

Efeitos de disrupção endócrina dos substitutos do Bisfenol A (Bisfenol F e Bisfenol S) na artéria umbilical humana

Fátima Alexandra Abrantes Soares

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

Orientador: Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira
Co-orientador: Mestre Margarida Ferreira Lorigo

outubro de 2022

Declaração de Integridade

Eu, Fátima Alexandra Abrantes Soares, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11006 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 10 /10 /2022

Fátima Alexandra Abrantes Soares

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a sua realização.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, expresso o meu sentido agradecimento à Professora Doutora Elisa Cairrão por tudo o que me ensinou, pela disponibilidade, por todas as conversas, pelo apoio confiança e simpatia. Obrigada pela oportunidade que me proporcionou em desenvolver este trabalho, com a sua ajuda sinto que cresci muito como profissional, mas também como pessoa.

À Mestre Margarida Lorigo deixo o meu especial agradecimento por toda a disponibilidade, paciência, apredizagem, atenção, simpatia, amizade e bons momentos partilhados. Obrigada por toda a ajuda que sempre me deste e por seres um exemplo no que toca à paixão pela ciência e pela investigação.

À Professora Doutora Cecília Santos e à Professora Doutora Isabel Theriaga agradeço por me terem cedido o Bisfenol A, essencial à realização de uma parte do meu trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, nomeadamente à Mestre Melissa Mariana, Mestre Carolina Mangana e Ana Marques agradeço por todos os momentos de amizade, partilha, entreajuda e boa disposição.

À minha família, em especial aos meus pais, agradeço do fundo do coração por sempre terem acreditado em mim, me apoiarem e incentivarem a seguir os meus sonhos. Obrigada por todo o esforço que sempre fizeram por mim, por todas as oportunidades, por serem um exemplo e por me tornarem no que sou hoje. Quero agradecer com muito carinho à minha avó Ana por ser um exemplo de força, resiliência e bom coração. Agradeço também ao meu primo Zé por todos os momentos de amizade e por toda a ajuda que sempre me deu ao longo de todos estes anos. À minha restante família deixo ainda a minha gratidão por todo o apoio e auxílio que sempre me deram.

Aos meus amigos, em particular, às minhas grandes amigas Adriana, Ana Isabel, Mariana e Sylvie o meu grande agradecimento por ouvirem os meus desabafos, me motivarem e incentivarem quando mais precisei. Obrigada por toda a amizade.

À minha grande amiga Francisca, a minha enorme gratidão, por todos os momentos que partilhámos ao longo destes 5 anos. Obrigada, do fundo do coração, por tudo, toda a ajuda, partilha, amizade e companheirismo. Obrigada por estares comigo sempre que precisei e por me entenderes tão bem.

Por fim, o meu sincero e gigante agradecimento ao meu namorado Bruno por tudo o que fazes por mim, por todo o amor, carinho, compreensão, apoio e confiança. Obrigada por estares sempre presente, por todos os conselhos, pela paciência, motivação e por acreditares mais em mim do que eu própria.

A todos, muito obrigada por tudo!

Resumo

O bisfenol F (BPF) e o bisfenol S (BPS) são dois compostos químicos que nos últimos anos têm vindo a ser utilizados em diversos produtos do quotidiano para substituir o bisfenol A (BPA), pois a exposição a este foi associada ao desenvolvimento de diversas patologias, nomeadamente as cardiovasculares. Contudo, estudos recentes também têm vindo a relacionar também a exposição aos substitutos do BPA com o desenvolvimento de várias doenças, como neurológicas, tiroideias, comportamentais e cardiovasculares. Deste modo, têm vindo a ser levantadas questões quanto à segurança dos substitutos do BPA para a saúde humana. Preocupantemente, alguns estudos referem que os substitutos podem exercer efeitos disruptivos tão ou mais graves que o BPA. No entanto, os estudos existentes ainda são pouco vastos e conclusivos, nomeadamente, ao nível dos efeitos cardiovasculares.

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho foi estudar os efeitos do BPA, BPF e BPS no tónus arterial e analisar quais os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos. Além disso, pretendeu-se perceber se os efeitos provocados pelos substitutos do BPA (BPF e BPS) são mais ou menos adversos do que os causados pelo BPA.

Os resultados deste trabalho parecem demonstrar que o BPA, BPS e BPF exercem efeitos relaxantes rápidos (não genómicos) e independentes de endotélio nas artérias umbilicais humanas (HUAs). Estes efeitos também foram observados para o BPF e BPS a nível celular, isto é, em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs). A nível dos efeitos a longo prazo, os resultados parecem demonstrar que o mecanismo contrátil das HUAs incubadas durante 24 horas com BPA estava alterado, ao contrário do que se verificava nas HUAs incubadas com BPF. Porém, ainda a nível genómico, constatou-se que tanto o BPA como o BPF podem interferir com os principais mecanismos responsáveis pela relaxação das HUAs, interferindo com a via NO/sGC/cGMP/PKG e modulando a atividade dos canais de Ca^{2+} do tipo L (LTCC), sendo que os resultados parecem demonstrar que o BPF altera mais a resposta vasorelaxante do que o BPA. Deste modo, a substituição do BPA pelos seus análogos não parece ser benéfica para a saúde humana cardiovascular. Assim, futuramente, os efeitos vasculares destes bisfenóis devem continuar a ser avaliados de modo clarificar os seus modos de ação e implicações futuras na saúde materno-fetal.

Palavras-chave

Bisfenóis; Disruptores endócrinos; Artéria umbilical humana; Células musculares lisas; Toxicidade vascular.

Abstract

In recent years, the chemical compounds bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) have been used in several everyday products to replace bisphenol A (BPA), since exposure to BPA has been associated with the development of several pathologies, including cardiovascular diseases. However, recent studies have also been associating exposure to BPA substitutes with the development of various pathologies, such as neurological, thyroid, behavioral, and cardiovascular diseases. Therefore, questions have been raised about the safety of BPA substitutes for human health. Worryingly, some studies reported that BPA substitutes may cause disruptive effects as harmful, or even more severe, than BPA. However, the existing literature is still limited and inconclusive, particularly concerning cardiovascular effects.

In this sense, the aim of the present work was to study the effects of BPA, BPF, and BPS on arterial tone and to analyze the possible mechanisms involved in these effects. Furthermore, it was aimed to understand whether the effects caused by BPA substitutes (BPF and BPS) are more, or less, adverse than those caused by BPA.

Our results seem to demonstrate that BPA, BPS, and BPF exert rapid (non-genomic) and endothelium-independent relaxant effects in human umbilical arteries (HUAs). These effects were also observed for BPF and BPS at the cellular level, i.e., in human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMCs). Regarding the long-term effects, the results seem to demonstrate that in HUAs incubated for 24 hours with BPA, the contractile mechanism was altered, in contrast to HUAs incubated with BPF. However, also at the genomic level, it was found that both BPA and BPF can disturb the main mechanisms responsible for the relaxation of HUAs, by interfering with the NO/sGC/cGMP/PKG pathway and modulating the activity of L-type Ca²⁺ channels (LTCC). Moreover, our results seem to demonstrate that BPF alters more the vasorelaxant response than BPA. Therefore, replacing BPA with its analogs does not seem to be beneficial for human cardiovascular health. Thus, in the future, the vascular effects of these bisphenols should continue to be evaluated to clarify their modes of action and future implications for maternal-fetal health.

Keywords

Bisphenols; Endocrine-disrupting chemicals; Human umbilical artery; Smooth muscle cells; Vascular toxicity.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Disruptores endócrinos	1
1.2. Bisfenol A e os seus substitutos	1
1.2.1. Bisfenol F e Bisfenol S – Propriedades Físicas e Químicas.....	2
1.3. Cordão Umbilical Humano (HUC)	3
1.4. Artéria Umbilical Humana (HUA)	5
1.5. Células Musculares Lisas (SMCs)	8
1.6. Regulação da função vascular da HUA	9
1.6.1. Mecanismos de contração das HUASMCs	10
1.6.2. Mecanismos de relaxação das HUASMCs.....	13
1.7. Exposição do ser humano na fase pré-natal	17
1.8. Efeitos dos substitutos do BPA na fase pré-natal	32
1.9. Efeitos da exposição para o sistema cardiovascular	35
1.9.1. Estudos animais <i>in vivo</i>	36
1.9.2. Estudos <i>in vitro</i>	40
1.9.3. Estudos epidemiológicos	42
2. Enquadramento e Objetivos da investigação	46
3. Materiais e métodos	47
3.1. Recolha dos Cordões Umbilicais Humanos (HUC)	47
3.2. Estudos de contratilidade arterial recorrendo à técnica de Banho de Órgãos	47
3.3. Cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMCs)	50
3.4. Estudos de contratilidade celular recorrendo à técnica de <i>Planar Cell Surface Area</i> (PCSA)	51
3.5. Análise estatística	53
3.6. Soluções e Materiais	54
3.6.1. Soluções	54
3.6.2. Químicos.....	55

3.6.3. Materiais.....	55
4. Resultados	57
4.1. Estudos de contratilidade arterial.....	57
4.1.1. Efeitos vasculares diretos dos bisfenóis na contratilidade das HUAs induzida por 5-HT.....	57
4.1.2. Efeitos vasculares diretos dos bisfenóis na contratilidade das HUAs induzida por KCl	58
4.1.3. Efeitos da exposição a longo prazo dos bisfenóis na vasculatura das HUAs	59
4.1.4. Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação das HUAs induzida pelos bisfenóis.....	61
4.1.5. Análise do envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação das HUAs induzida pelos bisfenóis.....	64
4.2. Estudos de contratilidade celular.....	67
4.2.1. Efeitos vasculares diretos dos bisfenóis na contratilidade das HUASMCs induzida por 5-HT.....	67
4.2.2. Efeitos dos bisfenóis na vasculatura das HUAs contraídas por 5-HT	69
4.2.3. Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na relaxação das HUASMCs induzida pelos bisfenóis.....	70
4.2.4. Análise do envolvimento dos canais de cálcio na relaxação das HUASMCs induzida pelos bisfenóis.....	72
5. Discussão	74
6. Conclusão e perspectivas futuras	83
7. Bibliografia	84
8. Apêndices	95

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas do BPA e dos seus substitutos.....	2
Figura 2. Corte transversal do cordão umbilical humano.....	5
Figura 3. Corte transversal da artéria umbilical humana com endotélio	7
Figura 4. Representação esquemática dos principais mecanismos de contração das células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMCs)	13
Figura 5. Representação esquemática dos principais mecanismos de relaxação das células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMCs)	16
Figura 6. Representação esquemática dos vários estadios de vulnerabilidade à disrupção endócrina causada pelos substitutos do BPA.....	32
Figura 7. Tabuleiro utilizado para isolar as HUAs	48
Figura 8. Sistema experimental in vitro de Banho de Órgãos	49
Figura 9. Microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1, Jena, Alemanha) equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade Axio Cam Hsm (Zeiss, Jena, Alemanha) e incorporado com um sistema de incubação.....	53
Figura 10. Efeito do BPA, BPS e BPF (0,002 μM – 100 μM) sobre as artérias umbilicais humanas (HUAs) contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM)	58
Figura 11. Efeito do BPA, BPS e BPF (0,002 μM – 100 μM) sobre as artérias umbilicais humanas (HUAs) contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM)	59
Figura 12. Tensão (expressa em milinewtons, mN) das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM) e contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM)	60
Figura 13. Tensão (expressa em milinewtons, mN) das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM) e contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM)	61
Figura 14. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01 – 100 μM) .	62
Figura 15. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM), contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60	

mM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01 – 100 μ M).	64
Figura 16. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μ M – 20 μ M), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M) e sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina (Nif; 0,01 – 1 μ M).....	65
Figura 17. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μ M – 20 μ M), contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina (Nif; 0,01 – 1 μ M)	67
Figura 18. Perfil temporal de contração induzida por serotonina (5-HT; 1 μ M), seguida de relaxamento induzido pelo BPS e BPF (0 μ M – 20 μ M) em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs).....	68
Figura 19. Efeito do BPS e do BPF (0 μ M – 20 μ M) sobre as células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs) contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M).....	69
Figura 20. Efeito da serotonina (5-HT; 1 μ M) sobre as células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs) incubadas com BPS ou BPF (0 μ M – 20 μ M).....	70
Figura 21. Perfil temporal de contração induzida por serotonina (5-HT; 1 μ M), seguida de relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP; 10 μ M) em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs).....	71
Figura 22. Percentagem (%) de redução da área compensada das células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M) e sujeitas ao nitroprussiato de sódio (SNP; 10 μ M).....	71
Figura 23. Perfil temporal de contração induzida por serotonina (5-HT; 1 μ M), seguida de relaxamento induzido pela nifedipina (Nif; 1 μ M) em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs).....	72
Figura 24. Percentagem (%) de redução da área compensada das células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M) e sujeitas à nifedipina (Nif; 1 μ M)	73

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações e taxas de detecção dos substitutos do BPA em diferentes estudos de exposição pré-natal	22
Tabela 2. Efeitos dos substitutos do BPA no sistema cardiovascular de diversos organismos	43
Tabela 3. Soluções utilizadas ao longo deste trabalho e respectivas composições	54
Tabela 4. Equipamentos e materiais utilizados ao longo do trabalho e respectivas marcas	56

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina
ALP	Fosfatase alcalina (do inglês “alkaline phosphatase”)
ALT	Alanina aminotransferase (do inglês “alanine aminotransferase”)
AST	Aspartato aminotransferase (do inglês “aspartate aminotransferase”)
BHPF	Bisfenol HPF (4-[9-(4-hidroxifenil)fluoren-9-il]fenol)
BK _{Ca}	Canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de alta condutância (do inglês “large-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels”)
BPA	Bisfenol A (4-[2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol)
BPAF	Bisfenol AF (4-[1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol)
BPAP	Bisfenol AP (4-[1-(4-hidroxifenil)-1-feniletil]fenol)
BPB	Bisfenol B (4-[2-(4-hidroxifenil)butan-2-il]fenol)
BPE	Bisfenol E (4-[1-(4-hidroxifenil)etil]fenol)
BPF	Bisfenol F (4-[(4-hidroxifenil)metil]fenol)
BPP	Bisfenol P (4-[2-[4-[2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenil]propan-2-il]fenol)
BPS	Bisfenol S (4-(4-hidroxifenil)sulfonilfenol)
BPZ	Bisfenol Z (4-[1-(4-hydroxyphenyl)cyclohexyl]phenol)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês “bovine serum albumin”)
BW	Peso corporal (do inglês “body weight”);
Ca ²⁺	Cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico 3’5’-adenosina (do inglês “3’-5’-cyclic adenosine monophosphate”)
cGMP	Monofosfato cíclico 3’5’-guanosina (do inglês “3’-5’-cyclic guanosine monophosphate”)
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira
CICS-UBI	Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
CVD	Doenças cardiovasculares (do inglês “cardiovascular diseases”)
Distância SV-BA	Distância entre o <i>sinus venosus</i> e o <i>bulbus arteriosus</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco’s modified Eagle’s medium/F12</i>
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
E2	17β-estradiol
EDCs	Disruptores endócrinos (do inglês “endocrine-disrupting chemicals”)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês “epidermal growth factor”)
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial (do inglês “endothelial nitric oxide synthase”)
Erα	Recetor de estrogénio α (do inglês “estrogen receptor alpha”)
ERβ	Recetor de estrogénio β (do inglês “estrogen receptor beta”)
ESC R1	Células estaminais embrionárias da linha celular R1 (do inglês “embryonic stem cells R1”)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês “fetal bovine serum”)
FGF	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês “fibroblast growth factor”)
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (do inglês “high-density lipoprotein”)

hiPSC-CM	Cardiomiócitos humanos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas (do inglês “human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes”)
His	Histamina
HUAs	Artérias umbilicais humanas (do inglês “human umbilical arteries”)
HUASMCs	Células musculares lisas da artéria umbilical humana (do inglês “human umbilical artery smooth muscle cells”)
HUC	Cordão umbilical humano (do inglês “human umbilical cord”)
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato (do inglês “inositol 1,4,5-trisphosphate”)
K ⁺	Potássio
K _{2P}	Canais de K ⁺ com domínio de dois poros (do inglês “2-pore domain K ⁺ ”)
K _{ATP}	Canais de K ⁺ sensíveis ao ATP (do inglês “ATP-sensitive K ⁺ ”)
KCl	Cloreto de potássio
K _{ir}	Canais de K ⁺ retificadores (do inglês “inward rectifier K ⁺ ”)
K _V	Canais de K ⁺ operados por voltagem (do inglês “voltage-dependent K ⁺ ”)
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês “low density lipoprotein”)
LGA	Idade gestacional maior (do inglês “large gestational age”)
Log K _{ow}	Coefficiente de partição (do inglês “octanol/water partition coefficient”)
LTCC	Canais de Ca ²⁺ do tipo L (do inglês “L-type Ca ²⁺ channels”)
MCC	Meio de cultura completo
Mda	Malondialdeído (do inglês “malondialdehyde”)
MSS	Meio de cultura sem soro
NCX	Bomba de Na ⁺ /Ca ²⁺ (do inglês “Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger”)
Nif	Nifedipina (do inglês “nifedipine”)
NO	Óxido nítrico (do inglês “nitric oxide”)
NP	Péptidos natriuréticos (do inglês “natriuretic peptides”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução fosfato-salino diluído (do inglês “phosphate buffered saline solution”)
PCSA	<i>Planar Cell Surface Area</i>
PDE	Fosfodiesterases (do inglês “phosphodiesterase”)
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PKA	Proteína cinase A (do inglês “protein kinase A”)
PKG	Proteína cinase G (do inglês “protein kinase G”)
PLC	Fosfolipase C (do inglês “phospholipase C”)
PLN	<i>Phospholamban</i>
PMCA	ATPase de Ca ²⁺ da membrana celular (do inglês “plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase”)
PSS	Solução salina fisiológica estéril (do inglês “sterile physiological saline solution”)
PTE	Eficiência de transferência placentária (do inglês “placental transfer efficiency”)
R _{CM}	Razão entre as concentrações no sangue do cordão umbilical e no sangue materno (do inglês “cord–maternal concentration ratio”)
ROCC	Canais de Ca ²⁺ operados por recetores (do inglês “receptor-operated Ca ²⁺ channels”)
R _{PM}	Razão entre as concentrações na placenta e no sangue materno (do inglês “placental–maternal concentration ratio”).
RyR	Recetores de rianodina (do inglês “ryanodine receptors”)
SAA	Solução de antibiótico-antimicótico

SACC	Canais de Ca ²⁺ ativados pelo stress físico (do inglês “stretch-activated Ca ²⁺ channels”)
SERCA	ATPase de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático (do inglês “sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase”)
SGA	Idade gestacional menor (do inglês “small gestational age”)
sGC	Guanil ciclase solúvel (do inglês “soluble guanylyl cyclase”)
SK _{Ca}	Canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de baixa condutância (do inglês “large-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels”)
SM22	<i>Smooth muscle 22</i>
SMCs	Células musculares lisas (do inglês “smooth muscle cells”)
SM-MHC	<i>Smooth muscle myosin heavy chain</i>
SmaA	<i>Smooth muscle α-actin</i>
SNP	Nitroprussiato de sódio (do inglês “sodium nitroprusside”)
SOCC	Canais de Ca ²⁺ operados por depósitos intracelulares (do inglês “store-operated Ca ²⁺ channels”)
STIM	Moléculas de interação estromal (do inglês “stromal interaction molecule”)
T	Testosterona
t _{1/2}	Tempo de meia vida
TBBPA	Tetrabromobisfenol A (2,6-dibromo-4-[2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol)
TBT	Tributil estanho
TG	Triglicéridos
TH	Hormonas tiroideias (do inglês “thyroid hormones”)
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês “very low density lipoprotein”)
VOCC	Canais de Ca ²⁺ operados por voltagem (do inglês “voltage operated Ca ²⁺ channels”)

1. Introdução

1.1. Disruptores endócrinos

Os disruptores endócrinos (EDCs; do inglês “endocrine-disrupting chemicals”) são compostos químicos exógenos naturais ou sintéticos [1], que têm a capacidade de interagir com os diversos constituintes do sistema endócrino e, conseqüentemente, afetar diversos processos biológicos e a homeostasia dos organismos. Isto é, estes compostos conseguem mimetizar as hormonas endógenas e, dessa forma, atuar no sistema endócrino como agonistas ou antagonistas de alguns recetores hormonais, perturbando a produção, libertação, metabolismo, eliminação e/ou mecanismos de ação das hormonas [1-3]. Além disso, os EDCs encontram-se no meio ambiente de forma ubíqua, logo, os seres humanos estão constantemente a ser expostos aos mesmos, por diversas vias, tais como, ingestão, absorção dérmica ou inalação. Assim, a saúde humana pode ser prejudicada pela ação dos EDCs a vários níveis, tais como, cardiovascular, reprodutor, neurológico, imunitário e desenvolvimento [1-10].

1.2. Bisfenol A e os seus substitutos

O bisfenol A (4-[2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol; BPA) é um monómero sintético constituinte de muitos plásticos de policarbonato, resinas epóxi e produtos de consumo, tais como, recipientes de comida, canos de água, brinquedos, garrafas, equipamento médico e eletrónico [9, 11-14]. Este composto é um químico pseudo-persistente que, embora apresente um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pequeno, é considerado um dos EDCs mais presentes no meio ambiente, pois está constantemente a ser libertado para o mesmo [14-16]. Deste modo, este composto já foi detetado em diversas matrizes biológicas humanas e animais, tendo sido associado ao desenvolvimento de diversas patologias, tais como, diabetes, obesidade e problemas cardiovasculares, renais e comportamentais, entre outros [9, 11, 13-18]. Assim, ao longo dos anos, este composto tem sido gradualmente substituído pelos seus análogos, tais como, bisfenol S (4-(4-hidroxifenil)sulfonilfenol; BPS), bisfenol F (4-[(4-hidroxifenil)metil]fenol; BPF), bisfenol AF (4-[1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol; BPAF), bisfenol E (4-[1-(4-hidroxifenil)etil]fenol; BPE), bisfenol B (4-[2-(4-hidroxifenil)butan-2-il]fenol; BPB), bisfenol AP (4-[1-(4-hidroxifenil)-1-feniletil]fenol; BPAP), bisfenol Z (4-[1-(4-hydroxyphenyl)cyclohexyl]phenol; BPZ), bisfenol P (4-[2-[4-[2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenil]propan-2-il]fenol; BPP), bisfenol HPF (4-[9-(4-hidroxifenil)fluoren-9-il]fenol; BHPF) [11, 13, 18-22] (Figura 1). De facto, estes compostos têm sido usados, em larga escala, em diversos objetos do quotidiano, tendo sido detetados em diferentes substratos ambientais, incluindo sedimentos [23], água [22,

24], esgotos [25, 26] e poeiras [19], o que faz com que o ser humano esteja exposto de forma contínua e persistente [11-13, 18, 20, 27-30]. No entanto, uma vez que estes são estruturalmente semelhantes ao BPA, nos últimos anos têm sido levantadas dúvidas quanto à sua segurança para a saúde humana [11, 13, 16, 30].

Deste modo, ao longo dos últimos anos têm sido feitos alguns estudos em modelos animais e em humanos com o objetivo de avaliar quais os efeitos que os substitutos do BPA podem exercer em períodos da vida de maior vulnerabilidade, como é o caso da gravidez e da fase pré-natal [31-37]. Além disso, uma vez que a associação do BPA ao desenvolvimento de algumas patologias, como, por exemplo, as relacionadas com o sistema cardiovascular, já se encontra documentada [9, 14, 38-40], recentemente, têm surgido alguns trabalhos onde é avaliado o impacto dos seus análogos neste sistema [14, 41, 42].

