



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Estudo dos Efeitos Genómicos e Não Genómicos do Di(2-Etilhexil) Ftalato a Nível Vascular**

**Regina Maria Marques Azevedo**

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

Orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños  
Co-orientadora: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues

**Covilhã, outubro de 2016**

Folha em branco

## Dedicatória

*À minha Mãe  
que me ensinou a nunca  
desistir dos meus sonhos.*

Folha em branco

# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños, e coorientadora, Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues, por me terem confiado este projeto, pela orientação, pelos ensinamentos teóricos e práticos, e acima de tudo pela paciência e disponibilidade demonstradas.

Quero agradecer também ao Professor Doutor Cláudio Maia pela paciência, ajuda, e conhecimentos teóricos e práticos transmitidos sobre o PCR em tempo real.

Às minhas colegas de laboratório, Melissa Mariana e Joana Feteiro, obrigada pelos ensinamentos práticos e pela disponibilidade. À Solange Glória e à Nádia Oliveira agradeço a amizade, o companheirismo e a cumplicidade, todos os momentos de trabalho e diversão, e por nunca me terem deixado desistir.

Não podia deixar de agradecer às “minhas crianças”, Júlio César, Andreia Amaral, Joana Rodrigues, Ivo Duarte e Miguel Fraga, por serem a minha família do coração, por todos os jantares, cafés, discussões e sorrisos, por não terem deixado morrer a nossa vida social neste ano de malucos e por nunca terem desistido de mim.

À minha Mãe agradeço todo o amor, apoio e a confiança. Obrigada por nunca teres deixado de acreditar em mim e por teres feito de mim o que sou hoje, sem ti nada disto teria sido possível! À minha Avó e ao meu Padrinho agradeço todos os valores, apoio e preocupação. Obrigada família, por serem os meus pilares e exemplos.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer ao João. Porque mesmo não estando comigo desde o início desta etapa, acreditou sempre em mim e ajudou-me em tudo o que estive e não estive ao seu alcance. Obrigada por seres o meu porto de abrigo.

Folha em branco

# Resumo

O di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) é um agente plastificante bastante utilizado no cloreto polivinílico (PVC) para aumentar a sua flexibilidade, elasticidade e maleabilidade. As maiores fontes de exposição ao DEHP incluem produtos de uso doméstico, como os brinquedos, tintas, papéis de parede, mobília, adesivos e luvas; também está presente no pó, em embalagens de alimentos e dispositivos médicos. Uma das características mais importantes dos ftalatos prende-se com o facto de estes não se ligarem covalentemente aos plásticos, tornando-os altamente suscetíveis de se libertarem na atmosfera, nos alimentos ou diretamente nos fluídos corporais. Os ftalatos são conhecidos pelas suas características de disruptor endócrino, associadas à obesidade, diabetes e infertilidade. No entanto os seus efeitos a nível vascular ainda não são bem conhecidos.

O efeito do DEHP na contratilidade da artéria umbilical humana (AUH) foi avaliado pela técnica de banho de órgãos. Anéis de AUH sem endotélio foram incubados com DEHP (1 nM, 10 e 100  $\mu$ M) durante 24h, posteriormente contraídos com serotonina (5-HT) (1  $\mu$ M), histamina (10  $\mu$ M) e KCl (60 mM), e o efeito de concentrações crescentes de DEHP (1 nM - 100  $\mu$ M) foi avaliado. Já o efeito da exposição ao DEHP (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) na expressão de mRNA dos recetores 5-HT<sub>2A</sub> e HR-H<sub>1</sub> em células do músculo liso da artéria umbilical humana (HUASMC) foi avaliado por qPCR.

Com base nos resultados obtidos concluiu-se que o DEHP pode agir como vasorelaxante direto da AUH, mas também provoca efeitos genómicos que podem alterar significativamente o efeito direto. Os resultados sugerem que os efeitos genómicos alteram o metabolismo do cálcio intracelular, mudando a resposta contráctil e vasorelaxante da AUH.

## Palavras-chave

DEHP, Artéria Umbilical Humana (AUH), Banho de Órgãos, Células do Músculo Liso da Artéria Umbilical Humana (HUASMC), PCR quantitativo (qPCR)

Folha em branco

# Abstract

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer widely used in polyvinyl chloride (PVC) to increase flexibility, elasticity and pliability. In addition to medical devices as blood bags, catheters, tubes and gloves, humans are exposed to DEHP through ingestion of house dust, food that has been storage in plastic packs, dermal uptake from cosmetics and inhalation of covering materials and paints. Phthalates are highly susceptible to leach from the polymer matrix once they are not covalently bound to it. Phthalates are known for their endocrine disrupting properties which are related to obesity, diabetes and fertility problems. However, the effects of phthalates at vascular level are not well described yet.

The effect of DEHP in human umbilical artery (HUA) contractility was studied using organ bath techniques. Rings of HUA without endothelium were incubated with different concentrations of DEHP (1 nM, 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M) for 24h, then contracted by serotonin (1  $\mu$ M), histamine (10  $\mu$ M) and KCl (60 mM) and the effect of crescent concentrations of DEHP (1nM - 100 $\mu$ M) was analysed. Also, mRNA expression of serotonin receptor 5-HT<sub>2A</sub> and histamine receptor HR-H1 in human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC) exposed to different concentrations of DEHP (1nM, 10 nM, 100 nM, 1 $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 100 $\mu$ M) was evaluated by qPCR.

Consistent with the obtained data it was concluded that DEHP may act as a HUA direct vasorelaxant, though genomic effects may arise unbalancing the direct effects. These results suggest that the genomic effects distort intracellular calcium metabolism, modifying the contractile and vasorelaxant response of the HUA.

## Keywords

DEHP, Human Umbilical Artery (HUA), Organ Bath, Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells (HUASMC), Quantitative PCR (qPCR)

Folha em branco

# Índice

Dedicatória .....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo .....	vii
Palavras-chave .....	vii
Abstract .....	ix
Keywords.....	ix
Lista de Figuras .....	xv
Lista de Tabelas .....	xvii
Lista de Acrónimos .....	xix
Capítulo I - Introdução .....	1
1.1. Sistema Endócrino .....	1
1.1.1. Hormonas.....	1
1.2. Disruptores Endócrinos.....	2
1.2.1. Ftalatos .....	3
1.2.2. Di(2-Etilexil) Ftalato.....	4
1.3. Cordão Umbilical .....	6
1.3.1 Artéria Umbilical Humana .....	8
1.4. Músculo Liso.....	9
1.4.1. Proteínas Contráteis.....	11
1.5. Contração do Músculo Liso .....	13
1.5.1. Regulação do Potencial de Membrana.....	13
1.5.2. Função do Cálcio na Contração do Músculo Liso Vascular .....	14
1.6. Relaxação do Músculo Liso Vascular .....	16
1.6.1. Nucleótidos Cíclicos .....	16
1.7. Canais Iónicos da AUH .....	17
1.7.1. Canais de Cálcio .....	17
1.7.2. Canais de Potássio.....	19
1.8. Mensageiros Químicos da AUH .....	20
1.8.1. Serotonina .....	20

1.8.2. Histamina .....	21
Capítulo II - Objetivos .....	22
Capítulo III - Materiais e Métodos .....	25
3.1. Materiais e Soluções .....	25
3.1.1. Soluções.....	25
3.1.2. DEHP.....	26
3.1.3. Materiais e Equipamentos.....	26
3.2. Métodos .....	27
3.2.1. Recolha do Cordão Umbilical.....	27
3.2.2. Contractilidade - Banho de órgãos .....	27
3.2.3. Cultura de HUASMC .....	28
3.2.4 Tratamento das HUASMC com DEHP .....	28
3.2.5. Ensaio de Viabilidade Celular - MTT .....	29
3.2.6. Extração do RNA total .....	29
3.2.7. Retrotranscrição.....	30
3.2.8. PCR em Tempo Real (qPCR) .....	30
3.3. Análise Estatística.....	31
Capítulo IV - Resultados.....	33
4.1. Contractilidade - Banho de Órgãos.....	33
4.1.1. Efeito vasorelaxante do DEHP.....	33
4.1.2. Efeito da pré-incubação com DEHP sobre contrações induzidas por 5-HT .	34
4.1.3. Efeito da pré-incubação com DEHP em contrações induzidas por histamina.....	36
4.1.4. Efeito da pré-incubação com DEHP em contrações induzidas por KCl .....	38
4.2. Citotoxicidade .....	39
4.2.1. Efeito da exposição ao DEHP na viabilidade celular - MTT .....	40
4.3. Análise da Expressão de mRNA .....	40
4.3.1. Efeito da exposição ao DEHP na expressão do 5-HT <sub>2A</sub> .....	40
4.3.2. Efeito da exposição ao DEHP na expressão do HR-H1.....	41
Capítulo V - Discussão .....	42
Capítulo VI - Conclusão.....	47

Bibliografia .....	49
Anexos.....	57
Anexo I - Poster apresentado no XI ANNUAL CICS-UBI SYMPOSIUM 2016 .....	57

Folha em branco

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Estrutura química geral dos ftalatos. ....	3
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do Di(2-etilhexil) ftalato .....	5
<b>Figura 3</b> - Representação ilustrativa da constituição do cordão umbilical humano .....	7
<b>Figura 4</b> - Representação de um corte histológico transversal do cordão umbilical humano....	8
<b>Figura 5</b> - Ilustração das diferentes camadas que constituem a artéria.....	8
<b>Figura 6</b> - Imagem ilustrativa de uma célula muscular lisa. ....	10
<b>Figura 7</b> - Representação das possíveis transições entre os fenótipos sintético e contrátil das células musculares lisas .....	10
<b>Figura 8</b> - Imagem representativa da organização funcional dos filamentos finos e grossos ..	13
<b>Figura 9</b> - Imagem representativa do mecanismo de contração dependente de cálcio nas células musculares lisas. ....	15
<b>Figura 10</b> - Imagem representativa da estrutura de um canal de cálcio dependente de voltagem .....	18
<b>Figura 11</b> - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP em AUH não incubadas. ....	34
<b>Figura 12</b> - Efeito da exposição das AUH ao DEHP em contrações induzidas por 5-HT .....	35
<b>Figura 13</b> - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP em contrações induzidas por 5-HT em AUH incubadas.....	36
<b>Figura 14</b> - Efeito da exposição das AUH ao DEHP em contrações induzidas por histamina ...	36
<b>Figura 15</b> - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP em contrações induzidas por histamina em AUH incubadas .....	37
<b>Figura 16</b> - Efeito da exposição das AUH ao DEHP em contrações induzidas por KCl .....	38
<b>Figura 17</b> - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP em contrações induzidas por KCl em AUH incubadas.....	39
<b>Figura 18</b> - Efeito do DEHP na viabilidade celular de células musculares lisas de artéria umbilical humana .....	40
<b>Figura 19</b> - Efeito da exposição ao DEHP na expressão de 5-HT <sub>2A</sub> em células musculares lisas da artéria umbilical humana.....	41
<b>Figura 20</b> - Efeito da exposição ao DEHP na expressão de HR-H1 em células musculares lisas da artéria umbilical humana.....	41

Folha em branco

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos, vias de exposição e fontes de disruptores endócrinos comuns. ....	2
Tabela 2 - Ftalatos de baixo e alto peso molecular .....	4
Tabela 3 - Lista de metabolitos do DEHP .....	5
Tabela 4 - Soluções utilizadas na realização do trabalho. ....	25
Tabela 5 - Materiais, equipamentos e softwares utilizados na realização do trabalho. ....	26
Tabela 6 - Primers utilizados para PCR em tempo real. ....	31

Folha em branco

# Lista de Acrónimos

5-HT	5-hidroxitriptamina; Serotonina
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenosina Trifosfatase
AUH	Artéria Umbilical Humana
BK <sub>Ca</sub>	Canais de Potássio Ativados por Cálcio de Elevada Condutância
BSA	Albumina do Soro Bovino
Ca <sup>2+</sup>	ião Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloreto de Cálcio Dihidratado
CaM	Calmodulina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
Cl <sup>-</sup>	ião Cloro
Cl <sub>Ca</sub>	Canais de Cloro Ativados por Cálcio
CML	Células Musculares Lisas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DEHP	Di(2-etilhexil) Ftalato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM-F12	Solução de Dulbecco's Modified Eagle's Medium / F12
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Fosfatados
EDC	Disruptores Endócrinos
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
F-actina	Actina Filamentosa
FBS	Soro Fetal Bovino
FGF	Fator de Crescimento Fibróblástico
G-actina	Actina Globular
GC	Guanilil Ciclase
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclica
GTP	Guanosina Trifosfato
HEPES	Ácido 2[4-(-2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanossulfónico
HVA	Canais de Cálcio Ativados por Alta Voltagem
HUASMC	Células Musculares Lisas da Artéria Umbilical Humana
IK <sub>Ca</sub>	Canais de Potássio Ativados por Cálcio de Condutância Intermédia
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5- Trifosfato

K <sup>+</sup>	lão Potássio
K <sub>ATP</sub>	Canais de Potássio Sensíveis ao ATP
K <sub>Ca</sub>	Canais de Potássio Ativados pelo Cálcio
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrogenofosfato de Potássio
K <sub>IR</sub>	Canais de Potássio Inward-rectifier
K <sub>V</sub>	Canais de Potássio Dependentes de Voltagem
LTCC	Canais de Cálcio do Tipo L
LVA	Canais de Cálcio Ativados por Baixa Voltagem
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
MLC <sub>20</sub>	Cadeia Leve Reguladora de Miosina
MLCK	Cinase das Cadeias Leves de Miosina
MLCP	Fosfatase da Cadeia Leve de Miosina
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
Na <sup>+</sup>	lão Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Hidrogenofosfato Dissódico
NO	Óxido Nítrico
PBS	Solução Fosfato-salino Diluído
PCR	Polymerase Chain Reaction
pGC	Guanilil Ciclase Particulada
PKA	Proteína Cinase Dependente do AMPc
PKC	Proteína Cinase C
PKG	Proteína Cinase Dependente do GMPc
PSS	Solução Salina Fisiológica
PVC	Policloreto de Vinílo
qPCR	PCR quantitativo; PCR em Tempo Real
ROC	Canais de Cálcio Operados por Recetores
ROCK	Rho Cinase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNases	Ribonucleases
SAA	Solução Antibiótico-antimicótico
SAC	Canais de Cálcio Ativados por Stress
sGC	Guanilil Ciclase Solúvel
SK <sub>Ca</sub>	Canais de Potássio Ativados por Cálcio de Baixa Condutância
SOC	Canais de Cálcio Operados por Depósitos Intracelulares
TTCC	Canais de Cálcio do Tipo T

VOCC

Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem

Folha em branco

# Capítulo I - Introdução

## 1.1. Sistema Endócrino

O sistema endócrino é um dos principais sistemas de regulação das funções do corpo humano. É constituído por glândulas endócrinas e por células secretoras de hormonas localizadas em vários órgãos como o coração, o fígado, os rins e o tecido adiposo. Devido à ausência de ductos, os produtos de secreção das glândulas endócrinas, as hormonas, são libertadas no fluído intersticial e entram na corrente sanguínea para serem transportados ao longo do corpo, influenciando apenas as células efetoras que possuem recetores específicos [1-3].

### 1.1.1. Hormonas

As hormonas são mensageiros químicos que regulam funções corporais como o crescimento, desenvolvimento, metabolismo, funções sexuais e reprodutoras, funções cognitivas e a termorregulação. Com base na sua composição química, as hormonas podem ser classificadas como proteínas, péptidos, monoaminas, derivados de aminoácidos, esteroides e lípidos [2]. Dependendo da estrutura química existem diferentes tipos de recetores. Assim, por exemplo, as hormonas proteicas interagem com recetores membranares e desencadeiam respostas rápidas, e as hormonas esteroides tanto podem ligar-se a recetores nucleares como a recetores membranares.

Reduzidas concentrações hormonais causam efeitos consideráveis nos processos metabólicos [3, 4]. De forma a manter a homeostase, a secreção hormonal é regulada por três mecanismos distintos. A secreção de algumas hormonas é regulada pela concentração de outra substância que não é uma hormona ou um neurotransmissor. A secreção de outras hormonas é regulada por estímulos nervosos. Por fim, algumas glândulas endócrinas secretam hormonas em resposta a estímulos hormonais produzidos por outras glândulas [3].

Devido à importância do sistema endócrino na regulação das funções biológicas e fisiológicas, as disfunções no mesmo podem originar doenças ou mesmo causar a morte. A secreção excessiva ou deficiente de hormonas pode provocar distúrbios metabólicos, infertilidade, perturbações do sono, bem como outras doenças agudas e crónicas [3, 4].

## 1.2. Disruptores Endócrinos

Em 2015, no “*Endocrine Society’s Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals*”, definiram-se os disruptores endócrinos (EDC; “*endocrine-disrupting chemicals*”) como “substâncias químicas, ou mistura de substâncias químicas, exógenas que interferem com qualquer vertente da ação hormonal” [4]. Muitos EDC, quando absorvidos, afetam o normal funcionamento do corpo porque se ligam a receptores hormonais atuando como agonistas ou antagonistas dos mesmos, mimetizando ou bloqueando a ação hormonal. Também podem interferir nos mecanismos de transdução do sinal hormonal ou alterar o número de receptores nos diferentes tipos de células e as concentrações das hormonas em circulação [4-6].

Os EDCs incluem uma vasta gama de substâncias, tanto naturais como sintéticas [6], na sua maioria, persistentes e bioacumulativas, incluindo dioxinas, pesticidas e plastificantes, que podem ser encontradas em produtos de uso diário, como garrafas de plástico, latas de comida, detergentes, retardadores de chamas, brinquedos e cosméticos [6, 7]. Na Tabela 1 estão descritos alguns tipos de EDC, bem como as suas fontes e vias de exposição.

Tabela 1 - Tipos, vias de exposição e fontes de disruptores endócrinos comuns. Adaptado de [4, 6].

