



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

Joana Isabel Simões Nicolau Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

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

Covilhã, outubro de 2013

Agradecimentos

Não posso deixar de expressar o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram com apoio, motivação, incentivo, compreensão e disponibilidade para a concretização desta dissertação. Desejo expressar os agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues, por toda a disponibilidade, atenção, paciência e orientação científica demonstrada durante todo este ano.

Ao professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños, por me transmitir novos conhecimentos e pela sua contribuição e orientação no desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Cláudio Maia pela paciência e pelo tempo despendido para me ensinar real-time PCR.

A todos os membros do CICS-UBI que, de algum modo, me ajudaram durante este ano.

Às minhas colegas do laboratório, Joana Feiteiro e Melissa Mariana, pela ajuda e disponibilidade no decorrer deste trabalho, mas em especial à Ana Esteves por todo o apoio prestado, e colaboração no trabalho prático.

Às minhas amigas Cláudia Sousa, Ana Esteves, Armanda Gonçalves e Tatiana Saraiva, pelo companheirismo, incentivo, compreensão, amizade e por me ajudarem a superar todos os bons e maus momentos.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha família pelo carinho, amor, sacrifício e apoio. Ao meu namorado, Luís, obrigada pelo apoio, amor e atenção.

Resumo

A artéria umbilical humana é uma via importante na circulação feto-placentária e é essencial que se conheçam os seus mecanismos funcionais para uma melhor compreensão de patologias como a hipertensão gestacional. O mecanismo de contração do músculo liso é iniciado por ativação de um recetor ou de um canal iónico e envolve mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de cálcio. O objetivo deste trabalho foi analisar se existem alterações a nível vascular entre cordões umbilicais provenientes de gestantes normotensas e cordões umbilicais provenientes de gestantes hipertensas. Neste sentido, analisou-se a expressão dos canais de cálcio Cav1.2, das subunidades α e β dos canais de potássio BK_{Ca} e também de algumas proteínas envolvidas nos mecanismos de contração/relaxamento, a PKG, a GC e o NPRA. Para analisar se existem ou não alterações na expressão dos diferentes genes, foram realizadas culturas celulares de células provenientes da artéria umbilical de cordões de gestantes normotensas e hipertensas e posteriormente foi realizada uma análise de expressão genética por Real-time PCR.

Neste trabalho observou-se a existência de pequenas alterações na expressão dos genes analisados, notando-se uma maior diferença no caso da guanilato ciclase ($P = 0,086$), em que houve um aumento da expressão. No referente à expressão da subunidade α dos canais BK_{Ca} , e contrariamente ao expectável, parece não existir alteração da sua expressão, embora a subunidade β apresente uma diminuição não significativa da expressão.

Palavras-chave

Hipertensão, Canais de cálcio, Canais de potássio, Real-time PCR

Abstract

The human umbilical artery is an important pathway in the fetoplacental circulation and it is essential to know their functional mechanisms, in order to better understanding the diseases such as hypertension during pregnancy. The smooth muscle contraction mechanism is initiated through the activation of a receptor or an ionic channel which involves calcium dependent or independent mechanisms. The research objective was identifying if there are vascular modifications between umbilical cords from normotensive and hypertensive pregnant. In order to reach the objective purposed, the expression of Cav1.2 calcium channels, α and β subunits of BK_{Ca} potassium channel and some proteins (PKG, GC and NPRA) involved in contraction/relaxation mechanisms were analyzed. Also, to analyze modifications on the expression of genes, cells cultures from umbilical arteries of normotensive and hypertensive pregnant were made. Later, an analysis of genetic expression by Real-time PCR was carried.

In this study, we observed the existence of small modifications in the analyzed genes. In consequence of an expression increase, a greater difference was revealed in guanylyl cyclase ($P=0,086$). Concerning the expression of α subunit of BK_{Ca} channels, and contrarily to the expected, seems not exist an alteration of its expression, although the β subunit shows a, non-significant, decrease of the expression.

Keywords

Hypertension, Calcium channels, potassium channels, Real-time PRC

Índice

Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Músculo liso vascular	1
1.1.1 Canais de Cálcio	3
1.1.2 Canais de potássio.....	7
1.2 Contração do músculo liso vascular	11
1.3 Relaxamento do músculo	14
1.3.1 Guanilato ciclase	15
1.3.2 GMP cíclico	19
1.3.3 Proteína cinase G.....	20
1.4 Cordão umbilical	23
1.4.1 Artéria umbilical humana	24
1.5 Hipertensão gestacional	26
Capítulo 2: Objetivos.....	29
Capítulo 3: Materiais e métodos	30
3.1 Recolha de tecidos.....	30
3.2 Cultura celular.....	30
3.3 Extração de RNA total.....	31
3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)	32
3.5 PCR (Reação em cadeia da polimerase) convencional.....	32
3.6 PCR em tempo real	33
3.7 Análise estatística.....	34
Capítulo 4: Resultados	35
4.1 Análise da expressão do canal Cav1.2.....	35
4.2 Análise da expressão do canal BK _{ca}	36
4.3 Análise da expressão da proteína cinase G.....	38
4.4 Análise da expressão da guanilato ciclase.....	39
4.5 Análise da expressão do recetor NPRA	40
Capítulo 5: Discussão.....	41
Capítulo 6: Conclusão	44
Bibliografia.....	45

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática de uma célula muscular lisa	2
Figura 2: Características estruturais das células musculares lisas	2
Figura 3: Estrutura geral dos canais de cálcio tipo L	5
Figura 4: Estrutura geral dos canais de potássio BK_{ca}	8
Figura 5: Vias de ativação dos canais de cálcio e de potássio	10
Figura 6: Mecanismos de contração das células musculares lisas	14
Figura 7: Estrutura geral dos recetores da guanilato ciclase	19
Figura 8: Representação esquemática do cordão umbilical humano, apresentando duas artérias e uma veia	23
Figura 9: Representação esquemática da artéria umbilical humana	24
Figura 10: Estudo da expressão dos canais Cav1.2	35
Figura 11: Estudo da expressão da subunidade α dos canais BK_{ca}	36
Figura 12: Estudo da expressão da subunidade β dos canais BK_{ca}	37
Figura 13: Estudo da expressão da proteína cinase G	38
Figura 14: Estudo da expressão da guanilato ciclase	39
Figura 15: Estudo da expressão do recetor do péptido natriurético A	40

Lista de Tabelas

Tabela 1: Isoformas da guanilato ciclase particulada, os seus ligandos e a respetiva distribuição nos tecidos.	16
Tabela 2: Isoformas da guanilato ciclase solúvel e a respetiva distribuição nos tecidos	18
Tabela 3: Primers utilizados para PCR em tempo real	33

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina (<i>Serotonin</i>)
AC	Adenilato ciclase (<i>Adenylate cyclase</i>)
ACm	Adenilato ciclase membranar (<i>Membranous adenylyl cyclase</i>)
ACs	Adenilato ciclase solúvel (<i>Soluble adenylyl cyclase</i>)
ADP	Adenosina difosfato (<i>Adenosine diphosphate</i>)
AMP	Adenosina monofosfato (<i>Adenosine monophosphate</i>)
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina (<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BK _{Ca}	Canais de potássio de grande condutância ativados por cálcio (<i>Large conductance calcium-activated potassium channels</i>)
Ca ²⁺	Cálcio (<i>Calcium</i>)
CaM	Calmodulina (<i>Calmodulin</i>)
Cap	Calponina (<i>Calponin</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>Complementary DNA</i>)
CO	Monóxido de carbono (<i>Carbon monoxide</i>)
DAG	Diacilglicerol (<i>Dyacylglycerol</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Trifosfato de desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
EDHF	Fator hiperpolarizante dependente do endotélio (<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EPAC	Permutador de proteína ativado pelo AMPc (<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>)

FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
GC	Guanilato ciclase (<i>Guanylate cyclase</i>)
GCp	Guanilato ciclase particulada (<i>Particulate Guanylate cyclase</i>)
GCS	Guanilato ciclase solúvel (<i>Soluble guanylate cyclase</i>)
GDP	Guanosina difosfato (<i>Guanosine diphosphate</i>)
GMPc	Monofostafo cíclico de guanosina (<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>)
GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine triphosphate</i>)
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato (<i>Bicarbonate</i>)
HTA	Hipertensão (<i>Hypertension</i>)
HUA	Artéria umbilical humana (<i>human umbilical artery</i>)
IGF-I	Fator 1 de crescimento de insulina (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IK	Canal de potássio de condutância intermedia ativado por cálcio (<i>Intermediate conductance potassium channel</i>)
IP3R	Recetor de inositol trifosfato (<i>Inositol-1,4,5-triphosphate receptor</i>)
K ⁺	Potássio (<i>Potassium</i>)
K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP (<i>ATP-sensitive potassium channels</i>)
KCl	Cloreto de potássio (<i>Potassium chloride</i>)
KH ₂ PO ₄	Ácido fosfórico (<i>Potassium dihydrogen phosphate monobasic</i>)
K _{ir}	Canais de potássio retificadores internos (<i>Inwardly rectifying potassium channels</i>)
K _v	Canais de potássio operados por voltagem (<i>Voltage-gated potassium channels</i>)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MBS	Subunidade de ligação à miosina (<i>Myosin-binding subunit</i>)
MEK	MAPK cinase (<i>MAPK kinase</i>)
Mg ²⁺	Magnésio (<i>Magnesium</i>)

MgCl ₂	Cloreto de magnésio (<i>Magnesium chloride</i>)
MLC ₂₀	Cadeias leves de miosina (<i>Myosin light chains</i>)
MLCK	Cinase das cadeias leves de miosina (<i>Myosin light chain kinase</i>)
MLCP	Fosfatase das cadeias leves de miosina (<i>Myosin light chain Phosphatase</i>)
mRNA	RNA mensageiro (<i>Messenger RNA</i>)
MYPT	Fosfatase de miosina-1 (<i>Myosin phosphatase target protein-1</i>)
Na ⁺	Sódio (<i>Sodium</i>)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio (<i>Sodium bicarbonate</i>)
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio (<i>Sodium phosphate</i>)
NO	Óxido nítrico (Nitric oxide)
NOS	Sintetase do óxido nítrico (<i>Nitric oxide synthase</i>)
NPR	Recetor de péptidos natriuréticos (<i>Natriuretic peptide receptor</i>)
NXC	Permutador de sódio/cálcio (<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
PAK	Proteína cinase ativada por P21 (<i>P21-activated kinase</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCT	C-terminal proximal do canal Cav1.2 (<i>Proximal Cav1.2 C-terminus</i>)
PDE	Fosfodiesterases (<i>Phosphodiesterases</i>)
PKN	Proteína cinase N (<i>Protein kinase N</i>)
PLA2	Fosfolipase A2 (<i>Phospholipase A2</i>)
PLC	Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)
PLD	Fosfolipase D (<i>Phospholipase D</i>)
PMCA	Cálcio ATPase da membrana plasmática (<i>Plasma membrane Ca²⁺ ATPase</i>)
PKA	Proteína cinase A (<i>Protein kinase A</i>)
PKC	Proteína cinase C (<i>Protein kinase C</i>)

PKG	Proteína cinase G (<i>Protein kinase G</i>)
PSS	Solução salina fisiológica (<i>Physiologic saline solution</i>)
RCK	Domínio regulador de condutância de potássio
RE	Reticulo endoplasmático (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RyR	Recetor de rianodina (<i>Ryanodine receptor</i>)
ROC	Canais operados por recetores (<i>Receptor-operated channels</i>)
ROCK	Proteína cinase dependente da Rho (<i>Rho-activated kinase</i>)
SAC	Canais ativados pelo stress físico (<i>Receptor stretch-activated</i>)
SERCA	Bomba de cálcio do reticulo endoplasmático (<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ activated ATPase</i>)
SK3	Canal de potássio de pequena condutância ativado por cálcio (<i>Small conductance calcium-activated potassium channels</i>)
SMC	Célula muscular lisa (<i>Smooth muscle cell</i>)
SOC	Canais operados por depósitos intracelulares (<i>Store-operated channel</i>)
VDCC	Canais de cálcio dependentes de voltagem (<i>Voltage dependent calcium channel</i>)

Capítulo 1: Introdução

1.1 Músculo liso vascular

O tecido muscular é um dos tecidos mais especializados, estando presente em todo o organismo e tem como propriedades fundamentais a contractilidade, a regulação do tónus vascular, pressão sanguínea e fluxo sanguíneo [1]. Em termos morfológicos existem dois tipos, o tecido do músculo liso comum e o especializado, sendo aqui abordado o tecido muscular liso comum, mais especificamente as fibras musculares lisas agrupadas que formam as paredes das artérias, sendo constituído por células fusiformes e citoplasma eosinófilo homogéneo, as células musculares lisas (SMC) [2]. Estas células têm um comprimento de 20-500 μm e uma largura de 5-10 μm , e estão envolvidas por uma malha de reticulina e por uma cápsula fina através da qual se encontram individualizadas. O sarcolema está revestido por um revestimento celular ou uma membrana basal. O núcleo é cilíndrico e localiza-se no centro da célula, o sarcoplasma está maioritariamente ocupado por filamentos que podem ser filamentos de actina, de miosina e intermédios [2, 3]. Os filamentos de actina dispõem-se numas estruturas densas denominadas corpos densos, que são dispostos de modo irregular no citoplasma e na membrana plasmática; os filamentos de miosina são mais escassos e dispõem-se entre os filamentos de actina mas não estão em contacto com os corpos densos. Os filamentos intermédios não possuem nenhuma proteína contráctil e estão paralelamente agrupadas ao sarcolema ou no centro da célula e encontram-se associados ao esqueleto celular [2, 4-6]. O citoesqueleto é constituído por microfilamentos (actina), microtúbulos e filamentos intermédios, mediando as propriedades mecânicas da célula [7]. Canais e outros transportadores iónicos estão integrados na membrana plasmática e ligados, principalmente, aos filamentos de actina [7]. A proteína mais abundante ao nível das células é a actina que existe sob a forma solúvel ou filamentosa. A actina filamentosa tem uma estrutura polimérica assimétrica bilobada de cerca de 42 kDa de monómeros organizados numa dupla estrutura helicoidal. Nas SMC, os filamentos de actina encontram-se na membrana através de um complexo de proteínas de adesão associado às integrinas [8]. O retículo sarcoplasmático é representado por uma rede de tubos longitudinais que se situam sob o sarcolema, tem como missão o armazenamento de cálcio, que no momento da contração é libertado, desencadeando a atividade ATPásica da miosina e assim produzindo a contração muscular [2].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

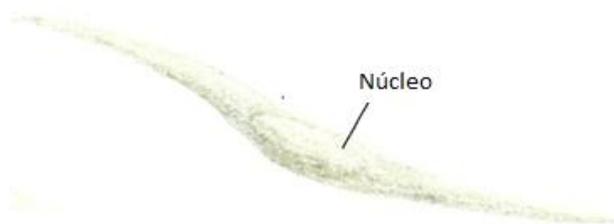


Figura 1. Representação esquemática de uma célula muscular lisa (SMC). Adaptado de [9]

As SMC das artérias podem apresentar fenótipo contrátil ou sintético (figura2). Quando há presença de fatores de crescimento ocorre um aumento de células com fenótipo sintético, com grande número de organelos para síntese proteica e elevada taxa de crescimento. As células com fenótipo contrátil apresentam atividade sintética e proliferativa reduzida apresentando proteínas envolvidas na regulação da contração vascular, canais iônicos e enzimas [1, 10].

Quando ocorre uma lesão arterial, as SMC passam do estado contrátil para sintético. Esta mudança leva a um aumento dos componentes da matriz extracelular, da proliferação e da migração das SMC (essenciais na resposta à lesão) que leva à redução do fluxo sanguíneo.

Nos vasos sanguíneos, as SMC (Figura 1), facilitam o fluxo de nutrientes que sustentam todos os órgãos do corpo e são determinantes na pressão sanguínea. As doenças vasculares resultam de um aumento da pressão sanguínea e são a causa mais comum de morte e incapacidade no Ocidente [11].

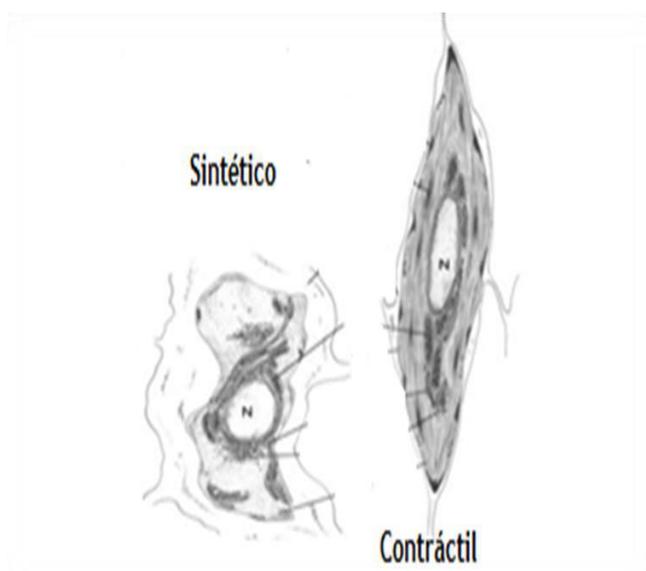


Figura 2. Características estruturais das SMCs contracteis e sintéticas. N representa o núcleo da célula. Adaptado de [10].