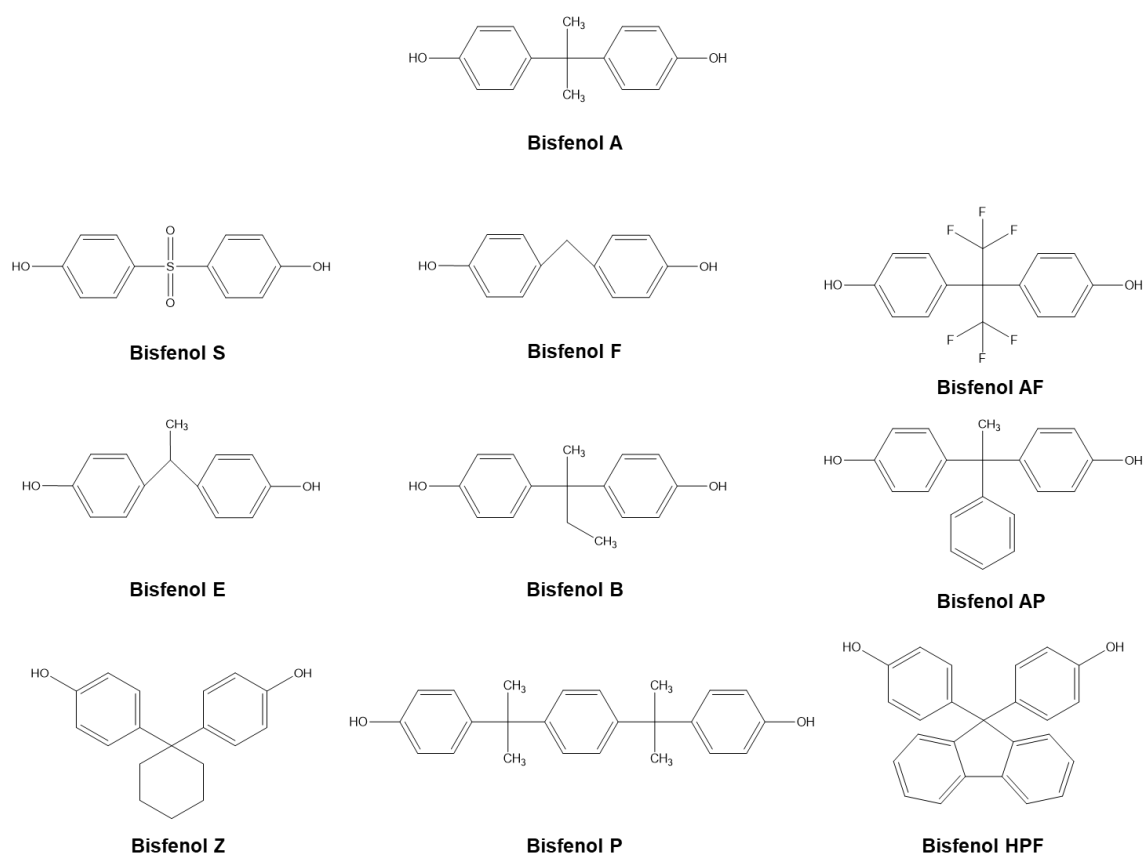


Figura 1. Estruturas químicas do BPA e dos seus substitutos, desenhadas no programa ChemDraw 18.0.

1.2.1. Bisfenol F e Bisfenol S – Propriedades Físicas e Químicas

O BPF (CAS: 920-92-8) é um bisfenol, cuja fórmula molecular é C₁₃H₁₂O₂ e a massa molecular é 200,233 g/cm³. Estruturalmente é constituído por dois anéis fenólicos ligados por um grupo metil [43, 44]. À temperatura ambiente, este é uma substância sólida

crystalina com uma cor branca e com um ponto de fusão de 162,5 °C. O seu coeficiente de partição (Log K_{ow} ; do inglês “octanol/water partition coefficient”), determinado experimentalmente, é igual a 2,91 [45]. Este parâmetro reflete a lipossolubilidade dos compostos, permitindo caracterizar a capacidade que estes têm em migrar, transformar e se distribuir no meio ambiente. Portanto, compostos com valores de K_{ow} mais altos apresentam uma maior hidrofobicidade [30]. Deste modo, o BPF apresenta uma boa solubilidade em solventes orgânicos, tais como, etanol, éter, clorofórmio e DMSO. No entanto, é insolúvel em dissulfeto de carbono [43].

Devido à sua baixa viscosidade e maior resistência aos solventes, quando comparado com o BPA, este substituto tem vindo ser cada vez mais utilizado, nomeadamente, em resinas epóxi [44].

Já o BPS (CAS: 80-09-1) é um bisfenol, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{10}O_4S$ e a massa molecular é 250,270 g/cm³ [30, 43]. Estruturalmente é formado por 2 grupos hidroxifenil conectados por um grupo sulfonil [46]. À temperatura ambiente, este composto é um pó cristalino de cor branca [30, 43]. O BPS possui um ponto de fusão de 240,5 °C [43] e um ponto de ebulição de 505,3 °C [47]. O Log K_{ow} calculado do BPS é de 1,65 [11], sendo que experimentalmente já foi determinado é igual a 1,2 [48]. Este apresenta uma boa solubilidade em etanol e éter e é parcialmente solúvel em benzeno e DMSO. Porém, é insolúvel em água [30, 43]. À temperatura de 15 °C, tem uma densidade de 1.3663 g/cm³ [43].

O BPS possui uma maior acidez que os restantes bisfenóis e é mais estável que o BPA, por isso, tem vindo a ser bastante utilizado, nomeadamente, como intermediário na produção de resinas epóxi e plásticos de policarbonato [11, 30].

Devido às propriedades já referidas, verifica-se que ambos os substitutos do BPA têm maior tendência para permanecerem acumulados em sedimentos – $t_{1/2} = 135$ dias – e no solo – $t_{1/2} = 30$ dias –, do que na água – $t_{1/2} = 15$ dias [11].

1.3. Cordão Umbilical Humano (HUC)

O cordão umbilical humano (HUC; do inglês “human umbilical cord”) é um constituinte da unidade fetoplacentária, assumindo um papel crucial para o crescimento, desenvolvimento, bem-estar e sobrevivência do feto [9, 49-52]. Isto é, esta estrutura permite estabelecer uma conexão entre o embrião em desenvolvimento – feto – e a placenta, possibilitando a troca de nutrientes, metabolitos e gases [9, 50-53]. Além disso, o HUC é importante para o desenvolvimento psicomotor do feto, uma vez que permite que este se consiga movimentar [9, 51, 52, 54]. No entanto, curiosamente, embora o HUC assuma funções tão importantes durante a gestação e determine como começará a vida extrauterina, este órgão morre quando a vida pós-natal começa [9, 49].

Fisiologicamente, o HUC constitui um canal que se desenvolve a partir do saco vitelino e do alantoide [9, 50, 52, 55, 56]. Deste modo, nas fases iniciais da gestação, o HUC é composto por duas veias e duas artérias; porém, na maior parte dos casos, em fases posteriores do desenvolvimento do embrião, a veia umbilical direita atrofia [9, 50-52]. Consequentemente, o HUC adquire a sua conformação tradicional, ou seja, passa a ser composto por duas artérias e uma veia (Figura 2), enroladas em hélice, conferindo-lhe um aspeto helicoidal, que o torna mais resistente à torção, flexão e compressão, sem que os movimentos do feto sejam limitados [52, 54, 57-60]. Porém, por vezes, o HUC pode apresentar algumas anomalias e ser constituído apenas por uma artéria e uma veia, sendo que este facto está muitas vezes associado a complicações para o feto, nomeadamente, a nível vascular [9, 51] e no aumento do risco de desenvolvimento de malformações congénitas e anomalias cromossómicas [53, 61]. A nível estrutural, a veia e as artérias umbilicais são bastante semelhantes; contudo, as paredes das artérias são mais finas e estas possuem um menor calibre (3 mm, em média), sendo, por isso, facilmente distinguidas da veia (calibre médio de 6 mm) [62]. Importa ainda referir que estes vasos sanguíneos diferem estrutural e funcionalmente dos principais vasos do corpo humano [54]. Isto é, relativamente à sua função, as artérias são responsáveis pelo transporte de sangue desoxigenado do feto para a placenta, ao contrário da veia que transporta sangue oxigenado no sentido inverso [9, 50, 51, 53, 63].

Além disso, os vasos umbilicais encontram-se rodeados pela geleia de Wharton – que não apresenta *vasa vasorum* – e, na parte mais exterior, por um epitélio amniótico de camada única [9, 51, 53, 55, 59, 63]. A nível celular, a geleia de Wharton é essencialmente constituída por células derivadas do mesênquima, ou seja, é composta por fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas (SMCs; do inglês “smooth muscle cells”) e células estaminais mesenquimatosas [55, 64, 65]. Assim, esta geleia é constituída por células do tecido conjuntivo dispersas numa matriz porosa (formada por diversas fibras de colagénio organizadas de forma concêntrica em volta dos vasos umbilicais) e uma matriz extracelular hidrofílica – composta por proteoglicanos e ácido hialurónico – que confere uma consistência viscosa e gelatinosa ao HUC [9, 51, 52, 54-56, 65]. Estas estruturas do HUC são importantes para a manutenção da estabilidade mecânica, protegendo os vasos umbilicais de fenómenos de compressão, torsão e rutura [9, 51, 59]. Deste modo, o epitélio amniótico protege os vasos umbilicais das forças tensoras, enquanto a geleia de Wharton está mais envolvida na proteção contra a aglomeração e compressão dos vasos umbilicais – promovida por exemplo, pelos movimentos do feto –, uma vez que permite reduzir a pressão local e diminuir o perigo de oclusão [9, 50-52, 58].

Assim, no final da gestação, o HUC, por norma, possui 1 a 2 cm de diâmetro e, em média, 50 a 60 cm de comprimento e tem um aspeto esbranquiçado e brilhante [49, 50, 53, 64]. No

entanto, por vezes, o seu comprimento pode variar, o que poderá estar associado ao desenvolvimento de algumas complicações para o feto [52]. Isto é cordões mais longos podem estar associados ao aumento do risco da formação de nós, ao prolapso e ao enrolamento em volta do feto [52, 63]. Já a existência de cordões mais curtos pode promover a separação prematura da placenta da parede do útero durante o parto e inibir os movimentos fetais, originando malformações, miopatias, neuropatias [52, 63]. Além disso, existem ainda outros tipos de anomalias associadas ao HUC que podem pôr em risco a saúde e sobrevivência do feto, ao submetê-lo, por exemplo, a situações de hipoxia e anoxia, entre outras [49-51, 52Hayes, 2020 #155Hayes, 2020 #155, 53, 54, 56, 58, 63]. Portanto, para que este seja protegido e se possam diminuir as taxas de morbilidade e mortalidade, deve ser feito um controlo rigoroso de monitorização da gravidez, nomeadamente, ao nível das características do HUC [51, 58].

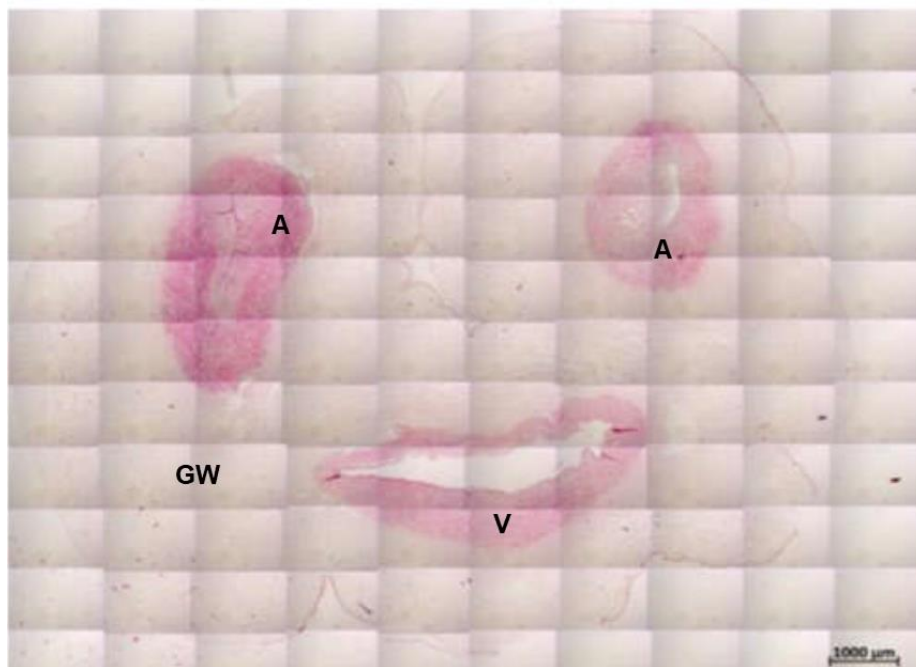


Figura 2. Corte transversal do cordão umbilical humano. Podem ser observadas as duas artérias umbilicais (A), a veia umbilical (V) e a geleia de Wharton (GW). Adaptado de [62].

1.4. Artéria Umbilical Humana (HUA)

As artérias umbilicais humanas (HUAs; do inglês “human umbilical arteries”), devido à facilidade em recolher estas amostras biológicas e às suas características morfológicas e fisiológicas, são frequentemente utilizadas em estudos vasculares humanos [66-69].

Fisiologicamente, a HUA é uma artéria cujo calibre pode variar entre 1 e 10 mm, sendo, por isso, considerada de calibre médio. Além disso, as paredes deste vaso umbilical são essencialmente constituídas por fibras musculares [9, 62]. Por outro lado, a HUA é

composta por três túnicas concêntricas, morfológicamente distintas – túnica íntima, média e adventícia [57, 62, 70, 71].

De facto, a túnica íntima, também denominada de interna, caracteriza-se por ser constituída por uma monocamada de células endoteliais, com morfologia ligeiramente alongada e fina. Isto é, nesta estrutura não é possível observar a presença de uma camada sub-endotelial, nem de lâmina elástica interna adjacente, o que faz com que a HUA apresente uma menor elasticidade, quando comparada com as restantes artérias [54, 71, 72]. Esta túnica contacta diretamente com a camada muscular e com o sangue que circula na HUA, constituindo assim uma barreira entre o tecido e os componentes sanguíneos, o que permite controlar a permeabilidade vascular [72]. As células endoteliais podem detetar alterações hemodinâmicas e estímulos químicos provenientes da corrente sanguínea e transmiti-los às SMCs vasculares [9, 62, 72]. Além disso, o endotélio exerce um importante papel no que diz respeito à regulação do tónus vascular, uma vez que este tem capacidade de libertar moléculas vasorrelaxantes e vasoconstritoras que depois vão atuar nas SMCs vasculares [9, 62, 72, 73].

Quanto à túnica média da HUA, também conhecida por túnica própria, há a destacar algumas diferenças estruturais relativamente às restantes artérias do organismo. Isto é, esta túnica, em vez de ser composta por uma única camada de SMC, é constituída por duas, sendo uma delas mais interna e outra mais externa (Figura 3) [62, 66, 70]. Estas duas camadas celulares apresentam ainda características distintas que fazem com que assumam diferentes papéis nos processos de contração e relaxação vasculares. Isto é, a camada média mais externa encontra-se por dentro dos feixes musculares, é menos definida e revela uma estrutura típica onde as SMCs vasculares se organizam de forma circular [62, 70, 72]. Por oposição, a camada média mais interna encontra-se por fora dos feixes musculares e tem um aspeto mais enrugado [62, 70]. A maioria das SMCs que compõem esta camada dispõem-se linear ou longitudinalmente, relativamente ao eixo da artéria, embora o façam de uma forma dispersa sobre uma matriz amorfa rica em fibras plásticas e pobre em fibras elásticas, o que confere alguma plasticidade à HUA [54, 62, 66]. Portanto, verifica-se que a contração das SMCs da túnica média mais externa e o seu conseqüente rearranjo circular, exerce uma força que permite “empurrar” a substância amorfa da túnica média mais interna para o interior do lúmen da artéria, acabando por ocluí-la. Deste modo, desencadeiam-se contrações localizadas na HUA que podem culminar com o fecho fisiológico da mesma [62, 72]. Assim, percebe-se que esta plasticidade permite que exista uma cooperação entre ambas as camadas, possibilitando a oclusão fisiológica das HUAs no pós-parto e o desenvolvimento de uma resposta eficiente a algumas condições adversas, tais como, lesões vasculares [62, 72].



Figura 3. Corte transversal da artéria umbilical humana com endotélio. Podem ser observadas as duas camadas de células musculares lisas (SMCs), onde a camada mais externa (1) é composta por SMCs organizadas de forma circular e a camada mais interna (2) por SMCs dispostas longitudinalmente umas em relação às outras. Adaptado de [70].

Por fim, verifica-se que as HUAs para além de não possuírem *vasa vasorum*, tal como anteriormente mencionado, são também desprovidas de *nervi vasorum* e de uma típica túnica adventícia (mais externa). Deste modo, é a geleia de Wharton que acaba por exercer as funções comumente associadas a esta túnica [9, 54, 62, 66, 72].

Assim sendo, visto que os vasos umbilicais não são inervados pelo sistema nervoso autónomo, verifica-se que tanto o controlo do tónus vascular como a regulação do fluxo sanguíneo são modulados por mecanismos endócrinos e parácrinos [74-76]. Isto é, a presença na corrente sanguínea ou a libertação local de determinadas substâncias vasoativas – como a serotonina (5-HT), histamina (His), bradicinina, tromboxano, endotelina-1, óxido nítrico (NO; do inglês “nitric oxide”), prostaglandinas, entre outras – e de alguns iões – por exemplo, cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+) – pode regular o fenótipo contrátil das células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMCs; do inglês “human umbilical artery smooth muscle cells”), uma vez que estas moléculas têm propriedades vasoconstritoras ou vasorrelaxantes [68, 70, 77]. Consequentemente, constata-se que estes mecanismos acabam por influenciar a troca de gases e de nutrientes entre a mãe e o feto, através da placenta, podendo afetar o normal crescimento e desenvolvimento fetal, pelo que devem ser devidamente estudados e compreendidos [78, 79].

1.5. Células Musculares Lisas (SMCs)

As SMCs presentes na túnica média dos vasos sanguíneos exercem um papel fundamental na regulação do tônus vascular, uma vez que têm a capacidade de responder a diversos estímulos hormonais e hemodinâmicos [57, 76, 80-83]. De facto, estas células estão envolvidas em diversos processos, tais como, os biossintéticos, proliferativos e contráteis, que são cruciais para o normal funcionamento dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, do sistema cardiovascular [81-83]. Assim, estas células são consideradas a componente estrutural mais importante dos vasos sanguíneos, sendo que alterações nas mesmas estão muitas vezes envolvidas na patogénese de algumas doenças cardiovasculares (CVD; do inglês “cardiovascular diseases”), tais como hipertensão, pré-eclampsia, reestenose, vasospasmo e aterosclerose [62, 83-85].

Considera-se que as SMCs podem ser encontradas nos vasos sanguíneos no fenótipo contrátil ou sintético, podendo assumir alguns estados intermédios entre estes fenótipos, o que resulta na execução de diferentes funções por parte destas células [62, 80, 83]. Isto é, as SMCs no estado diferenciado apresentam-se no fenótipo contrátil, sendo que este é caracterizado por uma baixa taxa de proliferação e elevada expressão de proteínas contráteis e do citoesqueleto – ex. *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC), *smooth muscle 22* (SM22), *smooth muscle α -actin* (SmaA) e *calponin* – que são essenciais para a contração dos vasos sanguíneos e que podem ser considerados marcadores deste tipo de células [57, 62, 81-83]. Além disso, estas células expressam um conjunto de diferentes canais iónicos e de recetores membranares que permitem regular a função contrátil [9, 57]. Morfologicamente, têm um aspeto mais alongado e fusiforme, [62, 85]. Já quando as SMCs entram numa fase de desdiferenciação, passam a apresentar um fenótipo sintético, sendo que este se caracteriza pelo aumento da capacidade proliferativa e migratória, incremento da produção de componentes da matriz extracelular e redução da expressão dos marcadores específicos das SMCs [81, 83, 86]. Além disso, quando apresentam este fenótipo, as SMCs adquirem uma morfologia menos alongada e em forma de paralelepípedo, assemelhando-se às células endoteliais [62, 82, 85]. Este tipo de transição entre fenótipos é definido por “modulação fenotípica” ou “remodelação vascular” [62, 80, 81, 85]. Atualmente sabe-se que existem um conjunto de situações que podem promover este processo de modulação fenotípica nas SMCs. Por exemplo, verificou-se que quando os vasos sanguíneos são expostos a elevadas pressões, tais como, ao estiramento mecânico, são promovidas alterações proteicas e na expressão génica o que, por sua vez, induz a hipertrofia e hiperplasia das SMC, assim como a remodelação vascular, para que seja possível reparar os danos existentes [62, 80, 81, 85]. No entanto, esta elevada plasticidade das SMCs, por vezes, pode vir a tornar-se prejudicial, uma vez que pode predispor as células a responderem a estímulos anormais. Isto é, embora os mecanismos ainda não sejam compreendidos, sabe-

se que as SMCs podem sofrer uma modulação fenotípica adversa que promove a transição do fenótipo contrátil para o sintético e a aquisição de características que, conseqüentemente, contribuem para o desenvolvimento e/ou progressão de algumas patologias vasculares [9, 62, 80-83, 85, 86].

Assim, percebe-se que é importante efetuar estudos em que sejam utilizadas as SMCs, de modo a ser possível compreender os diversos processos de sinalização responsáveis pelo controlo do tónus vascular – ex. metabolismo do Ca^{2+} – e das vias envolvidas na modulação da reatividade vascular, para que seja possível delinear estratégias de prevenção e tratamento de patologias vasculares [57, 70, 84]. Contudo a obtenção de SMCs nem sempre é simples, uma vez que existe alguma dificuldade em obter tecido humano que permita isolar e efetuar cultura destas células [62, 82]. Assim, as HUASMCs presentes nas artérias umbilicais revelam ser uma excelente fonte biológica para efetuar este tipo de estudos, uma vez que, após o parto, o HUC é uma amostra facilmente recolhida sem que haja quaisquer perigos para a saúde materna ou do recém-nascido. Isto é, embora as HUASMCs apresentem algumas diferenças das SMCs das restantes artérias sistémicas, o uso destas células pode ser bastante útil para a compreensão de alguns mecanismos vasculares e, principalmente, para a elucidação dos mecanismos que promovem o desenvolvimento de algumas patologias vasculares durante a gravidez [9, 57, 62, 76, 82].

As HUASMCs são cruciais para o controlo do fluxo sanguíneo fetoplacentar. Assim, nos vasos umbilicais, *in vivo*, estas células estão predominantemente no seu fenótipo contrátil, apresentando-se, por isso, com uma morfologia alongada, tendo um comprimento de 15-200 μm e um diâmetro de 5-8 μm . Há ainda a realçar que, fisiologicamente, por norma, estas células são constituídas por uma maior quantidade de filamentos de actina do que de miosina, o que permite formar as unidades contráteis. O deslizamento, em direções opostas, dos filamentos de actina livres sobre filamentos de miosina adjacentes – durante o ciclo *cross-bridge* – permite criar a força mecânica necessária para que a contração destas células possa ocorrer [62]. Contudo, a cultura de HUASMCs nem sempre é simples, pelo que devem ser tomadas algumas medidas de prevenção que evitem contaminações com células estromais da geleia de Wharton, células endoteliais e/ou fibroblatos, devendo tentar isolar-se a túnica média o melhor possível, por exemplo [57, 62, 82].

1.6. Regulação da função vascular da HUA

Os vasos umbilicais não são inervados pelo sistema nervoso autónomo, o que faz com que o fenótipo das HUASMCs e, conseqüentemente, a regulação da função vascular da HUA sejam controlados por várias substâncias vasoativas de origem endócrina ou parácrina e por estímulos físicos, tal como anteriormente referido [62, 70, 87]. Portanto, torna-se essencial compreender quais os mecanismos que estão envolvidos na regulação da circulação feto-

placentária, de modo a, posteriormente, ser possível clarificar quais os processos patológicos associados a algumas CVD [62, 70, 86]. Isto é, é importante perceber, em situações fisiológicas normais, como operam os mecanismos que promovem a contração e relaxação das HUASMCs, para que, em condições patológicas, seja possível determinar as alterações e tentar corrigi-las.

1.6.1. Mecanismos de contração das HUASMCs

Existem várias substâncias vasoativas libertadas localmente ou presentes na circulação fetoplacentária que têm a capacidade de regular o tônus vascular das HUAs. Isto é, já foram realizadas diversas investigações que comprovaram que algumas destas substâncias têm a capacidade de promover a vasoconstrição das HUAs, tais como, a endotelina-1, bradicidina, 5-HT, His, tromboxano, prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e cloreto de potássio (KCl) [62, 70] (ver Figura 4). No entanto, Quan e os seus colaboradores, verificaram que tanto a noradrenalina, como a angiotensina II não têm capacidade de regular o tônus vascular das HUAs [87].