Tipo	EDC	Via de Exposição	Fontes
Herbicida clorotriazina	Atrazina (ATR)	Ingestão e inalação	Pesticidas/herbicidas; água e solos contaminados
Bisfenol	Bisfenol A (BPA)	Ingestão, inalação e absorção cutânea	Brinquedos e garrafas de plástico; revestimento de latas de comida
Herbicidas organoclorados	Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	Ingestão, inalação e absorção cutânea	Água contaminada; peixe e hortícolas
	Bifenilos policlorados (PBC)	Ingestão, inalação e absorção cutânea	Água e alimentos contaminados; material elétrico antigo
Estrogénios sintéticos não esteroides	Dietilestilbestrol (DES)	Ingestão e injeção	Fármacos

Derivados sintéticos do 17 $\beta$ -estradiol	Etinilestradiol (EE2)	Ingestão	Fármacos (contracetivos orais); água contaminada
Plastificantes	Ftalatos	Ingestão, inalação e absorção cutânea	Alimentos contaminados; cosméticos; equipamentos médicos em PVC
Fluorosurfactantes	Compostos perfluorados (PFC)	Ingestão e inalação	Água e alimentos contaminados; pó; cabos elétricos; revestimentos alimentares

Vários estudos sugerem que a exposição a diferentes EDC afeta a saúde humana, originando malformações no sistema reprodutor, problemas de desenvolvimento, e doenças cardiovasculares, como a doença da artéria coronária, hipertensão, aterosclerose e enfarte do miocárdio [8-14].

### 1.2.1. Ftalatos

Os ftalatos, ou diésteres de ácido ftálico (Figura 1), são plastificantes amplamente utilizados para aumentar a flexibilidade, elasticidade e maleabilidade de polímeros rígidos, como o policloreto de vinilo (PVC), chegando a representar 40% do produto final. Brinquedos, tintas, cosméticos e equipamentos médicos são alguns exemplos das várias aplicações dos ftalatos [6, 7, 15].

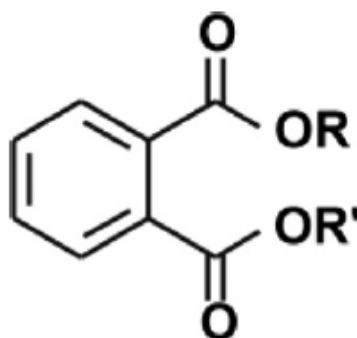


Figura 1 - Estrutura química geral dos ftalatos. Adaptado de [4].

Estes compostos podem ser classificados como sendo ftalatos de baixo ou alto peso molecular (Tabela 2). Contrariamente aos ftalatos de baixo peso molecular, os ftalatos de alto peso molecular caracterizam-se por terem uma baixa taxa de bioacumulação. Os primeiros, têm sido amplamente aplicados em cosméticos e embalagens de alimentos e fármacos. Os segundos, são aplicados como plastificantes do PVC em brinquedos, materiais de construção, embalagens de alimentos e dispositivos médicos [16-19].

Tabela 2 - Ftalatos de baixo e alto peso molecular [20].

Ftalatos de Baixo Peso Molecular	Ftalatos de Alto Peso Molecular
Dibutil ftalato (DBP)	Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP)
Dimetil ftalato (DMP)	Butilbenzil ftalato (BBzP)
Dietil ftalato (DEP)	Di-isononil ftalato (DiNP)
Di-isobutil ftalato (DiBP)	Di-n-octil ftalato (DnOP)
	Di-isodecil ftalato (DiDP)

Uma das características mais importantes dos ftalatos prende-se com o facto de estes não se ligarem covalentemente aos plásticos, sendo altamente provável a sua libertação na atmosfera, nos alimentos ou diretamente nos fluídos corporais [21, 22]. Assim, as principais vias de exposição aos ftalatos incluem o consumo de água e alimentos contaminados, absorção cutânea a partir de cosméticos, pó e a difusão direta para os fluídos quando é administrada medicação por via parentérica [18].

Após a exposição, o metabolismo dos ftalatos ocorre rapidamente e em duas fases distintas: fase I - hidrólise, e fase II - conjugação [22, 23]. Após a primeira fase a maioria dos monoésteres de ftalatos de baixo peso molecular são excretados na urina e fezes. Já os metabolitos dos ftalatos de elevado peso molecular são oxidados ou hidroxilados, originando metabolitos oxidativos [18]. Estes metabolitos oxidativos entram na segunda fase, onde formam conjugados glucorónicos hidrofílicos, facilmente excretados na urina em 24h [18, 22].

### 1.2.2. Di(2-Etilexil) Ftalato

O Di(2-Etilexil) ftalato (DEHP) é um líquido oleoso e de baixa volatilidade utilizado como plastificante do PVC [24]. Este ftalato é produzido através da reação do 2-etilhexiletanol com o ácido ftálico. Na Figura 2 está representada a sua estrutura química. As maiores fontes de

exposição ao DEHP incluem produtos de uso doméstico, como os brinquedos, tintas, papéis de parede, mobília, adesivos e luvas; também está presente no pó, em embalagens de alimentos, dispositivos médicos, álcool isopropílico, fluidos hidráulicos e dielétricos, detergentes líquidos, lubrificantes industriais e na indústria do papel [20, 24].

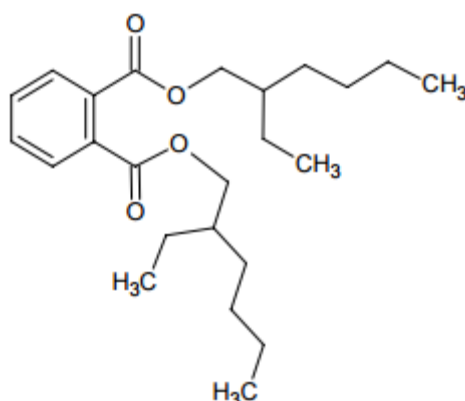


Figura 2 - Estrutura química do Di(2-etilhexil) ftalato. Adaptado de <http://www.plasticisers.org>, acedido em 05/10/2016.

O DEHP é altamente hidrofóbico e, tal como é característica dos ftalatos, não se liga covalentemente ao PVC, libertando-se para o ambiente, alimentos, sangue ou outros fluidos com que entre em contacto [25]. A taxa de migração do DEHP depende das condições de armazenamento e da lipofilicidade dos fluidos com que está em contacto [12].

Após a exposição, o DEHP é metabolizado em mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP), que é posteriormente oxidado noutros metabolitos (Tabela 3) que são eliminados na urina [22]. O nível de exposição ao DEHP, e aos seus metabolitos, varia com o género, idade, estilo de vida e a utilização de dispositivos médicos [12].

Tabela 3 - Lista de metabolitos do DEHP. Adaptada de [20].

Ftalato	Metabolitos
	Mono(2-etilhexil) Ftalato (MEHP)
	Mono(2-etil-5-hidroxihexil) Ftalato (MEHHP)
	Mono(2-etil-5-oxohexil) Ftalato (MEOHP)

Di(2-etilhexil) Ftalato	Mono(2-etil-5-carboxipentil) Ftalato (MECCP)
	Mono-[2-(carboximetil)hexil] Ftalato (MCMHP)

### Efeitos do DEHP a Nível Vascular

Devido às toneladas de produtos de PVC produzidos e utilizados anualmente, o DEHP é um dos ftalatos que mais preocupação causa. Sabe-se que este composto é tóxico e carcinogénico, afeta o sistema reprodutor, o desenvolvimento e função dos cardiomiócitos em modelos animais [20]. Em humanos sabe-se muito pouco sobre os efeitos do DEHP a nível cardiovascular. O MEHP (metabolito maioritário do DEHP) foi associado com a doença da artéria coronária e a arterioesclerose [10, 26]; já elevadas concentrações de DEHP na urina foram associadas com o aumento da pressão arterial [14].

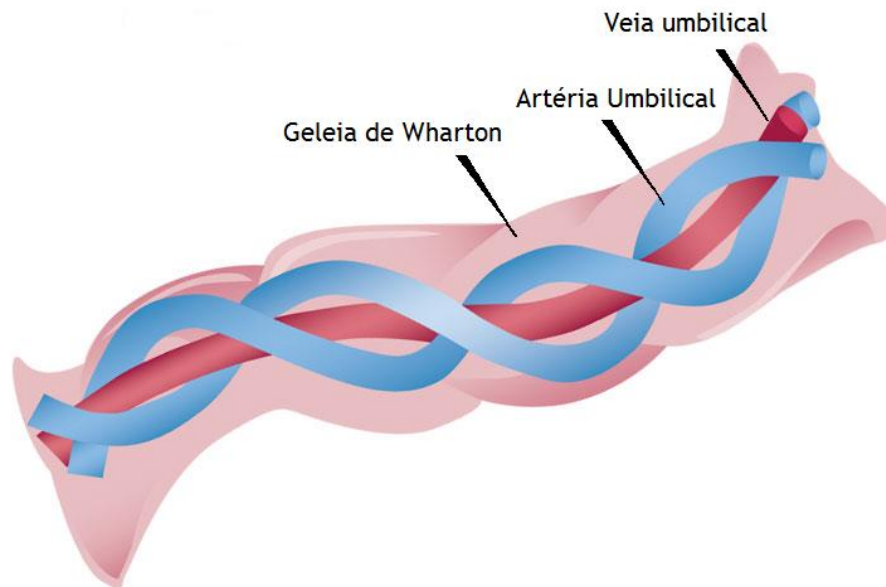
### **1.3. Cordão Umbilical**

O cordão umbilical é um importante órgão da circulação feto-placentária, sendo responsável pela ligação entre a mãe e o feto. Este órgão tem como principal função o transporte de sangue e nutrientes, sendo fulcral ao bom desenvolvimento e bem-estar do feto [27].

As dimensões do cordão umbilical variam entre os 50 e os 60 cm de comprimento e 1 a 2 cm de diâmetro [27, 28]. No entanto, podem ocorrer variações nestas dimensões que influenciam a vida intrauterina: cordões excessivamente curtos (<30cm) podem originar malformações fetais e deslocamento prematuro da placenta; cordões longos (>65cm) estão associados a disfunções na circulação sanguínea e no fornecimento de nutrientes, abortos espontâneos, e morte fetal por hipoxia ou anoxia, provocadas por enrolamento ou torção do mesmo [28]. As alterações morfológicas e constitutivas do cordão umbilical podem influenciar todo o período de gestação e o nascimento, podendo estar associadas a patologias gestacionais, nomeadamente a diabetes, a pré-eclampsia e a hipertensão arterial [28].

O cordão umbilical trata-se de um órgão flexível, gelatinoso, esbranquiçado e brilhante, coberto por um epitélio simples, derivado do âmnio [29]. Este aspeto característico deve-se à Geleia de Wharton que é um tecido conjuntivo, e forma uma camada protetora em torno dos vasos sanguíneos. A GW é constituída por células suportadas por uma fina matriz extracelular composta, predominantemente, por água, glicosaminoglicanos, proteoglicanos (ácido hialurónico e sulfato de condroitina) e vários tipos de colagénio [28, 29].

Para além da Geleia de Wharton o cordão umbilical é constituído por uma veia e duas artérias, enroladas em hélice no sentido anti-horário (Figura 3). As duas artérias distinguem-se da veia através do seu calibre e consistência, uma vez que apresentam uma camada de células endoteliais e duas camadas de células musculares lisas, uma disposta circularmente e outra longitudinalmente. As artérias têm em média 3 mm de diâmetro, enquanto que a veia possui 6 mm. Além do maior espaço luminal, a veia umbilical é constituída por paredes finas, contrariamente às paredes espessas das artérias [28] (Figura 4). O transporte de sangue oxigenado proveniente da placenta é feito através da veia, as artérias transportam o sangue pouco oxigenado no sentido inverso [28-30].



*Figura 3 - Representação ilustrativa da constituição do cordão umbilical humano e da sua estrutura helicoidal anti-horária. As artérias umbilicais, transportadoras de sangue não oxigenado e a veia, responsável pela circulação de sangue oxigenado, envolvidas pela Geleia de Wharton que é constituída na sua maioria por tecido conjuntivo. Adaptado de <https://umbilicalstemcellsbanking.wordpress.com>, acedido em 02/10/2016.*

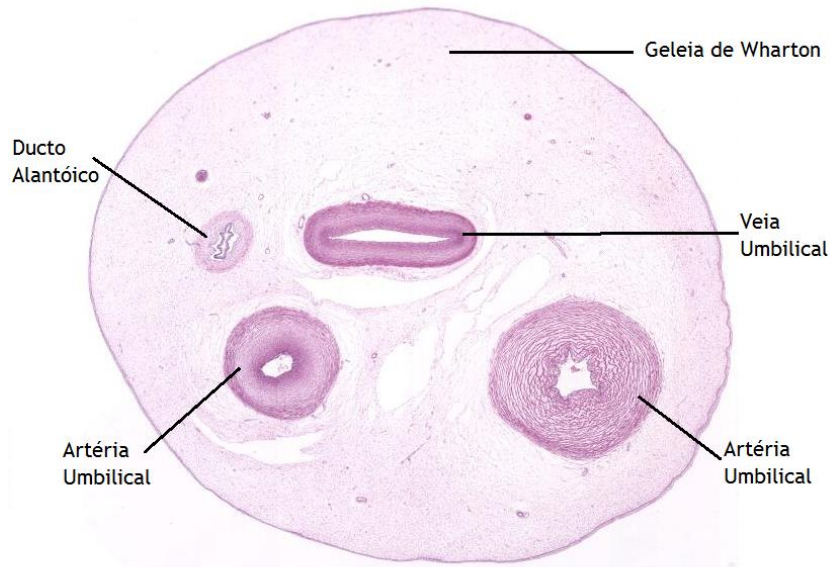


Figura 4 - Representação de um corte histológico transversal do cordão umbilical humano, no qual se observam as duas artérias umbilicais e a veia umbilical envolvidas pela Geleia de Wharton. Neste corte facilmente conseguimos observar as diferenças significativas relativamente aos calibres das artérias umbilicais em comparação ao da veia umbilical. É ainda possível observar o ducto alantóico. Adaptado de <https://www.best.edu.au>, acedido em 02/10/2016.

### 1.3.1 Artéria Umbilical Humana

No geral a parede das artérias humanas é constituída por três túnicas concêntricas: a túnica interna ou íntima, a túnica média e a túnica externa ou adventícia, partindo do lúmen para a parede exterior do vaso [3] (Figura 5).

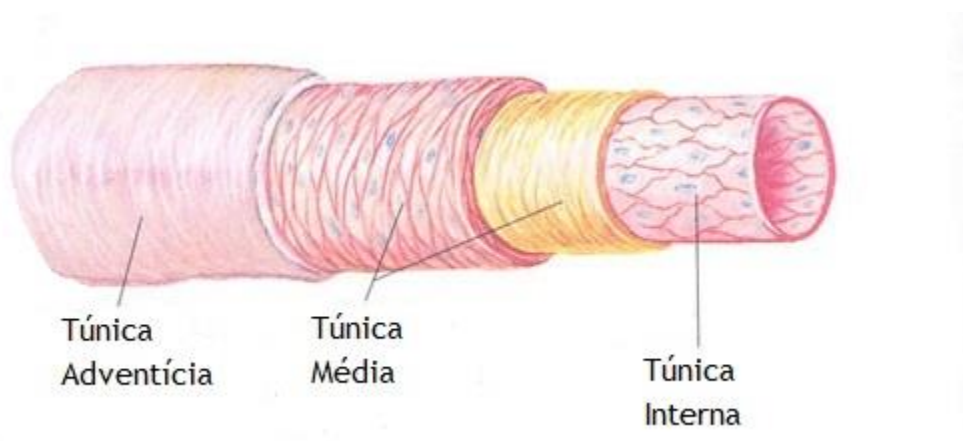


Figura 5 - Ilustração das diferentes camadas que constituem a artéria. Da camada mais interna para a periferia podem observar-se a túnica interna, constituída por células endoteliais, seguida pela túnica média, composta por células musculares lisas e por fim túnica adventícia, constituída por fibroblastos, fibras elásticas e colagénio. Adaptado de <http://www.auladeanatomia.com>, acedido em 04/10/2016.

A túnica interna ou íntima é constituída por células endoteliais e controla a permeabilidade e a regulação do tónus vascular. Esta camada deteta alterações hemodinâmicas e é suscetível a sinais ou estímulos químicos provenientes da corrente sanguínea, que são posteriormente transmitidos às células do músculo liso [31, 32].

A túnica média é formada por células musculares lisas (CML) e constituintes da matriz extracelular, sendo a principal responsável pela atividade contrátil da artéria. As CML têm uma forma alongada, com um único núcleo central, responsável pela sua forma convexa [3, 33].

A túnica média da artéria umbilical humana (AUH) é constituída por duas camadas de CML, uma interna e outra externa aos feixes musculares, designadas por membranas interna elástica e externa elástica, respetivamente. A primeira separa a túnica média da íntima e as CML que a constituem estão dispostas longitudinalmente na camada mais interna, já na camada mais externa estão dispostas de forma circular [30, 34].

A túnica adventícia é composta por fibroblastos e fibras elásticas e de colagénio. Esta camada contém ainda pequenos vasos que nutrem os tecidos constituintes das várias túnicas, *vasa vasorum*, e terminais nervosos, *nervi vasorum* [3, 35].

No caso da AUH as funções da camada adventícia e dos *vasa vasorum* são desempenhadas pela Geleia de Wharton, uma vez que esta não possui túnica adventícia diferenciada [36]. A geleia suporta estruturalmente os vasos sanguíneos do cordão e previne a sua hiperdistensão, enquanto que a túnica média muscular bem desenvolvida permite que as AUH variem de calibre consoante as necessidades metabólicas da região irrigada [30].

Uma vez que os vasos sanguíneos umbilicais não possuem fibras nervosas, o controlo do fluxo sanguíneo umbilical depende exclusivamente da ação de substâncias vasoativas libertadas localmente ou em circulação. As prostaglandinas, a serotonina, a histamina e alguns iões como o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o potássio ( $\text{K}^+$ ) são exemplos dessas substâncias [36].

## 1.4. Músculo Liso

O músculo liso está presente nos vasos sanguíneos, paredes do tubo digestivo, vias respiratórias, ureteres, útero e olhos, e executa um grande número de funções. A atividade contrátil deste tipo de tecido é involuntária e ocorre muito lentamente [31, 37].

