



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeitos do Tributilestanho na contratilidade da artéria umbilical humana por ativação de recetores de serotonina e histamina

Lara Madeline Leite Lima

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Co-orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues

Covilhã, Dezembro de 2017

A minha família

Agradecimentos

A finalização desta dissertação trouxe-me uma enorme vontade de registrar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram neste último ano, para que eu pudesse crescer e alcançar a minha maturidade profissional.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a professora Doutora **Maria Elisa Cairrão Rodrigues**, pelo total apoio e disponibilidade demonstrado durante este ano letivo.

Ao professor Doutor **José Ignacio Verde Lusquiños**, agradeço pela disponibilidade, paciência e todos ensinamentos transmitidos.

A **Joana** e a **Melissa**, agradeço a amizade e disponibilidade em transmitir ensinamentos laboratoriais que me permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço a minha amiga e colega **Margarida** pelo companheirismo e todo apoio durante este ano em que estivemos a desenvolver as nossas dissertações. Como amiga também agradeço pelos momentos únicos, especiais que tivemos ao longo deste ano, que nos proporcionou muitas vezes risadas em momentos mais críticos.

A minha família agradeço tudo o que sou hoje, agradeço a força de vontade da minha avó **Mercedes**, da minha mãe **Cláudia** e do meu pai **César** por proporcionarem todo apoio não só monetário, mas também o apoio emocional, e por terem persistido juntos comigo para que juntos pudéssemos concluir mais esta etapa. Também agradeço as minhas tias queridas **Lena Almeida**, **Maria Filomena Maurício**, e **Isabel Furtado** pelo apoio durante toda a minha formação académica.

Um agradecimento especial a minha tia **Gilda**, por ser mais do que uma tia em todos os momentos.

A minha professora e amiga **Alexandrina Freitas**, agradeço todo o apoio, confiança e todos os ensinamentos transmitidos durante o ensino secundário.

Agradeço o apoio dos meus amigos que estiveram presentes durante todo o meu percurso académico na UBI, a **Melanie**, ao **Rodrigo**, a **Elna**, a **Cecília**, a **Mariana** e ao **Tiago** que também fazem parte da minha família.

Por último, não menos importante agradeço ao **Diogo** pelo seu amor, apoio e por estar sempre comigo em todos os momentos.

Resumo

Atualmente, o homem está exposto à uma variedade de substâncias químicas com capacidade de interferir com o sistema endócrino. Estas substâncias são denominadas de disruptores endócrinos (EDCs) e possuem a capacidade de prejudicar a homeostasia hormonal. De entre estes químicos com propriedades de EDC está o tributilestano (TBT) que devido a sua ampla utilização em tintas antivegetativas, biocidas e catalisadores de plástico, está associado a bioacumulação em cadeias alimentares de várias espécies, incluindo o ser humano. Consequentemente, muitos estudos associam-no a problemas reprodutivos e sexuais (por exemplo, imposexo), à obesidade, ao cancro e recentemente foi considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares. Os estudos a nível vascular sugerem que o TBT pode afetar os mecanismos intracelulares relacionados ao cálcio (Ca^{2+}), interferindo com a função cardíaca e diminuindo a reatividade vascular. Outro fato recentemente descoberto indica que o TBT pode modificar a capacidade contrátil do músculo liso da artéria umbilical humana (AUH) pela ativação dos recetores de serotonina (5-HT) e histamina.

Neste sentido, o objetivo deste estudo consiste em investigar os efeitos do TBT a longo prazo na atividade contrátil do músculo liso arterial das AUH, através da ativação dos recetores de 5-HT como 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2A}, e 5-HT₇, assim como os recetores de histamina como o H₁ e H₂.

O estudo da atividade contrátil do músculo liso da AUH foi realizado utilizando a técnica de banho de órgãos. Os anéis de AUH sem endotélio foram extraídos e incubados por um período de 24h com diferentes concentrações de TBT (0,1nM, 1nM, 0,1μM e 100μM) e para obtenção de um grupo controlo. Posteriormente, as artérias foram submetidas a diferentes agentes contráteis como a 5-HT (1μM), a histamina (10μM), o L69 (1μM, agonista do recetor 5-HT_{1B/1D}), a AMHT (1μM, agonista do recetor 5-HT_{2A}), e o BHI (1mM, agonista do recetor H₁). Também foi analisada a relaxação da AUH através de dois agentes vasorelaxantes, o AS19 (1μM, agonista do recetor 5-HT₇) e o DMP (100μM, agonista do recetor H₂).

Para os recetores de 5-HT, a análise do efeito do TBT a longo prazo demonstrou que as concentrações mais altas (0,1μM e 100μM) provocam uma perda significativa da capacidade contrátil dos anéis da AUH induzida pela 5-HT e AMHT, afetando a atividade contrátil do recetor 5-HT_{2A}. No geral, os resultados das contrações provocadas pelo L69 não apresentaram diferenças significativas entre as incubações com TBT e a condição controlo. Segundo os resultados, aparentemente a concentração de 1nM de TBT parece ter menos efeito na contratilidade das AUHs provocada pela a ativação dos recetores de 5-HT, quando comparadas com o controlo, e as outras incubações. Relativamente a concentração mais baixa de TBT (0,1nM), os resultados indicam que existe redução da capacidade contrátil provocada pela 5-HT, mas esta redução não se observou com os outros agentes contráteis. Neste sentido, a análise do efeito vasorelaxante do DMP nas AUHs demonstrou que apenas para esta concentração, o relaxamento é superior a condição controlo. Estes dados permitem

então perceber que a resposta após ativação do recetor 5-HT₇ aparenta estar afetada pela incubação de TBT 0,1 nM.

Em relação aos recetores de histamina pode-se também observar que há redução da atividade contrátil das AUHs induzida pelo BHI, para as concentrações mais altas de TBT (0,1µM e 100µM). Os dados demonstram que estas duas incubações também diminuem a resposta da função contrátil do músculo liso provocada pela ativação do recetor H₁. Para as artérias incubadas com TBT 1nM, foi possível observar que a contração induzida pela histamina foi significativamente maior quando comparada com a condição controlo. Estes resultados demonstram que para esta concentração, a capacidade contrátil provocada pela histamina é semelhante ao BHI, não havendo diferenças significativas entre os dois agentes contráteis. A análise do efeito vasorelaxante do DMP demonstrou que para esta incubação com 1nM de TBT, a percentagem de relaxação atingida pelos anéis da AUH foi significativamente menor quando comparada com a situação controlo e as outras incubações. Sendo assim, os dados indicam que o recetor H₂ pode ser influenciado a esta concentração.

Palavras-chave

Tributilestanho; Recetores de serotonina; Recetores de histamina; Músculo liso; Artérias umbilicais humanas; Técnica de banho de órgãos

Abstract

Nowadays, the man is exposed to a variety of chemicals that can be able to interfere with the endocrine system. These chemicals are called endocrine disrupters (EDCs) and thus, they can impair hormonal homeostasis. Among these chemicals with endocrine disrupting proprieties there is the tributyltin (TBT). TBT is widely use as antifouling paints, biocides, plastic catalyzers and it is associated with bioaccumulation in food chains of several species, including human being. Consequently, many studies associate it with reproductive and sexual problems (eg. imposex), obesity, cancer and recently associated as a risk factor for cardiovascular diseases. Vascular studies suggest that they may affect calcium-related intracellular mechanisms, interfere with cardiac function, and decrease vascular reactivity. Another recently discovered fact, show that TBT may play a modifying role in the contractile capacity of human umbilical artery (HUA) smooth muscle by the activation of the serotonin (5-HT) and histamine receptors.

The purpose of this study was to investigate the long-term effects of TBT on the contractile activity of HUA smooth muscle by the activation of 5-HT receptors as 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇, and histamine receptors as H₁ and H₂.

The study of contractile activity of HUA was performed using the organ bath technique. Subsequently, HUA rings without endothelium were extracted and incubated for 24h at control condition and for at different TBT concentrations (0,1 nM, 1 nM, 0,1 μM and 100 μM). After that, the arteries were subjected to different contractile agents such as 5-HT (1μM), histamine (10μM), and their agonists L69 (1μM, 5-HT_{1B/1D} receptor agonist), AMHT (1μM, 5-HT_{2A} receptor agonist), and BHI (1mM, H₁ receptor agonist). They were also submitted for two vasorelaxant agents as AS19 (1μM, 5-HT₇ receptor agonist) and DMP (100 μM, H₂ receptor agonist).

For the 5-HT receptors, the long-term effect of TBT demonstrated that higher concentrations (0,1μM and 100μM) appear to induce significant loss of HUA-ring responsiveness to 5-HT and AMHT contractile agents, affecting the contractile activity of 5-HT_{2A} receptor. Overall, the results of L69 contractions did not show significant differences between the TBT incubations and the control condition. According to the results, it appears that the concentration of 1nM TBT exerts less effect on the contractility of the HUA caused by the activation of the 5-HT receptors, when compared to the control and other incubations. Regarding the lowest incubation of the study (0,1nM), the results indicate that there is a reduction of contractile activity for 5-HT, except for the other contractile agents. Thus, the percentage relaxation analysis with DMP showed that for this concentration, the relaxation is greater than the control condition. These data showed that the 5-HT₇ receptor appears to be affected in this incubation.

Concerning to the histamine receptors, it can also be observed that there is a reduction of the contractile activity induced by the BHI for the two higher concentrations. These two incubations also show decrease the responsiveness of the H₁ receptor. For the arteries incubated with 1nM TBT, it showed that the histamine-induced contraction was significantly higher when compared to the control condition. These results demonstrate that for this concentration the contractile capacity of the histamine is apparently similar to BHI, with no significant differences between both. Therefore, the percent of relaxation with DMP demonstrated that for this incubation the relaxation was significantly lower when compared to the control situation and the other incubations. Thus, this may indicate that the H₂ receptor may be influenced at this concentration (1nM).

Keywords

Tributyltin; Serotonin receptors; Histamine receptors; Smooth muscle; Human umbilical artery; Organ bath technique

Índice

Capítulo I - Introdução	1
1.1. Conceitos gerais sobre os disruptores endócrinos	1
1.1.1. Contextualização	1
1.1.2. Definição de Disruptor endócrino.....	2
1.1.3. Origem e características dos EDCs.....	2
1.1.4. Vias de exposição aos EDCs	4
1.1.5. Efeitos associados a exposição aos EDCs	4
1.2. Tributilestanho.....	5
1.2.1. Caracterização e propriedades físico-químicas	5
1.2.2. Origem e vias de exposição	5
1.2.3. Toxicocinética	7
1.2.4. Mecanismos de ação do TBT associados à fisiopatologia das doenças	8
Anomalias reprodutivas.....	8
Cardiotoxicidade.....	9
Obesidade.....	10
Imunotoxicidade	10
1.2.5. Legislação para o uso de TBT	11
1.3. Cordão umbilical humano	13
1.3.1. Estrutura e função	13
1.3.2. Artéria umbilical	14
1.4. Tecido muscular liso	16
1.4.1. Mecanismo contrátil base das células do músculo liso	17
1.4.2. Patologias da gravidez	19
1.5. Serotonina	20
1.5.1. Recetores de serotonina	21
Recetor 5-HT _{1B/1D}	21
Recetor 5-HT _{2A}	22
Recetor 5-HT ₇	24
1.6. Histamina	24

1.6.1. Recetores de Histamina.....	25
Recetor H ₁	26
Recetor H ₂	27
Capítulo II - Objetivos.....	29
Capítulo III - Materiais e Métodos	31
3.1. Amostra biológica - Cordão umbilical humano	31
3.2. Estudo de contratilidade arterial.....	31
3.2.1. Preparação e extração das artérias do cordão umbilical	31
3.2.2 Estudo de contratilidade arterial.....	32
3.3. Químicos	33
3.4. Análise estatística	34
Capítulo IV - Resultados	35
4.1. Análise do efeito a longo prazo do TBT na atividade contrátil da AUH provocada pela ativação de recetores de 5-HT	35
4.1.1. Efeito do solvente na atividade contrátil da AUH desencadeada pela ativação de recetores de 5-HT	35
4.1.2. Efeito do TBT a longo prazo na atividade contrátil desencadeada pela ativação de recetores de 5-HT na AUH	36
Efeito da incubação com TBT na contratilidade da AUH induzida pela 5-HT	36
Efeito da incubação com TBT na contratilidade da AUH induzida pela 5-HT e pelos agonistas dos recetores 5-HT _{1B/1D} e 5-HT _{2A}	37
Efeito da incubação com TBT sobre a vasorelaxação provocada pela ativação do recetor 5-HT ₇ na AUH	38
4.2. Análise do efeito a longo prazo do TBT na atividade contrátil da AUH provocada pela ativação de recetores de histamina	39
4.2.1. Efeito do solvente na atividade contrátil da AUH desencadeada pela ativação de recetores de histamina	40
4.2.2. Efeito do TBT a longo prazo na atividade contrátil desencadeada pela ativação de recetores de histamina na AUH	40
Efeito da incubação com TBT na contratilidade da AUH induzida pela histamina e pelo agonista do recetor H ₁	40

Efeito da incubação com TBT sobre a vasorelaxação provocada pela ativação do recetor H ₂ na AUH	41
Capítulo V - Discussão.....	43
5.1. Efeito a longo prazo do TBT na contratilidade da AUH provocada pela ativação de recetores de 5-HT	44
5.2. Efeito a longo prazo do TBT na contratilidade da AUH provocada pela ativação de recetores de histamina	46
Capítulo VI - Conclusão	49
Capítulo VII - Perspetivas futuras	51
Capítulo VIII - Bibliografia	53

Lista de Figuras

Figura 1. Via metabólica da biossíntese das hormonas esteroides a partir do colesterol.....	4
Figura 2. Imagem representativa da molécula de tributilestanho (TBT)	6
Figura 3. Imagens representativas de aplicação de tintas antivegetativas nas incrustações dos cascos dos barcos	7
Figura 4. Via de desalquilação sucessiva da degradação do TBT em seus metabolitos	8
Figura 5. Imagem representativa de um cordão umbilical humano com duas artérias e uma veia envolvida pela geleia de Wharton	15
Figura 6. Imagem descritiva da constituição do tecido da artéria umbilical humana	16
Figura 7. Imagens de culturas de células do músculo liso da artéria umbilical humana	17
Figura 8. Imagem ilustrativa da regulação da contração do músculo liso através da fosforilação reversível - desfosforilação da cadeia leve de miosina (MLC ₂₀)	19
Figura 9. Imagem representativa da molécula de serotonina (5-HT)	21
Figura 10. Classificação dos recetores acoplados a proteína G do sistema serotoninérgico	22
Figura 11. Regulação da contração do músculo liso pela ativação do recetor acoplado a proteína G _{qα}	24
Figura 12. Imagem representativa da molécula de histamina	26
Figura 13. Imagem ilustrativa da vasodilatação indireta desencadeada pelo NO sintetizado no endotélio com ação no tecido muscular vascular.....	28
Figura 14. Efeito do TBT na contração da AUH induzida pela 5-HT e seus agonistas L69 e AMHT.....	37
Figura 15. Efeito relaxante induzido pelo AS19, após contração das artérias com AMHT	39
Figura 16. Efeito da incubação dos anéis com TBT na contração induzida pela histamina e pelo BHI.....	41
Figura 17. Efeito relaxante induzido pelo DMP, após a contração das artérias com BHI.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição da solução fisiológica PSS diluído (pH 7,4) e compostos adjuvantes para evitar a contaminação e degradação das amostras	31
Tabela 2. Composição do meio DMEM-F12 (pH 7,4)	32
Tabela 3. Composição da solução fisiológica Krebs (pH 7,4).....	33
Tabela 4. Descrição dos materiais e equipamentos utilizados durante a realização do estudo, com as suas respetivas marcas	33
Tabela 5. Químicos utilizados na realização do procedimento laboratorial.....	34
Tabela 6. Efeito contrátil induzido pela 5-HT nos anéis AUH em percentagem (%) após incubação de 24h com as seguintes concentrações de TBT 0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM.....	36

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina
17 β -E	17 β -estradiol
AC	Adenilato ciclase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMHT	α - metil-5-hidroxitriptamina
AS19	(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatase
AUH	Artéria umbilical humana
BHI	Betahistine
Ca ²⁺	Ião cálcio
Ca ²⁺ - CaM	Complexo Ca ²⁺ -calmodulina
Ca ²⁺ - ATPase	Ca ²⁺ -adenosinatrifosfatase
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular do Ião cálcio
[K ⁺] _i	Concentração intracelular do Ião potássio
CPI-17	Proteína inibidora da fosfatase da cadeia leve de miosina
DAG	1,2-diacilglicerol
DMP	Dimaprit
DCV	Doenças cardiovasculares
EDC	Disruptor endócrino
ERK	Cinase regulada por um sinal extracelular
G _{i/o}	Recetor acoplado a proteína G do tipo inibitória
G _s	Recetor acoplado a proteína G do tipo estimulante
G _{qa}	Recetor acoplado a proteína G do tipo que ativa a fosfolipase C
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
IMO	<i>International Maritime Organization</i>
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
JNK	Cinases Jun N-terminal/proteínas cinases ativadas por stress
K ⁺	Ião potássio

L69	L694,297
MAPK	Proteína cinase ativada pelo mitogénio
MLC₂₀	Cadeia leve de miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve de miosina
NK	Linfócitos <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico (oxide nitric)
p44/42	Proteína cinase ativada pelo mitogénio do tipo p44/42
p38	Proteína cinase ativada pelo mitogénio do tipo p38
PI3K	Cinase 3-fosfatidilinositol
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PKC	Proteína cinase C
PKA	Proteína cinase A
PLC	Fosfolipase C
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor-γ</i>
Rho	Família das GTPases
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
TBT	Tributilestanho
OT	Organoestanho

Capítulo I - Introdução

1.1. Conceitos gerais sobre os disruptores endócrinos

1.1.1. Contextualização

O sistema endócrino visa o controlo do fluxo de informações entre diferentes células e tecidos do organismo. Biologicamente, o termo endócrino significa secreção interna de moléculas ativas, que são denominadas de hormonas ⁽¹⁾. Elas circulam no sangue e coordenam a homeostasia corporal, regulando importantes processos fisiológicos ao longo da vida. Estes processos, como por exemplo, o crescimento, a maturação sexual e a reprodução, permitem ao organismo adaptar-se às mudanças nutricionais e a outros condicionantes externos, que possam perturbar o equilíbrio do meio ⁽²⁻⁴⁾.

Em geral, as hormonas são libertadas de diferentes glândulas ou órgãos, circulam na corrente sanguínea e atingem tecidos e órgãos, nos quais as células constituintes podem possuir recetores para as mesmas ^(1, 5, 6). Assim, elas interagem com elevada afinidade com as células através de recetores específicos presentes nestas ⁽¹⁾. Estes recetores podem ser membranares ou intracelulares, de forma que as hormonas hidrossolúveis, que não podem atravessar a barreira celular lipídica, ligam-se aos recetores membranares ⁽³⁾, enquanto as hormonas lipossolúveis conseguem difundir para o interior da célula e ligar aos recetores intracelulares. As hormonas lipossolúveis têm tendência a serem transportadas ligadas a proteínas plasmáticas ⁽⁶⁾, o que pode provocar o aumento do seu tempo de semivida, comparativamente com as hormonas com características hidrofílicas ⁽⁴⁾.

A ativação dos recetores hormonais desencadeia uma cascata de processos, nos quais podem estar envolvidos segundos mensageiros, que transmitem a informação para o interior da célula ^(3, 6). A ativação ou inibição destes pode desencadear mudanças na atividade de enzimas, abertura de canais iónicos mudando o potencial da membrana, e de fatores de transcrição que regulam a expressão genética ⁽⁵⁾.

O controlo dos processos de síntese, da libertação, do transporte e metabolismo das hormonas, assim como da expressão e da atividade dos recetores destas moléculas é imprescindível, existindo diferentes mecanismos de regulação do sistema endócrino ^(1, 3, 4). Estes mecanismos são influenciados por um conjunto de *set-points* como o ciclo circadiano, ciclos sazonais, o sistema nervoso, o ambiente, entre outras influências que podem ser prejudiciais ao organismo. ⁽⁴⁾.

A evolução das novas tecnologias nas últimas décadas, tem acontecido de forma muito rápida e por vezes pouco pensada. Assim sendo, a urbanização progressiva, a industrialização e o consumismo desmedidos, tem conduzido a um grande aumento da

poluição do meio ambiente ⁽⁷⁾. Vários estudos demonstram que a poluição deve ser considerada como um fato preocupante. Os poluentes são diversos em estrutura e tendo em conta a sua localização na natureza, pois estão presentes, em plásticos, em produtos farmacêuticos e cosméticos, em pesticidas e biocidas, em hidrocarbonetos do petróleo e em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros ^(7, 8). Isto faz com que estes produtos interajam com os ecossistemas acarretando sérios riscos tanto à vida selvagem como a saúde humana ^(9, 10).

Deste modo, uma das temáticas atuais envolve a influência de determinados agentes poluentes sobre o sistema endócrino, nomeadamente aqueles considerados como disruptores endócrinos. Atualmente existem mais de 85.000 produtos químicos registados no mercado, e sabe-se que para a maioria dos produtos, há poucos estudos sobre os seus efeitos ⁽¹¹⁾. Assim sendo, as estimativas atuais indicam a existência de aproximadamente 1000 produtos químicos que podem ser classificados como disruptores endócrinos (EDC) ⁽²⁾.

1.1.2. Definição de Disruptor endócrino

Nos últimos dez anos, foram propostas diferentes definições para o termo disruptor endócrino ⁽²⁾.