As células endoteliais têm a capacidade de libertar moléculas vasoativas que, ao atuarem sobre as SMCs, podem modular o tônus vascular, tal como previamente referido. Deste modo, verifica-se que a endotelina-1 é uma destas moléculas, sendo que quando atua sobre os recetores de endotelina (ET_A e ET_B) presentes nas SMCs, a vasoconstrição é promovida [62, 70, 88-92]. Isto é, estes recetores parecem estar acoplados a proteínas G_q , portanto, quando são ativados, a atividade da enzima fosfolipase C (PLC; do inglês “phospholipase C”) é estimulada o que, conseqüentemente, promove o aumento dos níveis inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3 ; do inglês “inositol 1,4,5-trisphosphate”), que ao ativarem o seu recetor, promovem a saída de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, culminando com a contração do músculo liso vascular [62, 70, 93]. Além disso, a bradicinina também é considerada como um agente vasoativo relacionado com o endotélio, sendo que esta tem a capacidade de estimular a contração das HUASMCs ao ativar os seus recetores B_2 , que por sua vez, estão também acoplados a proteínas G_q , promovendo o aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} [62, 70, 94]. No entanto, também foi possível constatar que a bradicinina parece promover a ativação dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCC; do inglês “voltage operated Ca^{2+} channels”) e da bomba de Na^+/Ca^{2+} (NCX; do inglês “ Na^+/Ca^{2+} exchanger”) e a inativação dos canais de K^+ , culminando com o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , o que permite que a contração ocorra [62, 70, 94].

Outro agente vasoativo com extrema importância para a regulação do tônus vascular das HUAs é a 5-HT, sendo que, atualmente, sabe-se que esta está incumbida de promover o encerramento fisiológico das HUAs, após o parto [87]. No que diz respeito às HUA sem endotélio, vários estudos já comprovaram que a capacidade contráctil da 5-HT está

diretamente relacionada com a ativação dos recetores específicos 5-HT_{2A} e 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}, localizados nas HUASMCs [74, 78, 95-98]. Isto é, por um lado, o recetor 5-HT_{2A} que está acoplado a uma proteína G_q, quando ativado, promove a ativação da PLC e, conseqüentemente, o aumento dos níveis de IP₃ e, posteriormente, de Ca²⁺ intracelulares. Por outro lado, os recetores 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} que estão acoplados às proteínas G_{i/o}, ao serem ativados, permitem que a atividade da enzima adenil ciclase seja diminuída, reduzindo os níveis intracelulares de monofosfato cíclico 3'5'-adenosina (cAMP; do inglês "3'-5'-cyclic adenosine monophosphate") e aumentando os níveis de Ca²⁺ intracelulares. Em ambas as situações, o aumento da concentração intracelular deste íão permite que a contração seja desencadeada [74, 78, 95-98]. No entanto, em 2009, Santos-Silva et al. descobriram que nas HUAs também se pode encontrar o recetor 5-HT₇ [74]. Porém, a ativação do mesmo induz um efeito vasorrelaxante fraco, visto que se veio a descobrir que este está acoplado a uma proteína G_s, promovendo assim a estimulação da atividade enzimática da adenil ciclase com conseqüente diminuição e aumento das concentrações intracelulares de cAMP e de Ca²⁺, respetivamente [62, 70].

Já no que diz respeito à His, verifica-se que a sua capacidade contrátil está intimamente relacionada com a ativação dos recetores H₁ – presentes nas HUASMCs – que ao estarem acoplados a proteínas G_q, estimulam a ativação da cascata de sinalização PLC/IP₃ previamente descrita. Porém, é importante também referir que, tal como acontece para a 5-HT, a His pode promover a vasorrelaxação ao ativar os seus recetores H₂ e H₃ – existentes nas HUASMCs – que estão acoplados a proteínas G_s [74, 78, 79, 96-98]. Deste modo, é possível concluir que os efeitos provocados por ambos os agentes contrácteis dependem do balanço final de ativação dos diversos recetores e vias de sinalização associadas [62].

Relativamente aos agentes contrácteis tromboxano e PGF_{2α}, apenas se sabe que os seus efeitos estão relacionados com a ativação dos recetores TPα e TPβ e dos recetores FPA e FPB, respetivamente. A ativação de todos estes recetores promove a posterior ativação da cascata de sinalização PLC/IP₃, uma vez que estes estão acoplados também a proteínas G_q [62, 99].

No que concerne o KCl, observou-se que o efeito contráctil despoletado por este agente se relaciona, essencialmente, com a abertura dos VOCC permitindo que o influxo de Ca²⁺ ocorra [62, 70, 100]. No entanto, verifica-se que este efeito pode ser parcialmente inibido devido à ação de antagonistas específicos dos canais de Ca²⁺ do tipo L (LTCC; do inglês "L-type Ca²⁺ channels"), tais como, a nifedipina (Nif; do inglês "nifedipine") [70].

Assim sendo, fica explícito que para que se possa dar o início da contração das HUASMCs é essencial que ocorra um aumento da concentração intracelular de Ca²⁺. Para tal, as SMCs expressam nas suas membranas um conjunto de canais iónicos que controlam o potencial de membrana, permitem que o influxo de Ca²⁺ ocorra e, conseqüentemente, a contratilidade

destas células seja regulada [70, 101-103]. Estes canais iônicos podem ser essencialmente divididos em 2 grupos – VOCC e canais de Ca^{2+} independentes de voltagem. O primeiro grupo de canais iônicos inclui os canais de Ca^{2+} do tipo L, T e P/Q, ao contrário do segundo grupo que é composto pelos canais de Ca^{2+} operados por recetores (ROCC; do inglês “receptor-operated Ca^{2+} channels”), canais de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares (SOCC; do inglês “store-operated Ca^{2+} channels”) e canais de Ca^{2+} ativados pelo stress físico (SACC; do inglês “stretch-activated Ca^{2+} channels”) [62, 70, 102]. De um modo geral, verifica-se que os VOCC do tipo L, nomeadamente o subtipo $\text{Ca}_v1.2$, presentes na HUA, exercem um papel fundamental na regulação do tónus vascular, ao contrário dos VOCC do tipo T cuja função está mais relacionada com a regulação da proliferação das SMCs, não parecendo exercer um papel importante na contratilidade das HUAs [62, 79, 101-103]. Relativamente aos VOCC do tipo P/Q, ainda é necessário realizar estudos que clarifiquem o papel destes canais na regulação do tónus vascular [62]. Quanto ao segundo grupo de canais iônicos previamente referido, pensa-se que os canais ROCC e SOCC estão, de facto, presentes nas HUAs. Contudo, quanto aos SACC ainda não há evidências da sua presença nestes vasos umbilicais. Deste modo, é necessário continuar a efetuar mais estudos que permitam clarificar quais as vias de sinalização relacionadas com os diversos canais iônicos envolvidos na regulação do tónus vascular da HUA [62].

inglês “sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase”) – e/ou para o meio extracelular, através da ATPase de Ca^{2+} da membrana celular (PMCA; do inglês “plasma membrane Ca^{2+} -ATPase”) e da NCX [70, 84, 105-107]. No entanto, curiosamente, Rebolledo et al., descobriram que, nas HUAs, a NCX funciona no modo reverso, ao contrário do que acontece noutros vasos sanguíneos do organismo, ou seja, este transportador membranar, nestas artérias, promove o influxo de Ca^{2+} , não favorecendo a relaxação [108]. Além das proteínas já referidas, observou-se ainda que outras proteínas localizadas no retículo sarcoplasmático – ex. moléculas de interação estromal (STIM; do inglês “stromal interaction molecule”) – e outros canais presentes na membrana plasmática, tais como, os canais Orai, têm uma importante função no mecanismo de relaxação vascular, sendo que a sua presença já foi identificada nas HUAs [62, 109, 110].

Por outro lado, tal como referido anteriormente, a relaxação do músculo liso vascular pode ser promovida por diversos compostos exógenos e endógenos. Por norma, estes compostos atuam bloqueando a ativação dos recetores envolvidos nos mecanismos contrácteis, inibindo a síntese de agonistas do processo contráctil e fechando canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática [104]. Além disso, constatou-se que estes compostos podem ser agonistas com capacidade de ativar determinados recetores e, conseqüentemente, gerar mensageiros intracelulares secundários, tais como, os nucleótidos cíclicos – cAMP e monofosfato cíclico 3’5’-guanosina (cGMP; do inglês “3’-5’-cyclic guanosine monophosphate”) – que, por sua vez, podem ativar cascatas moleculares que culminam com a relaxação arterial [104, 111]. Deste modo, verificou-se que o aumento dos níveis intracelulares de cAMP está diretamente relacionado com a ativação de recetores acoplados a proteínas G_s ou com a inibição de recetores acoplados a proteínas $G_{i/o}$. Pelo contrário, o incremento das concentrações intracelulares de cGMP deve-se à ação de agentes vasodilatadores endógenos, como o NO. O aumento dos níveis de cAMP e cGMP permite que a proteína cinase A (PKA; do inglês “protein kinase A”) e proteína cinase G (PKG; do inglês “protein kinase G”) sejam ativadas, respetivamente. Em ambas as situações, verifica-se uma diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} e redução da sensibilidade dos miofilamentos das SMCs a este íão, resultando na relaxação destas células. Este processo já foi observado nas HUAs, mesmo quando estas se encontram desprovidas de endotélio, sendo que atualmente se considera que a regulação das concentrações destes nucleótidos cíclicos é um dos principais mecanismos responsáveis pela vasorrelaxação destes vasos umbilicais [70, 84, 96, 112]. Neste sentido, é ainda importante referir que o NO pode ser sintetizado, a partir do aminoácido L-arginina, nas células endoteliais da HUA, visto que estas expressam a enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS; do inglês “endothelial nitric oxide synthase”). Assim, este NO poderá atuar nas SMCs, nomeadamente, sobre a enzima guanil ciclase solúvel (sGC; do inglês “soluble guanylyl cyclase”), aumentando as

concentrações de cGMP e, conseqüentemente, ativando a cascata de sinalização que culmina com o vasorrelaxamento [84, 112-115]. Portanto, percebe-se que o endotélio vascular também parece exercer um papel fundamental no processo de relaxação da HUA [91, 96, 112, 113]. Além disso, os níveis intracelulares destes nucleótidos cíclicos também podem ser aumentados quando as enzimas responsáveis pela sua hidrólise – fosfodiesterases (PDE; do inglês “phosphodiesterase”) – são inibidas [70, 84]. De facto, em 2008, foi efetuado um estudo onde se pode comprovar, nas HUAs, a existência de quatro famílias de PDE – PDE1, PDE3, PDE4 e PDE5, tendo sido ainda demonstrado que a PDE4 é a enzima responsável pela regulação do relaxamento dependente de cAMP, ao invés da PDE5 que modula o processo de relaxação associado ao cGMP [96].

Para além dos mecanismos e respetivos componentes já mencionados, importa ainda salientar a relevância dos canais de K^+ no que diz respeito à regulação do tónus vascular das HUAs. De um modo geral, verifica-se que estes são os canais iónicos mais abundantes nas SMC, assumindo assim um papel fundamental na regulação do potencial de membrana [77, 116]. De facto, estes canais têm a capacidade de controlar direta e indiretamente as concentrações de K^+ e Ca^{2+} , respetivamente [76]. Isto é, a ativação dos canais de K^+ presentes nas SMCs vasculares promove a hiperpolarização da membrana plasmática, o que induz o fecho dos canais VOCC e, conseqüentemente, reduz a concentração intracelular de Ca^{2+} , permitindo que o vasorrelaxamento possa ocorrer [76, 77, 116, 117]. A atividade destes canais, nas SMCs, pode ser modulada por vários componentes fisiológicos, nomeadamente, pelas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , pelos nucleótidos cíclicos e também por diversas substâncias vasoativas, como, por exemplo, o NO, os péptidos natriuréticos (NP; do inglês “natriuretic peptides”) e as prostaciclina [76, 118]. Nas HUASMCs, já foi reportada a presença de alguns tipos de canais de K^+ : canais de K^+ operados por voltagem (K_V ; do inglês “voltage-dependent K^+ ”), canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca} ; do inglês “large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels”), canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância (SK_{Ca} ; do inglês “small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels”), canais de K^+ retificadores (K_{ir} ; do inglês “inward rectifier K^+ ”), canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP} ; do inglês “ATP-sensitive K^+ ”) e os canais de K^+ com domínio de dois poros (K_{2P} ; do inglês “2-pore domain K^+ ”) [76]. Atualmente, sabe-se que estes canais estão muito envolvidos nos processos de vasorrelaxação das HUAs. De facto, os canais K_V estão envolvidos na regulação do potencial de membrana, após esta ser despolarizada. Pelo contrário, os canais BK_{Ca} respondem a alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelulares, com o objetivo de também regular o potencial membranar [76-78, 119]. Por fim, importa acrescentar que devem continuar a ser feitos mais estudos que permitam clarificar o papel dos diversos canais de K^+ nas HUAs, visto que a informação disponível não é suficiente para compreender todos os mecanismos relacionados com os processos de vasorrelaxação. Além disso, pensa-se que estes canais

podem apresentar alterações em algumas doenças vasculares, nomeadamente, as doenças relacionadas com a gravidez. Assim, o estudo dos canais de K^+ nas HUAs torna-se ainda mais imperativo, visto que poderá constituir um alvo terapêutico para estas patologias [76].

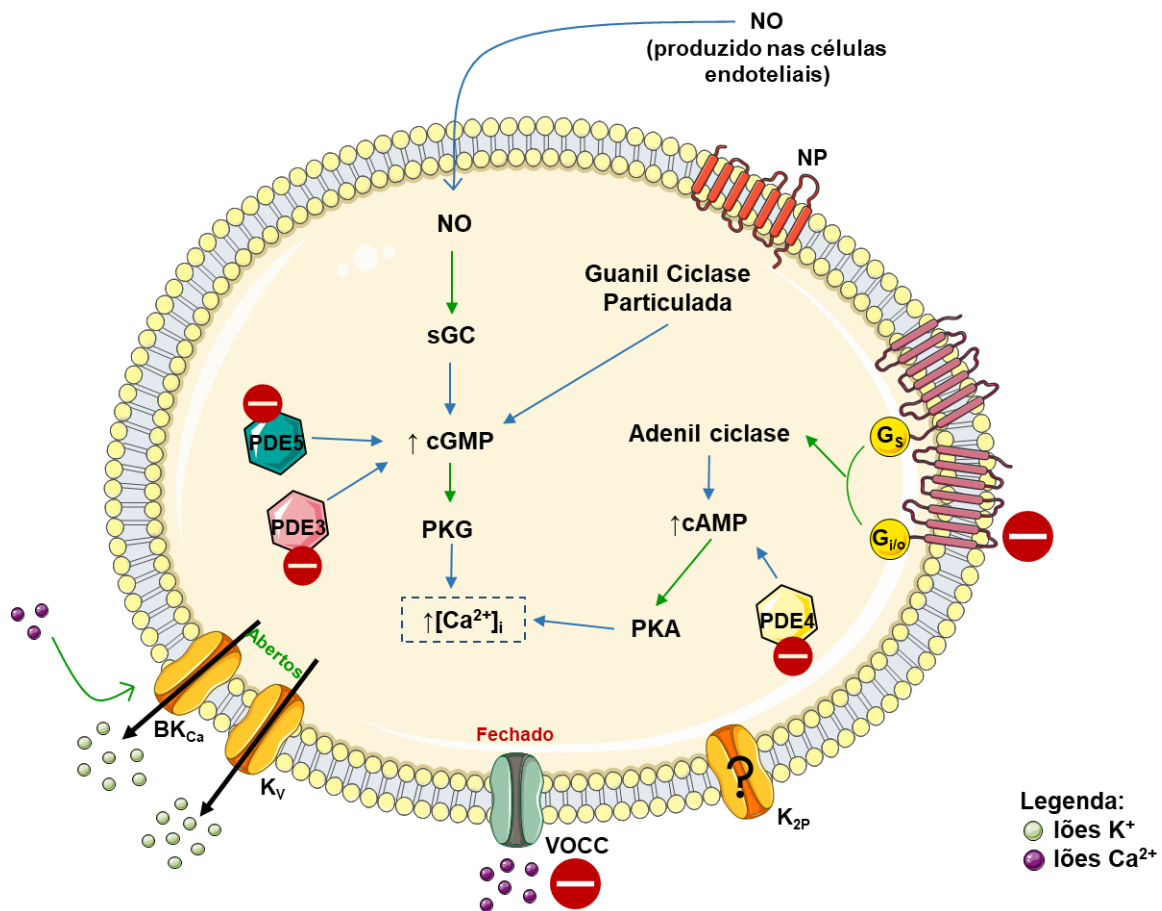


Figura 5. Representação esquemática dos principais mecanismos de relaxação das células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMCs). NO: óxido nítrico (do inglês “nitric oxide”); NP: péptidos natriuréticos (do inglês “natriuretic peptides”); BK_{Ca} : canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância (do inglês “large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels”); K_v : canais de K^+ operados por voltagem (do inglês “voltage-dependent K^+ ”); K_{2P} : canais de K^+ com domínio de dois poros (do inglês “2-pore domain K^+ ”); VOCC: canais de Ca^{2+} operados por voltagem (do inglês “voltage operated Ca^{2+} channels”); sGC: guanil ciclase solúvel (do inglês “soluble guanylyl cyclase”); cGMP: monofosfato cíclico 3’5’-guanosina (do inglês “3’-5’-cyclic guanosine monophosphate”); cAMP: monofosfato cíclico 3’5’-adenosina (do inglês “3’-5’-cyclic adenosine monophosphate”); PKG: proteína cinase G (do inglês “protein kinase G”); PKA: proteína cinase A (do inglês “protein kinase A”); $[Ca^{2+}]_i$: concentração intracelular do íon Ca^{2+} ; PDE: fosfodiesterases (do inglês “phosphodiesterase”); Setas verdes: ativação; Setas vermelhas: inibição. A figura foi criada no PowerPoint v.2204 usando figuras do Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier, licenciadas sob “Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)”. Adaptado de [70].

1.7. Exposição do ser humano na fase pré-natal

A exposição aos EDCs é uma questão bastante preocupante nas sociedades atuais, principalmente nas primeiras fases do desenvolvimento, como a gravidez e o período pré-natal, em que os indivíduos podem estar mais suscetíveis aos seus efeitos [4, 5, 9, 120-124]. Isto é, durante a gravidez, as mulheres sofrem um conjunto de alterações fisiológicas, metabólicas, endócrinas, reprodutoras e imunitárias, que as tornam mais sensíveis à ação destes compostos químicos [9, 123]. Porém, de acordo com a teoria *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), o feto em desenvolvimento também pode ser afetado, uma vez que alguns EDCs que se encontram na circulação materna têm a capacidade de atravessar a placenta e bioacumular-se, podendo comprometer vários processos metabólicos e fisiológicos e, conseqüentemente, aumentar o risco de desenvolvimento de patologias durante o período pós-natal e posteriormente na vida adulta [1, 2, 4, 5, 9, 10, 125-127]. Esta exposição aos EDCs durante a gravidez é definida como exposição pré-natal, sendo que pode ser subdividida em exposição materna e exposição fetal [9, 128].

Vários estudos já comprovaram que o BPA pode causar graves problemas para a saúde humana, e por isso este composto tem sido substituído pelos seus análogos/substitutos [11, 15, 16, 37, 129]. Portanto, é importante avaliar se a exposição humana a estes substitutos será mais segura do que a exposição ao BPA [32], nomeadamente, nos períodos de maior vulnerabilidade como acontece na fase pré-natal [34, 35, 37].

Os substitutos do BPA – BPS, BPF, BPAF, BPB, BPAP, BPZ, BPP e BPE – e o derivado do BPS (BPSIP) já foram encontrados em diversas amostras biológicas, nomeadamente, no sangue materno [37, 130-132], sangue do cordão umbilical [37, 130-133], urina materna [34-36, 129, 132-142], placenta [37] e fluído amniótico [132] (ver Tabela 1). Além disso, a concentração destes compostos químicos nas várias amostras biológicas foi determinada em diversos países, tais como, na China [34, 36, 37, 129, 130, 132], República Checa [131], Estados Unidos da América [133], Canadá [135], Israel [136], Holanda [138] e Coreia do Sul [142].

Em 2017, Liu e os seus colaboradores publicaram um trabalho em que eram analisadas as frequências de deteção de três substitutos do BPA (BPS, BPAF, BPB) em amostras de sangue materno e de sangue do cordão umbilical de 61 mulheres grávidas chinesas [130]. Contudo, neste estudo, apenas foi possível detetar, em ambas as amostras biológicas, mas com uma baixa frequência, o BPS conjugado. Assim, segundo os autores, estes dados sugerem, pela primeira vez, que existe uma transferência materno-fetal do BPS, através da placenta [130]. Em 2018, Kolatorova et al. examinaram amostras de sangue materno de 27 mulheres checas, recolhidas na 37^a semana de gravidez, e amostras de sangue do cordão umbilical recolhidas após o parto [131]. Os investigadores observaram que no plasma materno apenas foi possível detetar BPS e BPF não conjugados numa amostra e no plasma do cordão

umbilical só foi identificada uma amostra com BPF. Assim, fica evidenciado que tal como acontece com o BPS [130], para o BPF também existe uma transferência materno-fetal [131]. Ainda em 2018, Ihde et al. avaliaram a presença de BPS, BPF, BPB e BPAF em amostras de urina materna e de sangue do cordão umbilical de 30 mulheres norte americanas [133]. Estes autores verificaram que nas amostras de urina materna os substitutos BPAF, BPB e BPS eram os mais predominantes e que nas amostras de sangue do cordão umbilical os compostos mais prevalentes eram o BPAF e BPF. Deste modo, demonstraram que o BPAF e o BPB – ainda que em menor proporção – também são transferidos da mãe para o feto em desenvolvimento durante a gravidez. Contudo, tal como se observou no estudo de Kolatorova et al., o BPS não foi detetado em amostras de sangue do cordão umbilical [133]. Além disso, em 2018 e 2019, foram feitos vários estudos com o objetivo de detetar a presença dos substitutos do BPA, ao longo dos vários períodos da gravidez, em amostras de urina materna provenientes de mulheres que habitam em países muito variados, tais como, Canadá [135], Israel [136], Holanda [138], China [34-36, 129, 141], Estados Unidos da América [134, 137, 140], Porto Rico [139] e Coreia do Sul [142]. De um modo geral, no conjunto destes trabalhos, verificou-se a presença de BPS [34-36, 129, 134-141], BPF [36, 129, 135, 136, 138, 139, 141, 142] e BPAF [129, 135] em todos os trimestres da gravidez, e de BPZ, BPB e BPAP [138] no primeiro trimestre (ver Tabela 1). Assim, fica mais uma vez evidenciada a exposição materna durante a gravidez a estes EDCs. É importante realçar que no estudo efetuado por Wan et al. se observou que as concentrações de BPS determinadas em amostras de mulheres grávidas de meninas são superiores às das mulheres grávidas de meninos [34]. Esta tendência pode estar relacionada com uma hipótese que refere que os EDCs ao interferirem com as hormonas maternas durante o período de conceção podem conseguir modificar a razão entre sexos [34, 143]. Além disso, é de notar que nos estudos efetuados por Hu et al. e Huang et al. as concentrações de BPS na urina materna vão aumentando ligeiramente ao longo dos 3 trimestres, o que pode estar associado a uma maior exposição e bioacumulação e, conseqüentemente, a um maior risco de disrupção endócrina [35, 141]. Pelo contrário, no estudo efetuado por Li et al. não foram observadas alterações significativas nas concentrações de BPS e BPF presentes na urina materna, ao longo dos vários trimestres [36]. Contudo, os autores não conseguiram apresentar nenhuma justificação para esta constatação, tendo apenas sugerido que em estudos futuros se façam várias medições, ao longo do tempo de gestação, de modo a ser possível reduzir a probabilidade de erro [36]. É ainda importante referir que no estudo realizado por Liu et al., três meses após o parto, ainda foi possível detetar BPS na urina materna – 0,17 ng/mL; 0,20 µg/g creatinina [135]. Além disso, num estudo efetuado em 20 mulheres chinesas, foi possível detetar BPF (taxa de deteção = 60%; concentrações observadas entre 0,010 e 0,166 µg/L), BPAF (taxa de deteção = 15%; concentrações detetadas entre 0,021 e 0,052 µg/L) e

BPS (taxa de detecção = 5%; concentrações de 0, e 0,683 µg/L) no leite materno [144]. Deste modo, é possível que os efeitos provocados pelos substitutos do BPA se continuem a manifestar no período pós-natal. Ademais, que saibamos, não existe nenhuma literatura em que se comprove que os níveis dos EDCs, após a gravidez, voltam para os valores normais. Portanto, os efeitos causados por estes compostos podem ser ainda mais preocupantes, tanto para a saúde materna como fetal, uma vez que se podem continuar a manifestar nas fases de vida seguintes.