O músculo liso é composto por CML (Figura 6) que, através das suas propriedades contráteis, conseguem alterar o diâmetro luminal dos vasos sanguíneos, regulando a pressão arterial, como resposta a estímulos hormonais e hemodinâmicos [38, 39]. As CML encontram-se dispostas em feixes fusiformes alongados e são revestidas por uma lâmina basal que lhes confere suporte e resistência. O tamanho destas células varia de 15 a 200  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5 a 10  $\mu\text{m}$  de

diâmetro, consoante os diferentes tipos de órgãos em que se localizam [31]. A monitorização da variação do tónus destas células permite estudar vários processos de sinalização envolvidos no controlo e modulação da reatividade vascular [38].

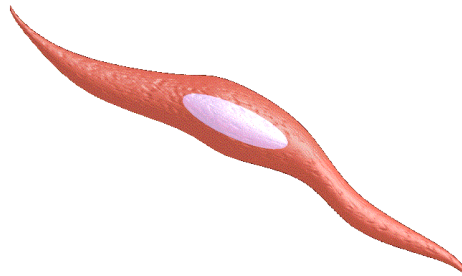


Figura 6 - Imagem ilustrativa de uma célula muscular lisa. Neste tipo celular é possível observar a forma alongada característica e o núcleo central. Adaptado de <http://molecularbiologynews.org>, acedido em 05/10/2016.

À semelhança de outras células, também as CML conseguem modificar reversivelmente o seu fenótipo como resposta a estímulos locais [38]. Assim, estas células podem ser diferenciadas entre contráteis e sintéticas. As CML de fenótipo sintético são menos alongadas e têm uma morfologia romboide, enquanto que as células com fenótipo contrátil se caracterizam por uma baixa taxa de proliferação e atividade sintética (Figura 7). É comum no fenótipo sintético ocorrer uma elevada taxa de síntese proteica, como consequência da presença do elevado número de organelos que a potenciam. Quando ocorre uma lesão vascular, as CML modificam o seu estado contráctil para o sintético e os filamentos contráteis são substituídos por proteínas que conferem às células elevadas taxas de crescimento e atividade migratória, contribuindo para o restabelecimento da homeostase [40, 41].

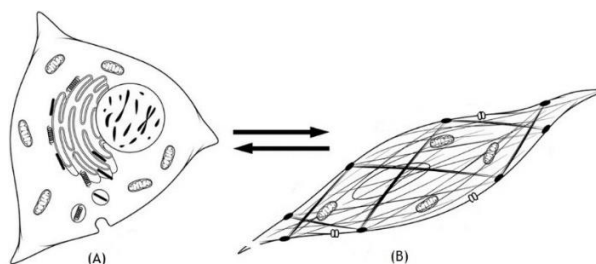


Figura 7 - Representação das possíveis transições entre os fenótipos sintético (A) e contrátil (B) das células musculares lisas e das suas características ultraestruturais. Em (A) podemos observar a sua forma romboide, assim como a diversidade de organelos celulares, contrariamente ao fenótipo (B), caracterizado pela presença de filamentos contráteis. Adaptado de [42].

Recorrendo à cultura celular é possível identificar ambos os fenótipos que, além das diferentes morfologias e taxas de proliferação, expressam diferentes proteínas [41]. A  $\alpha$ -actina do músculo liso, SM22- $\alpha$ , SM-calponina, h-caldesmona, smoothlina, telokina, metavinculina e desmina são características do fenótipo contrátil; já as proteínas predominantemente presentes no fenótipo sintético são a proteína de ligação ao retinol celular e a isoforma  $\beta$  não muscular da cadeia pesada da miosina [40, 41]. A multiplicidade fenotípica dificulta a cultura celular isolada. Porém, como já foi demonstrado, após serem incubadas durante 24 horas em meio sem soro estas culturas favorecem maioritariamente o fenótipo contrátil [43].

A grande capacidade de adaptação das CML a estímulos ambientais torna-se desvantajosa quando estas sofrem mudanças fenotípicas adversas que contribuem para o desenvolvimento e/ou avanço de doenças vasculares, como a aterosclerose, cancro e hipertensão [38].

#### 1.4.1. Proteínas Contráteis

As CML são compostas por três diferentes tipos de filamentos contráteis, os filamentos grossos constituídos por miosina, os filamentos finos compostos por actina e tropomiosina, e os filamentos intermédios constituídos por vimentina. Os filamentos de actina agrupam-se nos corpos densos celulares, dispostos irregularmente no citoplasma e na membrana plasmática. Os filamentos de miosina encontram-se em menor número e estão entrelaçados nos filamentos de actina, sem estarem em contacto com os corpos densos. Os filamentos de vimentina encontram-se ligados ao esqueleto celular, não estando associados a quaisquer proteínas contráteis [34, 44-46].

##### Filamentos Finos

Os filamentos finos possuem um calibre compreendido entre 6 e 8nm e são compostos predominantemente por actina filamentosa (F-actina). A F-actina é constituída por uma cadeia linear de subunidades de actina globular (G-actina), associada a três proteínas, nomeadamente, tropomiosina, caldesmona e calponina [47] (Figura 8).

No músculo liso estão presentes quatro isoformas de actina, sendo a  $\alpha$ -actina expressa no músculo esquelético, cardíaco e liso e as isoformas  $\beta$ -actina e  $\gamma$ -actina em células musculares e não-musculares. A  $\alpha$  e  $\gamma$ -actinas são também designadas isoformas contráteis, enquanto que as isoformas do citoesqueleto, denominadas por isoformas citoplasmáticas, são as beta e gama actina [48]. A  $\alpha$ -actina e a  $\gamma$ -actina ligam-se à miosina e à caldesmona durante a contração muscular, já a  $\beta$ -actina desempenha funções estruturais nas CML [49].

A tropomiosina é constituída por duas cadeias polipeptídicas entrelaçadas sob a forma de hélices  $\alpha$ , originando filamentos que correm ao longo do microfilamento de F-actina (Figura 8).

Esta proteína desempenha uma função determinante na interação actina-miosina, pois quando a tropomiosina se encontra ligada à actina, bloqueia o local de ligação da actina à miosina. A troponina é um complexo constituído por três subunidades que permite a ligação dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  à actina [49] (Figura 8).

A caldesmona é uma proteína com capacidade de ligação à actina, tropomiosina, miosina e calmodulina (CaM). Até à data, foram identificadas duas isoformas da caldesmona, sendo elas a h-caldesmona e a l-caldesmona. Porém, somente a isoforma h-7 caldesmona é expressa nas CML vasculares diferenciadas [49].

A calponina interage com a F-actina, miosina, tropomiosina e proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , inibindo a atividade da adenosina trifosfatase (ATPase) da miosina, bem como o movimento dos filamentos de actina sobre a miosina *in vitro* [50, 51].

### Filamentos Grossos

Os filamentos grossos têm entre 15 e 18 nm de diâmetro e são compostos por miosina (Figura 8). A miosina é uma ATPase dependente do ATP, que se movimenta ao longo das cadeias de actina e é a responsável pela contração muscular [52].

A miosina é composta por duas cadeias pesadas, duas cadeias leves alcalinas não fosforiláveis e por duas cadeias leves reguladoras (a sua forma assemelha-se à de um bastão). O dímero de cadeias pesadas, possui uma longa “cauda” formada por duas hélices alfa e na extremidade N-terminal duas “cabeças globulares” (Figura 8). Cada uma destas “cabeças” contém propriedades ATPase, sendo ativadas pela actina. Por conseguinte, a miosina converte a energia química armazenada em forma de ATP, refletindo-se num trabalho mecânico associado à contração muscular. Por esse motivo, a miosina é avaliada como uma proteína motora. O “pescoço” da miosina regula a atividade da “cabeça”, através da ligação à CaM e contém ainda sítios de ligação que determinam se a molécula se vai ligar à membrana plasmática ou a outras caudas para formar um novo filamento grosso [52] (Figura 8).

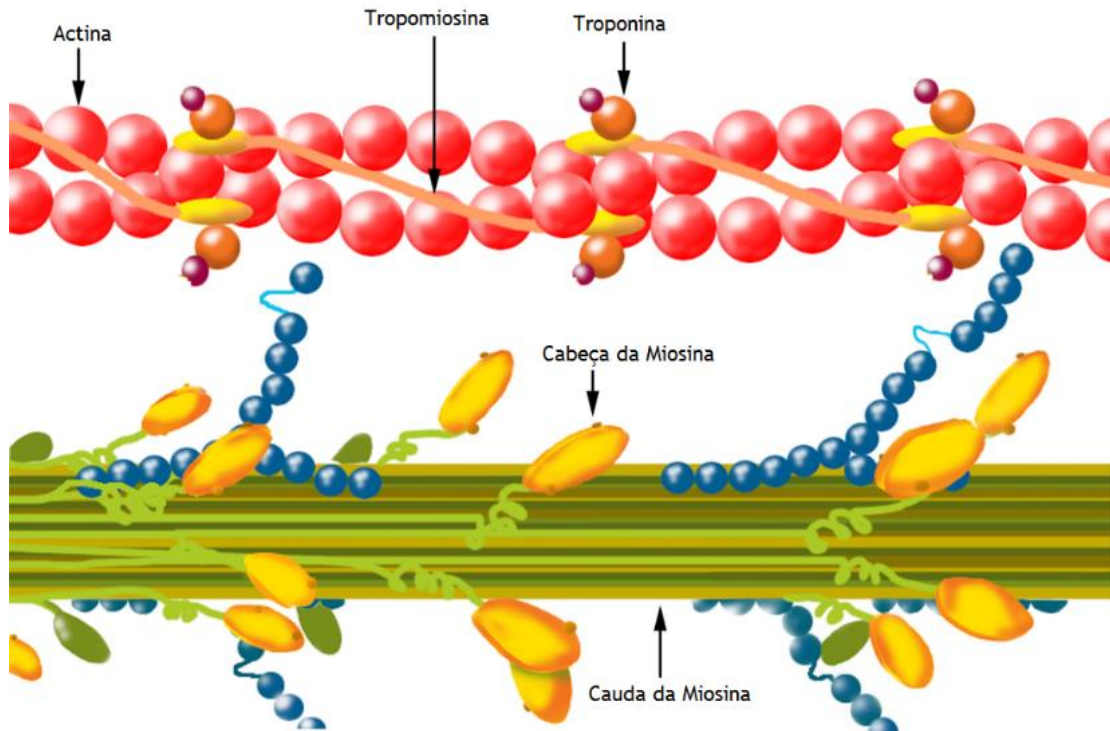


Figura 8 - Imagem representativa da organização funcional dos filamentos finos (actina) e grossos (miosina). É possível observar as restantes proteínas envolvidas no mecanismo contrátil (tropomiosina entrelaçada nos filamentos de actina; troponina associada à tropomiosina). Adaptado de [53].

## 1.5. Contração do Músculo Liso

A ativação das proteínas contráteis actina e miosina, assim como as alterações do potencial de membrana levam à ativação do mecanismo contrátil. O mecanismo contrátil das CML é controlado pelo sistema hormonal, nervoso autónomo e por mediadores locais. A regulação da contração é feita recorrendo a alterações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , isto é, os níveis intracelulares deste ião aumentam na presença de substâncias vasoconstritoras e diminuem com substâncias vasodilatadoras [54].

### 1.5.1. Regulação do Potencial de Membrana

As CML têm um potencial de membrana que varia entre os -40 mV e os -60 mV e uma pequena variação nesse potencial pode causar alterações significativas no diâmetro vascular [55-57]. Este potencial regula a contractilidade muscular mediante a abertura ou encerramento de canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC) [56, 58]. O potencial de membrana é também conhecido como um regulador da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico através do permutador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e da libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos depósitos intracelulares [56]. Outros canais que participam na regulação do potencial de membrana são os de potássio ( $\text{K}^+$ ), nomeadamente os canais de

potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ ), os canais de  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), os canais de  $K^+$  *inward-rectifier* ( $K_{IR}$ ) e os canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) [55, 57].

Também os canais de cloro ( $Cl^-$ ) têm sido descritos como tendo um papel essencial na regulação do tónus muscular. O gradiente eletroquímico do  $Cl^-$  promove a abertura dos canais, resultando na difusão deste ião para o espaço extracelular, após a despolarização da membrana e a abertura dos VOCC, o que leva à contração do músculo liso [59, 60]. Apesar de existirem diferentes tipos de canais de  $Cl^-$  (dependentes de voltagem, ativados pela adenosina monofosfato cíclica (AMPC), aniônicos regulados por volume e dependentes de  $Ca^{2+}$ ) nas CML vasculares apenas atuam os canais de  $Cl^-$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $Cl_{Ca}$ ) [60].

### 1.5.2. Função do Cálcio na Contração do Músculo Liso Vascular

Geralmente os fenómenos de contração e relaxamento do músculo liso estão dependentes do equilíbrio dos mecanismos que controlam o aumento ou decréscimo da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ . O controlo da entrada e saída deste ião do citosol é realizado pelos ciclos extracelular, onde o ião  $Ca^{2+}$  entra e sai do citosol através da membrana plasmática; e intracelular, no qual o ião circula entre os organelos intracelulares que o armazenam [54].

O ciclo das pontes cruzadas de actomiosina é o mecanismo fundamental para o desenvolvimento de tensão que leva à contração das CML, através da conversão da energia química em energia mecânica [45]. No músculo-esquelético o ciclo das pontes cruzadas é controlado pela troponina e pela proteína cinase das cadeias leves da miosina (MLCK). A troponina regula a interação entre a actina e a miosina na presença de tropomiosina e  $Ca^{2+}$  [61]. Contudo, a troponina não é expressa no tecido muscular liso, sendo a sua função desempenhada pela CaM, uma proteína com estrutura semelhante, que se liga ao ião  $Ca^{2+}$ , modificando a interação deste com outras proteínas [62].

O  $Ca^{2+}$  citosólico liga-se à CaM, alterando a sua conformação e formando o complexo  $Ca^{2+}/CaM$ , que por sua vez se liga à MLCK ( $Ca^{2+}/CaM/MLCK$ ). O complexo  $Ca^{2+}/CaM/MLCK$  ativa a  $MLC_{20}$ , permitindo que a miosina adenosina trifosfatase seja ativada pela actina, ocorrendo contração do músculo liso vascular, como resultado da interação entre a actina e a miosina. A desfosforilação da  $MLC_{20}$  desativa o mecanismo contráctil e está a cargo da fosfatase de serina/treonina do tipo I ou fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) [50] (Figura 9). Pode concluir-se que a fosforilação ou desfosforilação da  $MLC_{20}$  conduz à contração ou relaxamento do músculo liso, um processo mediado pela ação das enzimas MLCK e MLCP [63, 64].

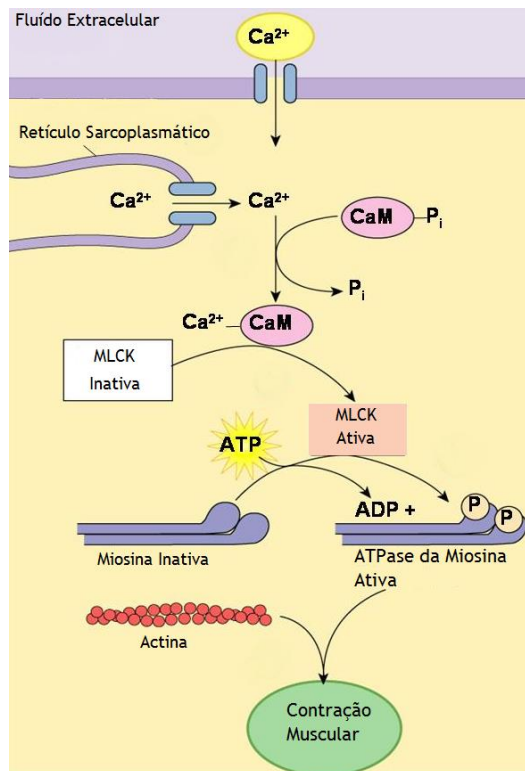


Figura 9 - Imagem representativa do mecanismo de contração dependente de cálcio nas células musculares lisas, após aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Como primeiro passo temos a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM, após o aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . O complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  associa-se à MLCK e forma um novo complexo,  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{MLCK}$ . Este complexo vai fosforilar a  $\text{MLC}_{20}$ . Deste modo, a ATPase da miosina associa-se à actina, sendo ativa, e esta associação conduz ao fenômeno da contração muscular.  $\text{Ca}^{2+}$ : Cálcio; CaM: Calmodulina; MLCK: Cinase das Cadeias Leves de Miosina;  $\text{MLC}_{20}$ : Cadeia Leve Reguladora da Miosina; ATPase: Adenosina Trifosfatase. Adaptado de <http://www.austincc.edu>, acessado em 06/10/2016.

Existe ainda uma outra via que regula a contratilidade do músculo liso devido a alterações na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo que esta é ativada por dois mecanismos que recorrem a agonistas vasculares [65, 66]. Um desses mecanismos é conhecido como “sensibilização ao cálcio”, onde ocorre fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  e o outro mecanismo envolve a família da MAPK [67].

Alguns agonistas de recetores membranares podem promover a ativação de recetores acoplados à proteína G que ativam a Rho. A proteína Rho, pertencente à família das Ras GTPases monoméricas, encontra-se envolvida em processos de motilidade celular e contração do músculo liso [68]. A via de sinalização da Rho envolve a Rho cinase (ROCK) que participa na contração do músculo liso e regula a atividade da MLCP [64, 69, 70]. A ROCK encontra-se envolvida na fosforilação da subunidade de ligação à MLCP, inibindo-a. Também fosforila ainda a  $\text{MLC}_{20}$  ativando-a e induzindo a contração do músculo liso [71].

A MLCP pode ser inativada pela ativação da CPI-17, uma proteína endógena expressa nos tecidos do músculo liso que potencia o efeito inibidor da proteína cinase C (PKC) sobre a MLCP [72]. Existe ainda, um terceiro mecanismo que descreve a inibição da MLCP através da dissociação induzida pelo ácido araquidónico [73].