Na definição da *Environmental Protection Agency* (EPA) é indicado que “os EDCs são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ação vinculante ou eliminação de hormonas naturais que circulam no sistema sanguíneo e que são responsáveis pela manutenção da homeostasia e da regulação dos processos de desenvolvimento do organismo” ^(7, 11).

De acordo com a *World Health Organization* (WHO) “os EDCs são substâncias que alteram uma ou mais funções do sistema endócrino, e consequentemente causam efeitos adversos em um organismo intacto, nos seus descendentes ou em (sub) populações” ⁽¹²⁾.

Sendo que em 2012, a *Endocrine Society* definiu os EDCs como “composto químico exógeno, ou mistura de substâncias químicas que imitam, bloqueiam ou que podem interferir com qualquer aspeto hormonal” ⁽²⁾.

1.1.3. Origem e características dos EDCs

Os EDCs podem ter origem na natureza ou ser sintetizados pela indústria química ⁽⁷⁾. Incluem pesticidas e herbicidas (difenil-dicloro-tricloroetano; DDT), biocidas, estabilizadores térmicos, catalisadores químicos (tributilestanho; TBT), determinados componentes de plásticos (bisfenol A; BPA ou di-2-etilhexil-ftalato; DEHP), produtos farmacêuticos (dietilstilbestrol e 17alfa-etinilestradiol), iões (cádmio) e alguns filtros Ultravioleta (metoxicinamato de octilo; OMC) ^(9, 13, 14).

Uma das propriedades de muitos EDCs consiste na capacidade de persistência e bioacumulação no ambiente. A maior parte dos EDCs são lipofílicos ⁽⁹⁻¹¹⁾, e podem atravessar as barreiras fisiológicas. Podendo ser detetados no tecido adiposo e em fluidos biológicos humanos, tais como soro, urina, leite e líquido amniótico ⁽⁷⁾.

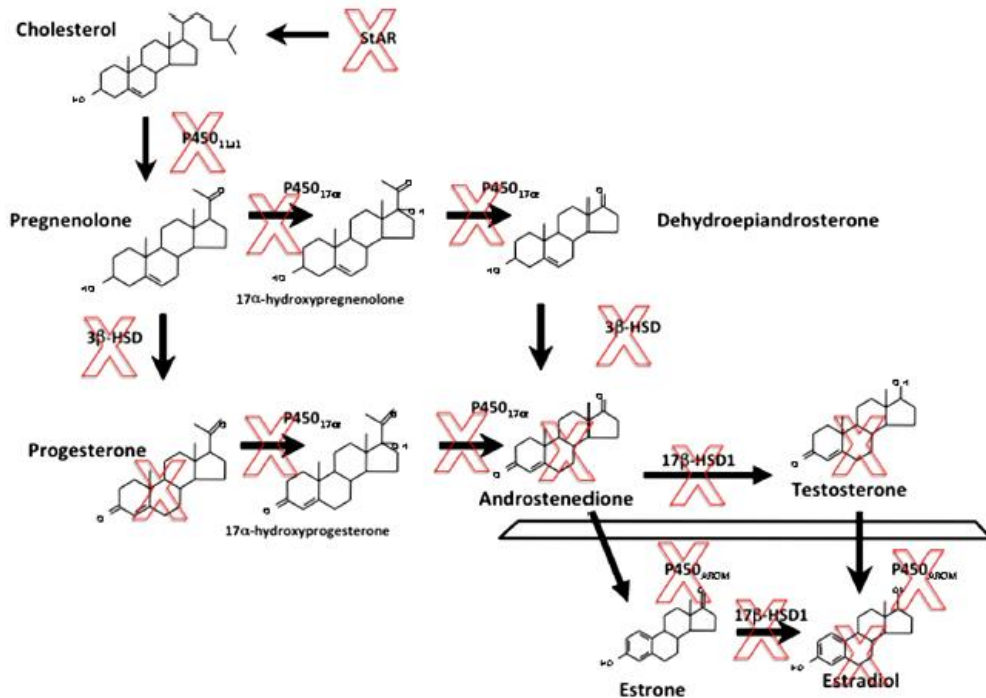


Figura 1: Via metabólica da biossíntese das hormonas esteroides a partir do colesterol. O X indica as hormonas ou enzimas que demonstraram ser afetadas pelos EDCs (*in* ⁽¹⁵⁾).

A maioria dos EDCs apresentam semelhanças estruturais com as hormonas esteroides conferindo-lhes a capacidade de interagir com os seus recetores tanto em animais e seres humanos, razão pela qual podem ser denominados de xenoestrógenos ^(7, 9). Contudo, alguns EDCs também podem interagir com a síntese destas hormonas. Eles podem estabelecer um impacto direto sobre os genes envolvidos na regulação do metabolismo dos estrogénios e androgénios. De entre estes genes são referidos a CYP19A (ou aromatase), o FOXL2, a SOX9, o DMRT1 e o NrOb1. Assim sendo, os EDCs podem alterar as concentrações séricas de lípidos ou de enzimas metabólicas, que são necessárias para converter o colesterol em hormonas esteróides, alterando desta forma a síntese destas hormonas ⁽¹⁶⁾ como pode ser observado na figura 1 ⁽¹⁵⁾.

Neste sentido sabe-se também que, no geral a semelhança entre estes compostos e as hormonas indicam que as respostas induzidas pela exposição aos EDCs podem ser bifásicas ou curvas em forma de U, ou em forma de U invertido ⁽¹¹⁾. Estes disruptores podem ter efeitos tóxicos máximos tanto a concentrações baixas como a concentrações elevadas, tornando difícil determinar os parâmetros como LOAEL (nível de efeito adverso observado mais baixo) e NOAEL (nenhum nível de efeito adverso observado) ⁽¹⁷⁾.

1.1.4. Vias de exposição aos EDCs

Os EDCs são encontrados numa ampla variedade de produtos de consumo, e deste modo as exposições são frequentemente disseminadas ⁽¹¹⁾. Isto facilita a interação destes com as hormonas, podendo exercer consequências adversas que levem ao aparecimento de patologias, ou mesmo à morte do organismo ⁽²⁾.

A exposição típica a estes químicos deve-se principalmente a contaminação pela cadeia alimentar ⁽⁹⁾. Destacando-se os seres humanos no final desta cadeia, expostos às doses mais elevadas destes compostos. Contudo, a exposição diária não é apenas referida ao consumo de alimentos contaminados, podendo ocorrer também pelo ar e água poluída ⁽⁷⁾.

É de extrema importância ter em conta vários fatores quando se pretende estimar toxicidade do xenobiótico, ou o risco de exposição humana a determinadas substâncias. Muitos EDCs exibem efeitos biológicos a baixas concentrações, sendo que frequentemente são doses inferiores às consideradas como tóxicas ⁽⁷⁾. Estes fatores incluem a natureza do químico, o tempo de exposição, assim como a periodicidade, o tipo de interação com recetores, o mecanismo de ação, assim como a via de absorção, distribuição e a sua metabolização química pelo organismo ^(9, 18). Outro aspeto importante refere-se a idade ⁽⁷⁾, assim como determinados períodos da vida como a puberdade e a gestação que podem aumentar a sensibilidade do aumento dos riscos ⁽⁹⁾.

1.1.5. Efeitos associados a exposição aos EDCs

A existência de um forte impacto modulatório no sistema endócrino e a falta de efeitos tóxicos evidentes a curto prazo, podem promover uma fase de atraso entre o momento da exposição (dependente de períodos críticos) e o tempo dos primeiros efeitos negativos. Esta característica é muito comum nos EDCs, o que faz com que o diagnóstico seja tardio. ^(7, 11).

Estudos recentes comprovam que o aumento da prevalência dos EDCs são associados não só à anomalias reprodutivas ⁽¹⁰⁾, como por exemplo o imposexo, o criptorquismo, a puberdade precoce, a infertilidade e a diminuição da motilidade do esperma, mas também à certos tipos de cancro como próstata e tireoide, alterações neurológicas e cardiovasculares ^(13, 19). Mais recentemente associou-se com o aumento da incidência de doenças alérgicas ⁽¹⁰⁾ e com a síndrome metabólica, considerada uma patologia dos tempos modernos que abrange um conjunto de patologias ou condições como a obesidade, a diabetes do tipo 2, e distúrbios lipídicos hepáticos ⁽¹¹⁾.

Os EDCs foram inicialmente associados ao imposexo, também conhecido como dimorfismo sexual ^(20, 21). Esta disfunção é caracterizada pelo desenvolvimento de órgãos

sexuais masculinos (pênis e/ou canal deferente) sobreposto ao trato genital feminino. Assim sendo, o tributilestanho foi o primeiro composto associado a esta anomalia sexual ⁽²²⁾.

1.2. Tributilestanho

1.2.1. Caracterização e propriedades físico-químicas

O tributilestanho (TBT) é um dos compostos mais tóxicos pertencente a família dos organoestanhos (OTs) ^(23, 24). Trata-se de um copolímero organometálico sintético amplamente utilizado nas décadas de 1950 a 2008 ⁽¹²⁾. Apresenta-se como fórmula geral $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{-Sn-X}$ (figura 2), onde o X é um anião, normalmente um ião halogénio tal como Cl^- , ou um grupo funcional ligado covalentemente ⁽²⁵⁾. No entanto, no ambiente espera-se que os compostos de TBT existam principalmente como cloreto de tributilestanho, hidróxido de tributilestanho, e carbonato de tributilestanho ⁽¹²⁾.

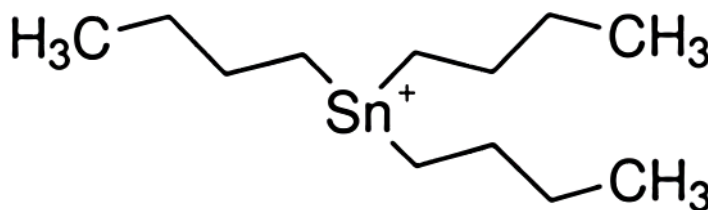


Figura 2. Imagem representativa da molécula de tributilestanho (TBT) (adaptado *in Sigma aldrich*).

O TBT é considerado um agente oxidante médio. Na presença de determinadas condições como o oxigênio, a luz ou o calor, pode ocorrer uma quebra lenta da molécula. O seu coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) varia de acordo com o pH e a salinidade da água, alternando entre os valores 3,19 a 3,84 para a água destilada e é 3,54 para a água do mar ^(12, 26). Em relação à sua solubilidade em água varia aproximadamente entre 1 a 100mg/L, dependendo da temperatura e do pH ⁽¹²⁾. Apresenta elevado carácter lipofílico e as estimativas de semivida deste tóxico no ambiente variam amplamente desde dias a semanas, podendo persistir nos sedimentos por vários anos ^(23, 24).

1.2.2. Origem e vias de exposição

O TBT é um produto químico tóxico utilizado para diversos fins industriais, tais como conservantes biocidas, têxteis de algodão, papel e tintas residenciais ⁽¹²⁾, fungicidas agrícolas, agentes desinfetantes para arrefecimento de águas industriais, e foi utilizado principalmente em pequenos e grandes embarcações, como um constituinte de tintas antivegetativas ^(23, 24).

O TBT começou a ser usado em 1950, como um constituinte ativo de tintas antivegetativas, com o objetivo de prevenir o crescimento de organismos incrustantes que correspondem a deposição e acumulação de material biológico como cracas, algas e outros animais marinhos em navios comerciais e militares. A sua utilização tem como finalidade reduzir o atrito entre os cascos dos barcos e a água ⁽²⁵⁾. Deste modo, ele é libertado lentamente da superfície pintada à medida que o polímero é hidrolisado na água do mar, proporcionando uma proteção contra incrustações até 4 a 5 anos ⁽¹²⁾. Estas qualidades do composto permitem então uma navegação mais suave e mais rápida, reduzindo desta forma os custos de combustível e permitindo uma maior eficiência e durabilidade do produto ^(12, 25, 27).



Figura 3. Imagens representativas de aplicação de tintas antivegetativas nas incrustações dos cascos dos barcos (in ⁽²⁸⁾).

Devido à sua ampla utilização, o seu elevado carácter lipofílico e baixa solubilidade em água, este composto esteve e ainda hoje está associado a bioacumulação nas cadeias alimentares de várias espécies marinhas ^(23, 24). O TBT apresenta uma grande capacidade de ser rapidamente adsorvido por seres vivos, tais como bactérias e algas, ou absorvido em partículas que podem apresentar-se em suspensão na água. O grau de adsorção vai depender da salinidade da água, natureza, tamanho das partículas e quantidade de matéria em suspensão, temperatura e presença de matéria orgânica dissolvida ^(12, 27, 29). Posteriormente, estes são incorporados nos tecidos de zooplâncton, alguns invertebrados marinhos, eventualmente, organismos superiores tais como peixes, caranguejos, aves aquáticas e mamíferos, atingindo toda a cadeia alimentar ^(29, 30).

O TBT tornou-se num contaminante comum dos ecossistemas marinhos e da água doce. Deste modo, tornou-se num fator preocupante, pelo fato de exceder os níveis ou limites determinados para a toxicidade aguda e crónica. Associa-se que a ingestão dietética é provavelmente a principal via de exposição aos compostos de TBT para a população em geral, mas não descartando possíveis efeitos da exposição dérmica e inalatória (17, 20, 29, 31).

1.2.3. Toxicocinética

A distribuição do tóxico no organismo demonstra a presença de resíduos de TBT no tecido adiposo de mamíferos marinhos e níveis consideravelmente superiores no sangue (32, 33) e outros tecidos, nomeadamente o fígado, os rins (27, 29) os músculos, os ovários, o cérebro (16, 17) e a placenta (23). Contudo, diferentes autores sugeriram que a acumulação principal é no fígado devido à sua ligação a proteínas hepáticas (27)

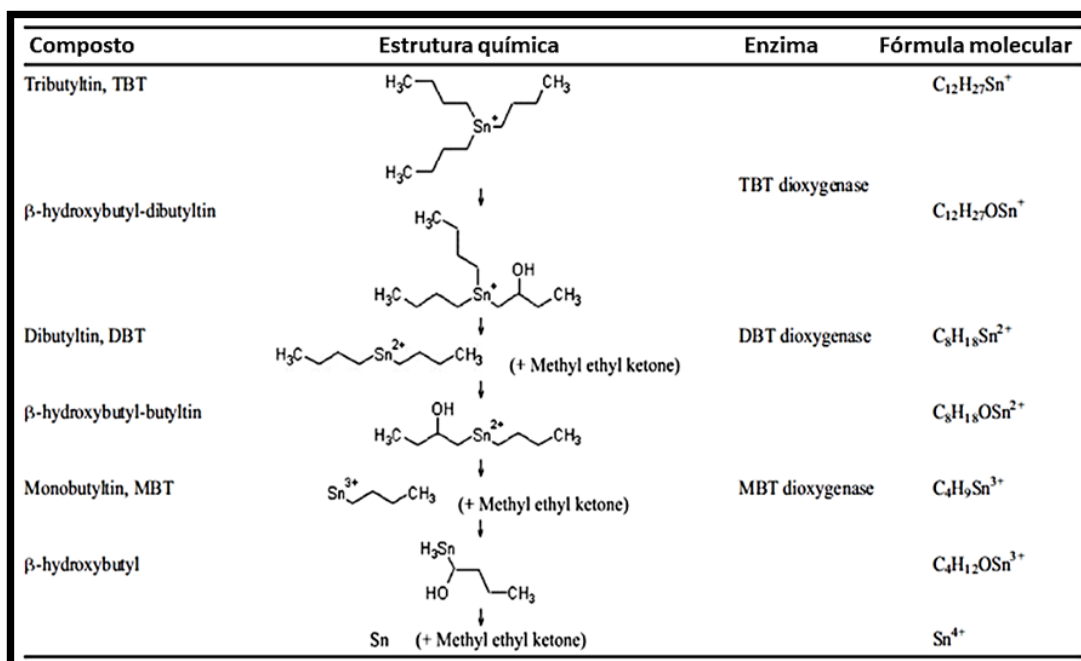


Figura 4. Via de desalquilação sucessiva da degradação do TBT em seus metabolitos (adaptado *in* (29)).

O desaparecimento progressivo do TBT adsorvido é devido à degradação, não à desorção. A degradação envolve a divisão da ligação carbono-estanho (27). Isto pode resultar de vários processos tanto físico-químicos (hidrólise, temperatura, pH), como biológicos (degradação por microorganismos e pelo metabolismo dos organismos superiores) (27, 29) O metabolismo do TBT no fígado ocorre através da desalquilação através de microssomas hepáticos e hidroxilação dependente do citocromo P450 (17). O processo de metabolização ocorre sob determinadas condições favoráveis através da desalquilação sucessiva para produzir dibutil-estanho (DBT), monobutil-estanho (MBT) e, numa última fase, estanho

inorgânico. Este processo metabólico permite de uma forma progressiva a diminuição do grau de toxicidade do composto ⁽²⁹⁾.

O TBT e os seus metabolitos são excretados pelo organismo, principalmente pela urina e as fezes, mas também pela bÍlis e pela via pulmonar. Contudo, é dependente do grau de exposição visto que grande parte fica acumulado no tecido adiposo e no fÍgado ⁽¹⁷⁾.

Um grande número de estudos indicam que o TBT e seus metabolitos apresentam efeitos adversos sobre vários sistemas fisiológicos ⁽¹⁷⁾, podendo causar várias formas de citotoxicidade, incluindo imunotoxicidade ^(10, 34), genotoxicidade ⁽³⁰⁾ e cardiotoxicidade ⁽³⁵⁾. Contudo, a informação sobre os mecanismos de ação do tÓxico em microrganismos no solo, na Água doce e em ambientes marinhos e estuarinos, e o papel dos radicais aniÓnicos no processo de degradação não se encontra totalmente esclarecida ⁽²⁹⁾.

Assim sendo, o TBT apresenta-se como uma preocupação atual, que se deve ter em consideração o nÍvel de toxicidade relacionado com diferentes concentrações, tempo de exposição, biodisponibilidade, sensibilidade da biota, e persistência no ambiente ^(23, 24, 29).

1.2.4. Mecanismos de ação do TBT associados à fisiopatologia das doenças

Os estudos sobre o TBT tornaram-se muito importantes quando as tintas antivegetativas foram relacionadas com a poluição nas marinhas e com o declÍnio de moluscos em Áreas costeiras ⁽²²⁾. Inicialmente foi associado a determinadas condições patológicas como anormalidades reprodutivas e sexuais, como o imposexo em gastrÓpodes ^(35, 36). Neste contexto, as gastrÓpodes fêmeas foram consideradas um biomarcador específico e sensível capaz de determinar a presença e o grau de poluição ambiental do meio ⁽³⁷⁾. Com o passar do tempo foram observados outros efeitos do composto em outros sistemas fisiológicos.

Anomalias reprodutivas

Os primeiros estudos sobre o TBT têm início nos anos 70, quando o fenômeno de imposexo foi relatado por Blader *et al.* em *Nucella lapillus* no Reino Unido ⁽³⁸⁾. Neste contexto, as gastrÓpodes fêmeas podem desenvolver pênis e canal deferente que sobrepõem sobre às características sexuais femininas. Isto ocorre devido à bioacumulação do TBT que resulta em efeitos de disrupção endócrina que provocam níveis elevados de testosterona, culminando na sobreposição dos dois géneros sexuais numa fêmea normal ^(29, 30, 36, 39, 40). O mecanismo de ação permanece desconhecido, mas parece estar relacionado com à inibição direta da enzima aromatase que converte a testosterona em estradiol ⁽²³⁾.

Estudos mais recentes, mostraram que a exposição ao TBT em *zebrafish* e *medaka* diminuÍam o sucesso reprodutivo, enquanto que o linguado japonês tendo uma dieta rica em

óxido de TBT acabou por induzir a inversão de género ⁽²⁴⁾. Por outro lado, sabe-se que o TBT possui a capacidade de modular o estradiol, provocando alterações a nível do sistema reprodutor em algumas espécies de gastrópodes. De entre estas anomalias destaca-se, alteração do ciclo reprodutivo, impedindo o desenvolvimento dos folículos ováricos, induzindo um desequilíbrio das hormonas ováricas que reduz o número de gonócitos e células germinativas ⁽²³⁾. Outros dados demonstraram que pode provocar alterações no peso dos testículos e dos ovários, provocando a redução dos níveis séricos de progesterona e consequentemente, a redução da taxa de gravidez ^(30, 35). Isto afeta o desenvolvimento sexual, que numa fase tardia pode conduzir a infertilidade ⁽²³⁾.

Contudo, apesar das hormonas esteroides sexuais controlarem os principais processos fisiológicos para o desenvolvimento das características sexuais e reprodutivos de forma diferente nos dois géneros, elas também exercem um papel importante a nível cardiovascular que pode ser afetado também pelo TBT ⁽¹⁸⁾.

Cardiotoxicidade

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais indicam que as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte nas mulheres. Em média, elas desenvolvem doenças cardiovasculares 10-15 anos mais tarde do que os homens e o risco de DCV aumenta mais de duas vezes após a menopausa. ⁽³⁵⁾. Embora as hormonas sexuais femininas estejam primariamente envolvidas na regulação das funções reprodutivas, o 17 β -estradiol (17 β -E) também protege contra as DCVs desempenhando um efeito cardioprotetor ⁽²³⁾. De fato, alguns autores demonstram que a terapia de substituição de estrogénio reduz a incidência de doenças arteriais coronárias ⁽³⁵⁾. Moysés *et al.* demonstraram que o tratamento com estrogénio em fêmeas de ratos ovarietomizadas provoca a restauração da vasodilatação coronária produzida pelo agente contrátil serotonina ^(35, 41). Assim sendo, segundo estes autores o TBT pode afetar a atividade cardiovascular podendo prejudicar a vasodilatação induzida pelo 17 β -E, diminuindo acentuadamente os níveis séricos da hormona ⁽⁷⁾. Como foi referido anteriormente, associa-se que este esteja relacionado com a inibição direta da enzima aromatase ⁽¹⁶⁾.