Em 2020, Pan et al. investigaram a ocorrência e distribuição dos bisfenóis (alguns substitutos do BPA e de um derivado do BPS (BPSIP)) na unidade materno-fetal-placentária [37]. Para tal, foram recolhidas, em 60 mulheres grávidas chinesas, amostras de sangue materno, sangue do cordão umbilical e de placenta, tendo sido recolhida sempre a mesma zona da placenta. De um modo geral, ficou evidenciado que existe transferência de BPS na forma livre, BPAF, BPE, BPAP e BPSIP da mãe para o feto em desenvolvimento, uma vez que estes compostos foram identificados nas amostras biológicas recolhidas. No entanto, o BPF apenas foi detetado em amostras de plasma materno e de placenta, o que pode estar relacionado com uma maior taxa de excreção deste composto e consequente menor transferência para o feto [37]. Além disso, neste estudo foram calculadas a eficiência de transferência placentária (PTE; do inglês “placental transfer efficiency”) e as razões entre as concentrações dos substitutos no sangue do cordão umbilical e no sangue materno (R_{CM} ; do inglês “cord–maternal concentration ratio”) e entre as concentrações dos substitutos na placenta e no sangue materno (R_{PM} ; do inglês “placental–maternal concentration ratio”). Assim, os investigadores concluíram que o BPAF tem maior tendência para se acumular no sangue do cordão umbilical e, consequentemente, no feto (R_{CM} médio=6,3; R_{PM} médio=2,2; PTE>100%). Pelo contrário, o BPSIP (R_{CM} médio=0,059; R_{PM} médio=0,20; PTE<100%) e o BPE (R_{CM} médio=0,82; R_{PM} médio=0,89; PTE<100%) têm maior tendência a se acumular no sangue materno havendo, por isso, uma menor probabilidade de transferência para o feto, embora esta ainda seja possível de ocorrer. Já o BPS é o composto que tem maior tendência para ficar retido na placenta (R_{CM} médio=0,67; R_{PM} médio=3,3; PTE<100%) [37]. Por fim, ainda em 2020, Zhang e os seus colaboradores analisaram, pela primeira vez, amostras de soro materno, urina materna, soro do cordão umbilical e fluído amniótico de 106 mulheres chinesas que vivem em locais onde a reciclagem de aparelhos eletrónicos é abundante [132]. Neste estudo foi possível detetar a presença de BPP, BPS, BPAF, BPAP em todas as amostras biológicas. Portanto, fica uma vez mais demonstrado que as mulheres que vivem nestes locais estão expostas a estes EDCs, tal como acontece com os seus filhos, devido à transferência materno-fetal destes substitutos. Além disso, nos casos em que foi possível detetar o substituto no par mãe-feto em simultâneo, os investigadores determinaram a R_{CM} para o BPAF e BPS. Assim, tal como aconteceu no estudo

anteriormente descrito [37], verificou-se que o BPAF (R_{CM} mediano=3,26 para 22 pares) possui uma elevada PTE, enquanto o BPS (R_{CM} mediano=1,11 para 11 pares) apresenta uma PTE menor [132].

No mesmo sentido, em 2019, Grandin et al. efetuaram um estudo com o objetivo de avaliar a transferência placentária do BPS e do seu derivado, BPSG, no sentido materno-fetal e no sentido inverso [145]. Para tal, recorreram ao uso de modelos placentários humanos perfundidos. De um modo geral, constatou-se que o BPS parece conseguir ser transferido em ambos os sentidos, através da placenta, embora a transferência no sentido feto-mãe seja menos pronunciada. Já no caso do BPSG, embora este composto tenha sido detetado nos compartimentos fetais, os resultados obtidos evidenciam que a transferência no sentido materno-fetal é quase inexistente. Este resultado é concordante com um estudo efetuado por estes investigadores em ovelhas [33]. Portanto, pensa-se que a deteção do BPSG nos compartimentos fetais está associada à metabolização do BPS por parte dos fetos. Já no sentido feto-mãe foi possível observar a transferência do BPSG, embora de forma lenta. Assim, fica evidenciado que neste modelo placentário, pelo menos no final da gestação, o BPS e o seu principal metabolito podem ser transferidos entre os dois compartimentos, expondo o feto aos efeitos deste EDC [145].

Finalmente, importa também referir que foram efetuados alguns estudos com o objetivo de perceber se existem fatores associados ao estilo de vida das mães que podem influenciar as concentrações destes compostos nas amostras biológicas [36, 37, 135, 138]. Por exemplo, verificou-se que as mulheres com um elevado índice de massa corporal pré-gravidez [37, 138] e/ou com défice de ácido fólico apresentam concentrações de bisfenóis na urina mais elevadas [138]. O ácido fólico (vitamina B9) é uma molécula dadora de grupos metil, sendo, por isso, importante na prevenção de alterações epigenéticas. Assim, o défice desta vitamina durante o primeiro trimestre pode ter impactos muito preocupantes, uma vez que nesta fase da gravidez a ocorrência destas alterações é comum [9, 138]. Além disso, é importante referir que, tal como anteriormente discutido, nos modelos animais, se pensa que os substitutos do BPA podem estar associados ao desenvolvimento de alterações epigenéticas. Julga-se ainda que estas modificações, por sua vez, se relacionam diretamente com a transmissão, às gerações seguintes, dos efeitos causados por estes compostos [6, 146, 147]. Deste modo, em estudos futuros, será importante avaliar se no ser humano a exposição a estes EDCs também pode promover o desenvolvimento destas alterações, que associadas a défices nutricionais acarretam uma preocupação ainda maior. Além disso, no estudo efetuado por Li et al. observou-se uma relação entre o ganho de peso excessivo durante a gravidez e o aumento das concentrações de BPF e de BPS. Isto pode estar associado aos efeitos disruptores endócrinos – ex. perturbação das hormonas tiroideias (TH; do inglês “thyroid hormones”) – e metabólicos (ex. metabolismo lipídico) ou às vias de exposição

dietéticas associadas a estes compostos, uma vez que o BPF se encontra maioritariamente presente na carne e o BPS em produtos vegetais [36]. Liu e os seus colaboradores, determinaram ainda a existência de uma relação entre o consumo de mostarda durante a gravidez e as elevadas concentrações de BPF na urina materna [135]. No entanto, são necessários estudos futuros para clarificar quais fatores do estilo de vida que podem afetar as concentrações destes EDCs e, conseqüentemente aumentar o risco de exposição antes e durante o tempo de gestação.

Em suma, os vários substitutos do BPA foram detetados em amostras de sangue materno, sangue do cordão umbilical, urina materna, placenta e fluído amniótico (Tabela 1). Além disso, foi possível detetar a presença de alguns substitutos ao longo dos vários trimestres, o que pode indicar que não existe um trimestre concreto no qual deva ser avaliada a presença de EDCs. Isto é, idealmente a exposição aos EDCs deve ser analisada em diferentes amostras biológicas e ao longo de toda a gravidez, de modo a ser possível perceber e identificar quais as consequências para a mãe e para o feto [4, 9, 36, 136, 141]. Por outro lado, também poderá ser importante identificar estes compostos na fase pós-natal, visto que este continua a ser um período de maior sensibilidade à exposição aos EDCs [135]. A maior parte dos estudos, evidencia uma transferência materno-fetal destes compostos, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento de problemas de saúde para a mãe, tais como, possíveis alterações hematológicas [142] e no metabolismo glicolítico [129]; e para o feto como, por exemplo, alterações no desenvolvimento e crescimento [37, 137, 141]. Assim, a bioacumulação dos substitutos do BPA pode perturbar a saúde materna e fetal.

Tabela 1. Concentrações e taxas de detecção dos substitutos do BPA em diferentes estudos de exposição pré-natal. BPS: bisfenol S; BPF: bisfenol F; BPAF: bisfenol AF; BPB: bisfenol B; BPAP: bisfenol AP; BPZ: bisfenol Z; BPP: bisfenol P; BPE: bisfenol E; BPSIP: 4-Hidroxifenil 4-Isopropoxifenilsulfona (derivado do BPS); NC: não calculado; LOD: limite de detecção.

Autor	População	Região/País	Tipo de parto	Anos de recolha	Amostra biológica	Colheita da amostra	Substituto	Frequência de detecção	Concentrações				Observações
									1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	Após parto	
[130]	61 mulheres grávidas	Beijing (31) e Shijiazhuang (30); China	Parto normal	2012 - 2013	Sangue materno	1 a 2 dias antes do parto	BPS total conjugado	7%	-	-	< 0,03 - 0,07 ng/mL	-	-
					Sangue do cordão umbilical	Imediatamente após o parto	BPS total conjugado	12%	-	-	-	< 0,03 - 0,12 ng/mL	-
[134]	476 mulheres grávidas	Boston, Estados Unidos da América	-	2006 - 2008	Urina materna	Primeiro, segundo e terceiro trimestres	BPS	27%	<0,4 ng/mL	-	-	-	95º percentil = 1,32 µg/L Mediana das semanas em que efetuaram as recolhas: 9,7ª semana; 17,9ª semana; 26ª semana; 35ª semana
[131]	27 mulheres grávidas	República Checa	Parto normal (21) e cesariana (6)	2016 - 2017	Sangue venoso materno	Terceiro trimestre	BPS não conjugado	3,7%	-	-	0,061 ng/mL (Σbisfenóis)	-	Amostras recolhidas na 37ª semana de gravidez
							BPF não conjugado	3,7%	-	-	-	-	

					Sangue do cordão umbilical	Imediatamente após o parto	BPF não conjugado	3,7%	-	-	-	0,105 ng/mL (Σbisfenóis)	-
[133]	30 mulheres grávidas	New Jersey; Estados Unidos da América	Cesariana	2015	Urina materna	Imediatamente após o parto	BPS	60%	-	-	-	6,69%	Os valores apresentados para as concentrações referem-se à variação diária das gamas de concentração
							BPF	17%	-	-	-	8,40%	
							BPB	57%	-	-	-	7,19%	
							BPAF	83%	-	-	-	4,59%	
					Sangue do cordão umbilical	Imediatamente após o parto	BPS	0%	-	-	-	5,06%	
							BPF	50%	-	-	-	8,17%	
							BPB	3,3%	-	-	-	5,29%	
						BPAF	57%	-	-	-	5,01%		
[135]	467 mulheres grávidas	Calgary; Canadá	-	2010 – 2012	Urina materna	Segundo trimestre (18 ^a semana)	BPS total	59%	-	0,16 ng/mL (média) 0,22 µg/g creatinina (média)	-	-	-
							BPF total	9%	-	NC	-	-	95 ^o percentil = 7,29 ng/mL (média); 8,04 µg/g creatinina (média) A concentração não foi calculada devido à baixa frequência de detecção

							BPAF total	0,21%	-	0,20 ng/mL	-	-	-
							BPS livre	1,93%	-	NC	-	-	A concentração não foi calculada devido à baixa frequência de detecção
							BPF livre	0,21%	-	NC	-	-	A concentração não foi calculada devido à baixa frequência de detecção
[136]	50 mulheres grávidas	Israel	Cesariana	2015 – 2016	Urina materna	1 dia antes do parto ou no momento de admissão	BPF	51%	-	-	0,4 µg/L (mediana não ajustada)	-	-
							BPS	27%	-	-	<LOD	-	95º percentil = 0,7 µg/L Não foi possível calcular a concentração pois os valores eram inferiores ao limite de detecção

[137]	107 mulheres grávidas	Boston, Estados Unidos da América	-	2015 – 2016	Urina materna	Primeiro, segundo e terceiro trimestres	BPS	55%			0,33 ng/mL	-	Semanas em que efetuaram as recolhas: 6 ^a semana; 24 ^a semana; 33 ^a semana
[138]	1396 mulheres grávidas	Holanda	-	2004 – 2005	Urina materna	Primeiro trimestre	BPS	67,8%	0,36 ng/mL (mediana)	-	-	-	Mediana das semanas em que efetuaram as recolhas: 12,9 ^a semana
							BPF	40,2%	0,57 ng/mL (mediana)	-	-	-	
							BPZ	<15%	0,17 ng/mL (mediana)	-	-	-	
							BPB	<15%	0,17 ng/mL (mediana)	-	-	-	
							BPAP	<15%	0,24 ng/mL (mediana)	-	-	-	
BPP	<15%	0,18 ng/mL (mediana)	-	-	-								
[34]	985 mulheres grávidas	Wuhan; China	-	2012 – 2014	Urina materna	No momento de admissão para o parto	BPS	93,7%	-	-	0,16 µg/L (média)	-	-
[139]	922 mulheres grávidas	Porto Rico	-	2011 – 2017	Urina materna	3 recolhas ao longo do segundo e	BPS	6,1%	-		0,46 µg/mL (média das 3 recolhas)	-	Amostras recolhidas entre 16 ^a e 20 ^a

						terceiro trimestre	BPF	56,8%	-	0,27 µg/mL (média das 3 recolhas)			-	semanas; 20 ^a e 24 ^a semanas; 24 ^a e 28 ^a semanas
[140]	480 mulheres grávidas	Boston, Estados Unidos da América	-	2006 – 2008	Urina materna	4 recolhas ao longo do primeiro, segundo e terceiro trimestres	BPS	20%	-	-	-	-	-	95 ^o percentil = 2,10 ng/mL Mediana das semanas em que efetuaram as recolhas: 9,7 ^a semana; 17,9 ^a semana; 26 ^a semana; 35 ^a semana
[141]	845 mulheres grávidas	Wuhan; China	-	2013 – 2015	Urina materna	Primeiro, segundo e terceiro trimestres	BPS	86,8%	0,3 ng/mL (média)	0,4 ng/mL (média)	0,5 ng/mL (média)	-	Mediana das semanas em que efetuaram as recolhas: 13 ^a semana; 23,6 ^a semana; 36 ^a semana	
							BPF	98,3%	0,6 ng/mL (média)	0,7 ng/mL (média)	0,7 ng/mL (média)	-		
[35]	850 mulheres grávidas	Wuhan; China	-	2014 – 2015	Urina materna	Primeiro, segundo e terceiro trimestres	BPS	62,38% (1 ^o trimestre); 64,60% (2 ^o trimestre); 68,11% (3 ^o trimestre)	0,37 ng/mL (média)	0,45 ng/mL (média)	0,70 ng/mL (média)	-	Mediana das semanas em que efetuaram as recolhas: 13 ^a semana; 23,6 ^a semana; 35,9 ^a semana	

[36]	941 mulheres grávidas	Wuhan; China	-	2014 – 2015	Urina materna	Primeiro, segundo e terceiro trimestres	BPS	>97%	0,67 ng/mL (mediana ajustada)	0,69 ng/mL (mediana ajustada)	0,69 ng/mL (mediana ajustada)	-	Mediana das semanas em que efetuaram as recolhas: 13 ^a semana; 23,6 ^a semana; 35,9 ^a semana
							BPF	>63%	0,39 ng/mL (mediana ajustada)	0,34 ng/mL (mediana ajustada)	0,36 ng/mL (mediana ajustada)	-	
[129]	1841 mulheres grávidas	Wuhan; China	-	2013 – 2015	Urina materna	Primeiro e segundo trimestre	BPS	90,06%	0,36 µg/L (média ajustada)	-	-	-	Amostras recolhidas entre a 8 ^a e 18 ^a semana (média 13 ^a semana)
							BPF	94,72%	2,01 µg/L (média ajustada)	-	-	-	
							BPAF	42,59%	0,030 µg/L (média ajustada)	-	-	-	
[142]	196 mulheres grávidas	Seoul-Gyeonggi; Coreia do Sul	-	2017 – 2019	Urina materna	Terceiro trimestre	BPS	65%	-	-	0,1 µg/L (média)	-	Amostras recolhidas a partir da 28 ^a semana
							BPF	81%	-	-	0,2 µg/L (média)	-	
[37]	60 mulheres grávidas	Guangzhou; China	-	2017 – 2018	Plasma materno	2 horas antes do parto	BPS	97%	-	-	11,70 pg g ⁻¹ , ww (média)	-	-
							BPSIP	100%	-	-	187,00 pg g ⁻¹ , ww (média)	-	-
							BPAF	100%	-	-	13,10 pg g ⁻¹ , ww (média)	-	-

						BPE	100%	-	-	62,70 pg g ⁻¹ , ww (média)	-	-	
						BPF	30%	-	-	41,00 pg g ⁻¹ , ww (média)	-	-	
						BPAP	30%	-	-	<LOD	-	95° percentil = 11,5 pg g ⁻¹ , ww (média) Não foi possível calcular a concentração pois os valores eram inferiores ao limite de detecção	
					Plasma do cordão umbilical	Imediatamente após o parto	BPS	90%	-	-	-	7,20 pg g ⁻¹ , ww (média)	-
							BPSIP	100%	-	-	-	7,90 pg g ⁻¹ , ww (média)	-
							BPAF	100%	-	-	-	80,40 pg g ⁻¹ , ww (média)	-
							BPE	100%	-	-	-	49,90 pg g ⁻¹ , ww (média)	-
							BPF	0%	-	-	-	<LOD	-

												concentração pois os valores eram inferiores ao limite de deteção	
						BPAP	60%	-	-	-	8,70 pg g ⁻¹ , ww (média)	-	
[132]	106 mulheres grávidas	Qingyuan; China	-	2017	Soro materno	No momento de admissão para o parto	BPP	8%	-	-	0,01 ng/mL (média)	-	
							BPS	30%	-	-	0,01 ng/mL (média)	-	
							BPAF	25%	-	-	0,01 ng/mL (média)	-	
							BPAP	13%	-	-	<0,02 ng/mL (média)	-	
					Urina materna	Durante e após o parto	BPP	7% (n=15)	-	-	<0,02 ng/mL (média)	-	
							BPS	100% (n=15)	-	-	0,05 ng/mL (média)	-	
							BPAF	100% (n=15)	-	-	0,1 ng/mL (média)	-	
							BPAP	47% (n=15)	-	-	<0,02 ng/mL (média)	-	
					Soro do cordão umbilical	No momento do parto	BPP	19%	-	-	-	0,01 ng/mL (média)	-
							BPS	63%	-	-	-	0,03 ng/mL (média)	-
							BPAF	24%	-	-	-	0,1 ng/mL (média)	-

							BPAP	22%	-	-	-	<0,02 ng/mL (média)	-
					Fluído amniótico	No momento do parto	BPP	13% (n=15)	-	-	-	<0,02 ng/mL (média)	-
				BPS			67% (n=15)	-	-	-	0,02 ng/mL (média)	-	
				BPAF			80% (n=15)	-	-	-	0,02 ng/mL (média)	-	
				BPAP			27% (n=15)	-	-	-	<0,02 ng/mL (média)	-	

1.8. Efeitos dos substitutos do BPA na fase pré-natal

A exposição aos substitutos do BPA durante a fase pré-natal pode ter consequências graves para a saúde materna e do feto em desenvolvimento. Isto é, estes EDCs podem exercer várias alterações nos sistemas maternos e fetais, podendo causar o aparecimento de complicações associadas à gravidez, tais como, diabetes mellitus gestacional [129], alterações hematológicas maternas [142], variações na duração da gravidez (maior tempo de gestação ou parto pré-termo – antes das 37 semanas) [34, 35, 37, 139, 140], modificações de características morfológicas como, por exemplo, peso à nascença [37, 134, 137, 141], tamanho corporal [139, 141], perímetro cefálico [134, 137] e abdominal [134] e tamanho do fémur [134] (Figura 6).

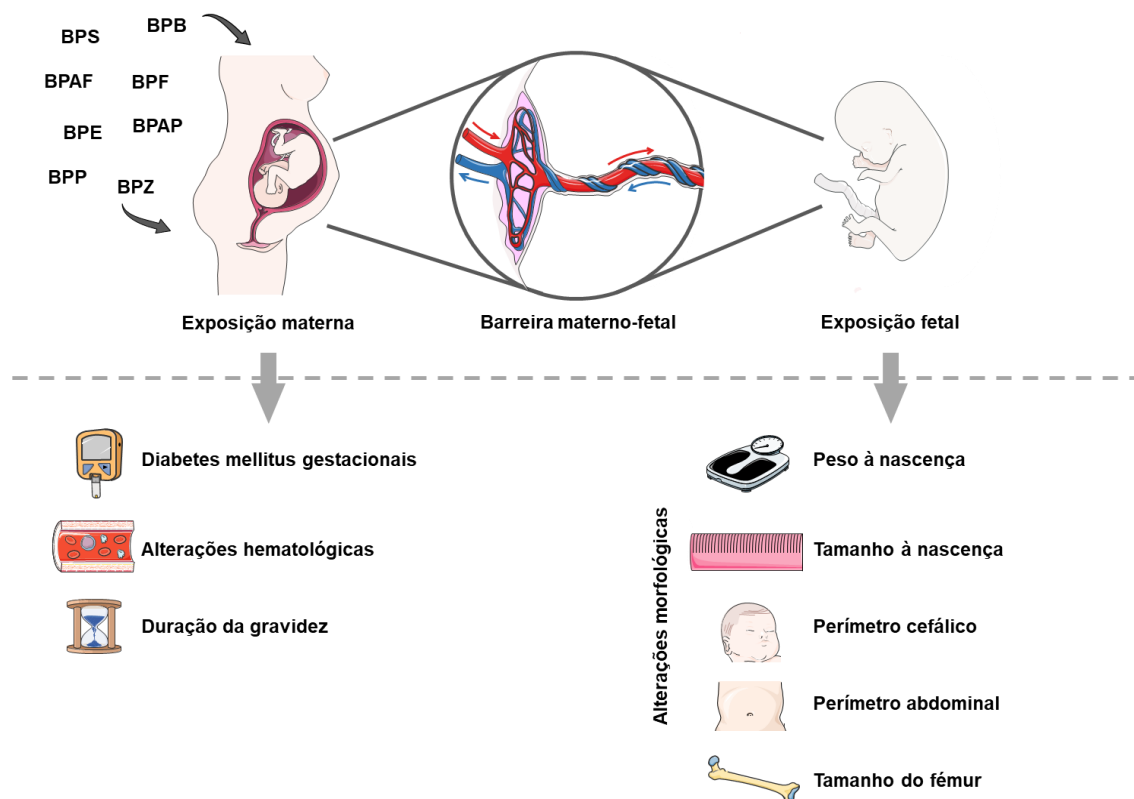


Figura 6. Representação esquemática dos vários estágios de vulnerabilidade à disrupção endócrina causada pelos substitutos do BPA. A exposição aos substitutos do BPA começa na fase pré-natal, visto que a placenta não é uma barreira totalmente eficaz à transferência materno-fetal destes compostos, o que faz com que estes se possam bioacumular no feto. A exposição materna e fetal pode acarretar consequências para a saúde de ambos. BPS: bisfenol S; BPF: bisfenol F; BPAF: bisfenol AF; BPB: bisfenol B; BPAP: bisfenol AP; BPZ: bisfenol Z; BPP: bisfenol P; BPE: bisfenol E. A figura foi criada no PowerPoint v.2204 usando figuras do Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier, licenciadas sob “Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)”.

Num estudo de coorte realizado na China, Zhang et al. avaliaram a relação entre as concentrações de BPS, BPF e BPAF presentes em amostras de urina materna recolhidas durante o primeiro trimestre e a perturbação do metabolismo glicolítico, associado ao desenvolvimento de diabetes mellitus gestacional [129]. De um modo geral, verificaram que a presença de BPAF e BPS na urina materna se relacionava com níveis mais altos de glicose na urina, sendo que os efeitos causados pelo BPS parecem ser influenciados pelo sexo do feto em desenvolvimento. Isto é, os resultados indicam que o BPS apenas perturba o metabolismo da glicose em mulheres grávidas de meninas, o que pode ser causado pelas diferenças na quantidade de hormonas na circulação materna. Além disso, constataram que as mulheres com peso corporal dentro dos valores de referência antes da gravidez, quando expostas ao BPAF, aparentam ter uma maior propensão para desenvolver diabetes mellitus gestacional, embora estes resultados devam ser interpretados com precaução e devam ser confirmados em estudos futuros. Porém, relativamente ao BPF, não foi possível estabelecer nenhuma relação com alterações no metabolismo glicolítico [129].

Em 2020, Kang e os seus colaboradores realizaram um estudo para averiguar quais os efeitos do BPS e BPF na hematopoiese e nos parâmetros bioquímicos serológicos maternos [142]. No modelo não ajustado foi possível observar uma associação entre o aumento da concentração de BPS e a diminuição do número de eritrócitos, níveis de hemoglobina e o hematócrito. Para o BPF, pelo contrário, verificou-se uma relação positiva entre os parâmetros mencionados. Contudo, quando os modelos foram ajustados a significância foi perdida. Portanto, os resultados obtidos foram inconsistentes e, por isso, os efeitos hematológicos destes compostos no ser humano são pouco concretos, o que acarreta uma necessidade de efetuar estudos adicionais [142].