## 1.6. Relaxação do Músculo Liso Vascular

A relaxação do músculo liso inicia-se quando ocorre uma diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ou através da dessensibilização do aparelho contrátil ao  $\text{Ca}^{2+}$ , e consequente aumento da atividade da MLCP [74]. O relaxamento do músculo liso vascular pode ocorrer de forma passiva, induzido pela remoção do agente contrátil, ou de forma ativa, pela ativação de uma via dependente de nucleótidos cíclicos [75]. A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  retorna aos valores basais através de vários mecanismos, que envolvem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática. Perante determinadas condições, a atividade da MLCP aumenta e esta desfosforila a  $\text{MLC}_{20}$ , induzindo o relaxamento das CML vasculares [54, 76].

O tónus do músculo liso pode diminuir como resposta a estímulos induzidos por compostos endógenos e exógenos. São exemplos deste mecanismo a ativação ou bloqueio de recetores específicos, inibição da síntese de agonistas contráteis, ou o bloqueio de recetores que medeiam a contração, abertura e encerramento de canais iónicos [54, 69].

### 1.6.1. Nucleótidos Cíclicos

Nucleótidos cíclicos como o AMPc e a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), são os principais mensageiros intracelulares que se encontram envolvidos na relaxação do músculo liso, principalmente através da ativação de proteínas cinases dependente do AMPc (PKA) e do GMPc (PKG) [77, 78].

#### AMP Cíclico

O AMPc é sintetizado pela enzima adenilil cilase, que se encontra na membrana plasmática [79] e tem a capacidade de ativar a PKA. Quando a PKA é ativada, esta fosforila as proteínas-alvo nos resíduos de serina e treonina alterando a sua atividade. A PKA é constituída por uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$  [80, 81].

O aumento do AMPc reduz a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A ativação da PKA é um dos mecanismos que pode provocar relaxamento [79], quer seja por inibição da fosfolipase C e dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou redução da fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$ , diminuindo a afinidade para o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [82-84].

Por outro lado, o AMPc também pode ativar a PKG, num processo denominado *cross activation*, quando a concentração deste é dez vezes superior à concentração de GMPc necessária para ativar a cinase [85].

## GMP Cíclico

Após a ativação da guanilil ciclase (GC) quer na forma transmembranar ou particulada (pGC) quer na forma citosólica ou solúvel (sGC), a guanosina trifosfato (GTP) é convertida em GMPc. Contudo a regulação das duas formas da GC é realizada de maneira diferente, pois esta é ativada pelo óxido nítrico (NO) e a pGC é ativada por péptidos natriuréticos [86-88]. O GMPc encontra-se descrito como um segundo mensageiro que tem efeitos em diferentes tipos de alvos, como os canais iónicos e as fosfodiesterases [74].

A PKG é um homodímero, onde cada subunidade se caracteriza por ter dois domínios funcionais, um regulador e outro catalítico, o primeiro possui dois locais de ligação para o GMPc. De forma a explicar a importância da PKG na redução da concentração do  $Ca^{2+}$ , têm sido propostos diversos mecanismos, como por exemplo: aumento da entrada de  $Ca^{2+}$  por estimulação da  $Ca^{2+}$  ATPase da membrana plasmática [89, 90]; processos de fosforilação e ativação da  $Ca^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático que ativam a entrada de  $Ca^{2+}$  para os depósitos intracelulares [91]; inibição da libertação de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático devido a processos de fosforilação mediados por PKG; inibição direta dos VOCC após fosforilação da proteína fosfatase 2A [86, 92]; ou pela redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  devido à diminuição da fosforilação da  $MLC_{20}$ , através da ativação da MLCP [93].

## **1.7. Canais Iónicos da AUH**

### **1.7.1. Canais de Cálcio**

O  $Ca^{2+}$  é um catião fundamental em vários processos celulares, tais como a transcrição genética, a contração muscular e a proliferação celular. A concentração de  $Ca^{2+}$  no interior das CML é regulada pela interação de diversos processos que aumentam ou diminuem a concentração do mesmo [94]. Os mecanismos responsáveis pelo aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular envolvem vários tipos de canais de  $Ca^{2+}$  localizados na membrana plasmática, sendo estes classificados de acordo com a dependência de voltagem. Neste sentido, podem ser identificados não só canais dependentes de voltagem, mas também canais independentes de voltagem, os quais incluem os canais de  $Ca^{2+}$  operados por recetores (ROC), os canais de  $Ca^{2+}$  operados por depósitos intracelulares (SOC) e os canais de  $Ca^{2+}$  ativados por *stress* físico (SAC) [95].

### Canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC)

Os VOCC são proteínas multiméricas compostas por quatro subunidades distintas: a subunidade principal  $\alpha_1$ , e as subunidades auxiliares  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  e  $\gamma$  [96]. A subunidade  $\alpha_1$  integra o poro

condutor, o sensor de voltagem e a zona de ligação de segundos mensageiros, fármacos e toxinas. Esta subunidade é formada por 4 domínios homólogos (I-IV), com seis segmentos transmembranares (S1-S6) cada um. O *loop* presente entre os segmentos S5-S6 determina a seletividade dos iões e a sua condutância (Figura 10) [97].

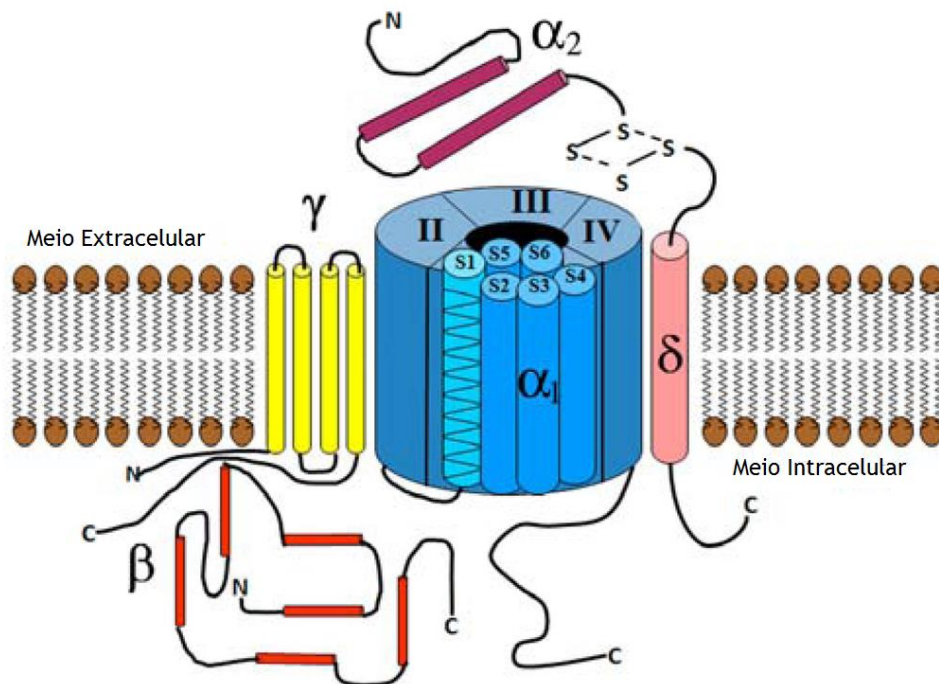


Figura 10 - Imagem representativa da estrutura de um canal de cálcio dependente de voltagem localizado na membrana celular, estando evidenciadas as diferentes subunidades que o constituem, assim como a localização intra ou extracelular dos seus terminais. A azul: domínios homólogos I-IV associados aos seis segmentos (S1 a S6); a laranja: subunidade B intracelular; a amarelo: subunidade  $\gamma$ , transmembranar com C e N terminais intracelulares; a roxo e rosa: subunidade  $\alpha_2\delta$  com N terminal extracelular e C intracelular. Adaptado de [98]

No músculo liso vascular foram identificados dois tipos de VOCCs, que inicialmente foram classificados de acordo com o potencial de membrana a que seriam ativados. Assim, os VOCC foram divididos em canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por alta voltagem (HVA) (-40 mv a -10 mv) e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por baixa voltagem (LVA) (-60 mv a -70 mv). Relativamente aos canais HVA existe uma subdivisão em canais de cálcio do tipo L, tipo N, tipo P/Q e R, enquanto que os LVA são apenas do tipo T [99]. Nas CML da artéria umbilical humana apenas são expressos funcionalmente os canais dependentes de voltagem do tipo L (LTCC) e do tipo T (TTCC) [43].

### Canais de cálcio do tipo L (LTCC)

Os LTCC são considerados os principais responsáveis pelo aporte do  $\text{Ca}^{2+}$  necessário à contração celular [100]. Nas CML é necessária uma forte e rápida despolarização (de -40 mv a 10 mv) para

que ocorra a ativação destes canais [101]. Após a despolarização das CML vasculares, os LTCC modificam-se para a sua conformação aberta, e induzem o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, estimulando a contração das células e, conseqüentemente, a vasoconstrição. Atualmente, são conhecidas quatro isoformas dos LTCC, denominadas por  $\text{Ca}_v1.1$ ,  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  e  $\text{Ca}_v1.4$ , sendo os  $\text{Ca}_v1.2$  são os mais abundantes no músculo liso [56, 102-104].

### Canais de cálcio do tipo T (TTCC)

Os TTCC das células musculares lisas são ativados por potenciais de membrana baixos (de -50 mV a -40/-10 mV) e apresentam uma menor condutividade, comparativamente aos canais LTCC [96, 102]. Dado que nestes canais o fluxo de corrente é baixo e transitório, ainda não foi possível determinar a sua função, uma vez que os perfis de ativação se encontram desenquadrados dos potenciais presentes em vasos fisiologicamente ativos [105].

### Canais de cálcio independentes de voltagem

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  independentes de voltagem incluem os ROC que são regulados pela interação agonista/recetor, os SOC ativados pela libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares, e os SAC que são ativados pelo stress físico exercido sobre a membrana. Todos estes canais estão presentes na membrana plasmática e contribuem para a regulação do tónus vascular [57, 102, 106, 107]. Apesar dos estudos que já foram efetuados neste sentido, ainda não foi determinada qualquer significância destes complexos nas células do músculo liso [108].

## **1.7.2. Canais de Potássio**

Os canais de  $\text{K}^+$  são os canais mais abundantes nas CML e são responsáveis pela difusão rápida dos iões  $\text{K}^+$  através da membrana, intervindo na repolarização da membrana, de forma a contrariar ações vasoconstritoras [109, 110]. Na literatura, encontram-se descritas 3 famílias diferentes de canais de  $\text{K}^+$ :  $\text{K}_V$ ,  $\text{K}_{Ca}$  e  $\text{K}_{IR}$ , dentro dos quais estão incluídos os  $\text{K}_{ATP}$  [56, 111].

### Canais de potássio operados por voltagem ( $\text{K}_V$ )

Os canais de potássio operados por voltagem são ativados quando se atingem potenciais entre os -35 e os -55 mV. Os mecanismos vasodilatadores ativam os  $\text{K}_V$ , enquanto que os vasoconstritores levam ao seu encerramento [57, 112].

Os canais  $\text{K}_V$  são constituídos por quatro subunidades  $\alpha$  e uma subunidade auxiliar  $\beta$ . As subunidades  $\alpha$  têm seis regiões ou segmentos transmembranares (S1-S6) em hélice alfa com uma ansa associada à membrana entre os segmentos transmembranares S5 e S6, que formam o domínio do poro do canal (“P-loop”) [110].

### Canais de potássio retificadores internos ( $K_{IR}$ )

Os canais  $K_{IR}$  encontram-se presentes em vários tipos de células, incluindo as CML. Estes canais são responsáveis pelo influxo de  $K^+$  a potenciais de membrana mais negativos do que o potencial de equilíbrio, e provocam o efluxo do ião a potenciais de membrana mais positivos. Foram descritas até à atualidade 7 famílias destes canais, constituídas por dois domínios transmembranares, com um longo poro citoplasmático de elevada carga negativa nas suas paredes [113].

### Canais de potássio ativados por cálcio ( $K_{Ca}$ )

Os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  estão presentes em grande número no músculo liso vascular e são ativados por alterações na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular e pela despolarização da membrana, contribuindo para a manutenção do potencial de membrana [56, 57, 112]. Os  $K_{Ca}$  dividem-se em três grandes grupos, sendo eles os canais de elevada condutância ( $BK_{Ca}$ ), os de condutância intermédia ( $IK_{Ca}$ ) e de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ). Os  $IK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$  caracterizam-se por serem sensíveis à voltagem e são geralmente ativados por baixas concentrações de  $Ca^{2+}$  intracelular, sendo relevantes em processos dependentes da sinalização do  $Ca^{2+}$  [114].

A subunidade  $\alpha$  que origina o poro é fundamental para o funcionamento dos canais  $BK_{Ca}$ . Estes canais expressam também a subunidade  $\beta_1$  encontrada nas CML vasculares, nas quais estão largamente presentes. Os canais  $BK_{Ca}$  possuem 11 segmentos transmembranares (S0-S10), dos quais os segmentos S0-S6 constituem a parte central do canal e os segmentos S7-S10 são os responsáveis pela sensibilidade do canal ao  $Ca^{2+}$ . Existem quatro tipos de subunidade  $\beta$ , sendo a  $\beta_1$ , a única presente nas CML [114, 115].

## **1.8. Mensageiros Químicos da AUH**

### **1.8.1. Serotonina**

A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é uma substância vasoconstritora que atua como neurotransmissor e como hormona. A biossíntese da 5-HT endógena consiste na conversão de triptofano em 5-hidroxitriptofano pela ação da triptofano-hidroxilase, posteriormente este é descarboxilado a 5-HT. Este processo ocorre em neurónios e células cromafins. As plaquetas possuem um mecanismo de captação de elevada afinidade para a 5-HT, acumulando-a quando passam no intestino. Os principais locais de ação da 5-HT são o trato gastrointestinal, as plaquetas, as terminações nervosas, o sistema nervoso central e os vasos sanguíneos [116].

O efeito da 5-HT nos vasos sanguíneos varia com o tipo, o diâmetro e a atividade simpática prevalente nos mesmos. Vasos de maior calibre, como é o caso das artérias e veias, são

contraídos pela 5-HT. Em vasos de menor calibre (arteríolas e capilares) a 5-HT atua nas células endoteliais promovendo a liberação de NO, e inibe a liberação da noradrenalina pelos terminais nervosos simpáticos, levando à vasodilatação [116].

### Recetores de 5-HT

A ação da 5-HT é mediada por recetores (5-HT<sub>1-7</sub>) na sua maioria acoplados à proteína G, excetuando os 5-HT<sub>3</sub> que são recetores ionotrópicos [116]. Os recetores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, e 5-HT<sub>7</sub> são expressos nos vasos sanguíneos [117]. Dentro destes, os 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>7</sub> regulam a contratilidade da AUH [118-121].

A ativação dos recetores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> leva à inibição da adenilil ciclase e consequentemente à contração da AUH. Quando os recetores 5-HT<sub>2A</sub> são ativados, os níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) aumentam levando também à contração da AUH [116, 119, 120]. Já os recetores 5-HT<sub>7</sub> estão ligados ao aumento da adenilil ciclase causando um efeito vasorelaxante na AUH [116, 121].

### **1.8.2. Histamina**

A histamina, ou 2-(imidazol-4-il) etilamina, é sintetizado no complexo de Golgi de mastócitos e basófilos por descarboxilação enzimática da histidina. Esta conversão é catalisada pela L-histidina descarboxilase com fosfato piridoxal como cofactor [122, 123]. Atua como hormona na regulação da contração do músculo liso, na vasodilatação e permeabilização de redes vasculares, e na regulação da produção de ácido estomacal. Também desempenha funções como neurotransmissor no sistema nervoso central [124]. Tal como a 5-HT, a histamina induz contração em vasos de maior calibre e relaxação em vasos de menor calibre [125].

### Recetores de Histamina

Esta substância ativa diferentes recetores (H<sub>1</sub> até H<sub>4</sub>) [125, 126], todos expressos na AUH [121]. O H<sub>1</sub> provoca mobilização do Ca<sup>2+</sup> intracelular e aumento da concentração de IP<sub>3</sub>, levando à contração [127]. O H<sub>2</sub> causa acumulação de AMPc e, consequentemente, vasorelaxação [125]. Embora já se tenha demonstrado que a ativação do recetor H<sub>3</sub> causa um efeito vasodilatador em algumas artérias [121, 128, 129], os mecanismos de ação dos recetores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> ainda não se encontram bem descritos [125, 130, 131].

Folha em branco

## Capítulo II - Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo central avaliar os efeitos genómicos e não genómicos do DEHP a nível vascular. Diferentes objetivos e tarefas específicas foram definidos para atingir a correta resolução do objetivo central:

1. Estudo do efeito rápido do DEHP na contractilidade da artéria umbilical humana, recorrendo à técnica de banho de órgãos.
2. Estudo dos efeitos genómicos de DEHP sobre o efeito rápido do DEHP na contractilidade da artéria umbilical humana, recorrendo à técnica de banho de órgãos.
4. Estudo do efeito do DEHP na expressão do mRNA do recetor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> e de histamina HR-H1 em células do músculo liso da artéria umbilical humana.

Folha em branco

# Capítulo III - Materiais e Métodos

## 3.1. Materiais e Soluções

### 3.1.1. Soluções

Na tabela que se segue são apresentadas as soluções utilizadas na realização do trabalho, bem como as respetivas composições e concentrações.

Tabela 4 - Soluções utilizadas na realização do trabalho.

Soluções	Composição
Solução Salina Fisiológica (PSS)	NaCl 110 mM; CaCl <sub>2</sub> 0,15 mM; KCl 5 mM; MgCl <sub>2</sub> 2 mM; HEPES 10 mM; NaHCO <sub>3</sub> 10 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 mM; glicose 10 mM e EDTA 49 mM.
Solução de antibiótico-antimicótico (SAA)	Penicilina 5U/mL; estreptomicina 5µg/mL e anfotericina 12,5 ng/mL.
Solução de antiproteases	Leupeptina 0,45 mg/L; benzamidina 26 mg/L e inibidor da tripsina 10 mg/L.
Solução de Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 Liofilizado, NaHCO <sub>3</sub> 1,2 g/L e ácido L-ascórbico 20 mg/L; pH 7,4.
Krebs Básico Modificado	NaCl 119 mM; KCl 5mM; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,5 mM; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1,2 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO <sub>3</sub> 25 mM; EDTA-Na <sub>2</sub> 0,03 mM; ácido L-ascórbico 0,6 mM e glucose 11mM; pH 7,4.
Krebs Despolarizante KCl	NaCl 119 mM; KCl 5mM; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,5 mM; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1,2 Mm; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO <sub>3</sub> 25 mM; EDTA-Na <sub>2</sub> 0,03 mM; ácido L-ascórbico 0,6 mM e glucose 11 mM; KCl 60 mM; pH 7,4.
Meio de Cultura HUASMC	DMEM-F12 suplementado com FBS; BSA 0,5%; EGF, 5µg/ml; FGF 0,5ng/ml; heparina 2µg/ml e insulina 5µg/ml; pH 7,4.
Meio de cultura sem soro	DMEM-F12; BSA - 0,5%; pH 7,4.