1.1.1 Canais de Cálcio

O cálcio é o potenciador da contração. O influxo de cálcio através dos canais localizados na membrana plasmática e o cálcio libertado das reservas intracelulares são a maior fonte de ativação e este influxo é regulado pela concentração de cálcio citosólico e pelo potencial de membrana [12]. Vasoconstritores atuam através do aumento de cálcio. Um aumento de cálcio endotelial induz o relaxamento das SMC adjacentes. A maior via de aumento de cálcio são os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) e os canais catiónicos não seletivos na membrana plasmática ou os canais que libertam as reservas internas de cálcio (recetor rianodina, RyR e recetor inositol trifosfato, IP3R) na membrana do retículo sarcoplasmático [13].

Canais de cálcio dependentes de voltagem

Os canais de cálcio dependentes de voltagem medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam a contração, secreção, neurotransmissão e expressão de genes. São membros da superfamília genética de canais iónicos transmembranares que inclui os canais de potássio dependentes de voltagem e os canais de sódio [14].

Os canais de cálcio são complexos proteicos com 4 ou 5 subunidades distintas codificadas por múltiplos genes. A subunidade α_1 tem entre 190 a 250 kDa e é a maior subunidade. Está subunidade incorpora a condução do poro, o sensor de voltagem e está envolvido na propagação e é o sitio da regulação do canal por segundos mensageiros, drogas e toxinas. A subunidade α_1 é composta por cerca de 2000 aminoácidos e está organizada em 4 domínios homólogos (I-IV) onde cada domínio contém 6 segmentos transmembranares em hélice α (S1-S6) e é codificada por 10 genes distintos. O domínio S4 é o sensor de voltagem. O poro localiza-se entre os segmentos transmembranares S5 e S6 e cada domínio determina a seletividade e a condutância de iões e mudam em apenas 3 aminoácidos no poro nos domínios I, III e IV. O domínio citosólico N-terminal situa-se no domínio I e o domínio C-terminal situa-se no domínio IV. O C-terminal consiste em 2 grandes regiões com um sitio de clivagem da calpaína e um sitio de interação da calmodulina (CaM). A subunidade α_1 está associada a quatro subunidades auxiliares distintas, a subunidade β (pode ser β_1 a β_4), a subunidade $\alpha_2\delta$ e a subunidade γ . A subunidade β é intracelular, hidrofóbica e tem entre 50 a 60 kDa. A subunidade $\alpha_2\delta$ é transmembranar e é um complexo ligado por pontes dissulfeto. Esta subunidade é codificada por um único gene no que resulta um prépolipéptido que sofre posterior clivagem e forma duas subunidades, α_2 e δ . A subunidade γ é composta por quatro segmentos transmembranares [14-16].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

O poro do canal é codificado por 10 genes que formam vários tipos de canais de cálcio dependentes de voltagem, são eles:

- Tipo L (Cav1, com quatro isoformas)
- Tipo P/Q, N, R neuronal (Cav2, com três isoformas)
- Tipo T (Cav3, com três isoformas)

Os Cav1 e Cav2 são canais ativados por alta voltagem, enquanto os Cav3 são ativados por baixa voltagem e são transitórias [17].

Os canais tipo L despolarizam a membrana quando o cálcio entra no citosol. O cálcio citosólico que entra via estes canais estimula uma grande libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelo RyR [15].

As quatro isoformas do tipo L provêm de 4 genes diferentes, que formam o poro (subunidade α_1), são: Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4. Os canais Cav1.1 são expressos no músculo esquelético, os cav1.2 são expressos no coração, onde desempenham um papel crucial na contratilidade, nas células musculares lisas, nos neurónios, nos linfócitos T e nas células β pancreáticas. Os Cav1.3 são expressos no nódulo sinoauricular, nos neurónios e nas células β pancreáticas e os Cav1.4 são expressos na retina [17].

Os canais Cav1 são os alvos moleculares de bloqueadores orgânicos dos canais de cálcio usados na terapia de doenças cardiovasculares. Estes canais são inibidos por fenilalquilaminas, que bloqueiam o poro, por dihidropiridinas e por benzodiazepinas [14, 17].

O canal Cav1.2 é codificado por um único gene (CACNA1C). O seu C-terminal contém mais de 600 aminoácidos e consiste em 2 grandes regiões com um sítio de clivagem da calpaína e um sítio de interação da calmodulina (CaM). A *Upstream* do C-terminal encontra-se o C-terminal proximal (PCT) e o fim do C-terminal encontra-se o C-terminal distal. No PCT está o sítio de interação com a CaM [15, 18].

A expressão dos Cav1.2 é regulada pela estimulação β adrenérgica, pela estimulação α adrenérgica, por androgénios, pela pressão arterial elevada e também pela entrada de cálcio através do canal [15].

A ligação do inibidor do tipo dihidropiridinas ao canal aumenta quando a membrana se torna mais despolarizada. Esta ligação é determinada pelos domínios IIS5, IIS6 e IVS6 e a ligação das fenilalquilaminas e das benzodiazepinas são mediadas pelo domínio IVS6 [19].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

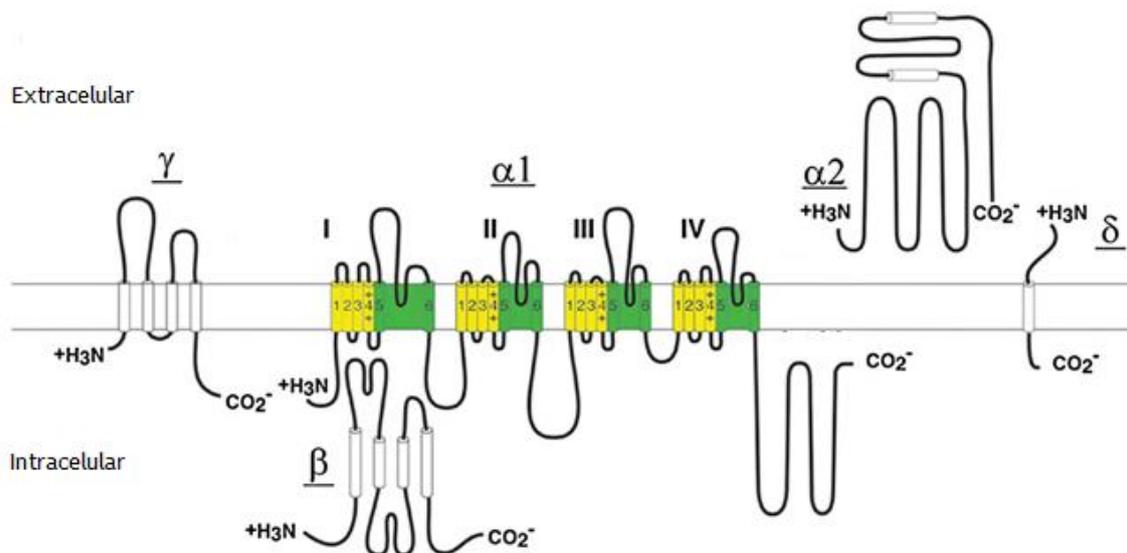


Figura 3. Estrutura geral dos canais de cálcio tipo L. Adaptado de [16].

Canais de cálcio independentes de voltagem

Nas SMC o aumento de cálcio intracelular é o início da contração. O aumento de cálcio induzido por neurotransmissores ou hormonas resulta na libertação de cálcio dos reservatórios intracelulares (retículo) e no influxo de cálcio extracelular. A via de entrada do cálcio envolve vários canais de cálcio, como os dependentes de voltagem e os independentes de voltagem. Os canais de cálcio independentes de voltagem são:

- Canal recetor operated (ROC), regulados por interações agonista-recetor e abaixo do sinal de transdução de proteínas
- Canais store-operated (SOC), ativados pelo esvaziamento das reservas intracelulares de cálcio
- Canais stretch-activated (SAC), ativados pelo stress físico da membrana celular [20].

ROCs

O termo canal operado por recetor foi proposto por Bolton (1979) e por Van Breemen (1978) para definir os canais de cálcio membranares cuja ativação resulta de uma ligação de um agonista ao recetor e é independente de alterações do potencial de membrana [20]. Nas

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

SMC, a ligação dos agonistas pode abrir os canais com permeabilidade significativa ao cálcio e produzir contração moderada [20].

Os ROC podem ser encontrados no músculo liso visceral e vascular e são ativados por uma variedade de agonistas que atuam nos recetores membranares, tais como, acetilcolina, angiotensina II, serotonina, norepinefrina e vasopressina. Estes canais não são ativados por cafeína ou tapsigargina, e podem abrir após a depleção das reservas intracelulares de cálcio [20].

SOC

Em 1986, Putney usou o termo “capacidade de entrada do cálcio” para definir a ligação entre a concentração de cálcio do retículo endoplasmático e a entrada de cálcio através da ativação de canais de cálcio membranares. Atualmente esses canais são designados por SOC [20].

A depleção das reservas de cálcio, devido a drogas como a tapsigargina e o ácido ciclopiazonico, ativa a entrada de cálcio através dos canais membranares para reabastecer as reservas. Estas drogas levam também à inibição da bomba de cálcio ATPase no retículo endoplasmático (SERCA), responsável pela ativação da captação de cálcio, o que vai produzir uma diminuição de íons de cálcio levando à ativação dos SOC [20].

SACs

Estes canais foram inicialmente descritos em 1984 no músculo esquelético embrionário de galinha. Nestes estudos, o stress na célula era provocado por uma pressão na pipeta e que provocava a ativação dos SAC [20].

Estes canais foram já encontrados em vários tipos de músculo liso, tais como, visceral, trato gastrointestinal e vascular [20].

Os SAC na membrana celular atuam como transdutores mecânicos, pois convertem forças físicas em sinais químicos, isto é, transformam o *stress* físico em fluxo de catiões através da membrana [20].

Possuem dois principais papéis:

- Induz a despolarização da membrana via influxo de catiões (Na), pela ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem e induz o aumento de cálcio citosólico.
- Aumento de cálcio citosólico devido à entrada de cálcio através de SAC, abre os BK_{Ca} ou leva à libertação de cálcio das reservas [20].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

1.1.2 Canais de potássio

Os canais de potássio são a via dominante da condução de íons nas SMC. A sua atividade determina e regula o potencial de membrana e o tônus vascular. O gradiente eletroquímico dos íons K^+ que abre os canais de K^+ resulta na difusão dos catiões para fora da célula e ocorre a hiperpolarização da membrana [12].

Existem 4 tipos de canais de K^+ : ativado por voltagem (K_v), grande condutância ativado por cálcio (BK_{Ca}), rectificadores internos (K_{ir}) e sensível a ATP (K_{ATP}) [12].

Canais K_v

Os canais K_v consistem em quatro subunidades α e cada subunidade contém seis sequências transmembranares. Cada subunidade α está associada a uma subunidade β que influencia as características do canal. Nas SMC vasculares foram encontradas várias isoformas deste canal ($K_v1.1-1.6$, K_v2 e K_v7).

Este canal é dependente de voltagem, quando ocorre a despolarização da membrana os canais K_v ficam ativos e aumentam a corrente hiperpolarizante de K^+ para o exterior. São também ativados pela via de AMPc/PKA.

Os canais K_v são inibidos por 4-aminopiridina e pela proteína cinase C (PKC). Participa nos mecanismos de ação da vasodilatação ao inativar os canais de Ca^{2+} quando hiperpolariza a membrana [12, 21].

Canais BK_{Ca}

O canal BK_{Ca} é composto por 4 subunidades α e 4 subunidades β ($\beta 1-4$). A subunidade α é codificada pelo gene *Slo1*, forma o poro do canal e tem 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10). Os domínios transmembranares (S0-S6) constituem o núcleo com um N-terminal extracelular. Os domínios S7-S10 estão localizados no citoplasma e formam uma cauda C-terminal. O domínio S4 contém vários aminoácidos carregados positivamente e representam o sensor de voltagem do canal. A região do poro está localizada nos domínios S5-S6. Mesmo na ausência das subunidades β , as quatro subunidades α formam um poro funcional. A subunidade α também contém sensibilidade intrínseca ao cálcio intracelular, isto pode ser conferido por uma região sensível ao Ca^{2+} localizada na região da cauda. Outros estudos sugerem que esta sensibilidade ao cálcio não se deve apenas à região sensível ao cálcio mas também a um domínio regulador da condutância de K^+ (RCK) localizado entre o núcleo e a região da cauda. As variantes de splice podem explicar as várias propriedades nos diferentes tecidos, tais como sensibilidade à voltagem, fosforilação pela PKA ou pela PKG. A subunidade β ($\beta 1-4$) é

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

composta por 2 domínios transmembranares com um ligante extracelular. O N-terminal e o C-terminal estão localizados no citoplasma. A isoforma $\beta 1$ é a subunidade predominante nas SMC. Esta isoforma interage com o domínio S0 e com o N-terminal extracelular da subunidade α . A subunidade $\beta 1$ é responsável pela tradução do sinal de cálcio para regular a função vascular [13].

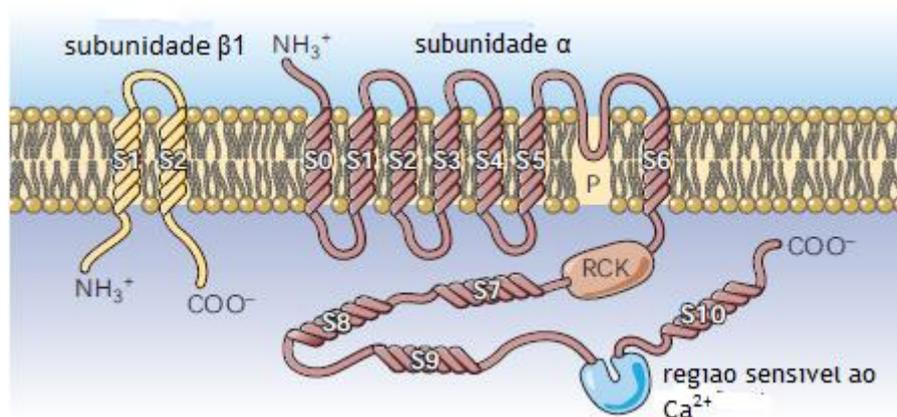


Figura 4. Estrutura geral do canal BK_{Ca} . Adaptado de [13].

Estes canais são ativados pelo aumento de cálcio intracelular, pela despolarização da membrana, por NS1619 e por resveratrol. Podem também ser ativados por vasodilatadores (adenosina, óxido nítrico e prostaglandina) que atuam através das vias de sinalização do AMPc e do GMPc. Agonistas da adenosina e de recetores β adrenérgicos podem ativar o canal BK_{Ca} através de mecanismos independentes de AMPc e dependentes de AMPc. A estimulação da cascata de AMPc/PKA fosforila o canal BK_{Ca} na subunidade α no resíduo de serina e leva à ativação do canal. A via de sinalização mediada pelo GMPc, que é ativada pela acetilcolina e pelo NO, podem produzir PKG que medeia a fosforilação do canal na serina 1072 e resulta na ativação do canal BK_{Ca} . O BK_{Ca} regula o tónus vascular devido ao aumento de cálcio subsarcolemal (*sparks* de cálcio) pela libertação de cálcio através do RyR no reticulo sarcoplasmático. Quando ocorre esta libertação de cálcio, os canais BK_{Ca} ficam ativos e hiperpolarizam a membrana, o que vai inibir os canais de cálcio e promover o vasorelaxamento [12, 22].

Quando ocorre um aumento da pressão intravascular, as artérias respondem com uma despolarização da membrana celular, um aumento de cálcio intracelular através da entrada deste pelos canais dependentes de voltagem e posterior vasoconstrição. Um mecanismo de feedback negativo está ligado ao aumento de cálcio nas SMC que inclui a ativação do BK_{Ca} .

Os canais BK_{Ca} são inibidos pela iberiotoxina, por vasoconstritores (angiotensina II e tromboxano A2) e são insensíveis à apamina. A inibição do canal BK_{Ca} pela iberiotoxina induz a despolarização da membrana, seguido do aumento de cálcio intracelular e consequente vasoconstrição [13].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

A baixas concentrações de cálcio, o canal BK_{ca} torna-se um canal de K^+ dependente de voltagem.

A deleção da subunidade $\beta 1$ leva a uma diminuição da sensibilidade de cálcio pelo canal que deixa de responder às sparks de cálcio. Leva também a uma maior depolarização da membrana e um aumento do cálcio intracelular seguido da vasoconstrição e um aumento da pressão arterial, podendo levar assim a um aumento da hipertensão [13]. Não só a deleção da subunidade $\beta 1$ pode levar à hipertensão, mas também o knockout para o canal pode originar hipertensão e outras malformações [22].

Canais K_{ir}

São conhecidas seis famílias de canais K_{ir} ($K_{ir}1-6$), sendo o canal $K_{ir}6$ sensível a ATP. Os canais K_{ir} são tetrâmeros compostos por quatro subunidades membranares homólogas ou heterólogas em torno de poro de água através do qual iões de K^+ passam. Cada subunidade consiste em dois domínios transmembranares hélice α (TM1 e TM2) separados por um loop extracelular que contém uma sequência seletiva de reconhecimento dos iões de K^+ .