Ao longo dos anos, têm sido feitos alguns estudos para avaliar a influência que os substitutos do BPA podem ter na duração da gravidez e na maior ou menor propensão para a ocorrência de parto pré-termo [34, 35, 37, 139, 140]. No que diz respeito ao BPS, os resultados obtidos nos vários estudos são bastante distintos. Isto é, no estudo efetuado por Wan et al. foi concluído que maiores concentrações de BPS na urina materna estão associadas a uma maior duração da gravidez e conseqüente menor probabilidade de parto pré-termo. Além disso, verificou-se que esta correlação positiva é mais significativa em mulheres grávidas de meninas [34]. Segundo os autores, o prolongamento da gravidez nos casos em que ocorre exposição a este EDC pode estar relacionado com o facto de os níveis de progesterona aumentarem, o que permite que ocorra uma manutenção da gravidez [34]. No entanto, o estudo efetuado por Aung e os seus colaboradores apresenta resultados opostos, uma vez que neste trabalho observaram que quando as concentrações de BPS na urina materna eram mais elevadas, a probabilidade de parto pré-termo durante o 3º trimestre aumentava [140]. Contudo, este segundo estudo apresenta algumas limitações quando comparado com o

primeiro, uma vez que a amostragem era mais pequena e a recolha das amostras foi realizada em anos anteriores, quando o uso deste substituto ainda não era tão alargado [140]. Porém, outros três estudos efetuados em 2019 e 2020, não observaram relações significativas entre a concentração de BPS na urina materna [35, 139] ou no plasma materno/do cordão umbilical [37] e a duração da gravidez. Relativamente ao BPF, um estudo concluiu que o aumento das concentrações na urina materna aparenta estar associado à maior probabilidade de parto pré-termo [139]. Já noutro estudo, não foi observada nenhuma relação significativa entre as concentrações deste EDC no plasma materno/do cordão umbilical e a duração da gravidez [37]. Quanto ao BPAF, apenas um estudo constata que as elevadas concentrações deste substituto no sangue do cordão umbilical estão associadas a uma maior probabilidade de parto pré-termo [37].

Além disso, também têm sido feitos trabalhos para determinar quais os efeitos dos substitutos do BPA em diversos parâmetros morfológicos do feto em desenvolvimento [37, 134, 137, 139, 141]. Alguns estudos demonstraram que quando o BPS se encontra presente na urina materna de mulheres grávidas de meninos, o peso corporal à nascença dos mesmos tem tendência a diminuir [134, 137, 141]. Contudo, noutros trabalhos efetuados não foram observadas relações significativas entre a presença destes compostos na urina materna ou no sangue do cordão umbilical e esta característica morfológica [37, 133, 139]. Quando as mulheres estão grávidas de meninas os resultados são ainda menos concordantes. Isto é, a deteção de BPS na urina materna, já foi associada a uma tendência de aumento, embora não estatisticamente significativo [137] e diminuição de peso à nascença, ainda que menos acentuada do que nas mulheres grávidas de meninos [141]. Já noutros estudos não foi verificada nenhuma associação entre este EDC e o peso corporal à nascença das meninas recém nascidas [37, 134, 139]. Relativamente ao BPF, um estudo associou a presença deste composto na urina materna à diminuição de peso corporal, sendo esta mais acentuada nos meninos [141], enquanto outros não demonstraram associações significativas entre este parâmetro e a presença deste EDC na urina materna [133, 139] e no sangue do cordão umbilical [37, 133]. No que diz respeito ao BPAF, Pan e os seus colaboradores observaram uma correlação negativa entre as concentrações de BPAF no sangue do cordão umbilical e o peso corporal do recém-nascido [37]. O tamanho da criança à nascença e durante a idade gestacional também foram avaliados quando é possível detetar a presença de BPS e BPF na urina materna [139, 141]. Deste modo, verificou-se que a deteção destes EDCs está inversamente relacionada com o tamanho corporal [141]. No que concerne ao tamanho gestacional, verificou-se que as concentrações de BPS e BPF determinadas entre a 24^a e a 28^a semanas gestacionais se associam a uma idade gestacional menor (SGA; do inglês “small gestational age”), ou seja, o feto tem um tamanho menor do que o normal para o número de semanas gestacionais [139]. No entanto, as concentrações de BPS detetadas

entre a 16^a e 20^a semanas gestacionais aparentam estar associadas a uma idade gestacional maior (LGA; do inglês “large gestational age”), ou seja, o feto tem um tamanho maior do que o normal para a idade [139]. Segundo os autores, esta discrepância de efeitos provocados pelo BPS pode estar relacionada com a interação deste EDC com os níveis hormonais variáveis associados aos diferentes períodos da gravidez. Contudo, os resultados devem ser analisados com cautela e idealmente devem ser realizados estudos adicionais para tentar compreender melhor quais são as dinâmicas associadas [139]. Além disso, o perímetro cefálico e abdominal, tal como o tamanho do fêmur são parâmetros morfológicos relevantes de serem avaliados [134, 137]. No estudo efetuado por Ferguson et al. concluiu-se que estas três variáveis estão inversamente relacionadas com as concentrações de BPS na urina de mulheres grávidas de meninos. Pelo contrário, verificaram que nas mulheres grávidas de meninas as concentrações deste composto estão diretamente relacionadas com o perímetro cefálico e com o tamanho do fêmur, não tendo sido possível estabelecer nenhuma relação estatisticamente significativa com o perímetro abdominal [134]. Por fim, no trabalho realizado por Mustieles et al. não foram observadas relações significativas entre este EDC e o perímetro cefálico [137].

Em suma, os substitutos do BPA, nomeadamente, o BPS, BPF e BPAF podem causar efeitos adversos para a saúde materna e do feto em desenvolvimento, sendo que, possivelmente, estes efeitos podem trazer complicações para a vida futura das crianças e das suas mães [34, 35, 37, 129, 134, 137, 139-142]. No entanto, será importante realizar mais estudos que avaliem as concentrações destes compostos em amostras biológicas humanas e permitam determinar as suas relações com o possível desenvolvimento de patologias e anomalias maternas e fetais, de modo a clarificar em concreto quais os efeitos causados por estes EDCs e perceber quais os mecanismos associados a estes fenómenos [34, 35, 37, 129, 139, 141]. Assim, poderá ser importante rever a segurança de substituir o BPA por estes análogos, uma vez que alguns estudos parecem indicar alguma semelhança entre os efeitos negativos causados [35-37, 129].

1.9. Efeitos da exposição para o sistema cardiovascular

As CVD englobam um conjunto bastante heterogêneo de patologias relacionadas com a perturbação do funcionamento e da estrutura dos vasos sanguíneos e do coração, tais como, aterosclerose, enfarte do miocárdio, hipertensão, insuficiência cardíaca, miocardiopatia dilatada, doença arterial coronária, arritmia, isquemia e acidente vascular cerebral, entre outras [14, 148, 149]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as CVD são consideradas a principal causa de morte a nível mundial [9, 14, 149], sendo que se espera que a sua incidência venha a incrementar ao longo dos anos [9]. Devido ao aumento dos

comportamentos de risco entre os jovens adultos, que residem principalmente no mundo ocidental, tem-se verificado uma maior incidência destas doenças nestas faixas etárias, o que se pode tornar problemático no futuro [148]. Portanto, se os efeitos causados pelos comportamentos de risco nestas idades não puderem ser revertidos, haverá uma sobrecarga ainda maior no número de indivíduos a sofrer deste tipo de patologias em idades mais jovens, aumentando assim a incidência da doença [148]. No entanto, cada indivíduo pode fazer alguns esforços para evitar alguns fatores de risco ao nível do estilo de vida como, por exemplo, manter uma dieta equilibrada e saudável, ter uma vida ativa, não fumar nem consumir substâncias de abuso [148, 150, 151]. Porém, existem fatores ambientais de risco que não são fáceis de evitar, tais como, a exposição a certos EDCs que estão presentes de forma ubíqua no meio ambiente, tal como acontece com o BPA e com os seus substitutos [14, 39]. Isto é, vários estudos já comprovaram que existe uma relação entre a exposição ao BPA e a prevalência de CVD [9, 14, 38-40, 152]. Por este motivo é importante avaliar se os análogos do BPA, que estão a ser cada vez mais usados para o substituir em diversos produtos do dia a dia, também podem ter um efeito disruptor no sistema cardiovascular [14, 41, 42, 153, 154].

1.9.1. Estudos animais *in vivo*

Deste modo, ao longo dos anos, têm sido feitos diversos estudos em modelos animais, tais como peixes zebra [21, 155-162], roedores [41, 42, 163-165], anelídeos [153] e crustáceos [166] com o intuito de avaliar se existe alguma relação entre a exposição a estes compostos e o desenvolvimento de anomalias no sistema cardiovascular (ver tabela 2).

Em 2020, foram efetuados 3 estudos em peixes zebra onde foi estabelecida a relação entre a exposição ao BPAF [160], BHPF [21] e BPS [161] e o desenvolvimento de cardiotoxicidade. De um modo geral, Gu e os seus colaboradores descobriram que o BPAF inibe a atividade de algumas enzimas antioxidantes (ex. Sod, Cat, Cu/Zn-SOD), aumentando o stress oxidativo que, por sua vez, aumenta a peroxidação de lípidos – tal como é evidenciado pelo incremento dos níveis de malondialdeído (Mda; do inglês “malondialdehyde”) – e promove o desenvolvimento de disfunções mitocondriais, culminando com a ativação da via apoptótica p53/caspases na região cardíaca [160]. Além disso, nesta investigação os autores também observaram que a exposição a este EDC perturbou a expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento e normal funcionamento do coração. Isto é, o BPAF alterou a expressão dos genes *nkx2.5*, *gata5*, *ta*, *noto*, e *tbx6* que estão envolvidos na formação do loop do tubo cardíaco, diferenciação, migração e proliferação dos cardiomiócitos e morfogénese do coração [160]. No estudo efetuado por Mi et al. foram obtidos resultados semelhantes [21]. Isto é, também neste estudo, a exposição ao BHPF foi relacionada com a

disrupção da formação do loop cardíaco que é necessário para individualizar a aurícula do ventrículo no coração destes animais. Esta perturbação pode ser verificada pelo aumento da distância entre o *sinus venosus* e o *bulbus arteriosus* (distância SV-BA). Além disso, neste estudo também foi observada a diminuição da expressão dos genes *nkx2.5*, *tbx5a* e *gata4*. Curiosamente, para as concentrações mais baixas de BHPF, foi observado um aumento da expressão do gene *myl7* que está envolvido na proliferação das células musculares cardíacas, nos processos de contração do coração e no conjunto de miofibrilas. Isto reflete o aumento da proliferação dos cardiomiócitos presentes na aurícula e no ventrículo como mecanismo de compensação das anomalias cardíacas causadas por este composto [21]. Já no trabalho realizado por Qiu e os seus colaboradores, constatou-se que a exposição ao BPS alterou alguns parâmetros imunitários (ex. níveis de citocinas, IL-12 e NO sintetase), o que perturbou o desenvolvimento e função do coração [161].

Uma das consequências mais frequentemente observadas, em peixes zebra nas fases embrionárias e larvais, após exposição ao BPAF [156, 157, 159], BPF [157-159], BPS [155, 157] e BHPF [21] é o desenvolvimento malformações cardíacas, tais como, edema cardíaco [155, 157] e pericárdico [21, 156, 158, 159]. Por vezes os peixes zebra também podem desenvolver um aumento da área pericárdica [21]. Ainda no que diz respeito à morfologia do coração nestes animais, verificou-se que a exposição ao BPAF diminuiu o número de cardiomiócitos e de células endocárdias, decrescendo o tamanho deste órgão [160]. Já a submissão a tratamentos com BHPF também foi associada à redução do número de cardiomiócitos na secção maior do ventrículo e da aurícula [21]. No entanto, no estudo realizado por Qiu e os seus colaboradores, a exposição dos peixes zebra ao BPS foi relacionada com o aumento do tamanho da aurícula e do espaço entre a parte lisa da aurícula e o apêndice auricular (parte musculada da aurícula), ou seja, segundo estes autores este composto promoveu a hipertrofia do coração dos peixes zebra [161]. Assim, os autores concluíram que estes EDCs podem despoletar o aparecimento de lesões cardiovasculares [156, 160]. No estudo efetuado por Moreman et al. verificou-se ainda que a exposição dos embriões de peixe zebra, nos primeiros dias de vida, ao BPAF e BPF promoveu a ocorrência de hemorragias cranianas, provavelmente devido a danos vasculares [157]. Isto é, este acontecimento pode estar relacionado com o enfraquecimento da rede de vasos sanguíneos locais, devido à perturbação, por parte destes compostos, das vias de sinalização associadas à tiróide e ao 17β -estradiol (E2) [157].

Por outro lado, para analisar os efeitos que os EDCs causam nas funções cardiovasculares, avalia-se frequentemente, a função contráctil do coração [41] e os parâmetros relacionados com a mesma, tais como, a frequência cardíaca [21, 41, 153, 160, 162, 166], volume sistólico [21], débito cardíaco [21] e encurtamento longitudinal do ventrículo [21]. O estudo realizado por Gao et al. verificou que a exposição de fêmeas de rato ao BPS promoveu o aumento da

fosforilação da proteína *phospholamban* (PLN), sendo que este processo também foi observado para os recetores de rianodina (RyR; do inglês “ryanodine receptors”), que estão envolvidos nos processos de contratilidade cardíaca [41]. Deste modo, constatou-se que este composto, ao interferir com os processos de captação e libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, pode aumentar a incidência dos acontecimentos de excitação espontâneos e aberrantes, ao nível dos miócitos. Portanto, a nível celular este EDC tem a capacidade de aumentar a ocorrência de eventos arritmogénicos que em determinadas condições patofisiológicas se podem propagar, aumentando o risco de desenvolvimento de arritmias. Contudo, neste estudo, ao nível do coração, em condições normais, não foram observados eventos de arritmia, embora haja a assinalar um aumento moderado da frequência cardíaca. É ainda importante referir que os eventos causados nos cardiomiócitos das fêmeas parecem estar relacionados com a ativação do recetor de estrogénio β (ER β ; do inglês “estrogen receptor beta”) e, conseqüentemente, com a sua via de sinalização. No entanto, neste estudo não foi possível observar alterações significativas nos machos, o que segundo os autores poderá ser explicado pela simultânea ativação do recetor de estrogénio α (ER α ; do inglês “estrogen receptor alpha”), o que acaba por anular os efeitos estimulatórios associados à ativação dos ER β [41].

Ainda no que concerne a frequência cardíaca, entre 2018 e 2021, foram realizados estudos em peixes zebra [21, 160-162], no anelídeo *Lumbriculus variegatus* [153] e nas fêmeas de crustáceo *Daphnia magna* [166]. Deste modo, verificou-se que a exposição dos anelídeos ao BPS diminuiu o intervalo entre as pulsações do vaso sanguíneo dorsal – que é considerado o homólogo filogenético do coração dos organismos superiores – aumentando assim a frequência de pulsação [153]. Pelo contrário, a exposição das fêmeas *D. magna* ao BPF levou à diminuição da frequência cardíaca [166]. Nos peixes zebra, de um modo geral, observou-se que os compostos BPAF [160], BHPF [21] e BPS [161, 162] têm tendência a reduzir a frequência cardíaca, embora no estudo efetuado por Qin et al. se tenha verificado que, 48h após a fertilização, os embriões F1 apresentavam um aumento da frequência cardíaca [162]. Por outro lado, no estudo onde os embriões de peixe zebra foram expostos ao BHPF, ocorreu uma diminuição da frequência cardíaca, redução do volume diastólico e débito cardíaco, e o encurtamento longitudinal do ventrículo, o que reforça mais uma vez a ideia de que este EDC tem capacidade de perturbar diretamente as funções cardíacas [21]. De modo a avaliar os potenciais riscos destes compostos para o sistema cardiovascular também se pode recorrer à determinação de diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos presentes no soro [164]. Assim, em 2017 foi efetuado um estudo em ratos adultos machos, onde foi possível estabelecer uma relação entre a exposição ao BPS e a perturbação destes parâmetros serológicos que, por sua vez, podem desencadear determinados processos no organismo associados a um maior risco de desenvolvimento de

CVD [164]. Isto é, verificou-se que este EDC induziu a diminuição do número de eritrócitos presentes na circulação, provavelmente devido à interferência com o processo de eritropoiese. Além disso, foi possível observar uma redução da concentração de hemoglobina, o que poderá ser explicado pela inibição da eritropoiese e da síntese de hemoglobina e/ou pela ocorrência de hemólise, sendo que se verificou que de facto o último processo enumerado ocorre, tal como é evidenciado pelo aumento das concentrações de bilirrubina. Por outro lado, este composto foi associado à diminuição do tempo de coagulação e ao aumento dos níveis serológicos de Ca^{2+} . Uma vez que o Ca^{2+} tem um papel essencial para o ritmo cardíaco, as alterações nos níveis serológicos deste ião podem ser preocupantes e indicar, mais uma vez, uma possível relação entre o BPS e o desenvolvimento de arritmias cardíacas, nestes modelos animais. Constatou-se também um decréscimo do número de leucócitos em circulação, logo, este EDC poderá suprimir algumas funções do sistema imunitário. Por outro lado, estes autores também constataram que o metabolismo da glicose e dos lípidos foi perturbado. Portanto, neste caso, verificou-se um aumento das concentrações serológicas de glicose, triglicéridos (TG), ácidos gordos livres, colesterol, lipoproteínas de baixa densidade (LDL; do inglês “low density lipoprotein”) e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL; do inglês “very low density lipoprotein”). Pelo contrário, observou-se a diminuição dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL; do inglês “high-density lipoprotein”). Deste modo, este EDC ao estar associado a estas alterações no perfil lipídico poderá estar relacionado com a promoção da formação de placas ateroscleróticas, que constituem um dos grandes fatores de risco para o desenvolvimento de CVD. Verificaram ainda que os ratos expostos aos tratamentos com BPS apresentavam hiperproteinemia que possivelmente está relacionada com danos tecidulares hepáticos, provavelmente correlacionados com problemas cardíacos, tal como é evidenciado pelo aumento da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT; do inglês “alanine aminotransferase”), aspartato aminotransferase (AST; do inglês “aspartate aminotransferase”) e fosfatase alcalina (ALP; do inglês “alkaline phosphatase”). Por fim, observaram um aumento das concentrações de ureia, que é um indicador de insuficiência cardíaca. Assim, percebe-se que o BPS pode ser considerado um composto indutor de risco cardiovascular [164]. Além disso, outro estudo realizado em 2017, considerou este composto como sendo um fator de risco para o sistema cardiovascular em murganhos, após ser induzido um enfarte do miocárdio [163]. Isto é, a exposição de forma contínua ao BPS, após um enfarte do miocárdio, aumenta o estado pró-inflamatório na zona lesada, o que culmina no desenvolvimento de complicações, tais como, rutura cardíaca e disfunção do ventrículo esquerdo, diminuindo a recuperação destes animais. Deste modo, verifica-se que os murganhos expostos aos tratamentos com este EDC acabam por morrer prematuramente devido à rutura cardíaca. Já quando sobrevivem o ventrículo esquerdo não se encontra a

funcionar corretamente, tal como é evidenciado pela sua dilatação e pela redução da área fracionada ((área do ventrículo esquerdo em diástole – área do ventrículo esquerdo em sístole)/área do ventrículo esquerdo em diástole) [163].

1.9.2. Estudos *in vitro*

Desde 2019, foram feitos diversos estudos *in vitro* de modo a avaliar a contratilidade [42, 165] e a cardiotoxicidade do BPS, BPF [165, 167] e BPAF [154, 168]. Isto é, Ferguson e os seus colaboradores realizaram um estudo em que expuseram ao BPS corações de ratos isolados e previamente perfundidos com o objetivo de determinar quais as consequências para a função contráctil deste órgão [42]. Deste modo, demonstraram que o BPS, ao interagir com ER β , exerce um efeito depressor rápido nestes corações, sendo que este, por sua vez, parece estar relacionado com a diminuição da pressão sistólica e das taxas de contração e relaxação. Além disso, avaliaram os perfis de fosforilação dos miofilamentos que constituem o aparelho contráctil e da PLN que funciona como um regulador da função contráctil. Ao ser fosforilada a proteína PLN dissocia-se da SERCA, ativando a bomba de Ca²⁺ presente na membrana do retículo sarcoplasmático o que, conseqüentemente, aumenta a remoção de Ca²⁺ do citoplasma para o retículo sarcoplasmático. Este processo culmina no aumento da taxa de relaxação e, posteriormente, no incremento da contração do miocárdio [42, 105]. Assim, estes investigadores verificaram que a exposição a este composto promoveu o desenvolvimento de alterações no padrão de fosforilação dos miofilamentos que diferem entre géneros e que podiam afetar diretamente a função contráctil do miocárdio. Contudo, estas variações provavelmente acabam por se anular umas às outras não causando modificações na função dos miofilamentos. Além disso, constataram que a exposição, dos corações das fêmeas, ao BPS aumentou a fosforilação da PLN no resíduo de serina 16 e diminuiu a fosforilação no resíduo de treonina 17. Porém, nos machos, não foram observadas alterações significativas nos perfis de fosforilação da PLN, ou seja, a resposta do miocárdio após exposição a este composto apresenta diferenças entre géneros que, segundo os autores, podem eventualmente estar relacionadas com diferentes padrões de fosforilação do ER β , embora sejam necessários estudos adicionais para o comprovar [42]. Portanto, este composto ao diminuir a contratilidade do miocárdio, nomeadamente ao nível do ventrículo esquerdo, pode reduzir a sua capacidade de funcionar corretamente o que, por sua vez, pode despoletar a ocorrência de situações de hipoperfusão, aumentando o risco de desenvolvimento de doença coronária isquémica [42]. No mesmo ano, Yin e os seus colaboradores estabeleceram uma relação entre a exposição de corpos embrionários de murganho ao BPF e BPS e o desenvolvimento de CVD [167]. Isto é, estes compostos foram associados ao aumento da frequência de cardiomiopatias ventriculares

direitas (dilatação, hipertrofia e arritmia), contração do músculo liso vascular e do músculo cardíaco e maior propensão para desenvolver miocardites. Nos últimos anos, foram efetuados trabalhos de investigação com cardiomiócitos derivados da diferenciação de células estaminais embrionárias da linha celular R1 (ESC R1; do inglês “embryonic stem cells R1”), onde estes foram expostos a várias concentrações de BPAF [154, 168]. Yang et al. verificaram que o aumento das concentrações deste EDC estava diretamente relacionado com o número de cardiomiócitos a sofrer apoptose. Além disso, constataram que a exposição a este substituto do BPA promoveu a hipertrofia dos cardiomiócitos [154]. Por outro lado, no trabalho efetuado por Zhou et al. foram obtidos resultados concordantes, sendo que se pensa que este aumento de tamanho pode ser explicado pela interferência deste EDC na via p38-MAPK que, conseqüentemente, aumenta a expressão de colagénio e promove o desenvolvimento de hipertrofia dos cardiomiócitos, afetando o normal desenvolvimento do coração [168]. Em 2021, foi efetuado um estudo onde foram avaliados os efeitos diretos não genómicos na eletrofisiologia cardíaca que estão associados à exposição ao BPF e ao BPS [165]. Para tal, recorreu-se ao uso de cardiomiócitos humanos derivados de células estaminais pluripotentes (hiPSC-CM; do inglês “human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes”). De um modo geral, estes investigadores descobriram que a exposição ao BPF provocou um efeito inibitório nos canais iónicos destas células, inibindo as correntes de Na⁺, Ca²⁺ e K⁺. Estas alterações, nomeadamente ao nível das correntes de Ca²⁺, podem ser preocupantes, visto que os canais de Ca²⁺ no tecido cardíaco estão envolvidos em processos importantes, tais como, a despolarização das células nodais, condução atrioventricular, fase de plateau, condução dos potenciais de ação cardíacos e contratilidade [165]. No entanto, para os casos de exposição ao BPS, não foi possível observar estas alterações [165]. Além disso, neste estudo foram avaliados os efeitos da exposição ao BPS e BPF de corações de rato isolados e previamente perfundidos. Deste modo, verificou-se que a exposição ao BPF podia ser associada à diminuição da frequência cardíaca e da condução auriculoventricular e ao aumento da refratariedade nodal auriculoventricular. Porém, nos casos de exposição ao BPS estas alterações não foram constatadas [165].