Outros estudos também indicam que o TBT pode afetar a atividade cardiovascular por outros mecanismos. Estudos em células musculares cardíacas indicam que este composto é capaz de inibir significativamente tanto a bomba Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (RS), assim como o transporte de captura de Ca²⁺ pelos RS em ratos. O estudo ainda demonstra níveis baixos de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e sugere que os mecanismos em causa são resultantes da alteração da fosforilação de proteínas específicas ⁽⁴²⁾. Outro estudo observou que o TBT provoca endurecimento de corações de ratos *wistar*, isto é, leva ao aumento da deposição de colagénio no interstício cardíaco, aumento do número de células inflamatórias (mastócitos), e apresenta uma capacidade de induzir a

remoção do endotélio nas artérias coronárias, com acumulação de plaquetas nesta superfície⁽³⁵⁾. É sugerido ainda a capacidade de exacerbar o stresse oxidativo, com formação de fibrose, levando a disfunção funcional e morfológica de anéis aórticos em ratos fêmeas⁽²⁷⁾. E foi demonstrado também que anéis aórticos sob efeito do TBT reduzem a reatividade a fenilefrina, sugerindo mecanismos dependentes da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), ou seja, dependente de endotélio, dos canais de K⁺ e do aumento do stress oxidativo⁽²³⁾.

Obesidade

Várias evidências indicam que o TBT tem propriedades pró-adipogênicas e está envolvido na ativação da *peroxisome proliferator activated receptor-γ* (PPAR γ)^(16, 43, 44). Foi demonstrado que o composto organoestanho aumenta a expressão do marcador de adipócitos C/EBP α com co-exposição para isobutil metilxantina ou insulina na ausência de outros estimuladores adipogênicos. A análise de proteínas adipogênicas específicas revelou que TBT e troglitazone (Trog) afetam diferencialmente a expressão das mesmas, comparativamente com a estimulação de PPAR γ ⁽⁴³⁾. Outros estudos mostram que para além do PPAR γ , o TBT também apresenta-se como um agonista do recetor nuclear retinóide X (RXR)^(16, 44), possuindo a capacidade de sensibilizar as células estaminais multipotentes humanas e de ratos, derivadas a partir do estroma de tecido adiposo. Assim sendo, estes fatos contribuem no processo de adiponogénese⁽⁴⁴⁾.

As condições exigidas para que o TBT possa induzir a formação de adipócitos e as suas consequências funcionais não se encontram totalmente esclarecidas⁽⁴³⁾. Sabe-se que as hormonas da tiroide regulam o metabolismo e o gasto de energia do organismo. Assim, é sugerido também que ação do TBT na morfofisiologia tiroidea, possa ser um fator desencadeante do aumento da massa gorda⁽¹⁷⁾. Estudos mais recentes demonstram que o TBT pode induzir diabetes e resistência à insulina^(33, 45). Apresentando em jejum um aumento significativo de glucose, insulina, adiponectina, e níveis de glucagon reduzidos em ratinhos tratados. O estado de hiperglicémia e hiperinsulinémia, conduz ao excesso de peso devido ao aumento de tecido adiposo. Sugere-se que o mecanismo envolvido resulta da supressão da via do sinal do recetor de insulina no músculo esquelético e no fígado⁽⁴⁵⁾, ou efeito sobre as células B do pâncreas (aumento [Ca²⁺]_i) que conduz a intolerância a glucose devido a uma resistência a insulina⁽³³⁾.

Imunotoxicidade

O TBT também foi associado à imunossupressão das células do sistema imunológico, incluindo aos linfócitos *natural killer* (NK). Deste modo, este efeito torna os seres vivos, incluindo o homem suscetíveis a infeções virais e ao aparecimento de tumores. Alguns estudos demonstraram que o TBT causa uma diminuição na capacidade das células NK, apresentando-

se com uma atividade funcional citotóxica fraca ⁽⁴⁶⁾. Associa-se que parte da ação ocorre nos eventos de sinalização intracelular, através da alteração e aumento da atividade das enzimas principalmente a p44/42, p38 ⁽³¹⁾ como proteínas cinase ativada por mitogénio (MAPK) e JNK (20). Justifica-se que a ativação da p44/42 induzida pelo TBT desempenha um importante papel na ativação da proteína quinase C (PKC), contudo a ativação do p38 e da JNK, não utiliza a mesma via ⁽²⁰⁾. Assim sendo, associa-se ainda que o TBT desempenha uma ação imunopressora sobre as NK, diminuindo atividade intracelular da proteína cinase A (PKA), através da inibição da adenilato ciclase (AC), conseqüentemente a diminuição dos níveis de AMPc ^(31, 42).

Nas últimas décadas, tem havido um aumento significativo da incidência de doenças alérgicas, tendo-se sugerido que alguns fatores ambientais como o TBT poderiam exercer efeitos adjuvantes pró-alérgicos ^(10, 47). Assim sendo, Takuma Kato *et al.* mostraram que o TBT é um poluente ambiental recalcitrante, com capacidade de induzir de uma forma exacerbada a imunidade das Th₂ (linfócitos T auxiliares do tipo 2). Deste modo, os efeitos associados destacados foram também o aumento da inflamação das vias aéreas, através de um mecanismo envolvendo o aumento do stresse oxidativo em órgãos linfóides secundários, induzindo também a apoptose das células Treg (linfócitos T reguladores) preferencialmente, tornando os indivíduos vulneráveis à sensibilização alérgica ⁽¹⁰⁾. Outros dados apontam, para que concentrações de exposição toxicologicamente de risco, podem suprimir as células T ativas (linfócitos T), induzindo-as a apoptose através da ativação das caspases. O que faz com o TBT seja um componente de risco para sistema imunológico ⁽⁴⁷⁾.

Os OTs podem também induzir alguns tumores como nos testículos e na pituitária ⁽³⁵⁾. Estudos em ratos sujeitos a uma dieta contendo 50 mg/kg TBT associaram este EDC a incidência de tumores benignos da hipófise, feocromocitomas na medula adrenal e adenomas na paratireóide. Durante o estudo foi possível observar que os ratos apresentavam anemia, linfocitopenia e trombocitose, diminuição da função renal e da tiroxina livre. Assim sendo, sugere-se que o aumento de alguns tumores se deva provavelmente as alterações hormonais ou imunológicas caudadas pelo composto. ⁽⁵⁾

Como forma de evitar todas estas anomalias associadas a exposição ao TBT, foi necessário desenvolver regulamentos desde os primeiros sinais de patologias associadas ao composto. Deste modo, foram criadas legislações que impedissem ou que estipulassem limites a sua utilização nas mais diversas áreas, com o objetivo a evitar qualquer possível contato com o composto que pudesse colocar em risco a vida selvagem e o ser humano.

1.2.5. Legislação para o uso de TBT

A produção mundial de compostos OTs incluindo o TBT, chegou a alcançar 40.000 toneladas/ano em 1985 e atingiu um pico máximo de 50.000 toneladas/ano em 1996 ⁽²⁵⁾.

Deste modo, a ampla distribuição, a alta hidrofobicidade e a persistência no meio ambiente aumentaram a preocupação com sua bioacumulação, o seu potencial poder de biomagnificação nas redes alimentares e os seus efeitos adversos para a saúde humana e meio ambiente. Consequentemente, a necessidade de estabelecer requisitos legais surgiu com o intuito de proteger os ecossistemas ⁽²⁹⁾.

A França foi o primeiro país a proibir o uso de tintas antivegetativas à base de OT em barcos com menos de 25 m de comprimento em 1982, seguida posteriormente pelo o Reino Unido em 1986 ⁽⁴⁸⁾. Nos Estados Unidos da América (1988) decretaram uma ação de control das tintas obtendo estes compostos, onde a taxa de lixiviação de $4 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ foi introduzida a nível federal. Outros regulamentos semelhantes entraram em vigor alguns anos depois, na Austrália, na Nova Zelândia, em Hong Kong e na maioria dos países europeus após 1988 ⁽²⁹⁾.

Atualmente na Europa, o *Water Framework Directive* é a principal comunidade responsável pelo controlo das descargas pontuais e difusas de substâncias prejudiciais na água. O regulamento 2455/2001/EC, de 20 de Novembro de 2001 da Comissão Parlamentar Europeia, que altera a Diretiva 2000/60/CE relativa à política da água, define 33 substâncias prejudiciais prioritárias, que incluem o TBT. Este determina a interrupção da produção, ou quais queiras descargas e perdas para a água ^(36, 49). No mesmo contexto, a Comunidade Europeia limitou a sua utilização através do Regulamento nº 782/2003 do Parlamento e do Conselho de 14 de Abril de 2003. A aplicação de tintas antivegetativas à base de OTs foi proibida a partir de 1 de Julho de 2003 ⁽³⁶⁾.

Mais recentemente, a *International Maritime Organization* (IMO) promoveu o estabelecimento de condições legais internacionais que proibissem a aplicação de tintas baseadas em TBT. A partir de 1 de janeiro de 2008, as tintas previamente aplicadas terão de ser removidas ou cobertas para evitar a libertação destes no meio ambiente ^(50, 51).

Apesar dos estudos realizados e das legislações desenvolvidas restringindo o uso destes compostos, a remoção do TBT de forma imediata não é possível, pois já foi bioacumulado, e os seus produtos de degradação continuam retidos nos sedimentos ^(29, 36). A degradação biótica e abiótica deste composto em lixiviados de aterro geralmente não ocorre de forma completa. Deste modo, vários estudos focam em processos de adsorção e degradação deste xenobiótico e dos seus metabolitos ⁽⁵²⁾. O desenvolvimento de técnicas de limpeza baseadas em tratamento térmico, biodegradação, oxidação química avançada e adsorção físico-química, tem sido uma preocupação atual ao nível da eficiência, viabilidade e custo das mesmas ⁽²⁵⁾.

Além disso, embora o uso de tintas antivegetativas e outros produtos derivados tenham sido banidos em muitos países, estes continuam a ser produzidos e utilizados por outros. Isto ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, os que não aderiram a IMO e também através do uso ilegal destes produtos ^(29, 36). Em alguns casos a legislação existente mostra-se ineficiente, o que implica a necessidade de fortalecer as ações legais. ⁽²²⁾.

Consequentemente, há uma forte necessidade de desenvolvimento de métodos avançados para a monitorização, que proporcionem maior sensibilidade, seletividade e precisão, de modo a evitar a disponibilidade do composto aos seres vivos ⁽⁵³⁾.

1.3. Cordão umbilical humano

1.3.1. Estrutura e função

O cordão umbilical é uma estrutura extremamente flexível que permite uma interligação vital entre o feto e a placenta da gestante. Corresponde ao suporte físico dos vasos umbilicais que permite o fluxo de oxigénio e nutrientes pela circulação feto-placentária ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Uma vez que os vasos umbilicais não são inervados, o estado contrátil das células do músculo liso é inteiramente dependente de mediadores locais, permitindo o fluxo de substâncias essenciais a sobrevivência e ao desenvolvimento do feto ⁽⁵⁴⁾. Apesar de ser extremamente flexível, esta estrutura possui uma estabilidade mecânica que protege os vasos da pressão (forças de tração e compressão), torção e rutura, graças as suas características ⁽⁵⁷⁾.

Numa fase inicial da gestação, o cordão umbilical apresenta quatro vasos, duas veias e duas artérias. Numa fase posterior atrofia uma veia, ficando apenas com duas artérias e uma veia (figura 5). A veia transporta sangue oxigenado para o feto e as duas artérias na direção oposta ⁽⁵⁷⁾.

Os vasos umbilicais encontram-se envolvidos por um epitélio derivado de âmnio ou bolsa amniótica que permite a formação de um esqueleto macio contínuo designado de geleia de Wharton. Esta geleia é constituída por um material mucoide com aspeto esbranquiçado e hidrofílico, constituído por tecido conjuntivo mucoso e fibroblastos ^(55, 58). Sendo o glicosaminoglicano que vai permitir envolver os fibroblastos e as fibrilas de colagénio do tecido que estão dispostas concêntricamente em torno dos vasos. A pressão local é assim amortecida e o perigo de oclusão da estrutura vascular, por exemplo, causado pelo movimento fetal normal, é significativamente reduzido ⁽⁵⁷⁾.

O comprimento médio para a estrutura vascular umbilical é aproximadamente de 50cm (30 a 100cm) e tem um diâmetro de 1,0 a 2,5cm. Os vasos são usualmente tortuosos e dispõem-se em espiral, tendo um comprimento maior que o próprio cordão. Apresentam por vezes varicosidades que se designam de falsos nós e a anomalia vascular mais frequente corresponde a presença de uma única artéria. Deste modo, variações ou anomalias do comprimento, podem acarretar sérios problemas entre a gestante e o feto ⁽⁵⁵⁾.

O cordão umbilical humano, para além de permitir a sobrevivência do feto durante a gestação, após o parto é considerado um material residual biológico de grande importância para a realização de estudos e terapias de células estaminais ^(56, 59). Esta estrutura também é rica em células estaminais consideradas células indiferenciadas, capazes de originar células especializadas específicas. Deste modo, é considerado uma importante fonte promissora de terapias baseadas em suplementação ou substituição celular. Visto que este contém dois reservatórios de células estaminais localizados no sangue do cordão umbilical e na geleia de Wharton ⁽⁵⁶⁾. Também pode ser usada como amostra biológica para estudos toxicológicos e para realizar metodologias que envolvem culturas de células do músculo liso da artéria umbilical humana (AUH) que expressam proteínas contráteis, canais iônicos funcionais entre outros ⁽⁵⁹⁾.

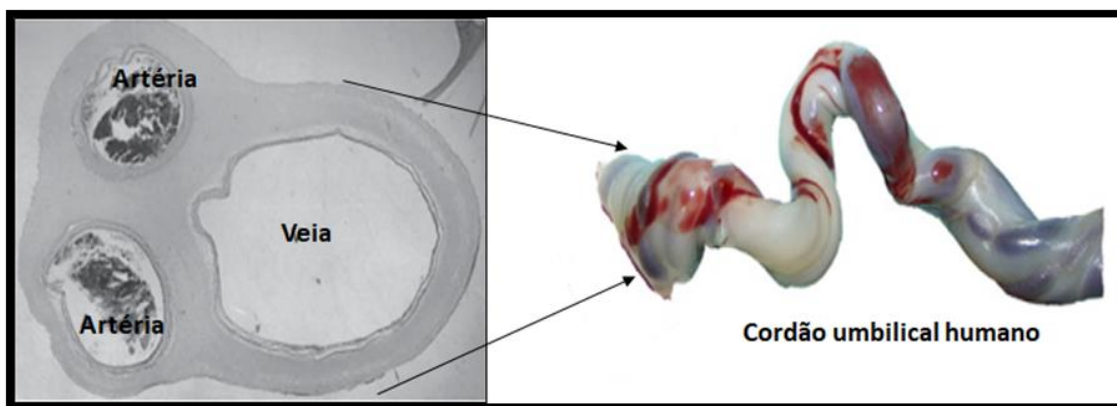


Figura 5. Imagem representativa de um cordão umbilical humano com duas artérias e uma veia envolvida pela geleia de Wharton (adaptado de ^(56, 60)).

1.3.2. Artéria umbilical

A AUH está envolvida na circulação feto-placentária. Os mecanismos endócrinos e parácrinos que regulam o estado contrátil das células do músculo liso são muito importantes para o melhor fluxo de oxigênio e nutrientes entre o feto e a placenta, já que o cordão não é uma estrutura inervada ⁽⁵⁴⁾.

As AUHs consistem em três túnicas distintas, indicadas na figura 6 ^(59, 61):

1) O revestimento interno é denominado de túnica íntima e consta de uma camada única de células endoteliais cercada por fibras de colágeno ^(62, 63). Hoje sabe-se que desempenha uma grande importância no controle do tônus vascular, pelo fato da ação de uma variedade de vasodilatadores e vasoconstritores dependente de um endotélio intato ⁽⁶³⁾.

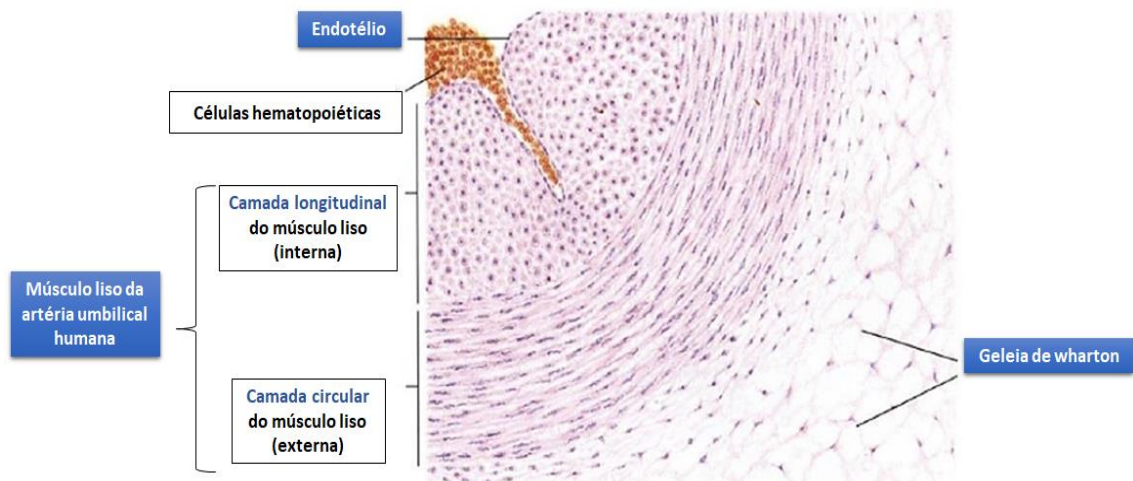


Figura 6. Imagem descritiva da constituição do tecido arterial umbilical humano (adaptado de ⁽⁶¹⁾).

2) A média é formada por células vasculares próprias do músculo liso dispostas circularmente numa camada mais externa e longitudinalmente mais interna. A disposição circular das células musculares lisas diferenciadas nesta túnica, permitem a acomodação estrutural e funcional da tensão exercida na parede arterial, aquando uma pressão relativamente alta. Esta tensão é mantida principalmente pelo tónus ativo da musculatura circular, porque há apenas uma pequena quantidade de tecido elástico na AUH que corresponde a camada disposta longitudinalmente. A camada mais externa é constituída por uma abundante substância amorfa pobre em fibras elásticas, mas muito plástica. Consequentemente, a tensão passiva elástica da parede arterial em comparação com a de outras artérias do mesmo calibre é provavelmente insignificante. A grande diferença morfológica entre as duas camadas da túnica média, deve-se ao fato de que mais externa, disposta circularmente é muito rica em miofilamentos ^(62, 64).

3) A túnica externa é composta por tecido conjuntivo mucoso e fibroblastos, chamado de geleia de Wharton, sendo envolvido por vasos nutricionais e rico em glicosaminoglicano ^(57, 59).

Assim sendo, as células vasculares musculares lisas especializadas, que residem dentro da camada média dos vasos sanguíneos são importantes para a manutenção do diâmetro vascular em resposta à pressão intraluminal e a vários estímulos hormonais e hemodinâmicos ⁽⁶⁵⁾. Deste modo, o uso destas células torna-se essencial para o estudo de vários processos de sinalização envolvidos no seu controle, como mecanismos envolvendo o cálcio (Ca^{2+}) e as diferentes vias envolvidas na modulação da reatividade vascular ⁽⁵⁹⁾.

1.4. Tecido muscular liso

A vida exige um fluxo e um refluxo constante de nutrientes e resíduos que vão permitir a homeostasia celular. Deste modo, as células vivas requerem um mecanismo pelo qual podem receber substratos metabólicos (ex. oxigénio, glicose, aminoácidos) e remover subprodutos do metabolismo (ex. dióxido de carbono, ácido láctico) ^(66, 67). A necessidade de troca de substratos e metabolitos, fez com que organismos mais complexos desenvolvessem um sistema sofisticado de vasos sanguíneos que transporta substâncias metabólicas entre as células e o sangue, chamado de sistema cardiovascular ⁽⁶⁶⁾.

O sistema cardiovascular é o primeiro sistema a ser formado durante o desenvolvimento intrauterino. Constituído por dois componentes primários, um órgão central, o coração, e um conjunto de vasos sanguíneos classificados em veias, vénulas, artérias, arteríolas e capilares ⁽⁶⁷⁾. Assim sendo, o músculo liso é a componente contrátil involuntária das artérias e veias, regulada por uma série de sinais extracelulares que induzem contração ou relaxamento vascular. O equilíbrio entre os sinais que induzem contração e os que provocam relaxamento, determinam o tónus vascular intrínseco do músculo liso. Por sua vez este equilíbrio, regula o calibre dinâmico do vaso, permitindo a regulação do fluxo sanguíneo ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾.

