvida na contração do músculo liso, atuando como uma proteína reguladora [30]. A calponina é uma proteína que interage com a F-actina, miosina, proteínas de ligação ao Ca^{2+} e com a tropomiosina. Esta proteína inibe a atividade ATPase da miosina, bem como o movimento dos filamentos de actina sobre a miosina, in vitro. A fosforilação da calponina por uma proteína cinase liberta a inibição da ATPase do músculo liso [31, 32].

Filamentos grossos

Os filamentos grossos têm 15-18 nm de diâmetro e são compostos por miosina. A miosina é uma proteína ATPase que se movimenta ao longo da actina e em presença de ATP, são responsáveis pela contração muscular. A miosina é composta por duas cadeias pesadas, um par de cadeias leves alcalinas não fosforiláveis de 17kDa (MLC17), e um par de cadeias leves reguladoras de 20kDa (MLC20). O dímero de cadeias pesadas contém na extremidade N-terminal duas “cabeças globulares” e na extremidade C-terminal uma longa cauda ou bastão formado por duas hélices alfa. A “cabeça” da miosina tem uma atividade intrínseca de Mg_2ATPase ativado pela actina, em que a miosina transforma a energia química armazenada na forma de ATP, em trabalho mecânico associado à contração muscular. Sendo assim a miosina considerada uma proteína motora. Na “cabeça” da miosina encontra-se o sítio de ligação ao ATP e á actina, sendo o local de geração de força. O "pescoço", que regula a atividade da "cabeça" liga-se à calmodulina. E a "cauda" contém sítios de ligação que determina se a molécula vai se ligar à membrana plasmática ou a outras caudas para formar um filamento grosso (figura 5) [33].

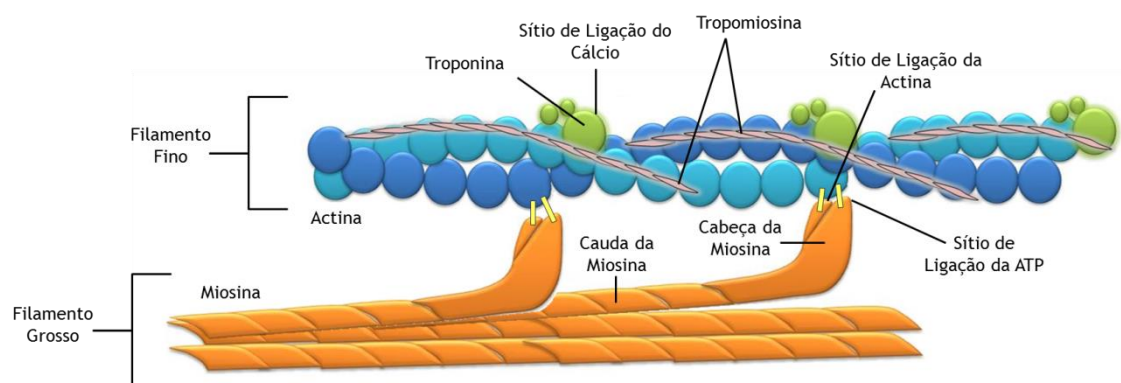


Figura 5 - Representação esquemática da organização dos filamentos finos e grossos.

No músculo liso, numerosos miofilamentos estão orientados ao longo do eixo longitudinal da célula. Estes consistem principalmente em filamentos de miosina e actina, que formam unidades contrátil, como já foi referido anteriormente. A força mecânica gerada nas SMC é baseada no deslizamento das extremidades livres dos filamentos de actina sobre os filamentos da miosina adjacentes em direções opostas durante o ciclo das pontes cruzadas. Este ciclo é um mecanismo bem estabelecido para o desenvolvimento da tensão em todas as células musculares [34].

1.3. Canais Iónicos

1.3.1. Canais de cálcio

O cálcio é um mensageiro intracelular que controla uma variada gama de processos celulares, como a transcrição de genes, contração muscular e proliferação celular. A concentração de cálcio no interior das SMC é regulada pela interação de diversos processos de compensação, que podem ser divididos em mecanismos para aumentar ou diminuir a concentração de Ca^{2+} [35]. Nos mecanismo para aumentar a $[Ca^{2+}]$ do meio extracelular para o meio intracelular envolve vários tipos de canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática, que podem ser dependentes ou independentes de voltagem [35, 36]. Os canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC) incluem os (1) canais dependentes de voltagem do tipo L (L-VOCC) que regulam o processo contrátil sendo a principal via de entrada de Ca^{2+} e os (2) canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T (T-VOCC) que estão principalmente envolvidos na regulação da proliferação celular [37]. Quanto aos canais de cálcio independentes de voltagem incluem os (1) canais operados por recetores (ROC) que são regulados pela interação entre o agonista e o recetor, (2) os canais de cálcio operados por depósitos intracelulares (SOC) que são ativados pela libertação do cálcio das reservas intracelulares, e os (3) canais de cálcio ativados por stress físico (SAC) que são ativados pelo stress físico da membrana. Todos estes canais independentes de voltagem estão situados na membrana plasmática, e estão envolvidos na regulação do tónus vascular [36, 38-40].

Quanto aos mecanismos de remoção do Ca^{2+} do citoplasma para os depósitos intracelulares é realizada através da Ca^{2+} ATPase do reticulo sarco-endoplasmático (SERCA), e/ou para o meio extracelular, através da ATPase do Ca^{2+} da membrana plasmática (PMCA) e do permutador Na^+/Ca^{2+} (NCX) [37].

1.3.1.1. Canais De Cálcio Dependentes de Voltagem

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC) são necessários para a excitação-contracção normal do coração, músculo-esquelético e células do músculo liso, incluindo as SMC vasculares e desempenham um papel central na regulação do tónus vascular, através do potencial de membrana [41].

A primeira classificação destes canais foi baseada em propriedades básicas eletrofisiológicas e farmacológicas. Foi observado que alguns canais de cálcio precisavam apenas de uma pequena despolarização para serem ativados, enquanto outros necessitariam de uma despolarização maior para abrirem. De acordo com este critério os canais de cálcio foram divididos em canais de cálcio ativados por alta voltagem (HVA) e os ativados por baixa voltagem (LVA). A ativação dos canais HVA ocorre a partir de -20mV enquanto a ativação dos canais LVA ocorre em potenciais de membrana baixos, a partir -60mV. À família dos canais HVA pertencem os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L (L-VOCC), tipo P/Q e canais tipo-R, enquanto a família dos canais LVA apenas é constituída por canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-T (T-VOCC) (tabela 1) [37, 42-44].

Em termos estruturais, os VOCC são proteínas complexas compostas por 4 diferentes subunidades, a subunidade principal α_1 , e as subunidades auxiliares β , $\alpha_2\delta$ e a γ . A subunidade α_1 é a maior subunidade (190 a 250 kDa) e nela está incorporada o poro condutor, o sensor de voltagem e a zona de ligação de segundos mensageiros, drogas e toxinas. Esta subunidade é formada por 4 domínios homólogos (I-IV), com seis segmentos transmembranares (S1-S6) cada um. A existência de um loop entre os segmentos S5-S6 determina a seletividade dos iões e a sua condutância. Quanto á subunidade β , é intracelular e transmembranar e está ligada por pontes disulfureto á subunidade $\alpha_2\delta$ (figura 6) [37].

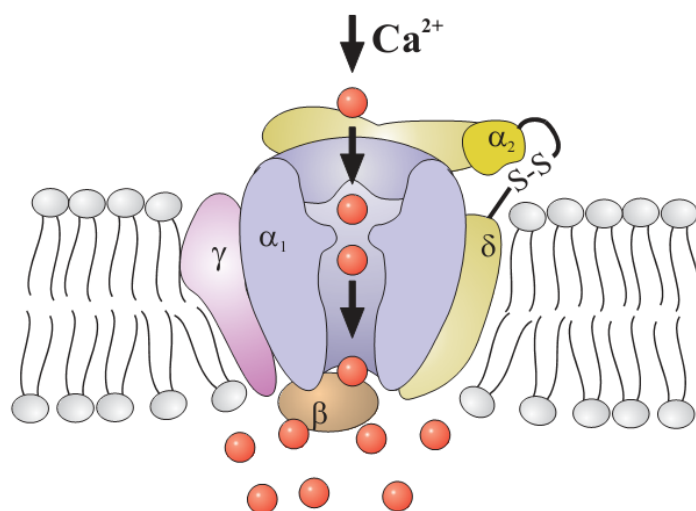


Figura 6 - Estrutura esquemática proposta para os VOCC [37]

Após a descoberta de vários canais foi necessário adotar uma nomenclatura de forma a distinguir os canais, deste modo a denominação segue o esquema Ca_v x.y., onde x é o número que designa a subfamília do canal e y é o número que designa os membros individuais da subfamília (tabela 1) [37].

Relativamente à expressão foi descrito que os canais L-VOCC e os T-VOCC são expressos nas SMC da artéria umbilical [21].

Tabela 1 - Representação esquemática dos VOCC. Adaptado de [37].

		Nomenclatura	
Canais HVA	tipo-L	α_{1S}	$Ca_v1.1$
		α_{1C}	$Ca_v1.2$
		α_{1D}	$Ca_v1.3$
		α_{1F}	$Ca_v1.4$
	tipo P/Q	α_{1A}	$Ca_v2.1$
	tipo-N	α_{1B}	$Ca_v2.2$
tipo-R	α_{1E}	$Ca_v2.3$	
Canais LVA	tipo-T	α_{1G}	$Ca_v3.1$
		α_{1H}	$Ca_v3.2$
		α_{1I}	$Ca_v3.3$

Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L

Os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L (L-VOCC) foram inicialmente identificados por Fatt e Katz et al. (1953) e são os canais mais bem caracterizados [36, 37]. Estes canais são ativados por despolarizações de membrana mais positivas (a partir dos -20 mV), possuem uma condutância elevada e a sua inativação é mais lenta (300 a 600 ms), e são por isso denominados de longa duração, tipo-L. Após a despolarização das SMC vasculares, os L-VOCC abrem-se, e conduzem a um aumento do cálcio intracelular, à contração das células e à vasoconstrição. Quatro isoformas dos L-VOCC foram descobertas e denominam-se de Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4 e todas elas são caracterizadas por terem uma alta sensibilidade à di-hidropiridina (DHP), sendo este um bloqueador específico. Esta sensibilidade única à DHP distingue-os de outros canais de cálcio dependentes de voltagem [39, 43, 45, 46]. Os L-VOCC do músculo liso (Cav1.2) desempenham um papel fundamental na determinação da pressão arterial e os bloqueadores destes canais são uma classe importante de medicamentos anti-hipertensivos [43]. Os canais Cav1.4 são encontrados principalmente em neurónios retiniais, e os canais Cav1.2 e Cav1.3 são mais amplamente distribuídos e ocorrem nos neurónios, células sensoriais do ouvido interno, na retina, células endócrinas, músculo liso, e no coração. Devido à falta de moduladores seletivos destas isoformas, é

impossível determinar a sua contribuição relativa para as correntes de cálcio ou qual a função nestas células por meios farmacológicos [45].

Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-T

Os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T (T-VOCC) parecem desempenhar um papel primordial em várias funções fisiológicas, como na proliferação celular e no ciclo celular das SMC vasculares. Estes canais são ativados por níveis de despolarização da membrana próximos do potencial de repouso (a partir dos -50 mV), possuem uma baixa condutância e são caracterizados por uma rápida ativação e inativação. Três membros compõem a família dos T-VOCC, e são conhecidos como Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3. Os Cav3.1 e Cav3.2 estão presentes no sistema cardiovascular, mas o Cav3.3 tem sido detetado principalmente no cérebro [43].

1.3.1.2. Canais de Cálcio Independentes de Voltagem

Nas SMC, agonistas como os neurotransmissores ou hormonas podem induzir o aumento da concentração de cálcio intracelular através da libertação de cálcio intracelular armazenado ou/e do influxo de cálcio extracelular. A via de entrada de cálcio opera através de uma variedade de canais de cálcio que envolvem, entre outros, os canais independentes de voltagem que incluem; os ROC, os SOC, e os SAC [38, 47, 48]. Os mecanismos de ativação destes canais ainda é assunto de muita discussão. No entanto, durante os últimos 10 anos, foram realizados estudos que sugeriram que os diferentes tipos de canais podem ser estruturalmente relacionados com a mesma família de proteínas: as TRP “*the transient receptor proteins*”. Alguns tipos de proteínas TRP são ubiquosamente expressas nas SMC e as variações na expressão depende do tipo de tecido e de espécie. Mais recentemente, outras proteínas como STIM1 e Orai1 foram apresentadas para participar isoladamente ou em associação com as TRP para a estrutura de SOC e SAC. Estes canais controlam a proliferação e a contração das SMC [47].

Canais de cálcio operados por recetores

O termo de canal operado por recetor (ROC), foi proposto simultaneamente por Bolton (1979) e VanBreemen (1978), de forma a definir um canal membranar que é ativado como resultado da ligação de um agonista ao seu recetor, estando este recetor ligado a uma proteína G e é independente de uma alteração no potencial de membrana. Os ROC estão presentes nas SMC vasculares e são ativados por uma grande variedade de agonistas. Entre os vários agonistas contráteis inclui-se o ATP, a norepinefrina, acetilcolina, angiotensina-II, a endotelina-1, serotonina e a vasopressina [47, 48].

Nas SMC, foi demonstrado que os agonistas podem ativar estes canais e provocar a contração, contudo a participação destes canais durante a vasoconstrição continua em debate uma vez que este efeito pode ser devido à ativação indireta dos VOCC e/ou SOC [47, 48].

Canais de cálcio operados por depósitos intracelulares

Os canais de cálcio operados por depósitos intracelulares (SOC) são canais ativados após a libertação de cálcio dos depósitos intracelulares, contudo a via de sinalização porque ocorre esta ativação ainda não está bem definida. Várias evidências sugerem que esta via pode ser importante na regulação do tónus vascular [38]. A entrada de cálcio através destes canais foi originalmente proposta por Putney (1986) que usou o termo “entrada de cálcio capacitativo” para descrever o fenómeno de acoplamento entre a concentração de cálcio do retículo endoplasmático e a ativação dos canais membranares para entrada de cálcio em células não-excitáveis [47]. A depleção das reservas intracelulares de cálcio do retículo sarcoplasmático por diversos mecanismos tem sido relatada como causador da entrada de cálcio capacitativo através dos SOC, numa ampla gama de células, incluindo as SMC vasculares [48]. Tem sido difícil saber um pouco mais sobre os SOC nas SMC, devido ao facto de ser complexo registar especificamente a corrente iónica ativada pela depleção das reservas neste tipo de célula. É importante referir que é a depleção de cálcio do retículo por si, e não o cálcio libertado das reservas, que ativa os SOCs. Várias experiências demonstraram que os inibidores de SERCA, sem ativar os recetores da membrana plasmática, aumenta o influxo de cálcio nas SMC e, conseqüentemente, aumentar a concentração de cálcio intracelular e induz a contração do músculo liso [47, 48].

Canais ativados pelo aumento do stress físico

Os canais ativados pelo stress físico (SAC) foram descritos em 1984 no músculo-esquelético embrionário de galinha por Guharay e Sachs. Desde a sua caracterização original, os SACs foram encontrados numa variedade de tecidos e espécies, incluindo no músculo liso dos mamíferos. As SMC em virtude da sua posição num ambiente biomecânico complexo são continuamente expostas à estimulação mecânica, tais como compressão, stress físico e distensão [47]. Os SAC na membrana celular têm como função a conversão da força física em sinais biológicos e resposta celular. Uma característica comum dos SAC é que a abertura do canal depende do grau da compressão, stress físico ou distensão da membrana. Dois mecanismos principais do papel dos SAC foram propostos; (1) induzem a despolarização da membrana via influxo de catiões (principalmente Na^+), pela ativação dos VOCC que induz o aumento de cálcio citosólico, e (2) o aumento de cálcio citosólico devido à entrada de cálcio através de SAC, abre os BK_{Ca} ou leva à libertação de cálcio das reservas [38, 47, 48].

1.3.2. Canais de potássio

Os canais de potássio são a via dominante da condução de íons nas SMC. Como tal, a sua atividade contribui de forma importante para a determinação e regulação do potencial de membrana e do tónus vascular [49, 50]. A hiperpolarização da membrana é devida a um efluxo de potássio aquando da abertura dos canais de potássio no músculo liso vascular. Este efeito é seguido pelo fecho dos canais de cálcio dependentes da voltagem, que conduz a uma redução da entrada de cálcio, e vasodilatação [49]. Em contraste, a inibição da função de canais de potássio leva à despolarização da membrana e consequente vasoconstricção. Até à data, quatro tipos distintos de canais de potássio foram identificados no músculo liso vascular: os canais de potássio operados por voltagem (K_v), os canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}), canais de potássio retificadores internos (K_{IR}), dentro dos quais estão incluídos os canais sensíveis ao ATP (K_{ATP}). (figura 7) [38, 50-52].

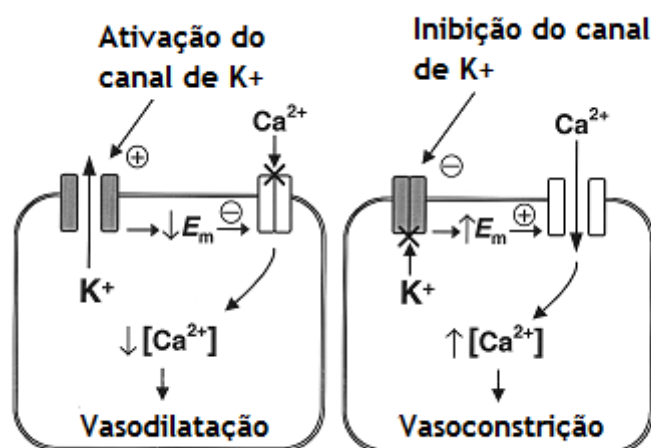


Figura 7 - Ilustração esquemática dos eventos chave envolvidos na resposta das células musculares lisas à ativação dos canais de potássio (esquerda) ou inibição (direita). Adaptado de [52].

Canais de potássio operados por voltagem

Os canais de potássio operados por voltagem (K_v) estão presentes no músculo liso vascular e são ativados pela despolarização da membrana num potencial de membrana entre os -35 mV e os -55 mV, resultando na repolarização e um retorno ao potencial de membrana. Uma despolarização em pequena escala nas SMC conduz a um influxo de cálcio através dos L-VOCC e ativação da maquinaria contrátil. Deste modo podemos afirmar que os K_v têm uma função importante para limitar a despolarização da membrana e manter o tónus vascular em repouso [49, 51, 52]. Quanto à inativação deste canal resulta de uma despolarização prolongada [51]. O composto 4-aminopiridina tem sido utilizado como um bloqueador farmacológico dos K_v . A 4-aminopiridina causa a despolarização arterial e vasoconstricção, sugerindo que a atividade do canal K_v existe em alguns vasos sanguíneos sob condições basais. O cAMP e o NO/cGMP podem ativar estes canais em alguns vasos sanguíneos, e podem ser inibidos pela proteína

cinase C [38, 51, 52]. Cairrão et al. mostraram também que a Tes e o ANP estimulam a atividade deste canal através do aumento dos níveis intracelulares de cGMP e consequentemente ativação da PKG [53]. Na hipertensão vários estudos eletrofisiológicos indicam uma diminuição da expressão funcional dos K_v nas SMC, que podem contribuir para a despolarização e um aumento no tônus vascular nesta doença [38].