Assim, fica evidenciado que nestes modelos *in vitro* também é possível observar uma diminuição da resposta cardíaca, diminuindo a frequência cardíaca e a pressão arterial, promovendo os efeitos cardiotóxicos e hipertróficos associados aos substitutos do BPA [154, 165, 167].

1.9.3. Estudos epidemiológicos

Embora os estudos que avaliam os efeitos dos substitutos do BPA a nível cardiovascular em humanos sejam bastante escassos, em 2021, um trabalho de investigação constatou que as concentrações de BPS e BPF na urina de pacientes hipertensos internados num hospital em Wuhan eram estatisticamente superiores às dos pacientes sem hipertensão [169]. Assim, os autores concluíram que estes compostos podem eventualmente exercer alguns efeitos hipertensivos em humanos, embora sejam necessários estudos posteriores [169].

Em suma, fica evidenciado que, nos modelos animais, os substitutos do BPA, tais como, o BPS [41, 42, 153, 155, 157, 161-164], BPF [157-159, 166], BPAF [156, 157, 159, 160] e BHPF [21] podem modificar a morfologia e a função dos componentes do sistema cardiovascular, promovendo uma maior cardiotoxicidade que depois pode culminar no desenvolvimento de CVD. Além disso, estas consequências também foram observados em modelos *in vitro*, o que mostra que estes podem ser bastante úteis na compreensão dos efeitos e dos mecanismos associados a estes processos, pelo que futuramente poderão constituir uma boa área de estudo [154, 167, 168]. No entanto, há a assinalar que os trabalhos para avaliar diretamente os efeitos destes EDCs no sistema cardiovascular de humanos ainda são muito escassos [169]. Assim, será importante realizar mais estudos que permitam obter um melhor conhecimento das relações que existem entre a exposição ubíqua do ser humano a estes compostos e o desenvolvimento de CVD. Deste modo, é essencial determinar se de facto será seguro substituir o BPA pelos seus análogos, visto que vários estudos já comprovaram que, por exemplo, no que diz respeito ao sistema cardiovascular, estes compostos apresentam riscos para a saúde [41, 42, 153, 154].

Tabela 2. Efeitos dos substitutos do BPA no sistema cardiovascular de diversos organismos. PND: dias pós-natal (do inglês “postnatal day”); bw: peso corporal (do inglês body weight); HDL: lipoproteína de alta densidade (do inglês “high density lipoprotein”); PLN: *phospholamban*; CVD: doenças cardiovasculares (do inglês “cardiovascular diseases”); distância SV-BA: distância entre o *sinus venosus* e o *bulbus arteriosus*; ESC: células estaminais embrionárias (do inglês “embryonic stem cells”); BPAF: bisfenol AF; BPF: bisfenol F; BPS: bisfenol S; BHPPF: fluoreno-9-bisfenol.

Estudo	Referência	Organismos de estudo	Exposição	Substituto do BPA	Efeitos para o sistema cardiovascular
<i>In vivo</i>	[155]	Larva de peixe zebra	Exposição pré-natal e durante o período de eclosão de forma contínua a 50 µg/L de BPS	BPS	Desenvolvimento de edema cardíaco
	[156]	Embriões de peixe zebra	Exposição dos embriões durante 72h após fertilização a 1,5 mg/L BPAF	BPAF	Desenvolvimento de edema pericárdico
	[41]	Ratos adultos fêmeas Sprague-Dawley	Exposição dos corações de rato excisados e dos miócitos ventriculares isolados a 1 nM BPS	BPS	Nos miócitos: aumento dos mecanismos arritmogênicos; No coração: aumento moderado da frequência cardíaca; pode contribuir para o desenvolvimento de arritmias se na presença de substratos arritmogênicos existentes
	[163]	Murganhos adultos machos C57bl/6n	Exposição pré e pós-natal, até ao momento da eutanásia (PND21), a 5 µg/kg bw/dia BPS	BPS	Promove a rutura cardíaca e a disfunção do ventrículo esquerdo, após enfarte do miocárdio, diminuindo a recuperação
	[157]	Embriões de peixe zebra	Exposição dos embriões desde as 0h após fertilização até às 96h a concentrações que variam entre 10 e 200 mg/L BPAF/BPF/BPS	BPAF	Edema cardíaco e hemorragia cranial (>10 mg/L BPAF)
				BPF	Edema cardíaco e hemorragia cranial (>20 mg/L BPF)
				BPS	Edema cardíaco (>200 mg/L BPS)
	[164]	Ratos adultos machos Sprague-Dawley	Exposição dos ratos adultos durante 30 dias a 30, 60 e 120 mg/kg bw/dia BPS	BPS	Redução de parâmetros hematológicos e do número de leucócitos no soro; aumento das concentrações serológicas de Ca ²⁺ (associado ao desenvolvimento de arritmias); incremento dos níveis de variáveis do perfil lipídico que promovem a formação de placas ateroscleróticas e diminuição da síntese de HDL
	[158]	Embriões de peixe zebra	Exposição pré-natal e até 1h após fertilização a 0,1 e 1mg/L BPF	BPF	Desenvolvimento de edema pericárdico
[159]	Embriões de peixe zebra	Exposição dos embriões no estadio de 16 células (1,5 a 1,7	BPAF	Desenvolvimento de edema pericárdico (0,5 mg/L e 1 mg/L); redução da frequência cardíaca (0,5 mg/L and 1 mg/L)	

			horas após fertilização) a concentrações que variam entre 0,1 mg/L e 10 mg/L BPAF/BPF durante 4 dias	BPF	Desenvolvimento de edema pericárdico (10mg/L; redução da frequência cardíaca (5 mg/L and 10 mg/L)
[153]	Anelídeo <i>Lumbriculus variegatus</i>		Exposição dos anelídeos durante 5 dias (100 a 120h) ou exposição aguda (5min) a 1 nM e 1 µM de BPS	BPS	Diminuição do intervalo entre pulsações do vaso sanguíneo dorsal, em ambos os tipos de exposição
[160]	Embriões de peixe zebra transgênicos		Exposição dos embriões entre as 4h e 72h após fertilização a 200 µg/L BPAF	BPAF	Redução da frequência cardíaca, do número de cardiomiócitos e de células endocárdicas no coração; diminuição do tamanho do coração; indução de cardiotoxicidade por indução de stress oxidativo e apoptose
[166]	Fêmeas de crustáceo planctónico <i>Daphnia magna</i>		Exposição dos neonatos durante 21 dias a 10 e 100 µg/L BPF	BPF	Diminuição da frequência cardíaca
[21]	Embriões de peixe zebra		Exposição dos embriões entre as 2h e 72h após fertilização a 2, 5 e 10 µM BPAF	BHPF	Indução de cardiotoxicidade; atenuação da função cardíaca; menor desenvolvimento do coração; aumento da área pericárdica (2 e 10 µM); desenvolvimento de edema pericárdico (5 e 10 µM); aumento da distância SV-BA (2, 5 e 10 µM); redução do número de cardiomiócitos na secção maior do ventrículo e do átrio (2, 5 e 10 µM); perturbação da função contráctil do coração - diminuição da frequência cardíaca, volume sistólico, débito cardíaco (2, 5 e 10 µM); encurtamento longitudinal do ventrículo (2, 5 e 10 µM)
[161]	Embriões/larvas de peixe zebra		Exposição dos embriões entre as 4 e 120h após fertilização a 100µg/L BPS	BPS	Indução de cardiotoxicidade; desenvolvimento de hipertrofia no coração; diminuição da frequência cardíaca; aumento do tamanho do átrio e da área entre o átrio e o ventrículo
[162]	Embriões de peixe zebra		Exposição pré-natal (progenitoras foram expostas durante 240 dias a 1 e 100 µg/L BPS)	BPS	48h após fertilização: aumento da frequência cardíaca 120h após fertilização: diminuição da frequência cardíaca
<i>In vitro</i>	[42]	Murganhos CD1	Exposição dos corações de murganhos isolados e	BPS	Diminuição da função contráctil do ventrículo esquerdo, em ambos os géneros; aumento e diminuição, respetivamente, da fosforilação

			perfundidos durante 15min a 1 nM BPS		dos resíduos de serina 16 e treonina 17 da proteína PLN nos corações das fêmeas
	[167]	Corpos embrionários derivado de células estaminais de murganho	Exposição dos corpos embrionários a 100nM BPF/BPS	BPF BPS	Relação com o desenvolvimento de CVD, tais como, cardiomiopatias ventriculares direitas (dilatação, hipertrofia e arritmia), contração do músculo vascular liso, contração do músculo cardíaco, miocardite viral; ativação da sinalização adrenérgica nos cardiomiócitos
	[154]	Cardiomiócitos derivados da linha celular ESC R1	Exposição das células durante 7 a 10 dias a 8, 200 e 1000 ng/ml BPAF	BPAF	Indução de hipertrofia e de processos apoptóticos nos cardiomiócitos
	[165]	Cardiomiócitos humanos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas (hiPSC-CM) e corações de rato Sprague-Dawley isolados e perfundidos	Exposição das hiPSC-CM a 0,01-100 µM BPF durante 15 min e exposição dos corações de rato isolados e perfundidos durante 15 min	BPF	Nas hiPSC-CM: inibição dos canais iónicos destas células, inibindo as correntes de Na ⁺ , Ca ²⁺ e K ⁺ No coração: diminuição da frequência cardíaca e da condução auriculoventricular e ao aumento da refratariedade nodal auriculoventricular
	[168]	Células da linha celular ESC R1 em diferenciação para cardiomiócitos	Exposição das células desde o dia 0 ao 10º dia de diferenciação a 10 ng/mL	BPAF	Aumento da expressão do colagénio que pode resultar numa hipertrofia cardíaca associada a problemas no desenvolvimento do coração
Epidemiológico	[169]	Pacientes hipertensos internados no serviço de cardiologia de um hospital em Wuhan	Detetadas concentrações médias de 0,39 µg/L BPS e 0,32 µg/L BPF na urina dos doentes hipertensos internados	BPF BPS	Concentrações de BPS/BPF detetadas na urina dos pacientes hipertensos são significativamente superiores aos controlos, logo, BPS/BPF podem ter alguns efeitos hipertensivos

2. Enquadramento e Objetivos da investigação

O BPA é um monómero sintético constituinte de muitos plásticos de policarbonato, resinas epóxi e outros produtos de consumo. Este composto químico está sempre a ser libertado para o meio ambiente, o que faz com que, por isso, seja considerado como um dos EDCs mais presentes no meio ambiente. De facto, a presença do BPA em diversas amostras biológicas já foi comprovada, assim como a associação da exposição a este composto com o desenvolvimento de diversas patologias.

Deste modo, ao longo dos anos, o BPA tem vindo a ser substituído em diversos produtos pelos seus compostos análogos, tais como, o BPF e BPS. Assim, o ser humano e o meio ambiente, de um modo geral, passaram a estar também expostos de forma ubíqua aos substitutos do BPA. No entanto, a nível estrutural, estes EDCs são todos muito semelhantes entre si, pelo que ultimamente, têm sido levantadas diversas questões quanto à segurança destes compostos. Neste sentido, têm sido efetuadas algumas investigações com o objetivo de avaliar os efeitos que os substitutos do BPA podem acarretar para a saúde humana. Preocupantemente parece que estes substitutos podem exercer efeitos disruptivos ainda mais graves do que o BPA. A nível cardiovascular, estudos em animais já reportaram que o BPF e o BPS são vasodilatadores rápidos da aorta de rato.

Assim sendo, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos do BPA, BPF e BPS ao nível da contratilidade celular e arterial humana e analisar os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos, de modo a clarificar se os efeitos destes EDCs podem estar relacionados com o desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Além disso, pretendeu-se verificar se os efeitos provocados por estes compostos são mais ou menos adversos que os causados pelo BPA, de modo a perceber se efetivamente estes substitutos podem ser considerados como mais seguros para a saúde humana cardiovascular.

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

- 1.** Realização com sucesso do isolamento e cultura HUASMCs;
- 2.** Análise do efeito direto do BPA, BPF e BPS em HUA sem endotélio e em HUASMCs;
- 3.** Análise dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito do BPA e BPF na HUA, principalmente o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de Ca^{2+} .

3. Materiais e métodos

Este trabalho de investigação foi realizado nas instalações laboratoriais do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), sendo que para a realização do mesmo foram utilizados cordões umbilicais provenientes de partos que ocorreram no Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira (CHUCB).

3.1. Recolha dos Cordões Umbilicais Humanos (HUC)

As amostras de HUC recolhidas apresentavam um tamanho de cerca de 3 a 7 cm de comprimento e provinham de partos efetuados por via vaginal, de grávidas desprovidas de patologias. As mães dadoras que estivessem a tomar medicação para além de ácido fólico durante as primeiras 21 semanas de gestação e de suplementos de ferro, ou outras vitaminas durante todo o período gestativo, foram excluídas do estudo. Os HUCs foram cortados a partir da metade proximal ao recém-nascido – 20 cm – e recolhidos nos primeiros minutos após o parto. Há ainda a assinalar que todas as amostras de HUC foram obtidas a partir de partos em termo – entre as 37 e 42 semanas de gestação – com o devido consentimento informado das mães dadoras.

As amostras de HUC, após a recolha, foram colocadas numa solução salina fisiológica estéril (PSS; pH = 7,40), que mimetiza as condições no corpo humano, à temperatura de 4 °C. Esta solução era constituída por NaCl 110 mM; CaCl₂ 0,16 mM; EDTA 0,5 mM; KCl 5 mM; HEPES 10 mM; MgCl₂ 2mM; NaHCO₃ 10 mM; KH₂PO₄ 0,5 mM; NaH₂PO₄ 0,5m M e Glicose 10 mM, sendo que a esta foi adicionada uma solução de antibiótico-antimicótico (SAA) – penicilina (5 U/ml), estreptomina (5 µg/ml) e anfotericina B (12,5 ng/ml) – de modo a evitar a ocorrência de possíveis contaminações (Tabela 3).

No total, foram recolhidas e utilizadas neste estudo 41 amostras de HUC normais. Todos os procedimentos efetuados com estas amostras biológicas foram aprovados pelo Comitê de Ética do “Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E” (Covilhã, Portugal) (No.33/2018, 18 de Julho de 2018) e encontram-se em concordância com os princípios da Declaração de Helsínquia.

3.2. Estudos de contratilidade arterial recorrendo à técnica de Banho de Órgãos

As HUAs foram utilizadas para estudos de reatividade vascular, usando para tal um sistema experimental *in vitro* denominado por Banho de Órgãos (do inglês “organ chamber”).

Porém, antes desta técnica ser efetuada há que ter em conta dois procedimentos de preparação das amostras biológicas – isolamento das HUAs e posterior remoção do

endotélio destes vasos umbilicais. Deste modo, procedeu-se à realização dos mesmos, seguindo os passos descritos por Cairrao et al. e Lorigo et al. [69, 78, 170]. Resumidamente, as HUA foram isoladas da geleia de Wharton, usando uma placa de Petri de vidro com PSS diluído a 4 °C e os devidos materiais cirúrgicos (ver Figura 7). As HUAs devidamente isoladas foram depois colocadas em 10 mL de PSS, à temperatura de 0-4 °C, durante 3 a 12 horas. Passado este período temporal, as artérias isoladas foram cortadas em pequenos pedaços – anéis – de 3 a 5 mm, usando o material cirúrgico apropriado. Seguidamente, o endotélio vascular foi mecanicamente removido usando uma agulha com linha de algodão introduzida no lúmen arterial. Por fim, os anéis foram colocados em 10 mL de DMEM-F12 (“Dulbecco’s modified Eagle medium”) (Tabela 3), a uma temperatura de 0-4 °C, durante 24 horas. É importante referir que embora se saiba que o endotélio tem um papel importante na regulação do tónus vascular, tal como anteriormente descrito, foram usadas HUAs sem este tecido para que fosse possível determinar apenas os efeitos e os mecanismos que o BPA, BPF e o BPS exercem na contratilidade do músculo liso arterial.



Figura 7. Tabuleiro utilizado para isolar as HUAs numa placa de Petri de vidro com PSS diluído, a uma temperatura de 4 °C.

Após as 24 horas, os anéis de HUA foram colocados no banho de órgãos – LE01.004, Letica) –, a uma temperatura de 37 °C, que continha 10 mL da solução de Krebs diluído constituída por NaCl 119 mM; KCl 5,0 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 0,5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 0,03 mM e glicose 11mM e tinha um pH = 7,40 (Tabela 3). Além disso, estes anéis foram continuamente gaseados com carbogénio – 95% de O₂ e 5% de CO₂ (ver Figura 8). Foram escolhidos estes valores de pH e esta constituição gasosa para que as condições

no Banho de Órgãos pudessem mimetizar a pressão de CO₂ e o pH do plasma humano [170]. Há ainda a assinalar que os anéis foram suspensos entre 2 ganchos paralelos de aço inoxidável, sendo que a determinação da tensão isométrica, em milinewton (mN), foi realizada recorrendo a transdutores isométricos de força (TR1201, Panlab SA, Espanha), a um amplificador (ML118/D Quad Bridge, ADInstruments) e uma interface PowerLab/4SP (ML750, ADInstruments) que se encontrava ligada a um sistema computacional com o software “PowerLab Chart5” (ADInstruments) (Tabela 4).



Figura 8. Sistema experimental in vitro de Banho de Órgãos. Os quatro anéis de HUA foram colocados no Banho de Órgãos que continha a solução de Krebs diluído continuamente gaseificada com carbogénio, à temperatura de 37 °C.

Primeiramente, os anéis foram submetidos a uma pré-tensão (20-25 mN) e expostos a um período de equilíbrio de cerca de 45 minutos, de modo a ser possível alcançar uma tensão de repouso compreendida entre os 20 e os 25 mN, sendo que de 15 em 15 minutos, a solução de Krebs diluído foi renovada. De seguida, após este período, foi testada a viabilidade dos anéis de HUA, ao sujeitá-los a uma concentração supramaximal de 5-HT (1 µM). Para os procedimentos seguintes apenas foram considerados os anéis cujas contrações máximas excederam os 10 mN [69, 78, 170].

Neste trabalho, o primeiro objetivo com esta técnica laboratorial foi descobrir quais os efeitos vasculares diretos do BPA, BPF e do BPS na contratilidade das HUA sem endotélio. Assim sendo, os anéis de HUA foram contraídos com o agente vasoativo 5-HT (1 µM), ou com o agente despolarizante KCl isomótico (60 mM) e, após estabilização da resposta contráctil induzida por estes agentes, foi avaliado o efeito do BPA, BPF e BPS (0,002; 0,02; 0,2; 2; 20; e 100 µM) nestas contrações. As diferentes concentrações foram adicionadas de forma crescente e cumulativa. Foram sempre realizados controlos com etanol, visto que este

é o veículo usado para dissolver o BPA e os seus substitutos. A escolha das concentrações que foram utilizadas teve como base um trabalho anterior efetuado pelo nosso grupo de investigação com SMCs de rato [152].

Numa segunda fase, foram analisados quais os efeitos que o BPA e o BPF causam nas HUAs, a longo prazo, tendo sido efetuados estudos mecanísticos, de modo a clarificar quais os mecanismos de ação destes EDCs. Para tal, as HUAs foram incubadas durante 24 horas, após remoção do endotélio, com diferentes concentrações destes compostos (0,02; 0,2; 20 μM). Isto é, uma vez que as vias associadas aos canais de Ca^{2+} e à sinalização do cGMP são consideradas as principais vias envolvidas no relaxamento do músculo liso das HUAs, estas foram as selecionadas como alvo desta fase do estudo [69]. Portanto, os anéis destas artérias foram contraídos com 5-HT (1 μM), ou com KCl (60 mM) e o modo de ação destes compostos foi analisado. Neste sentido, para avaliar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de Ca^{2+} , na vasorelaxação induzida pelo BPA e pelo BPF, recorreu-se ao nitroprussiato de sódio (SNP; do inglês “sodium nitroprusside”; 0,01 – 100 μM) – um estimulador da sGC – e à Nif (0,0001 – 1 μM) – um inibidor específico do LTCC. Tanto o SNP como a Nif foram adicionados, de forma crescente, após estabilização das respostas contrácteis. Além disso, foram realizados controlos com artérias não incubadas, onde após estabilização das contrações induzidas pela 5-HT (1 μM), ou pelo KCl (60mM), foram adicionadas as mesmas concentrações de SNP e Nif. Visto que tanto o SNP como a Nif são agentes foto-degradáveis, todos os procedimentos onde estes estavam envolvidos foram realizados na ausência de luz, sendo que todo o material que os envolvia foi rodeado por papel de alumínio e foi evitada a exposição a ambientes luminosos.

É ainda importante referir que cada experiência foi realizada com anéis de HUA de, pelo menos, 4 artérias diferentes, para garantir a variabilidade genética.

Após as experiências e de modo a assegurar a remoção de componentes residuais do aparelho, procedeu-se à passagem de água corrente e posteriormente de água destilada, pelos poços e pelo sistema, três vezes.

3.3. Cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMCs)

A cultura de HUASMCs é um procedimento que requer o máximo de esterilidade possível, por isso, este foi efetuado numa câmara de fluxo laminar da sala das culturas primárias do CICS-UBI, tendo sido utilizados materiais, soluções e instrumentos devidamente esterilizados.

Para obter culturas de HUASMCs, estas foram isoladas da HUA de acordo com o método de explantes descrito por Cairrão et al. e Lorigo et al. [57, 69, 170]. Resumidamente, as HUAs foram isoladas da geleia de Wharton, numa placa de Petri que continha 30 mL de PSS e 300

μL de SAA. Posteriormente estas artérias foram cortadas em pequenos anéis, tendo sido removida a túnica íntima – endotélio vascular – de forma mecânica, com o auxílio de um cotonete estéril. De seguida, as camadas de SMCs foram isoladas utilizando pinças cirúrgicas e foram lavadas quatro vezes com 3 mL de PSS, em cada lavagem. Por fim, as camadas de SMCs foram transferidas – o mais esticadas possível – para os frascos de cultura T25 que previamente tinham sido revestidos com $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de colagénio, de modo, a promover a adesão. Os frascos foram ainda colocados numa incubadora a 37°C com uma atmosfera de 95% ar e 5% CO_2 , durante 25 minutos, sendo que depois foi-lhes adicionado 2 mL de meio de cultura completo (MCC) (Tabela 3). Passadas 24 horas, foram adicionados mais 2 mL de MCC ao frasco de cultura. O meio de cultura foi renovado a cada 2 ou 3 dias. As culturas primárias confluentes, em média, foram obtidas em 20 a 30 dias, sendo que quando foram alcançadas confluências de 90 a 95% no frasco de cultura, as células e respetivas camadas foram tripsinizadas, usando uma solução comercial de tripsina-EDTA 0,025%. As subculturas foram obtidas até ao máximo de 5 passagens, sendo que as células das diversas passagens foram utilizadas para realizar as experiências de *Planar Cell Surface Area* (PCSA).

3.4. Estudos de contratilidade celular recorrendo à técnica de *Planar Cell Surface Area* (PCSA)

A técnica de PCSA foi utilizada para estudar a contratilidade celular das HUASMCs, tal como foi descrito, em 2016, por Mariana et al. [171]. Nesta técnica, é feita uma aquisição de imagens das células ao longo tempo, possibilitando assim, o estudo das alterações de área da superfície celular. Isto é, a aquisição destes dados permite perceber se há um aumento ou diminuição das áreas celulares, indicando se as células sofreram um relaxamento ou contração, respetivamente [171].

De um modo geral, as HUASMCs foram plaqueadas para *multiwells* de 6 poços, sendo que em cada um deles foi adicionado 1 mL de MCC, até atingirem a confluência máxima. Quando este estado foi atingido, o meio MCC foi substituído por meio de cultura sem soro (MSS; 1 mL por poço) (Tabela 3) e as células foram incubadas a 37°C , numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO_2 , durante 24 horas. Após o término deste período, para a realização do estudo dos efeitos diretos do BPF, BPS e dos respetivos controlos, as células foram novamente incubadas com MSS, ou seja, o meio que se encontrava nos poços foi removido e foi adicionado novamente 1 mL de MSS, por poço, durante mais 24 horas. Já no caso dos estudos mecanísticos, as células foram incubadas com 1 mL de uma solução de $20 \mu\text{M}$ BPS ou $20 \mu\text{M}$ de BPF (ambos dissolvidos em MSS), durante mais 24 horas. Além disso, foram efetuados controlos, onde as células tiveram o mesmo tipo de tratamento que as células incubadas com os substitutos do BPA, com a única diferença de terem sido incubadas com

20 μM de etanol (dissolvido em MSS) e não com os compostos. Em ambas as situações de estudo foram mantidas condições ambientais previamente referidas. Após este intervalo de tempo terminar, as células foram tripsinizadas e plaqueadas (500 μL) em caixas de Petri específicas para o microscópio de fluorescência que foram previamente revestidas com 5mg/cm² de colagénio. Posteriormente, as caixas de Petri foram colocadas na incubadora, sob as condições ambientais referidas acima, durante mais 2 horas. Após este período de incubação, o MSS com que as células foram plaqueadas foi removido e foram efetuadas duas lavagens com 495 μL de RCS Ca₃ (Tabela 3), sendo que, na última lavagem, a solução foi mantida nas caixas como meio para levar as células para o ensaio microscópico.