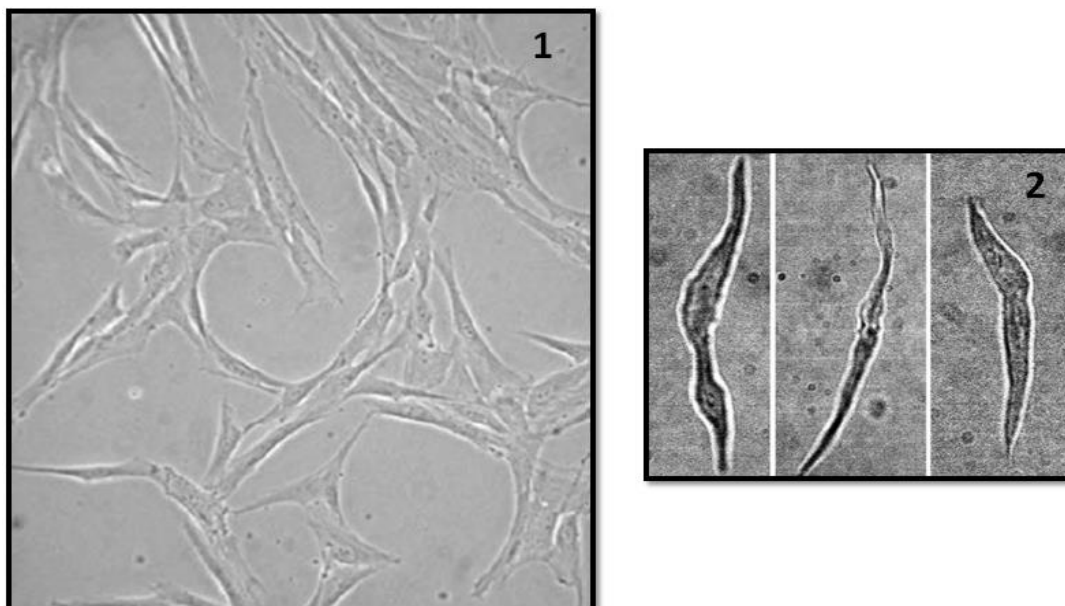


Figura 7. Imagens de culturas de células do músculo liso da artéria umbilical humana (adaptado de ⁽⁵⁹⁾).

O tecido muscular liso tem origem no mesênquima embrionário e é distribuído por todo o organismo na maioria dos vasos sanguíneos e sistema interno dos órgãos. Do ponto de vista morfológico é constituído por células musculares lisas do tipo fusiforme, contendo um núcleo e citoplasma eosinófilo de forma homogénea. O músculo liso é regulado normalmente

por fibras que são estimuladas pelo sistema nervoso autónomo (sistema nervoso simpático e parassimpático) ^(71, 72). Este músculo partilha um mecanismo contrátil semelhante ao que ocorre no músculo esquelético e cardíaco. De forma geral, as hormonas e os mediadores locais também desempenham um papel de grande importância no controlo da atividade contrátil (adrenalina, hormonas da medula supra-renal, ocitocina, serotonina, histamina e as prostaglandinas) ⁽⁶⁾.

1.4.1. Mecanismo contrátil base das células do músculo liso

As células do músculo liso vascular possuem miofilamentos de actina e miosina numa rede interlaçada no citoplasma, exceto na zona nuclear. Estes filamentos apresentam uma orientação longitudinal ou espiral, sem estarem organizados em sarcómeros. Eles resultam da mesma origem mesodérmica do músculo cardíaco e esquelético, contudo não apresentam qualquer aspeto estriado ⁽⁶⁾. Os feixes de actina estão ligados à membrana celular através dos corpos densos, chamado de desmina que corresponde a uma proteína intermediária específica do músculo liso ⁽⁷²⁾.

O mecanismo fundamental, referido como resposta miogénica ⁽⁷⁰⁾ é desencadeado quando as cadeias leves da miosina (MLC₂₀) são fosforiladas pela cinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Esta enzima é ativada pelo complexo Ca²⁺-calmodulina (Ca²⁺-CaM), permitindo a fosforilação da MLC₂₀ na serina 19 e provocando a sua ligação à actina, ⁽⁷²⁾ Deste modo, ocorre a formação de uma ponte cruzada entre filamentos de MLC₂₀ e actina ⁽⁶⁵⁾. Este processo acontece através da ativação de canais de Ca²⁺ e à libertação do mesmo pelas reservas intracelulares contidas no RS aumentando o teor da [Ca²⁺]_i ⁽⁷³⁾.

Ao contrário dos músculos cardíacos e esqueléticos a manutenção da tensão no músculo liso vascular é um fenómeno gradual. Deste modo, a tensão de contração dos vasos pode ser gerada e mantida ao longo de todo o seu comprimento com baixo custo de adenosina trifosfato (ATP), normalmente pela ação de um agonista ⁽⁶⁹⁾. Existe um mecanismo de sustentação chamado “*latch bridge*” que permite a formação de pontes cruzadas que permanecem presas sob tensão, mas sem ser fosforiladas. Estas pontes são consideradas de reciclagem lenta e consomem cerca de sete vezes menos ATP ^(69, 74). O mecanismo envolve um rápido aumento de consumo de oxigênio como resultado da hidrólise da ATP, numa fase inicial atinge um pico de contração, que retorna a níveis basais durante a fase sustentada de contração ⁽⁶⁸⁾. A contração sustentada e a fosforilação MLC₂₀ podem ser dependentes da RhoA e mediados por dois mensageiros PKC e Rho cinase. Esta cascata de sinalização é mediada geralmente pelos recetores membranares acoplados a proteína G, do tipo G_{qα} e G_{12/13}, envolvendo a fosforilação de CPI-17 (treonina 38) pela PKC e com a ajuda da cinase Rho, permite a fosforilação da MYPT1 (treonina 696), inibindo a MLCP, permitindo a contração sustentada (ver **figura 11**) ⁽⁷⁴⁾. As vias iniciadas pelos recetores acoplados a G_{i/o} envolvem a ativação sequencial de G_{Bγi}, a PI3-K, cinase ligada a integrina, e MLCK dependente e/ou

independente de Ca^{2+} . Também ocorre inibição do AC e posteriormente leva a diminuição de AMPc e diminuição da ativação da PKA inibindo a via de desfosforilação da MLC_{20} ⁽⁷⁵⁾.

As células do músculo liso vascular apresentam uma maior dependência de Ca^{2+} extracelular do que do RS para haver contração ^(68, 72). Contudo, a contração sustentada não reflete a sensibilização ao Ca^{2+} , porque a inibição da atividade da MLCP na ausência de Ca^{2+} induz a contração sustentada do músculo liso. Deste modo, considera-se que a fosforilação sustentada da MLC_{20} provavelmente é independente de Ca^{2+} ⁽⁷⁵⁾.

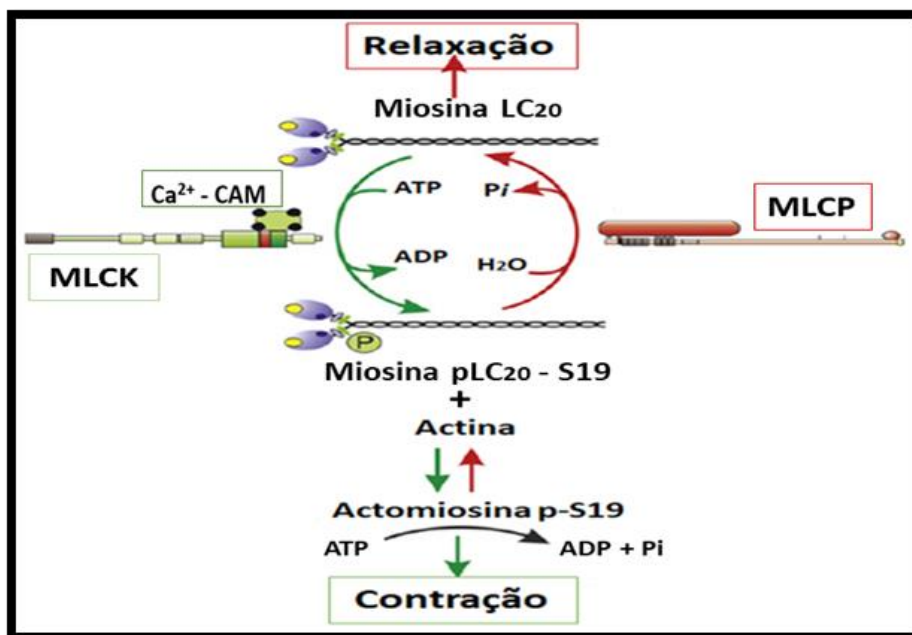


Figura 8. Imagem ilustrativa da regulação da contração do músculo liso através da fosforilação reversível - desfosforilação da MLC_{20} (adaptado de ⁽⁷⁰⁾).

Os eventos de sinalização que medeiam o relaxamento podem incluir a remoção de um agonista contrátil (relaxamento passivo) e/ou a ativação de caminhos de sinalização dependentes de nucleotídeos cíclicos como AMPc e GMPc, que ocorre na presença de um agonista vasorelaxante (relaxamento ativo) ⁽⁶⁸⁾. Posteriormente, as proteínas cinases A e G (PKA e PKG) que medeiam relaxamento, devido a atividade do adenilato e guanilato ciclase (AC e GC) estimulam a atividade das fosfodiesterases PDE3 e PDE4 específicas de AMPc, e PDE5 específica do GMPc. Estas cinases também atuam de modo a inibir contração inicial pela inibição da mobilização de Ca^{2+} e da contração sustentada pela inibição de RhoA e a sua restante via. Isso aumenta a atividade da MLCP e induz a desfosforilação MLC_{20} , provocando o relaxamento muscular ⁽⁷⁵⁾. De acordo com o que já foi referido, este processo requer uma diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico por diversos mecanismos que envolvem o Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), o Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA), o permutador do $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e proteínas citosólicas de ligação ao Ca^{2+} ⁽⁷⁶⁾. Além destes mecanismos, a inibição dos canais operados por voltagem e canais operados por recetores

localizados na membrana plasmática, ou mesmo a abertura de canais que estimulam a hiperpolarização celular também podem provocar relaxamento ⁽⁷³⁾. Outros agentes vasodilatadores envolvem a atividade MLCP que desfosforila a MLC₂₀, diminuindo a magnitude de contração devido ao MLCK, provocando relaxamento. De facto, o equilíbrio das atividades MLCK e MLCP, determinam o nível de fosforilação MLC₂₀ e a força gerada no estado estacionário ⁽⁷⁰⁾.

Problemas relacionados na regulação destes processos que controlam a atividade contrátil vascular, podem causar ou contribuir para o aparecimento de patologias cardiovasculares ⁽⁶⁹⁾, incluindo a pré-eclâmpsia desenvolvida durante a gravidez ⁽⁷⁷⁾.

1.4.2. Patologias da gravidez

No útero encontra-se presente uma população de mastócitos dependente da gravidez e do ciclo *oestrous*. Estes possuem a capacidade de libertar mediadores químicos como a serotonina (5-HT) e histamina, capazes de regular a contratilidade do músculo liso uterino ^(78, 79) e induzir contrações significativas nas células musculares lisas da AUH ⁽⁷⁷⁾.

No entanto, diversos autores descrevem que a pré-eclâmpsia está associada ao aumento dos níveis plasmáticos destes agentes contráteis na corrente sanguínea, e também com o aumento da sensibilidade dos respetivos recetores na AUH. Assim sendo, esta patologia é designada normalmente por um estado hipertenso durante a gestação, apresentando um aumento da resistência cardiovascular, que induz ao aumento da constrição vascular ^(77, 79-81). A hipertensão pode ser desencadeada durante a gravidez ou pode apresentar-se como uma condição já existente que é agravada durante o período gestacional. Contudo, é apenas uma condição ou sintoma desta patologia, característica do estado gestacional na espécie humana ⁽⁸²⁾.

A pré-eclâmpsia pode ser definida em três níveis. Numa fase inicial é associado a presença de trofoblasto. Associa-se a segunda fase a adaptação materna a invasão de trofoblasto endovascular e arterioesclerose aguda (disfunção das células endoteliais), incluindo os sinais de pré-eclâmpsia, hipertensão e proteinúria ⁽⁷⁹⁾. Em certas circunstâncias, pode se iniciar uma terceira fase (fase eclâmpsia) associada com a expressão de hemorragia cerebral, insuficiência renal e síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, plaquetas baixas) ⁽⁸⁰⁾.

Deste modo, a capacidade da 5-HT e da histamina na regulação do tónus muscular da AUH é essencial para o crescimento e desenvolvimento do feto, já que o cordão não é uma estrutura inervada como referido anteriormente. Isto faz com que estes dois reguladores desempenham um papel chave na contratilidade da AUH, já que medeiam a ativação de

diferentes tipos de recetores. Assim sendo, situações não fisiológicas podem interferir com as concentrações normais, perturbando a circulação umbilical ⁽⁷⁷⁾.

1.5. Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é uma monoamina biogénica ⁽⁷⁷⁾ encontrada numa variedade de organismos ⁽⁸³⁾. Ela foi descrita inicialmente em 1930 por Ersparmer e colegas que atribuíram o nome de “*enteramine*”. Contudo em 1940, foi redescoberta na circulação pelo grupo de Irvin Page sendo nomeada de acordo com sua fonte (sero-) e capacidade de modificar o tónus do músculo liso (-tonina) ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾.

No sistema cardiovascular a 5-HT é conhecida por causar vasoconstrição no geral, embora possa também causar vasodilatação periférica, proliferação de células musculares lisas e agregação de plaquetas ⁽⁸⁷⁾. Esta monoamina desempenha um grande papel na regulação do tónus vascular ⁽⁸⁸⁾, contudo, ela também desempenha funções importantes a nível do sistema nervoso central e periférico e, também à nível gastrointestinal ⁽⁸⁹⁾.

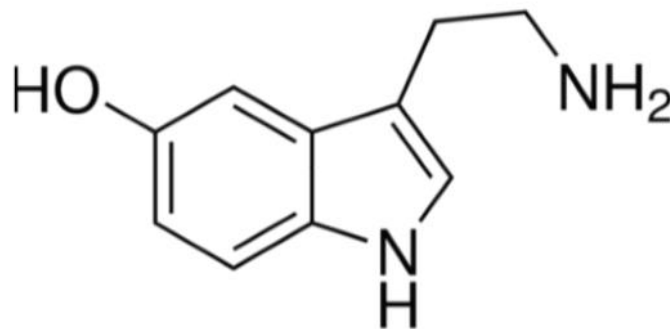


Figura 9. Imagem representativa da molécula de de 5-HT (in Sigma Aldrich).

A 5-HT pode ser obtida através da síntese (células enterocromafins dos intestinos) a partir do aminoácido essencial triptofano (catalisada pelo triptofano hidroxilase) ou pode ser absorvida pelo transportador SERT e ser armazenada em grânulos no interior das células ^(85, 88, 90).

A AUH apresenta uma alta sensibilidade a 5-HT, tendo sido sugerido que a sua libertação exacerbada, possa reduzir ou interromper o fornecimento de sangue, levando a um retardamento do crescimento do feto ou mesmo ao aborto ⁽⁹¹⁾. Assim sendo, como foi referido anteriormente, a pré-eclâmpsia está associada ao aumento da libertação de 5-HT ⁽⁷⁷⁾.

De um modo geral considera-se que a 5-HT pode estar relacionada com várias patologias cardiovasculares, como vasoespasmo, trombose, aterosclerose e hipertensão ⁽⁸⁷⁾. Por outro lado, é conhecido que a 5-HT desempenha papeis importantes no controle de muitas funções vitais devido a existência de uma ampla variedade de recetores ^(83, 85, 92).

1.5.1. Recetores de serotonina

A 5-HT pode ativar uma variedade de recetores classificados de acordo com as suas características estruturais, transduccionais e operacionais, em sete classes distintas: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e o 5-HT₇ (89). Atualmente, sabe-se que existem nos mamíferos 14 subtipos destes recetores. De entre estes, 13 são acoplados a proteína G da família do tipo A, com a exceção do 5-HT₃ que é o único que possui uma combinação de canais iónicos da família Cys-loop (84, 92, 93) (representação dos mecanismos dos subtipos dos recetores acoplados a proteína G indicado na figura 10) (89). A importância fisiológica do sistema de 5-HT é apoiada pela grande diversidade e complexidade dado o número de elementos envolvidos, incluindo a multiplicidade de recetores (diversidade de subtipos), transportadores e enzimas metabolizadoras (84).

Nos vasos sanguíneos destacam-se 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄, e 5-HT₇, ainda que o RNA mensageiro (mRNA) dos recetores 5-HT_{2B} e 5-HT₄ terem sido encontrados apenas em células endoteliais humanas (90). Uma variedade de estudos afirma que a atividade contrátil do músculo liso arterial umbilical é induzida principalmente por 5-HT₁ e 5-HT_{2A} (94), sendo que outros estudos demonstraram evidências da expressão do 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2A} (77, 95) e 5-HT₇ (77).

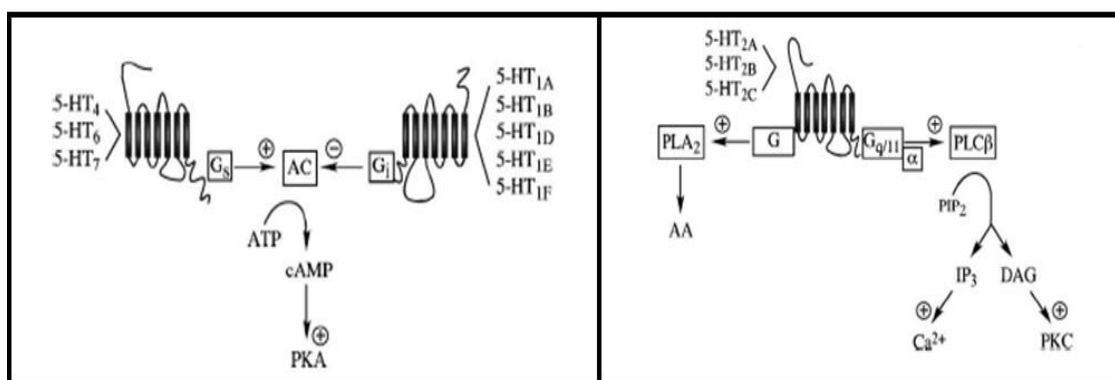


Figura 10. Classificação dos recetores acoplados a proteína G do sistema serotoninérgico (adaptado *in* (89)).

Recetor 5-HT_{1B/1D}

A classe 5-HT₁ abrange cinco subtipos de recetores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F} (92). Os recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} estão acoplados à proteína G_{i/o}, inibindo a AC e reduzindo os níveis de AMPc, assim como a restante família 5-HT₁. Estes dois subtipos embora não sejam idênticos são farmacologicamente semelhantes o que faz com que seja difícil a distinção entre eles (77). A principal diferença que os permite distinguir é que os antagonistas dos recetores β-adrenérgicos se ligam com elevada afinidade ao recetor 5-HT_{1B}, mas não ao 5-HT_{1D} (96), embora isto não ocorra em todas as espécies (93). Deste modo, devido às semelhanças

os recetores são geralmente referidos na literatura com uma terminologia acoplada ou única designada como 5-HT_{1B/1D}.

De forma geral, os recetores 5-HT_{1B/1D} foram descritos com a capacidade de mediar contrações na AUH, artérias coronárias e mamárias ⁽⁹⁴⁾ com o mecanismo G_{i/o}, contudo na artéria renal de coelho, envolve a interação de várias vias de sinalização intracelular sendo os intermediários da via, a cinase fosfatidilinositol-3 (PI3K) e a cinase ativada por mitogénio (MAPK) ⁽⁹⁷⁾.

Alguns estudos demonstraram a ativação de recetores 5-HT_{1B/1D} pelo sumatriptano (agonista seletivo) nas artérias humanas coronárias e mamárias provoca contrações pobres ou não provoca contração, quando aplicado sozinho. No entanto, este agonista consegue reforçar as contrações induzidas por outros agentes vasoativos ⁽⁹⁴⁾. Este fenómeno tem sido relacionado ao aumento da mobilização de Ca²⁺ intracelular, como resultado da ativação inicial desencadeada por um outro vasoconstritor ^(98, 99). Por outro lado, foi descrito que existe uma grande variabilidade de expressão genética entre indivíduos. Na AUH, este fato leva a existência de diferentes tipos de sensibilidade a um agonista específico L694,297 (L69), podendo haver artérias com atividade contrátil induzida pelo L69 elevada (tensão real >1000mg), baixa (tensão real >200 <300mg), e média (aproximadamente 500mg). Assim sendo, estes dados sugerem que estes recetores podem participar no efeito contrátil 5-HT, mas com uma ampla variação na resposta nas AUH ⁽⁷⁷⁾.

Por outro lado, o GR 127935 consegue antagonizar as contrações provocadas pela 5-HT provando ser um antagonista seletivo do recetor 5-HT_{1B/1D} ⁽⁹⁷⁾.

Recetor 5-HT_{2A}

A classe dos recetores 5-HT₂ é constituída por 3 subtipos: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, pela qual podem ser encontrados na área mesolímbica do cérebro, no tecido muscular liso e nas plaquetas. A sua principal função é ativar o turnover de fosfato inositol, através da ativação da fosfolipase C (PLC) e síntese de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) ^(77, 100). Consequentemente, o IP₃ desencadeia a libertação de Ca²⁺ pelo RS produzindo um aumento intracelular livre de Ca²⁺ que ativa a MLCK dependente do complexo Ca²⁺-CAM. A fosforilação subsequente da MLC₂₀ ativa uma ATPase que permite a formação da ligação actina-miosina, resultando na fase inicial de contração muscular. É sugerido que este mecanismo possa ser prejudicado pela formação de AMPc estimulando o efluxo de Ca²⁺, diminuindo a [Ca²⁺]_i ⁽¹⁰¹⁾.

A ativação deste recetor pela 5-HT e pelos seus agonistas, mediam contrações das células do músculo liso da AUH, ⁽⁹⁴⁾ estômago proximal do porco ⁽¹⁰²⁾, cão, ⁽¹⁰³⁾ assim como de bexiga de coelho, gato, cão e de origem humana, sendo uma exceção para a bexiga de rato ⁽¹⁰⁴⁾.