Canais de potássio ativados por cálcio

Os canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) (200 - 250 pS) são uma característica constante das células do músculo liso vascular. Os canais BK_{Ca} são ativados por alterações na concentração de cálcio intracelular, e pela despolarização da membrana, e acredita-se que contribuem para a manutenção do potencial de membrana em pequenos vasos miogénicos [38, 49, 51]. A ativação fisiológica dos BK_{Ca} pode ser um importante mecanismo de tamponamento para neutralizar a despolarização e constrição do vaso em resposta a alguns vasoconstritores e ao aumento da pressão intravascular. Devido à grande condutância dos BK_{Ca} , a atividade de um número relativamente pequeno destes canais pode exercer uma influência relativamente grande no potencial de membrana [52].

Vasodilatadores que aumentem os níveis intracelulares de cAMP ou cGMP, monóxido de carbono, e epóxidos do ácido araquidónico podem ativar estes canais. Os BK_{Ca} podem ser bloqueados por TEA, iberotoxina e *charybdotoxin*, sendo a iberotoxina é a mais seletiva. Na hipertensão arterial a expressão dos canais BK_{Ca} aumenta e isto ocorre como resposta a um feedback negativo ao aumento da reatividade vascular observada no tratamento da hipertensão. Assim, os canais BK_{Ca} desempenham um papel importante na regulação do tônus vascular, na saúde e na doença [38]. Cairrão et al. mostraram que a vasodilatação induzida pela Tes ocorre através da ativação destes canais [14].

Canais de potássio retificadores internos

Os canais de potássio retificadores internos (K_{IR}) estão presentes numa variedade de células, incluindo nas SMC vasculares. Como uma descrição empírica de correntes iónicas de membrana, retificação significa mudança de condutância com voltagem. A maioria, se não todos os canais iónicos, apresentam algum grau de retificação. Estes canais caracterizam-se por apresentarem um influxo de iões de potássio a potenciais de membrana mais negativos do que o potencial de equilíbrio, e efluxos deste ião a potenciais de membrana mais positivos que o potencial de equilíbrio. Os canais K_{IR} são ativados pela hiperpolarização da membrana, ao contrário dos canais K_v e BK_{Ca} , que são ativados pela despolarização da membrana. Estes canais permitem assim o influxo de iões de potássio, quando não há hiperpolarização, e a saída deste ião, quando o potencial de membrana aumenta. As correntes deste tipo de canais são inibidas por bário nas SMC vasculares de uma forma dependente de voltagem [38, 51, 52, 54, 55]. Foi observado que na hipertensão estes canais têm a sua expressão ou função diminuída [52].

Canais de potássio dependentes do ATP

Os canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP}) foram descritos pela primeira vez em miócitos cardíacos, no entanto também se encontram presentes nas SMC vasculares [56]. Estes canais fecham quando a concentração de ATP intracelular aumenta. No entanto os canais K_{ATP} são regulados por diversas vias de transdução de sinal independentes das alterações do ATP. Assim, outras vias de regulação podem ser mais importantes fisiologicamente. Foi demonstrado tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* que o bloqueio dos K_{ATP} leva à vasoconstrição e à despolarização da membrana em diversos tipos de músculo liso vascular. Os K_{ATP} no músculo liso são conhecidos como sendo inibidos pelas drogas antidiabéticas sulfonilureias, como a glibenclamida e tolbutamida [38, 49, 51, 52, 56].

1.4. Mecanismos envolvidos no tônus vascular

O tônus vascular é a atividade contrátil das SMC nas paredes das artérias e arteríolas, e é o principal determinante da resistência ao fluxo sanguíneo. Tem um papel importante na regulação da pressão arterial e na distribuição de fluxo sanguíneo. A regulação da atividade contrátil das células musculares lisas depende de uma interação complexa entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores, de hormonas, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e da pressão arterial e todos estes sinais podem induzir contração ou relaxamento do músculo liso vascular. [16, 38, 57, 58].

Os iões não se encontram uniformemente distribuídos no interior e no exterior da célula e esta assimetria, quando associada à diferente permeabilidade da membrana plasmática para cada espécie iónica, torna-se responsável pela criação de um potencial de membrana em repouso (E_m). A maioria dos estudos em SMC isoladas sugere que o seu E_m varia em média entre -40 a -60 mV e pensa-se que a interação entre os canais de K^+ e Ca^{2+} é o principal fator que determina os níveis do par excitação-contração nas SMC [49, 59]. Assim, a abertura dos canais de K^+ ou Cl^- resulta no aumento do potencial de membrana com o interior da célula a ficar mais negativo - Hiperpolarização. A hiperpolarização fecha os canais de cálcio dependentes de voltagem e leva à vasodilatação. Contrariamente, a abertura dos canais de Na^+ ou Ca^{2+} resulta na diminuição do potencial de membrana com o interior a ficar menos negativo - despolarização, ou seja à vasoconstrição [38, 50, 60].

O movimento de iões e o influxo de cálcio através dos canais iónicos da membrana plasmática, assim como, a libertação de cálcio das reservas intracelulares são a maior fonte de ativação da contração [38].

1.4.1. Mecanismo contrátil

No organismo, o processo de contração das SMC é regulado principalmente pela receção e ativação das proteínas contráteis, miosina e actina. Uma mudança no potencial de membrana, provocada pela atividade dos potenciais de ação ou pela ativação de canais iónicos, pode também desencadear a contração [57]. Resumidamente a contração do músculo liso é baseada na fosforilação da cadeia leve da miosina que é necessária para o ciclo das “pontes cruzadas” e geração de força [61]. A partir da atividade ATPase da miosina é libertada energia que resulta neste ciclo e é importante para o mecanismo da contração. Esta atividade resulta no que é conhecido como o tónus do músculo liso e a sua intensidade pode ser variada [16, 57, 61].

Contração dependente de cálcio

O fenómeno de contração/relaxamento do músculo liso depende do equilíbrio que se estabelece entre os mecanismos que controlam as subidas e descidas da concentração de cálcio citosólico. A contração das SMC é regulada pela entrada de cálcio através de duas vias iniciadas tanto pela despolarização como por agonistas. A despolarização da membrana celular ativa os VOCC resultando num influxo de cálcio, enquanto que a estimulação por agonistas geralmente ativa a proteína G levando à formação do IP3 e a libertação de cálcio a partir do reticulo sarcoplasmático [61].

O mecanismo inicia-se do seguinte modo (figura 8): Em resposta a estímulos específicos nas SMC a concentração de cálcio citosólico aumenta, e este liga-se à calmodulina (CaM), provocando uma alteração da conformação da CaM, e formando o complexo Ca^{2+}/CaM . Este complexo ativa a MLCK (cinase da cadeia leve da miosina) para posteriormente fosforilar uma das cadeias leves da miosina, a MLC20, e em conjunto com a actina e a miosina ocorre o ciclo de ponte cruzada, levando à contração da célula do músculo liso [61].

Agonistas como por exemplo a noradrenalina, angiotensina II, endotelina, etc, ligam-se a recetores acoplados à proteína G heterotrimérica, que vai estimular a atividade da fosfolipase C. Esta enzima produz dois segundos mensageiros: o inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liga-se aos recetores no reticulo sarcoplasmático e causa a libertação de cálcio para o citosol. O DAG, juntamente com o cálcio, ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila as proteínas alvo específicas. Em muitos casos, PKC tem uma contração que promove efeitos, tais como a fosforilação dos canais L-VOCC ou outras proteínas que regulam o ciclo das “pontes cruzadas” [16, 57, 61].

Além da contração muscular dependente de Ca^{2+} , existe também a contração independente de Ca^{2+} , existindo assim dois mecanismos que vão desencadear este tipo de contração.

Sensibilização ao cálcio

Na ausência de Ca^{2+} , a contração do músculo liso inicia-se quando a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) se encontra totalmente inibida [62]. O mecanismo de sensibilização ao cálcio é iniciado ao mesmo tempo que a fosfolipase C é ativada, e envolve a ativação da uma pequena proteína a RhoA de ligação à GTP. A proteína Rho é uma pequena proteína que pertence à superfamília da Ras GTP-ases monoméricas e atua em diversas funções fisiológicas associadas com a actina-miosina, tal como a motilidade celular e a contração do músculo liso. A natureza precisa sobre como ocorre a ativação da RhoA pelo recetor acoplado à proteína G não é completamente claro mas envolve um "guanine nucleotide exchange factor" o RhoGEF e a migração da RhoA para a membrana plasmática. Esta via de sinalização envolve a Rho cinase (ROCK), que desempenha um papel fundamental na contração do músculo liso, nomeadamente na regulação da atividade da MLCP. Uma vez ativada a RhoA aumenta a atividade da ROCK, levando à inibição da fosfatase da miosina. Isto vai promover um estado fosforilado quando a cadeia leve da miosina não pode ser desfosforilada, permitindo que o estado contrátil se mantenha (figura 8) [57, 63, 64].

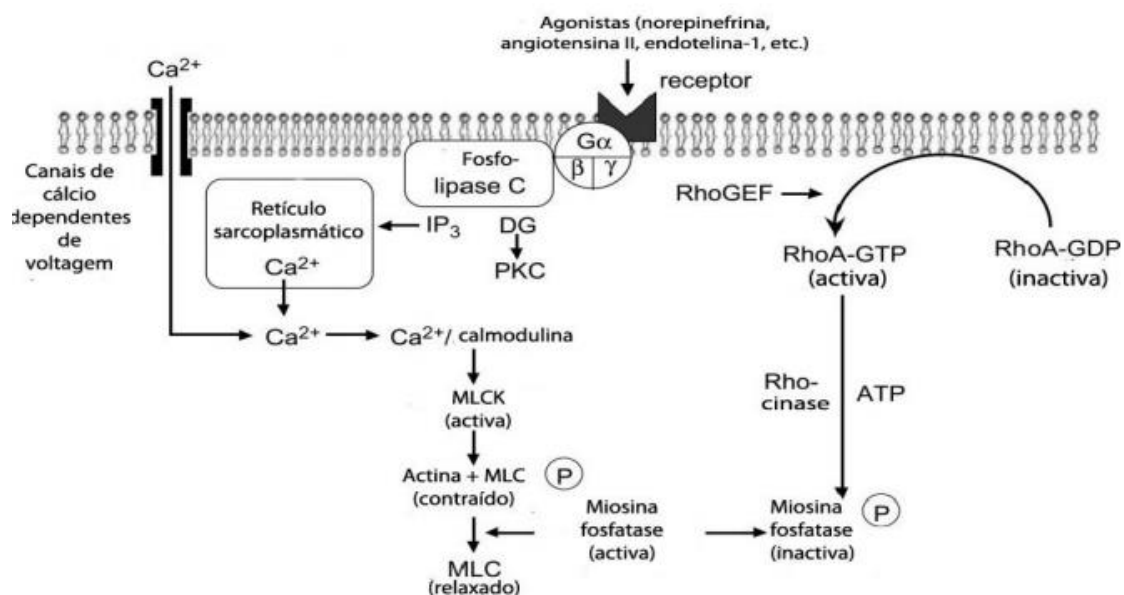


Figura 8 - Representação esquemática do mecanismo de regulação da contração do músculo liso. Adaptado de [57]

1.4.2. Mecanismo de relaxação

O relaxamento do músculo liso vascular pode ocorrer de forma passiva, induzido pela remoção do agente contrátil, ou de forma ativa, induzido pela ativação de uma via dependente de nucleótidos cíclicos [57, 65]. O processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de cálcio intracelular e o aumento da atividade da MLCP. E os mecanismos envolvidos na remoção de cálcio citosólico envolvem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática.

Quando a concentração de Ca^{2+} diminui, o complexo Ca^{2+} -CaM é dissociado e a MLCK é inativa. A dissociação do complexo tem como resultado a libertação de Ca^{2+} que se encontrava ligado à CaM. A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ regressa aos valores basais através de vários mecanismos, que envolvem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática: a PMCA, a SERCA, o permutador NCX e proteínas citosólicas de ligação ao Ca^{2+} . Sob estas condições, a atividade da MLCP aumenta e esta desfosforila a MLC20 e induz a relaxação das SMC vasculares [62, 65].

Entre os mecanismos envolvidos na regulação fisiológica do tónus vascular encontram-se os nucleótidos cíclicos. Um aumento a nível citosólico do cAMP ou cGMP, vai provocar ativação das proteínas cinases PKA e PKG, respetivamente, nas células do músculo liso vascular sendo este considerado um dos principais mecanismos que medeiam a vasodilatação sob condições fisiológicas. Estes mecanismos estão mais desenvolvidos no capítulo a seguir.

1.5. Nucleótidos Cíclicos

Os nucleótidos cíclicos, cAMP e cGMP são os principais mensageiros ligados à vasodilatação no músculo liso vascular. A síntese destes nucleótidos é catalisada pela adenilato ciclase (AC) e pelo guanilato ciclase (GC), respetivamente. A grande parte dos seus efeitos intracelulares resulta da ativação de proteínas cinases específicas: a proteína cinase dependente do cAMP (PKA) e proteína cinase dependente do cGMP (PKG). Neste trabalho apenas vamos abordar a GC pois apenas vamos estudar o efeito da Tes sobre a expressão deste nucleótido.

1.5.1. Guanilato Ciclase

O cGMP (guanosina-3',5'-monofosfato cíclico) é uma molécula de sinalização importante gerada por guanilato ciclastes, que estão envolvidas em vários processos fisiológicos, incluindo a relaxação das células musculares lisas, transdução do sinal neuronal, e a agregação plaquetária [66, 67]. Logo a partir das experiências iniciais [68, 69] foi descoberto duas isoformas distintas da enzima guanilato ciclase que sintetizam o cGMP, a guanilato ciclase solúvel ou citosólica (sGC) e a guanilato ciclase particular ou membranal (pGC) [70]. A sGC é ativada pelo óxido nítrico (NO) enquanto que a pGC é ativada pelos péptidos natriuréticos (NPs) [71].

Guanilato ciclase solúvel

A guanilato ciclase solúvel (sGC) é uma proteína heterométrica, expressa no citoplasma celular e interfere em várias funções fisiológicas importantes, tais como relaxação das células musculares lisas, transdução de sinal neuronal e inibição da agregação plaquetária. Esta proteína é constituída por duas subunidades diferentes, a α (α_1 ou α_2) e a β (β_1 ou β_2) [72-74] e a expressão de ambas as subunidades requer atividade catalítica [67, 74]. Relativamente à estrutura, a sGC possui um domínio de regulação no N-terminal que contém um grupo prostético heme, com um núcleo de ferro que forma uma ligação com a histidina 105 da subunidade β e medeia a sensibilidade para o NO [67, 71]. Para além disso, possui um domínio de dimerização, que apenas tem uma função conhecida, a de ligar as duas subunidades a um domínio catalítico no terminal carboxilo. Esse domínio catalítico é altamente conservado e é responsável pela conversão do GTP em cGMP (figura 9) [67, 71, 72, 74].

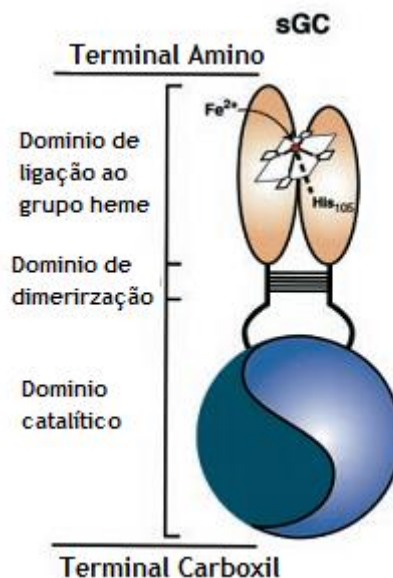


Figura 9 - Estrutura da sGC. Adaptado de [67].

As subunidades mais abundantes são a α_1 e a β_1 , que podem ser encontradas em diversos tecidos. Embora as duas subunidades α e β possuam domínios catalíticos, é necessário que sejam expressas simultaneamente para que a enzima tenha atividade. As combinações de subunidades mais habituais são as α_1/β_1 e a α_2/β_1 , ambas presentes no sistema vascular sendo a α_1/β_1 a mais expressa [73, 74]. Diversos estudos revelam dados que suportam a hipótese de que a expressão de β_2 pode servir para regular a atividade sGC α_1/β_1 . De facto, a expressão de β_2 tem sido sugerida para desempenhar um papel na patogénese da hipertensão [67, 71, 74, 75].

Foi feito outro estudo onde, Ruetten et al.(1999) mediram a expressão e a atividade enzimática da sGC em ratos normotensivos e ratos com hipertensão. Curiosamente, eles

observaram que tanto a expressão da subunidade $\alpha 1$ como a $\beta 1$ estavam diminuídas nos ratos com hipertensão, sugerindo que a falta de sGC pode contribuir para a hipertensão [76].

Quanto à regulação da atividade de sGC, a ativação desta ocorre quando o NO se liga ao grupo prostético heme. Quando o NO se liga, a ligação entre a histidina105 da subunidade $\beta 1$ e o ferro, formando-se o complexo His-Fe²⁺-heme. Foi demonstrado que uma mutação na His105 vai resultar na incapacidade do heterodímero se ligar ao grupo heme e conseqüente falta de sensibilidade ao NO [67, 71, 72, 74]. O NO ao se ligar ao grupo heme e a subseqüente alteração conformacional desse complexo leva a um aumento da atividade enzimática em aproximadamente 200 vezes. O posterior aumento na concentração de cGMP traz mudanças na atividade das moléculas efetoras cGMP, como na proteína cinase dependente do cGMP (PKG) e fosfodiesterases dependentes de cGMP levando a alterações na função celular (figura 10) [75]. O monóxido de carbono (CO) também ativa a sGC, mas é menos eficaz que o NO [67, 68, 77].

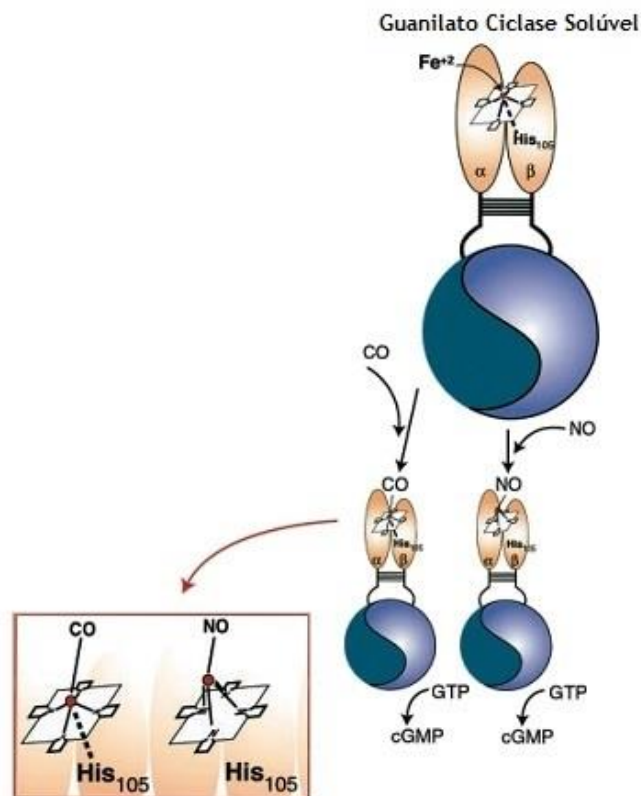


Figura 10 - Regulação da sGC pelos seus ligandos. Adaptado de [67].