Para efetuar estes ensaios, recorreu-se a um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1, Jena, Alemanha) (Figura 9). Este consiste num microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade Axio Cam Hsm (Zeiss, Jena, Alemanha), no qual está ainda incorporado um sistema de incubação que tem a capacidade de controlar a temperatura ao longo do procedimento experimental, sendo que este é um fator fundamental para a manutenção da viabilidade celular.

Deste modo, as HUASMCs foram observadas ao microscópio e, após ter sido escolhido um plano adequado, foi tirada uma foto (foto 0) que serviu de controlo. De seguida, foram adicionados 5 μL do agente contráctil 5-HT e as células foram filmadas, durante 20 minutos (vídeo 1) e no final foi tirada outra foto (foto 1). Este intervalo de tempo é o necessário para obter uma resposta máxima à ação do agente adicionado, sendo que no final é possível obter uma fase de plateau. Após este tempo, no caso do estudo dos efeitos diretos do BPF e do BPS, foram adicionados 5 μL de 2 μM BPF/BPS, tendo sido gravado um novo vídeo de 20 minutos (vídeo 2) e tirada uma foto no final (foto 2). Nestes ensaios foram ainda adicionados mais 5 μL de 20 μM BPF/BPS, gravado outro vídeo (vídeo 3) e tirada uma foto no fim (foto 3). Deste modo, no final, foi possível observar o efeito que o BPF/BPS exerce sobre a pré-contracção celular. Para estes ensaios, foi efetuado um controlo onde se procedeu exatamente da mesma forma, mas em vez de ser adicionado BPF/BPS, foi acrescentada a mesma quantidade das soluções de 2 e de 20 μM de etanol. Já no caso dos estudos mecânicos (células incubadas com 20 μM de BPF ou BPS), após ser tirada a foto 1, foram adicionados 5 μL do agente SNP 10 μM ou 5 μL de Nif 1 μM , tendo sido gravado um novo vídeo de 20 minutos (vídeo 2) e tirada uma foto no final (foto 2). Assim sendo, foi possível verificar quais os efeitos que, a exposição a estes EDCs, a longo prazo, exercem nos mecanismos de contratilidade celular. É ainda importante referir que também para estes ensaios foram efetuados controlos, usando as células incubadas com 20 μM de etanol, tendo-se procedido exatamente da mesma forma nesta fase da experiência.

Finalmente, para analisar os resultados e proceder ao tratamento de imagens, foram utilizados programas computacionais, nomeadamente, o suplemento de medição

Automatic measurement do programa *Axionvision 4.8 software* (Zeiss, Jena, Alemanha) (Tabela 4). Desta forma, conseguiu-se medir a diferença de áreas, após adição dos diversos agentes, o que nos permitiu analisar os efeitos destes substitutos do BPA na contratilidade celular.

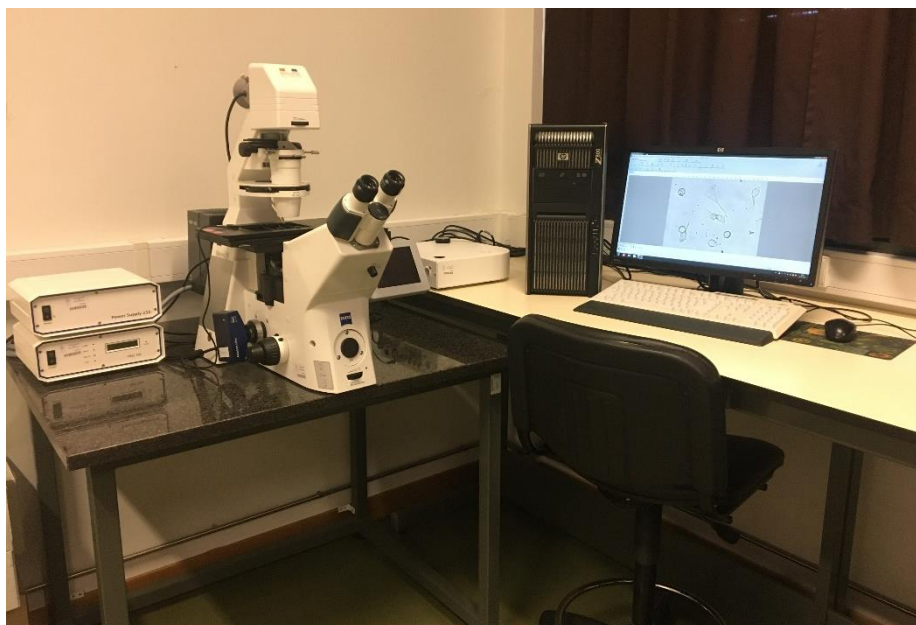


Figura 9. Microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1, Jena, Alemanha) equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade Axio Cam Hsm (Zeiss, Jena, Alemanha) e incorporado com um sistema de incubação.

3.5. Análise estatística

A análise dos dados dos estudos de contratilidade arterial – Banho de órgãos – foi efetuada através das medições da tensão isométrica em mN de força desencadeada pelos anéis de HUA contraídos. Deste modo, para a análise das respostas relaxantes induzidas pelo BPA, BPF e pelo BPS, foram consideradas as percentagens de redução da contração máxima induzida pelos agentes contrácteis 5-HT 1 μM e KCl 60 mM. Nestes estudos, os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão (S.D.) do número de anéis (n). Já os dados obtidos nas experiências de PCSA foram apresentados em média \pm desvio padrão (S.D.) do número de células (n).

A análise estatística foi efetuada recorrendo ao programa *SigmaStat Statistical Analysis System*, versão 3.5 (2006) e o design gráfico foi realizado no *Software Origin 2021 9.8.0.200*. Os critérios de normalidade e de homoscedasticidade dos dados foram avaliados pelos testes de *Kolmogorov–Smirnov* e de *Levene*, respetivamente. Para comparar os resultados obtidos em diferentes grupos, foram usados os testes de *one-way* ou *two-way ANOVA*, seguidos dos testes *post-hoc* de *Holm-Sidak*.

A existência de diferenças significativas foi considerada quando os níveis de probabilidade foram inferiores a 5% ($p < 0,05$).

3.6. Soluções e Materiais

3.6.1. Soluções

No decorrer desta investigação, foram utilizadas diversas soluções, que estão mencionadas na Tabela 3 com as respectivas composições.

Tabela 3. Soluções utilizadas ao longo deste trabalho e respectivas composições.

Solução	Composição
Solução salina fisiológica estéril (PSS; do inglês “sterile physiological saline solution”) concentrada	EDTA 0,5 mM; KCl 5 mM; HEPES 10 mM; MgCl ₂ 2mM; NaHCO ₃ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 0,5 mM; NaH ₂ PO ₄ 0,5m M e Glicose 10 mM; pH = 7,40
Solução salina fisiológica estéril (PSS; do inglês “sterile physiological saline solution”) diluída	PSS Básico Concentrado; NaCl 110 mM; CaCl ₂ 0,16 mM; pH = 7,40
Solução de antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina 10000 U; estreptomicina 10 mg e anfotericina 25 mg
Solução de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium/F12</i> (DMEM-F12)	DMEM-F12 liofilizado sigma; NaHCO ₃ 1,2 g/L e ácido L-ascórbico 20 mg/L; pH = 7,40
Krebs Básico Concentrado	KCl 5,0 mM; EDTA 0,03 mM; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,2 mM; KH ₂ PO ₄ 1,2 mM e ácido L-ascórbico 0,6 mM
Krebs diluído	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0,5 mM; NaCl 119 mM; NaHCO ₃ 25 mM e glicose 11 mM; pH = 7,40
Krebs despolarizante (KCl 60 mM)	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0,5 mM; NaCl 64 mM; KCl 60,0 mM; NaHCO ₃ 25 mM e glicose 11 mM; pH = 7,40
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino 5% (FBS; do inglês “fetal bovine serum”); albumina de soro bovino 0,25% (BSA; do inglês “bovine serum albumin”); fator de crescimento epidérmico 5µg/ml (EGF; do inglês “epidermal growth factor”); fator de crescimento fibroblástico 0,5 ng/ml (FGF; do inglês “fibroblast growth factor”); heparina 2 µg/ml; insulina 5 µg/ml e SAA 1%; pH = 7,40
Meio de cultura com 20% soro	DMEM-F12 suplementado com FBS 20% e SAA 1%; pH = 7,40

Meio de cultura sem soro (MSS)	DMEM-F12; pH = 7,40
Solução fosfato-salino diluído (PBS; do inglês “phosphate buffered saline solution”)	NaCl 1,37 M; KCl 27 mM; Na ₂ HPO ₄ 100 mM e KH ₂ PO ₄ 20 mM; pH = 7,40
Solução de Tripsina – EDTA 0,025%	0,5 g de tripsina de porco e 0,2 g de EDTA
RCS Ca ₃	NaCl 124 mM; HEPES 5 mM; TEA 10 mM; glicose 6 mM; CaCl ₂ 5 M; KCl 4,7 mM; pH = 7,40

3.6.2. Químicos

Ao longo deste trabalho, foram utilizados vários compostos químicos e drogas, em particular, o BPA, BPF, BPS, etanol, 5-HT, Nif e SNP, sendo que todos estes foram adquiridos na Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal).

O BPA, BPF, BPS e a Nif foram dissolvidos em etanol puro, ao invés da 5-HT e do SNP que foram dissolvidos em água Milli-Q e armazenados a -20 °C. Ao longo das diversas experiências realizadas houve necessidade de efetuar diluições dos compostos BPA, BPF, BPS, etanol, Nif e SNP. Assim, nos estudos de contratilidade arterial, as diluições foram efetuadas em Krebs diluído, ao contrário dos estudos de contratilidade celular, em que as diluições foram realizadas nas soluções de trabalho (RCS Ca₃ ou MSS). Todas estas diluições foram feitas no dia das experiências segundo as normas laboratoriais necessárias, sendo que, para que os resultados não fossem indevidamente influenciados, a concentração final de etanol nunca excedeu 0,05%.

3.6.3. Materiais

Nesta investigação recorreu-se à utilização de diversos equipamentos e materiais, sendo que a Tabela 4 estão descritos os que foram mais essenciais.

Tabela 4. Equipamentos e materiais utilizados ao longo do trabalho e respetivas marcas.

Banho de órgãos	
Materiais e equipamentos	Marca
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Material Específico de Laboratório	-
Câmara de Banho de Órgãos	Letica
Transdutor de Força	PanLab
Amplificador	ADInstruments
Interface PowerLab/4SP	ADInstruments
Software Específico do Banho de Órgãos	ADInstruments
Isolamento e Cultura de HUASMCs	
Materiais e equipamentos	Marca
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Frascos de Cultura e Multiwells (6 poços)	Orange Scientific e VWR
Material Específico de Laboratório	-
Câmara de Fluxo Laminar	NuAire
Sistema de Incubação	Pecon
PCSA	
Materiais e equipamentos	Marca
Material Específico de Laboratório	-
Caixas de Petri Específicas para o Microscópio de Fluorescência	Sarstedt
Microscópio de Fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
Software Específico do Microscópio de Fluorescência	Axio Vision program 4.8
Preparação das soluções	
Materiais e equipamentos	Marca
Balança Digital	Sartorius
Medidor de pH	Metrohm

4. Resultados

4.1. Estudos de contratilidade arterial

Para avaliar a contratilidade arterial das HUAs recorreu-se à técnica de Banho de Órgãos.

4.1.1. Efeitos vasculares diretos dos bisfenóis na contratilidade das HUAs induzida por 5-HT

Os efeitos diretos do BPA, BPS e BPF foram avaliados sobre anéis vasculares de HUAs contraídos com 5-HT 1 μM , tendo sido observado sempre um máximo efeito na concentração mais alta em estudo (100 μM). Os resultados demonstraram interações estatísticas significativas entre os compostos (etanol, BPA, BPS e BPF) e as concentrações adicionadas (0,002 – 100 μM) ($p \leq 0,001$) (Tabela A1). Tal como pode ser observado na Figura 10, os três bisfenóis induziram vasorelaxação dos anéis de HUAs. Mais especificamente, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo (etanol) e os grupos de teste (BPA, BPS e BPF) para as concentrações de 0,2 ($p < 0,05$), 2 ($p < 0,01$), 20 e 100 μM ($p \leq 0,001$) de BPA; 0,002 ($p < 0,01$); 0,02 a 100 μM ($p \leq 0,001$) de BPS; e 0,02 a 100 μM ($p \leq 0,001$) de BPF. Quando comparado com o BPA, o BPS apresentou um efeito vasorelaxante superior para as concentrações de 0,002; 0,02; 0,2 ($p < 0,01$); 2; 20 e 100 μM ($p \leq 0,001$). Já o BPF revelou também possuir um efeito vasorelaxante maior do que o BPA para as concentrações de 0,02; 0,2; 2 ($p < 0,05$); 20 e 100 μM ($p \leq 0,001$). Por outro lado, verificou-se que os efeitos causados por ambos os substitutos são semelhantes, excetuando para a concentração de 100 μM , onde o BPF ($46,89 \pm 10,23\%$) apresenta um efeito vasorelaxante mais elevado do que o BPS ($41,39 \pm 7,85\%$) ($p < 0,05$) (Tabela A1).

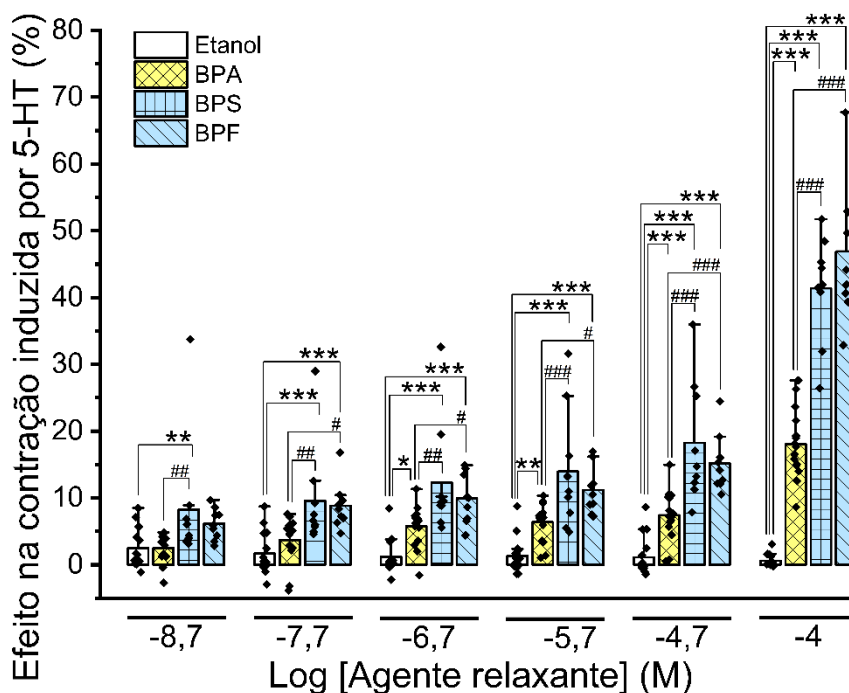


Figura 10. Efeito do BPA, BPS e BPF (0,002 μM – 100 μM) sobre as artérias umbilicais humanas (HUAs) contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de relaxação obtida após contração induzida por 5-HT. As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

4.1.2. Efeitos vasculares diretos dos bisfenóis na contratilidade das HUAs induzida por KCl

Os efeitos dos bisfenóis em anéis vasculares de HUAs contraídos com KCl 60 mM foi também analisada. Os resultados demonstraram interações estatísticas significativas entre os compostos (etanol, BPA, BPS e BPF) e as concentrações adicionadas (0,002 – 100 μM) ($p \leq 0,001$) (Tabela A2). Tal como pode ser verificado na Figura 11, os três bisfenóis induziram vasorelaxação dos anéis de HUAs, tendo sido observado sempre um máximo efeito na concentração mais alta em estudo (100 μM). Mais especificamente, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo (etanol) e os grupos de teste (BPA, BPS e BPF) para as concentrações de 0,2 ($p < 0,05$); 2; 20 e 100 μM ($p \leq 0,001$) de BPA; 0,002 a 100 μM ($p \leq 0,001$) de BPS; e 0,002; 0,02 ($p < 0,05$); 0,2 ($p < 0,01$); 2; 20 e 100 μM ($p \leq 0,001$) de BPF. Quando comparado com o BPA, o BPS apresentou um efeito vasorelaxante superior para as concentrações de 0,002; 2 ($p \leq 0,001$); 0,02; 0,2; 20 ($p < 0,01$) e 100 μM ($p < 0,05$). Já no caso do BPF, verifica-se que apenas para a maior concentração (100 μM) é que este composto apresenta um efeito vasorelaxante superior ao do BPA ($p \leq 0,001$). Além disso, constata-se que para as concentrações intermédias – 0,2; 2 e 20 μM – o BPS apresenta efeitos vasorelaxantes superiores aos do

BPF ($p < 0,05$). Pelo contrário para a concentração mais elevada (100 μM), observa-se que o BPF ($41,15 \pm 7,37\%$) tem um efeito mais proeminente que o BPS ($32,60 \pm 9,54\%$) ($p \leq 0,001$) (Tabela A2).

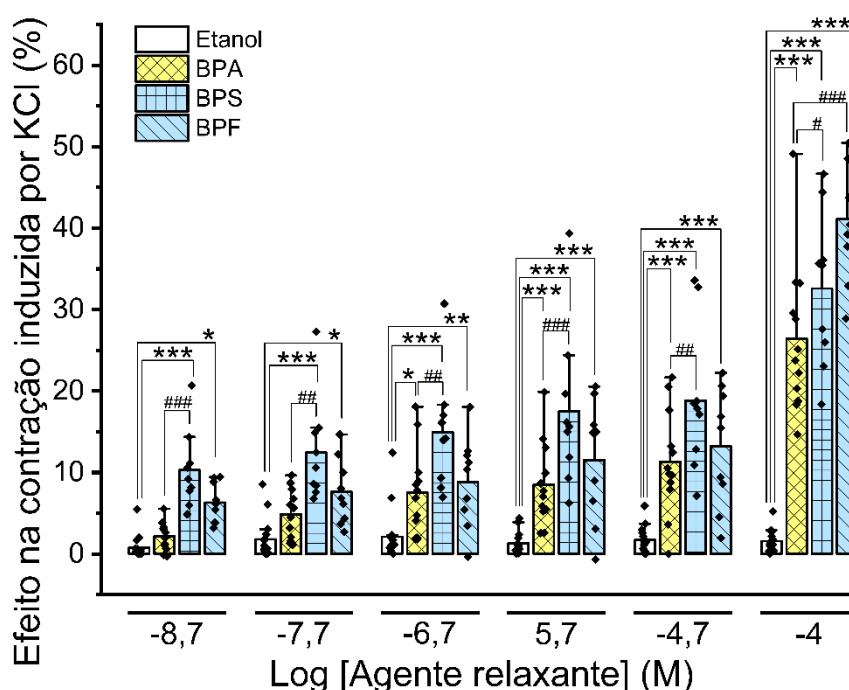


Figura 11. Efeito do BPA, BPS e BPF (0,002 μM – 100 μM) sobre as artérias umbilicais humanas (HUAs) contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de relaxação obtida após contração induzida por KCl. As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

4.1.3. Efeitos da exposição a longo prazo dos bisfenóis na vasculatura das HUAs

Os anéis vasculares de HUAs foram incubados durante 24 horas com diferentes concentrações de BPA e BPF, com o objetivo de avaliar quais os efeitos genómicos destes compostos. As tensões dos anéis de HUAs incubados com os bisfenóis e contraídos com 5-HT 1 μM e KCl 60 mM podem ser observadas nas Figura 12 e 13 respetivamente. Em ambos os casos, os resultados não demonstraram interações estatísticas significativas entre os compostos (BPA e BPF) e a incubação (0,002 – 20 μM) (5-HT: $p = 0,992$; KCl: $p = 0,132$). As tensões dos anéis de HUAs incubados com BPA (0,002, 0,2 e 20 μM) e (0,002 e 0,2 μM) foram significativamente inferiores às do grupo controlo para anéis contraídos com 5-HT (Figura 12) ou KCl (Figura 13), respetivamente. Por outro lado, verifica-se que os anéis de HUAs incubados com BPA 20 μM e contraídos com KCl apresentam valores de tensão superiores aos observados para os incubados com BPA 0,002 ($p < 0,05$) e 0,2 μM ($p \leq 0,001$).

Pelo contrário, as tensões obtidas para os anéis de HUAs incubadas com BPF 0,002; 0,2 e 20 μM e contraídas com qualquer um dos agentes vasoativos não são estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$) nem em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$). Além disso, foram obtidas tensões semelhantes para os anéis de HUAs incubados com a mesma concentração de BPA ou BPF ($p > 0,05$), exceto para o caso dos incubados com BPA 0,2 μM e contraídos por KCl, onde foram constatadas tensões inferiores às verificadas para os anéis de HUAs incubados com BPF 0,2 μM e contraídos pelo mesmo agente vasoativo ($p < 0,01$) (Tabela A3 e A4).

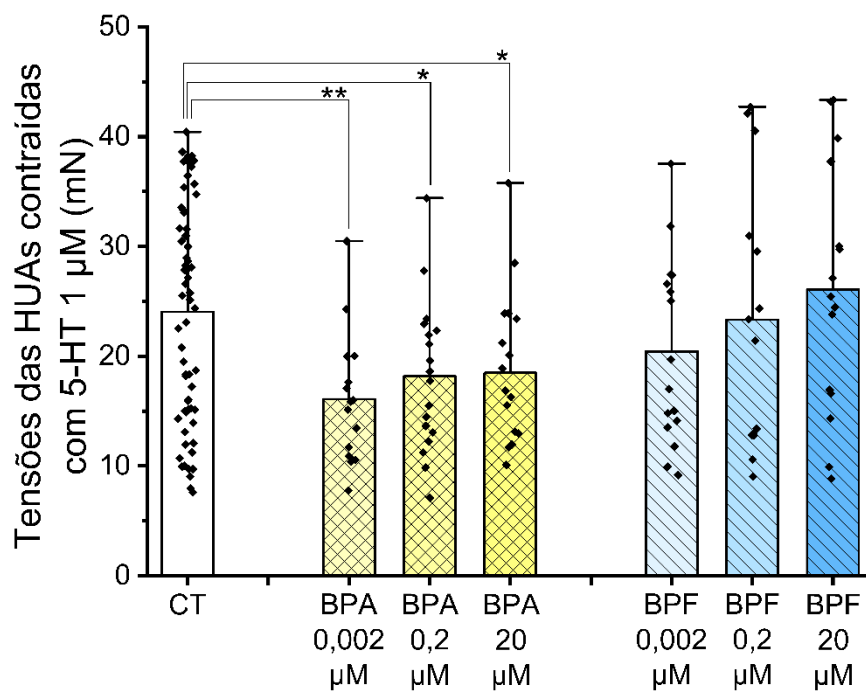


Figura 12. Tensão (expressa em milinewtons, mN) das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM) e contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM). As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelos testes de *one-way* ou *two-way ANOVA*, seguidos dos testes *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle.