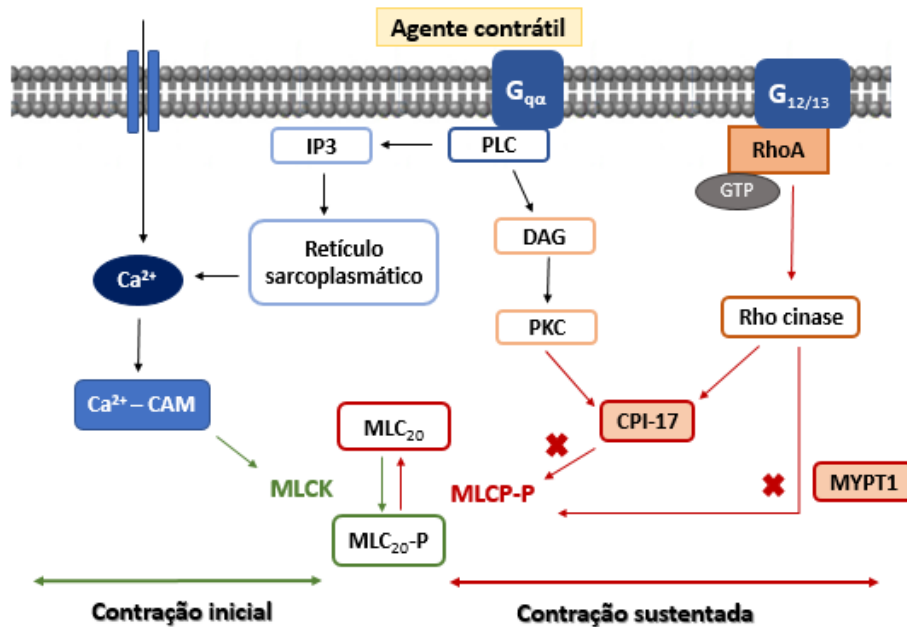


Figura 11. Regulação da contração do músculo liso pela ativação do recetor acoplado a proteína $G_{q\alpha}$ (adaptado *in* ^(70, 73, 101)).

O recetor 5-HT_{2A} , desempenha um papel importante na regulação do tónus das células musculares lisas através do mecanismo $G_{q\alpha}$ ⁽⁷⁷⁾ que ativa a MLCK e mantém a contração sustentada do músculo liso com a ajuda da Rho cinase que fosforila a MYPT1 na treonina 696 e o CPI-17 na treonina 38 (também com a ajuda da PKC) inibindo a MLCP (ver figura 11) ^{(73) (74)}. Contudo estudos gerais em células musculares lisas demonstraram que, a ativação deste recetor provoca proliferação e migração celular através da via de ativação de cinase ERK ⁽⁸⁷⁾, podendo também ativar canais de Ca^{2+} ⁽¹⁰⁵⁾. Um estudo feito pelo Takuji Machida *et al.* afirmaram que ativação de PKC e MAPK pela 5-HT_{2A} , são essenciais para a expressão completa da via COX-2, podendo desempenhar um papel importante na progressão e/ou proteção da lesão vascular local associada a trombose, aterosclerose e hipertensão arterial. ⁽⁸⁷⁾ Contudo, outro estudo apontou que o aumento de 5-HT e os inibidores da recaptção da serotonina (SSRI) aumentam a resistência pulmonar vascular (RPV) em um modelo de ovino recém-nascido com hipertensão pulmonar. Estes autores também demonstraram que o bloqueio da 5-HT_{2A} nesta situação diminui o RPV neste modelo ⁽⁸²⁾.

O α -metil-5-Hidroxitriptamina (α -CH₃-5-HT; AMHT) é considerado um agonista contrátil com alta afinidade para o recetor de 5-HT₂ (106) que provoca contração das células musculares da AUH (94). Por outro lado, a ketanserina é um antagonista seletivo deste recetor com efeitos vasculares opostos aos dos agonistas (77, 90).

Recetor 5-HT₇

O recetor 5-HT₇, medeia a inibição da contratilidade no músculo periférico vascular e não vascular de várias espécies de mamíferos (107), particularmente em camadas do músculo liso circular e no plexo mioentérico (108). Foi indicado a existência de uma diversidade de isoformas deste recetor, contudo dependente das espécies (107). O pre-mRNA do recetor pode sofrer *splicing* alternativo em tecido de rato para produzir três isoformas 5-HT_{7a}, 5-HT_{7b} e 5-HT_{7c}. Estas isoformas diferem entre si pela sequência de aminoácidos nas cadeias terminais com grupo carboxilo (109).

No geral, o 5-HT₇ está envolvido na inibição da contratilidade do músculo liso de intestino de equino (108), íleo de porco (110), colón humano (41, 111), estômago proximal de cão (103), e artérias pulmonares de porco (77). Esta resposta inibitória é devido ao aumento de AMPc intracelular através da ativação de AC, funcionalmente acoplada a proteína G_s, podendo estar associada a ativação da ERK (77, 78, 110), assim como algumas fosfodiesterases (PD3 e PD4) (75)

Um dos agonistas seletivos deste recetor é a 5-carboxamidotriptina (5-CT) (112), que é um potente vasodilatador do músculo liso, assim como o AS19 (77). Entre os antagonistas, está por exemplo o SB-269970, que consegue aumentar a amplitude das contrações espontâneas em na maioria do trato gastrointestinal (42, 108).

1.6. Histamina

A histamina ou aminoetilimidazol é um mediador químico que foi detetado pela primeira vez como estimulante uterino (113). Ela é uma amina de baixo peso molecular podendo ser libertada pelas células enterocromafins, pela mucosa gástrica, mastócitos, basófilos e células parietais (114). Deste modo, este mediador participa em várias respostas desde imunológicas mediadas por mastócitos, tais como alergia e inflamação, regula a secreção de ácido gástrico, a neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC) e desempenha uma grande importância no sistema cardiovascular. E assim, como a 5-HT, ela também atua como uma potente monoamina vasoativa, derivada da histidina, graças a ação da enzima histidina descarboxilase (77, 113, 115, 116).

Alguns autores relatam que a administração intravenosa de histamina causa uma queda na resistência vascular periférica e uma diminuição da pressão arterial sistêmica (116). Outros estudos demonstraram que pode apresentar duas ações diferentes e opostas, podendo

exercer tantos efeitos contráteis, como vasodilatadores ^(77, 115, 117). Além disso, também é possível ocorrer uma combinação destas duas respostas, considerada uma resposta bifásica ⁽¹¹⁷⁾. Geralmente, considera-se que ela induz a contração de vasos maiores e a dilatação de pequenos vasos. Mas na realidade, existem diferenças consideráveis de respostas dependendo das espécies. Por outro lado, a resposta vasorelaxante pode ser dependente ou independente do endotélio ^(115, 116).

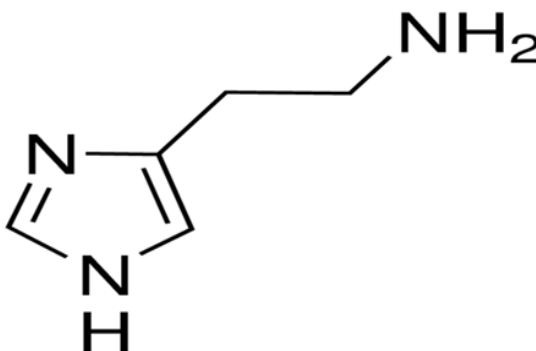


Figura 12. Imagem representativa da molécula de histamina (imagem da *Sigma Aldrich*).

Deste modo, há um conjunto de fatores que podem condicionar as características funcionais da resposta à histamina no sistema vascular, sendo um destes fatores, dependente dos tipos de recetores existentes e da sua localização podem condicionar o seu efeito ^(77, 118).

1.6.1. Recetores de Histamina

A resposta fisiológica da histamina é mediada por quatro classes distintas de recetores histamínicos o H₁, H₂, H₃ e H₄. Sendo os quatro recetores membranares acoplados a proteína G ^(77, 114, 115, 119).

Na literatura o recetor H₁ é acoplado a proteína G_{qα}, causando a mobilização de Ca²⁺ intracelular, o que resulta numa vasoconstrição. Enquanto, a H₂ ativa o mecanismo G_s causando acumulação de AMPc através da atividade da AC. Para o recetor H₃, ele é descrito como um modulador da síntese e libertação de histamina no SNC, portanto, funciona principalmente como um modulador da neurotransmissão. Ele pode ser positivamente acoplado a G_{i/o} apesar do sinal intracelular da via de transdução iniciada pela ativação deste recetor continua em debate. Referente ao recetor H₄ possui uma expressão limitada, sendo expressos em células hematopoiéticas e encontram-se envolvidas na resposta imunitária. É considerado funcionalmente acoplado a proteína G_{i/o}, causando quer mobilização de Ca²⁺ intracelular ou inibição da atividade da AC ^(77, 113).

O efeito vascular deve-se principalmente à participação diferencial dos recetores H₁ e H₂, desempenhando um papel importante na atividade contrátil dos vasos ⁽¹¹⁵⁾. Estudos

indicam que estes estão distribuídos pelos vasos de resistência na maioria dos leitos vasculares e que encontram-se mais concentrados no músculo liso do que no endotélio ⁽¹¹³⁾, no entanto é dependente da espécie ⁽¹²⁰⁾. Assim sendo, desempenham um papel de grande importância no sistema cardiovascular, o que implica dizer que qualquer alteração nas respostas vasculares a histamina pode associar-se a doenças cardiovasculares como a hipertensão e a pré-eclâmpsia ⁽¹¹³⁾.

Recetor H₁

O recetor H₁, presente em vários tecidos como o cérebro, músculo liso intestinal e vascular, está associado com a formação de IP₃ e DAG catalisada pela ativação da PLC. A ativação funcional deste recetor induz a síntese destas moléculas através da via de ativação da proteína G_{qα}. Normalmente, o mecanismo induz a vasoconstrição por uma ação a nível das células do músculo liso ⁽¹²¹⁾. Em mamíferos, após a ativação deste recetor em células musculares lisas, ocorre a hidrólise do fosfolípido de membrana plasmática (IP₂) através da PLC, produzindo dois segundos mensageiros IP₃ e DAG, ocorrendo uma sequência de eventos que iniciam a contração e que permitem a sua sustentação, como referido na figura 11 anteriormente ⁽¹⁰¹⁾.

Outro fato importante, deve-se a sua localização em células endoteliais e sua estimulação leva à formação de Óxido Nítrico (NO) que é um mediador de vasodilatação derivado do endotélio. A figura 13 descreve este mecanismo, o NO difunde a partir células endoteliais em direção às células do músculo liso vascular e ativa a enzima GC, o que aumenta o nível de GMPc, e de PKG conduzindo ao relaxamento do músculo liso vascular. Estes eventos resultam na diminuição dos níveis de Ca²⁺ e com a abertura de canais de potássio (K⁺) induzindo a diminuição da [K⁺]_i ^(113, 114).

Deste modo, foi demonstrado que o H₁ pode participar na produção da resposta contrátil ou vasodilatadora. Por um lado, em muitos estudos *in vitro* a histamina pode causar vasoconstrição pela via do recetor H₁ (constrição direta), enquanto nos estudos *in vivo*, o mediador químico também pode provocar vasodilatação em vasos de resistência periférica dependente de endotélio (vasodilatador indireto) ^(116, 118). Contudo, é sugerido também que a vasoconstrição e a vasodilatação independente do endotélio podem ser mediadas pelo recetor H₁ e indiretamente através dos nervos perivasculares do sistema nervoso simpático. É sugerido também a possibilidade de que a histamina atue sobre nervos perivasculares, ou possui a capacidade de excitar um subgrupo de fibras não mielinizadas sensíveis à capsaicina, podendo causar diferentes respostas vasculares ^(116, 119, 122).

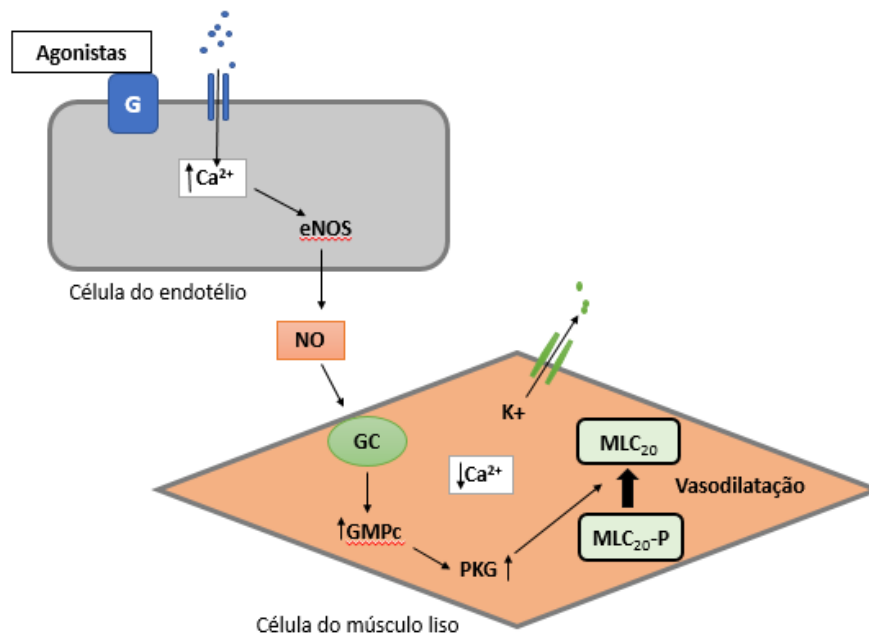


Figura 13. Imagem ilustrativa da vasodilatação indireta desencadeada pelo NO sintetizado no endotélio com ação no tecido muscular vascular (adaptado de ^(113, 114)).

A *betahistine* é um dos agonistas do recetor H_1 , demonstrando a capacidade de estimular a contratilidade do músculo liso arterial pela ativação seletiva deste recetor ⁽⁷⁷⁾. Como bloqueador, a *diphenhydramine* demonstrou antagonizar os efeitos contráteis vasculares desencadeados pela ativação do recetor H_1 ⁽¹¹⁸⁾.

Recetor H_2

O recetor H_2 é acoplado ao sistema AC do mecanismo G_s e podendo ser localizado em vários tipos de tecidos ou órgãos como, cérebro, estômago, pulmão, coração, artérias revestidas com células do músculo liso. Os efeitos vasodilatadores produzidos pela sua ativação são mediados pelo AMPc, e são independentes do endotélio ^(113, 114, 117, 121). Estudos *in vivo* comprovam que ativação do recetor H_2 induzida pela histamina, provoca vasodilatação em vasos de resistência periférica ⁽¹¹⁸⁾, podendo provocar a diminuição ou queda da resistência vascular e uma diminuição da pressão sanguínea sistémica (e também pelo recetor H_1 dependente de endotélio) ⁽¹¹⁶⁾.

Na maioria dos estudos *in vitro* foi demonstrado realmente que a vasodilatação é independente do endotélio e pelo mecanismo G_s ⁽¹¹⁸⁾ Embora alguns autores como Chiba *et al.* tenham demonstrado que os recetores H_2 localizados nas artérias carótidas de rato, indicam que o este recetor também medeia a vasodilatação dependente do endotélio através da síntese de EDRF ⁽¹²³⁾ Contudo outros autores sugerem que este recetor medeia a reversão do tónus miogénico mediada pela histamina em artérias cerebrais de ratos em condições independentes do endotélio, mas sem o envolvimento de AC, ou seja, sem a ação do AMPc.

Eles sugerem que na maioria, a ativação do recetor H_2 envolve a ativação de canais de K^+ . Contudo, ainda os eventos de sinalização celular que ativam os canais de K^+ pela ativação do recetor H_2 , acoplada a proteína G não estão esclarecidos ⁽¹¹⁷⁾.

A ranitidina, é considerada um bloqueador dos recetores H_2 , com a capacidade de inibir o relaxamento do tónus vascular induzido pela histamina ⁽¹¹⁴⁾. Como agonista, o dimaprit (DMP) demonstra induzir o vasorelaxamento do músculo liso pela ativação específica do recetor ^(77, 123).

Capítulo II - Objetivos

O tributilestanho (TBT) é um composto organoestanho (OT) com propriedades de disruptor endócrino (EDC) e prejudicial a homeostasia do sistema hormonal. Este disruptor é extremamente tóxico e possui grande poder de bioacumulação e biomagnificação em vários ecossistemas. Deste modo, o TBT está presente na cadeia alimentar de várias espécies, destacando o ser humano no topo da cadeia alimentar sujeito a concentrações mais elevadas.

A toxicidade do TBT tem demonstrado como fator de risco cardiovascular. Recentemente, um estudo realizado pelo grupo analisou os possíveis efeitos deste poluente a curto e a longo prazo. A curto prazo, os dados referentes a essa investigação demonstraram que o TBT possui propriedades vasorelaxantes dependente da sua concentração, na presença de contrações desencadeadas pela histamina e pelo cloreto de potássio na artéria umbilical humana (AUH). A análise dos efeitos genômicos do TBT, mostrou que os níveis de expressão de dois recetores encontram-se reduzidos para o recetor 5-HT_{2A} e H₁.

Neste sentido, **objetivo principal** desta dissertação consiste no estudo dos efeitos a longo prazo do TBT na atividade contrátil do músculo liso das AUHs, pela ativação dos recetores de 5-HT e de histamina. Para avaliação do estudo, utilizou-se a técnica banho de órgãos de modo analisar a resposta contrátil arterial a diferentes agonistas dos recetores, após incubação de 24h com diferentes concentrações de TBT.

Capítulo III - Materiais e Métodos

3.1. Amostra biológica - Cordão umbilical humano

O estudo da contratilidade dos recetores de serotonina (5-HT) e histamina do músculo liso da AUH baseou-se na recolha de pedaços de 3 a 7cm de cordões umbilicais de origem humana, por via vaginal, sem patologia. Estas amostras biológicas foram recolhidas pelas enfermeiras do Bloco de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB) Covilhã. Os procedimentos efetuados nestas amostras do estudo estão aprovados de acordo com o comité de ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira EPE.

De modo a evitar a degradação e contaminação dos pedaços de cordões, estes foram recolhidos e conservados na solução salina fisiológica estéril PSS, contendo antimicótico e antiproteases. Posteriormente, mantidas à temperatura de 4°C por um período de 4-24h no máximo antes da sua utilização.

Tabela 1. Composição da solução fisiológica PSS diluído (pH 7,4) e compostos adjuvantes para evitar a contaminação e degradação do cordão umbilical humano.

PSS	Antibióticos e antimicóticos	Antiproteases
NaCl 110mM CaCl ₂ 0,15mM KCl 5mM MgCl ₂ 2mM HEPES 10mM NaHCO ₃ 10mM KH ₂ PO ₄ 0,5mM NaH ₂ PO ₄ 0,5mM Glucose 10mM EDTA 0,49mM	Penicilina (5U/mL), Estreptomicina (5 µg/mL) Anfotericina B (12,5 ng/mL)	Leupeptina 0,45 mg/L Benzamidina 26 mg/L Inibidor de tripsina 10 mg/L

3.2. Estudo de contratilidade arterial

3.2.1. Preparação e extração das artérias do cordão umbilical

O cordão foi inicialmente limpo na solução fisiológica salina PSS. As artérias foram isoladas do resto dos componentes do cordão umbilical, removendo a geleia de Wharton e a veia, numa placa de *petri* contendo PSS. Posteriormente, deixou-se por um período de 3 a 12h num tubo de *falcon* contendo 10 ml de PSS à uma temperatura de 4°C. Com o intuito de promover o vasorelaxamento das mesmas após o isolamento. Consequentemente, utilizou-se uma placa de *petri* com PSS para proceder a extração do endotélio, a partir de uma agulha e um fio de linha de algodão, deixando exposto a túnica média, correspondente ao músculo

liso. Com a recolha de pequenos anéis de artéria do cordão umbilical sem endotélio fez-se incubações por um período de 24h, para a obtenção de dois grupos controlo, um controlo e outro com 0,01% de solvente etanol (EtOH). O estudo do efeito do TBT a longo prazo baseou se na obtenção de incubações com diferentes concentrações de TBT 0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM em 10mL de DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium), à temperatura de 0-4°C, após 24h. Posteriormente, procedeu-se ao estudo contrátil das mesmas.

Tabela 2. Composição do meio DMEM-F12 (pH 7,4).

Solução	Composição
DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium)	DMEM-F12 liofilizado NaHCO ₃ (1,2 g/L) Ácido L-ascórbico (20 mg/L)

3.2.2 Estudo de contratilidade arterial

Após às 24h de incubação, foi analisado a capacidade contrátil dos anéis de AUH para os diferentes grupos do estudo. Estes foram montados na câmara de banho de órgãos (LE01.004, Leticia) através de pequenos ganchos de aço inoxidável que permite o suporte dos anéis e consequentemente com outros auxílios complementares, permitiram detetar as diferenças de tensão que poderão ser sujeitas. Foram submergidos na solução fisiológica Krebs à temperatura de 37°C, continuamente em contato com carbogénio (95% O₂ e 5% CO₂). Inicialmente foram estimuladas a terem uma tensão entre 1,5 - 2g através de períodos de lavagem da solução fisiológica de 15 - 15mn durante 45mn, de modo definirem uma tensão basal.

Para avaliar a contratilidade dos anéis de AUH foram utilizados diferentes agentes contráteis, iniciando-se com 1µM de 5-HT para o estudo da viabilidade das artérias, de seguida por 1µM de L694,297 (L69; agonista do recetor 5-HT_{1B/1D}), por 1µM de α-metil-5-HT (AMHT; agonista do recetor 5-HT_{2A}), por 10µM histamina, e por 1mM de betahistine (BHI; agonista do recetor H₁). Durante o estudo também foram utilizados dois agentes vasorelaxantes como o AS19 (1µM; agonista do recetor 5-HT₇) e o dimaprit (100µM de DMP; agonista do recetor H₂).