Guanilato Ciclase Membranar

Aquando da descoberta da guanilato ciclase membranar (pGC), esta não prendeu muita atenção devido ao facto de ainda não se conhecerem os ativadores fisiológicos desta enzima. Após alguns anos descobriu-se que os péptidos natriureticos (NPs) ativavam a pGC e estimulavam a produção de cGMP em diversos tecidos e a partir daí começou uma investigação mais profunda desta enzima.

Os ligandos da pGC são os NPs: o péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético do cérebro (BNP), e o péptido natriurético do tipo C (CNP) [77]. Os péptidos natriuréticos são uma família de mediadores peptídicos cardíacos e vasculares com papéis fundamentais na homeostase cardiovascular, principalmente na regulação do volume e da pressão sanguínea [78, 79]. O ANP é um polipéptido de 28 aminoácidos produzido na aurícula, é um potente vasodilatador e também uma hormona diurética [80, 81]. O BNP está também presente na aurícula, mas é encontrado a elevados níveis nos ventrículos de corações em stress. As concentrações plasmáticas de ANP são maiores que as do BNP em humanos saudáveis. Mas tanto as concentrações do ANP como as do BNP estão elevadas em pacientes com insuficiência cardíaca grave, e em alguns casos, os níveis de BNP excedem os níveis de ANP. O CNP é encontrado a baixas concentrações no coração, mas está presente a altas concentrações nos condrócitos, onde estimula o crescimento dos ossos [82]. O CNP é mais potente que o ANP a provocar o relaxamento no músculo liso, mas é menos potente a induzir a diurese e a natriurese [83]. Nos mamíferos, são conhecidas sete isoformas da pGC (da GC-A à GC-G) [77], mas apenas três formas são conhecidas por se ligarem aos NPs, também chamados de recetores de NPs (NPRs): GC-A (ou NPR-A), GC-B (ou NPR-B) e recetor de *clearance* (ou NPR-C). Enquanto os recetores GC-A e GC-B produzem o segundo mensageiro intracelular o cGMP, o NPR-C apenas tem função de *clearance* [70, 79, 81]. A topologia básica das guanilato ciclasas membranares consiste num domínio extracelular de ligação ao ligando, uma única região transmembranar e um domínio homólogo de cinase intracelular (KHD), um domínio de dimerização da guanilato ciclase e um domínio catalítico (homodímero) na região C-terminal (figura 11) [80].

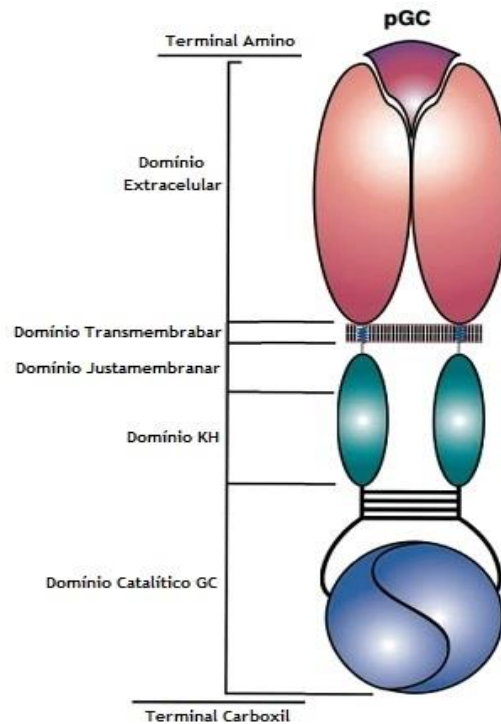


Figura 11 - Estrutura da pGC. Adaptado de [67].

O NPR-A é o recetor membrar com atividade catalítica GC mais bem caraterizado [70, 80]. Este recetor é considerado o recetor biológico do ANP e do BNP, porque a maioria dos efeitos fisiológicos destas hormonas são desencadeados pela produção de cGMP. Estudos recentes em humanos, que tinham uma mutação num único alelo no promotor do gene do NPR-A, verificaram que uma perturbação genética no NPR-A aumenta a pressão sanguínea e causa hipertensão (tabela 2). Nas células em cultura, este recetor é encontrado nas células primárias vasculares do músculo liso e nas células mesenliais do rim e é expresso a níveis baixos mas significativos no coração [70, 78, 80, 84]. A ordem de preferência de ativação deste recetor é: ANP ≥ BNP >> CNP (figura 12) [84, 85]. A maioria das funções fisiológicas do NPR-A está associada com processos que reduzem o trabalho cardíaco [80]. O NPR-B tem uma topologia semelhante ao NPR-A. O mRNA deste recetor foi encontrado no cérebro, pulmões, ossos, coração e tecido ovário. Mas é igualmente expresso a níveis relativamente altos nos fibroblastos e nas células musculares lisas vasculares [70, 84]. A ordem de preferência de ativação do NPRB é: CNP >> ANP ≥ BNP (figura 12) [85]. Vários estudos em ratos mostraram que quando existe uma mutação no gene do recetor, os ratos fêmeas ficam inférteis e alguns com nanismo (tabela 2) [84]. O NPR-C tem uma arquitetura extracelular semelhante aos GC-A e GC-B, mas não contém o domínio KHD nem o domínio catalítico [70, 80]. Este recetor é o mais abundante, sendo principalmente expresso nos rins, cérebro, pulmões e na parede vascular [70, 78]. A ordem de preferência de ativação para o NPR-C é: ANP > CNP > BNP (figura 12) [84, 85]. Tem como principal função eliminar os NPs circulação através da internalização e degradação mediada pelo recetor [78].

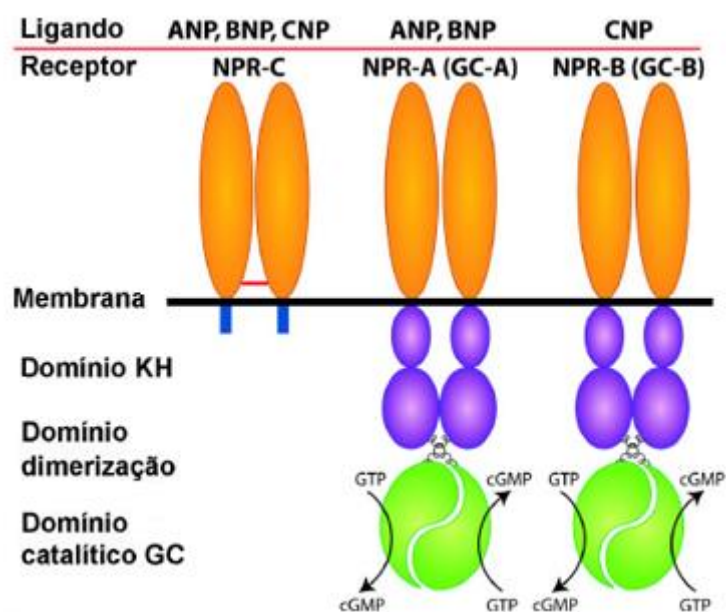


Figura 12 - Estrutura dos recetores NP. Adaptado de [84].

Tabela 2 - Fenótipos de ratos e seres humanos com mutações que levam à inativação dos genes que codificam para os recetores dos péptidos natriuréticos. Adaptado de [84].

Gene	Fenótipo do ratinho knockout	Doenças humanas
NPR-A	Hipertensão Fibrose ventricular Hipertrofia cardíaca	Hipertensão Fibrose ventricular
NPR-B	Nanismo, convulsões, Esterilidade feminina Decrescente adiposidade	Nanismo
NPR-C	Gigantismo Hipotensão	

O mecanismo exato de ativação e de dessensibilização dos recetores NPR-A e B ainda não é conhecido. Um modelo hipotético foi proposto, segundo o qual podem apresentar três estados classificados como “basal”, “ativo”, e “dessensibilizado” (figura 13).

No estado basal, os recetores, que estavam no estado dessensibilizado, são fosforilados por tirosina cinases no KHD o que permite a ligação dos NP. No estado ativo, a ligação do NP promove uma mudança conformacional no recetor que permite a associação de duas partes do domínio intracelular, anulando o efeito inibitório que a KHD exercia sobre a atividade catalítica e ativando a ciclase. No estado dessensibilizado, a exposição prolongada ao NP provoca uma desfosforilação do KHD por uma fosfatase específica, o que provoca uma redução da atividade. A saída do ligando e a fosforilação faz voltar o recetor ao estado basal [84].

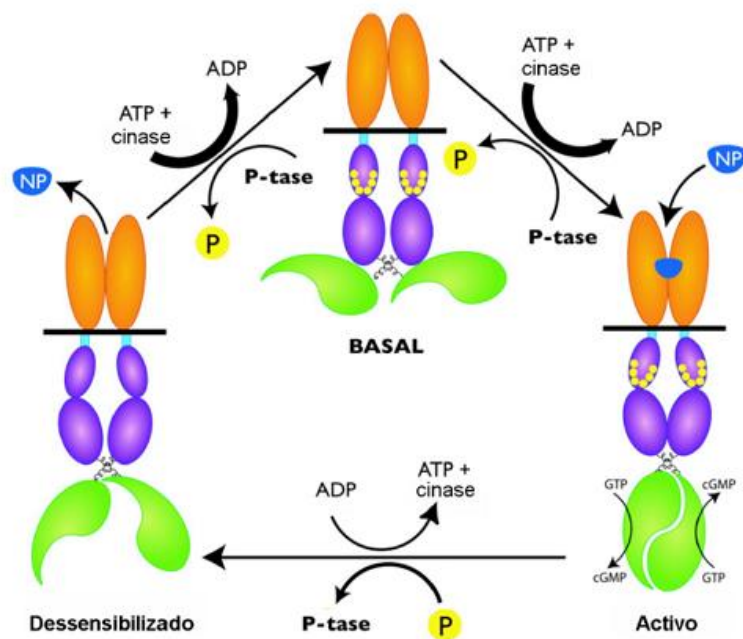


Figura 13 - Modelo hipotético da ativação e dessensibilização dos receptores NPR-A e B. Adaptado de [84].

1.5.2. Proteína cinase G

Através da produção do cGMP, a sGC e a pGC exercerem muitos efeitos fisiológicos como mediador da motilidade e do tónus do músculo liso vascular. Para fazer isto, o cGMP atua em efetores diretos tais como a família de proteínas cinases dependentes do cGMP ou PKG (proteína cinase G). A PKG fosforila um número importante de alvos biológicos e está implicada na regulação da relaxação do músculo liso, função plaquetária, divisão celular e síntese de ácidos nucleicos [84]. A PKG é uma cinase de serina/treonina e é composta por um domínio N-terminal, um domínio regulatório e um domínio catalítico. O domínio regulatório contém dois sítios de ligação ao cGMP e quando estão os dois ocupados ocorre uma alteração conformacional e deixa de haver a inibição da PKG no centro catalítico o que permite a fosforilação do resíduo de serina/ treonina e uma autofosforilação no N-terminal, o que vai provocar a sua ativação. Uma vez ativa a PKG pode atuar em muitos substratos, incluindo o recetor de IP3, a *phospholamban*, e as subunidades da fosfatase da cadeia leve da miosina. Existem duas isoformas desta enzima, a tipo I (PKG1) e a tipo II (PKG2), que derivam de genes diferentes (*prkg1* e *prkg2*) com diferenças a nível do domínio regulatório. A isoforma PKG1 (PKG1 α e a PKG1 β) é citosólica e a PKG2 é membranar e não se encontra expressa nas SMC [78, 84, 86]. O cGMP permite a redução da concentração intracelular de cálcio através da ativação da PKG, pois esta sabe-se que fosforila proteínas alvo (tais como, canais iónicos, bombas iónicas, receptores e enzimas) levando à diminuição das concentrações de cálcio e portanto ao relaxamento do músculo liso.

Múltiplos mecanismos têm sido propostos para explicar o papel da PKG na redução do cálcio (figura 15) [87].

1. Fosforilação da fosfolipase C ativada pela proteína G que depois inibe a atividade desta enzima, reduzindo assim a produção de IP3 e a mobilização de cálcio [88].
2. A sinalização NO/cGMP/PKG1 promove o aumento da sequestração e diminuição da libertação de cálcio como resultado da fosforilação do IRAG/recetor de IP3 [89].
3. A fosforilação/ativação dos canais BK_{Ca} promove a abertura dos canais, deste modo há uma perda de potássio intracelular, hiperpolarização da membrana e diminuição do influxo de cálcio através dos L-VOCC [90].
4. A fosforilação de phospholamban promove o seu efeito inibitório na bomba cálcio/ATPase e assim causa um aumento da sequestração de cálcio [91].
5. A fosforilação da fosfatase da cadeia leve da miosina promove a relaxação do músculo liso [87].

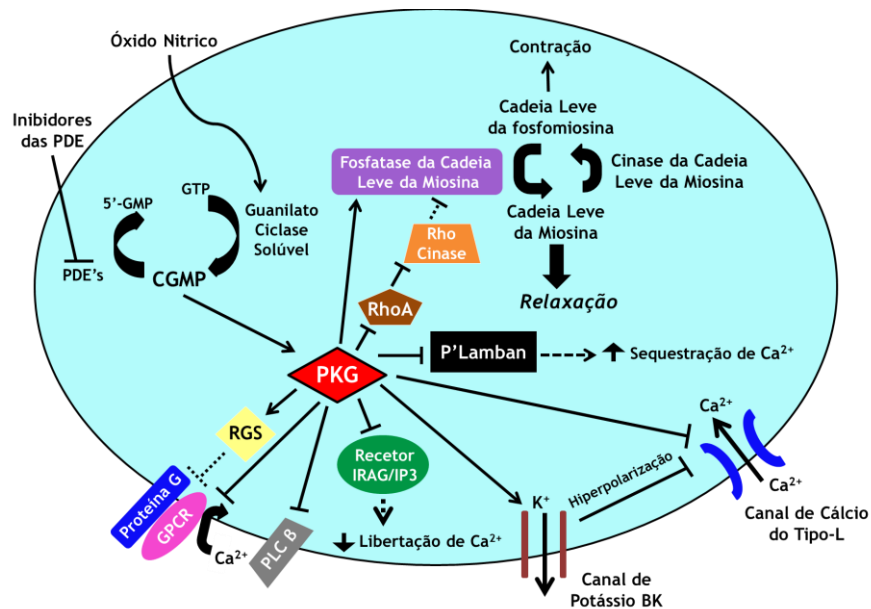


Figura 14 - Papel da PKG1 na modulação do nível do cálcio intracelular na promoção da relaxação do músculo liso. Adaptado de [87].

1.6. Androgénios

1.6.1. Generalidades

Os androgénios do corpo humano incluem a testosterona (Tes), a di-hidrotestosterona (DHT), a androstenediona e a dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato DHEAS. A maior parte da Tes é secretada pelos testículos e aproximadamente 5% da Tes presente no soro produzido nos homens sofre uma redução através da 5α -reductase, para formar o androgénio mais potente, o DHT. O DHT tem três vezes mais afinidade com o recetor de androgénios (AR) que a Tes. O DHEA e o DHEAS, são os esteroides adrenais mais abundantes nos humanos, e são precursores da produção intracelular de androgénios e estrogénios nos tecidos não reprodutores (figura 15) [92].

A Tes é o principal androgénio da circulação sanguínea, e é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas [93]. Mais de 95% da Tes em circulação nos homens é sintetizada a partir do colesterol proveniente dos ésteres de colesterol armazenados na matriz intracelular ou nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) [93, 94]. A síntese de Tes nos homens ocorre predominantemente nas células de Leydig dos testículos sob estimulação da hormona luteinizante (LH). A LH, por sua vez, está sob o controlo positivo dos níveis da hormona libertadora (GnRH) que é libertada pelo hipotálamo episodicamente, controlando a secreção de hormona luteinizante, e a Tes, por sua vez, exerce um feed-back negativo, inibindo a secreção de GnRH [92, 95]. A maior parte da Tes circulante, aproximadamente 98%, está ligada às proteínas, dentro das quais, 44% circulam ligadas à globulina que se liga a esteroides sexuais (SHBG) e 54% ligam-se à albumina e a outras proteínas enquanto os restantes 2% a Tes é livre [94]. A ligação da Tes à albumina e a Tes livre é referida como a quantidade biodisponível, enquanto que a que se liga à SHBG serve como uma forma de armazenamento ou transporte [92, 93, 95]. Quanto ao nível de Tes no soro, nos homens os níveis mais elevados são observados no início da manhã e vão diminuindo até à noite. A concentração da Tes diária no plasma varia entre 3,1 ng/mL e 8,4 ng/mL [93, 96].

A síntese de androgénios e estrogénios também pode ser feita na placenta desempenhando um papel importante durante a gravidez. Sugere-se que o complexo hormona-recetor pode estar envolvido no mecanismo da programação das condições fisiológicas, ou patológicas, normais na vida extra-uterinas. A concentração de DHEA e de 16alfa-DHEA e dos sulfatos correspondentes é maior na HUA do que na veia umbilical humana, indicando que estes androgénios são produzidos principalmente no compartimento fetal. A maioria dos androgénios produzidos pelo feto é posteriormente convertida em estrogénios na placenta. Contudo, a Tes é biossintetizada no testículo do feto, usando a progesterona e a pregnenolona como precursores, sendo a Tes determinante na diferenciação do mesmo [97].