Estes canais são ativados por leves aumentos de K^+ extracelular. São modulados por vários vasodilatadores (adenosina, prostaciclina e nitroprussiato de sódio) e pela via do AMPc/PKA [12, 23].

Canais K_{ATP}

Os canais K_{ATP} consistem em oito subunidades, onde quatro são subunidades α da família dos canais K_{ir} ($K_{ir}6.1$ ou $K_{ir}6.2$) que formam o poro do canal e quatro são subunidades regulatórias pertencentes à família de recetores de sulfonilureia (SUR1, SUR2A e SUR2B).

Estes canais são inibidos quando há um aumento da concentração de ATP intracelular e também por glibenclamida. São estimulados por ADP, cromakalim e pinacidil.

Os canais K_{ATP} nas SMC vasculares, quando sujeitos a vários vasodilatadores endógenos e farmacológicos (calcitonina, prostaciclina, adenosina, forskolina e isoprenalina), ficam ativos pela estimulação da formação de AMPc e consequente aumento da atividade da PKA. Existem evidências que os ativadores da guanilato ciclase (óxido nítrico e péptido natriurético) também podem ativar os canais K_{ATP} em certos tipos de músculo liso vascular [12, 24].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

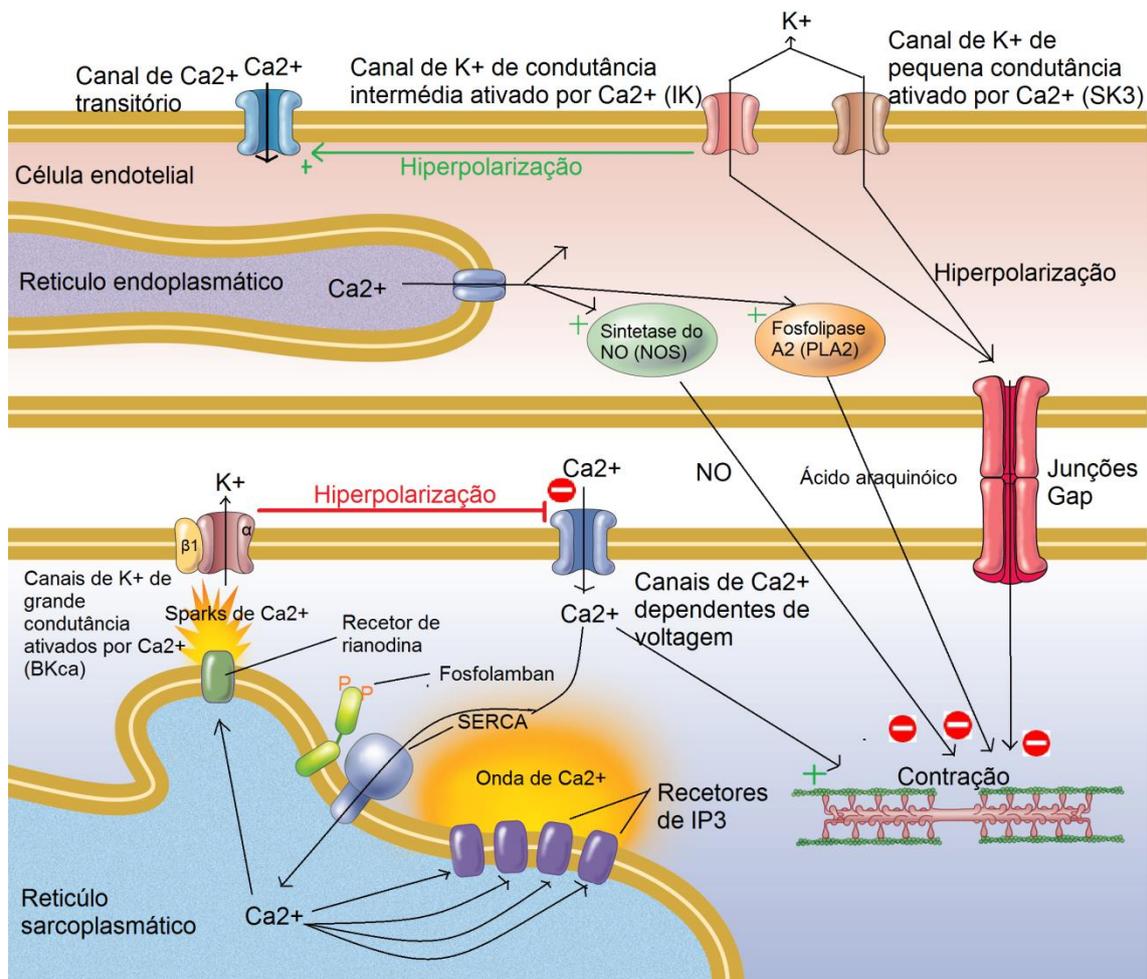


Figura 5. A ativação do canal de pequena condutância ativado por cálcio (SK3) e do canal de condutância intermédia ativado por cálcio (IK) pode levar à vasodilatação. Estes canais regulam o potencial de membrana das células endoteliais e são ativados por um aumento do cálcio intracelular. A hiperpolarização da membrana das células endoteliais promove a entrada de cálcio, possivelmente através do canal de cálcio transitório. Este aumento de cálcio intracelular leva ao aumento do óxido nítrico (NO) e à produção de metabolitos de ácido araquidónico, que pode hiperpolarizar a SMC adjacente. A hiperpolarização da membrana endotelial pode também ser transmitida através de junções gap que vão promover a hiperpolarização da SMC, diminuindo a entrada de cálcio através dos canais de cálcio dependentes da voltagem e assim é promovida a vasodilatação. A vasoconstrição também é contrariada pela estimulação das sparks de cálcio, que ativam os canais BKCa. Adaptado de [13].

1.2 Contração do músculo liso vascular

Os canais iônicos iniciam e regulam a contração e o tónus do músculo liso. A identificação dos seus genes permitiu um conhecimento significativo das vias de transdução de sinal das SMC. Independentemente dos canais de cálcio dependentes de voltagem não seletivos, os canais catiónicos têm sido identificados como importantes na regulação do tónus vascular pela mediação da entrada de catiões como Ca^{2+} , Na^+ e Mg^{2+} . O Ca^{2+} é uma molécula muito importante na fisiologia das SMC e encontra-se em concentrações mais baixas dentro da célula (10^{-7}M) do que no espaço extracelular (10^{-3}M) [11, 25]. O Ca^{2+} entra e sai do citoplasma pela membrana plasmática através dos canais de Ca^{2+} , da ATPase de Ca^{2+} (PMCA) e do permutador de sódio/cálcio (NCX). Também existe uma circulação de Ca^{2+} entre o citoplasma e os organelos armazenadores de Ca^{2+} , como por exemplo o retículo sarcoplasmático, através da SERCA e do recetor IP_3 . A contração do músculo é controlada pelo aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático que se vai ligar à calmodulina (CaM) e forma o complexo Ca^{2+} -CaM. O complexo Ca^{2+} -CaM vai desencadear a fosforilação das cadeias leves de miosina com 20 kDa (MLC_{20}) no resíduo Ser-19 pela cinase de cadeias leves de miosina (MLCK). As cadeias leves de miosina vão promover a interação da miosina com a actina, ativar a miosina ATPase, induzir o cruzamento cíclico da miosina e actina e assim gerar a contração. Para ocorrer a contração é necessário a polimerização dos filamentos de actina [8, 26-29].

A miosina e a actina são duas proteínas contráteis. A actina é a proteína mais abundante nas células e existe no estado solúvel e filamentoso. Os filamentos de actina possuem uma estrutura polimérica composta por monómeros de actina bilobados assimétricos com 42 kDa, organizados em hélice dupla. Os filamentos de actina estão presentes na ativação da atividade da miosina ATPase e do ciclo das pontes cruzadas. A estrutura e organização dos filamentos de actina permanecem constantes durante a contração e estão ancorados à membrana plasmática por um complexo de proteínas de adesão associadas a integrinas citoplasmáticas, onde o citoesqueleto se liga à matriz extracelular. A miosina é a maior componente do sistema contrátil muscular e a família de miosina existente no músculo liso é a miosina II. Tem a estrutura de um hexâmero composto por duas cadeias pesadas com 200 kDa cada no N-terminal e dois pares de cadeias leves com 15 a 27 kDa. Cada cadeia pesada consiste numa cabeça globular (S1) e uma cauda em hélice α no C-terminal. A cabeça de miosina possui atividade de ATPase e contém um sítio de ligação de nucleótidos e um sítio de ligação da actina. A contração das SMC é associada com um consumo de oxigénio o que leva à hidrólise de ATP, este consumo de oxigénio aumenta rapidamente na fase inicial da contração celular mas volta aos níveis basais durante a fase de sustentação da contração [8, 26, 29-33].

Existem dois mecanismos para explicar a manutenção da contração muscular, o primeiro mecanismo ocorre quando as cadeias de miosina são desfosforiladas. Esta desfosforilação associada ao lento cruzamento entre a miosina e a actina diminui a atividade da ATPase e assim mantém a força de tensão. O segundo mecanismo refere-se à modulação

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

dos domínios fibrilares do citoesqueleto, o domínio caldesmon-tropomiosina-actinmiosina e o domínio filamina-actina-desmina. Os domínios encontram-se ancorados a corpos densos através da α -actina. Este mecanismo sugere que há interação de proteínas em domínios específicos e que são importantes para a reorganização a nível estrutural do citoesqueleto [8, 29].

A contração do músculo liso provoca um aumento da actina filamentosa e uma diminuição da actina globular monomérica. As isoformas α e γ de actina no músculo liso estão associadas à miosina e à caldesmon e participam na contração. A isoforma β da actina está associada com a calponina e tem um papel estrutural nas células musculares lisas [8].

Além da contração muscular dependente de Ca^{2+} , existe também a contração independente de Ca^{2+} . Existem dois mecanismos que vão desencadear este tipo de contração [34].

Sensibilização ao cálcio

Há agonistas capazes de provocar contrações musculares independentemente da concentração de Ca^{2+} . A força de contração induzida pela ativação destes agonistas é maior do que quando provocada pela despolarização da membrana, induzida pelo aumento da concentração de Ca^{2+} . Na ausência de Ca^{2+} , a contração do músculo liso inicia-se quando a fosfatase de cadeias leves de miosina (MLCP) se encontra totalmente inibida. A MLCP consiste em três subunidades, uma subunidade grande de ligação à miosina (MBS), uma subunidade pequena de 20 kDa e a subunidade catalítica. Foram propostos três mecanismos para a inibição da MLCP: a fosforilação da MYPT, a fosforilação da proteína CPI-17 e a dissociação da MLCP [28].

A proteína Rho é uma pequena proteína que pertence à superfamília da Ras GTPases monoméricas. Estudos sugerem que a Rho atua em diversas funções fisiológicas associadas com a actina-miosina, tal como citocinese, motilidade celular e contração do músculo liso. Esta via de sinalização envolve a Rho cinase (ROCK), que desempenha um papel fundamental na contração do músculo liso, nomeadamente na regulação da atividade da MLCP [35-37].

A ROCK fosforila a subunidade de ligação à miosina, inibindo a sua atividade e assim promove o estado fosforilado da MLC_{20} permitindo que o estado contrátil se mantenha [38]. A Rho possui atividade de ligação GTP/GDP e atividade GTPase, e funciona como um interruptor molecular, alternando entre um estado inativo, ligado ao GDP (GDP-Rho) e um estado ativo, ligado GTP (GTP-Rho) [39]. No estado de repouso, a RhoA-GDP existe no citosol, ligada por uma cauda ao inibidor da dissociação do GDP, a Rho-GDI. Vários agonistas promovem a ativação de recetores acoplados à proteína G heterotrimérica e recetores de cinases de tirosina. Esta ligação promove a conversão da Rho-GDP a Rho-GTP. A Rho-GDI dissocia-se e a RhoA-GTP associa-se com a membrana, onde interatua com a ROCK, levando à sua ativação [40]. A ROCK ativada fosforila a Fosfatase da Miosina-1 (MYPT). Quando fosforilada, a MYPT fica incapacitada de ativar a subunidade catalítica da MLCP, o que reduz a sua atividade

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

levando assim ao aumento dos níveis de fosforilação da MLC₂₀ [41, 42]. A inibição da atividade da MLCP também pode ser mediada pela ativação da CPI-17 [43].

A CPI-17 é uma proteína endógena que potencia o efeito inibidor da PKC sobre a MLCP. A CPI-17 exerce o seu efeito inibitório quando é fosforilada. Inicialmente foi reconhecida como um substrato da PKC, contudo outras cinases também podem fosforilar a CPI-17, como a ROCK, cinase como integrina (ILK), proteína cinase ativada por P21 (PAK) e proteína cinase N (PKN) [44].

Outro mecanismo proposto para a inibição da MLCP consiste na dissociação da estrutura da MLCP (separação da MYPT da PP1c δ). Esta dissociação resulta da ação do ácido araquidônico (AA), resultante da atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂). Assim, o AA pode sensibilizar o músculo liso para o Ca²⁺, através da inibição da desfosforilação da MLC₂₀, promovendo a dissociação e inibição da MLCP [43].

Via das MAPK

Diversos agonistas vasculares provocam contração muscular através da ativação de uma via independente da fosforilação da MLC₂₀ e da concentração de Ca²⁺. A via das MAP cinase (MAPK) é uma via de sinalização fundamental em muitos processos celulares tais como, diferenciação celular, sobrevivência celular e *stress* físico, está também envolvida na contração do músculo liso [45].

O termo “via das MAPK” refere-se a um módulo de três cinases que incluem uma MAPK cinase cinase (MKKK), MAPK cinase (MKK) e MAPK terminal. Estas cinases são ativadas por uma sequência de fosforilações entre si, em resposta a estímulos, tais como citocinas, fatores de crescimento e neurotransmissores [46, 47]. A primeira cinase do módulo de ativação é a MKKK [48]. A MKKK pode ser fosforilada pela MAPK cinase cinase cinase (MKKKK) pela Rho. A MKKK quando ativada por fosforilação, fosforila a cinase seguinte, a MKK [49]. As MKK que reconhecem e fosforilam o motivo Thr-X-Tyr no *loop* de ativação da MAPK.

A MAPK tem como substratos fatores de transcrição, cinases, fosfolipases e proteínas associadas ao citoesqueleto.

O Mg²⁺ desempenha um papel importante na regulação das SMC. Ao contrário do Ca²⁺, um aumento do Mg²⁺ intracelular provoca vasodilatação e atenua a vasoconstrição e a sua diminuição provoca uma hipercontratibilidade e uma diminuição do vasorelaxamento. O Mg²⁺ extracelular modula a proliferação e a fibrose das SMC vasculares características na hipertensão. Pequenas alterações nos níveis de MG²⁺ extracelular influenciam o transporte membranar de Ca²⁺, Na⁺ e K⁺ [11].

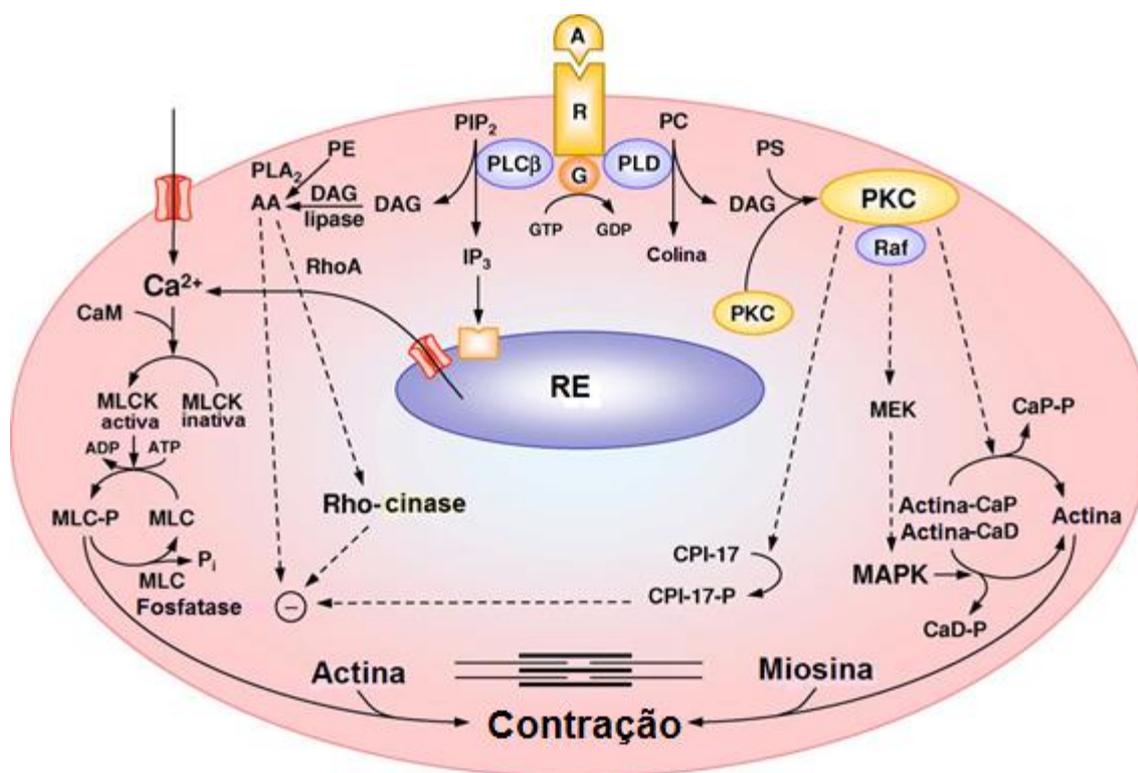


Figura 6. Mecanismo de contração das SMC. O substrato (A) liga-se ao recetor (R) e vai ativar a PLCβ para aumentar a produção de IP₃ e de diacilglicerol (DAG) através de PIP₂. O IP₃ estimula o retículo endoplasmático a libertar Ca²⁺. O substrato também estimula a entrada de Ca²⁺ extracelular através dos canais de Ca²⁺. O Ca²⁺ liga-se à CaM, formando o complexo e ativa a MLC cinase levando à fosforilação das MLC provocando assim à contração celular. A DAG, ativada pela PLD, ativa a PKC. A PKC fosforila o CPI-17, que inibe a MLC fosfatase. PKC pode fosforilar a calponina (Cap), e a actina pode ligar-se à miosina, levando também à contração. A PKC pode ativar uma cascata de cinases que envolve a Raf, a MAPK cinase (MEK) e a MAPK, que produz actina. Outro mecanismo de contração celular é a via de RhoA/Rho-cinase, que inibe a MLC fosfatase. Adaptado de [30].