<b>Solução de MTT</b>	0,5 mg/mL de MTT diluído em PBS 1%.
<b>Solução fosfato-salino diluído (PBS)</b>	NaCl 110 mM; CaCl <sub>2</sub> 0,15 mM; KCl 5 mM; MgCl <sub>2</sub> 2 mM; HEPES 10 mM; NaHCO <sub>3</sub> 10 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM; glicose 10 mM e EDTA 0.49 mM NaCl; KCl; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4.

### 3.1.2. DEHP

O Di(2-Etilhexil) Ftalato (DEHP) foi adquirido à ACROS Organics (Thermo Fisher Scientific). Preparou-se um stock de 1M em etanol absoluto, e todas as diluições necessárias para o trabalho foram realizadas nos meios de cultura a uso.

### 3.1.3. Materiais e Equipamentos

Na tabela que se segue estão descritos os materiais, equipamentos e softwares mais relevantes para a realização do trabalho, bem como as respetivas marcas.

*Tabela 5 - Materiais, equipamentos e softwares utilizados na realização do trabalho.*

<b>Material/Equipamento</b>	<b>Marca</b>
<b>Material cirúrgico</b>	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
<b>Frascos e placas de cultura</b>	Orange scientific
<b>Câmara de banho de órgãos LE01.004 Termóstato LE 13206</b>	Letica®, LSi Scientific Instruments
<b>Transdutores isométricos TRI201</b>	PanLab, SA Espanhã
<b>Amplificador ML118/D Quad Bridge Interface PowerLab/4SP ML750 Software Chart5 PowerLab</b>	ADInstruments
<b>Microplate Reader EZ Read 400 Galapagos Software</b>	Biochrom
<b>Balança Digital</b>	Sartorius

Balança de Precisão ABT 100-5M	KERN
Medidor de pH Orion Star A211	Thermo Scientific
Microcentrífuga Mikro 200R	Hettich zentrifugen
Block Heater SBH130D	Stuart
NanoPhotometer™	IMPLEN
T100™ Thermal Cycler iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	BIO-RAD

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Recolha do Cordão Umbilical

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

Os cordões umbilicais recolhidos em intervalos de tempo não superiores a 15 minutos após o parto, foram imediatamente colocados em PSS. Como forma de evitar contaminações e degradação dos tecidos, uma mistura de antibióticos e antiproteases foi adicionada ao PSS. As amostras foram mantidas a 4°C por períodos máximos de 48h até à sua utilização. Cordões umbilicais provenientes de partos cujas mães apresentavam patologias durante a gravidez foram excluídos.

### 3.2.2. Contractilidade - Banho de órgãos

O cordão umbilical foi lavado com PSS e colocado numa placa de Petri, com o mesmo meio de lavagem, onde as artérias foram isoladas por dissecação da Geleia de Wharton envolvente, sendo posteriormente armazenadas em PSS, a 4°C durante 12 horas. Após este período o endotélio vascular foi mecanicamente removido, fazendo-se passar uma linha de algodão pelo lúmen arterial. As artérias foram seccionadas em pequenos anéis de 3-5 mm e mantidas durante

24h a 4 °C em DMEM-F12, juntamente com as diferentes concentrações de DEHP (1 nM, 10 µM e 100 µM), bem como o seu solvente, o etanol, em concentrações nunca superiores a 0,1%.

Os anéis de AUH foram colocados na câmara de banho de órgãos, suspensos por dois fios de aço inoxidável paralelos, numa solução de Krebs Básico Modificado continuamente oxigenada (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e mantida a 37°C. A medição e registo da tensão foram realizados pelos equipamentos descritos na Tabela 5. Os anéis foram equilibrados durante 45 minutos, com substituição do Krebs a cada 15 minutos, até se obter uma tensão isométrica entre 1500 e 2000 mg. Nas secções de artéria viáveis (que apresentaram contrações mínimas de 1000 mg quando induzidas com 5-HT 1 µM) foram induzidas contrações com 5-HT (1 µM), histamina (10 µM) e KCl (60 mM) e posteriormente foram submetidas a concentrações crescentes de DEHP (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1µM, 10 µM e 100 µM) de forma a avaliar o seu efeito na contractilidade. Paralelamente testes controlo foram realizados adicionando apenas etanol em percentagens nunca superiores a 0,1%.

### 3.2.3. Cultura de HUASMC

Para a obtenção de culturas de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC; *human umbilical artery smooth muscle cells*) os procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar, sob condições de esterilidade e refrigeração com gelo, como descrito por Cairrão et al [43]. O cordão umbilical foi lavado com PSS ao qual foi adicionado uma mistura de antibióticos para evitar contaminações. Posteriormente foi colocado numa placa de Petri com o mesmo meio de lavagem onde as artérias foram isoladas por dissecação da geleia de Warthon. Após o isolamento, os segmentos da artéria foram cortados em retângulos, e a túnica íntima foi mecanicamente removida com a leve passagem de um cotonete estéril sobre a mesma.

A camada de músculo liso vascular foi extraída da parte interior da artéria, utilizando para o efeito pinças estéreis apropriadas. As camadas da túnica média foram cortadas em pequenos fragmentos e posteriormente lavadas em PSS num tubo de Falcon, repetindo-se este passo quatro vezes. Por fim as camadas de músculo liso foram colocadas em frascos de cultura, previamente revestidos com colagénio (5 µg/cm<sup>2</sup>), foi-lhes adicionado 2 ml de meio HUASMC e colocadas a 37°C numa atmosfera de 95% ar e 5% CO<sub>2</sub>. Subculturas destas células foram obtidas até à quinta passagem.

### 3.2.4 Tratamento das HUASMC com DEHP

Placas de 6 ou 96 poços, consoante a aplicação, com células musculares lisas em confluência foram colocadas em meio sem soro durante 24 horas. Findo este período, o meio sem soro foi renovado e realizou-se uma exposição prolongada com diferentes concentrações de DEHP em (1nM, 10nM, 100 nM, 1µM, 10 µM e 100 µM) durante 24 horas. A solução stock de DEHP foi

preparada com etanol absoluto e foi posteriormente diluída até se obterem as concentrações desejadas. Sendo o etanol o solvente, foi utilizado como controle, nas mesmas condições que o DEHP, em concentrações nunca superiores a 0,1%.

As células expostas ao DEHP, ao etanol ou não expostas foram utilizadas para realizar as experiências de citotoxicidade e de análise da expressão

### 3.2.5. Ensaio de Viabilidade Celular - MTT

Placas de 96 poços com células HUASMC confluentes em monocamada foram expostas ao DEHP como anteriormente descrito. Após o período de exposição, o meio de cultura foi aspirado e, na ausência de luz, adicionaram-se 200 µL da solução de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) (0,5 mg/mL) a cada poço. Incubaram-se as placas durante 3 horas numa atmosfera húmida, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido o período de incubação, a solução de MTT foi aspirada e adicionaram-se 200 µL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazano. O conteúdo dos poços foi transferido para uma placa de leitura e a absorvância a 570 nm foi determinada num espectrofotómetro com leitor de microplacas.

### 3.2.6. Extração do RNA total

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

Para a extração do RNA total utilizou-se o TRIzol® Reagent (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante. Placas de 6 poços com células HUASMC confluentes foram tratadas com DEHP como anteriormente descrito, e lavadas com 200 µL de PBS por poço antes de iniciar a extração. Para extrair o RNA total das células adicionaram-se 200 µL de reagente TRIzol em cada poço (1 ml TRIzol/100 mg de tecido) e soltaram-se as células da superfície da placa com um *cell scraper*. Transferiu-se o conteúdo de cada poço para eppendorfs de 1,5 mL e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 80 µL de clorofórmio (200 µL de clorofórmio/ 1 mL de TRIzol®) e homogeneizaram-se as amostras por inversão. Incubaram-se à temperatura ambiente durante 2-3 minutos e centrifugaram-se a 4 °C durante 15 minutos a 12000g. Após este passo de centrifugação formaram-se três fases: no fundo do eppendorf a fase orgânica (rosa) que contém as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio, a interfase (branca) onde está presente o DNA e à superfície a fase aquosa (transparente), onde está contido o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf de 1,5 mL, ao qual se adicionaram 200 µL de isopropanol (500 µL de isopropanol/1 mL de TRIzol), agitou-se por inversão e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugaram-se as

amostras a 4 °C, 12000g durante 10 min. Descartou-se o sobrenadante, lavaram-se os pellets de RNA com 400 µL de etanol a 75% em água DEPC e centrifugaram-se a 4 °C durante 5 minutos a 7500g. Após a repetição da lavagem e passos subsequentes, fez-se um quick spin para remover o excesso de etanol. Depois de incubar à temperatura ambiente, durante 5 minutos, hidrataram-se os pellets com 20µL de água DEPC e incubaram-se a 57° C durante 5 minutos. Armazenou-se o RNA a -80° C.

Efetuar-se leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm, utilizando o nanoespectrofotômetro. Este equipamento fornece diretamente a concentração de RNA total em µg/µL e o rácio entre a A260/A280. Para determinar uma boa qualidade e pureza de RNA total, o rácio em causa deverá estar no intervalo de 1,8 a 2,1. Os rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou fenol e os rácios superiores a 2,1 indicam contaminação com DNA.

### 3.2.7. Retrotranscrição

O DNA complementar (cDNA) é obtido através da transcrição reversa do RNA mensageiro pela ação da enzima transcriptase reversa. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit NZY M-MuLV Reverse Transcriptase (NzyTech, Portugal), seguindo o protocolo do fabricante. Prepararam-se duas misturas para n+1 reacções e um volume total de 20 µL por reacção. Para a MIX 1 adicionaram-se *Random hexamer mix* (0.5 µg/µL) (NZYset, Portugal) e dNTPs (10 mM) (NZYset, NzyTech, Portugal), na proporção de 2 para 1. Na Mix 2 adicionaram-se, também na proporção de 2 para 2, 10x *reaction buffer* (nzytech, Portugal), e M-MuLV.

Para cada reacção adicionaram-se nos tubos de PCR 3µL da MIX 1, o volume adequado para 1µg perfez-se com água estéril até ao volume de 17µL. Os tubos de PCR foram colocados no termociclador a 65° C durante 5 minutos. As amostras foram arrefecidas em gelo e adicionaram-se 3µL da MIX 2 a cada tudo de PCR. Novamente no termociclador seguiram-se uma série de incubações: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e a 70° C durante 15 minutos. No final da reacção o cDNA foi armazenado a -20° C.

### 3.2.8. PCR em Tempo Real (qPCR)

A quantificação da expressão dos genes 5-HT<sub>2A</sub> e HR-H1 (Tabela 6) foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o NZY qPCR Green Master MIX (NZYtech), segundo as instruções do fabricante. O gene endógeno utilizado para normalizar os níveis de expressão foi a β-2-microglobulina (β2M) (Tabela 6). A eficiência do qPCR foi determinada para todos os primers usando diluições de cDNA (1:1, 1:3, 1:9). As reacções de amplificação dos genes foram preparadas para um volume final de 20 µL, adicionaram-se 10 µL de NZY qPCR Green Master MIX (NZYtech), 0,4 µL de Primer Fw e de Primer Rv, 1 µL de cDNA e por fim perfez-se o volume com água estéril. As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95° C durante

5 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, temperatura de annealing durante 30 segundos, e 72°C durante 10 segundos. A formação de dímeros de primers e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das curvas melting. As diferenças entre experiências foram calculadas recorrendo o modelo matemático de Pfaffl utilizando a fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . [132]

Tabela 6 - Primers utilizados para PCR em tempo real.

Nome do Primer	Gene	Sequência do Primer	Fragmento (bp)	Número do GeneBank
<b><math>\beta</math>-2-microglobulina</b>	$\beta$ 2M	Fw 5'-ATG AGT ATG CCT GCC GTG TG-3' Rv 5'-CAA ACC TCC ATG ATG CTG CTT AC-3'	92	NM_004048.2
<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	5-HT <sub>2A</sub>	Fw 5'-TCT TTC AGC TTC CTC CCT CA -3' Rv 5'-TGC AGG ACT CTT TGC AGA TG-3'	223	NM_000621
<b>HR-H1</b>	HR-H1	Fw 5'-CAC ACT GAA CCC CCT CAT CT -3' Rv 5'-GGC CTT CGT CCT CTA TTT CC-3'	151	NM000861

### 3.3. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média das experiências  $\pm$  erro padrão para cada condição experimental. A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat Statistical Analysis System versão 3.5 (Systat Software, London. UK). A significância estatística entre as diferentes concentrações foi analisada por One-way ANOVA seguida do teste de Turkey ou do teste de Dunnet. A significância estatística entre dois tipos de amostra foi analisada recorrendo ao teste t de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa para probabilidades inferiores a 5% ( $P < 0,05$ ).

Folha em branco

# Capítulo IV - Resultados

## 4.1. Contractilidade - Banho de Órgãos

Os anéis de AUH sem endotélio foram colocados no banho de órgãos e realizaram-se experiências de contratilidade recorrendo a agentes contráteis, como a 5-HT (1  $\mu$ M), histamina (10  $\mu$ M) ou KCl (60 mM). Posteriormente foi analisado o efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M). O etanol, solvente do DEHP, foi utilizado como controlo sempre em concentrações inferiores a 0,1%.

Para analisar os efeitos genómicos do DEHP, alguns anéis de AUH foram pré-incubados com diferentes concentrações de DEHP (1nM, 10 $\mu$ M e 100  $\mu$ M) ou com etanol (solvente do DEHP, controlo) durante 24h.

### 4.1.1. Efeito vasorelaxante do DEHP

As AUH contraídas com 5-HT sofreram efeito vasorelaxante significativo pela ação do DEHP ( $P < 0,05$  One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc), na ordem dos 15% aquando da adição da concentração mais elevada de DEHP (100  $\mu$ M) (Figura 11-A).

Quando a histamina foi usada como agente contrátil foi mais evidente o efeito vasorelaxante do DEHP. Este efeito é dependente da concentração de DEHP adicionada. Começando nos 9% para a concentração mais baixa (1 nM), chegando quase a 30% na concentração mais elevada (1  $\mu$ M) (Figura 11-B).

Quando as AUH foram contraídas com KCl, o DEHP relaxou significativamente as contrações, sendo o efeito vasorelaxante menor que com histamina. Este efeito também é dependente da concentração de DEHP adicionada, sendo no máximo de 11% de relaxação para a concentração de 100  $\mu$ M (Figura 11-C).

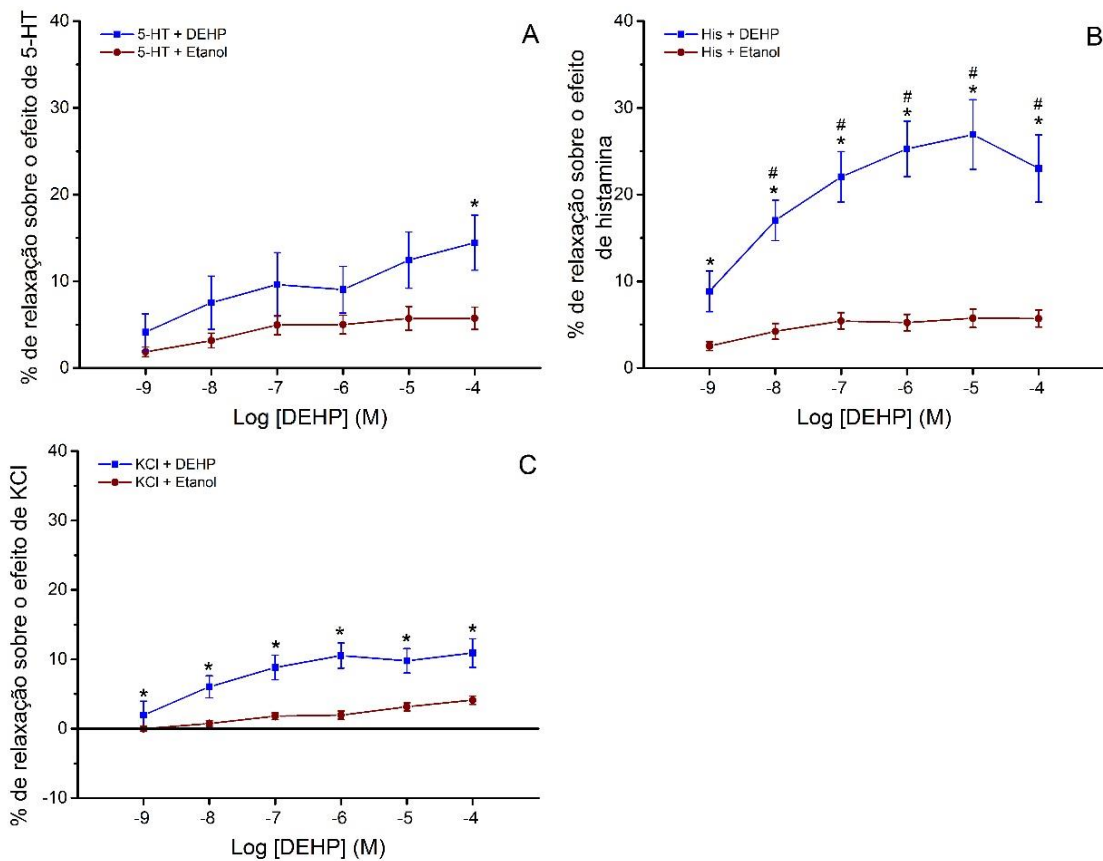


Figura 11 - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1  $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) em contrações induzidas por (A) 5-HT (1  $\mu$ M), (B) histamina (10  $\mu$ M) e (C) KCl (60 mM) em AUH não incubadas. Os símbolos representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de  $n \geq 13$  experiências. \*( $P < 0,05$  versus controlo, One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc). #( $P < 0,05$  versus [DEHP], One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc)

#### 4.1.2. Efeito da pré-incubação com DEHP sobre contrações induzidas por 5-HT

##### Efeito da pré-incubação com DEHP sobre as contrações por 5-HT

Quando contraídas com 5-HT as artérias controlo (não pré-incubadas com DEHP) apresentaram uma tensão média de  $1367,58 \pm 101,62$  mg. As AUH pré-incubadas com DEHP 1nM mostraram uma redução significativa na tensão induzida com 5-HT para  $952,96 \pm 130,40$  mg (Figura 12-A). No entanto, podemos distinguir dois tipos de resposta nestas artérias, pois em 69,6% das artérias a 5-HT induziu uma contração média semelhante ao controlo ( $1270,63 \pm 115,47$  mg), enquanto que as restantes 30,4% apresentaram contração média significativamente inferior na ordem das  $226,86 \pm 48,66$  mg (17,8% do controlo) (Figura 12-B). Nos anéis pré-incubados com DEHP 10 $\mu$ M é visível uma redução na tensão média induzida para  $386,88 \pm 54,44$  mg. Finalmente, as AUH expostas durante 24h à concentração mais elevada de DEHP (100  $\mu$ M) apresentaram um aumento

significativo na contração induzida pela 5-HT, sendo esta na ordem das  $2396,545 \pm 298,423$  mg (Figura 12-A).