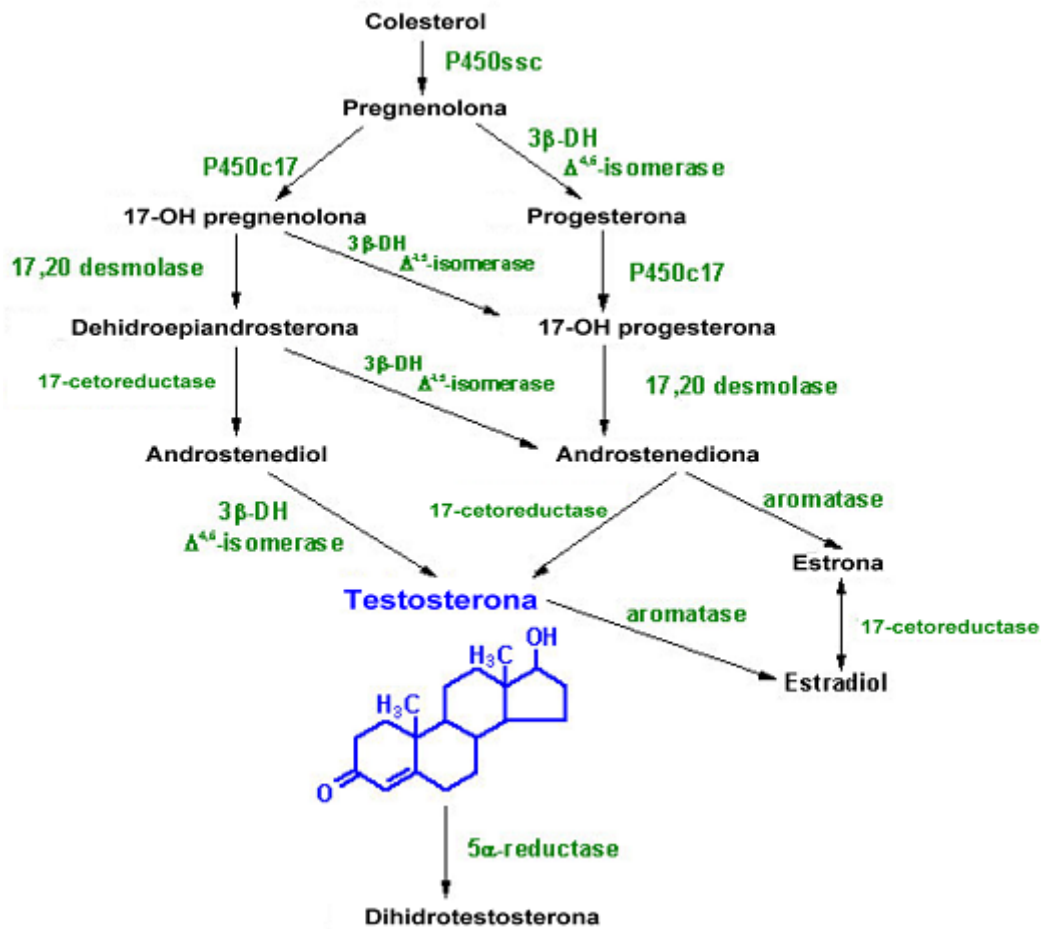


Figura 15 - Mecanismo da formação da di-hidrotestosterona, um potente metabolito da testosterona [98]

A ação dos androgénios é iniciada quando estes se ligam ao recetor de androgénios (AR). Este recetor AR distribui-se amplamente pelo sistema cardiovascular, é um membro da superfamília de recetores nucleares e os efeitos dos androgénios são mediados pela ativação do mesmo. A Tes e o DHT ligam-se a este recetor e produzem efeitos fisiológicos na massa e força muscular, densidade óssea, função metabólica, humor e cognição (figura 16) [93, 94, 99]. As ações biológicas dos androgénios via regulação transcricional dos genes alvo pelo AR são referidas como efeitos genómicos. Inicialmente, o androgénio entra na célula e liga-se ao AR, esta ligação provoca a dimerização do recetor agindo o dímero como fator de transcrição que se liga a sequências específicas do DNA (androgen Responde Elements) e deste modo regula a expressão de genes-alvo (figura 16) [92-94, 100, 101]. Para além dos efeitos genómicos dos esteroides, a Tes pode também exercer efeitos não genómicos de ação mais rápida, pela ligação da Tes a recetores de esteroides na membrana plasmática - o que leva ao bloqueio dos canais L-VOCC e abertura dos canais BK_{Ca} e K_v e também a indução rápida das cascatas de transdução de sinal dos segundos mensageiros incluindo a regulação da concentração de cálcio citosólico, a ativação da proteína cinase A, da proteína cinase C e das MAPKcinases [100-102].

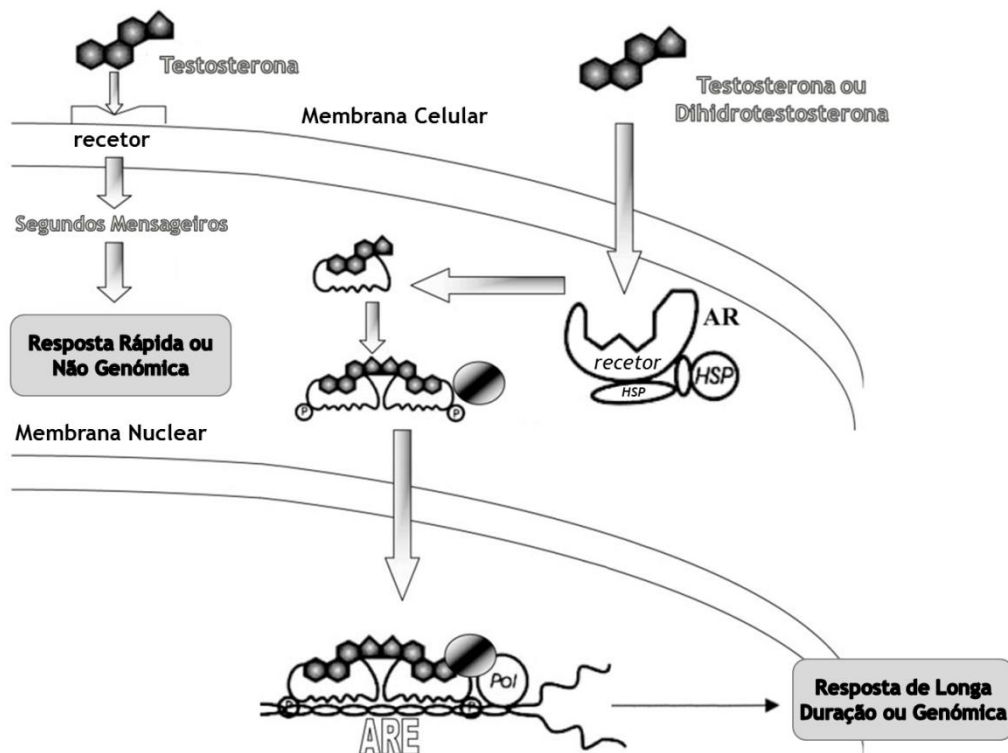


Figura 16 - Efeitos não genômicos (esquerda) e efeitos genômicos (direita) dos androgénios. ARE - elementos de resposta aos androgénios (androgen response elements). Adaptado de [103]

1.6.2. Mecanismo vasodilatador da testosterona

Nos últimos anos, o sistema cardiovascular tem sido um alvo importante para androgénios. A Tes, é considerada um esteroide vasoativo, e em estudos *in vivo* e *in vitro* em animais e humanos tem sido mostrado que a Tes provoca a relaxação dos vasos [101, 104, 105]. Controversamente, alguns estudos demonstraram também que a Tes pode produzir efeitos antirelaxantes, em particular no tratamento a longo prazo com doses elevadas de androgénios. No entanto, a maioria dos estudos disponíveis têm mostrado consistentemente um efeito vasodilatador da Tes [106]. É importante também realçar que o efeito vasodilatador não é exclusivo da Tes, outros androgénios como o DHT também são capazes de induzir a relaxação de vasos, como na aorta torácica de rato e na artéria umbilical humana [100, 107], mas ao que parecem são mais sensíveis ao vasorelaxamento induzido pela DHT. No entanto, os mecanismos através dos quais a Tes e o DHT modulam o tónus vascular são objeto de interesse recente. Esses mecanismos vão ser descritos mais abaixo [106].

Efeito no endotélio vascular

Diversos estudos estabeleceram claramente que os androgénios induzem um vasorelaxamento com um efeito rápido, não genómico na parede vascular [108]. Além disso, é importante assinalar que vários estudos têm demonstrado que as altas concentrações farmacológicas de Tes (10-100 μM) induzem a vasodilatação nos vasos sem endotélio, sugerindo um mecanismo independente do endotélio. Em contraste, outros estudos demonstraram que o relaxamento vascular é induzido por concentrações fisiológicas (100 pM-10 μM) de Tes e é inibido significativamente pela remoção do endotélio. Deste modo, estes dados sugerem a presença de um mecanismo dependente do endotélio com concentrações fisiológicas de Tes (11-36 nmol/l). Esta possibilidade é apoiada por estudos *in vivo*, que demonstraram que a vasodilatação induzida pela Tes em artérias coronárias sistémicas de cães e suínos, é dependente de óxido nítrico (NO) [108]. O NO é um potente vasodilatador que pode ser sintetizado pela sintetase do óxido nítrico (NOS) e é libertado pelo endotélio vascular, entre outros tecidos. A síntese de NO aumenta em resposta a concentrações fisiológicas de Tes pela ativação da via não genómica afirmando que a Tes aumenta a produção do NO e estimula a sua síntese, provocando o aumento da formação de cGMP e induzindo a relaxação das células do músculo liso vascular.

Por outro lado, Yue et al. (1995) examinaram artérias coronárias de coelhos com e sem endotélio. Yue et al. (1995) expuseram as artérias à prostaglandina para contrair a túnica média. Depois de 7 minutos, as artérias foram lavadas e expostas à Tes ou numa solução de controlo. A percentagem de relaxamento e a concentração da Tes foi determinada e foi observado um aumento. A significância estatística foi observada, e não houve diferença entre os grupos com e sem endotélio. Isto sugere que a Tes tem um efeito relaxante direto no músculo liso e não necessita do endotélio para induzir vasodilatação [101, 108-110]. Deenadayalu et al. (2001) fizeram um estudo parecido usando artérias coronárias de suínos, onde foi usada a prostaglandina como agente contrátil. Comprovaram que a Tes tem um efeito vasodilatador e a remoção do endotélio não influenciou o resultado [111]. Jones et al. (2005) observaram igualmente em artérias e aortas de ratos que não havia diferença na relaxação com Tes em vasos com ou sem endotélio. Em síntese, podemos afirmar que alguns estudos demonstram uma interação entre o efeito da Tes e o endotélio, mas é visível que o efeito vasodilatador da Tes é principalmente devido a uma ação direta no músculo liso vascular [112].

Modulação dos canais iónicos

Diversos estudos demonstraram que o mecanismo fundamental subjacente à ação vasodilatadora da Tes está associado com a modulação dos canais iónicos influenciando tanto a abertura dos canais de potássio e/ou a inativação dos canais de cálcio [101, 108].

Ativação dos canais de potássio

Vários estudos realizados em animais sugerem que a vasodilatação induzida pela Tes é mediada predominantemente via canais de K^+ em artérias mesentéricas de rato [113], artérias coronárias de coelho [109], e na aorta de ratos [114]. Num estudo usando o patch-clamp, Deenadayalu et al. (2001) demonstraram, através de experiências em SMC de artérias coronárias de suíno, que a vasodilatação provocada pela Tes é devido à ativação dos canais BK_{Ca} [111]. Noutro estudo Seyrek et al. (2011), observou e concluiu que a Tes estimula os canais K_v e BK_{Ca} em veias de grande condutância e os canais K_{ATP} em artéria e veias de pequena resistência [115]. Contrariamente Ding e Stallone (2001) observaram que o efeito da Tes é exclusivamente devido à ativação dos K_v , não estando envolvidos os canais K_{ATP} e os BK_{Ca} [114]. O efeito vasodilatador da Tes nas HUA, pré-contraídas com serotonina ou histamina ou cloreto de potássio, foi parcialmente mediado pela ativação de ambos os canais de potássio, K_v e BK_{Ca} [14]. Estudos realizados pelo nosso grupo em HUASMC foi observado que a atividade dos K_{ATP} é insignificante, e existe uma maior atividade dos canais BK_{Ca} e K_v [53].

As investigações sobre os efeitos dos andrógenos nos canais iônicos também são relevantes para a compreensão do seu papel em algumas doenças cardiovasculares, como por exemplo na HT [100]. Neste sentido, Amberg et al. demonstraram que, em ratos hipertensos, verificou-se uma diminuição da expressão dos canais BK_{Ca} a nível vascular. Outros demonstraram que, em artérias de ratos hipertensos há pouca funcionalidade dos canais K_v e/ou uma maior atividade dos canais de BK_{Ca} [116]. No entanto Saldanha et al (2012), demonstraram que a longo prazo (durante 24h) os efeitos dos androgénios envolvem mudanças na expressão dos canais BK_{Ca} e modificações no envolvimento dos canais K_v nos mecanismos subjacentes à vasodilatação induzida pela Tes. Estas observações sugerem que os andrógenos podem ser benéficos na prevenção da hipertensão arterial pois, têm efeitos vasodilatadores diretos, e efeitos genómicos que aumentam a expressão dos canais BK_{Ca} e dos K_v como mediadores da vasodilatação [100].

Bloqueio dos canais de Cálcio

Em relação aos canais de cálcio, vários estudos têm sugerido que a Tes inibe principalmente os elementos dependentes de cálcio intervenientes na contração vascular, através da inibição dos L-VOCC para induzir os efeitos vasodilatadores da Tes [117]. Scragg et al. (2004) demonstraram que a resposta vasodilatadora à Tes ocorre seletivamente através da inibição dos L-VOCC em células embrionárias de rim transfetadas com a subunidade α_1-C , que forma o poro dos L-VOCC e em células SMC vasculares de A7r5 de rato que expressam estavelmente o canal dos L-VOCC [118]. Através de células da aorta de rato, Montano et al. (2008) demonstraram, que, a vasodilatação induzida pela 5β -DHT pode ser devido ao seu bloqueio seletivo nos L-VOCC atuando como um puro antagonista em concentrações que vão de nM a μ M. Em contraste, a Tes pode assumir diferentes locais de ação dependendo do intervalo de concentração utilizada. A Tes pode ser antagonista (baixas concentrações, nM) ou agonista (altas concentrações, μ M) dos L-VOCC. Com este estudo também se pode observar

que concentrações elevadas da Tes aumentam os níveis de cAMP, podendo assim dever-se à ativação da PKA [106].

Em relação à artéria umbilical humana, Perusquia et al.(2007) sugeriram que a Tes provocava relaxação da HUA pré-contraída com KCl e com 5-HT devido à inibição direta dos VOCC e não através da ativação de vias de sinalização intracelulares, e demonstrou também que elevados níveis de outros androgénios fetais no plasma, como DHEA, podem induzir um efeito relaxante significativo. Podendo concluir que níveis baixos destes androgénios podem ser a causa de muitas doenças da gravidez como a pré-eclampsia [107]. Saldanha et al. (2012) testaram a longo prazo o efeito do DHT nas HUASMC, e demonstraram que o DHT diminui a expressão dos L-VOCC mais especificamente da subunidade $\alpha 1$ [100].

Envolvimento do cGMP e da PKG no vasorelaxamento induzido pela testosterona

Para explicar alguns dos efeitos rápidos não genómicos da Tes, o envolvimento de algumas vias de sinalização têm sido propostos. Deenadayalu et al. (2001) sugeriram que a ativação dos canais BK_{Ca} pela Tes pode estar associada com o aumento dos níveis intracelulares do cGMP [111]. Os dadores de NO e o ANP são potentes vasodilatadores e atuam através do aumento intracelular dos níveis de cGMP, resultando na ativação da PKG. Estudos recentes demonstraram que a produção do cGMP pela guanilato ciclase membranar (GC particulado) regula preferencialmente os alvos localizados na membrana plasmática, como os canais iónicos, provavelmente devido à ação localizada dependente da PKG [119]. Cairrão et al. (2008) mostraram que na HUA a Tes e o ANP, estimulam a atividade dos canais BK_{Ca} e dos K_v devido à ação da PKG. Sugerem ainda que a Tes aumenta os níveis de cGMP ativando a pGC diretamente ou indiretamente por um mecanismo ainda desconhecido [14].

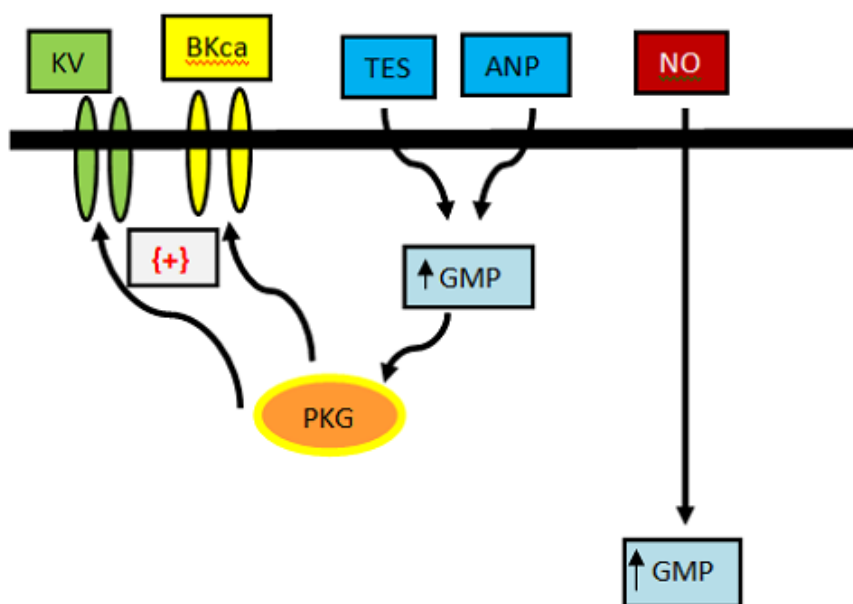


Figura 17 - Mecanismo rápido da Testosterona nas células musculares lisas da artéria umbilical humana [120]

Assim como mecanismo geral não-genômico, foi estudado que a Tes ativa a guanilato ciclase membranar e conseqüentemente aumenta o cGMP, que ativa a proteína cinase G (PKG) e finalmente estimula os canais K_v e BK_{Ca} nas SMC da HUA [14, 53, 100, 101, 121, 122].

1.6.3. Androgénios e as Doenças Cardiovasculares

Globalmente, as doenças cardiovasculares (CVD) são a maior causa de mortalidade. As diferenças entre homens e mulheres na incidência dos problemas cardiovasculares ainda não foi devidamente explicada [123]. O foco tem sido largamente os estrogénios, mas nenhuma evidência conclusiva provou o seu papel na redução da incidência da CVD. Na verdade, os resultados dos principais estudos concluíram que após a menopausa a suplementação de estrogénio pode ser associada a um aumento do risco de doenças cardiovasculares, em vez de reduzir esse risco [124]. A suplementação de estrogénios em homens apresenta resultados claramente piores. Isto gerou mais interesse em identificar qual o papel dos androgénios na doença cardiovascular [95]. Devido à elevada prevalência de algumas doenças cardiovasculares nos homens, a Tes foi inicialmente considerada como prejudicial para o sistema cardiovascular. Nos últimos anos, diferentes estudos clínicos reverteram esta ideia. De facto, foi observado que a maior parte dos homens com níveis mais baixos de Tes tendem a ter maior incidência de doenças cardiovasculares, incluindo HT, dislipidemia e doença da artéria coronária [14]. No entanto, a intervenção com a suplementação de Tes tem sido clinicamente benéfico apenas na melhoria do desempenho de pacientes com insuficiência cardíaca. Estes dados, embora promissores são escassos neste momento para a recomendação do uso da suplementação de Tes nesses pacientes. No entanto, é reconfortante a evidência de que a suplementação de Tes pode ser usada com intenção terapêutica, sem efeitos adversos significativos, apesar das relatadas complicações idiossincráticas. Os efeitos colaterais relatados em atletas que abusam dos androgénios e esteroides anabolizantes são observados principalmente em doses suprafisiológicas. Deste modo podemos afirmar que em determinadas patologias a terapia hormonal de substituição é uma forma de prevenir e/ou reduzir a severidade da CVD como a HT que ainda hoje atinge um grande número de indivíduos [14, 92, 110, 125].

1.6.4. Androgénios e a Hipertensão

Pouco se conhece sobre a influência dos androgénios na patogénese da HT. Há relatos de que níveis baixos de Tes circulante ocorrem em homens hipertensos. Alguns estudos sugeriram que a diminuição dos níveis de androgénios está associada à HT, enfarte do miocárdio e doença arterial coronária. Uma ressalva importante é que os níveis de Tes mais baixos observados nos estudos descritos podem simplesmente refletir o aumento do stresse induzido por recente cirurgia, traumatismo craniano etc [126]. Giorgi et al.(1999) mostraram através de experiências placebo que o efeito da Tes na pressão sanguínea pode ser é modelado pelo exercício físico [127]. Foi estudado também que a Tes aumenta os níveis de

homocisteína, que induz a destruição endotelial e conseqüentemente o desenvolvimento de aterosclerose. Assim a Tes pode elevar a pressão sanguínea e contribuir para a patogénese da CVD através da alteração da homocisteína, endotelina-1 e catecolaminas [126, 128].