1.3 Relaxamento do músculo

O relaxamento começa quando há uma diminuição da concentração de Ca²⁺ intracelular e esta diminuição provoca a dissociação do complexo Ca²⁺-CAM e a desfosforilação pela fosfatase MLC das MLC fosforiladas [26]. O relaxamento pode ocorrer por forma passiva, removendo o agente contráctil ou por forma ativa, quando induzida pela ativação dos nucleótidos cíclicos. A proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) e a proteína cinase dependente de GMP cíclico (PKG) têm um papel nos mecanismos celulares através de fosforilações de proteínas específicas [30, 50, 51].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

Vários estudos sugerem que a PKA e a PKG têm um mecanismo comum na modulação do relaxamento muscular. A fosforilação do recetor IP₃ leva a uma inibição da libertação de cálcio induzida pelo IP₃. A fosforilação da bomba de cálcio leva ao aumento da afinidade desta pelo cálcio e a fosforilação da fosfolamban diminui a interação com a bomba SERCA no retículo sarcoplasmático que ativa a ATPase que por sua vez leva à diminuição do cálcio intracelular [51].

Atualmente pensa-se que a vasodilatação induzida pelos nucleótidos cíclicos possa ter 4 diferentes vias:

1. Diminuição dos níveis intracelulares de cálcio
 - Através da diminuição da libertação pelo retículo sarcoplasmático, via fosforilação do recetor IP₃ ou inibição da síntese de IP₃.
 - Aumento da sequestração pelo retículo sarcoplasmático, via fosforilação da fosfolamban e ativação da bomba SERCA.
 - Diminuição do influxo de cálcio extracelular, via canais de cálcio tipo L.
 - Aumento do influxo intracelular de cálcio, via estimulação da bomba Ca²⁺-ATPase na membrana plasmática.
2. Hiperpolarização da membrana pelos canais de potássio
 - K_v
 - BK_{Ca}
 - K_{ATP}
 - K_{ir}
3. Inibição da fosforilação de MLC₂₀ sensível ao cálcio
 - Inibição da atividade das cadeias leves de miosina cinase.
 - Aumento da atividade das cadeias leves de miosina fosfatase.
4. Dissociação da força contrátil da fosforilação de MLC₂₀ ou regulação dos filamentos finos [51].

1.3.1 Guanilato ciclase

A guanilato ciclase (GC) possui atividade na maioria das células na forma solúvel e particulada [52].

Guanilato ciclase particulada

A GC particulada (GCp) é uma enzima membranar que tem um domínio extracelular de ligação ao ligando. Existem sete isoformas da GCp que vão desde a GC-A até a GC-G (Tabela 1).

Possuem domínios estruturais altamente conservados que incluem:

- Domínio extracelular de ligação ao N-terminal (define a ligação ao ligando na GC-A, -B e -C),

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

- Domínio transmembranar simples,
- Domínio citoplasmático justamembranar,
- Domínio regulador (homologia semelhante a proteínas cinases, KHD),
- Região “hinge”,
- Domínio catalítico C-terminal.

As diferentes isoformas da GpC foram classificadas em:

1. Recetores de péptidos natriuréticos,
2. Recetores de ligação ao péptido intestinal,
3. Recetores órfãos.

Estas classificações foram baseadas nos seus respetivos ligandos.

Das 7 isoformas, existem 3 que são designadas por recetores de péptidos natriuréticos, (NPR-A, NPR-B e NPR-C) e são ativadas pela ligação dos péptidos natriuréticos. Os péptidos natriuréticos podem ser designados por: péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético cerebral (BNP) e péptido natriurético tipo C (CNP) [52].

Tabela 1: Isoformas da guanilato ciclase particulada, os seus ligandos e a respetiva distribuição nos tecidos. Adaptado de [52]

Recetor	Ligando	Distribuição nos tecidos
GC-A (NPR-A)	ANP, BNP	Tecido adiposo, glândula adrenal, íleo, rim, placenta, cerebelo, coração, pituitária, timo, ovário, fígado, pulmão
GC-B (NPR-B)	CNP	Placenta, medula adrenal, cerebelo, pituitária, glândula adrenal, aorta, pulmão, intestino, testículos, útero, ovário, timo, cartilagem
GC-C	Guanilina, uroguanilina, enterotoxina	Mucosa intestinal, fígado, rim
GC-D	Órfão	Epitélio olfativo
GC-E	Órfão	Retina, glândula pineal
GC-F	Órfão	Retina
GC-G	Órfão	Intestino, rim, pulmão, músculo esquelético

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

Recetores dos péptidos natriuréticos

Existem três diferentes recetores dos péptidos natriuréticos (NPR-A, NPR-B e NPR-C). Apresentam variabilidade em termos da especificidade de ligando e na atividade da transdução de sinal. Os recetores NPR-A e NPR-B podem também ser chamados de GC-A e GC-B, respetivamente. O recetor NPR-C não possui o domínio catalítico nem o domínio KHD, é designado por recetor de péptidos natriuréticos de clearance e contém uma cauda citoplasmática pequena.

O recetor NPR-C é expresso na aurícula, músculo liso vascular e no endotélio e tem como função eliminar os péptidos natriuréticos da circulação ou do meio extracelular. O NPR-A e o NPR-B também se encontram expressos no músculo liso vascular.

Os péptidos natriuréticos induzem efeitos fisiológicos que envolvem a ativação dos recetores e o aumento da concentração de GMPc intracelular.

O ANP é o ligando mais seletivo do NPR-A mas também se pode ligar ao NPR-C. O BNP também se liga ao NPR-A mas é menos potente que o ANP na ativação deste recetor e também se pode ligar ao NPR-C. O CNP liga-se preferencialmente ao NPR-A, podendo igualmente ligar-se ao NPR-C. O mecanismo de ativação dos recetores ainda não é conhecido.

O ANP é sintetizado na aurícula e induz natriurese, diurese e hipotensão e é um inibidor da secreção de renina e aldosterona. É um mediador do controlo da pressão sanguínea e do balanço eletrólito. O ANP é sintetizado como um prepropeptido com 151 aminoácidos que contém o C-terminal com a sequência biologicamente ativa. Em circulação, o ANP é um péptido com 28 aminoácidos.

O BNP é um péptido com 26 aminoácidos com estrutura conservada, foi inicialmente isolado no cérebro mas é sintetizado no coração como prepropeptido com 134 aminoácidos. O CNP é sintetizado como propeptido com 103 aminoácidos, depois é clivado a péptido com 53 resíduos e posteriormente torna-se biologicamente ativo com 22 aminoácidos. Este não possui C-terminal e o N-terminal não é homólogo com a mesma região no ANP e BNP. O CNP induz natriurese, diurese e relaxação nas células musculares lisas, mas é menos potente que o ANP e BNP. Está presente no sistema nervoso central, nas células vasculares endoteliais e nos condrócitos. Os três tipos contêm um anel de ácido dissulfeto com 17 aminoácidos altamente conservado [52-55].

Guanilato ciclase solúvel

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é expressa no citoplasma celular e interfere em várias funções fisiológicas importantes, tais como relaxação das células musculares lisas, vasodilatação, transdução de sinal neuronal e inibição da agregação plaquetária.

É um heterodímero composto por duas subunidades α e β (Tabela 2).

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

Tabela 2: Isoformas da guanilato ciclase solúvel e a respetiva distribuição nos tecidos

Subunidade	Distribuição nos tecidos
$\alpha 1$ ($\alpha 3$)	Fígado, cerebelo, encéfalo, coração, rim, pulmão, músculo esquelético
$\alpha 2$	Cérebro, retina, rim, placenta
B1 (B3)	Pulmão, cerebelo, encéfalo, coração, rim, fígado, músculo esquelético, placenta
B2	Rim, fígado

A subunidade B tem uma massa molecular de aproximadamente 70 kDa e a subunidade α tem entre 73 a 82 kDa. Cada subunidade possui um domínio regulador N-terminal e um domínio catalítico C-terminal, homólogos aos domínios correspondentes na pGC.

As subunidades mais abundantes são a $\alpha 1$ e B1 e necessitam de ser expressas em conjunto para a proteína possuir atividade catalítica mediada por NO. A subunidade $\alpha 1$ pode formar um heterodímero com subunidade B1 e B2, tendo mais especificidade o complexo $\alpha 1/B1$. A subunidade $\alpha 2$ também se pode ligar à subunidade B1 mas é menos específico que o heterodímero $\alpha 1/B1$.

Cada subunidade contém três domínios:

- Domínio de ligação ao heme (no N-terminal);
- Domínio de dimerização;
- Domínio catalítico.

O domínio catalítico é o responsável pela conversão do GTP a GMPc e esta conversão necessita da presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . O domínio de dimerização liga o domínio N-terminal ao domínio catalítico.

A presença do grupo heme permite a ativação da GCs pelo óxido nítrico (NO). O NO é sintetizado pela NO sintetase (NOS) que converte o aminoácido L-arginina em NO. O NO para ativar a GCs precisa de se ligar ao heme, formando um complexo ferroso. Esta ligação provoca uma mudança conformacional e leva a um aumento da atividade catalítica. A GCs ativada aumenta a conversão de GTP a GMPc e o relaxamento vascular pode ser regulado pelo aumento de GMPc. A oxidação do grupo heme leva a uma diminuição da atividade enzimática. O monóxido de carbono (CO) também se pode ligar ao heme e ativar a GCs, mas este é um ativador menos potente que o NO [26].

Tanto a GCs como a GCp necessitam de catiões divalentes como cofatores, como o Mg^{2+} e o Mn^{2+} . Ao usar o Mg^{2+} , tanto a GCs como a GCp possuem atividade catalítica basal e são bastante sensíveis à ativação pela ligação do ATP e dos ligandos. O Mg^{2+} é o catião

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

fisiológico que sustenta a atividade da GC in vivo. Ao usar Mn^{2+} , a GC possui uma atividade catalítica máxima mas é insensível à ativação por nucleótidos e ligandos.

O cálcio também pode atuar como cofator da GC mas como modulador negativo. O Ca^{2+} e o GMPc têm funções antagonistas, como por exemplo, no músculo liso a contração é mediada pelo aumento de Ca^{2+} , enquanto a relaxação é mediada pelo aumento de GMPc [52].

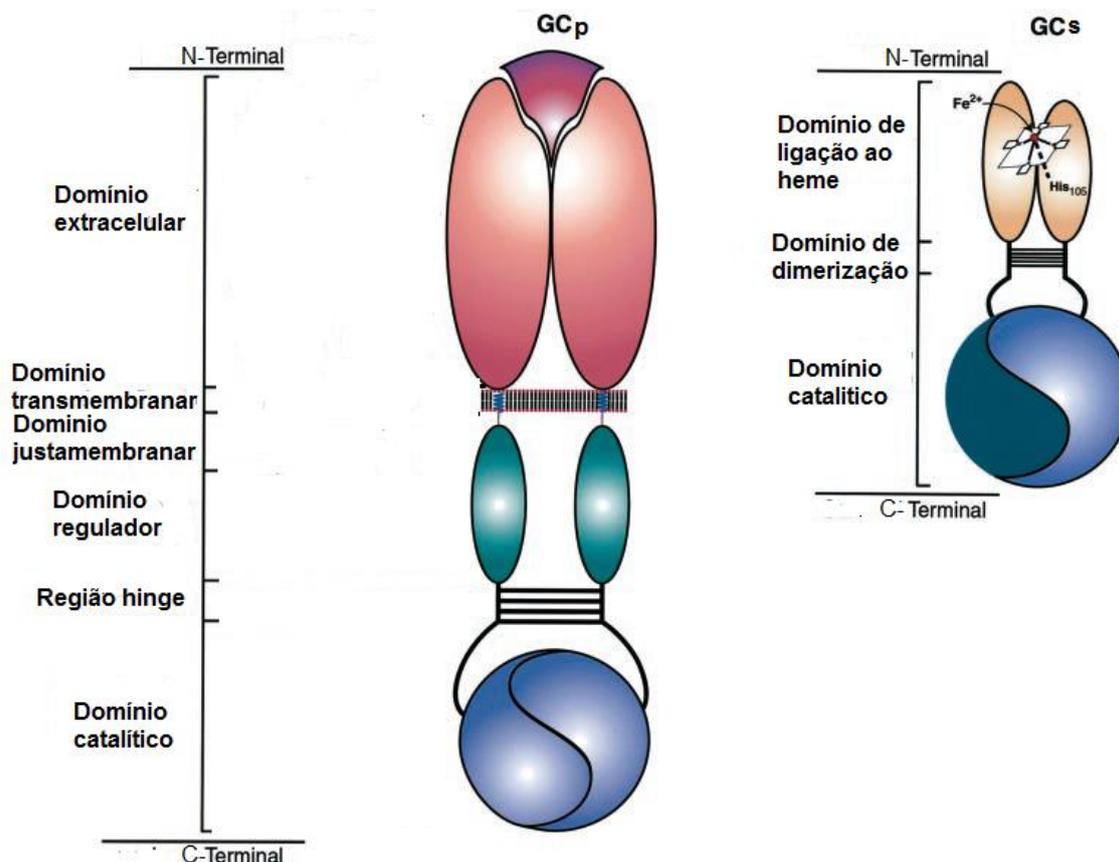


Figura 7. Esquema dos receptores da GC. Adaptado de [52].

1.3.2 GMP cíclico

O GMPc é sintetizado pelas enzimas GC [53]. É uma molécula que está presente na maioria das células e ativa a PKG. É um importante segundo mensageiro envolvido no relaxamento do músculo liso, na transmissão sináptica, na agregação de plaquetas, na ativação de proteínas cinases, de canais iônicos e de fosfodiesterases. Este nucleótido pode ser hidrolisado por várias fosfodiesterases [51, 53, 54]. Tal como acontece com o AMPc, também o GMPc sofre compartimentalização celular [56].

1.3.3 Proteína cinase G

A PKG é uma cinase de serina/treonina e é um dímero com 80 kDa. É composta por um domínio N-terminal, um domínio regulador e um domínio catalítico. O domínio regulador contém dois sítios de ligação ao GMPc e quando estão os dois ocupados ocorre uma alteração conformacional e deixa de haver a inibição da PKG no centro catalítico o que permite a fosforilação do resíduo de serina/ treonina e uma autofosforilação no N-terminal, o que vai provocar a sua ativação. A autofosforilação aumenta a afinidade da ligação do GMPc e a atividade da fosfotransferase. Quando a PKG está ativa provoca vasorelaxamento, pela diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e através da regulação da miosina fosfatase [26, 50]. O domínio N-terminal, além de controlar a ativação e a inibição do centro catalítico, tem outras 2 funções:

- Dimerização de homodímeros de PKG juntos por um zipper de leucina
- Direcionamento da PKG a diferentes locais subcelulares [51].

Existem duas isoformas desta enzima, a tipo I (PKG1) e a tipo II (PKG2), que derivam de genes diferentes (*prkg1* e *prkg2*) com diferenças a nível do domínio regulatório [50]. Quando ocorre sinalização do GMPc mediada pelo NO, é a PKG1 que costuma estar envolvida. Os monómeros da PKG1 contêm um domínio regulatório mais localizado no domínio N-terminal e um domínio catalítico mais localizado no domínio C-terminal. O domínio regulatório tem um subdomínio de dimerização e de localização fornecido por um zipper de leucina, subdomínios de autofosforilação e de autoinibição sobrepostos e um subdomínio de ligação ao GMPc que contém dois sítios de ligação homólogos. O zipper de leucina no N-terminal de cada monómero proporciona uma alta afinidade de homodimerização e uma interação seletiva com proteínas. O domínio catalítico contém um subdomínio de ligação ao ATP e Mg^{2+} e um subdomínio de ligação ao substrato. As isoenzimas da PKG1 (PKG1 α e PKG1 β) são produtos de splicing alternativo e diferem no domínio N-terminal. Esta divergência de 100 aminoácidos no domínio N-terminal afeta a afinidade ao GMPc, a especificidade proteína-substrato, o estado de ativação e também a localização celular. A afinidade do GMPc à PKG1 α é aproximadamente 10 vezes maior que a afinidade à PKG1 β . O zipper de leucina na PKG1 α é estabilizado por resíduos hidrofóbicos e por uma rede de ligações de hidrogénio [26].