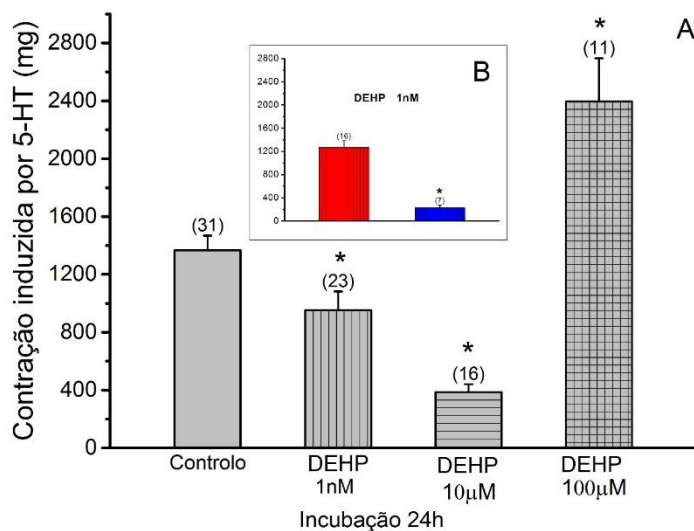


Figura 12 - (A) Efeito da exposição das AUH ao DEHP (1nM, 10µM e 100µM) em contrações induzidas por 5-HT (1 µM). (B) Efeito duplo da exposição das AUH ao DEHP (1nM) em contrações induzidas por 5-HT (1 µM). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão do número de experiências representado sobre as barras. \*( $P < 0,05$  versus controlo, One-way ANOVA com teste de Dunnett post hoc).

### Efeito da pré-incubação com DEHP no seu próprio efeito relaxante em contrações por 5-HT

Na Figura 13 é possível visualizar a diferença entre o efeito da adição de concentrações crescentes de DEHP em artérias controlo e pré-incubadas com DEHP 1nM (Figura 13-A) e 100 µM (Figura 13-B), após contração com 5-HT.

No que diz respeito às artérias pré-incubadas com DEHP 1nM, estas apresentam um comportamento semelhante às artérias não pré-incubadas para as concentrações mais baixas (1 e 10 nM) de DEHP. A partir da concentração de 100 nM as artérias experimentaram um efeito contrátil, atingindo um valor de 16% de contração para a concentração de 10 µM de DEHP (Figura 13-A).

As AUH pré-incubadas com DEHP 100 µM comportam-se de forma semelhante às não incubadas, sendo que o efeito vasorelaxante que apresentam não é significativo ( $P < 0,05$  One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc) (Figura 13-B).

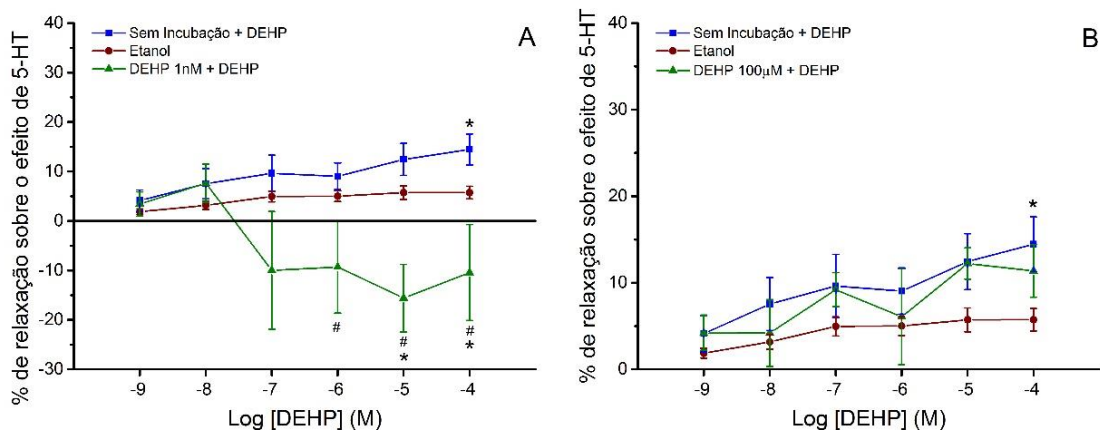


Figura 13 - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1 µM, 10µM e 100µM) em contrações induzidas por 5-HT (1 µM) em AUH incubadas com (A) DEHP 1nM e (B) DEHP 100 µM. Os símbolos representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de  $n \geq 7$  experiências.  $(P < 0,05$  versus Etanol, One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc). # $(P < 0,05$  versus Sem Incubação, One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc).

#### 4.1.3. Efeito da pré-incubação com DEHP em contrações induzidas por histamina

##### Efeito da pré-incubação com DEHP sobre as contrações por histamina

As AUH não incubadas apresentam uma tensão média induzida pela histamina de  $1148,85 \pm 101,86$  mg. Quando comparadas com os controlos, as artérias pré-incubadas com DEHP (1 nM, 10 µM e 100 µM) não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$  versus controlo, One-way ANOVA com teste de Dunnett post hoc), sendo os valores de tensão após indução com histamina os que se seguem:  $955,53 \pm 82,51$  mg,  $1105,00 \pm 99,69$  mg e  $1181,19 \pm 192,57$  mg, respetivamente (Figura 14).

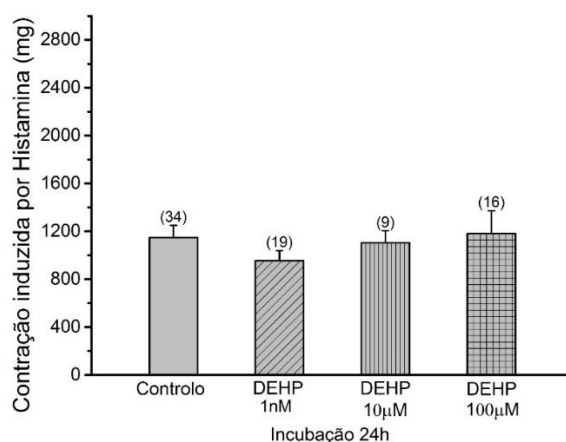


Figura 14 - Efeito da exposição das AUH ao DEHP (1nM, 10µM e 100µM) em contrações induzidas por histamina (10 µM). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão do número de experiências representado sobre as barras.

Efeito da pré-incubação com DEHP no seu próprio efeito relaxante em contrações por histamina

Na Figura 15 é possível visualizar a diferença entre o efeito da adição de concentrações crescentes de DEHP em artérias controlo e pré-incubadas com DEHP 1nM (Figura 15-A), 10 µM (Figura 15-B) e 100 µM (Figura 15-C), após contração com histamina.

No que diz respeito às artérias previamente pré-incubadas com DEHP 1nM, estas apresentam um comportamento diferente das artérias não pré-incubadas. Para as concentrações mais baixas (1 nM a 1 µM) de DEHP não se observou efeito vasorelaxante. Para as concentrações de DEHP de 10 e 100 µM as artérias contraíram até 8% (Figura 15-A).

Quando pré-incubadas com DEHP 10 µM as artérias, contrariamente às não pré-incubadas, não apresentam efeito vasorelaxante significativo (Figura 15-B).

As AUH pré-incubadas com DEHP 100 µM comportam-se de forma semelhante às não pré-incubadas, apresentando um efeito vasorelaxante significativo e dependente da concentração de fitalato adicionada. (Figura 15-C).

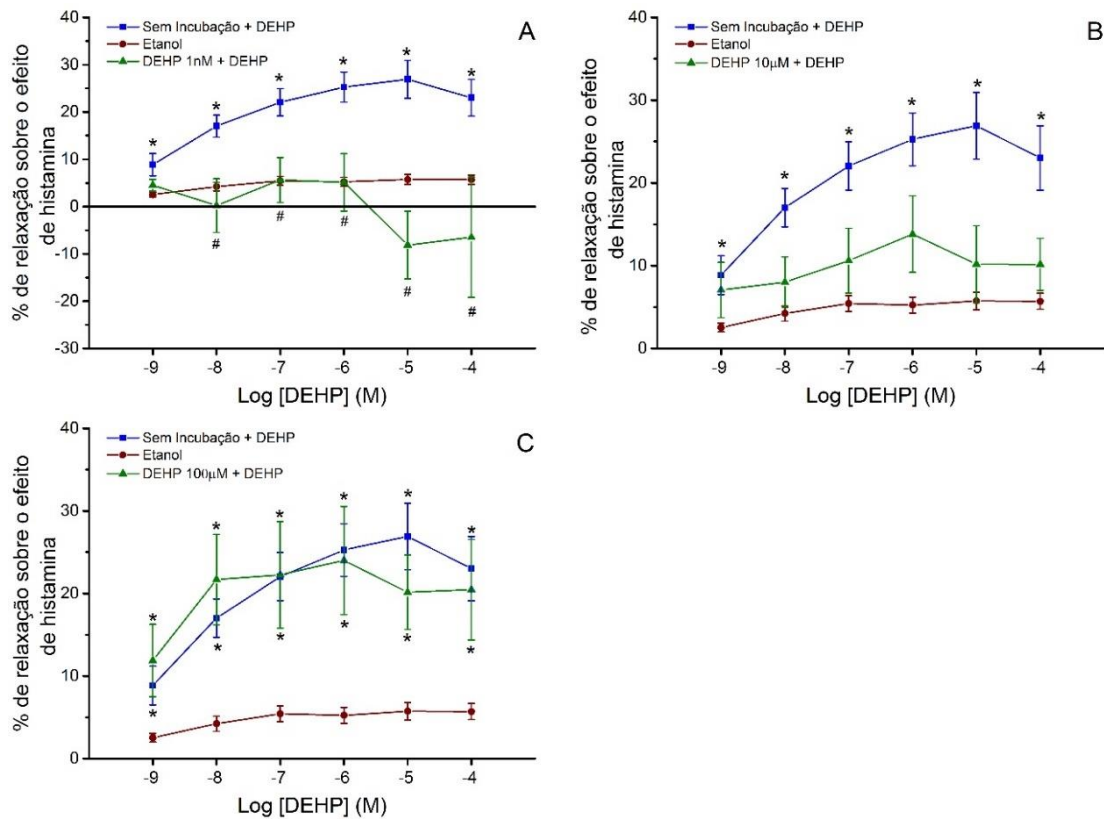


Figura 15 - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1 µM, 10µM e 100µM) em contrações induzidas por histamina (10 µM) em AUH incubadas com (A) DEHP 1nM, (B) DEHP 10 µM e (C) DEHP 100 µM. Os símbolos representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de n≥ experiências. \*(P<0,05 versus Etanol, One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc). # (P<0,05 versus Sem Incubação, One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc).

#### 4.1.4. Efeito da pré-incubação com DEHP em contrações induzidas por KCl

##### Efeito da pré-incubação com DEHP sobre as contrações por KCl

Quando induzidas com KCl (60 mM) as artérias controlo apresentaram uma tensão média na ordem dos  $1889,77 \pm 115,01$  mg. Comparativamente, as artérias pré-incubadas com DEHP (1nM, 10 e 100  $\mu$ M) não apresentam diferenças significativas ( $P > 0,05$  versus controlo, One-way ANOVA com teste de Dunnett post hoc). Os valores são, respetivamente, os que se seguem:  $2037,40 \pm 153,62$  mg,  $1559,85 \pm 166,99$  mg e  $1811,25 \pm 150,82$  mg (Figura 16).

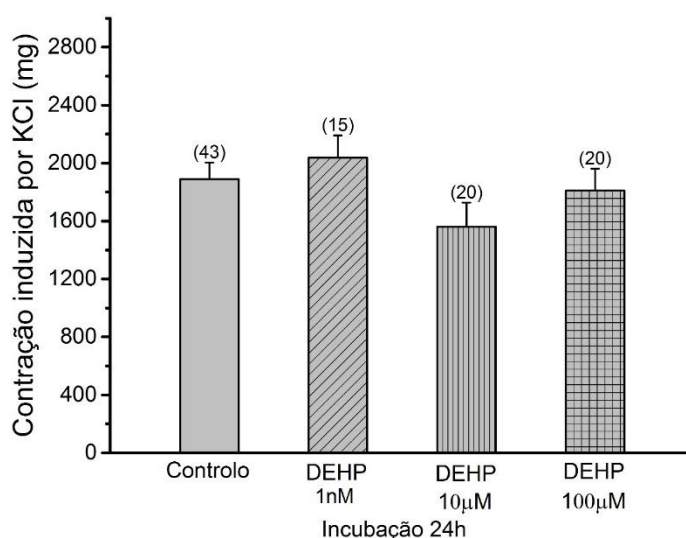


Figura 16 - Efeito da exposição das AUH ao DEHP (1nM, 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) em contrações induzidas por KCl (60 mM). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão do número de experiências representado sobre as barras.

##### Efeito da pré-incubação com DEHP no seu próprio efeito relaxante em contrações por KCl

Na Figura 17 é possível visualizar a diferença entre o efeito da adição de concentrações crescentes de DEHP em artérias controlo e pré-incubadas com DEHP 1nM (Figura 17-A), 10  $\mu$ M (Figura 17-B) e 100  $\mu$ M (Figura 17-C), após contração com KCl.

No que diz respeito às artérias pré-incubadas com DEHP 1nM, estas apresentam um comportamento semelhante ao das artérias não pré-incubadas para as concentrações mais baixas (1 nM a 100 nM) de DEHP, sendo visível um efeito vasorelaxante significativo. Para as concentrações de DEHP de 1 a 100  $\mu$ M as artérias não relaxam (Figura 17-A).

Quando pré-incubadas com DEHP 10  $\mu\text{M}$ , as artérias, similarmente às não pré-incubadas, apresentam efeito vasorelaxante significativo e dependente da concentração de DEHP adicionada (Figura 17-B).

As AUH pré-incubadas com DEHP 100  $\mu\text{M}$  comportam-se, também, de forma semelhante às não pré-incubadas, apresentando um efeito vasorelaxante significativo e dependente da concentração de ftalato adicionada. (Figura 17-C).

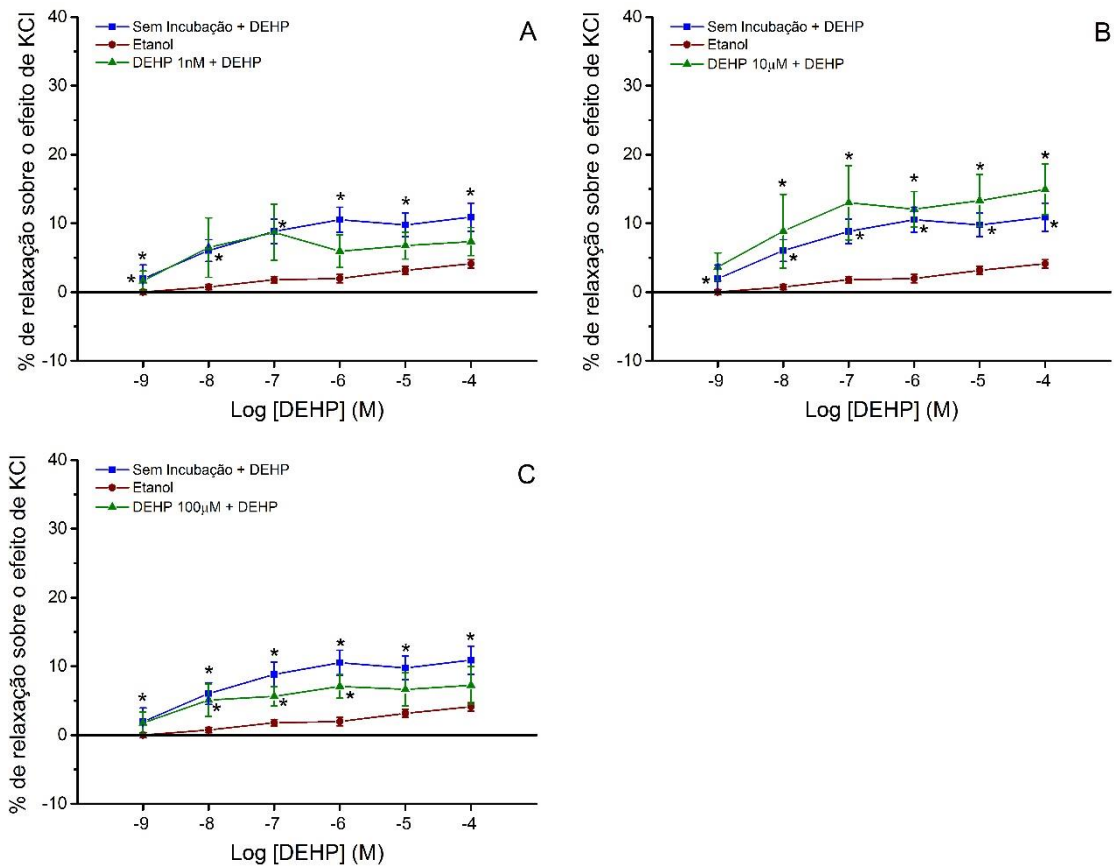


Figura 17 - Efeito vasorelaxante de concentrações crescentes de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$ ) em contrações induzidas por KCl (60 mM) em AUH incubadas com (A) DEHP 1nM, (B) DEHP 10  $\mu\text{M}$  e (C) DEHP 100  $\mu\text{M}$ . Os símbolos representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de  $n \geq 3$  experiências. (\* $P < 0,05$  versus Etanol, One-way ANOVA com teste de Turkey post hoc).