Para cada agente vasoativo utilizado, há a necessidade de repetir os períodos de lavagem com a solução fisiológica Krebs de 15 - 15mn durante 45mn. Este passo permite as artérias voltarem a relaxar e seestabilizarem a uma tensão basal, de modo a não haver interferências para o próximo agente contrátil e/ou vasorelaxante.

Tabela 3. Composição da solução fisiológica Krebs (pH 7,4).

Composição da Solução Krebs	
Componente	Concentração
NaCl	119Mm
KCl	5.0mM
NaHCO ₃	25mM
KH ₂ PO ₄	1.2mM
CaCl ₂	0.5mM
MgSO ₄	1.2mM
EDTA	0.03mM
Glucose	11Mm

Os dados da tensão, real em gramas (g) foram obtidos a partir dos materiais e equipamentos descritos na tabela:

Tabela 4. Descrição dos materiais e equipamentos utilizados durante a realização do estudo, com as suas respetivas marcas.

Material e Equipamento	Marca
Material cirúrgico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless Material específico de laboratório
Material específico de laboratório	-
Camara de banho de órgãos	Letica
Transdutor de força isométrica	TRI201, Panlab SA, Spain
Amplificador	músculo liso118/D Quad Bridge, ADInstruments
Interface PowerLab/4SP	ML750, ADInstruments
Software específico do banho de órgãos	Chart5PowerLab, ADInstruments

3.3. Químicos

Para a realização deste projeto laboratorial utilizou-se o cloreto de tributilestanho (TBTCI; 96%) e os seguintes agentes contráteis indicados na tabela 5.

Tabela 5. Químicos utilizados na realização do procedimento laboratorial.

Agentes contráteis	Marca
TBTCl (96%)	Sigma-Aldrich
Serotonina	
Histamina	
L694,297	
α -metyl-5-HT	
Betahistine	
AS19	Tocris
Dimaprit	

3.4. Análise estatística

Os resultados obtidos durante o estudo foram expressos em forma de médias \pm erro padrão, 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 duas situações diferentes na mesma condição de amostra foi analisada usando o *Student's t-test*. Enquanto, a significância estatística referente a diferentes condições de concentração de TBT mais o controlo, utilizou-se uma *One-Way ANOVA*. As diferenças entre os diferentes grupos foram consideradas significativas quando ($P < 0,05$).

Capítulo IV - Resultados

Para a realização desta dissertação utilizaram-se 25 cordões umbilicais humanos, procedentes de gestantes sem patologias ou condições que poderiam colocar em causa a fidelidade do estudo.

4.1. Análise do efeito a longo prazo do TBT na atividade contrátil da AUH provocada pela ativação de recetores de 5-HT

Inicialmente, os anéis da AUH foram sujeitos a remoção do endotélio e incubados durante 24 horas para obtenção de três grupos distintos, um grupo controlo, um grupo com o solvente etanol (0,01% de EtOH) e outro constituído por diferentes concentrações de TBT (0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM). Posteriormente, foi analisada a atividade contrátil dos anéis pela ativação dos recetores de 5-HT, por diferentes agentes contráteis: 5-HT, L69 (agonista do recetor 5-HT_{1B/1D}) e AMHT (agonista do recetor 5-HT_{2A}). Sendo que, os anéis contraídos com AMHT foram posteriormente submetidos ao agente vasorelaxante AS19, agonista do recetor 5-HT₇. A análise da contratilidade dos recetores 5-HT baseou-se na utilização da técnica banho de órgãos

Em todos os casos, os anéis de AUH foram primeiramente contraídos pela 5-HT (1µM) com o intuito de testar a viabilidade dos anéis. Deste modo, as artérias submetidas a 5-HT cuja contratilidade não superasse 900 mg foram excluídos do estudo.

4.1.1. Efeito do solvente na atividade contrátil da AUH desencadeada pela ativação de recetores de 5-HT

Para cada artéria, foi analisado se a incubação com o solvente (EtOH) tinha influência sobre a contratilidade arterial. Assim, mediram-se as tensões provocadas pelos diferentes agonistas, 5-HT (1µM), L69 (1µM), AMHT (1µM) e AS19 (1µM) em anéis incubados com EtOH e em anéis controlo. Desta forma, analisou-se a possibilidade de alguma interferência deste solvente ^(124, 125).

Os resultados obtidos demonstraram não existir qualquer diferença estatisticamente significativa entre a contratilidade obtida em ambos os grupos controlo e solvente EtOH, independentemente do agonista utilizado. Também não houve diferenças significativas no efeito relaxante do AS19 (dados não apresentados). Assim, do mesmo modo como já tinha sido demonstrado por estudos prévios, o EtOH a 0,01% não exerce nenhum tipo de efeito ^(126, 127).

4.1.2. Efeito do TBT a longo prazo na atividade contrátil desencadeada pela ativação de recetores de 5-HT na AUH

Para cada artéria, foi analisado se a incubação com diferentes concentrações de TBT tinha influência sobre a resposta contrátil dos anéis, após ativação de recetores de 5-HT. Assim, analisaram-se as tensões provocadas pelos diferentes agonistas, 5-HT (1 μ M), L69 (1 μ M), e AMHT (1 μ M) e analisaram a percentagem de relaxação provocada pela a AS19 (1 μ M), em anéis incubados com TBT (0,1nM, 1nM, 0,1 μ M e 100 μ M) e em anéis controlo. Desta forma, analisou-se as possíveis alterações deste xenobiótico na função contrátil do músculo liso da AUH, desencadeada pela ativação dos recetores 5-HT.

Efeito da incubação com TBT na contratilidade da AUH induzida pela 5-HT

As artérias contraídas com 5-HT após incubação de 24h com 0,1nM de TBT, possuíram uma atividade contrátil diminuída quando comparadas com a condição controlo. Neste sentido, 39,2% das artérias contraíram entre os 500 e 900mg e 15,7% abaixo de 500mg, enquanto que 45,1% contraíram acima dos 900mg.

Tabela 6. Efeito contrátil induzido pela 5-HT nos anéis de AUH em percentagem (%) após incubação de 24h com as seguintes concentrações de TBT 0,1nM, 1nM, 0,1 μ M e 100 μ M.

Incubação	<500mg	>500mg e <900mg	>900mg	Nº total de experiências
Controlo	0 % (0)	6,7% (4)	93,3% (56)	60
TBT 0,1nM	15,7% (8)	39,2% (20)	45,1% (23)	51
TBT 1nM	15,8% (3)	15,8% (3)	68,4% (13)	19
TBT 0,1 μ M	23,1% (6)	53,8% (14)	23,1% (6)	26
TBT 100 μ M	32,6% (14)	41,8% (18)	25,6% (11)	43

Em relação as artérias incubadas com TBT 1nM, como podemos observar na tabela 6, 68,4% dos anéis contraíram acima de 900mg. Os dados obtidos com estas artérias incubadas com 1nM TBT demonstram uma atividade funcional menos diferente da obtida com as artérias controlo, apesar de que 31,6% de artérias contraíram abaixo de 900mg, quando no controlo há apenas 6,7% que contraíram abaixo deste valor.

Para a incubação com 0,1 μ M de TBT, apenas 23,1% dos anéis contraíram acima de 900mg e 23,1% contraíram por valores inferiores a 500mg. Ou seja, 76,9% das artérias incubadas com esta concentração apresentaram atividade contrátil reduzida abaixo de 900mg.

Relativamente ao TBT 100 μ M, 25,6% das artérias contraíram acima de 900mg. A maior parte dos anéis incubados apresentaram 41,8% da atividade contrátil atingida entre 500mg e 900mg, enquanto 32,6% apresentaram uma capacidade contrátil inferior a 500mg. Deste modo, estes dois valores mostram que 74,4% dos anéis apresentaram uma atividade contrátil menor a 900mg de tensão.

Em suma, os resultados demonstram que incubação de 1nM não é consistente com as outras incubações, pelo fato de ser a concentração com resultados mais semelhantes comparativamente ao grupo controlo. Contudo, de um modo geral o aumento da concentração de TBT provocou um aumento de artérias que diminuíram a sua atividade contrátil.

Efeito da incubação com TBT na contratilidade da AUH induzida pela 5-HT e pelos agonistas dos recetores 5-HT_{1B/1D} e 5-HT_{2A}

Em relação à análise da capacidade contrátil nas artérias controlo, podemos observar no gráfico referente a figura 14, que a contração média induzida pela 5-HT é semelhante à obtida pelo AMHT.

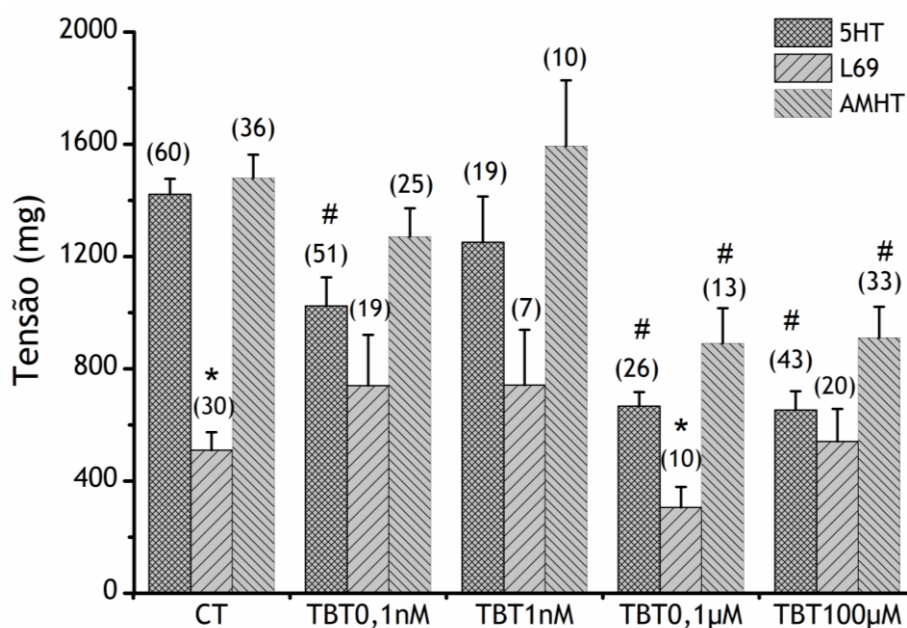


Figura 14. Efeito do TBT na contração da AUH induzida pela 5-HT e seus agonistas L69 e AMHT. O efeito contrátil (mg) induzido pela 5-HT (1 μ M), L69 (agonista do recetor 5-HT_{1B/1D}; 1 μ M) e AMHT (agonista do recetor 5-HT_{2A}; 1 μ M), após 24h de incubação com TBT (0,1nM, 1nM, 0,1 μ M e 100 μ M) e controlo (CT). As barras representam as médias \pm erro padrão, associado ao número de experiências indicado próximo as barras. *versus contração obtida pela 5-HT e pela AMHT (P <0.05, One-way ANOVA com teste post hoc Dunn) # versus controlo (P <0.05, One-way ANOVA com teste post hoc Dunn).

Relativamente às artérias incubadas com TBT, verifica-se uma diminuição significativa da capacidade contrátil provocada pela 5-HT para as duas concentrações mais elevadas de TBT (0,1 μ M e 100 μ M) e para a concentração mais baixa (TBT 0,1nM).

As contrações induzidas pelo L69 (agonista do recetor 5-HT_{1B/1D}) nas artérias controlo são significativamente menores que as induzidas pela 5-HT e pela AMHT. Esta diferença mantém-se para as artérias incubadas com TBT 0,1 μ M. Enquanto, em relação as contrações induzidas pelo L69 nas artérias controlo não são significativamente diferentes às obtidas nas artérias incubadas com TBT (0,1nM, 1nM e 100 μ M).

Relativamente ao agonista do recetor 5-HT_{2A}, AMHT, a contração provocada em artérias controlo foi significativamente maior que a obtida em artérias incubadas com as concentrações de TBT mais elevadas (0,1 μ M e 100 μ M). Contudo, os dados não foram significativamente diferentes das obtidas em artérias incubadas com as concentrações de TBT mais baixas (0,1nM e 1nM).

Efeito da incubação com TBT sobre a vasorelaxação provocada pela ativação do recetor 5-HT₇ na AUH

Analisou-se a percentagem (%) de relaxação dos anéis, induzida pela ativação do recetor 5-HT₇ em artérias previamente incubadas (durante 24h) com TBT (0,1nM, 1nM, 0,1 μ M e 100 μ M) ou em meio controlo (CT). Os anéis foram contraídos por AMHT (1 μ M) e após a estabilização da contração, estes foram submetidos ao AS19 (agonista do recetor 5-HT₇; 1 μ M).

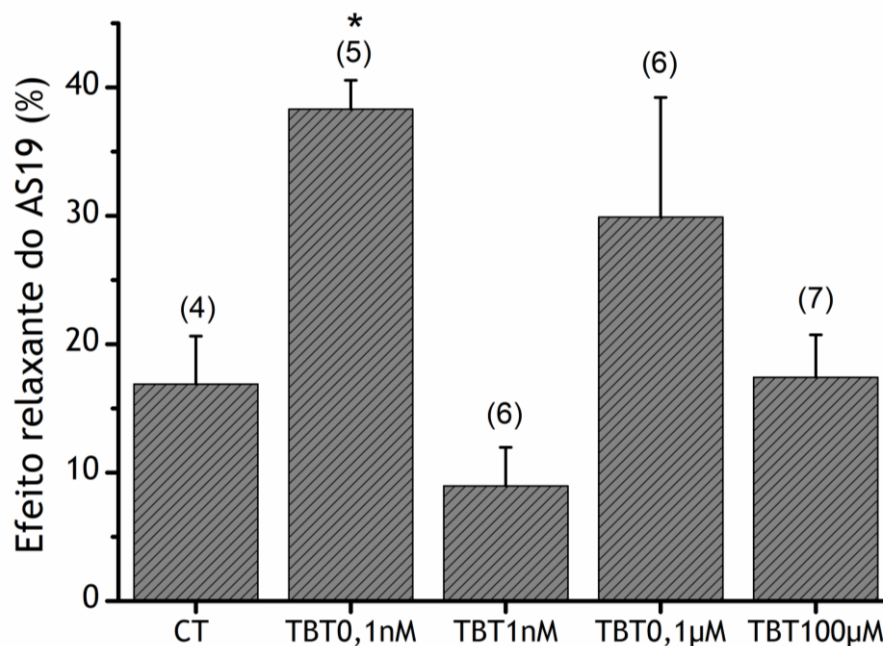


Figura 15. Efeito relaxante induzido pelo AS19, após contração das artérias com AMHT. Estudo do efeito da ativação do recetor 5-HT₇ com AS19 (1µM), após os anéis da AUH terem sido contraídas com AMHT (1µM). As artérias foram previamente incubadas (durante 24h) com TBT (0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM) ou em meio controlo (CT). As barras representam a média ± erro padrão associado ao número de experiências indicado próximo as barras. * versus controlo (P <0,05, One-Way ANOVA com teste post hoc Dunnett).

Os resultados demonstraram a existência de diferenças significativas entre a condição controlo e a incubação TBT 0,1nM, sendo que esta diferença corresponde a um aumento da percentagem de relaxação relativamente ao controlo. Não houve diferenças significativas entre o controlo e as artérias incubadas com outras concentrações de TBT.

4.2. Análise do efeito a longo prazo do TBT na atividade contrátil da AUH provocada pela ativação de recetores de histamina

A determinação da atividade funcional dos recetores de histamina na AUH também se baseou na análise da contratilidade arterial realizada pela técnica de banho de órgãos.

As artérias sem endotélio foram incubadas com ou sem TBT, da mesma forma que referido na seção anterior, com a utilização de três condições de estudo, o controlo, com solvente EtOH (0,01%) e com diferentes concentrações de TBT (0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM). Os agentes contráteis utilizados foram histamina e BHI (agonista do recetor H₁). Alguns dos anéis contraídos com BHI foram posteriormente submetidos ao agente vasorelaxante DMP (agonista do recetor H₂).

4.2.1. Efeito do solvente na atividade contrátil da AUH desencadeada pela ativação de recetores de histamina

Foi analisada a influência do solvente EtOH na função contrátil de AUH, desempenhada pela ativação dos recetores histamínicos. Assim, mediram-se as tensões atingidas pela utilização de dois agentes contráteis e agonistas destes recetores, histamina (10 μ M) e de BHI (1mM), em anéis incubados com etanol e em anéis controlo. Também foi analisado o efeito relaxante do DMP (100 μ M) sob contrações induzidas pelo BHI (1mM). Desta forma analisou-se a possibilidade de alguma interferência deste solvente ^(124, 125) em artérias incubadas na presença de 0,01% de EtOH. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito contrátil é semelhante entre os grupos analisados, controlo e com EtOH (0,01%). Também não há diferenças significativas no efeito relaxante provocado pelo DMP (dados não apresentados). Como referido anteriormente a percentagem de 0,01% de EtOH não exerce nenhuma influência significativa na contratilidade arterial ^(126, 127).

4.2.2. Efeito do TBT a longo prazo na atividade contrátil desencadeada pela ativação de recetores de histamina na AUH

Os anéis de AUH sem endotélio foram incubados por um período de 24h em presença de concentrações diferentes de TBT (0,1nM, 1nM, 0,1 μ M e 100 μ M). Após o período de incubação dos anéis, determinaram-se as tensões provocadas pela ação da histamina (10 μ M) e do BHI (1mM), e analisaram a percentagem de relaxação induzida pelo DMP (100 μ M). Assim sendo, analisaram-se as possíveis interferências do xenobiótico na função contrátil do músculo liso da AUH, desencadeada pela ativação dos recetores histamínicos.

Efeito da incubação com TBT na contratilidade da AUH induzida pela histamina e pelo agonista do recetor H₁

O gráfico da figura 16 mostra que a contração induzida pela histamina é significativamente inferior à induzida pelo agonista BHI do recetor H₁ em anéis controlo. Também se observou esta diferença em anéis incubados com TBT 0,1nM, deixando de existir esta diferença significativa em anéis incubados com concentrações superiores de TBT (1nM, 0,1 μ M e 100 μ M).

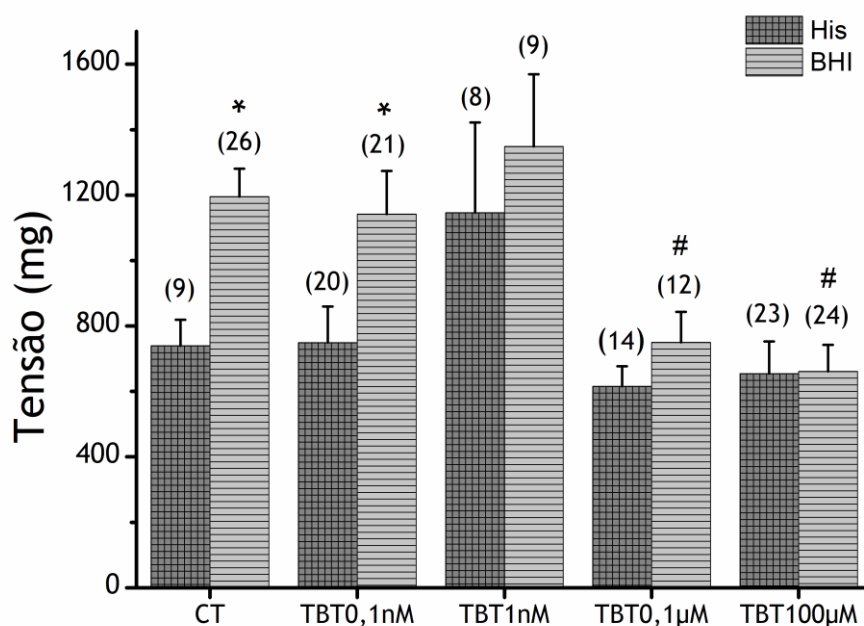


Figura 16. Efeito do TBT na contração da AUH induzida pela histamina e pelo BHI. O efeito contrátil (mg) induzido pela histamina (10µM) e pelo BHI (agonista do recetor H₁; 1mM) após 24h de incubação com TBT (0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM) e em anéis controlo (CT). As barras representam as médias ± erro padrão, associado ao número de experiências indicado próximo as barras. *versus agente contrátil (teste de Student), # versus controlo (P <0.05, One-way ANOVA com teste post hoc Dunnett).

Deste modo, verifica-se que em anéis incubados com as concentrações mais altas de TBT (0,1µM e 100µM) as tensões provocadas por histamina e BHI são semelhantes. Estes dados também demonstram que a capacidade contrátil do BHI é reduzida significativamente pela incubação dos anéis com TBT (0,1µM e 100µM). Por outro lado, a contratilidade máxima provocada pela histamina não é significativamente alterada pela incubação dos anéis com TBT.

Efeito da incubação com TBT sobre a vasorelaxação provocada pela ativação do recetor H₂ na AUH

Analisou-se a percentagem (%) de relaxação induzida pela ativação do recetor H₂ em artérias previamente incubadas (durante 24h) com TBT (0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM) ou em meio controlo (CT). Os anéis foram contraídos por BHI (1mM) e após a estabilização da contração, estes foram submetidos ao DMP (agonista do recetor H₂; 100µM).