Na ausência de GMPc, a atividade da PKG é autoinibida. O domínio N-terminal contém sequências autoinibitórias que na ausência de GMPc exibem baixa atividade catalítica. Os resíduos catalíticos estão em contato direto com o subdomínio autoinibitório localizado a partir de 50 a 75 resíduos do N-terminal [26].

Os processos oxidativos podem providenciar a ativação da PKG1 α através de mecanismo independente de NO/GMPc, tais como as espécies reativas de oxigénio que regulam a PKG1 no músculo liso vascular [26].

1.3.4 Adenilato ciclase

A adenilato ciclase (AC) pode encontrar-se na forma membranar ou solúvel. Existem 9 isoformas membranares (AC1-AC9) e uma forma solúvel. Esta enzima catalisa a conversão de ATP a AMPc, um importante segundo mensageiro [57].

Adenilato ciclase membranar

A adenilato ciclase membranar (ACm) consiste em dois domínios transmembranares hidrofóbicos, com seis hélices cada, um domínio citoplasmático pequeno (N) e dois domínios citosólicos grandes (C1 e C2). Estes domínios têm uma homologia considerável e constituem o núcleo catalítico.

Quando um ligando se liga ao recetor acoplado à proteína G promove um aumento intracelular de AMPc através da adenilato ciclase.

As isoformas da ACm exibem atividade basal que é reforçada através da ligação à proteína G estimuladora (G_s) e a atividade é reduzida quando a ACm se liga à proteína G inibidora (G_i). O domínio C1 é o sítio preferencial para a ligação à proteína G_i e o domínio C2 é o sítio de ligação à proteína G_s e também contém sítios de fosforilação da proteína cinase C (PKC) e da calmodulina cinase [57].

A ACm está presente na maioria das células, estando presente nas células musculares lisas [58, 59].

Adenilato ciclase solúvel

A adenilato ciclase solúvel (ACs) é responsável pela produção de AMPc citosólico. Possui um N-terminal com dois domínios com homologia aos domínios catalíticos da ciclase. A sequência de aminoácidos confirmada nestes dois domínios é mais parecida com as ciclasas das cianobactérias do que as ciclasas dos mamíferos. Encontra-se dentro do núcleo e da mitocôndria e nos microtúbulos e centríolos.

Este tipo de adenilato ciclase é ativada por bicarbonato (HCO_3^-), Ca^{2+} e por ATP, é sensível a moduladores farmacológicos e insensível à proteína G e à forskolina.

A ACs tem um papel crucial na fisiologia do esperma, mas também está envolvida nas vias de sinalização de vários tecidos como o pâncreas, cérebro, rins e pulmões e regula a fosforilação oxidativa na mitocôndria [60].

Foi detetada expressão da ACs na placenta, no fígado, no timo, baço, ovários e músculo [61]. Desempenha um papel na apoptose das células endoteliais coronárias e de cardiomiócitos [60].

AMP cíclico

O monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) é um importante segundo mensageiro envolvido em várias vias de sinalização intracelular. O AMPc pode atuar através da proteína cinase A (PKA), do permutador de proteína ativado pelo AMPc (EPAC), de fosfodiesterases (PDE) e de canais iônicos regulados por nucleótidos cíclicos [60].

No citoplasma, o AMPc forma microdomínios e acumula-se em locais específicos, isto é, ocorre a compartimentalização do AMPc. Esta compartimentalização é controlada pelas AC e pelas PDE. Enquanto a AC é responsável pela produção de AMPc, as PDE catalisam a degradação do AMPc a adenosina monofosfato (AMP) [60].

13.6 Proteína cinase A

A PKA é um heterotetrâmero que contém duas subunidades catalíticas (C) em estado inativo e um dímero de subunidades regulatórias (R). Existem duas classes de PKA, tipo I e tipo II que diferem na subunidade R (RI e RII, respetivamente). As subunidades R e C têm múltiplas isoformas (RI α , RI β , RII α , RII β , C α , C β , C γ e PRKX). As duas subunidades C estão ligadas a homodímeros ou heterodímeros de RI ou de RII. Cada subunidade R contém um N-terminal, um domínio de dimerização (D/D), um sítio inibidor da PKA e dois sítios (A e B) de ligação ao AMPc [60].

No estado inativo a enzima apenas tem o sítio B exposto, quando este está ocupado ocorre uma alteração intramolecular e aumenta a ligação do AMPc ao sítio A. A ligação de quatro moléculas de AMPc, duas em cada subunidade R, promove uma alteração conformacional libertando as subunidades C que se tornam cataliticamente ativas e, por sua vez, vão fosforilar enzimas, fatores de transcrição, proteínas motoras, canais e outras moléculas de sinalização nos resíduos de serina ou treonina.

A PKA tipo I é mais sensível ao AMPc citosólico, enquanto 75% da PKA tipo II está associada a organelos e estruturas celulares [60, 62].

1.4 Cordão umbilical

O cordão umbilical é um órgão que morre quando a vida começa, pois a partir desse momento deixa de ser necessário para a sustentação do feto. Este liga o feto à placenta e é responsável pelo transporte de sangue aos tecidos e pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio [63]. No fim da gestação, o cordão umbilical tem aproximadamente 50-60 cm de comprimento, que vai desde o feto à placenta, e 1-2 cm de diâmetro [64].

O cordão umbilical apresenta um aspeto esbranquiçado e, normalmente, helicoidal devido à disposição dos vasos sanguíneos. É constituído por uma veia umbilical, que transporta o sangue arterial da placenta para o feto, por duas artérias umbilicais, que transportam o sangue venoso do feto para a placenta e pela geleia de Wharton (Figura 8) [63, 65]. Esta geleia é um tecido conjuntivo mucoso composto por uma matriz extracelular rica em água, fibras de colagénio, glicosaminoglicanos e proteoglicanos.

Em alguns casos o cordão umbilical pode apresentar uma única artéria, devido a malformações cromossomais ou congénitas, o que vai aumentar o risco de morte intrauterina ou mesmo durante o parto. Posteriormente, durante a sua vida, estas crianças podem sofrer de problemas renais e intestinais [64].

Alguns estudos demonstraram que alterações tanto na composição como no metabolismo do cordão umbilical são observadas em certas doenças na gravidez, como pré-eclâmpsia, diabetes, distúrbios cardíacos fetais e morte fetal. Estas evidências indicam que o cordão umbilical é um órgão importante para um bom desenvolvimento da gravidez e também do desenvolvimento fetal até ao nascimento [64].



Figura 8. Corte transversal do cordão umbilical humano. Adaptado de [9]

1.4.1 Artéria umbilical humana

As artérias são constituídas por três túnicas morfológicamente distintas, a íntima, a média e a adventícia, do interior para o exterior. A túnica íntima é constituída por células endoteliais e controla a permeabilidade e o tónus vascular. A túnica média é constituída por células do músculo liso e por constituintes da matriz extracelular (proteoglicanos e fibras). As SMC são responsáveis pela contratilidade das artérias e dividem-se espacialmente em duas camadas, na mais interna as células encontram-se dispostas longitudinalmente e na mais externa encontram-se dispostas circularmente [9, 66]. A túnica adventícia é constituída por fibroblastos, colagénio e elastina [67]. Os fibroblastos definem-se como células de origem mesenquimais que produzem uma variedade de componentes da matriz extracelular, incluindo vários tipos de colagénio assim como fibronectinas. A principal função da elastina é fornecer a elasticidade e permite a distensão/contração das artérias [67, 68].

O sistema arterial possui arteríolas (menores de 0,1 cm), artérias de médio calibre (0,1-1 cm) e de grande calibre (1-2,5 cm). As artérias musculares são vasos de diâmetro medio, que é o caso das artérias umbilicais [69].

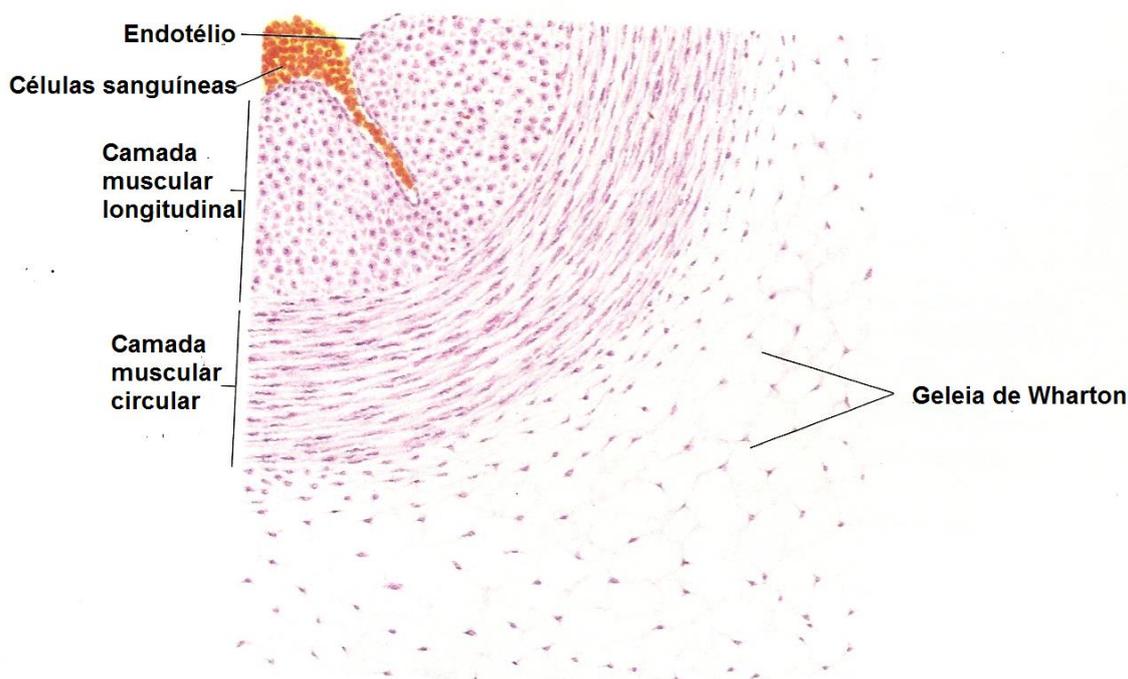


Figura 9. Corta transversal da artéria umbilical. Adaptado de [9]

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na regulação da circulação feto-placentária é essencial para compreender processos patológicos, tais como a hipertensão ou a pré-eclâmpsia. A artéria umbilical humana não possui terminações nervosas, pelo que a sua regulação é regulada por mediadores locais vasoativos (serotonina e prostaglandinas) transportados pelo fluxo sanguíneo e por iões (potássio e cálcio). Alguns mediadores que

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

provocam a vasoconstrição são: a serotonina (5-HT), a histamina, a prostaglandina e o KCl [70-72].

A 5-HT é o agente mais potente e que tem uma maior eficácia como agonista vasoconstritor na artéria umbilical possuindo uma extrema importância na regulação da resistência sistêmica fetal [73, 74]. A contração induzida pela 5-HT pode envolver 3 subtipos de recetores: 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}. Estes recetores podem estar envolvidos em respostas contráteis, em casos de pré-eclampsia ou hipertensão [75-77]. Em estudos já realizados foi verificada a presença dos recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A} na artéria umbilical humana, mas não o recetor 5-HT_{1D}. Isto sugere que o recetor 5-HT_{1D} se encontra no endotélio e portanto, o efeito contráctil da 5-HT na HUA sem endotélio é devido à ativação dos recetores: 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}. O recetor 5-HT_{1B} está acoplado à proteína Gi/Go, que inibe a adenilato ciclase. O recetor 5-HT_{2A} está acoplado à proteína Gq, que quando está ativo aumenta aos níveis de IP₃ [71, 72]. A 5-HT também pode produzir contrações através do influxo de cálcio proveniente do meio extracelular através dos canais de cálcio dependentes de voltagem e do cálcio libertado das reservas intracelulares. O KCl provoca contração através do influxo de cálcio extracelular via canais de cálcio dependentes de voltagem devido à despolarização da membrana [78].

A histamina é um mediador vasoativo que pode ativar diferentes recetores (H₁ a H₄). Os recetores H₁ estão acoplados à proteína Gq e causam a mobilização do cálcio intracelular. O recetor H₂ causa aumento do AMPc devido à ativação da proteína Gs. O recetor H₃ está acoplado à proteína Gi/o. O recetor H₄, pode ser acoplado à proteína Gi/o, causando a mobilização do cálcio intracelular e inibição da atividade da adenilato ciclase. A contração da artéria umbilical humana pela histamina é devido à ativação do recetor H₁, que vai induzir um aumento dos níveis de IP₃ [71].

O endotélio também controla o tónus do músculo liso vascular pela produção de mediadores que podem provocar vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes e são o NO, a prostaciclina e o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF). As substâncias vasoconstritoras são: a endotelina-1, angiotensina-II, a prostaglandina H₂, o tromboxano A₂ e as espécies reativas de oxigénio [79, 80].

Um aumento da fosforilação de uma proteína relacionada com o choque térmico (HSP20) ocorre com o relaxamento mediado por nucleótidos cíclicos e inibição da contração. O músculo liso da artéria umbilical humana é um tipo de músculo muito resistente ao relaxamento dependente de nucleótidos cíclicos, por isso a fosforilação de HSP20 ocorre muito lentamente. Isto faz com que uma lenta fosforilação de HSP20 no músculo liso da artéria umbilical humana corresponda a uma resposta muito lenta de relaxamento [29].

1.5 Hipertensão gestacional

A hipertensão complica cerca de 8% das gestações em países desenvolvidos, de forma significativa em algumas áreas. A hipertensão (HTA) na gravidez é a primeira causa de mortalidade fetal e materna em todo o mundo. Por isso é importante um melhor estudo dos mecanismos que podem estar relacionados com esta patologia, visto que afeta uma população considerável, podendo levar à morte [81].

A HTA apresenta 4 principais formas: HTA crónica, pré-eclampsia, HTA crónica com pré-eclampsia e HTA gestacional [82].

A HTA gestacional consiste num aumento significativo da pressão arterial que pode ocorrer após as 20 semanas de gravidez, em gestantes previamente normotensas, ou mesmo durante toda a gravidez e que termina após o parto. Esta pressão arterial atinge valores superiores a 140/90 mm Hg [82]. Quando a pressão sistólica é maior que 160 mm Hg e diastólica maior que 110 mm Hg designa-se por hipertensão gestacional severa.

Várias patologias aumentam o risco deste tipo de hipertensão, tais como obesidade, doença renal, doenças cardíacas, idade da mãe e gestações múltiplas. Uma mulher com historial de pré-eclampsia tem um risco de 11% de desenvolver HTA gestacional moderada e um risco de 4% de desenvolver HTA gestacional severa [83]. A HTA gestacional aumenta o risco de parto prematuro e de descolamento da placenta.

Na HTA crónica, a pressão arterial atinge valores superiores a 140/90 mm Hg e pode ocorrer antes da gestação, antes das 20 semanas de gravidez e persistir por mais 12 semanas após o parto. Neste tipo de hipertensão é característica a diminuição da pressão arterial no fim do primeiro e início do segundo trimestre voltando a aumentar no terceiro trimestre para os valores anteriores à gestação [81]. Existem duas categorias: primária e secundária. A hipertensão primária é a forma mais comum de hipertensão (90% dos casos) sem ter associada outras patologias. A hipertensão secundária (10% dos casos) está associada a outras doenças como diabetes, doença renal crónica, distúrbios de tiroide ou doenças vasculares. A maioria das grávidas com hipertensão crónica tem hipertensão primária, mas mulheres com hipertensão pré-existente, diabetes gestacional ou doença renal crónica estão mais propensas a desenvolver hipertensão secundária [83].

A HTA crónica na gravidez é caracterizada por leve, quando a pressão sistólica está entre 140-159 mm Hg ou a diastólica entre 90-109 mm Hg, ou severa, quando a pressão sistólica é maior que 160 mm Hg ou diastólica maior que 100 mm Hg. Durante a gravidez, a hipertensão crónica aumenta o risco de mortalidade e morbidade materna e fetal [83].

A pré-eclampsia é uma desordem na gravidez que é definida como HTA gestacional com proteinúria (≥ 300 mg/24 horas). É classificada como leve quando a pressão sistólica é menor que 160 mm Hg ou a diastólica menor que 110 mm Hg com plaquetas e enzimas hepáticas normais e ausência de sintomas cerebrais, e severa quando a pressão sistólica é maior que 160 mm Hg ou a diastólica maior de 110 mm Hg ou também quando a proteinúria é maior que 5g/24h. Ocorre também redução do volume do plasma, aumento da resistência

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

periférica e vasoconstrição [84]. Afeta 3-7% das gestações e aumenta o risco a partir das 34 semanas até ao fim da gravidez [85]. Tem como fatores de risco a diabetes, doenças cardíacas, doença renal, idade da mãe, obesidade e gestações múltiplas. É a principal causa de mortalidade e morbidade materna e fetal [83].