## 4.2. Citotoxicidade

As HUASMC foram expostas a diferentes concentrações de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) e 0,1% de etanol durante 24h e o seu efeito na viabilidade celular foi avaliado por MTT. Células não incubadas foram utilizadas como controle.

#### 4.2.1. Efeito da exposição ao DEHP na viabilidade celular - MTT

As HUASMC expostas ao etanol, às concentrações mais baixas (1 e 10 nM) e mais alta (100  $\mu$ M) de DEHP apresentam uma redução da viabilidade celular para os 86%. Para o DEHP 100 nM e 1  $\mu$ M a viabilidade reduziu para os 78%. A concentração de 10  $\mu$ M foi a que apresentou maior redução da viabilidade para os 70%. Após avaliação estatística não foram encontradas diferenças estatísticas,  $p > 0.05$  One-way ANOVA, entre as diferentes exposições e o controlo, o que leva a crer que o DEHP nas concentrações testadas não apresenta citotoxicidade (Figura 18).

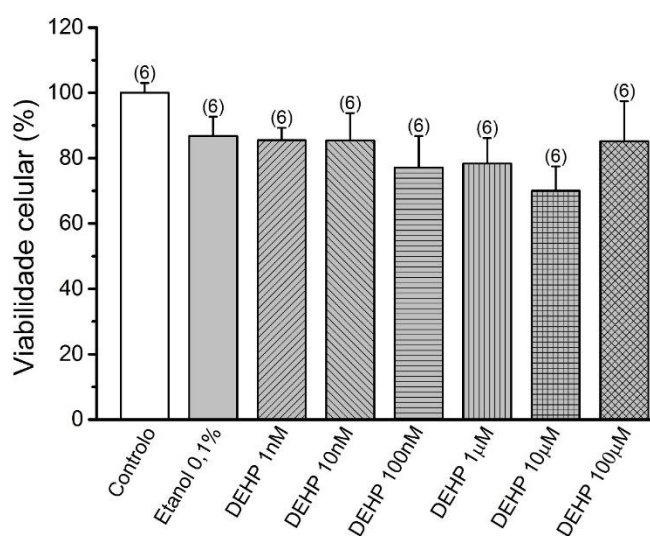


Figura 18 - Efeito do DEHP na viabilidade celular de células musculares lisas de artéria umbilical humana (HUASMC) expostas a DEHP (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) e ao solvente Etanol 0,1% durante 24h. A viabilidade celular está expressa em percentagem do controlo. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão do número de experiências representado sobre as barras.

#### 4.3. Análise da Expressão de mRNA

As HUASMC foram incubadas com diferentes concentrações de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) durante 24h e o nível de expressão do mRNA do 5-HT<sub>2A</sub> e do HR-H1 foi avaliado por qPCR. Células não incubadas foram utilizadas como controlo.

##### 4.3.1. Efeito da exposição ao DEHP na expressão do 5-HT<sub>2A</sub>

Embora a análise estatística não tenha revelado nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$  One-way ANOVA com teste de Dunnett post hoc) entre as várias

concentrações de DEHP e o controlo, os resultados sugerem a existência de um aumento da expressão de 5-HT<sub>2A</sub> para todas as incubações (Figura 19).

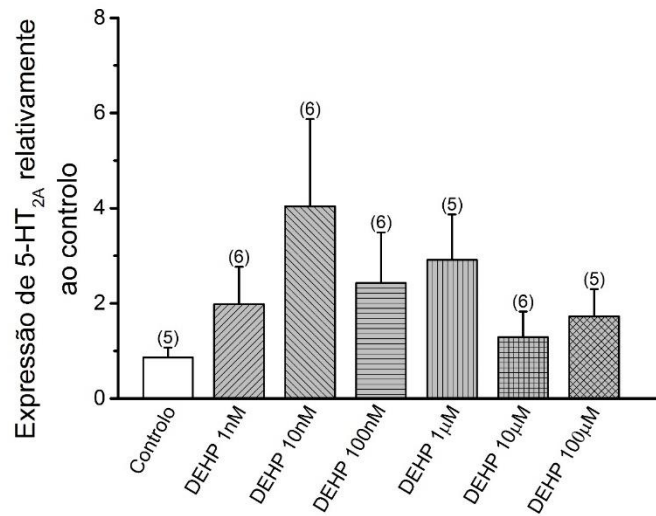


Figura 19 - Efeito da exposição ao DEHP (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10 µM e 100 µM) na expressão de 5-HT<sub>2A</sub> em células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão do número de experiências representado sobre as barras.

#### 4.3.2. Efeito da exposição ao DEHP na expressão do HR-H1

Relativamente ao HR-H1 parece haver uma diminuição da expressão nas células incubadas com as concentrações de 1 nM, 100 nM e 1 µM de DEHP. Já as células incubadas com 10 e 100 µM aparentam um aumento na expressão. Após a análise estatística, não foram detetadas diferenças significativas para nenhuma das incubações relativamente ao controlo, P>0,05 One-way ANOVA com teste de Dunnett post hoc (Figura 20).

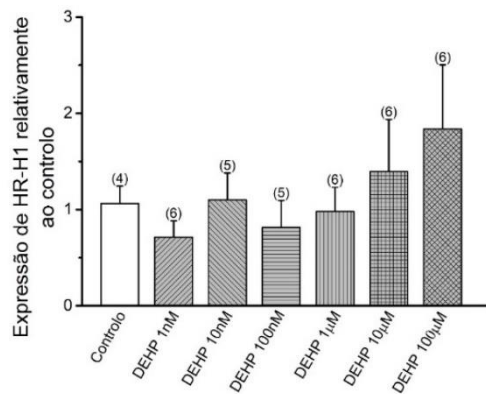


Figura 20 - Efeito da exposição ao DEHP (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10 µM e 100 µM) na expressão de HR-H1 em células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão do número de experiências representado sobre as barras.

Folha em branco

## Capítulo V - Discussão

O mecanismo que regula o estado contrátil das CML na AUH é extremamente importante para garantir que a troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta é eficiente. Uma vez que os vasos sanguíneos umbilicais não possuem fibras nervosas, o controlo do fluxo sanguíneo umbilical depende exclusivamente da ação de substâncias vasoativas libertadas localmente ou em circulação.

Devido à ubiquidade dos plásticos, as pessoas são diariamente expostas ao DEHP que, por ser um ftalato, se comporta como um EDC, afetando o normal funcionamento das glândulas endócrinas, o nível das hormonas em circulação e alterando os seus recetores.

Uma vez que se sabe muito pouco sobre os efeitos cardiovasculares do DEHP em humanos, torna-se pertinente avaliar os efeitos da exposição a este ftalato na contratilidade da AUH, bem como na expressão de mRNA de recetores envolvidos nos mesmos processos contráteis. O estudo do efeito do DEHP na contratilidade da AUH decorreu em 3 fases distintas: a) análise do efeito direto do DEHP (relaxação arterial); b) análise do efeito genómico do DEHP sobre as contrações de 5-HT, histamina e KCl; c) análise conjunta de efeitos genómicos e diretos do DEHP.

Em relação ao efeito rápido de concentrações crescentes de DEHP (1nM, 10 nM, 100nM, 1 µM, 10 µM e 100 µM) em artérias previamente contraídas com 5-HT, histamina ou KCl, observou-se que, em alguns casos, o DEHP causa um efeito vasorelaxante e dependente da concentração, principalmente quando as artérias foram contraídas por histamina e por KCl. Isto sugere que o DEHP relaxa melhor as contrações induzidas pela ativação do recetor HR-H1, o principal responsável pelas contrações por histamina na AUH. O HR-H1 está acoplado a uma Gq e provoca aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular [121]. Também as contrações obtidas pela despolarização da membrana foram relaxadas pelo DEHP, embora de forma menos significativa que as de histamina. A despolarização provoca abertura dos VOCC que aumenta o  $Ca^{2+}$  intracelular. Finalmente as contrações induzidas por 5-HT não são muito afetadas pelo DEHP. As contrações por 5-HT envolvem os recetores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, recetores acoplados principalmente a proteínas Gi (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>), ainda que o 5-HT<sub>2A</sub>, presente em menor quantidade que os outros recetores na AUH, também está acoplado a Gq [121]. Estes dados sugerem que o mecanismo relaxante do DEHP provoca um maior efeito quando está envolvida a libertação de  $Ca^{2+}$  intracelular e também, de forma menos intensa, quando o  $Ca^{2+}$  entra desde fora das células.

Posteriormente avaliou-se o efeito da exposição prolongada (24h) das AUH a várias concentrações de DEHP (1nM, 10 µM e 100 µM) sobre os efeitos contracteis da 5-HT, histamina e KCl.

No que diz respeito à 5-HT, artérias expostas à concentração mais baixa de DEHP apresentaram um comportamento dual, em que apenas 69,6% das artérias contraíram. Esta dualidade pode corresponder à presença de diferentes populações de recetores responsáveis pelo efeito contráctil da 5-HT na AUH, o 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> [121]. Provavelmente o DEHP altera a expressão de todos de forma diferente em diferentes populações celulares. Já no caso das artérias expostas ao DEHP 10 µM, a contratilidade induzida com 5-HT foi menor, mas este efeito não é devido a uma diminuição de expressão dos recetores, não havendo dados que sugiram esta diminuição. Por fim, as artérias incubadas com a concentração mais elevada de DEHP mostraram uma resposta contráctil aumentada à 5-HT, este resultado concorda com os resultados obtidos para expressão de mRNA, em que esta concentração de DEHP parece aumentar a expressão do recetor 5-HT<sub>2A</sub> em HUASMC.

Em relação aos outros agentes contrácteis, não se verificaram alterações nas contrações induzidas por histamina entre artérias previamente expostas ao DEHP e AUH não expostas ao DEHP. Este dado sugere que o DEHP não provoca mudanças genómicas significativas que alterem as contrações induzidas pela histamina.

Nas experiências de contractilidade vascular, por último, avaliou-se o efeito da exposição prolongada ao DEHP (1nM, 10 µM e 100 µM) no efeito relaxante rápido do mesmo (sobre contrações induzidas por 5-HT, histamina e KCl).

Como referido anteriormente, nas contrações por 5-HT, o DEHP não provoca um grande efeito relaxante em AUH não condicionadas (só para a concentração de 100 µM de DEHP há um efeito significativo). Em AUH pré-incubadas com DEHP, o efeito relaxante é menor, ou passa a apresentar o efeito contrário (contração em vez de relaxação). Assim, o efeito genómico do DEHP prejudica o seu efeito relaxante, que era fraco, quando as artérias são contraídas pela 5-HT.

Nas contrações por histamina, o DEHP provoca um efeito relaxante significativo em AUH não condicionadas (efeito máximo de quase 30%). Em artérias pré-incubadas com DEHP 1 µM ou 10 µM, o efeito relaxante direto do DEHP sobre as contrações por histamina é anulado, deixa de existir o comportamento vasodilatador. No entanto, quando a pré-incubação das AUH foi realizada com DEHP 100 µM, o efeito relaxante direto do DEHP mantém-se semelhante ao observado em AUH não condicionadas. Estes resultados parecem indicar que os efeitos genómicos do DEHP variam grandemente com a concentração, o que é normal, mas parte desta variação é qualitativa, provavelmente existem padrões de variação da expressão de proteínas muito diferentes qualitativamente a 100 µM que a 1 ou 10 µM. Os resultados de expressão realizados já mostram levemente isto, pois para os dois recetores analisados existe variação da expressão a diferentes concentrações, e o sentido da variação dos dois é diferente, aumento num caso (HR-H1) e aumento inicial e diminuição final no outro (5-HT<sub>2A</sub>). No entanto serão

necessários novos e mais abrangentes estudos de expressão para entender os efeitos genômicos do DEHP que estão envolvidos neste tipo de comportamento.

Nas contrações por KCl, o DEHP provoca um efeito relaxante significativo em AUH não condicionadas (efeito máximo de quase 10%), embora este efeito seja menor que o observado nas contrações por histamina. Em AUH pré-incubadas com DEHP, o efeito relaxante é semelhante, independentemente da concentração de DEHP usada na pré-incubação. Assim, não há influência significativa do efeito genômico do DEHP sobre o seu efeito relaxante direto das AUH contraídas pelo KCl.

Como foi referido anteriormente, a expressão de mRNA do recetor 5-HT<sub>2A</sub> parece aumentar quando aumenta a concentração de DEHP. No caso do RH-H1, os níveis de expressão parecem aumentar inicialmente (até 10 µM) para diminuir posteriormente a concentrações de DEHP mais elevadas. Como também já foi referido, ambos os efeitos genômicos, relacionados com o HR-H1 e com o recetor 5-HT<sub>2A</sub>, variam de forma diferente com a concentração de DEHP, o que indicia a existência de uma diferença quantitativa e qualitativa na expressão genética dependente da concentração do ftalato. Estudos mais abrangentes devem ser realizados para compreender a influência dos efeitos genômicos na função vascular.

É importante referir que o DEHP parece não afetar grandemente a viabilidade das HUASMC, pois, embora exista uma leve diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração, esta não é significativa.

Estes resultados sugerem que o DEHP provoca efeitos diretos e genômicos na AUH que afetam a sua função e estes efeitos são qualitativa e quantitativamente diferentes dependendo da concentração de DEHP. São necessários mais testes para aprofundar os efeitos genômicos do DEHP, em particular na expressão de proteínas e na análise da influência das mudanças provocadas pelo DEHP.

Folha em branco

## Capítulo VI - Conclusão

Com o término deste trabalho foi possível concluir que o DEHP pode agir como vasorelaxante direto da AUH, mas também provoca efeitos genómicos que podem alterar significativamente o efeito direto. O mecanismo de ação do DEHP na contratilidade da AUH aparenta estar relacionado com o metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, embora também poderá haver influência das mudanças na expressão dos recetores de 5-HT e histamina. Não obstante, mais testes são necessários para determinar o mecanismo de ação do DEHP na contratilidade da AUH, os seus efeitos na expressão de proteínas envolvidas na regulação da função contrátil das HUASMC, permitindo posteriormente deslindar o seu papel na toxicidade cardiovascular.

Futuramente sugere-se a avaliação do efeito de agonistas e antagonistas dos recetores de 5-HT e histamina na contratilidade de AUH previamente expostas ao DEHP, de forma a clarificar o mecanismo de ação deste composto. A avaliação da expressão dos restantes recetores de 5-HT (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>7</sub>) e de histamina (H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>) presentes na AUH, bem como de outras proteínas implicadas na regulação da contratilidade vascular.

Os resultados obtidos neste trabalho foram divulgados sob a forma de poster no XI Annual CICS-UBI Symposium 2016, na Covilhã (Anexo I).

Folha em branco

## Bibliografia

1. Widmaier, E.P., et al., *Vander's human physiology : the mechanisms of body function*. 13th Edition. 2014. McGraw-Hill College.
2. Gardner, D.G. and D.M. Shoback, *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology: Eighth Edition*. 2007: McGraw-Hill Education.
3. Cinnamon VanPutte, J.R., Rod Seeley, Trent Stephens, Philip Tate, Andrew Russo *Seeley's Essentials of Anatomy and Physiology*. 8th edition ed, ed. K. Edition. 2011, New York: McGraw-Hill.
4. Gore, A.C., et al., *EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals*. *Endocrine Reviews*, 2015. **36**(6): p. E1-E150.
5. Schug, T.T., et al., *Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011. **127**(3-5): p. 204-15.
6. Casals-Casas, C. and B. Desvergne, *Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption*. *Annu Rev Physiol*, 2011. **73**: p. 135-62.
7. Halden, R.U., *Plastics and Health Risks*. *Annual Review of Public Health*, 2010. **31**(1): p. 179-194.
8. Khalil, N., A. Chen, and M. Lee, *Endocrine disruptive compounds and cardio-metabolic risk factors in children*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014. **19**: p. 120-124.
9. Lang, I.A., et al., *Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults*. *Jama*, 2008. **300**(11): p. 1303-10.
10. Olsén, L., L. Lind, and P.M. Lind, *Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012. **80**: p. 179-183.
11. Melzer, D., et al., *Urinary Bisphenol A Concentration and Angiography-Defined Coronary Artery Stenosis*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(8): p. e43378.
12. Posnack, N.G., *The adverse cardiac effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate and Bisphenol A*. *Cardiovasc Toxicol*, 2014. **14**(4): p. 339-57.
13. Shankar, A., S. Teppala, and C. Sabanayagam, *Bisphenol A and Peripheral Arterial Disease: Results from the NHANES*. *Environmental Health Perspectives*, 2012. **120**(9): p. 1297-1300.
14. Trasande, L., et al., *Urinary Phthalates Are Associated with Higher Blood Pressure in Childhood*. *The Journal of Pediatrics*, 2013. **163**(3): p. 747-753.e1.
15. Wittassek, M., et al., *Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach*. *Mol Nutr Food Res*, 2011. **55**(1): p. 7-31.
16. Talsness, C.E., et al., *Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009. **364**(1526): p. 2079.