Quanto ao tónus vascular Saldanha et al.(2012) observaram que os androgénios podem ser benéficos na prevenção da HT como já foi referido anteriormente pois, têm efeitos vasodilatadores, e tem efeitos genómicos que aumentam a expressão dos canais BK_{Ca} e K_v como mediadores da vasodilatação [100].

Quanto aos efeitos dos androgénios nos rins, foram feitos estudo em animais que afirmam que os efeitos anti-mitogénicos da Tes nas SMC vasculares diminui a habilidade dos rins excretarem sal, e assim predispõe para a HT [126, 129].

1.7. Patologias da Gravidez

1.7.1. Hipertensão

A hipertensão é uma das doenças mais comuns na gravidez e a maior causa de morbidade e morte maternal e perinatal [130]. A hipertensão complica 5% a 10% das gravidezes e inclui várias desordens como a pré-eclampsia, hipertensão gestacional e hipertensão crónica. Apesar da morbidade significativa associada aos bebés de grávidas hipertensas, a patogénese permanece por esclarecer, o que limita a capacidade de prevenir e tratar esta desordem [131-133]. Numa gravidez normal, existem algumas alterações no sistema cardiovascular que ocorrem para se adaptar às exigências da gravidez. Estas adaptações são caracterizadas por um aumento do volume de sangue, aumento do débito cardíaco, diminuição da pressão sanguínea, uma diminuição da resistência aos agentes vasopressores (fármacos cuja ação característica é o aumento da pressão arterial através da vasoconstrição arterial) tais como a norepinefrina e angiotensina II e uma vasodilatação generalizada [134, 135].

A hipertensão na gravidez está associada a um risco aumentado de casos cardiovasculares na vida adulta do feto [135]. A hipertensão é definida como um aumento sustentado da pressão sanguínea a valores de 140mm Hg sistólica ou 90 mm Hg diastólica [136].

Hipertensão gestacional

A hipertensão gestacional define-se como uma elevação significativa da pressão arterial durante a segunda metade da gravidez, após a 20ª semana em grávidas que previamente foram dadas como normotensas. Valores superiores a 140/90mmHg e a ausência de proteinúria também são característicos. A hipertensão gestacional pode ser uma manifestação precoce da pré-eclâmpsia, e se a pressão arterial permanece elevada após o parto, pode levar ao diagnóstico de hipertensão crónica [131, 132, 134, 136-138].

Hipertensão crónica

Hipertensão crónica é definida com uma pressão arterial maior que 140/90 mm Hg e apresenta-se antes da gravidez ou antes da 20ª semana de gravidez no quarto mês de gestação. Também pode ser considerada hipertensão crónica, o aumento de pressão diagnosticado em qualquer fase da gravidez e que persiste além de seis semanas após o parto. Também é considerada hipertensão crónica quando diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez e que não se normaliza no pós-parto. O grande problema neste tipo de hipertensão é a grande probabilidade de desenvolver pré-eclâmpsia, pois os pacientes com hipertensão crónica têm maiores probabilidades de desenvolver esta outra forma de hipertensão que pode complicar a gestação [131, 138].

1.7.2. Pré-eclâmpsia

É uma desordem específica da gravidez que ocorre entre 3% a 5% das gravidezes. A pré-eclâmpsia é uma doença multissistémica onde existe um mau funcionamento do sistema vascular [131, 132, 135, 139, 140]. A pré-eclâmpsia é caracterizada por hipertensão e proteinúria (≥ 300 mg/24 horas), redução do volume do plasma, aumento da resistência periférica e vasoconstrição geral. Normalmente desenvolve-se depois de 20 semanas de gestação e normaliza após a expulsão da placenta. A pré-eclâmpsia é ainda uma das principais causas de morte e morbidade materna e perinatal [131, 132, 134-142]. A PE é caracterizada por uma resposta vascular anormal à placentação que está associada a um aumento da resistência vascular sistémica, aumento da agregação das plaquetas, ativação do sistema de coagulação, e disfunção das células endoteliais. As descobertas clínicas sobre a PE podem-se manifestar tanto como um síndrome materno (hipertensão e proteinúria, com ou sem outras anomalias multissistémicas) ou síndrome fetal (restrição do crescimento fetal, líquido amniótico reduzido, e oxigenação anormal). Alguns autores consideram ainda que a pré-eclâmpsia pode ser caracterizada por edema [131, 136, 140]. Mas hoje em dia este sintoma não é mais usado na definição de pré-eclâmpsia. Este sintoma é muito raro aparecer, e por isso é sim um sinal de alerta, em que afeta os membros inferiores, mas também nas mãos e no rosto da mãe [138]. As duas complicações mais graves da pré-eclâmpsia são (1) a síndrome HELLP onde é característica hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixas plaquetas, e (2) a pré-eclâmpsia eclâmpsia, caracterizada pelo desenvolvimento de convulsões. Ambas as condições são raras, mas estão associadas a um prognóstico particularmente pobre [131].

Capítulo II - Objetivo

Diversos estudos têm discutido a importância dos androgénios nas doenças cardiovasculares. Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a testosterona apresenta efeitos benéficos para o sistema cardiovascular, tendo um efeito vasodilatador nas artérias umbilicais humanas. Esse efeito vasodilatador passa por aumentar a concentração intracelular do cGMP e consequente ativação da PKG que provoca a ativação dos canais de potássio BK_{Ca} e K_v . A terapia de substituição hormonal em determinadas patologias é uma forma de prevenir e/ou reduzir a severidade de doenças cardiovasculares como hipertensão que ainda hoje atinge grande número de indivíduos. As síndromes hipertensivas na gravidez são a principal causa de morbidez e mortalidade materna e fetal no mundo desenvolvido.

Torna-se assim importante demonstrar o efeito dos androgénios na expressão de diferentes proteínas, envolvidas na regulação da contratilidade vascular de artérias umbilicais humanas provenientes de grávidas normotensas (Amostras normais) e provenientes de grávidas hipertensas (amostras com hipertensão).

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

1. Isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana.
2. Pré-incubação com os androgénios a diferentes concentrações
3. Estudos de expressão da sGC, do NPRA e PKG usando o PCR em tempo real.

Capítulo III - Materiais e Métodos

2.1. Preparação do tecido

Os cordões umbilicais procederam de partos vaginais no término da gestação realizados pelo Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira. Todos os procedimentos levados a cabo com o cordão umbilical foram aprovados pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira EPE (Covilhã, Portugal) em conformidade com a Declaração de Helsínquia.

Os cordões umbilicais provenientes de mães com hipertensão gestacional e pré-eclampsia procederam de partos vaginais e cesarianas realizadas pelo Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital Sousa Martins (Guarda). Todos os procedimentos destas amostras foram aprovados pelo “Comité de Ética” do Hospital Sousa Martins (Guarda, Portugal) em conformidade com a Declaração de Helsínquia.

Os cordões umbilicais foram recolhidos dentro de intervalos de tempo não superiores a 15 minutos, e após os partos foram imediatamente colocados numa solução salina fisiológica estéril, PSS constituído por (mM); NaCl 110; CaCl₂ 0,15; KCl 5; MgCl₂ 2; HEPES 10; NaHCO₃ 10; KH₂PO₄ 0,5; NaH₂PO₄ 0,5; Glucose 10; EDTA 0,49). A fim de evitar contaminações e a degradação dos tecidos, uma mistura de antibióticos (penicilina 5 U/ml, anfotericina B 12,5 ng/ml, estreptomicina 5µg/ml) e antiproteases (leupeptina 0,45 mg/l, benzamidina 26 mg/l e inibidor de tripsina 10 mg/l) foi adicionada ao PSS. As amostras foram sempre mantidas a 4°C e utilizadas nas 24h-48h seguintes.

2.2. Cultura de células

A dissecação do cordão umbilical e cultura celular do mesmo foi obtida usando os procedimentos descritos por Martin et al e por Cairrão et al (Cairrão et al., 2010; Martin de Llano et al., 2007). A dissecação das artérias do cordão umbilical foi realizada numa câmara de fluxo laminar, sob condições de esterilidade e sobre gelo. Primeiramente o cordão foi lavado com PSS e antibiótico para evitar a contaminação. Posteriormente o cordão é colocado numa placa de Petri com 35 mL de PSS e 350 µl de antibiótico e as artérias isoladas por remoção da geleia de Wharton envolvente. Após o isolamento da HUA, a artéria foi seccionada longitudinalmente e os segmentos desta artéria foram cortados em retângulos, e posteriormente removida a camada endotelial da túnica íntima (endotélio) com uma leve passagem de um cotonete estéril. As artérias sem endotélio foram transferidas para uma nova caixa de petri com 3 ml de PSS e 30 µl de antibiótico. As camadas de músculo liso vascular foram extraídas, usando para o efeito uma pinça e um bisturi cirúrgico estéreis. Posteriormente, recorreu-se à lavagem das camadas utilizando 3 ml de PSS sem antibiótico, e o mesmo procedimento foi realizado quatro vezes seguidas. As camadas de músculo liso foram

posteriormente colocadas em frascos de cultura previamente revestidas com colagénio (5 µg/cm) e colocadas na incubadora a 37°C numa atmosfera de ar de 95% e 5% de CO₂. Após 10-15 min foram adicionados 3 ml de meio de cultura e voltou-se a colocar na incubadora. Depois de 24h neste ambiente, foi adicionado 2ml de meio HUASMC contendo *Dulbecco's modified Eagle's medium* F12 (DMEM-F12) (Sigma-Aldrich), 5% de soro fetal bovino (FBS), fator de crescimento epidérmico (EGF, 100 ng/ml), fator de crescimento de fibroblastos (FGF, 1 µg/ml), heparina (2 mg/ml), e insulina (5 µg/ml). O meio de cultura foi mudado a cada 2 dias e as culturas confluentes foram obtidas entre 15-30 dias. Subculturas destas células foram obtidas até à sexta passagem.

2.3. Tratamento com 5α-DHT

As placas de 6 poços com células musculares lisas em plena confluência, foram submetidas ao tratamento com 5α-DHT. Inicialmente, após se verificar plena confluência em cada poceto, foi colocado meio sem soro. Após 24h foi colocado o 5α-DHT em diferentes concentrações (1nM, 10nM, 100nM, 1000nM) e em poços diferentes. O DHT (Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal)), foi inicialmente dissolvido em etanol para criar uma solução stock, onde posteriormente foi diluído para as concentrações desejadas usando meio sem soro. Nos pocetos de controlo, foi utilizado o solvente que é utilizado na preparação de 5α-DHT, sendo este 0,1% de etanol.

2.4. Extração do RNA total

A extração do RNA Total (RNAt) foi efetuada utilizando o TRIzol® Reagent (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante. Assim, para extrair o RNAt das células musculares lisas adicionou-se 200 µL de reagente TRIzol em cada poço (1ml TRIzol/100mg de tecido), que consiste numa solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato e permite a lise celular, libertando para a solução o RNA sem que a sua integridade seja comprometida. Após a adição do Trizol em cada poço (placa de 6) fez-se uma raspagem com um cell scrapper na superfície da placa para soltar as células. Juntou-se o conteúdo de dois poços em cada eppendorf de 1,5 mL para uma maior quantidade de RNA. Após incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 80 µL de clorofórmio (200 µL de clorofórmio/ 1 mL de TRIzol) (VWR) e homogeneizou-se a amostra por inversão. Esta foi posteriormente incubada durante 2-3 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 12000g, com a finalidade de se obter uma fase aquosa que contém o RNA. Após a centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo de cada eppendorf obtivemos a fase orgânica (rosa) que contém as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio, a interfase (branca) onde está presente o DNA e por fim a fase aquosa (transparente), onde está contido o RNA. Esta fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf de 1,5 mL, ao qual se adicionou 200 µL de isopropanol (500 µL de isopropanol/1mL de TRIzol) (VWR). Após agitação mecânica, para melhor precipitação de RNA, incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente

e centrifugou-se posteriormente a 4°C a 12000g durante 10 minutos. Após a centrifugação rejeitou-se o sobrenadante, e o RNA sob forma de um precipitado branco (pellet), lavou-se cerca de duas vezes, onde a cada lavagem se adicionou 400 µL de etanol a 75% em água DEPC a -20°C. Agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos a 7500g. Após a centrifugação fez-se um quick spin e retirou-se o excesso de etanol. Depois de ser incubado à temperatura ambiente, durante cerca de 5 minutos, hidratou-se o pellet, em 20µL de água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC) e armazenaram-se a -80°C para uso posterior.

De forma a quantificar o RNAt efetuaram-se leituras espectralométricas a 260 e 280nm, utilizando o nanoespectrofotómetro (Nanophotometer™, Implen, Germany).

Este aparelho fornece diretamente a concentração de RNAt (µg/µL) e o rácio entre a A260/A280, que determina a qualidade do RNAt com base na absorvência a 260 nm, comprimento de onda ao qual os ácidos nucleicos têm pico de absorção, e a 280 nm, comprimento de onda ao qual as proteínas têm pico de absorção. Para determinar uma boa qualidade e pureza de RNAt, o rácio em causa deverá estar no intervalo de 1,8 a 2,1. Os rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou com fenol e os rácios superiores a 2,1 indicam contaminação com DNA.

Para assegurar a pureza do RNAt, reduzindo ao máximo a atividade das ribonucleases (RNases) em todos os passos da extração foi usado material estéril, e todas as soluções foram preparadas com água DEPC e todo o procedimento anterior foi realizado em gelo devido à sensibilidade do RNA.

2.5. Síntese de DNA complementar

O cDNA é o DNA sintetizado a partir da transcrição reversa do mRNA, por ação da enzima transcriptase reversa, obtendo assim uma cópia exata do gene sem intrões. A reação requer o uso de primers, iniciadores de síntese cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado, nucleótidos para a síntese DNA (dNTPs), tampão e M-MuLV, todos presentes no kit NZY M-MuLV Reverse Transcriptase (NzyTech, Portugal), seguindo o protocolo do fabricante.

Preparam-se as misturas com volumes de reagentes para n+1 reações. Assim, para cada reação de síntese de cDNA de volume final 20 µL adicionou-se o volume adequado para 1µg de RNA, 2,5 µL de Random hexamer mix (0.5 µg /µL) (NZYset, Portugal), 1 µL de dNTP's (10 mM) (NZYset, NzyTech, Portugal) e fez-se o volume com 17 µL com água estéril livre de nucleases. Esta mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos, e de seguida arrefecida em gelo. Posteriormente, adicionou-se outra mistura com os seguintes reagentes: 2 µL de 10x reaction buffer (nzytech, Portugal), e 1 µL de M-MuLV. Seguiu-se uma segunda incubação a 25°C durante 10 minutos novamente a 37°C durante 60 minutos. Por fim, as amostras foram incubadas a 70°C durante 15 minutos e guardou-se o cDNA a -20°C.

2.6. PCR convencional

A expressão dos genes, nomeadamente da sGC, NPRA, e PKG foi analisada através da técnica de PCR convencional (RT-PCR). A mix foi realizada com n+1 reações e para um volume final de 25 μ L. Por cada reação adicionou-se 2,5 μ L de 10x buffer (NZY Taq DNA polymerase, Nzytech, Portugal), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM) (nzytech, Portugal), 0,625 μ L de dNTP's (10 mM), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (NZY Taq DNA polymerase, Nzytech, Portugal), 1,2 μ L de primer Fw e de primer Rv e 16,875 μ l de água estéril até um volume total de 24 μ L. A cada reação foi-lhe adicionado 1 μ L de cDNA, à exceção do negativo, ao qual se adicionou água. A amplificação dos genes ocorreu num termociclador TProfessional Basic Gradient (Biometra). Inicialmente as amostras foram colocadas a 95°C durante 5 minutos, de seguida estas foram expostas a 30 ciclos onde estiveram a 95°C durante 30 segundos para a molécula de DNA desnaturar, depois à temperatura ótima de emparelhamento de cada primer durante 30 segundos para cada primer se poder ligar à molécula de DNA e a 72°C durante 30 segundos, onde ocorre a fase de amplificação, e por fim as amostras foram colocadas a 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% (GRiSP, Portugal) na presença de Green safe (NzyTech, Portugal) e utilizando o marcador NZY DNA Ladder V (nzytech, Portugal).

2.7. PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes NPR1, PRKG1 α , GUCY1 α 3, foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o kit Maxima SYBR®Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific), nos dois grupos em estudo (HUASMC provenientes de grávidas normotensas vs HUASMC provenientes de grávidas hipertensas). O gene endógeno usado foi a β -actina para normalizar os níveis de expressão (tabela 3). A eficiência do Real Time PCR (iCycler iQ™5, Biorad, Hercules) foi determinada para todos os primers usando diluições de amostras de cDNA (1:1, 1:5, 1:25). As reações de amplificação dos genes foram preparadas para um volume final de 20 μ L, para tal adicionou-se 10 μ l de SYBR green Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 1,2 μ l de Primer Fw e de Primer Rv, 1 μ l de cDNA e por fim fez-se com água estéril (Thermo Scientific). As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, temperatura de annealing durante 30 segundos, e 72°C durante 10 segundos. A formação de dímeros de primers e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das curvas melting do PCR em tempo real. As diferenças entre experiências foram calculadas usando o modelo matemático de Pfaffl usando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [143].

Tabela 3 - Primers utilizados para PCR em tempo real

Nome do primer	Gene	Sequência do primer	Fragmento (bp)	Temperatura (°C)	Nº gene bank
B-actina	ACTB	Fw 5'-CATCCTCACCTGAAGTACCC-3' Rv 5'-GCCTGGATAGCAACGTACATG-3'	314	60	NM_001101
PKG	PRKG1 α	Fw 5'-GGCTGTCAGAGAAGGAGGAAG-3' Rv 5'-GGAAGGACCTGTACGTCTGC-3'	150	60	NM_001098512.2
GC	GUCY1a3	Fw 5'-GATAGCACTGATGGCCCTGAA-3' Rv 5'-GTAGTCCAATTCGCATCTTGATAGG-3'	89	60	NM_00130687
NPRA	NPR1	Fw 5'-GCAAAGGCCGAGTTATCTACATC-3' Rv 5'-AACGTAGTCCTCCCCACACAA-3'	98	60	NM_000906.3

2.8. Análise estatística

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

Capítulo IV - Resultados

A primeira fase deste trabalho foi analisar a expressão de várias proteínas que participam na regulação da contratilidade vascular. Foram analisados os níveis de expressão do mRNA da sGC, do NPRA e da PKG de HUASMC de cordões umbilicais provenientes de grávidas normotensas e hipertensas. Estas experiências foram realizadas através da técnica de PCR em tempo real. As células testadas foram tratadas com diferentes concentrações de 5 α -DHT (1-1000nM) e as células que não foram tratadas com DHT serviram de controlo. A β -actina foi utilizada como gene de referência interno para normalizar os níveis de expressão do mRNA dos genes.