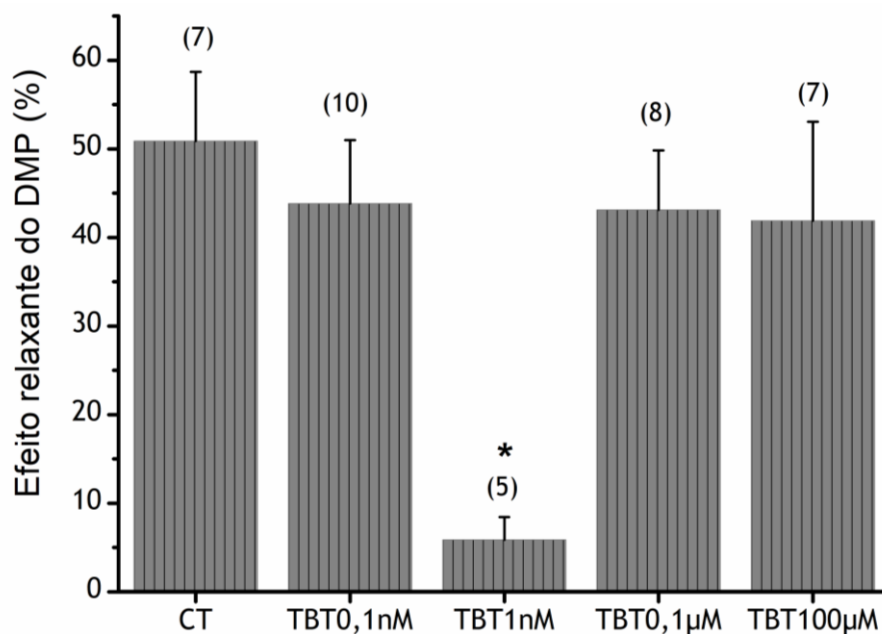


Figura 17. Efeito relaxante induzido pelo DMP, após a contração das artérias com BHI. Estudo do efeito da ativação do recetor H_2 com DMP ($100\mu M$), após as artérias terem sido contraídas com BHI ($1mM$) e incubadas por 24h com TBT ($0,1nM$, $1nM$, $0,1\mu M$ e $100\mu M$) ou em meio controlo (CT). As barras representam a média \pm erro padrão, associado ao número de experiências indicado próximo as barras. * versus controlo ($P < 0,05$, One-Way ANOVA com teste post hoc Dunnett).

Os resultados do gráfico da figura 17 mostram uma diminuição significativa do efeito relaxante do DMP em com anéis incubados com TBT $1nM$ em relação aos anéis controlo. E referente as outras concentrações, não foi observado diferença significativas com o grupo controlo.

Capítulo V - Discussão

O Tributilestanho (TBT) é um poluente ambiental que se bioacumula em diferentes ecossistemas ^(10, 11). Deste modo, diferentes estudos têm demonstrado a sua capacidade de influenciar o comportamento de vários sistemas fisiológicos dos seres vivos, inclusive o homem. Estes estudos comprovam a sua citotoxicidade, incluindo a imunotoxicidade, neurotoxicidade ^(10, 34), genotoxicidade anormalidades sexuais e reprodutivas, e recentemente alguns autores sugerem-no como um fator de risco cardiovascular ^(7, 35, 128).

Estudos prévios realizados por investigadores do grupo foram os primeiros a analisar o efeito do TBT a nível vascular em humanos, e abriram caminhos para novos projetos de investigação científica. Este estudo demonstrou três fatos ⁽¹²⁸⁾:

1)A exposição ao TBT a curto prazo, provocava um efeito relaxante nas AUH contraídas sendo dependente da concentração;

2)Uma exposição prolongada das AUH ao TBT (100 μ M) provoca um efeito duplo, demonstrando a sub-expressão do recetor 5-HT_{2A} e do recetor H₁;

3)Testes de viabilidade celular demonstraram que a toxicidade do TBT sobre as células do músculo liso da AUH ocorre a partir da concentração de 1 μ M.

Este trabalho pretende analisar os efeitos a longo prazo do TBT na função contrátil da AUH provocada pela ativação dos recetores de 5-HT e de histamina localizados no músculo liso destas artérias. Esta avaliação foi feita através da incubação (24h) dos anéis de AUH em meio DMEM-F12 com diferentes concentrações de TBT. De seguida analisou-se a atividade contrátil dos anéis desencadeada pela ativação dos recetores de 5-HT e de histamina, com a utilização de diferentes agonistas destes recetores.

Para realizar o estudo inicialmente foram utilizados dois grupos, um controlo e um com solvente EtOH. Assim alguns anéis de AUH foram incubados por 24h com meio base (DMEM-F12) e outros com meio base com EtOH 0,01%. Os resultados obtidos nestes dois grupos demonstraram não existir diferenças significativas nos efeitos contráteis provocados pela 5-HT, pelos outros agonistas dos recetores 5-HT (L69 e AMHT), assim como pela histamina e BHI. Referente aos agentes vasorelaxantes, AS19 e DMP, os dados demonstraram também nenhuma diferença estatística. Assim podemos concluir que o EtOH 0,01% não altera significativamente os efeitos contráteis dos agonistas referidos na AUH. Esta ausência de efeito do EtOH já tinha sido referida anteriormente em outros tipos de estudo com AUH ^(126, 127).

5.1. Efeito a longo prazo do TBT na contratilidade da AUH provocada pela ativação de recetores de 5-HT

O estudo do efeito do TBT a longo prazo foi realizado, fazendo incubações de anéis de AUH com diferentes concentrações de TBT (0,1nM, 1nM, 0,1µM e 100µM).

Avaliou-se a resposta dos anéis de AUH à 5-HT e os resultados mostraram que, nas artérias incubadas com TBT 100µM, apenas uma percentagem de 25,6% dos anéis contraíram acima de 900 mg. Contudo, 32,6% destes anéis tiveram uma atividade contrátil inferior a 500mg e 74,4% inferior a 900mg. Pode-se concluir que esta concentração de TBT provoca uma grande perda da atividade contrátil funcional provocada pela 5-HT. Em relação à incubação com 0,1µM de TBT, só 23,1% destes contraíram acima de 900mg pelo efeito da 5-HT, havendo 53,8% que contraíram entre 500 e 900mg e 23,1% abaixo de 500mg. Esta concentração também mostrou reduzir a atividade contrátil dos anéis para a 5-HT. Assim sendo, a análise estatística dos resultados obtidos ao longo da experiência, mostrou haver diferenças significativas entre o grupo controlo e a incubação 0,1 µM, apresentando atividade contrátil reduzida semelhante a concentração 100 µM para o agente contrátil 5-HT e AMHT. Neste caso, sugere-se que os recetores de 5-HT ativados pelo agente contrátil 5-HT e o agonista do recetor 5-HT_{2A}, AMHT estão afetados nestas duas concentrações. Estes valores mostram uma grande perda funcional de atividade contrátil dos recetores 5-HT_{2A} para as estas duas incubações, não havendo diferenças relativamente significativas entre elas. Sugere-se que a sua capacidade de mediar contrações por um mecanismo G_{qα} por estimulação direta através de células do músculo liso de AUH⁽⁹⁴⁾, esteja afetada.

Estudos recentes do grupo demonstraram concordância com estes resultados, uma vez que o gene deste recetor encontra-se sub-regulado na presença de TBT 0,1nM, 10nM e 0,1 µM⁽¹²⁸⁾. Outros estudos também parecem corroborar com os dados obtidos, sendo que estudos *in vitro* demonstram que o TBT pode afetar canais de Ca²⁺^(105, 129, 130), sendo um composto capaz de inibir significativamente tanto as bombas de Ca²⁺-ATPase no RS (SERCA), assim como a recaptação do Ca²⁺ pelas bombas. Estes estudos demonstram a existência de níveis baixos de AMPc, associando que o mecanismo do efeito do TBT deve-se à alteração da fosforilação de proteínas específicas e dependente da concentração do tóxico⁽⁶⁷⁾. De fato o TBT foi identificado como um inibidor potente da ATPase mitocondrial na região F₁F₀ em mamíferos, moluscos, bactérias. Garcia-carrilo *et al.* demonstraram que o TBT se liga à enzima induzindo a transição do estado de ligação ao Ca²⁺ de alta para baixa afinidade (transição E1 para E2)⁽¹³¹⁾. Outros autores sugerem que o TBT induz o aumento da [Ca²⁺]_i libertado pelo RS, levando a depleção de Ca²⁺ no organelo, prejudicando as suas funções e permitindo a acumulação de proteínas *unfolding* no lúmen, o que induz ao stress do RS⁽¹³²⁾. É sugerido ainda a capacidade de exacerbar o stress oxidativo com a formação de espécies reativas de oxigénio (O²⁻) e com formação de fibrose, levando a disfunção funcional e morfológica de anéis aórticos em ratos fêmeas⁽²⁷⁾. Também já foi referido a capacidade do TBT de desencadear apoptose através do aumento do efluxo de Ca²⁺ intracelular do RS podendo ativar endonucleases, que resultam na

fragmentação do DNA. Isto pode resultar da ativação de proteases tipo calpaína que sub-regulam ou degradam o PKC, ou caspases. Deste modo, estes eventos podem modificar o estado de fosforilação de proteínas apoptóticas, levando a apoptose celular pela ação do TBT (47, 130).

Em relação as artérias incubadas com 1nM de TBT, apresentaram uma percentagem de 68,4% de anéis que contraíram acima de 900mg. No geral, estes anéis mostraram uma atividade contrátil reduzida em relação aos anéis controlo, pois 31,6% dos anéis contraíram abaixo de 900mg. No entanto, os resultados obtidos com artérias incubadas com 1nM de TBT são semelhantes aos obtidos com artérias controlo, o que não ocorre com os resultados obtidos para as outras incubações de TBT. Contudo, apesar de não existir diferença estatística significativa entre o L69 e os outros agentes contráteis, considera-se que anéis incubados a esta concentração apresentam resultados semelhantes a uma condição padrão fisiológica. Contudo, o fato de o número de ensaios ser inferior as outras incubações, pode ter induzido a alguma influência.

Para a concentração TBT de 0,1nM, os resultados demonstraram uma atividade contrátil diminuída após os anéis terem sido submetidos à 5-HT. Neste sentido, 45,1% dos anéis contraíram acima de 900mg, enquanto 39,2% delas contraíram entre os 500 e 900mg. Os dados demonstraram uma diminuição significativa da atividade contrátil dos anéis AUH, mostrando alteração funcional dos recetores 5-HT a esta incubação. Pode-se dizer que a capacidade de contração delas foi dividida aproximadamente, podendo afirmar que quase metade dos anéis contraíram e as outras diminuíram a sua atividade funcional a esta concentração. Assim sendo, a análise do recetor 5-HT₇ para a mesma concentração foi possível observar um aumento da percentagem de relaxação após os anéis terem sido submetidos ao agente vasorelaxante AS19 (após contração com AMHT) comparativamente com o grupo controlo. Em referência às incubações com outras concentrações de TBT, os resultados não demonstram ser significativamente diferentes quando comparadas com o controlo. Deste modo, sugere-se que o recetor 5-HT₇ encontra-se afetado pela incubação em 0,1nM de TBT. O que se pode afirmar que concentração mais baixa consegue reduzir a resposta contrátil para a 5-HT, desempenhando um efeito sobre o recetor 5-HT₇. Este recetor é responsável pela inibição da contratilidade do músculo liso (41, 77, 108, 111) na AUH (77) associado a ativação de AC e a sua restante via de sinalização acoplada positivamente a proteína G_s (78, 110).

Os resultados demonstram a existência de um efeito na concentração mais baixa, sendo muito comum na maioria dos EDCs. Deste modo, o estudo indica que o TBT tem efeitos tóxicos tanto em níveis de exposição muito baixos como em níveis muito altos (17). Consideramos estas respostas como não monotônicas, frequentemente referidas como respostas bifásicas ou curvas em forma de U, ou U invertido (11). Os dados concordam com outros estudos em que os efeitos do TBT possuem a capacidade de diminuir a lise das células tumorais desempenhando uma ação imunossupressora nas células NK, assim como a

diminuição dos níveis de AMPc intracelular. Deste modo, demonstrou-se que a inibição de AC, consequentemente a diminuição da atividade da PKA e dos níveis de AMPc, e aumento da ativação de p44/42 e p38 (mudanças no estado de fosforilação) ^(31, 42) e JNK ⁽²⁰⁾ causa alterações a nível das MAPK e em outras cinases como a JNK ^(20, 31, 42). Contudo os resultados são controversos em relação ao observado por *Solomon et al.* que afirmam que o que o TBT inibe a vasorelaxação induzida pelo péptido natriurético (ANP) e a estimulação de GMPc em anéis aórticos de ratos, mas não tem nenhum efeito sobre a vasorelaxação induzida por nitroprussiato de sódio (SNP) e a síntese de GMPc. Estes dados sustentam a ideia de que a interação inibitória entre TBT é mais sensível ao ANP, ao seu recetor e principalmente a atividade de ciclase ⁽¹³³⁾. Contudo, outro estudo mais recente mostra que é possível o TBT provocar diminuição da vasorelaxação do SNP ⁽²⁷⁾.

Em referência ao recetor 5-HT_{1B/1D}, a sua função pode estar comprometida, apesar de os resultados não aparentarem nenhuma alteração na sua funcionalidade após as diferentes incubações com TBT. No entanto, já foi descrita uma alteração da sua expressão dependente da variabilidade genética individual do recetor 5-HT_{1B/1D} na HUA⁽⁷⁷⁾. Há uma necessidade que ele seja ativo primeiramente por um agente contrátil, e só posteriormente desencadear a sua resposta com o seu agonista ⁽⁹⁴⁾. A resposta contrátil dos agonistas pode apresentar um efeito duplo, podendo ser representada por uma atividade contrátil elevada (>1000mg), baixa (>200 - <300mg) ou um efeito total médio (\pm 500mg) ^(77, 94). Deste modo, a análise deve ser complementada com estudos de expressão do recetor 5-HT_{1B/1D}.

Apesar dos resultados da incubação de 1nM, não serem relativamente consistentes com os outros resultados das outras incubações. Esta concentração aparentemente não apresenta diferenças significativas com a situação controlo. Contudo, estes dados, o número de ensaios realizados é relativamente menor que o número realizado para as outras incubações de TBT. De um modo geral, em relação às artérias contraídas com 5-HT, o aumento da concentração de TBT provocou um aumento da proporção de artérias que contraíram menos de 500mg, e também provocou um decréscimo da proporção de anéis que contraíram por valores superiores a 900mg, comparativamente com o grupo controlo. De acordo com o estudo, aparentemente os recetores afetados são o 5-HT_{2A} (TBT 0,1 μ M e 100 μ M) e o recetor 5-HT₇ (TBT 0,1nM).

5.2. Efeito a longo prazo do TBT na contratilidade da AUH provocada pela ativação de recetores de histamina

A análise do efeito a longo prazo do TBT na resposta contrátil da AUH induzida pela histamina e seus agonistas demonstrou também que existem diferenças significativas entre as incubações com TBT e o controlo.

A análise dos resultados também demonstrou diferenças significativas com a situação controle e as concentrações mais altas do estudo (TBT 0,1 μ M e 100 μ M). Assim sendo, os dados demonstram que para as artérias incubadas com 0,1 μ M e 100 μ M de TBT, elas apresentam tensões máximas menores comparativamente com o controle, após os anéis terem sido submetidos a histamina e BHI. Para além disso, a tensão máxima atingida pelos anéis de AUH mediados pela ativação dos recetores por ambos os agentes contráteis, é semelhante e reduzida a estas duas concentrações, já que no grupo controle a tensão atingida pelo BHI é superior a histamina. De acordo com Santos *et al.* (2009) a histamina ativa ambos os recetores H₁ e H₂, o que implica haver contração elevada através de H₁ e posteriormente, relaxação através de H₂, diminuindo a tensão para o agente contrátil numa situação controle ⁽⁷⁷⁾. Deste modo, a contração mediada pelo BHI é maior quando comparada com a contração provocada pela histamina, já que o BHI ativa exclusivamente o H₁ acoplado a proteína G_{q α} , permitindo o aumento dos níveis intracelular de IP3 e DAG ⁽¹⁰¹⁾. Os resultados sugerem que a atividade contrátil das artérias desencadeada pela ativação do recetor H₁ encontra-se alterada para ambas as incubações mais elevadas. Assim sendo, as artérias incubadas a estas concentrações apresentam uma atividade contrátil reduzida, semelhante a contração padrão da histamina. Neste sentido, o TBT aparenta induzir um efeito inibitório referente a este recetor acoplado a proteína G_{q α} . Do mesmo modo, como referido anteriormente nos recetores de 5-HT, pressupõe-se a possibilidade das bombas de Ca²⁺ ou mesmos canais estejam a ser de influenciados pelo tóxico, interferindo com o estado de fosforilação de proteínas no lúmen celular ^(67, 105, 129, 130).

Os resultados obtidos pelo grupo coincidem com os apresentados no estudo, já que a análise genómica realizada por Glória *et al.* indica que a exposição ao tóxico induz a diminuição dos níveis de expressão do mRNA do gene H₁, estando o gene sub-regulado para as concentrações 0,1nM, 1nM, 10nM, e 0,1 μ M ⁽¹²⁸⁾. O que pode indicar que a baixa expressão do recetor, possa implicar a diminuição da atividade contrátil dos anéis incubados com as concentrações mais altas do estudo.

Em relação a incubação 1nM, a análise dos resultados demonstrou não haver diferenças significativas entre a tensão atingida pela histamina e pelo BHI, quando comparadas com o controle. Os dados mostram uma similaridade na resposta contrátil entre os dois agentes vasoativos, já que a contração da histamina aumentou consideravelmente atingindo uma capacidade contrátil semelhante a contração mediada pelo BHI em artérias incubadas com esta concentração de TBT. Verifica-se pela análise do efeito vasorelaxante do DMP (agonista do recetor H₂), após os anéis terem sido contraídos com o agente contrátil BHI, que as únicas diferenças significativas referentes ao grupo controle é referido a concentração TBT 1nM. De fato, após os anéis terem sido incubados (TBT 1nM) e submetidos ao DMP, a percentagem de relaxação atingida foi menor em relação a todas outras incubações e ao controle. Sugere-se que a atividade do recetor H₂ pode estar alterada nas artérias incubadas com TBT 1nM, verificando-se uma menor capacidade de resposta ao seu efeito relaxante.

Deste modo, os dados apontam para a existência de efeitos do TBT relacionados com o recetor H_2 para a concentração 1nM, sendo esta resposta não monotônica ⁽¹¹⁾. Acredita-se também que os dados estejam relacionados com um efeito semelhante do TBT na imunossupressão das células NK, onde inibe a AC, como foi referido também na avaliação da atividade contrátil da 5-HT ^(20, 31, 42). Tornam-se necessários mais estudos relativamente a avaliação da expressão génómica do recetor, através da incubação de células do músculo liso expostas a diferentes concentrações de TBT.

Relativamente, as artérias incubadas com a concentração mais baixa de 0,1nM, os dados obtidos não apresentaram diferenças significativas com os obtidos em artérias controlo, mantendo o mesmo padrão de contração para ambos os agentes contráteis. Assim, esta incubação não afeta a contratilidade dos anéis após terem sido contraídos com histamina e BHI.

De um modo geral, existe um efeito causado pelo TBT na contratilidade das AUHs provocada pela ativação dos recetores histamínicos, após incubação com 1nM, 0,1 μ M e 100 μ M de TBT. O aumento da concentração de TBT provoca uma diminuição da atividade contrátil das artérias provocada pela histamina e pelo BHI. Quando as artérias foram incubadas com as concentrações mais altas de TBT (0,1 μ M e 100 μ M), os resultados mostraram uma perda de capacidade contrátil do músculo liso após a ativação dos recetores H_1 . Em relação a incubação com TBT 1nM, as artérias aumentaram a sua atividade contrátil deixando de haver diferenças significativas na contração entre histamina e BHI. Sugere-se para esta concentração (TBT 1nM) perda da atividade vasorelaxante do recetor H_2 . Contudo, o número de ensaios para TBT 1nM pode implicar uma influência no estudo, podendo não ser conclusivo e necessitar de mais ensaios.

Capítulo VI - Conclusão

A realização deste trabalho baseou-se no efeito a longo prazo do TBT na contratilidade provocada pela ativação de recetores de 5-HT e de histamina na AUH. Os resultados foram obtidos podendo concluir que o TBT exerce efeitos que diminuem a atividade contrátil do músculo liso da AUH provocada pela ativação destes recetores. Neste sentido os dados indicam que:

1) A incubação com as concentrações mais altas de TBT 0,1 μ M e 100 μ M provocaram uma grande perda da atividade contrátil induzida pela ativação de recetores 5-HT e de histamina, nomeadamente os recetores 5-HT_{2A} e H₁, o que concorda com a observação de Glória *et al.* que indicam que a expressão dos genes se encontra sub-regulada;

2) Referente as artérias incubadas com 1nM de TBT, os dados indicam um aumento da atividade contrátil das artérias submetidas a histamina. Os resultados demonstram que esta concentração afeta a ativação do recetor H₂ que apresenta uma atividade vasorelaxante baixa quando comparada com a condição controlo. Para os recetores de 5-HT aparenta ser a incubação com menos efeitos na AUH.

3) Para os anéis incubados com 0,1nM de TBT, a análise dos dados permitiu constatar efeitos do TBT apenas relacionados com a ativação dos recetores 5-HT. Esta concentração consegue reduzir a resposta contrátil da AUH induzida pela 5-HT Outro fato importante observado referente a esta incubação, corresponde ao aumento da atividade vasorelaxante após a ativação do recetor 5-HT₇;

4) Relativamente ao recetor 5-HT_{1B/1D}, este estudo não conseguiu concluir se a atividade contrátil induzida pela ativação do recetor se encontra afetada após incubação com as diferentes concentrações de TBT.

Capítulo VII - Perspetivas futuras

Referente as perspetivas futuras, sugere-se avaliar a influência do TBT sobre a expressão génica dos recetores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT₇ e H₂ e a análise da influência do TBT na quantificação dos segundos mensageiros das vias de sinalização envolvidas na ativação dos recetores de 5-HT e histamina.