17. Wetherill, Y.B., et al., *In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action*. *Reprod Toxicol*, 2007. **24**(2): p. 178-98.
18. Kim, S.H. and M.J. Park, *Phthalate exposure and childhood obesity*. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 2014. **19**(2): p. 69-75.
19. Mankidy, R., et al., *Biological impact of phthalates*. *Toxicol Lett*, 2013. **217**(1): p. 50-8.
20. Mariana, M., et al., *The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review*. *Environment International*, 2016. **94**: p. 758-776.
21. Koch, H.M., R. Preuss, and J. Angerer, *Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results<sup>1</sup>*. *International Journal of Andrology*, 2006. **29**(1): p. 155-165.
22. Ventrice, P., et al., *Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013. **36**(1): p. 88-96.
23. Calafat, A.M., et al., *Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate*. *Toxicology*, 2006. **217**(1): p. 22-30.
24. Tanaka, T., *Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet*. *Food and Chemical Toxicology*, 2002. **40**(10): p. 1499-1506.
25. Posnack, N.G., et al., *Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells*. *Environ Health Perspect*, 2012. **120**(9): p. 1243-51.
26. Lind, P.M. and L. Lind, *Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly*. *Atherosclerosis*, 2011. **218**(1): p. 207-213.
27. Di Naro, E., et al., *Umbilical cord morphology and pregnancy outcome*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001. **96**(2): p. 150-7.
28. Benirschke, K., *Remarkable placenta*. *Clin Anat*, 1998. **11**(3): p. 194-205.
29. Nanaev, A.K., et al., *Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord*. *Placenta*, 1997. **18**(1): p. 53-64.
30. Ferguson, V.L. and R.B. Dodson, *Bioengineering aspects of the umbilical cord*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2009. **144**: p. S108-S113.
31. Zhang, S.-x., *An Atlas of Histology*, Springer, Editor. 1998, Springer New York: New York, NY.
32. Vanhoutte, P.M., *Endothelium and control of vascular function*. *Hypertension*, 1989. **13**: p. 658-667.
33. Meyer, W.W., et al., *Structure and closure mechanism of the human umbilical artery*. *Eur J Pediatr*, 1978. **128**(4): p. 247-59.
34. Marino, E.C., *Histología Humana 1 - Citología, Embriología e Histología Geral*. 3ª ed. Vol. 1. 2001, Salamanca.

35. Gabella, G., *Morphology of smooth muscle*, in *Cellular aspects of smooth muscle function*, C.Y. Kao and M.E. Carsten, Editors. 1997, Cambridge University Press: Cambridge. p. 1-47.
36. Santos-Silva, A.J., et al., *PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries*. *European Journal of Pharmacology*, 2008. **582**(1-3): p. 102-109.
37. Sunkel, C.A.C., *Biologia Celular e Molecular*. 4<sup>a</sup> ed. 2005, Lisboa.
38. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**: p. 767-801.
39. Rzucidlo, E.M., K.A. Martin, and R.J. Powell, *Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation*. *Journal of Vascular Surgery*, 2007. **45**(6, Supplement): p. A25-A32.
40. Roffino, S., et al., *Premature birth is associated with not fully differentiated contractile smooth muscle cells in human umbilical artery*. *Placenta*. **33**(6): p. 511-517.
41. Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. *Neth Heart J*, 2007. **15**(3): p. 100-8.
42. Milewicz, D.M., et al., *Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: Evidence for a hyperplastic vasculomyopathy*. *Genet Med*, 2010. **12**(4): p. 196-203.
43. Cairrao, E., et al., *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2009. **45**(3): p. 175-84.
44. Frank, E.D. and L. Warren, *Aortic smooth muscle cells contain vimentin instead of desmin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(5): p. 3020-4.
45. Gunst, S.J., *Applicability of the sliding filament/crossbridge paradigm to smooth muscle*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. **134**: p. 7-61.
46. Morgan, K.G. and S.S. Gangopadhyay, *Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins*. *J Appl Physiol (1985)*, 2001. **91**(2): p. 953-62.
47. Kargacin, G.J. and M.P. Walsh, *Chapter 31 - Vascular Smooth Muscle Contraction A2 - Cohen, Nicholas Sperelakis Yoshihisa Kurachi Andre Terzic Michael V*, in *Heart Physiology and Pathophysiology (Fourth Edition)*. 2001, Academic Press: San Diego. p. 527-539.
48. Lehman, W. and K.G. Morgan, *Structure and Dynamics of the Actin-Based Smooth Muscle Contractile and Cytoskeletal Apparatus*. *Journal of muscle research and cell motility*, 2012. **33**(6): p. 461-469.
49. Sobue, K., et al., *Caldesmon: A common actin-linked regulatory protein in the smooth muscle and nonmuscle contractile system*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1988. **37**(3): p. 317-325.

50. Winder, S.J. and M.P. Walsh, *Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(17): p. 10148-10155.
51. El-Mezgueldi, M., *Calponin*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1996. **28**(11): p. 1185-1189.
52. Babu, G.J., D.M. Warshaw, and M. Periasamy, *Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(6): p. 532-40.
53. Tajsharghi, H., *Thick and Thin Filament Gene Mutations in Striated Muscle Diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2008. **9**(7): p. 1259.
54. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. Nature, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
55. Sobey, C.G., *Potassium channel function in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 28-38.
56. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
57. Jackson, W.F., *Ion channels and vascular tone*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 173-8.
58. Faraci, F.M. and D.D. Heistad, *Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 53-97.
59. Large, W.A. and Q. Wang, *Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl- conductance in smooth muscle*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C435-54.
60. Yamazaki, J., et al., *Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells*. J Physiol, 1998. **507** ( Pt 3): p. 729-36.
61. Toyota, N., Y. Shimada, and D. Bader, *Molecular cloning and expression of chicken cardiac troponin C*. Circ Res, 1989. **65**(5): p. 1241-6.
62. Stevens, F.C., *Calmodulin: an introduction*. Can J Biochem Cell Biol, 1983. **61**(8): p. 906-10.
63. Lin, G., et al., *Modulation of smooth muscle tonus in the lower urinary tract: interplay of myosin light-chain kinase (MLCK) and MLC phosphatase (MLCP)*. BJU Int, 2011. **108**(2 Pt 2): p. E66-70.
64. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
65. Kitazawa, T., M. Masuo, and A.P. Somlyo, *G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**: p. 9307-9310.

66. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
67. Woodrum, D.A. and C.M. Brophy, *The paradox of smooth muscle physiology*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **177**(1-2): p. 135-43.
68. Amano, M., et al., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
69. Uehata, M., et al., *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. *Nature*, 1997. **389**(6654): p. 990-4.
70. Shimokawa, H., et al., *Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm*. *Cardiovasc Res*, 1999. **43**(4): p. 1029-39.
71. Amano, M., Y. Fukata, and K. Kaibuchi, *Regulation and functions of Rho-associated kinase*. *Exp Cell Res*, 2000. **261**(1): p. 44-51.
72. Hirano, K., *Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle*. *J Pharmacol Sci*, 2007. **104**(2): p. 109-15.
73. Gong, M.C., et al., *Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(30): p. 21492-8.
74. Carvajal, J.A., et al., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. *J Cell Physiol*, 2000. **184**(3): p. 409-20.
75. Somlyo, A.P., et al., *Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. **134**: p. 201-34.
76. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012. **69**(2): p. 247-66.
77. Andreopoulos, S. and A. Papapetropoulos, *Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation*. *Gen Pharmacol*, 2000. **34**(3): p. 147-57.
78. Lucas, K.A., et al., *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 375-414.
79. Haynes, J., Jr., et al., *Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilation*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(2 Pt 2): p. H511-6.
80. Hardie, D.G., *Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status*. *Endocrinology*, 2003. **144**(12): p. 5179-83.
81. Hardie, D.G., *The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 23): p. 5479-87.
82. Takuwa, Y., *Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca<sup>2+</sup>, protein kinase C and myosin light chain phosphatase*. *Jpn Heart J*, 1996. **37**(6): p. 793-813.
83. Rembold, C.M., *Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle*. *Hypertension*, 1992. **20**,2: p. 129-137.

84. Minami, K., et al., *Mechanism of activation of the Ca(2+)-activated K+ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells*. Life Sci, 1993. **53**(14): p. 1129-35.
85. McDaniel, N.L., et al., *Cyclic AMP relaxes swine arterial smooth muscle predominantly by decreasing cell Ca2+ concentration*. J Physiol, 1991. **439**: p. 147-60.
86. Vaandrager, A.B. and H.R. de Jonge, *Signalling by cGMP-dependent protein kinases*. Mol Cell Biochem, 1996. **157**(1-2): p. 23-30.
87. Sonnenburg, W.K. and J.A. Beavo, *Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 87-114.
88. Polson, J.B. and S.J. Strada, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 403-27.
89. Raeymaekers, L., F. Hofmann, and R. Casteels, *Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle*. Biochem J, 1988. **252**(1): p. 269-73.
90. Lincoln, T.M. and T.L. Cornwell, *Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation*. Blood Vessels, 1991. **28**(1-3): p. 129-37.
91. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-176.
92. Orallo, F., *Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle*. Pharmacol Ther, 1996. **69**: p. 153-171.
93. Furukawa, K., et al., *Cyclic GMP stimulates Na+/Ca2+ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12337-41.
94. Bootman, M.D., et al., *Calcium signalling -an overview*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(1): p. 3-10.
95. Guibert, C., T. Ducret, and J.P. Savineau, *Voltage-independent calcium influx in smooth muscle*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. **98**(1): p. 10-23.
96. Hofmann, F., M. Biel, and V. Flockerzi, *Molecular basis for Ca2+ channel diversity*. Annu Rev Neurosci, 1994. **17**: p. 399-418.
97. Lacinova, L., *Voltage-dependent calcium channels*. Gen Physiol Biophys, 2005. **24 Suppl 1**: p. 1-78.
98. Gurkoff, G., et al., *Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury*. Pharmaceuticals, 2013. **6**(7): p. 788.
99. Yamakage, M. and A. Namiki, *Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review*. Can J Anaesth, 2002. **49**(2): p. 151-64.
100. Kuo, A., et al., *Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state*. Science, 2003. **300**(5627): p. 1922-6.

101. McDonald, T.F., et al., *Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells*. *Physiol Rev*, 1994. **74**: p. 365-507.
102. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels*. *Pharmacological Reviews*, 2005. **57**(4): p. 411-425.
103. Cribbs, L.L., *T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: Multiple functions*. *Cell Calcium*, 2006. **40**(2): p. 221-30.
104. Striessnig, J., H.J. Bolz, and A. Koschak, *Channelopathies in Ca(v)1.1, Ca(v)1.3, and Ca(v)1.4 voltage-gated L-type Ca(2+) channels*. *Pflugers Archiv*, 2010. **460**(2): p. 361-374.
105. Kuo, I.Y., S.E. Wolfle, and C.E. Hill, *T-type calcium channels and vascular function: the new kid on the block?* *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 4): p. 783-95.
106. Striessnig, J., et al., *L-type Ca<sup>2+</sup> channels in Ca<sup>2+</sup> channelopathies*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. **322**(4): p. 1341-1346.
107. Tufan, H., et al., *Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levcromakalim*. *Life Sci*, 2003. **72**(12): p. 1321-9.
108. Garcia-Martinez, C., et al., *Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 32552-8.
109. Korovkina, V.P. and S.K. England, *Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002. **29**(4): p. 317-23.
110. Bonnet, S. and S.L. Archer, *Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension*. *Pharmacol Ther*, 2007. **115**(1): p. 56-69.
111. Gutman, G.A., et al., *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels*. *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(4): p. 473-508.
112. Ko, E.A., et al., *Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells*. *J Smooth Muscle Res*, 2008. **44**(2): p. 65-81.
113. Alexander, S.P., A. Mathie, and J.A. Peters, *Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164 Suppl 1**: p. S1-324.
114. Wei, A.D., et al., *International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels*. *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(4): p. 463-72.
115. Kotlikoff, M. and I. Hall, *Hypertension: beta testing*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(5): p. 654-6.
116. Rang, H.P. and M.M. Dale, *Rang and Dale's pharmacology*. 2014, Edinburgh etc.: Elsevier/Churchill Livingstone.

117. Ullmer, C., et al., *Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels*. FEBS Lett, 1995. **370**(3): p. 215-21.
118. Karlsson, C., et al., *Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating circular smooth muscle contraction in the human umbilical artery*. Gynecol Obstet Invest, 1999. **47**(2): p. 102-7.
119. Gupta, S., et al., *Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy*. J Hypertens, 2006. **24**(7): p. 1345-53.
120. Lovren, F., et al., *Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery*. Br J Pharmacol, 1999. **127**(5): p. 1247-55.
121. Santos-Silva, A.J., et al., *Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors*. Reproductive Sciences, 2009. **16**(12): p. 1175-85.
122. Goodman, L.S., et al. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 2011. 12th Edition. Laurence&Brunton.
123. Foye, W.O., T.L. Lemke, and D.A. Williams, *Foye's principles of medicinal chemistry*. 2008. 7th Edition Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
124. Repka-Ramirez, M.S., *New concepts of histamine receptors and actions*. Current Allergy and Asthma Reports, 2003. **3**(3): p. 227-231.
125. Hill, S.J., et al., *International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors*. Pharmacol Rev, 1997. **49**(3): p. 253-78.
126. Leurs, R., M.J. Smit, and H. Timmerman, *Molecular pharmacological aspects of histamine receptors*. Pharmacol Ther, 1995. **66**(3): p. 413-63.
127. Hawley, J., P.C. Rubin, and S.J. Hill, *Distribution of receptors mediating phosphoinositide hydrolysis in cultured human umbilical artery smooth muscle and endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 1995. **49**(7): p. 1005-11.
128. Martinez, A.C., et al., *Evidence of histamine receptor function in isolated horse penile dorsal arteries*. Life Sci, 2000. **67**(11): p. 1355-68.
129. Obuchowicz, R., et al., *Involvement of central and peripheral histamine H(3) receptors in the control of the vascular tone and oxygen uptake in the mesenteric circulation of the rat*. J Physiol Pharmacol, 2004. **55**(1 Pt 2): p. 255-67.
130. Levi, R. and N.C. Smith, *Histamine H(3)-receptors: a new frontier in myocardial ischemia*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(3): p. 825-30.
131. de Esch, I.J., et al., *The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(9): p. 462-9.
132. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.

### Effect of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Human Umbilical Artery Contractility

Azevedo R. M.<sup>1</sup>, Cairrão E.<sup>1</sup>, Verde I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.

#### Introduction

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer widely used in polyvinyl chloride (PVC) medical devices to increase flexibility, elasticity and facilitate processing. In addition to medical devices as blood bags, catheters, tubes and gloves, humans are exposed to DEHP through ingestion of house dust, food that has been stored in plastic packs, dermal uptake from cosmetics and inhalation of covering materials and paints. Phthalates are highly susceptible to leach from the polymer matrix once they are not covalently bound to it. Phthalates are known for their endocrine disrupting properties which are related to obesity, diabetes and fertility problems. However, the effects of phthalates at vascular level are not well described yet.

#### Methods

The effect of DEHP in human umbilical artery (HUA) contractility was studied using organ bath technique. Rings of HUA without endothelium were incubated with different concentrations of DEHP (1 nM, 10 µM and 100 µM) for 24h, then contracted by serotonin (1 µM), histamine (10 µM) and KCl (60mM) and the effect of crescent concentrations of DEHP (1nM - 100µM) was also analyzed.

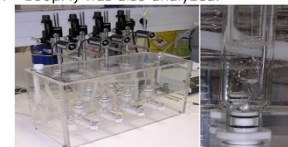


Image 1 - Organ Bath

#### Results

##### Effect of DEHP exposure (1nM, 10µM and 100µM) for 24h in HUA contractions induced by 5-HT (1µM), His (10µM) or KCl (60mM).

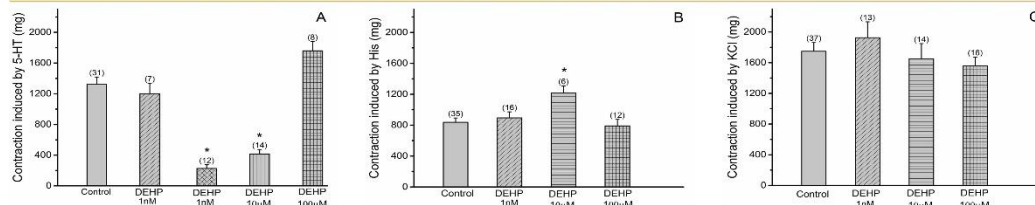


Figure 1 – Effects of 24h exposure to DEHP (1nM, 10µM and 100µM) on contractions induced by (A) 5-HT (1µM), (B) His (10µM) and (C) KCl (60mM). The bars represent the mean value and the vertical lines indicate the SEM of the number of experiments represented near the bars. \*(P<0.05 versus Control, one-way ANOVA with Dunn's post hoc test).

##### Vasorelaxant effect induced by DEHP (1nM to 100µM) in the presence of three different contractile agents in HUA exposed for 24h to DEHP (1nM, 10µM and 100µM).

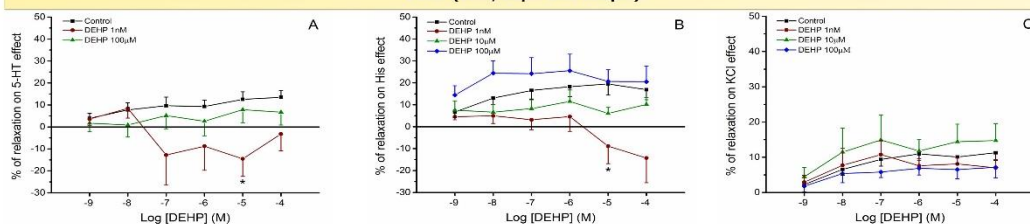


Figure 2 – Vasorelaxant effect of DEHP after contractions induced by (A) 5-HT (1µM), (B) His (10µM) and (C) KCl (60mM). Each point represent the mean value and the vertical lines indicate the SEM of at least 7 experiments. \*(P<0.05 versus Control, one-way ANOVA with Dunn's post hoc test).

#### Conclusions

- DEHP influences the contractile effect of serotonin and histamine. Serotonin elicited lower contractile effect in HUA exposed to DEHP, and histamine induced higher contractile effect in HUA under the same conditions.
- DEHP seems to induce a vasorelaxant effect. The same effects were not observed in HUA exposed to DEHP 1nM for 24h.
- Further experiments will be needed to determine the cardiovascular effects of DEHP.