4.1. Análise da expressão do mRNA da sGC

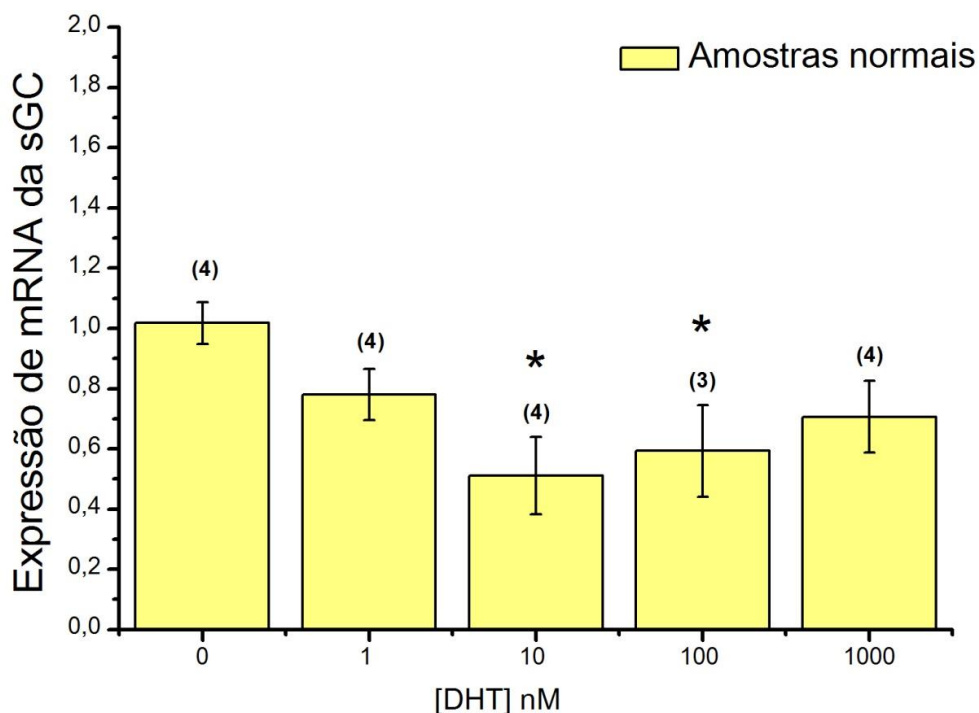


Figura 18 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA da sGC nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P <0,05 Control versus pré-incubação com DHT (one-way ANOVA com Dunnett's post hoc test).

Relativamente ao nível de expressão da sGC de HUASMC provenientes de grávidas normotensas, podemos observar que a 5 α -DHT provocou uma diminuição da expressão nas concentrações de 10 nM e 100 nM (P<0,05).

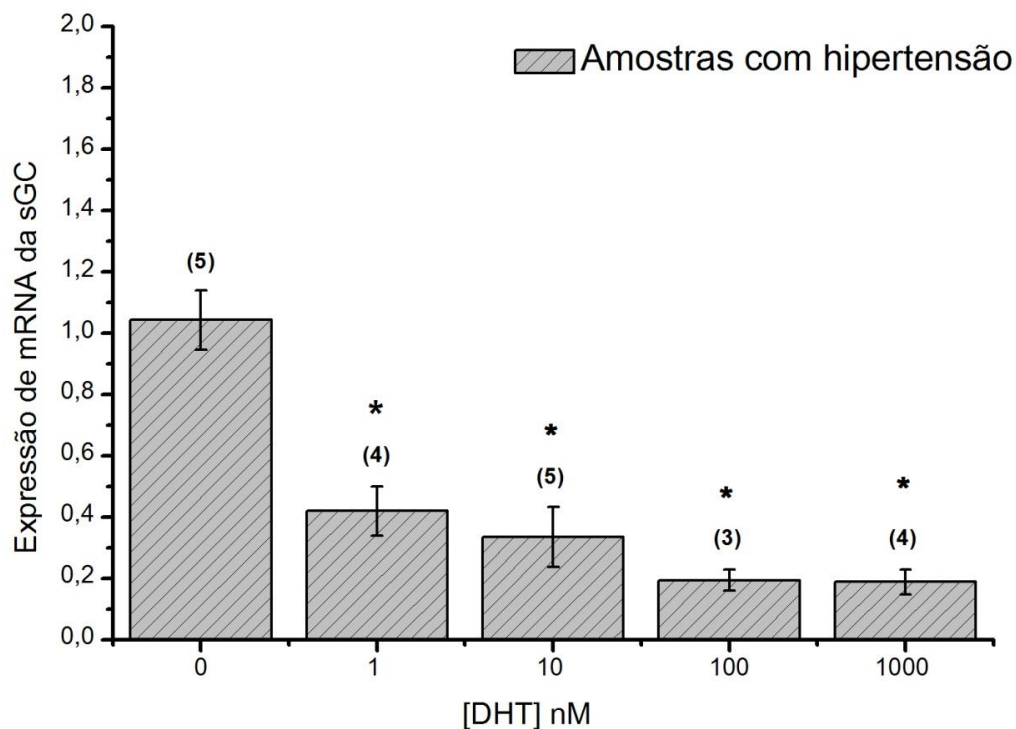


Figura 19 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA da sGC nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas hipertensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P <0,05 Control versus pré-incubação com DHT (one-way ANOVA com Dunnett's post hoc test).

Em relação à expressão da sGC em amostras com hipertensão, podemos observar que a as diferentes concentrações de 5 α -DHT provocam uma diminuição da expressão de sGC, relativamente ao controlo (0nM).

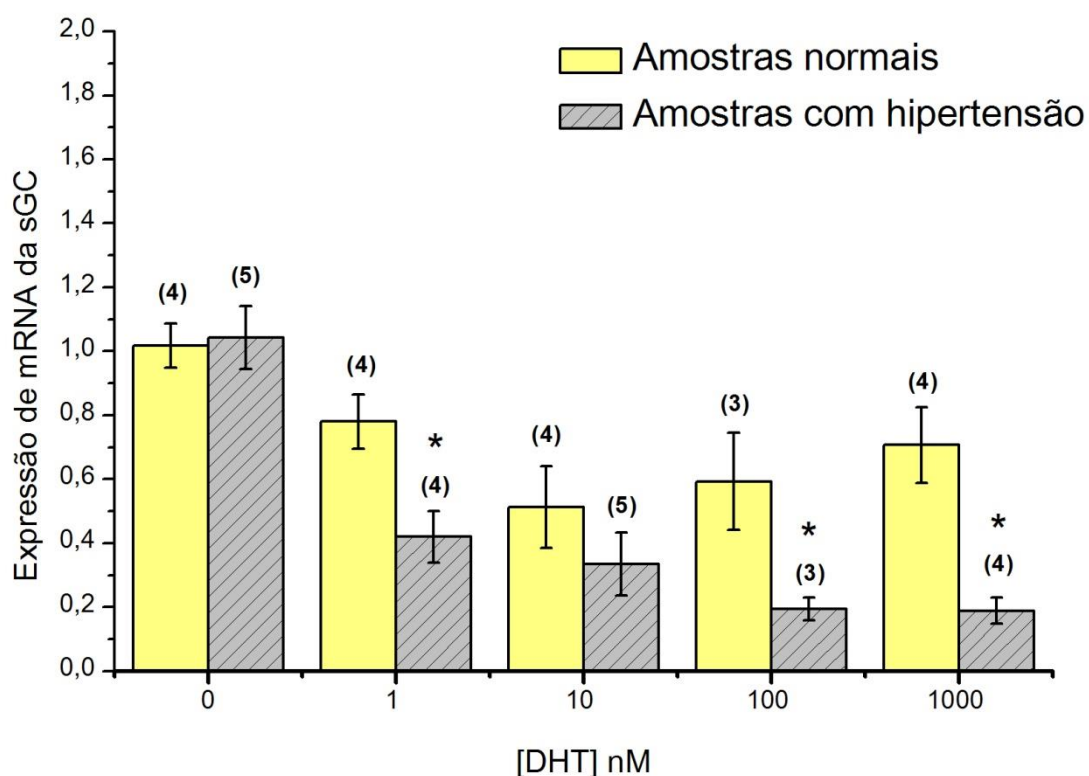


Figura 20 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA da sGC nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas *versus* cordões procedentes de grávidas hipertensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P < 0,05 Amostras provenientes de grávidas normotensas *versus* amostras provenientes grávidas hipertensas com DHT (student's t-test)

Ao compararmos os níveis de expressão entre as HUASMC de cordões umbilicais de situações de gravidez normais *versus* cordões de situações de gravidez com hipertensão observamos que há uma diminuição generalizada da expressão, sendo mais significativa à medida que as concentrações de 5 α -DHT aumentam. Esta diminuição é maior em células procedentes de situações de hipertensão, sendo que em presença de 5 α -DHT a sGC é mais expressa em células procedentes de grávidas normotensas (figura 21).

4.2. Análise da expressão do mRNA do NPRA

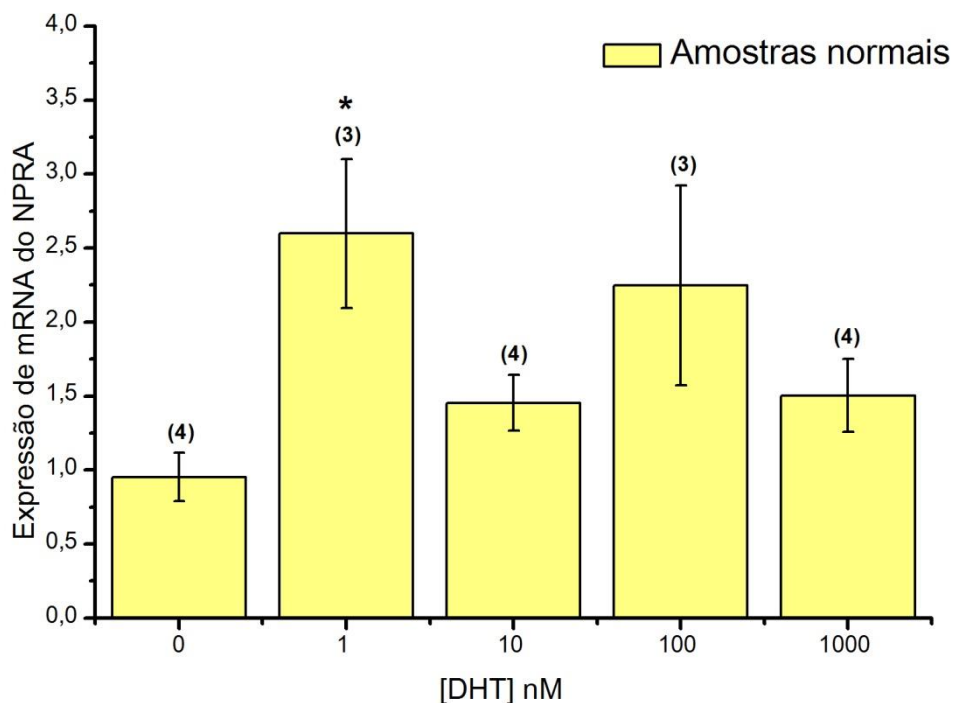


Figura 21 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA do NPRA nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P <0,05 Control versus pré-incubação com DHT (one-way ANOVA com Dunnett's post hoc test).

Relativamente aos níveis de expressão do NPRA, nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas observa-se que a 5 α -DHT 1nM provoca um aumento significativo da expressão deste gene, contudo nas restantes concentrações analisadas também existe um aumento da expressão, embora este não é estatisticamente significativo ($p > 0.05$).

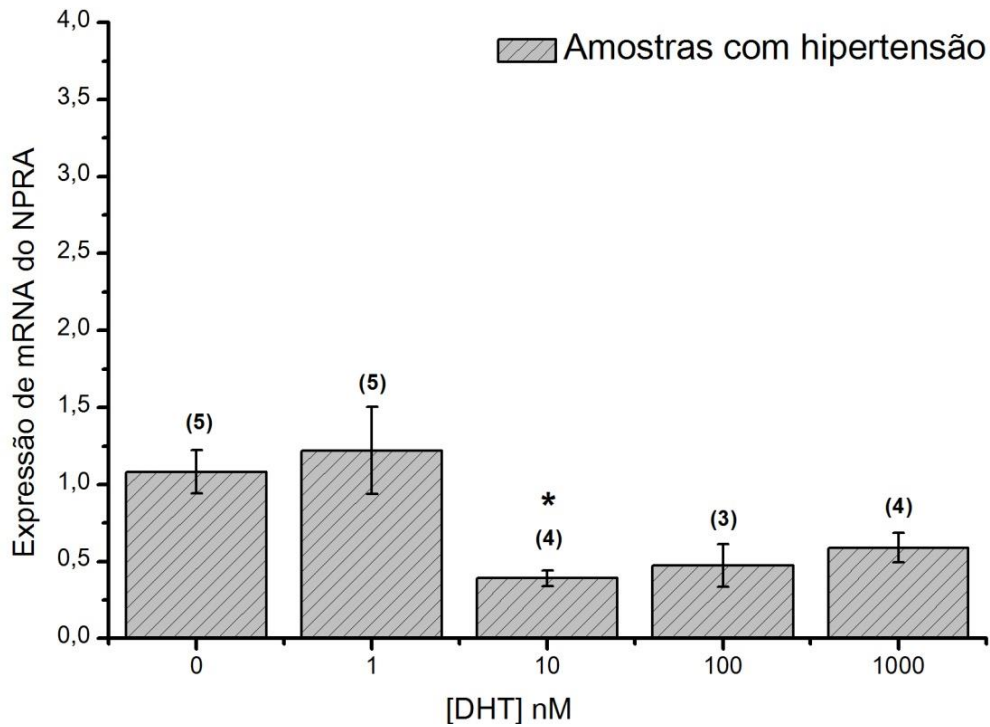


Figura 22 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA do NPRA nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas hipertensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P <0,05 Control versus pré-incubação com DHT (one-way ANOVA com Dunnett's post hoc test).

Ao contrário do gráfico anterior (fig.22), nas HUASMC de cordões de mães com hipertensão existe uma diminuição da expressão do NPRA, sendo significativa quando a concentração de DHT usada foi de 10 nM. No entanto nas restantes concentrações analisadas há também uma diminuição da expressão deste gene, mas esta não é estatisticamente significativa.

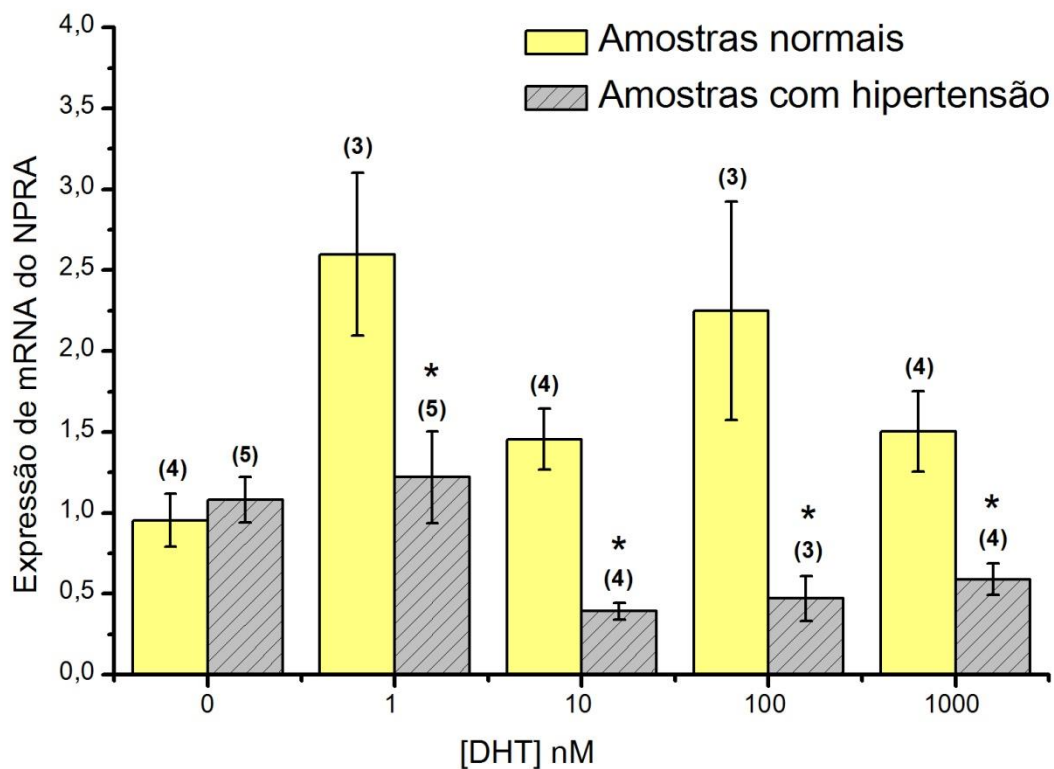


Figura 23 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA do NPRA nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas *versus* cordões provenientes de grávidas hipertensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P < 0,05 Amostras provenientes de grávidas normotensas *versus* amostras provenientes grávidas hipertensas com DHT (student's t-test)

Em relação às diferenças entre os dois tipos de amostras, HUASMC provenientes de cordões normais *versus* cordões com hipertensão, podemos observar que o NPRA é mais expresso em amostras normais, sendo que nas HUASMC provenientes de cordões com hipertensão há uma diminuição generalizada da expressão deste gene.

4.3. Análise da expressão do mRNA da PKG

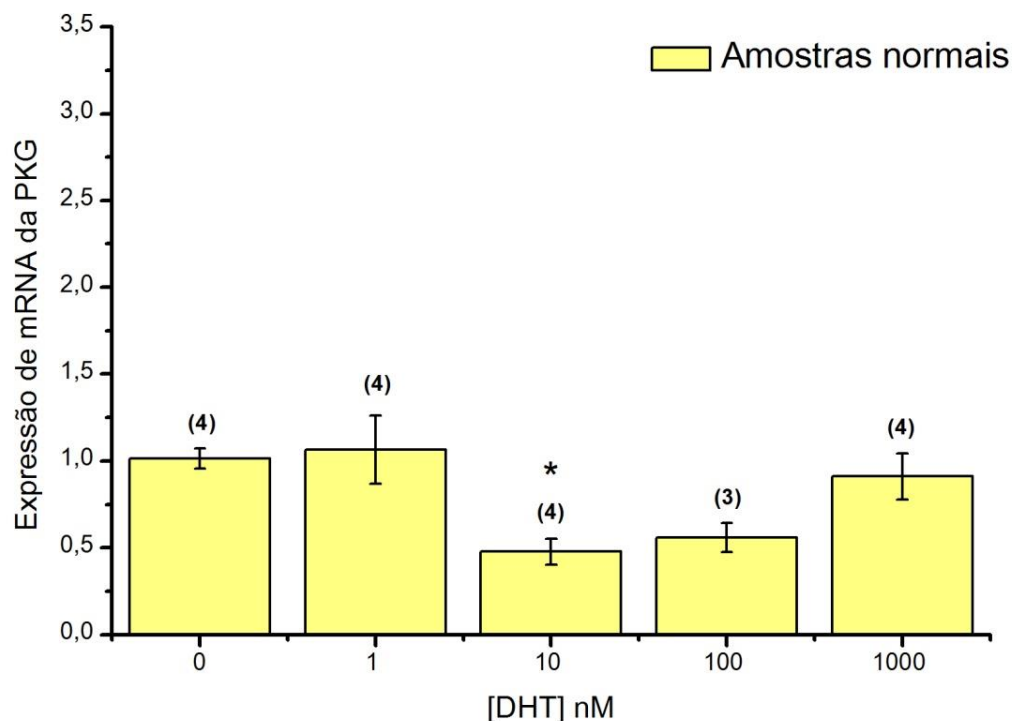


Figura 24 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA da PKG nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P <0,05 Control versus pré-incubação com DHT (one-way ANOVA com Dunnett's post hoc test).