Capítulo VIII - Bibliografía

1. Shoback DGGD. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology 2007.
2. Koch CA, Diamanti-Kandarakis E. Introduction to Endocrine Disrupting Chemicals--is it time to act? Reviews in endocrine & metabolic disorders. 2015;16(4):269-70.
3. Marshall CGDBNJ. Essential Endocrinology 2001.
4. Porterfield SP. Endocrine Physiology 2001.
5. JM N. How the endocrine System Works 2002.
6. Seeley RR. Anatomia e Fisiologia 2011.
7. Rutkowska A, Rachon D, Milewicz A, Ruchala M, Bolanowski M, Jedrzejuk D, et al. Polish Society of Endocrinology Position statement on endocrine disrupting chemicals (EDCs). Endokrynologia Polska. 2015;66(3):276-81.
8. Choudri BS, Baawain M. Effects of Pollution on Freshwater Organisms. Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation. 2016;88(10):1672-92.
9. Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, et al. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. Journal of neuroendocrinology. 2012;24(1):144-59.
10. Kato T, Tada-Oikawa S, Wang L, Murata M, Kuribayashi K. Endocrine disruptors found in food contaminants enhance allergic sensitization through an oxidative stress that promotes the development of allergic airway inflammation. Toxicology and applied pharmacology. 2013;273(1):10-8.
11. Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. Reproductive toxicology. 2017;68:3-33.
12. Benson R. Concise International Chemical Assessment Document 14 - Tributyltin Oxide. World Health Organization and United Nations Environment Programme. 1999.
13. Martinez-Paz P, Morales M, Martinez-Guitarte JL, Morcillo G. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. Mutation research. 2013;758(1-2):41-7.
14. Axelstad M, Boberg J, Hougaard KS, Christiansen S, Jacobsen PR, Mandrup KR, et al. Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. Toxicology and applied pharmacology. 2011;250(3):278-90.
15. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. Endocrine reviews. 2015;36(6):E1-E150.

16. Chapman RW, Guillette LJ. Contaminants and impoSEX: transcriptomics of contaminant-induced sex change. *Molecular Ecology*. 2013;22(6):1485-7.
17. Santos-Silva AP, Andrade MN, Pereira-Rodrigues P, Paiva-Melo FD, Soares P, Graceli JB, et al. Frontiers in endocrine disruption: Impacts of organotin on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017.
18. Pellegrini M, Bulzomi P, Lecis M, Leone S, Campesi I, Franconi F, et al. Endocrine disruptors differently influence estrogen receptor beta and androgen receptor in male and female rat VSMC. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(8):1061-8.
19. Soto AM, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature reviews Endocrinology*. 2010;6(7):363-70.
20. Abraha AB, Rana K, Whalen MM. Role of protein kinase C in TBT-induced inhibition of lytic function and MAPK activation in human natural killer cells. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2010;59(4):661-9.
21. Stange D, Sieratowicz A, Oehlmann J. Imposex development in *Nucella lapillus*--evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways in vivo. *Aquatic toxicology*. 2012;106-107:20-4.
22. Zeidan GC, Boehs G. Assessment of tributyltin contamination based on imposex in *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) along southern Bahia coast, northeastern Brazil. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*. 2017;77(1):185-90.
23. Rodrigues SM, Ximenes CF, de Batista PR, Simoes FV, Coser PH, Sena GC, et al. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. *Toxicology letters*. 2014;225(3):378-85.
24. McGinnis CL, Crivello JF. Elucidating the mechanism of action of tributyltin (TBT) in zebrafish. *Aquatic toxicology*. 2011;103(1-2):25-31.
25. Du J, Chadalavada S, Chen Z, Naidu R. Environmental remediation techniques of tributyltin contamination in soil and water: A review. *Chemical Engineering Journal*. 2014;235:141-50.
26. Alzieu C. Tributyltin. *Ocean & Coastal Management*. 1998;40(1):23-36.
27. Ximenes CF, Rodrigues SML, Podratz PL, Merlo E, de Araujo JFP, Rodrigues LCM, et al. Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats. *Environmental science and pollution research international*. 2017;24(31):24509-20.
28. Sousa ACA, Pastorinho MR, Takahashi S, Tanabe S. History on organotin compounds, from snails to humans. *Environ Chem Lett*. 2014;12(1):117-37.
29. Antizar-Ladislao B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. *b_antizar@hotmail.com. Environment international*. 2008;34(2):292-308.

30. Podratz PL, Merlo E, Sena GC, Morozesk M, Bonomo MM, Matsumoto ST, et al. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. *Reproductive toxicology*. 2015;57:29-42.
31. Aluoch A, Whalen M. Tributyltin-induced effects on MAP kinases p38 and p44/42 in human natural killer cells. *Toxicology*. 2005;209(3):263-77.
32. Kannan K, Senthilkumar K, Giesy JP. Occurrence of Butyltin Compounds in Human Blood. *Environmental Science & Technology*. 1999;33(10):1776-9.
33. Chen YW, Lan KC, Tsai JR, Weng TI, Yang CY, Liu SH. Tributyltin exposure at noncytotoxic doses dysregulates pancreatic beta-cell function in vitro and in vivo. *Archives of toxicology*. 2017.
34. Yamada S, Asanagi M, Hirata N, Itagaki H, Sekino Y, Kanda Y. Tributyltin induces mitochondrial fission through Mfn1 degradation in human induced pluripotent stem cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2016;34:257-63.
35. dos Santos RL, Podratz PL, Sena GC, Filho VS, Lopes PF, Goncalves WL, et al. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in isolated rat heart. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2012;75(16-17):948-59.
36. Pavoni B, Centanni E, Valcanover S, Fasolato M, Ceccato S, Tagliapietra D. Imposex levels and concentrations of organotin compounds (TBT and its metabolites) in *Nassarius nitidus* from the Lagoon of Venice. *Marine pollution bulletin*. 2007;55(10-12):505-11.
37. Kim NS, Hong SH, Shin KH, Shim WJ. Imposex in *Reishia clavigera* as an Indicator to Assess Recovery of TBT Pollution After a Total Ban in South Korea. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2017;73(2):301-9.
38. Blaber SJM. The Occurrence of a Penis-Like Outgrowth Behind the Right Tentacle in Spent Females of *Nucella Lapillus* (L.). *Journal of Molluscan Studies*. 1970;39(2-3):231-3.
39. Oehlmann J, Stroben E, Fioroni P. The Morphological Expression of Imposex in *Nucella Lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan Studies*. 1991;57(3):375-90.
40. Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology*. 1992;113(4):625-36.
41. Prins NH, Briejer MR, Van Bergen PJ, Akkermans LM, Schuurkes JA. Evidence for 5-HT7 receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1999;128(4):849-52.
42. Whalen MM, Odman-Ghazi SO. Effects of adenylyl cyclase and protein kinase A inhibition on signaling enzymes in natural killer cells: comparison to tributyltin. *Human & experimental toxicology*. 2006;25(6):333-40.
43. Regnier SM, El-Hashani E, Kamau W, Zhang X, Massad NL, Sargis RM. Tributyltin differentially promotes development of a phenotypically distinct adipocyte. *Obesity*. 2015;23(9):1864-71.

44. Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Molecular endocrinology*. 2010;24(3):526-39.
45. Li B, Guo J, Xi Z, Xu J, Zuo Z, Wang C. Tributyltin in male mice disrupts glucose homeostasis as well as recovery after exposure: mechanism analysis. *Archives of toxicology*. 2017;91(10):3261-9.
46. Whalen MM, Loganathan BG, Kannan K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. *Environmental research*. 1999;81(2):108-16.
47. Stridh H, Cotgreave I, Müller M, Orrenius S, Gigliotti D. Organotin-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Chemical Research in Toxicology*. 2001;14(7):791-8.
48. Claude A. L'étain et les organoétains en milieu marin biogéochimie et ecotoxicologie 1989.
49. Cole RF, Mills GA, Bakir A, Townsend I, Gravell A, Fones GR. A simple, low cost GC/MS method for the sub-nanogram per litre measurement of organotins in coastal water. *MethodsX*. 2016;3:490-6.
50. Lagerstrom M, Strand J, Eklund B, Ytreberg E. Total tin and organotin speciation in historic layers of antifouling paint on leisure boat hulls. *Environmental pollution*. 2017;220(Pt B):1333-41.
51. Jin C, Qiu J, Miao L, Feng K, Zhou X. Antifouling activities of anti-histamine compounds against the barnacle *Amphibalanus (=Balanus) amphitrite*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2014;452:47-53.
52. Peeters K, Lespes G, Milacic R, Scancar J. Adsorption and degradation processes of tributyltin and trimethyltin in landfill leachates treated with iron nanoparticles. *Environmental research*. 2015;142:511-21.
53. Malik AK, Grundmann M, Matysik FM. Development of a fast capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry method for the speciation of organotin compounds under separation conditions of high electrical field strengths. *Talanta*. 2013;116:559-62.
54. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;376(5):375-83.
55. Colaboradores LMGe. *Medicina Materno Fetal* 1.2000.
56. Sypecka J, Sarnowska A. Mesenchymal cells of umbilical cord and umbilical cord blood as a source of human oligodendrocyte progenitors. *Life sciences*. 2015;139:24-9.
57. Bosselmann S, Mielke G. Sonographic Assessment of the Umbilical Cord. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2015;75(8):808-18.
58. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells*. 2004;22(7):1330-7.

59. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Alvarez E, Correia I, Verde I. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2009;45(3-4):175-84.
60. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Anatomy and Pathology of the Umbilical Cord*. 2012:309-75.
61. Zhang S-X. *An Atlas of Histology*1999.
62. Wolf G. Cell physiology of vascular smooth muscle cells and mesangial cells and the impact of this on the control of renal circulation. *Advances in Organ Biology*. 2000; 9:35-61.
63. Cetin A, Kukner A, Ozturk F. Ultrastructure of human umbilical vessels in pre-eclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2002;12(3):178-84.
64. Meyer WW, Rumpelt HJ, Yao AC, Lind J. Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *European Journal of Pediatrics*. 1978;128(4):247-59.
65. Lin Q, Zhao G, Fang X, Peng X, Tang H, Wang H, et al. IP3 receptors regulate vascular smooth muscle contractility and hypertension. *JCI insight*. 2016;1(17):e89402.
66. Pfaltzgraff ER, Bader DM. Heterogeneity in vascular smooth muscle cell embryonic origin in relation to adult structure, physiology, and disease. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2015;244(3):410-6.
67. Klabunde RE. *Cardiovascular physiology concepts*2012.
68. Woodrum DA, Brophy CM. The paradox of smooth muscle physiology. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001;177(1-2):135-43.
69. Clark JF, Pyne-Geithman G. Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology*. 2005;12(1):35-45.
70. Cole WC, Welsh DG. 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):160-73.
71. Marino EC. *Histología Humana*2001.
72. Klein JCMRM. *Basic Concepts in Cell Biology And Histology*2000.
73. Webb RC. *Smooth muscle contraction and relaxation*. American Physiological Society. 2003;27.
74. Huang J, Zhou H, Mahavadi S, Sriwai W, Lyall V, Murthy KS. Signaling pathways mediating gastrointestinal smooth muscle contraction and MLC20 phosphorylation by motilin receptors. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(1):G23-31.
75. Murthy KS. Signaling for Contraction and Relaxation in Smooth Muscle of the Gut. *Annual Review of Physiology*. 2006;68(1):345-74.

76. 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):220-31.
77. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Marques B, Verde I. Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reproductive sciences*. 2009;16(12):1175-85.
78. Kitazawa T, Kubo O, Satoh M, Taneike T. Involvement of 5-hydroxytryptamine₇ receptors in inhibition of porcine myometrial contractility by 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol*. 1998;123(2):173-82.
79. Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EA, Saxena PR, Vulto AG, et al. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *Journal of hypertension*. 2006;24(7):1345-53.
80. Bolte AC, van Geijn HP, Dekker GA. Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2001;95(1):12-21.
81. Brew O, Sullivan MH. The links between maternal histamine levels and complications of human pregnancy. *Journal of reproductive immunology*. 2006;72(1-2):94-107.
82. Delaney C, Gien J, Roe G, Isenberg N, Kailey J, Abman SH. Serotonin contributes to high pulmonary vascular tone in a sheep model of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;304(12):L894-901.
83. Millan MJ, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in pharmacological sciences*. 2008;29(9):454-64.
84. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural brain research*. 2008;195(1):198-213.
85. Watts SW, Priestley JR, Thompson JM. Serotonylation of vascular proteins important to contraction. *PLoS one*. 2009;4(5):e5682.
86. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacological reviews*. 2012;64(2):359-88.
87. Machida T, Ohta M, Onoguchi A, Iizuka K, Sakai M, Minami M, et al. 5-Hydroxytryptamine induces cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells: Mechanisms involving Src, PKC and MAPK activation [corrected]. *European journal of pharmacology*. 2011;656(1-3):19-26.
88. Ayme-Dietrich E, Aubertin-Kirch G, Maroteaux L, Monassier L. Cardiovascular remodeling and the peripheral serotonergic system. *Archives of cardiovascular diseases*. 2017;110(1):51-9.
89. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2002;71(4):533-54.

90. Doggrell SA. The role of 5-HT on the cardiovascular and renal systems and the clinical potential of 5-HT modulation. *Expert opinion on investigational drugs*. 2003;12(5):805-23.
91. Karlsson C, Bodelsson G, Bodelsson M, Stjernquist M. Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating circular smooth muscle contraction in the human umbilical artery. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1999;47(2):102-7.
92. Kaumann A, Levy F. 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;111(3):674-706.
93. Neumaier NMBaJF. *Neuronal 5-HT Receptors and SERT*. Tocris Bioscience 2010.
94. Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle C. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br J Pharmacol*. 1999;127(5):1247-55.
95. Ellwood AJ, Curtis MJ. Involvement of 5-HT(1B/1D) and 5-HT2A receptors in 5-HT-induced contraction of endothelium-denuded rabbit epicardial coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 1997;122(5):875-84.
96. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics*. 2001;92(2-3):179-212.
97. Hinton JM, Hill P, Jeremy J, Garland C. Signalling pathways activated by 5-HT(1B)/5-HT(1D) receptors in native smooth muscle and primary cultures of rabbit renal artery smooth muscle cells. *Journal of vascular research*. 2000;37(6):457-68.
98. Young MS, Iwanov V, Moulds RFW. Interaction between Platelet-Released Serotonin and Thromboxane A2 on Human Digital Arteries. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1986;13(2):143-52.
99. Cocks TM, Kemp BK, Pruneau D, Angus JA. Comparison of contractile responses to 5-hydroxytryptamine and sumatriptan in human isolated coronary artery: synergy with the thromboxane A2-receptor agonist, U46619. *British Journal of Pharmacology*. 1993;110(1):360-8.
100. Pauwels PJ, Van Gompel P, Leysen JE. Rapid desensitization and resensitization of 5-HT2 receptor mediated phosphatidyl inositol hydrolysis by serotonin agonists in quiescent calf aortic smooth muscle cells. *Life sciences*. 1990;47(22):2009-19.
101. Dickenson JM, White TE, Hill SJ. The effects of elevated cyclic AMP levels on histamine-H1-receptor-stimulated inositol phospholipid hydrolysis and calcium mobilization in the smooth-muscle cell line DDT1MF-2. *Biochemical Journal*. 1993;292(2):409-17.
102. Janssen P, Prins NH, Meulemans AL, Lefebvre RA. Smooth muscle 5-HT2A receptors mediating contraction of porcine isolated proximal stomach strips. *Br J Pharmacol*. 2002;137(8):1217-24.
103. Janssen P, Prins NH, Meulemans AL, Lefebvre RA. Pharmacological characterization of the 5-HT receptors mediating contraction and relaxation of canine isolated proximal stomach smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 2002;136(2):321-9.

104. Lychkova AE, Pavone LM. Role of serotonin receptors in regulation of contractile activity of urinary bladder in rabbits. *Urology*. 2013;81(3):696 e13-8.
105. Kawanishi T, Kiuchi T, Asoh H, Shibayama R, Kawai H, Ohata H, et al. Effect of tributyltin chloride on the release of calcium ion from intracellular calcium stores in rat hepatocytes *Biochemical Pharmacology*. 2001;62(7):863-72.
106. Campos-Bedolla P, Vargas MH, Calixto E, Segura P, Mendoza-Patino N, Figueroa A, et al. Alpha-methyl-5-HT, a 5-HT₂ receptor agonist, stimulates beta₂-adrenoceptors in guinea pig airway smooth muscle. *Pharmacological research*. 2006;54(6):468-73.
107. Heidmann DEA, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. Four 5-Hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) Receptor Isoforms in Human and Rat Produced by Alternative Splicing: Species Differences Due to Altered Intron-Exon Organization. *Journal of Neurochemistry*. 2002;68(4):1372-81.
108. Prause AS, Stoffel MH, Portier CJ, Mevissen M. Expression and function of 5-HT₇ receptors in smooth muscle preparations from equine duodenum, ileum, and pelvic flexure. *Research in veterinary science*. 2009;87(2):292-9.
109. Heidmann DEA, Szot P, Kohen R, Hamblin MW. Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology*. 1998;37(12):1621-32.
110. Tonini M, Vicini R, Cervio E, De Ponti F, De Giorgio R, Barbara G, et al. 5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1557-66.
111. Irving HR, Tan YY, Tochon-Danguy N, Liu H, Chetty N, Desmond PV, et al. Comparison of 5-HT₄ and 5-HT₇ receptor expression and function in the circular muscle of the human colon. *Life sciences*. 2007;80(13):1198-205.
112. Janssen P, Prins NH, Moreaux B, Meulemans AL, Lefebvre RA. Characterization of 5-HT₇-receptor-mediated gastric relaxation in conscious dogs. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;289(1):G108-15.
113. O. EABaTO. Vascular Effects of Histamine. *Niger J Physiol Sci* 2014.
114. Lee SE, Kim DH, Kim YC, Han JH, Choi W, Kim CH, et al. H₂ Receptor-Mediated Relaxation of Circular Smooth Muscle in Human Gastric Corpus: the Role of Nitric Oxide (NO). *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18(5):425-30.
115. Nagai S, Tsurumaki T, Abe H, Higuchi H. Functional serotonin and histamine receptor subtypes in porcine ciliary artery in comparison with middle cerebral artery. *European journal of pharmacology*. 2007;570(1-3):159-66.
116. Jin H, Koyama T, Hatanaka Y, Akiyama S, Takayama F, Kawasaki H. Histamine-induced vasodilation and vasoconstriction in the mesenteric resistance artery of the rat. *European journal of pharmacology*. 2006;529(1-3):136-44.

117. Jarajapu YP, Oomen C, Uteshev VV, Knot HJ. Histamine decreases myogenic tone in rat cerebral arteries by H₂-receptor-mediated KV channel activation, independent of endothelium and cyclic AMP. *European journal of pharmacology*. 2006;547(1-3):116-24.
118. Chiba S, Tsukada M. Mechanisms for histamine H₁ receptor-mediated vasodilation in isolated canine lingual arteries. *European journal of pharmacology*. 1997;329(1):63-8.
119. Whyment AD, Blanks AM, Lee K, Renaud LP, Spanswick D. Histamine excites neonatal rat sympathetic preganglionic neurons in vitro via activation of H₁ receptors. *Journal of neurophysiology*. 2006;95(4):2492-500.
120. Hide M, Fukui H, Watanabe T, Wada H, Yamamoto S. Histamine H₁-receptor in endothelial and smooth muscle cells of guinea-pig aorta. *European journal of pharmacology*. 1988;148(2):161-9.
121. Ji Hoon Jeong MCY, Chang Yell Shin, Tai Sang Lee, Hyun Ju Song, and Uy Dong Sohn. Signaling via Histamine Receptors in Cat Duodenal Smooth Muscle Cells. *Molecular and Cells*. 2003;16(2):180-6.
122. Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjork HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *Journal of neurophysiology*. 2003;89(5):2441-8.
123. Chiba S. TM. Histamine-induced vasodilations mediated by H₁- and H₂-receptors in isolated rat common carotid arteries *Heart and Vessels*. 1991(6):185-90
124. Tawakol A, Omland T, Creager MA. Direct effect of ethanol on human vascular function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;286(6):H2468-73.
125. Altura BM, Altura BT, Carella A. Ethanol produces coronary vasospasm: evidence for a direct action of ethanol on vascular muscle. *British Journal of Pharmacology*. 1983;78(2):260-2.
126. Saldanha PA, Cairrao E, Maia CJ, Verde I. Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2013;40(3):181-9.
127. Cairrao E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I. Non-genomic vasorelaxant effects of 17beta-estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition. *Acta pharmacologica Sinica*. 2012;33(5):615-24.
128. Glória S. Efeitos do tributilestanho a nível vascular. Covilhã: Universidade da Beira Interior; 2016.
129. Kanada A, Yamaguchi JY, Nishimura Y, Oyama TM, Satoh M, Katayama N, et al. Tri-n-butyltin-induced blockade of store-operated calcium influx in rat thymocytes. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2006;22(2):213-8.
130. Reader S, Moutardier V, Denizau F. Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes: the role of Ca²⁺, protein kinase C and proteases. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1448(3):473-85.

131. Garcia-Carrillo S, Aranda FJ, Ortiz A, Teruel JA. Kinetic characterization of Ca(2+)-ATPase (SERCA1) inhibition by tri-n-butyltin(IV) chloride. A docking conformation proposal. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2015;33(6):1211-24.
132. Isomura M, Kotake Y, Masuda K, Miyara M, Okuda K, Samizo S, et al. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca(2+)-mediated mechanism. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;272(1):137-46.
133. Solomon R, Krishnamurty V. The effect of tributyltin chloride on vascular responses to atrial natriuretic peptide. *Toxicology*. 1992;76(1):39-47.