Na pré-eclampsia ocorre disfunção renal, gastrointestinal, na coagulação e no sistema nervoso central. A nível renal ocorre endoteliose glomerular, diminuição da clearance da creatinina e da excreção de ácido úrico e de cálcio. A nível hepático pode ocorrer isquemia, necrose hepatocelular devido ao aumento das transaminases. A nível hematológico pode ocorrer anemia hemolítica microangiopática devido à disfunção endotelial. A nível neurológico pode ocorrer dores de cabeça, visão turva e alteração do estado mental (10).

Uma complicação grave é a síndrome de HELLP, inicialmente descrito por Weinstein em 1982, onde é característica hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixas plaquetas [81]. Os sinais clínicos ocorrem no terceiro trimestre e caracterizam-se por um mal-estar geral (90%), dor epigástrica (90%), náuseas e vômitos (50%). Complica 1 ou 2 gravidezes em 1000 e 5% de mulheres com pré-eclampsia. Esta síndrome também está associada a mortalidade e morbidade materna e infantil. Vários problemas estão associados com esta síndrome, tais como edema pulmonar, insuficiência renal, insuficiência renal e acidente vascular cerebral [83, 86].

Vários estudos mostraram que os níveis da concentração de 5-HT no plasma e na placenta em mulheres com pré-eclampsia eram mais elevados do que em gestações normais. O que sugere que este agente pode estar envolvido nesta patologia [87, 88]. Outros autores descreveram que a pré-eclampsia está associada com o aumento da concentração tanto da histamina como da 5-HT, assim como com um aumento da sensibilidade ou reatividade da artéria umbilical humana a estes mediadores, o que poderá conduzir ao aumento da resistência vascular [89, 90]. Por outro lado, uma possível causa para a elevada mortalidade intra-uterina é a diminuição do fluxo sanguíneo materno-fetal. Várias alterações a nível dos vasos umbilicais e da placenta têm sido apontadas como as possíveis causas desta diminuição do fluxo, como a disfunção endotelial e o aumento da atividade contráctil provocada pela histamina e pela 5-HT [91, 92].

Vários autores afirmam que uma disfunção nos canais iónicos, principalmente os canais de potássio e os de cálcio, pode levar à hipertensão. Defeitos na função dos canais de potássio pode levar à vasoconstrição e assim ocorrerem alterações que podem envolver mecanismos patológicos como a hipertensão [93]. Estudos realizados em animais hipertensos verificou-se que as correntes eram maiores nos BK_{Ca} e menores nas correntes de K_v [94, 95]. Outros estudos em ratos mostraram que a expressão da subunidade $\beta 1$ dos BK_{Ca} em ratos hipertensos diminuiu sem alteração visível na subunidade α [96, 97]. Além dos BK_{Ca} , também os K_v apresentam uma função alterada. A sua função é diminuída nas SMC vasculares de animais hipertensos o que pode levar à despolarização da membrana e conseqüente aumento do tónus vascular. Em casos de hipertensão foi demonstrada uma diminuição da regulação dos canais K_v , embora a expressão da proteína tenha aumentado [98].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

Na pré-eclâmpsia foi verificada uma diminuição do relaxamento vascular do músculo liso da artéria umbilical que está relacionada com um baixo nível de AMPc nas SMC. Verificou-se através de um modelo de estudo que o número de recetores β adrenérgicos na pré-eclâmpsia é reduzido [99].

Resultados em laboratório mostraram que o factor I de crescimento de insulina (IGF-I) promove a produção de 1,25-dihidroxitamina D3 no tecido placentário. Nas condições de pré-eclâmpsia, as concentrações de 1,25-dihidroxitamina no soro materno são mais baixas comparativamente às grávidas com tensão normal [100].

Capítulo 2: Objetivos

A hipertensão é uma patologia que afeta um número substancial de pessoas. Na gravidez, a hipertensão põe em risco tanto a vida materna como a fetal, sendo assim importante um estudo mais aprofundado das alterações que ocorrem nesta patologia a nível vascular. A artéria umbilical humana é um bom material de estudo a nível vascular, pois é relativamente fácil de obter após o parto e uma fonte de células humanas.

Como já foi referido anteriormente, o controlo do tónus vascular é dependente dos mediadores vasoativos libertados localmente, transportados pelo fluxo sanguíneo e de iões como o potássio e o cálcio. Torna-se assim importante analisar as alterações que poderão ocorrer na hipertensão a nível dos canais de cálcio e potássio e também de diferentes proteínas envolvidas no mecanismo de contração e relaxação.

O objetivo principal deste trabalho foi verificar se existem alterações a nível vascular entre cordões umbilicais provenientes de gestantes normotensas e cordões umbilicais provenientes de gestantes hipertensas.

Para isso, foram definidos diferentes objetivos específicos para tentar resolver o objetivo principal:

1. Isolamento e cultura celular de células do músculo liso da artéria umbilical humana.
2. Realização de extração de RNA, síntese de cDNA e PCR convencional.
3. Análise da expressão dos diversos canais (Cav1.2 e as subunidades α e β dos canais BK_{ca}) e de proteínas envolvidas no mecanismo de contração/relaxação (PKG, GC e NPRA) por Real time PCR.

Capítulo 3: Materiais e métodos

3.1 Recolha de tecidos

Os cordões umbilicais, resultantes de partos normais, foram obtidos no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, com o consentimento informado das mães e de acordo com o Comité de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira, EPE (Covilhã, Portugal). Os cordões umbilicais, resultantes de parto por cesariana, foram obtidos no serviço de obstetrícia/maternidade do Hospital Sousa Martins - Guarda (Unidade Local de Saúde da Guarda), com o consentimento informado das mães e de acordo com o Comité de Ética do Hospital Sousa Martins - Guarda (Unidade Local de Saúde da Guarda, EPE). As amostras de cordão umbilical foram recolhidas e guardadas em solução salina estéril, PSS com composição em mM: NaCl 110; CaCl₂ 0,15; KCl 5; MgCl₂ 2; HEPES 10; NaHCO₃ 10; KH₂PO₄ 0,5; NaH₂PO₄ 0,5; Glucose 10; EDTA 0,49). Foi também adicionado à solução de PSS uma mistura de antibióticos (penicilina 5 U/ml, estreptomicina 5 µg/ml e anfotericina B 12,5 ng/ml) e antiproteases (leupeptina 0,45 mg/l, benzamidina 26 mg/l e inibidor de tripsina 10 mg/l) de modo a evitar a degradação e a contaminação das amostras.

3.2 Cultura celular

Para a obtenção de culturas de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUA), o isolamento das artérias foi realizado numa câmara de fluxo laminar, sob condições de esterilidade e a 4°C. O cordão umbilical foi lavado com PSS e antibiótico e foi colocado numa placa de Petri com o mesmo meio de lavagem e as artérias foram isoladas por dissecação da geleia de Wharton. Após o isolamento da HUA, os segmentos desta artéria foram cortados em retângulos, e a túnica íntima (endotélio) foi mecanicamente removida com uma leve passagem de um cotonete estéril sobre a mesma. As camadas de músculo liso vascular foram extraídas da parte interior da artéria, utilizando para o efeito pinças estéreis apropriadas. As camadas da túnica média foram cortadas em pequenos fragmentos e após agitação mecânica foram colocadas em placas de cultura revestidas com colagénio (5 µg/cm²). As placas foram colocadas numa incubadora a 37°C com 5% CO₂, e o meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium F-12* (DMEM-F12) (Sigma-Aldrich), albumina de soro bovino (BSA) (5mg/ml), 5% de soro fetal bovino, fator de crescimento de fibroblastos (1 µg/ml), heparina (2 mg/ml), insulina (5 µg/ml), fator de crescimento epidérmico (100 ng/ml) e antibiótico (referido anteriormente) foi mudado a cada 2/3 dias, até à obtenção de culturas primárias confluentes. Células das diferentes passagens foram usadas para realizar as

experiências de PCR, até ao máximo de 6 passagens. Depois de as culturas atingirem a confluência, substituiu-se o meio DMEM-F12 com 5% de soro, por meio com a mesma composição de BSA, mas sem o suplemento de soro insulina, fatores de crescimento e antibiótico durante as 24-48 horas prévias à realização das experiências.

3.3 Extração de RNA total

Para realizar a extração de RNA total das SMC em cultura foi usado Trizol ou reagente Tri (Ambion) que consiste numa solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que rompe a membrana celular e mantém a integridade do RNA e todo o procedimento foi realizado em gelo para evitar a degradação deste. Adicionou-se 200 μ L a cada poço de uma placa de 6 e fez-se uma raspagem com um cell scrapper para lisar melhor as células. Juntou-se o conteúdo de dois poços em cada eppendorf para uma maior quantidade de RNA. Incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 80 μ L de clorofórmio (VWR). Após agitação mecânica, incubou-se 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e foi centrifugar a 4°C a 12000g durante 15 minutos. Ao terminar a centrifugação obteve-se três fases distintas, no fundo do eppendorf a fase orgânica (rosa) que contém as proteínas, resíduos de fenol e clorofórmio, a interfase (branca) que contém o DNA e a fase aquosa (transparente) que contém o RNA. A fase aquosa (fase de interesse) foi transferida para um novo eppendorf onde se adicionou 200 μ L de isopropanol (VWR). Após agitação mecânica, para melhor precipitação de RNA, incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 4°C a 12000g durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 400 μ L de etanol a 75% em água de DEPC a -20°C. Agitou-se no vórtex e foi centrifugar a 4°C a 7500g durante 5 minutos. Voltou a rejeitar-se o sobrenadante, lavou-se o pellet com 400 μ L de etanol a 75% frio, agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 4°C a 7500g durante 5 minutos. Rejeitou-se novamente o sobrenadante e incubou-se durante 5 minutos à temperante ambiente. Após incubação hidratou-se o pellet com 20 μ L de água de DEPC (inibidor das RNases).

Para determinar a concentração e a integridade do RNA realizaram-se leituras espectrofotométricas a 260nm (Nanophotometer™, Implén, Germany). Este equipamento permite quantificar diretamente a concentração em μ g/ μ L e o rácio A260/A280 indica o grau de pureza do RNA. O rácio deve encontrar-se entre 1,8 e 2,1. Os rácios inferiores a 1,8 indicam contaminação com proteínas ou com fenol e os rácios superiores a 2,1 indicam contaminação com DNA. Após medição guardou-se o RNA a -80°.

3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA obtém-se a partir da transcrição reversa do mRNA, sendo sintetizado pela enzima transcriptase reversa e origina uma cópia exata do gene sem intrões. A enzima usada para realizar a transcrição reversa das amostras foi a do kit NZY M-MuLV Reverse Transcriptase (nzytech, Portugal). Todas as mixes foram preparadas com volumes de reagentes de n+1 reações. Para cada reação de síntese de cDNA com volume final de 20 µL adicionou-se o volume correspondente para 1 µg de RNA, 2,5 µL de Random hexamer mix (nzytech, Portugal) e 1 µL de dNTP's (dNTPs NZYSet, nzytech, Portugal) e perpez-se o volume até 17 µL com água estéril. Esta mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos e de seguida arrefecida em gelo. Posteriormente, adicionou-se outra mistura com 2 µL de 10x reaction buffer (nzytech, Portugal) e 1 µL de M-MuLV. As amostras foram novamente a incubar a 25°C durante 10 minutos, 60 minutos a 37°C e 15 minutos a 70°C. O cDNA foi guardado a -20°C.

3.5 PCR (Reação em cadeia da polimerase) convencional

Para verificar se o cDNA estava em condições ótimas, para posteriormente ser realizado o PCR em tempo real, efetuou-se a técnica de PCR convencional. A mix foi realizada com n+1 reações e para um volume final de 25 µL. Para cada reação adicionou-se 2,5 µL de 10x reaction buffer (NZY Taq DNA polymerase, Nzytech, Portugal), 0,625 µL de dNTP's (10 mM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM) (nzytech, Portugal), 1,2 µL de primer β-actina (gene housekeeping) Fw e Rv, 16,875 µL de água estéril, 0,1 µL de Taq DNA polimerase (NZY Taq DNA polymerase, Nzytech, Portugal) e 1 µL de cDNA. Na reação de controlo negativo adicionou-se água estéril em vez de cDNA. A amplificação dos genes foi realizada num termociclador TProfessional Basic Gradient (Biometra). Inicialmente as amostras foram colocadas a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, onde ocorre a desnaturação da molécula de DNA, a 60°C durante 30 segundos, temperatura ótima de emparelhamento do primer e a 72°C durante 30 segundos, onde ocorre a fase de amplificação, no final dos 30 ciclos as amostras foram colocadas a 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% (GRiSP, Portugal) na presença de Green Safe (Nzytech, Portugal) e utilizando o marcador NZY DNA Ladder V (nzytech).

3.6 PCR em tempo real

A quantificação da expressão dos genes em estudo, ACTB, GAPDH, B2M, PRKG1 α , NPRA, GUCY1a3, KCNMA1, KCNMB1, ACNA1C, foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando o kit Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo scientific), nos dois grupos em estudo (células normais e células de hipertensão). O gene endógeno usado foi a β -actina para normalizar os níveis de expressão e foi utilizado o termociclador iCycler iQ-5 (Bio-Rad).

As reações de amplificação dos genes foram preparadas para um volume final de 20 μ L. Fez-se uma mix para cada gene contendo 10 μ L de SYBR green, 1,2 μ L de primer Fw e primer Rv (PRKG1 α , NPRA, GUCY1a3, ACNA1C, ACTB, GAPDH e B2M) ou 1,6 μ L de primer Fw e primer Rv (KCNMA1, KCNMB1), 1 μ L de cDNA e perpez-se até ao volume final com água estéril (Thermo scientific). As amostras foram expostas às seguintes condições de amplificação: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 10 segundos. A formação de dímeros e a pureza do produto amplificado foram avaliadas pelas curvas de melting. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $\Delta\Delta$ Ct.

Tabela 3: Primers utilizados para PCR em tempo real

Nome do primer	Gene	Sequência do primer	Fragmento (bp)	Temperatura (°C)	Nº gene bank
B-actina	ACTB	Fw 5'-CATCCTCACCCCTGAAGTACCC-3' Rv 5'-GCCTGGATAGCAACGTACATG-3'	314	60	NM_001101
GAPDH	GAPDH	Fw 5'-CGC CCG CAG CCG ACA CAT C-3' Rv 5'-CGC CCA ATA CGA CCA AAT CCG-3'	75	60	NM_001256799.1
B2M	B2M	Fw 5'-ATG AGT ATG CCT GCC GTG TG-3' Rv 5'-CAA ACC TCC ATG ATG CTG CTT AC-3'	92	60	NM_004048.2
PKG	PRKG1 α	Fw 5'-GGCTGTCAGAGAAGGAGGAAG-3' Rv 5'-GGAAGGACCTGTACGTCTGC-3'	150	60	NM_001098512.2
GC	GUCY1a3	Fw 5'-GATAGCACTGATGGCCCTGAA-3' Rv 5'-GTAGTCCAATTCGCATCTTGATAGG-3'	89	60	NM_00130687
NPRA	NPRA	Fw 5'-GCAAAGGCCGAGTTATCTACATC-3' Rv 5'-AACGTAGTCCTCCCCACACAA-3'	98	60	NM_000906.3
Cav1,2	CACNA1C	Fw 5'-TGCGTGGAATACGCCCTCAAGG-3' Rv 5'-ACAGGCAGCTCTGGCCGTAGTGC-3'	104	60	NM_001167625
BKca α	KCNMA1	Fw 5'- AAGCAACGAATGGAGGCAT-3' Rv 5'- CCAGTGAAACATCCCAGTAGAGT -3'	147	60	NM_001014797
BKca β	KCNMB1	Fw 5'- CAATGTGGTGAACGCAGCC -3' Rv 5'- TGTGATGCTGAGGCGTGAA-3'	86	60	NM_172159

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média das experiências, para cada condição experimental analisada. A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat Statistical Analysis System, versão 3.5. A significância estatística entre os dois grupos de dados foi analisada utilizando o teste t-Student's e o teste Mann Whitney (não paramétrico).

Para quantificar a expressão das amostras, os valores de Ct foram calculados usando curvas modelo produzidas a partir do cDNA obtido e estes cDNAs foram normalizados a partir dos genes housekeeping β -actina, GAPDH e β 2M das HUASMC. Todos os ensaios foram validados com uma eficiência determinada entre 90% e 105% [101]. Os níveis de expressão foram calculados pelo método $\Delta\Delta$ Ct.

Capítulo 4: Resultados

4.1 Análise da expressão do canal Cav1.2

Foi analisado, através da técnica de real time PCR, a expressão da subunidade α_{1C} dos canais de cálcio Cav1.2 em amostras provenientes de cordões umbilicais de gestantes normotensas (controlo) e cordões umbilicais de gestantes hipertensas (hipertensão). Verificou-se que a expressão deste canal não apresenta alterações significativas entre as amostras controlo e as de hipertensão ($P = 0,672$) (figura 10).