Em relação á expressão da PKG, podemos observar que existe um decréscimo significativo da expressão deste gene após pré-incubação com 10 nM de DHT, sendo que as outras concentrações de DHT utilizadas não provocaram um efeito significativo na expressão de PKG em relação ao controlo em ausência de DHT.

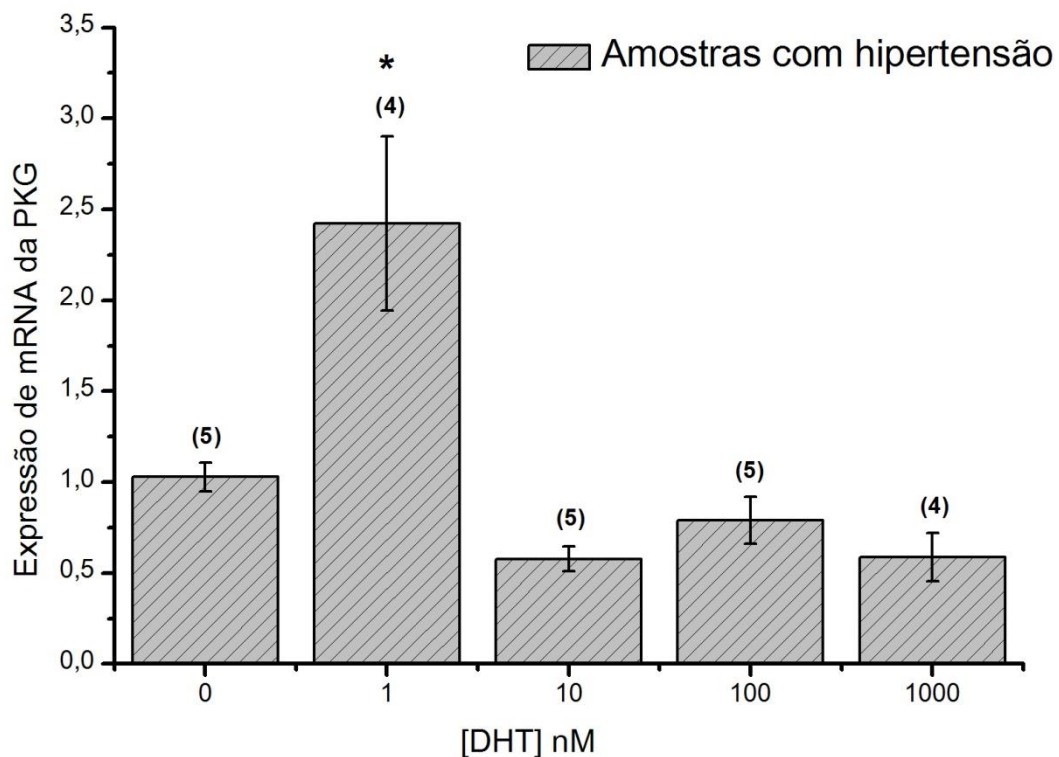


Figura 25 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA da PKG nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas hipertensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P < 0,05 Control versus pré-incubação com DHT (one-way ANOVA com Dunnett's post hoc test).

Relativamente à expressão do mRNA da PKG em amostras provenientes de mães hipertensas, observa-se um efeito contrário ao observado na figura anterior (fig 25), ocorrendo um aumento significativo da expressão a 1nM de DHT. Nas restantes concentrações de DHT analisadas parece não existir qualquer diferença em relação ao controlo.

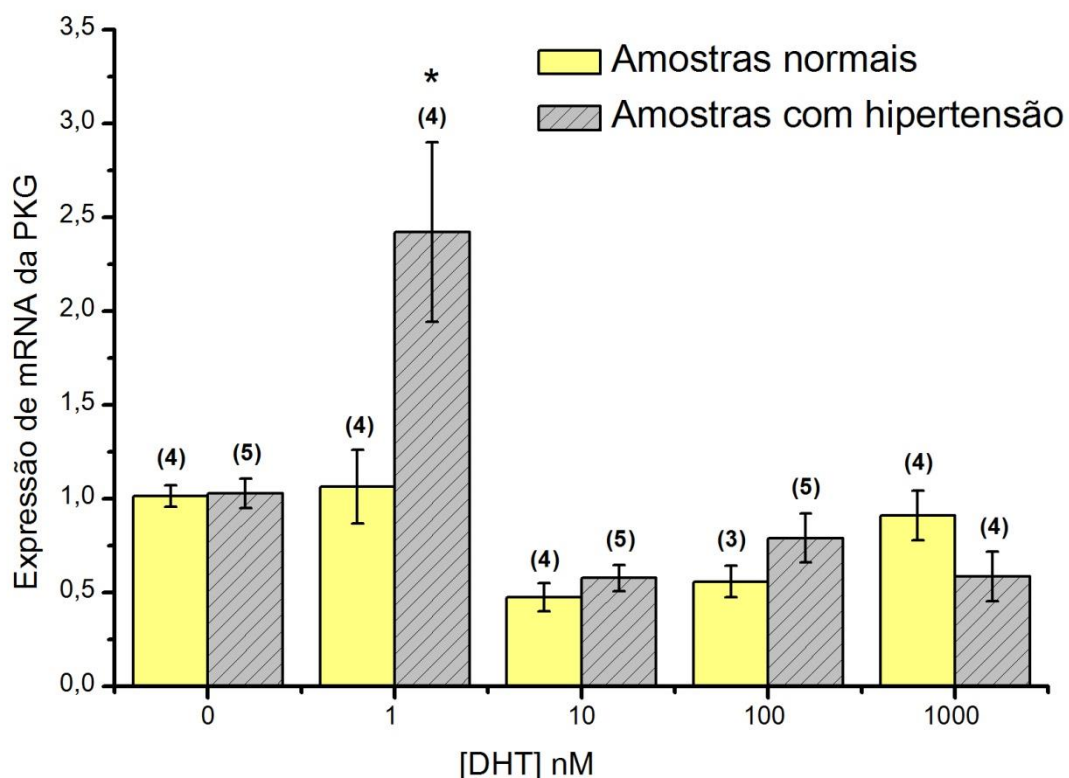


Figura 26 - Efeito da 5 α -DHT na expressão do mRNA da PKG nas HUASMC de cordões procedentes de grávidas normotensas *versus* cordões provenientes de grávidas hipertensas determinado por PCR em tempo real. As barras representam as médias da expressão, e as linhas o erro padrão. Para a normalização dos níveis de expressão de mRNA usou-se a β -actina como gene de referência interno. * P < 0,05 Amostras provenientes de grávidas normotensas *versus* amostras provenientes grávidas hipertensas com DHT (student's t-test)

Quanto às diferenças entre os dois tipos de amostras, é possível observar que após pre-incubação com DHT, a PKG é mais expressa em amostras provenientes de mães hipertensas embora o único efeito significativo foi observado quando se utilizou uma concentração de 1 nM de DHT.

Capítulo V - Discussão

O cordão umbilical é uma amostra que frequentemente é descartada e pode ser utilizada como fonte de SMC humanas. Além disso, a utilização destas amostras para a pesquisa não é perigoso nem para a mãe nem para a saúde do recém-nascido [21]. As células do músculo liso da artéria umbilical humana desempenham um papel importante no controlo do fluxo sanguíneo feto placentário e a utilização destas células é essencial para o estudo de vários processos de sinalização envolvidos neste controlo [21]. Para iniciar a realização deste trabalho, foi importante obter células musculares lisas que, neste caso, proveem tanto de cordões umbilicais de grávidas normotensas como de cordões umbilicais de grávidas hipertensas.

O primeiro passo deste trabalho foi o desenvolvimento de culturas de HUASMC puras, isto é, sem contaminações de células endoteliais e/ou de fibroblastos, através da remoção mecânica do endotélio e da camada adventícia. Após serem colocadas durante 24h em meio sem soro, foi necessário colocar o fármaco para posteriormente ser analisado o efeito do mesmo nas HUASMC em PCR em tempo real. Para tal foram colocadas diferentes concentrações, entre 1nM a 1000nM, consideradas como concentrações fisiológicas [108].

A razão pela qual foi escolhido o DHT em detrimento da Tes, foi porque a Tes pode ser convertida em estradiol pela aromatase, ao contrário do que acontece com o DHT que não sofre esta conversão. Se tivéssemos usado a Tes, uma vez que a aromatase está presente no músculo liso vascular, não poderíamos distinguir se o efeito era devido à Tes ou ao estradiol [144]. Assim, o uso do DHT foi essencial, pois permitiu obter efeitos exclusivos dos androgénios nas células, dado que este não é convertido em estradiol. Os efeitos genómicos da DHT envolvem a sua ligação ao recetor de androgénios, que vai levar a formação de um complexo que está envolvido na regulação da transcrição de genes e consequente produção de proteínas [101].

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, mostraram que o mecanismo vasodilatador da testosterona, efeito rápido e não genómico, passa pelo aumento do cGMP, que induz a ativação da PKG e que ativa os canais de potássio [53]. Com o intuito de ver se a indução a longo prazo com a testosterona altera a expressão de alguns genes Saldanha et al. (2012) observaram em conjunto e separadamente, os efeitos a longo e a curto prazo dos androgénios. Os resultados indicaram que a longo prazo os androgénios modificam a expressão das proteínas envolvidas na regulação da contratilidade vascular como os canais L-VOCC e de os canais de potássio. A incubação com DHT durante 24h (efeito a longo-prazo) diminuiu a expressão da subunidade α_{1c} dos L-VOCC e aumentou a expressão da subunidade β_1 dos canais BK_{Ca} nas HUA. Os efeitos a longo prazo modificaram a rápida relaxação induzida pela testosterona na presença de nidepdipina, um inibidor dos L-VOCC, uma vez que há um equilíbrio entre os efeitos a longo prazo e os efeitos a curto prazo. Do mesmo modo, os efeitos

a longo prazo não modificaram o grau de vasodilatação induzido pela aplicação da Tes. Neste sentido os efeitos vasodilatadores rápidos da Tes que é dependente da atividade dos canais BKca e K_v nas artérias de controlo, tornou-se dependente somente dos canais K_v em artérias tratadas com DHT. Deste modo, concluíram que os genes do mecanismo a longo prazo alteravam os genes do mecanismo a curto prazo da testosterona [100]. Do mesmo modo, fomos observar se os androgénios provocavam a longo prazo diferenças a nível da expressão da sGC, NPRA e PKG em HUASMC de grávidas normotensas e grávidas com HT.

5.1. Expressão da sGC

Inicialmente foi analisado o nível de expressão da sGC em HUASMC de cordões provenientes de grávidas sem patologia. A incubação com DHT diminuiu a expressão da sGC (a 10nM e 100 nM), em comparação com as células não tratadas. Indicando assim que os androgénios diminuem a expressão da sGC em HUASMC normais. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente por Liu et al. (2013), que observaram em tecidos benignos da próstata de ratos, que a expressão do sGC foi significativamente inibida quando tratada com testosterona (3mg/Kg/dia) [145]. No entanto dados obtidos em células cancerígenas provenientes da próstata de ratinhos contrariam esta hipótese. Cai et al. (2006) mostraram que nessas células os androgénios estimulam a expressão da sGC [147]. Assim, os resultados obtidos por este autor são opostos aos descritos no presente trabalho em células musculares lisas de HUA.

Quanto á expressão da sGC em HUASMC de cordões provenientes de grávidas com HT, observamos que houve uma diminuição significativa independente da concentração de DHT usada. No entanto, Oka et al. (2007) ao tratarem com DHEA as artérias de ratinhos com hipertensão pulmonar, observaram que ocorria uma sobre-regulação da atividade da sGC [148], sendo estes dados contrários aos obtidos no presente trabalho. Esta discrepância talvez seja devido à espécie em análise, ratinhos num caso e humanos no outro.

Quando comparamos os efeitos dos androgénios a longo prazo entre os dois tipos de amostras em análise, observamos que não há diferenças significativas em ausência de DHT (0 nM de DHT). Diversos autores analisaram a expressão da sGC na HT. Dumitrasco et al. (2006) observaram que em ratinhos com hipertensão pulmonar há um aumento da expressão da sGC, comparando com ratinhos normotensos, podendo ser este um alvo terapêutico para a cura desta doença [149]. O mesmo aconteceu com Schermuly et al. (2008) em que nas SMC de ratinhos com hipertensão pulmonar, observaram igualmente uma sobre-regulação da sGC [150]. Pelo contrário, Ruetten et al. (1999) concluiu que os níveis de mRNA da sGC e a expressão da proteína na aorta de ratinhos com hipertensão sofrem uma grande redução em comparação com os ratinhos sem patologia [76]. Neste sentido os dados obtidos neste trabalho estão discordantes com os apresentados por estes autores pois em HUASMC não foram observadas diferenças entre o controlo de grávidas normotensas versus grávidas hipertensas.

No entanto quando as HUASMC dos dois tipos de amostra são pré-encubadas com DHT, é observado uma expressão menor da sGC em amostras com HT.

Em suma, os efeitos a longo prazo dos androgénios alteram a expressão da sGC. Nas SMC provenientes de mães normotensas há uma pequena diminuição da expressão da sGC quando tratada com DHT, em comparação com o controlo. No entanto nas amostras com HT, o DHT provoca uma diminuição da expressão maior que nas HUASMC normais. Podemos concluir que o DHT em células com HT diminui significativamente a expressão da sGC.

5.2. Expressão do NPRA

Em relação à expressão do NPRA, os nossos resultados indicam que existe um aumento da expressão do NPRA em amostras normais tratadas com DHT, sendo apenas significativa na concentração de 1nM de DHT.

Relativamente às amostras com HT, o DHT provoca uma diminuição da expressão do NPRA .

Quando comparamos os efeitos dos androgénios a longo prazo entre os dois tipos de amostras em análise, observamos que em ausência de DHT não foram observadas diferenças significativas. Em presença de diferentes concentrações de DHT, observa-se um aumento da expressão do NPRA em amostras normais e uma diminuição da expressão nas amostras procedentes de grávidas com HT. Contudo diversos estudos usando amostras procedentes de animais hipertensos afirmaram que a pouca expressão do NPRA leva à hipertensão [151-153]. Oliver et al. (1998) para observar se as diferenças na expressão do NPRA afetavam a pressão sanguínea, criaram ratinhos com diferentes cópias do gene NPR1. Os resultados mostraram que quando há baixa expressão do gene NPR1, existe um aumento da pressão sanguínea [154]. Kapasi et al. (1996) examinaram a expressão do NPRA em ratinhos normotensos e em ratinhos hipertensos e concluíram que os normotensos tinham uma expressão maior do NPRA [155]. Neste sentido ambos os estudos mostraram que em amostras procedentes de hipertensos existe uma diminuição da expressão do NPRA.

Em suma, a expressão do NPRA é significativa a todas as concentrações de DHT e é maior em células normais, ao contrário do que acontece com células com HT, onde a sua expressão é bastante reduzida.

5.3. Expressão da PKG

O nosso grupo de investigação observou que na vasodilatação a curto prazo induzida pela testosterona participa a PKG. No entanto apenas foi observado o mecanismo a curto prazo e em HUASMC provenientes de grávidas normotensas [53].

Nas células normais pré-incubadas com DHT observou-se um decréscimo da expressão da PKG. Andric et al. (2010) através de células Leydig de ratos normais e ratos com

hipogonadotrofia observaram o efeito da testosterona nestas células. Através de PCR em tempo real observaram que a expressão de PRKG1 estava diminuída em ratos normais [156]. Do mesmo modo Muller et al. (2011) observaram que em ratinhos sem as células de leydig, que os níveis de expressão da PKG aumentam [157]. Concluindo assim que em amostras normais sem patologia a incubação com androgénios diminui a expressão da PKG estando de acordo com os nossos resultados.

Relativamente ao efeito do DHT na expressão da PKG em amostras procedentes de mães hipertensas, observamos que há um aumento da expressão em comparação com o controlo em ausência de DHT.

Quando comparamos os efeitos dos androgénios a longo prazo entre os dois tipos de amostras em análise, observamos que apenas na concentração de 1nM de DHT se observa, um aumento da expressão do PKG em amostras procedentes de mães com HT.

Em suma, o DHT diminui a expressão da PKG em amostras normais, e aumenta a sua expressão em amostras com HT. No entanto esse efeito apenas é significativo a 1 nM de DHT.

Capítulo VI - Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho foi possível demonstrar que o DHT modula a expressão da sGC, do NPRA e da PKG nas células do músculo liso vascular humano, o que contribuiu para um conhecimento mais profundo do efeito dos androgénios a nível fisiológico, assim como o seu possível envolvimento em doenças cardiovasculares, nomeadamente na hipertensão gestacional. Deste modo, foi demonstrado que:

- Os efeitos a longo prazo do DHT vão alterar a expressão de proteínas contráteis que participam no mecanismo rápido dos androgénios
- Os androgénios em amostras com HT provocam uma diminuição da expressão da sGC, da NPRA e um aumento da expressão da PKG.
- Nas amostras normais os androgénios provocam uma diminuição da expressão da sGC e da PKG, e um aumento na expressão do NPRA.

A concretização deste trabalho pode permitir o desenvolvimento de terapêuticas mais específicas no tratamento e prevenção da hipertensão gestacional. Contudo, é ainda necessário realizar um maior número de amostras para conseguir obter significância estatística em alguns dos dados obtidos.

Ainda existe um longo caminho a percorrer, uma vez que ainda falta determinar vários passos envolvidos no mecanismo destas patologias. Para experiências futuras seria importante fazer um estudo de outras proteínas contráteis envolvidas no mecanismo de ação dos androgénios e também analisar a concentração de testosterona no cordão, para averiguar se existe um aumento ou não dos androgénios.

Capítulo VII - Bibliografia

1. Moore, K.L. and T.V.N. Persaud, *Embriologia clínica*. 2008: Elsevier. p 61-65.
2. Di Naro, E., et al., *Umbilical cord morphology and pregnancy outcome*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001. 96(2): p. 150-157.
3. Cunningham, F.G., *Williams obstetrics*. Vol. 21. 2005: McGraw-Hill Professional New York.
4. Stefos, T., et al., *Umbilical cord length and parity—the Greek experience*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2003. 107(1): p. 41-44.
5. Alegria, A., et al., *Recém-nascidos com artéria umbilical única: justificação para avaliação ecográfica pós-natal de anomalias ocultas?* Conselho Editorial Director, 2011: p. 54.
6. Zhang, S.-x., *An atlas of histology*. 1999: Springer. p 351-353.
7. Mauro, A., et al., *Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS*. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2011. 49(2): p. 211-210.
8. Romanowicz, L. and Z. Galewska, *Extracellular Matrix Remodeling of the Umbilical Cord in Pre-eclampsia as a Risk Factor for Fetal Hypertension*. Journal of pregnancy, 2010. 2011.
9. Ferguson, V.L. and R.B. Dodson, *Bioengineering aspects of the umbilical cord*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2009. 144: p. S108-S113.
10. Santos-Silva, A.J., et al., *PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries*. European journal of pharmacology, 2008. 582(1): p. 102-109.
11. Roffino, S., et al., *Premature birth is associated with not fully differentiated contractile smooth muscle cells in human umbilical artery*. Placenta, 2012. 33(6): p. 511-517.
12. Marino, E.C., *Histología humana*. 2001.
13. Pina, J.E. and J.E. Pina, *Anatomia humana do coração e vasos*. 2007: Lidel.
14. Cairrão, E., et al., *Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2008. 376(5): p. 375-383.
15. Meyer, W., et al., *Structure and closure mechanism of the human umbilical artery*. European Journal of Pediatrics, 1978. 128(4): p. 247-259.
16. Woodrum, D.A. and C.M. Brophy, *The paradox of smooth muscle physiology*. Molecular and cellular endocrinology, 2001. 177(1): p. 135-143.
17. Owens, G.K., *Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells*. Physiological reviews, 1995. 75(3): p. 487-517.
18. Rzucidlo, E.M., K.A. Martin, and R.J. Powell, *Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation*. Journal of Vascular Surgery, 2007. 45(6): p. A25-A32.
19. Rensen, S., P. Doevendans, and G. Van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. Netherlands Heart Journal, 2007. 15(3): p. 100-108.

20. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. *Physiological reviews*, 2004. 84(3): p. 767-801.
21. Cairrao, E., et al., *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2009. 45(3-4): p. 175-184.
22. Li, S., et al., *Evidence From a Novel Human Cell Clone That Adult Vascular Smooth Muscle Cells Can Convert Reversibly Between Noncontractile and Contractile Phenotypes*. *Circulation Research*, 1999. 85(4): p. 338-348.
23. Murphy, R.A., *Signal transduction and regulation in smooth muscle: Problems and progress*, in *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 134*. 1999, Springer. p. 1-6.
24. Bolton, T., et al., *Smooth muscle cells and interstitial cells of blood vessels*. *Cell Calcium*, 2004. 35(6): p. 643-657.
25. Small, J. and M. Gimona, *The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell*. *Acta physiologica scandinavica*, 1998. 164(4): p. 341-348.
26. Sperelakis, N., et al., *Heart physiology and pathophysiology*. 2000: Access Online via Elsevier.
27. Hodgkinson, J.L., *Actin and the smooth muscle regulatory proteins: a structural perspective*. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 2000. 21(2): p. 115-130.
28. Lehman, W. and K.G. Morgan, *Structure and dynamics of the actin-based smooth muscle contractile and cytoskeletal apparatus*. *Journal of muscle research and cell motility*, 2012. 33(6): p. 461-469.
29. Gunst, S.J. and W. Zhang, *Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008. 295(3): p. C576-C587.
30. Sobue, K., et al., *Caldesmon: A common actin-linked regulatory protein in the smooth muscle and nonmuscle contractile system*. *Journal of cellular biochemistry*, 1988. 37(3): p. 317-325.
31. Winder, S. and M. Walsh, *Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(17): p. 10148-10155.
32. El-Mezgueldi, M., *Calponin*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1996. 28(11): p. 1185-1189.
33. Babu, G.J., D.M. Warshaw, and M. Periasamy, *Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology*. *Microscopy research and technique*, 2000. 50(6): p. 532-540.
34. Tuna, B.G., E.N. Bakker, and E. VanBavel, *Smooth muscle biomechanics and plasticity: relevance for vascular calibre and remodelling*. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2012. 110(1): p. 35-41.
35. Bootman, M.D., et al. *Calcium signalling—an overview*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2001. Elsevier.
36. Striessnig, J., et al., *L-type Ca²⁺ channels in Ca²⁺ channelopathies*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004. 322(4): p. 1341-1346.
37. Lacinova, L., *Voltage-dependent calcium channels*. *General physiology and biophysics*, 2005. 24.
38. Jackson, W.F., *Ion channels and vascular tone*. *Hypertension*, 2000. 35(1): p. 173-178.
39. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. *Pharmacological reviews*, 2005. 57(4): p. 411-425.

40. Tufan, H., et al., *Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim*. Life sciences, 2003. 72(12): p. 1321-1329.
41. Sonkusare, S., et al., *Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications*. Vascular pharmacology, 2006. 44(3): p. 131-142.
42. Salemme, S., et al., *L, P-/Q-and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2007. 20(1-4): p. 055-064.
43. Cribbs, L.L., *T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions*. Cell calcium, 2006. 40(2): p. 221-230.
44. Andreasen, D., et al., *Coexpression of voltage-dependent calcium channels Cav1. 2, 2.1 a, and 2.1 b in vascular myocytes*. Hypertension, 2006. 47(4): p. 735-741.
45. Striessnig, J., H.J. Bolz, and A. Koschak, *Channelopathies in Cav1. 1, Cav1. 3, and Cav1. 4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2010. 460(2): p. 361-374.
46. Satin, J., E.A. Schroder, and S.M. Crump, *L-type calcium channel auto-regulation of transcription*. Cell calcium, 2011. 49(5): p. 306-313.
47. Guibert, C., T. Ducret, and J.-P. Savineau, *Voltage-independent calcium influx in smooth muscle*. Progress in biophysics and molecular biology, 2008. 98(1): p. 10-23.
48. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone*. Journal of anesthesia, 2007. 21(2): p. 220-231.
49. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1995. 268(4): p. C799-C822.
50. Jackson, W.F., *Potassium channels and regulation of the microcirculation*. Microcirculation, 1998. 5(2-3): p. 85-90.
51. Ko, E.A., et al., *Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells*. Journal of Smooth Muscle Research, 2008. 44(2): p. 65-81.
52. Sobey, C.G., *Potassium channel function in vascular disease*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2001. 21(1): p. 28-38.
53. Cairrão, E., A.J. Santos-Silva, and I. Verde, *PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. European journal of pharmacology, 2010. 640(1): p. 94-101.
54. Hibino, H., et al., *Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles*. Physiological reviews, 2010. 90(1): p. 291-366.
55. Nichols, C. and A. Lopatin, *Inward rectifier potassium channels*. Annual Review of Physiology, 1997. 59(1): p. 171-191.
56. Noma, A., *ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle*. 1983.
57. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Advances in physiology education, 2003. 27(4): p. 201-206.
58. Dietrich, A., et al., *Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells*. Pharmacology & therapeutics, 2006. 112(3): p. 744-760.
59. Hughes, A., *Calcium channels in vascular smooth muscle cells*. Journal of vascular research, 1995. 32(6): p. 353-370.
60. Jackson, W.F., *Potassium channels in the peripheral microcirculation*. Microcirculation, 2005. 12(1): p. 113-127.

61. Cole, W.C. and D.G. Welsh, *Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure*. Archives of biochemistry and biophysics, 2011. 510(2): p. 160-173.
62. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. 1994.
63. Uehata, M., et al., *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. Nature, 1997. 389(6654): p. 990-994.
64. Nobes, C. and A. Hall, *Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases*. Current opinion in genetics & development, 1994. 4(1): p. 77-81.
65. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. 69(2): p. 247-266.
66. Andreopoulos, S. and A. Papapetropoulos, *Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation*. General Pharmacology: The Vascular System, 2000. 34(3): p. 147-157.
67. Lucas, K.A., et al., *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. Pharmacological reviews, 2000. 52(3): p. 375-414.
68. Kimura, H. and F. Murad, *Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart*. Journal of Biological Chemistry, 1974. 249(21): p. 6910-6916.
69. Chrisman, T., et al., *Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung*. Journal of Biological Chemistry, 1975. 250(2): p. 374-381.
70. Potter, L.R., *Guanylyl cyclase structure, function and regulation*. Cellular signalling, 2011. 23(12): p. 1921-1926.
71. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase*. Brain research bulletin, 2004. 62(6): p. 505-515.
72. Koesling, D., *Modulators of soluble guanylyl cyclase*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 1998. 358(1): p. 123-126.
73. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, *Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1999. 1411(2): p. 334-350.
74. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Structure and regulation of soluble guanylate cyclase*. Annual review of biochemistry, 2012. 81: p. 533-559.
75. Mergia, E., et al., *Major occurrence of the new $\alpha 2$ B1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain*. Cellular signalling, 2003. 15(2): p. 189-195.
76. Ruetten, H., et al., *Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats*. Circulation research, 1999. 85(6): p. 534-541.
77. Teunissen, C., et al., *Presence of soluble and particulate guanylyl cyclase in the same hippocampal astrocytes*. Brain research, 2001. 891(1): p. 206-212.
78. D'Souza, S.P., M. Davis, and G.F. Baxter, *Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart*. Pharmacology & therapeutics, 2004. 101(2): p. 113-129.
79. Suzuki, T., T. Yamazaki, and Y. Yazaki, *The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system*. Cardiovascular research, 2001. 51(3): p. 489-494.
80. Potter, L.R., *Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases*. Pharmacology & therapeutics, 2011. 130(1): p. 71-82.
81. Garg, R. and K.N. Pandey, *Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression*. Peptides, 2005. 26(6): p. 1009-1023.
82. Potter, L.R., *Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation*. FEBS Journal, 2011. 278(11): p. 1808-1817.

83. Schulz, S., *C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor*. Peptides, 2005. 26(6): p. 1024-1034.
84. Potter, L.R., S. Abbey-Hosch, and D.M. Dickey, *Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions*. Endocrine reviews, 2006. 27(1): p. 47-72.
85. He, X.-l., A. Dukkupati, and K.C. Garcia, *Structural determinants of natriuretic peptide receptor specificity and degeneracy*. Journal of molecular biology, 2006. 361(4): p. 698-714.
86. Sauzeau, V., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(28): p. 21722-21729.
87. Francis, S.H., J.L. Busch, and J.D. Corbin, *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacological Reviews, 2010. 62(3): p. 525-563.
88. Xia, C., et al., *Phosphorylation and Regulation of G-protein-activated Phospholipase C-β3 by cGMP-dependent Protein Kinases*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(23): p. 19770-19777.
89. Antl, M., et al., *IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation*. Blood, 2007. 109(2): p. 552-559.
90. Hall, S.K. and D.L. Armstrong, *Conditional and unconditional inhibition of calcium-activated potassium channels by reversible protein phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(6): p. 3749-3754.
91. Koller, A., et al., *Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex*. Biochemical and biophysical research communications, 2003. 300(1): p. 155-160.
92. Ikeda, Y., et al., *Effects of androgens on cardiovascular remodeling*. Journal of Endocrinology, 2012. 214(1): p. 1-10.
93. Gebara, O.C., et al., *Efeitos cardiovasculares da testosterona*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2002. 79(6): p. 644-649.
94. de Sá, E.Q.C., et al., *Testosterona sérica e doença cardiovascular em homens*. Arq Bras Endocrinol Metab, 2009. 53: p. 8.
95. Swerdloff, R.S. and C. Wang, *Androgens and the ageing male*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. 18(3): p. 349-362.
96. Basaria, S. and A.S. Dobs, *Hypogonadism and androgen replacement therapy in elderly men*. The American journal of medicine, 2001. 110(7): p. 563-572.
97. Pasqualini, J., *Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2005. 97(5): p. 401-415.
98. Cairrão, E., *Estudo do mecanismo vasodilatador da testosterona a nível arterial*. 2008, Covilhã: Universidade da Beira Interior.
99. Tartavouille, T.M. and D.J. Porche, *Low Testosterone*. The Journal for Nurse Practitioners, 2012. 8(10): p. 778-786.
100. Saldanha, P.A., et al., *Long-and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2013. 40(3): p. 181-189.
101. Jones, R.D., et al., *The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action?* British journal of pharmacology, 2003. 138(5): p. 733-744.
102. Foradori, C., M. Weiser, and R. Handa, *Non-genomic actions of androgens*. Frontiers in neuroendocrinology, 2008. 29(2): p. 169-181.

103. Liu, P.Y., A.K. Death, and D.J. Handelsman, *Androgens and cardiovascular disease*. Endocrine reviews, 2003. 24(3): p. 313-340.
104. Jones, R.D., et al., *Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action*. Clinical Science, 2004. 107(2): p. 149-158.
105. Perusquía, M., *Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect*. Experimental and clinical endocrinology & diabetes, 2003. 111(02): p. 55-59.
106. Montaña, L.M., et al., *Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5 β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade*. Endocrinology, 2008. 149(5): p. 2517-2526.
107. Perusquía, M., et al., *The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery*. Life sciences, 2007. 81(12): p. 993-1002.
108. Perusquía, M. and J.N. Stallone, *Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2010. 298(5): p. H1301-H1307.
109. Yue, P., et al., *Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta*. Circulation, 1995. 91(4): p. 1154-1160.
110. Traish, A.M., et al., *The dark side of testosterone deficiency: III. Cardiovascular disease*. Journal of andrology, 2009. 30(5): p. 477-494.
111. Deenadayalu, V.P., et al., *Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2001. 281(4): p. H1720-H1727.
112. Herring, M.J., et al., *Testosterone and the Cardiovascular System: A Comprehensive Review of the Basic Science Literature*. Journal of the American Heart Association, 2013. 2(4).
113. Tep-areenan, P., D.A. Kendall, and M.D. Randall, *Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels*. British journal of pharmacology, 2002. 135(3): p. 735-740.
114. Ding, A.Q. and J.N. Stallone, *Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation*. Journal of Applied Physiology, 2001. 91(6): p. 2742-2750.
115. Seyrek, M., et al., *Testosterone relaxes human internal spermatic vein through potassium channel opening action*. Urology, 2011. 78(1): p. 233. e1-233. e5.
116. Amberg, G.C., et al., *Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca²⁺ activated K⁺ channels in vascular smooth muscle during hypertension*. Journal of Clinical Investigation, 2003. 112(5): p. 717-724.
117. Kelly, D.M. and T.H. Jones, *Testosterone: a vascular hormone in health and disease*. Journal of Endocrinology, 2013. 217(3): p. R47-R71.
118. Scragg, J.L., et al., *Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca²⁺ channels*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. 318(2): p. 503-506.
119. Zhang, Q., et al., *Effects of natriuretic peptides on ventricular myocyte contraction and role of cyclic GMP signaling*. European journal of pharmacology, 2005. 510(3): p. 209-215.
120. Saldanha, P., *Efeitos genômicos da di-hidrotestosterona nas células vasculares do músculo liso humano*. 2012, Covilhã: Universidade da Beira Interior.
121. Yildiz, O., et al., *Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro*. Journal of cardiovascular pharmacology, 2005. 45(6): p. 580-585.

122. Walters, K., C. Allan, and D. Handelsman, *Androgen actions and the ovary*. *Biology of Reproduction*, 2008. 78(3): p. 380-389.
123. Alvarez, E., et al., *Testosterone and cholesterol vasodilation of rat aorta involves L-type calcium channel inhibition*. *Advances in pharmacological sciences*, 2010. 2010.
124. Hulley, S., et al., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women*. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 1998. 280(7): p. 605-613.
125. Kaushik, M., S.P. Sontineni, and C. Hunter, *Cardiovascular disease and androgens: a review*. *International journal of cardiology*, 2010. 142(1): p. 8-14.
126. Dubey, R.K., et al., *Sex hormones and hypertension*. *Cardiovascular research*, 2002. 53(3): p. 688-708.
127. Giorgi, A., R.P. Weatherby, and P.W. Murphy, *Muscular strength, body composition and health responses to the use of testosterone enanthate: a double blind study*. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 1999. 2(4): p. 341-355.
128. Giltay, E., et al., *Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: a study in transsexual males and females*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998. 83(2): p. 550-553.
129. Caplea, A., et al., *Sodium-induced rise in blood pressure is suppressed by androgen receptor blockade*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2001. 280(4): p. H1793-H1801.
130. Cruz, M.O., W. Gao, and J.U. Hibbard, *Obstetrical and perinatal outcomes among women with gestational hypertension, mild preeclampsia, and mild chronic hypertension*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2011. 205(3): p. 260.e1-260.e9.
131. Solomon, C.G. and E.W. Seely, *Hypertension in pregnancy*. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 2006. 35(1): p. 157-171.
132. Barra, S., et al., *Hypertension in pregnancy: The current state of the art*. *Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)*, 2012. 31(6): p. 425-432.
133. Beaufils, M., *Hypertensions de la grossesse*. *Néphrologie & Thérapeutique*, 2010. 6(3): p. 200-214.
134. VanWijk, M.J., et al., *Resistance artery smooth muscle function in pregnancy and preeclampsia*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2002. 186(1): p. 148-154.
135. Garovic, V.D. and S.R. Hayman, *Hypertension in pregnancy: an emerging risk factor for cardiovascular disease*. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2007. 3(11): p. 613-622.
136. Witlin, D., Andrea G and M. Sibai, Baha M, *Hypertension in pregnancy: current concepts of preeclampsia*. *Annual review of medicine*, 1997. 48(1): p. 115-127.
137. Berkane, N. *Définitions et conséquences des hypertensions artérielles de la grossesse*. in *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*. 2010. Elsevier.
138. Beaufils, M., *Hypertensions gravidiques*. *La Revue de médecine interne*, 2002. 23(11): p. 927-938.
139. Hertig, A. and P. Liere, *New markers in preeclampsia*. *Clinica Chimica Acta*, 2010. 411(21): p. 1591-1595.
140. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. *The Lancet*, 2005. 365(9461): p. 785-799.
141. Sibai, B.M., *Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2011. 205(3): p. 191-198.

142. Mohaupt, M., *Molecular aspects of preeclampsia*. *Molecular aspects of medicine*, 2007. 28(2): p. 169-191.
143. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic acids research*, 2001. 29(9): p. e45-e45.
144. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences*. *Science*, 2005. 308(5728): p. 1583-1587.
145. Liu, C.M., et al., *Cyclic guanosine monophosphate-enhancing reduces androgenic extracellular regulated protein kinases-phosphorylation/Rho kinase II-activation in benign prostate hyperplasia*. *International Journal of Urology*, 2013.
146. Krumenacker, J.S., S.M. Hyder, and F. Murad, *Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(2): p. 717-722.
147. Cai, C., et al., *Androgen regulation of soluble guanylyl cyclase α 1 mediates prostate cancer cell proliferation*. *Oncogene*, 2006. 26(11): p. 1606-1615.
148. Oka, M., et al., *Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension*. *Cardiovascular research*, 2007. 74(3): p. 377-387.
149. Dumitrascu, R., et al., *Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling*. *Circulation*, 2006. 113(2): p. 286-295.
150. Schermuly, R.T., et al., *Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension*. *European Respiratory Journal*, 2008. 32(4): p. 881-891.
151. Nakayama, T., et al., *Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese*. *Circulation research*, 2000. 86(8): p. 841-845.
152. Pandey, K.N., et al., *Hypertension associated with decreased testosterone levels in natriuretic peptide receptor-A gene-knockout and gene-duplicated mutant mouse models*. *Endocrinology*, 1999. 140(11): p. 5112-5119.
153. Oliver, P.M., et al., *Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94(26): p. 14730-14735.
154. Oliver, P.M., et al., *Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. 95(5): p. 2547-2551.
155. Kapasi, A.A., et al., *Differential Expression and Autoradiographic Localization of Atrial Natriuretic Peptide Receptor in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rat Testes: Diminution of Testosterone in Hypertension*. *Hypertension*, 1996. 28(5): p. 847-853.
156. Andric, S.A., et al., *Testosterone-Induced Modulation of Nitric Oxide-cGMP Signaling Pathway and Androgenesis in the Rat Leydig Cells*. *Biology of Reproduction*, 2010. 83(3): p. 434-442.
157. Müller, D., et al., *Cyclic GMP signaling in rat urinary bladder, prostate, and epididymis: tissue-specific changes with aging and in response to Leydig cell depletion*. *Reproduction*, 2011. 142(2): p. 333-343.