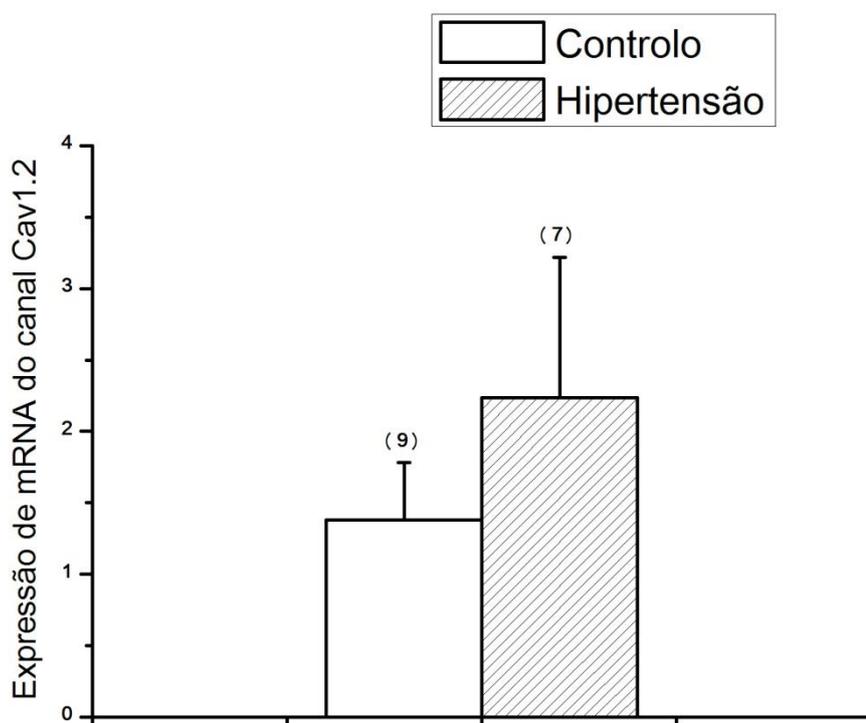


Figura 10. Estudo da expressão da subunidade α_{1C} dos canais Cav1.2 em células provenientes de cordões de grávidas normotensas e cordões de grávidas com hipertensão. As barras representam as médias e as linhas representam o erro padrão das médias do número de cordões usados indicados entre parênteses. As amostras foram normalizadas com a β -actina, GAPDH e β 2M e realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney.

4.2 Análise da expressão do canal BK_{ca}

Também foram analisadas as subunidades α e $\beta 1$ dos canais BK_{ca}. Não foram observadas diferenças significativas ao nível da subunidade α ($P = 0,832$) (figuras 11). Na subunidade β também não foram observadas diferenças significativas, no entanto ocorre uma ligeira diminuição da expressão na hipertensão ($P = 0,387$) (figura 12).

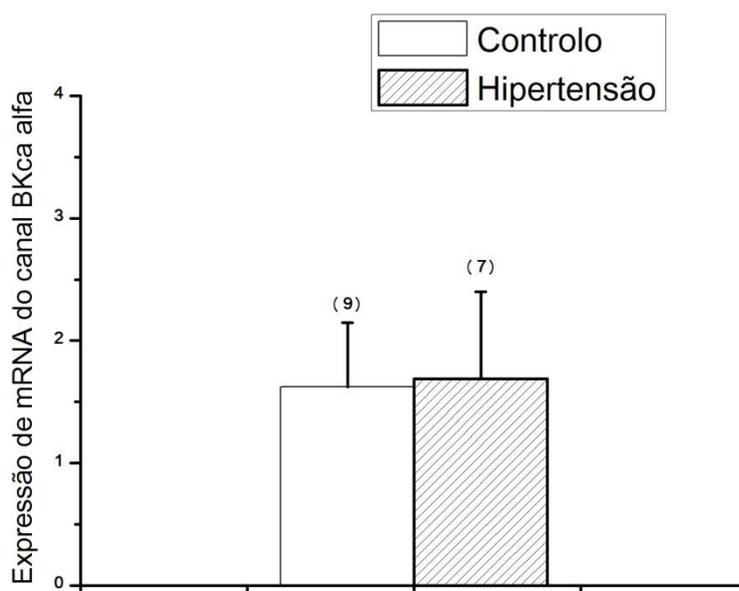


Figura 11. Estudo da expressão da subunidade α dos canais BK_{ca} em células provenientes de cordões normais e cordões de hipertensão. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. As amostras foram normalizadas com a β -actina, GAPDH e $\beta 2M$ e realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

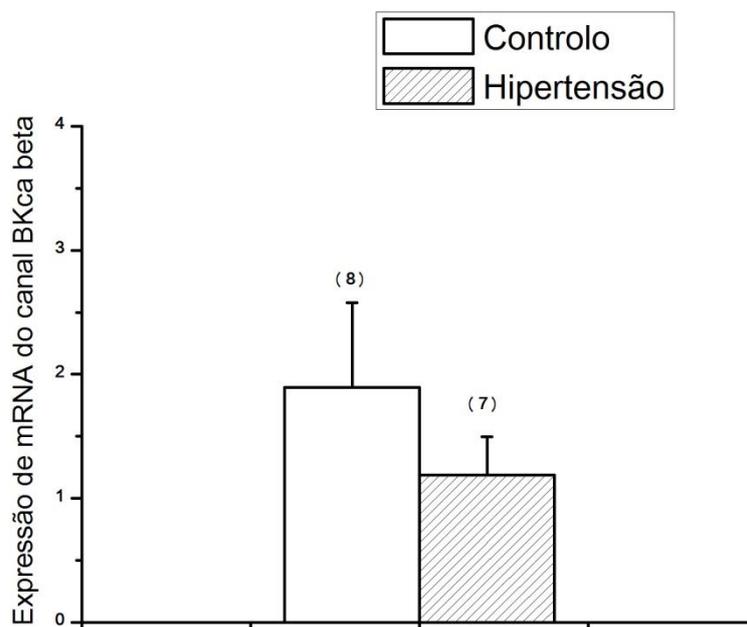


Figura 12. Estudo da expressão da subunidade β dos canais BK_{Ca} em células provenientes de cordões normais e cordões de hipertensão. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. As amostras foram normalizadas com a β -actina, GAPDH e β 2M e realizou-se o teste t-student.

4.3 Análise da expressão da proteína cinase G

Além dos canais Cav1.2 e BKca, também foram analisadas as expressões de diferentes proteínas envolvidas nos mecanismos de contração/relaxação do músculo liso vascular. Uma dessas proteínas analisadas foi a PKG. Em relação a esta proteína não foi verificada nenhuma alteração na sua expressão nos casos de hipertensão em relação ao controlo ($P = 0,230$) (figura 13).

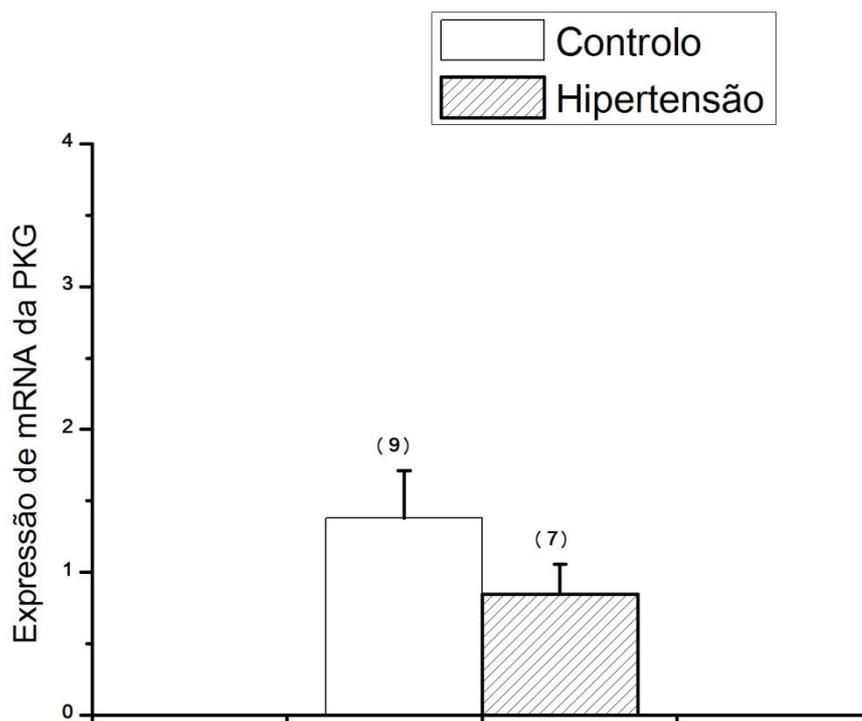


Figura 13. Estudo da expressão da proteína cinase G em células provenientes de cordões normais e cordões de hipertensão. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. As amostras foram normalizadas com a β -actina, GAPDH e B2M e realizou-se o teste t-student.

4.4 Análise da expressão da guanilato ciclase

A expressão da GC foi também estudada. Neste caso também não foi detetada diferença significativa (figura 14). Contudo pode-se observar que nas amostras com hipertensão existe um ligeiro aumento da expressão deste gene ($P = 0,086$).

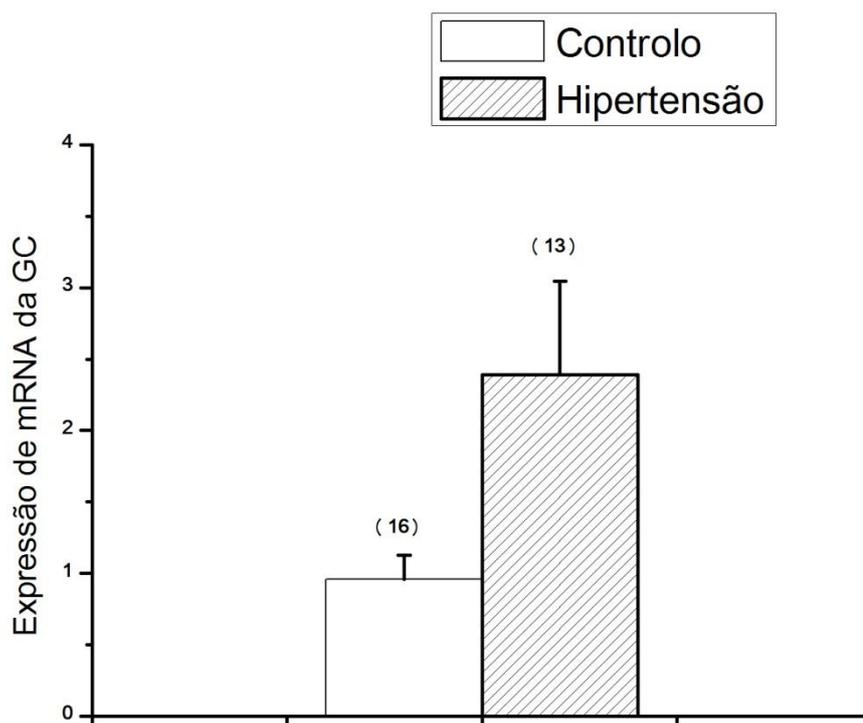


Figura 14. Estudo da expressão da guanilato ciclase em células provenientes de cordões normais e cordões de hipertensão. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. As amostras foram normalizadas com a β -actina, GAPDH e β 2M e realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney.

4.5 Análise da expressão do recetor NPRA

Também foi analisada a expressão relativamente ao recetor do péptido natriurético A. Não se verificaram alterações na expressão dos casos de hipertensão em relação ao controlo (figura 15). Contudo também se pode observar um ligeiro aumento da expressão deste recetor ($P= 0,213$).

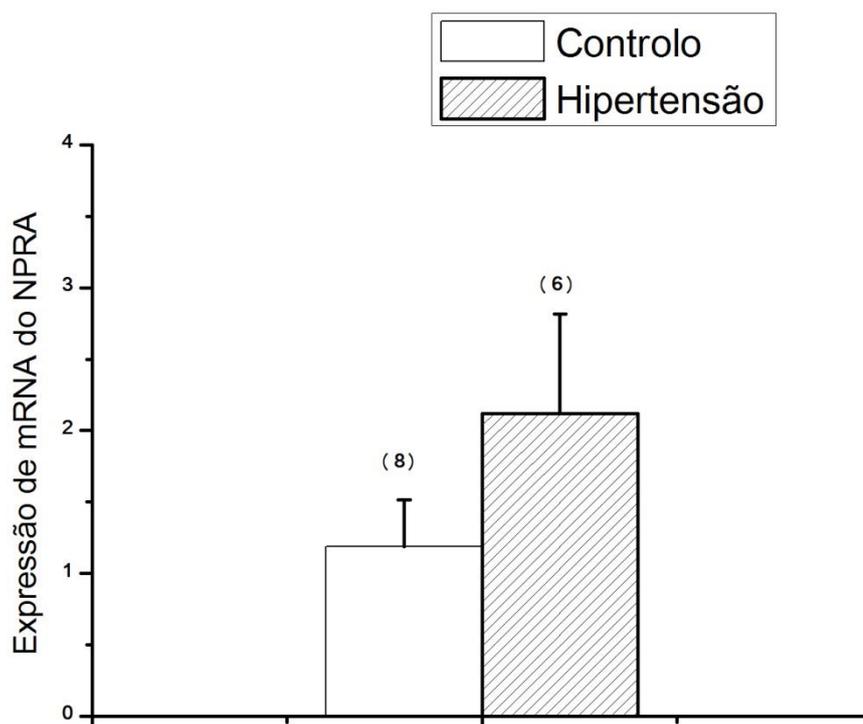


Figura 15. Estudo da expressão do recetor NPRA em células provenientes de cordões normais e cordões de hipertensão. As barras representam as médias, e as linhas, o erro padrão das médias do número de cordões usados indicadas entre parênteses. As amostras foram normalizadas com a β -actina, GAPDH e B2M e realizou-se o teste t-student.

Capítulo 5: Discussão

O cordão umbilical humano é uma ótima amostra para obtenção de SMC humanas. O cordão umbilical é uma extensão do sistema cardiovascular fetal, e como são de fácil obtenção, as artérias umbilicais são uma excelente amostra para a realização de estudos vasculares. A elucidação do mecanismo que regula o estado contráctil desta artéria pode ser importante para detetar potenciais alvos no tratamento de várias patologias, como a hipertensão gestacional e pré-eclampsia. Um dos problemas que pode ocorrer na realização de culturas primárias destas células consiste no facto de estas se poderem diferenciar em fenótipo sintético, que é o oposto das SMC contráteis. No entanto, estudos anteriores (Cairrão *et al.* e Rensen *et al.*) demonstraram que quando a cultura celular se encontra em confluência e após 24 horas de meio sem soro, as células apresentam essencialmente o fenótipo contráctil [10, 102].

Neste trabalho, os resultados em relação à expressão da subunidade α_{1C} do canal Cav1.2 revelaram que não existe diferença significativa entre o controlo e amostras de hipertensão. Estudos anteriores realizados no nosso grupo indicam uma diminuição da expressão desta subunidade em relação ao controlo [103]. Contrariamente, Pratt *et al* referiram um aumento da subunidade α_{1C} em artérias de ratos hipertensos comparado com ratos normotensos. Estes autores verificaram a alteração desta subunidade na circulação mesentérica, femoral e renal nos ratos com hipertensão podendo sugerir que esta sobreexpressão se estenda a outros locais vasculares. Demonstraram ainda que o aumento da expressão está relacionado ao aumento da corrente de cálcio [104]. Ohya *et al*, mostraram que em ratos hipertensos ocorre um aumento da atividade dos canais de cálcio comparativamente a ratos normotensos. Viram também que o aumento das correntes de cálcio pode estar relacionado com o número de canais de cálcio funcionais abertos e não com as possíveis propriedades alteradas do canal em ratos hipertensos [94]. No nosso trabalho apesar de haver um ligeiro aumento da expressão nos casos de hipertensão, não foi suficiente para ser considerado significativo.

Em relação aos canais BK_{Ca} , não se verificou nenhuma alteração ao nível da expressão tanto da subunidade α como da subunidade B1, apesar de se verificar uma relativa diminuição na expressão B1 mas sem significância. Estudos anteriores realizados no nosso grupo revelaram que a subunidade B1 sofre uma diminuição da expressão em amostras hipertensas, não havendo alteração na subunidade α [103]. Amberg *et al* concluíram nas suas experiências que ocorre uma diminuição da atividade do canal BK_{Ca} quando há uma diminuição da expressão da subunidade B1 em artérias cerebrais de ratos hipertensos. Também Resnik *et al* verificaram que ocorre uma diminuição da expressão destes canais nas SMC da artéria pulmonar de ratos hipertensos [105]. Estes resultados são contrariados pelos resultados de Liu *et al*, Navarro-Antolín *et al* e Chang *et al*, que verificaram um aumento da expressão das subunidades α e B1 dos canais BK_{Ca} na hipertensão. Verificaram também em ratos

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

hipertensos, um aumento do influxo de Ca^{2+} e um aumento da atividade dos canais BK_{Ca} nas SMC de artérias femorais [22, 94]. Ledoux *et al* sugerem que as mudanças na conformação ou na sensibilidade ao Ca^{2+} dos canais BK_{Ca} poderão levar a que estes canais atuem como puros K_v [13].

A importância dos canais na regulação nas SMC leva-nos a conceder a estes a grande importância. Para isso é necessário entender a composição molecular, atividade e expressão dos mesmos em patologias como a hipertensão arterial e em particular, a hipertensão gestacional, tal como a pré-eclampsia.

Em relação à guanilato ciclase também não se verificou nenhuma alteração a nível da expressão, notando-se um aumento nas amostras de hipertensão mas sem significância estatística. Num estudo realizado por Dumitrascu *et al* demonstraram que duas moléculas estimuladoras e ativadoras da GC solúvel podem reverter a hipertensão pulmonar em ratos. Verificaram também um aumento da expressão das subunidades α_1 e β_1 da GC solúvel em ratos e ratinhos hipertensos. Assim como Dumitrascu *et al*, também Schermuly *et al* verificaram um aumento da expressão da GC solúvel [106, 107]. Estes dois estudos afirmam que a ativação da GC solúvel pode ser uma opção na terapia da hipertensão pulmonar. Contrariando estes estudos, Ruetten *et al* demonstraram que na aorta de ratos hipertensos há uma diminuição da expressão das subunidades α_1 e β_1 GC solúvel quando comparado ao controlo (ratos *wild type*), verificando-se também uma diminuição dos níveis basais de GMPc [108]. Também Kloss *et al* e Bouloumié *et al* encontraram evidências da diminuição da expressão da GC solúvel em ratos hipertensos. Esta diminuição pode contribuir para uma disfunção arterial e hipertensão [109, 110].

Em relação à proteína cinase G não se demonstrou nenhuma alteração a nível da sua expressão da isoforma $I\alpha$. Ruetten *et al* verificou que ocorre uma diminuição da PKGI na aorta de ratos com hipertensão. A expressão da PKGI também se encontra reduzida na resposta ao óxido nítrico e ao GMPc nas SMC vasculares [108]. Resnik *et al* também observou que há uma diminuição da expressão da PKGI α nas SMC da artéria pulmonar de ratos hipertensos. Este estudo demonstrou que as SMC da artéria pulmonar quando expostas a condições de hipertensão apresentam uma diminuição da expressão de moléculas que medeiam a resposta da circulação pulmonar à estimulação de vasodilatadores e posterior vasodilatação [105]. Também Pfeifer *et al* demonstraram que uma deleção no gene da PKG em ratinhos provoca hipertensão e aumenta a adesão e agregação plaquetária [109].

Em relação ao NPRA também não foram verificadas alterações na expressão entre o controlo e as amostras de hipertensão. Ainda não existem muitos estudos que relacionem o NPRA com animais ou humanos hipertensos. No entanto, Oliver *et al*, nos seus estudos, verificaram que ratos sem o gene funcional que codifica para o NPRA possuem pressão arterial elevada e conseqüente hipertensão [111]. Também Nakayama *et al* sugeriram que a deleção do gene do NPRA reduz a atividade deste recetor e confere um aumento da suscetibilidade a desenvolver hipertensão [112].

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

Sendo a hipertensão gestacional e a pré-eclâmpsia uma doença que põe em risco a saúde materna e fetal, e que afeta uma parte significativa de mulheres, é de grande interesse continuar este estudo para se verificar se apenas os canais Cav1.2, BK_{ca} e Kv (anteriormente estudados pelo nosso grupo) estão envolvidos na hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia, o seu mecanismo e como estão relacionados com estas patologias. E não só os canais, mas também prosseguir o estudo de quais as proteínas que regulam a contração/relaxação que podem estar envolvidas nestas doenças e os seus mecanismos de ação.

Capítulo 6: Conclusão

Este trabalho contribuiu para um conhecimento mais profundo da hipertensão gestacional aportando informação sobre os genes intervenientes no mecanismo de contração/relaxamento do músculo liso vascular.

Com este trabalho pode-se concluir que ocorreram ligeiras alterações na expressão dos canais Cav1.2 e BK_{Ca} e das proteínas contráteis PKG, GC e NPRA. Observou-se um pequeno aumento da expressão dos canais Cav1.2, GC e NPRA e uma ligeira diminuição nos casos da subunidade β dos canais BK_{Ca} e na PKG. Quanto à subunidade α dos canais BK_{Ca} as suas expressões parecem ser similares, o que nos leva a crer que esta subunidade não é alterada na hipertensão. Além destes genes, também os genes utilizados como housekeepings parecem ter pequenas alterações na hipertensão, sendo a alteração na β-actina a mais pronunciada. Neste sentido é necessário aumentar o número de amostras a analisar, de modo a diminuir as discrepâncias verificadas, uma vez que estas amostras são provenientes de humanos os quais apresentam uma grande variabilidade interindividual, o que pode interferir na homogeneidade dos resultados. Também é importante realizar estes estudos diretamente em camadas de músculo liso da artéria umbilical humana, pois quando as células musculares lisas vasculares estão em cultura podem modificar-se geneticamente o que pode interferir nos resultados.

Sendo a hipertensão gestacional uma patologia que afeta um número significativo de gestantes e também o feto, é necessário a realização de trabalhos neste seguimento para uma melhor compreensão das alterações que ocorrem na hipertensão, no sentido de desenvolver novas terapias farmacológicas.

Bibliografia

1. Yoshida, T. and G.K. Owens, *Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity*. Circ Res, 2005. **96**(3): p. 280-91.
2. E., C., *Histologia humano, Vol. 1: Citologia, Embriologia e Histologia General*. 1 ed. Vol. 1. 2001. 453.
3. Meyer, W.W., et al., *Structure and closure mechanism of the human umbilical artery*. Eur J Pediatr, 1978. **128**(4): p. 247-59.
4. 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.
5. Gunst, S.J., *Applicability of the sliding filament/crossbridge paradigm to smooth muscle*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. **134**: p. 7-61.
6. Morgan, K.G. and S.S. Gangopadhyay, *Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 953-62.
7. Nakamura, M., et al., *Actin filament disruption inhibits L-type Ca(2+) channel current in cultured vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(2): p. C480-7.
8. Gunst, S.J. and W. Zhang, *Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(3): p. C576-87.
9. Zhang, S.-X., *An Atlas of Histology*. 1999, New York: Springer. 426.
10. 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.
11. Dietrich, A., et al., *Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells*. Pharmacology & Therapeutics, 2006. **112**(3): p. 744-760.
12. Jackson, W.F., *Ion channels and vascular tone*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 173-8.
13. Ledoux, J., et al., *Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 69-78.
14. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 411-25.
15. Satin, J., E.A. Schroder, and S.M. Crump, *L-type calcium channel auto-regulation of transcription*. Cell Calcium, 2011. **49**(5): p. 306-13.
16. Catterall, W.A. and A.P. Few, *Calcium channel regulation and presynaptic plasticity*. Neuron, 2008. **59**(6): p. 882-901.
17. Bidaud, I. and P. Lory, *Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: a focus on the Timothy mutations in Ca(v)1.2 channels*. Biochimie, 2011. **93**(12): p. 2080-6.
18. Harvey, R.D. and J.W. Hell, *CaV1.2 signaling complexes in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **58**: p. 143-52.
19. Liao, P., et al., *Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca2+ channels in cardiac and smooth muscles*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(2): p. 197-203.
20. 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.
21. Sorensen, C.M., et al., *Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(5): p. F505-18.

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

22. Eichhorn, B. and D. Dobrev, *Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007. **376**(3): p. 145-55.
23. Bhave, G., et al., *Small-molecule modulators of inward rectifier K⁺ channels: recent advances and future possibilities*. Future Med Chem, 2010. **2**(5): p. 757-74.
24. Flagg, T.P., et al., *Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 799-829.
25. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone*. J Anesth, 2007. **21**(2): p. 220-31.
26. Francis, S.H., et al., *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 525-63.
27. Gao, Y., et al., *Myosin light chain kinase stimulates smooth muscle myosin ATPase activity by binding to the myosin heads without phosphorylating the myosin light chain*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(1): p. 16-21.
28. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. Nature, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
29. Woodrum, D.A. and C.M. Brophy, *The paradox of smooth muscle physiology*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **177**(1-2): p. 135-43.
30. Salamanca, D.A. and R.A. Khalil, *Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(11): p. 1537-47.
31. Loukianov, E., T. Loukianova, and M. Periasamy, *Myosin heavy chain isoforms in smooth muscle*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1997. **117**(1): p. 13-8.
32. Kazmierczak, K., et al., *The role of the N-terminus of the myosin essential light chain in cardiac muscle contraction*. J Mol Biol, 2009. **387**(3): p. 706-25.
33. Eddinger, T.J. and D.P. Meer, *Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(2): p. C493-508.
34. Niuro, N. and M. Ikebe, *Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29567-74.
35. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
36. 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.
37. 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.
38. Amano, M., Y. Fukata, and K. Kaibuchi, *Regulation and functions of Rho-associated kinase*. Exp Cell Res, 2000. **261**(1): p. 44-51.
39. Nobes, C. and A. Hall, *Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases*. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(1): p. 77-81.
40. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
41. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
42. Kawano, Y., et al., *Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 1023-38.
43. 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.

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

44. Hirano, K., *Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle*. J Pharmacol Sci, 2007. **104**(2): p. 109-15.
45. Orton, R.J., et al., *Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 2): p. 249-61.
46. Cobb, M.H., *MAP kinase pathways*. Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 479-500.
47. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
48. Fanger, G.R., et al., *MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases?* Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(1): p. 67-74.
49. Siow, Y.L., et al., *Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7586-94.
50. Woodrum, D.A. and C.M. Brophy, *The paradox of smooth muscle physiology*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001. **177**(1-2): p. 135-143.
51. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 247-66.
52. Lucas, K.A., et al., *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 375-414.
53. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase*. Brain Research Bulletin, 2004. **62**(6): p. 505-515.
54. Andreopoulos, S. and A. Papapetropoulos, *Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation*. General Pharmacology: The Vascular System, 2000. **34**(3): p. 147-157.
55. Pandey, K.N., *The functional genomics of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A: perspectives and paradigms*. FEBS J, 2011. **278**(11): p. 1792-807.
56. Wilson, L.S., et al., *Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13650-5.
57. Seifert, R., et al., *Inhibitors of membranous adenylyl cyclases*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(2): p. 64-78.
58. Billington, C.K., et al., *cAMP regulation of airway smooth muscle function*. Pulm Pharmacol Ther, 2013. **26**(1): p. 112-20.
59. Gros, R., et al., *Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. 845-52.
60. Chen, J., L.R. Levin, and J. Buck, *Role of soluble adenylyl cyclase in the heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H538-43.
61. Tresguerres, M., L.R. Levin, and J. Buck, *Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase*. Kidney Int, 2011. **79**(12): p. 1277-88.
62. Pidoux, G. and K. Tasken, *Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(5): p. 271-84.
63. Mauro, A., et al., *Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS*. Folia Histochem Cytobiol, 2011. **49**(2): p. 211-8.
64. Di Naro, E., et al., *Umbilical cord morphology and pregnancy outcome*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001. **96**(2): p. 150-157.
65. Kiserud, T., *Physiology of the fetal circulation*. Semin Fetal Neonatal Med, 2005. **10**(6): p. 493-503.
66. Carrascal, E., *Histología Humana II Órganos y Sistemas*. 2001, Salamanca: Librería Cervantes. 233.
67. Gosline, J., et al., *Elastic proteins: biological roles and mechanical properties*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002. **357**(1418): p. 121-32.

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

68. Ferguson, V.L. and R.B. Dodson, *Bioengineering aspects of the umbilical cord*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009. **144 Suppl 1**: p. S108-13.
69. Martinez-Lemus, L.A. and E.L. Galinanes, *Matrix metalloproteinases and small artery remodeling*. Drug Discov Today Dis Models, 2011. **8**(1): p. 21-28.
70. Haugen, G., J. Mellembakken, and S. Stray-Pedersen, *Characterization of the vasodilatory response to serotonin in human umbilical arteries perfused in vitro. The influence of the endothelium*. Early Hum Dev, 1997. **47**(2): p. 185-93.
71. Santos-Silva, A.J., et al., *Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors*. Reprod Sci, 2009. **16**(12): p. 1175-85.
72. Tiritilli, A., *5-hydroxytryptamine induces vasoconstriction of the human umbilical artery: effects of hypoxia and nicorandil*. Gynecol Obstet Invest, 2000. **50**(2): p. 77-83.
73. Cairrao, E., et al., *Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **376**(5): p. 375-83.
74. Santos-Silva, A.J., et al., *PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries*. Eur J Pharmacol, 2008. **582**(1-3): p. 102-9.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Tufan, H., et al., *Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim*. Life Sci, 2003. **72**(12): p. 1321-9.
79. Neves, M.F., et al., *Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension*. Int J Hypertens, 2012. **2012**: p. 187526.
80. Quyyumi, A.A., *Prognostic value of endothelial function*. Am J Cardiol, 2003. **91**(12A): p. 19H-24H.
81. Solomon, C.G. and E.W. Seely, *Hypertension in pregnancy*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011. **40**(4): p. 847-63.
82. Barra, S., et al., *Hypertension in pregnancy: The current state of the art*. Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition), 2012. **31**(6): p. 425-432.
83. Deak, T.M. and J.B. Moskovitz, *Hypertension and pregnancy*. Emerg Med Clin North Am, 2012. **30**(4): p. 903-17.
84. VanWijk, M.J., et al., *Resistance artery smooth muscle function in pregnancy and preeclampsia*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2002. **186**(1): p. 148-154.
85. Habli, M., et al., *Neonatal outcomes in pregnancies with preeclampsia or gestational hypertension and in normotensive pregnancies that delivered at 35, 36, or 37 weeks of gestation*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2007. **197**(4): p. 406.e1-406.e7.
86. Beaufils, M., *[Pregnancy hypertension]*. Nephrol Ther, 2010. **6**(3): p. 200-14.
87. Weiner, C.P., R. Gelfan, and M.L. Socol, *Intrapartum treatment of preeclamptic hypertension by ketanserin—a serotonin receptor antagonist*. Am J Obstet Gynecol, 1984. **149**(5): p. 576-8.
88. Weiner, C.P., M.L. Socol, and N. Vaisrub, *Control of preeclamptic hypertension by ketanserin, a new serotonin receptor antagonist*. Am J Obstet Gynecol, 1984. **149**(5): p. 496-500.

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

89. Bolte, A.C., H.P. van Geijn, and G.A. Dekker, *Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001. **95**(1): p. 12-21.
90. Brew, O. and M.H. Sullivan, *The links between maternal histamine levels and complications of human pregnancy*. J Reprod Immunol, 2006. **72**(1-2): p. 94-107.
91. Roberts, J.M., *Endothelial dysfunction in preeclampsia*. Semin Reprod Endocrinol, 1998. **16**(1): p. 5-15.
92. VanWijk, M.J., et al., *Resistance artery smooth muscle function in pregnancy and preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **186**(1): p. 148-54.
93. 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.
94. Pinterova, M., J. Kunes, and J. Zicha, *Altered neural and vascular mechanisms in hypertension*. Physiol Res, 2011. **60**(3): p. 381-402.
95. Cox, R.H., *Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension*. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(1): p. 13-23.
96. Amberg, G.C. and L.F. Santana, *Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension*. Circ Res, 2003. **93**(10): p. 965-71.
97. Amberg, G.C., et al., *Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca(2+) activated K(+) channels in vascular smooth muscle during hypertension*. J Clin Invest, 2003. **112**(5): p. 717-24.
98. Cox, R.H. and N.J. Rusch, *New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure*. Microcirculation, 2002. **9**(4): p. 243-57.
99. Karadas, B., et al., *Effects of formoterol and BRL 37344 on human umbilical arteries in vitro in normotensive and pre-eclamptic pregnancy*. Vascul Pharmacol, 2007. **46**(5): p. 360-6.
100. Halhali, A., et al., *Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(5): p. 1828-33.
101. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
102. Cairrao, E., et al., *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009. **45**(3-4): p. 175-84.
103. Saldanha, P.A.C.B.d.S., *Efeitos genômicos da di-hidrotestosterona nas células vasculares do músculo liso humano*, 2012, Universidade da Beira Interior. p. 81.
104. Sonkusare, S., et al., *Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications*. Vascul Pharmacol, 2006. **44**(3): p. 131-42.
105. Resnik, E., et al., *Chronic intrauterine pulmonary hypertension selectively modifies pulmonary artery smooth muscle cell gene expression*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(3): p. L426-33.
106. Dumitrascu, R., et al., *Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling*. Circulation, 2006. **113**(2): p. 286-95.
107. Schermuly, R.T., et al., *Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2008. **32**(4): p. 881-91.
108. Ruetten, H., et al., *Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 1999. **85**(6): p. 534-41.
109. Browner, N.C., et al., *Regulation of cGMP-dependent protein kinase expression by soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46631-6.
110. Kloss, S., A. Bouloumie, and A. Mulsch, *Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 1): p. 43-7.

Implicação de diferentes proteínas contráteis na hipertensão na gravidez

111. Oliver, P.M., et al., *Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14730-5.
112. Nakayama, T., et al., *Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 841-5.