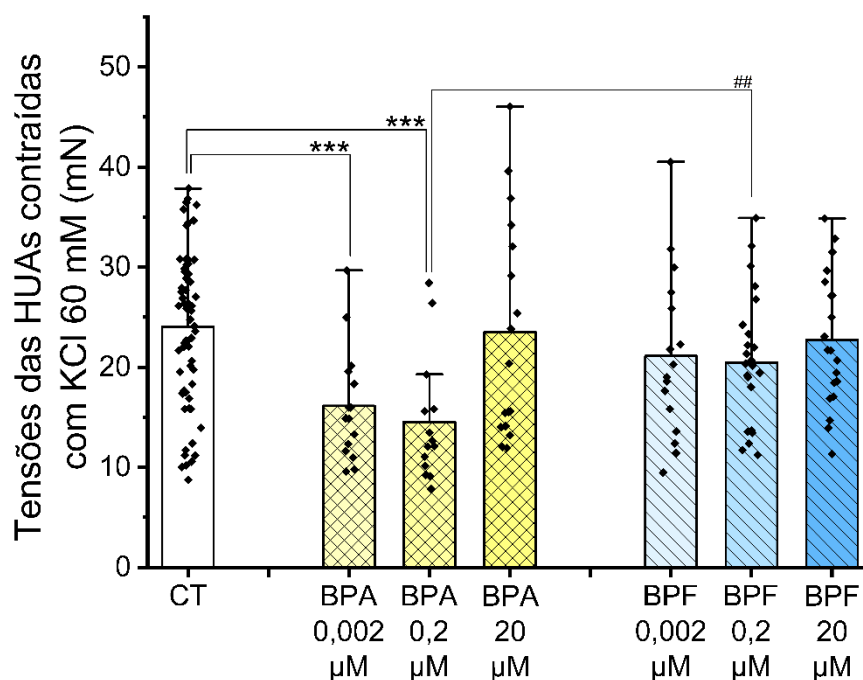


Figura 13. Tensão (expressa em milinewtons, mN) das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM) e contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM). As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelos testes de *one-way* ou *two-way ANOVA*, seguidos dos testes *post-hoc de Holm-Sidak*, onde *** $p \leq 0,001$ representa diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle e ## $p < 0,01$ representa diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

4.1.4. Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação das HUAs induzida pelos bisfenóis

Após os anéis de HUAs terem sido incubados durante 24 horas com diferentes concentrações de BPA ou BPF, foi estudado o envolvimento dos nucleótidos cíclicos na resposta vascular induzida por estes bisfenóis. Para tal, os anéis de HUAs incubados e contraídos com 5-HT 1 μM foram submetidos a diferentes concentrações de SNP (0,01 μM – 100 μM) (Figura 14). Os resultados demonstraram interações estatísticas significativas entre as incubações de BPA ou BPF e as concentrações de SNP ($p \leq 0,001$) (Tabela A5). No grupo controlo (sem incubação), verificou-se que após a contração induzida por 5-HT, o SNP induziu o relaxamento das HUAs, sendo que o efeito máximo foi observado para a concentração de 100 μM de SNP ($76,61 \pm 10,25\%$). Quando comparados com o grupo controlo, verificou-se que os anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 μM e BPA 0,2 μM apresentaram um relaxamento significativamente superior para as concentrações de 0,1; 1 e 10 μM de SNP. Já nos anéis de HUAs incubados com BPA 20 μM observou-se que o relaxamento induzido pelas concentrações de 1 a 100 μM de SNP diminuiu significativamente em comparação com o controlo ($p \leq 0,001$). Por outro lado, os anéis de HUAs incubados com BPF 0,002 e 0,2 μM demonstraram relaxamentos superiores para as

concentrações de 0,01 a 10 μM de SNP ($p \leq 0,001$), em comparação com o grupo controlo. Relativamente aos anéis de HUAs incubados com BPF 20 μM , verificou-se que o relaxamento induzido pelo SNP diminuiu significativamente em comparação com o controlo ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$), exceto para a concentração de 10 μM . Portanto, em relação ao controlo, ambos os bisfenóis aparentam ter um comportamento semelhante. Contudo, comparando os efeitos do SNP entre os dois bisfenóis, para a mesma incubação, verificou-se que quando são observadas diferenças significativas, o vasorelaxamento observado nos anéis de HUAs incubados com BPA é inferior. Isto é, o relaxamento induzido nos anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 μM foi inferior ao observado para os anéis de HUAs incubados com BPF 0,002 μM , para todas as concentrações de SNP ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$), exceto para a mais elevada (100 μM). O mesmo foi constatado para as concentrações de 0,01 (BPA: $8,30 \pm 3,04\%$; BPF: $16,81 \pm 5,70\%$) ($p < 0,05$) e 0,1 μM de SNP (BPA: $18,95 \pm 7,21\%$; BPF: $43,64 \pm 7,92\%$) ($p \leq 0,001$) nas incubações de 0,2 μM e para todas as concentrações de SNP nas incubações de 20 μM ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$).

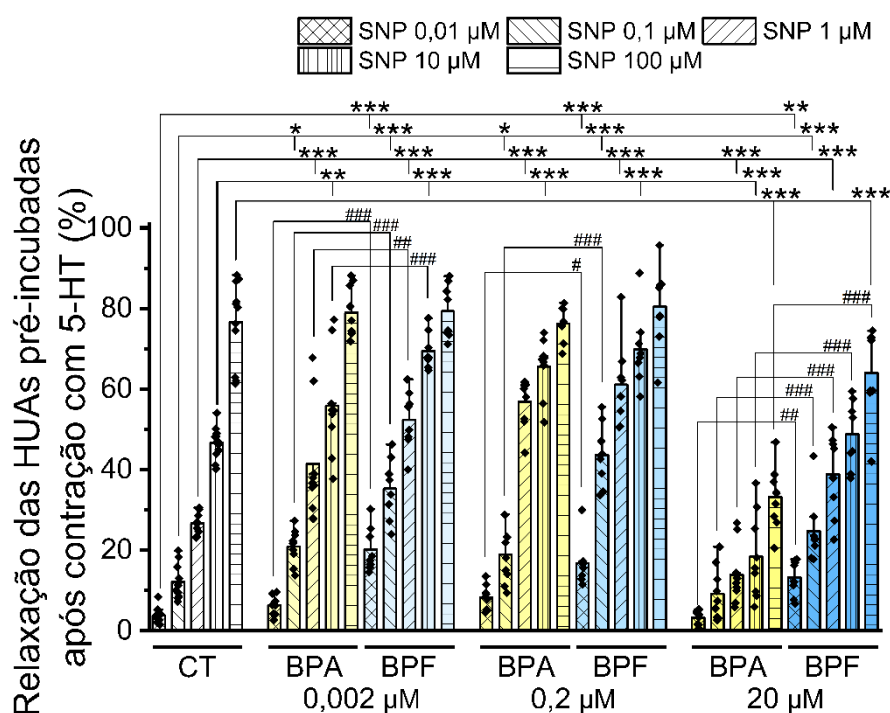


Figura 14. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM - 20 μM), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01 - 100 μM). As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

Além disso, o envolvimento dos nucleótidos cíclicos na resposta vascular induzida pelo BPA e pelo BPF foi ainda avaliado em anéis de HUAs incubados e contraídos com KCl 60 mM e posteriormente submetidos a diferentes concentrações de SNP (0,01 μ M – 100 μ M) (Figura 15). Os resultados demonstraram interações estatísticas significativas entre a incubação de BPA ou BPF e as concentrações de SNP ($p \leq 0,001$) (Tabela A6). No grupo controlo (sem incubação), após a contração induzida por KCl, o SNP induziu o relaxamento dos anéis de HUAs. Relativamente ao BPA, apenas os anéis de HUAs incubados com 20 μ M apresentaram um relaxamento significativamente superior, quando comparados com o respetivo controlo, para a concentração de SNP 0,1 μ M ($p < 0,05$). Já no caso dos anéis incubados com BPF 0,002 e 0,2 μ M foram observados relaxamentos significativamente superiores, em comparação com o grupo controlo, para as concentrações de 0,1 a 100 μ M de SNP e 0,1 a 10 μ M de SNP, respetivamente ($p \leq 0,001$). Nos anéis de HUAs incubados com BPF 20 μ M, para as concentrações mais elevadas de SNP (1; 10 e 100 μ M) foi constatada uma diminuição da resposta vasorelaxante ($20,88 \pm 7,82\%$; $27,67 \pm 8,22\%$ e $29,41 \pm 9,09\%$), em comparação com o controlo ($41,05 \pm 9,10\%$; $53,80 \pm 9,96\%$ e $68,24 \pm 11,99\%$) ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$). Relativamente aos efeitos do SNP (0,1 a 100 μ M) entre os dois bisfenóis, verificou-se que o relaxamento induzido nos anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 e 0,2 μ M foi inferior ao verificado para os anéis de HUAs incubados com as mesmas concentrações de BPF ($p < 0,05$ e $p \leq 0,001$). Pelo contrário, verifica-se que, em relação aos anéis de HUAs incubados com BPA 20 μ M, a vasorelaxação induzida por 0,1; 1; 10 ($p < 0,01$) e 100 μ M de SNP ($p \leq 0,001$) foi significativamente superior em comparação com os anéis de HUAs incubados com BPF 20 μ M.

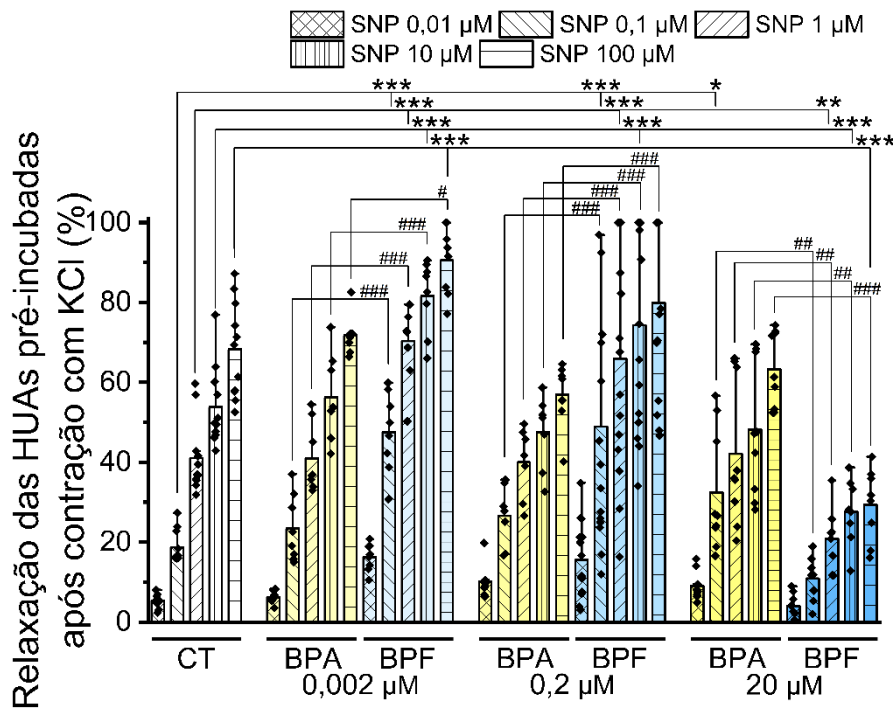


Figura 15. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM), contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01 – 100 μM). As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

4.1.5. Análise do envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação das HUAs induzida pelos bisfenóis

Após os anéis de HUAs terem sido incubados durante 24 horas com diferentes concentrações de BPA ou BPF, foi também estudado o envolvimento dos canais de Ca^{2+} na resposta vascular induzida pela exposição a estes bisfenóis. Para tal, os anéis de HUAs incubados e contraídos com 5-HT 1 μM foram submetidos a diferentes concentrações de Nif (0,01 μM – 1 μM) (Figura 16). Os resultados demonstraram interações estatísticas significativas entre a incubação de BPA ou BPF e as concentrações de Nif ($p \leq 0,001$) (Tabela A7). No grupo controlo (sem incubação), verificou-se que após a contração induzida por 5-HT, a Nif induziu o relaxamento dos anéis de HUAs, sendo que o efeito máximo foi observado para a concentração de 1 μM de Nif ($53,31 \pm 8,39\%$). Quando comparados com o grupo controlo, verificou-se que os anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 μM apresentaram um relaxamento significativamente superior para todas as concentrações de Nif ($p < 0,05$ e $p \leq 0,001$). Para os anéis de HUAs incubados com BPA 20 μM foram observadas as mesmas relações ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$). Já nos anéis de HUAs incubados com BPA 0,2 μM , observou-se que o relaxamento induzido pela concentração de 0,01 μM de Nif ($12,99 \pm 5,10\%$) aumentou significativamente em comparação com o grupo controlo ($4,39$

$\pm 0,53\%$) ($p < 0,05$), ao contrário do que se verificou na concentração de $0,1 \mu\text{M}$ de Nif ($20,59 \pm 9,29\%$), em que o relaxamento induzido foi significativamente inferior ao respetivo controlo ($28,47 \pm 5,32\%$) ($p < 0,05$). Por outro lado, os anéis de HUAs incubados com BPF $0,002 \mu\text{M}$ apresentaram um relaxamento significativamente superior ao controlo, para todas as concentrações de Nif ($p \leq 0,001$). Relativamente aos anéis de HUAs incubados com BPF $0,2$ e $20 \mu\text{M}$ verificou-se também um aumento significativo do relaxamento induzido pela Nif $0,01$ ($p \leq 0,001$) e $0,1 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$, respetivamente), em comparação com o controlo. Quanto aos efeitos da Nif entre os dois bisfenóis, verificou-se que o relaxamento induzido por este agente nas concentrações de $0,01$ e $1 \mu\text{M}$ em anéis de HUAs incubados com BPA $0,002 \mu\text{M}$ foram inferiores aos verificados para os anéis de HUAs incubados com a mesma concentração de BPF ($p < 0,05$). Foi observada a mesma relação para os anéis de HUAs incubados com $0,2 \mu\text{M}$ e submetidos às concentrações de $0,01$ e $0,1 \mu\text{M}$ de Nif. Pelo contrário, nos anéis de HUAs incubados com BPA $20 \mu\text{M}$, a vasorelaxação induzida por $0,1$ e $1 \mu\text{M}$ foi significativamente superior à observada para os anéis de HUAs incubados com BPF $20 \mu\text{M}$.

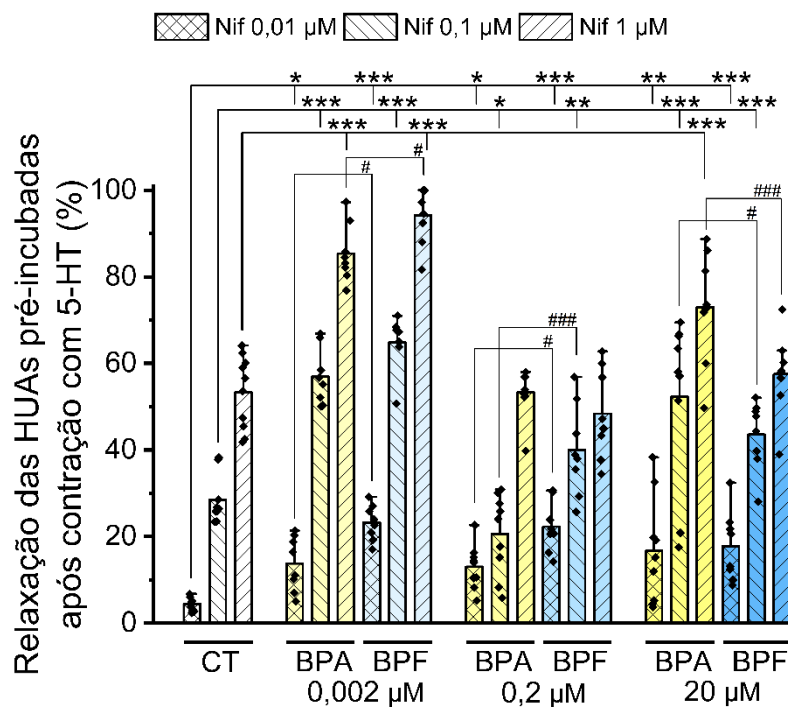


Figura 16. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF ($0 \mu\text{M} - 20 \mu\text{M}$), contraídas com serotonina (5-HT; $1 \mu\text{M}$) e sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina (Nif; $0,01 - 1 \mu\text{M}$). As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo e # $p < 0,05$ e ### $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

Além disso, o envolvimento dos canais de Ca^{2+} na resposta vascular induzida pelo BPA e pelo BPF foi avaliado em anéis de HUAs incubados e contraídos com KCl 60 mM e posteriormente submetidos a diferentes concentrações de Nif (0,01 μM – 1 μM) (Figura 17). Os resultados demonstraram interações estatísticas significativas entre a incubação de BPA ou BPF e as concentrações de SNP ($p \leq 0,001$) (Tabela A8). No grupo controlo (sem incubação), após a contração induzida por KCl, a Nif induziu o relaxamento dos anéis de HUAs, sendo que o efeito máximo foi observado para a concentração de 1 μM de Nif ($97,21 \pm 3,09\%$), tal como se verificou para a 5-HT. Relativamente aos anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 μM , observou-se uma diminuição da resposta vasorelaxante para as concentrações de 0,1 ($p \leq 0,001$) e 1 μM de Nif ($p < 0,05$), em comparação com o grupo controlo. Já para os anéis incubados com BPA 0,2 μM os dados demonstraram um efeito significativamente relaxante, embora tenha sido constatada uma diminuição acentuada da resposta vasorelaxante para todas as concentrações de Nif, em comparação com o grupo controlo ($p < 0,01$ e $p \leq 0,001$). Por outro lado, para os anéis de HUAs incubados com BPA 20 μM observou-se que o relaxamento induzido pela concentração de 0,01 μM de Nif aumentou significativamente em comparação com o grupo controlo ($p \leq 0,001$), ao contrário do que se verificou nas concentrações de 0,1 e 1 μM de Nif, em que os relaxamentos induzidos foram significativamente inferiores ($p < 0,01$). No que diz respeito aos anéis de HUAs incubados com BPF, verifica-se um aumento da resposta vasorelaxante induzido por Nif 0,01 (para todas as incubações; $p \leq 0,001$) e 0,1 μM (para as incubações de BPF 0,2 e 20 μM ; $p < 0,01$ e $p \leq 0,001$, respetivamente). No entanto, tal como pode ser observado na Figura 17, quando os anéis de HUAs incubadas com BPF 20 μM eram sujeitas à ação da Nif 0,01 μM , a resposta vasorelaxante era muito exacerbada ($99,71 \pm 1,01\%$). Deste modo, houve necessidade de avaliar também quais os efeitos que as concentrações inferiores de Nif (0,0001 e 0,001 μM) causavam na resposta vascular, para podermos avaliar se o efeito observado era aditivo ou similar (Figura 17a). Assim, verificou-se que para ambas as concentrações é possível observar um efeito significativamente relaxante (Nif 0,0001: $32,79 \pm 3,25\%$; Nif 0,001: $52,79 \pm 6,44\%$). Globalmente, o relaxamento induzido por todas as concentrações de Nif (0,01 a 1 μM) foi significativamente menor ($p < 0,05$ e $p \leq 0,001$) para todas os anéis de HUAs incubados com concentrações de BPA (0,002; 0,2 e 20 μM) do que para os anéis de HUAs incubados com concentrações de BPF (0,002; 0,2 e 20 μM).

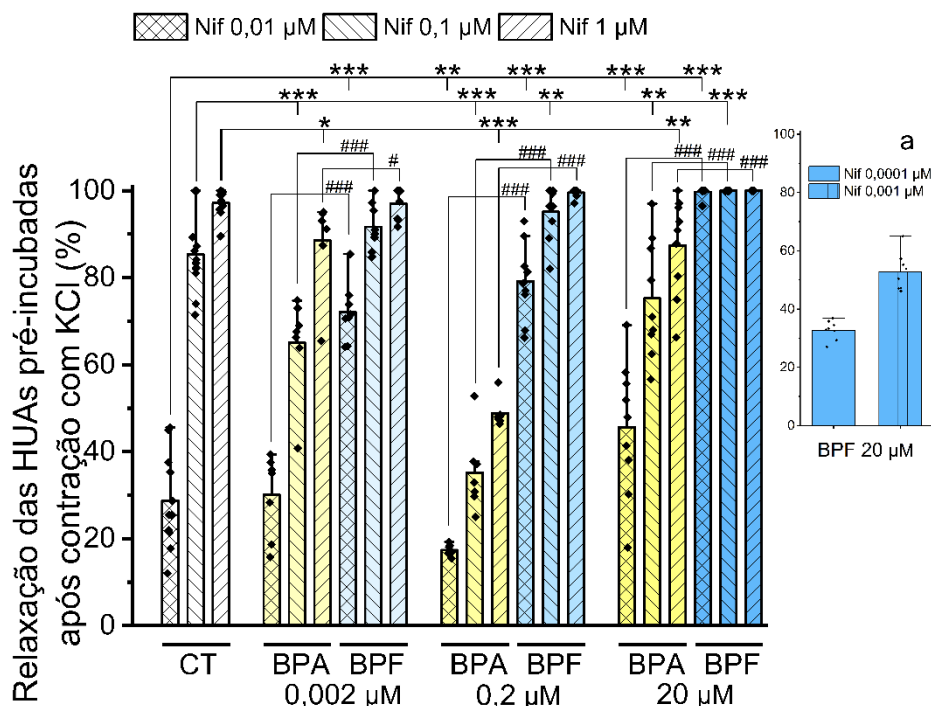


Figura 17. Percentagem (%) de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM), contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina (Nif; 0,01 – 1 μM). A percentagem de relaxação das HUAs incubadas com BPF 20 μM , contraídas com KCl e sujeitas a concentrações cumulativas de Nif (0,0001 – 1 μM) está representada na figura (a), tendo-se observado um efeito aditivo. As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo e # $p < 0,05$ e ### $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o BPA.

4.2. Estudos de contratilidade celular

De modo a ser possível avaliar a contratilidade celular das HUASMCs recorreu-se à técnica de PCSA. Ao nível celular apenas foi possível analisar os efeitos causados pelos BPF e BPS, sendo que futuramente pretendemos também avaliar o efeito do BPA para se poder efectuar uma comparação quanto ao nível de toxicidade.

4.2.1. Efeitos vasculares diretos dos bisfenóis na contratilidade das HUASMCs induzida por 5-HT

De modo a avaliar os efeitos diretos do BPS e do BPF (2 e 20 μM) a nível celular, as HUASMCs foram contraídas com 5-HT 1 μM (Figura 18). Os resultados não demonstraram interações estatísticas significativas entre os compostos (etanol, BPS e BPF) e as concentrações adicionadas ($p = 0,391$) (Tabela A9). Contudo, foram encontradas diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações de bisfenóis e o grupo de controlo. Isto é, tal como está evidenciado na Figura 19, o BPS e o BPF em ambas as concentrações, induziram um efeito relaxante nas HUASMCs – tal como pode ser observado pela diminuição do valor

de redução de área compensada. Estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo dos efeitos vasculares diretos na contratilidade das HUAs induzida pela 5-HT, pela técnica de Banho de Órgãos. Além disso, tal como foi observado ao nível das HUAs, também nas HUASMCs o efeito relaxante induzido pelo BPS 2 e 20 μM foi semelhante ao induzido pelo BPF para as mesmas concentrações, não tendo, por isso, sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela A9).

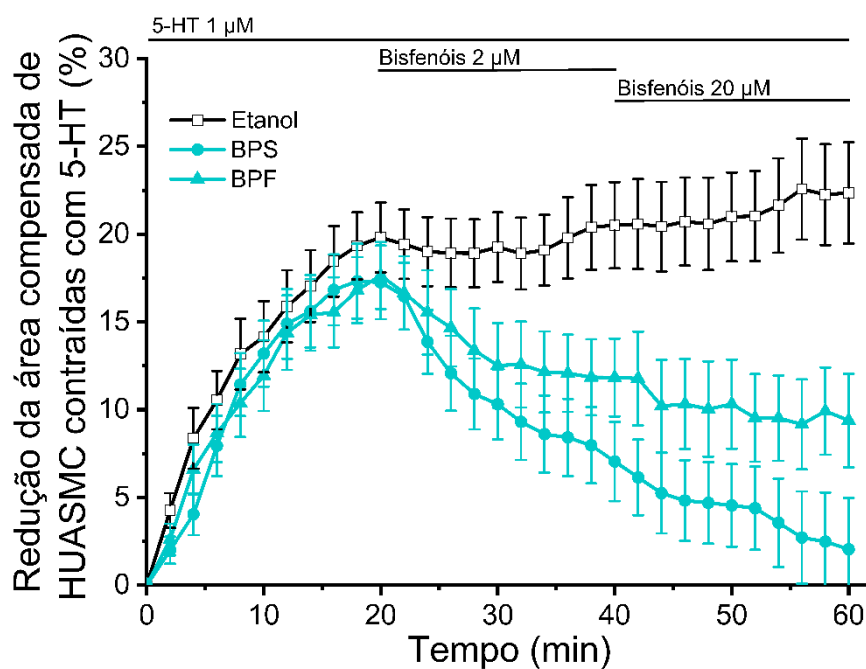


Figura 18. Perfil temporal de contração induzida por serotonina (5-HT; 1 μM), seguida de relaxamento induzido pelo BPS e BPF (0 μM – 20 μM) em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de redução da área compensada que avalia variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. Os pontos representam a média e as linhas verticais o erro padrão (S.E.M.).

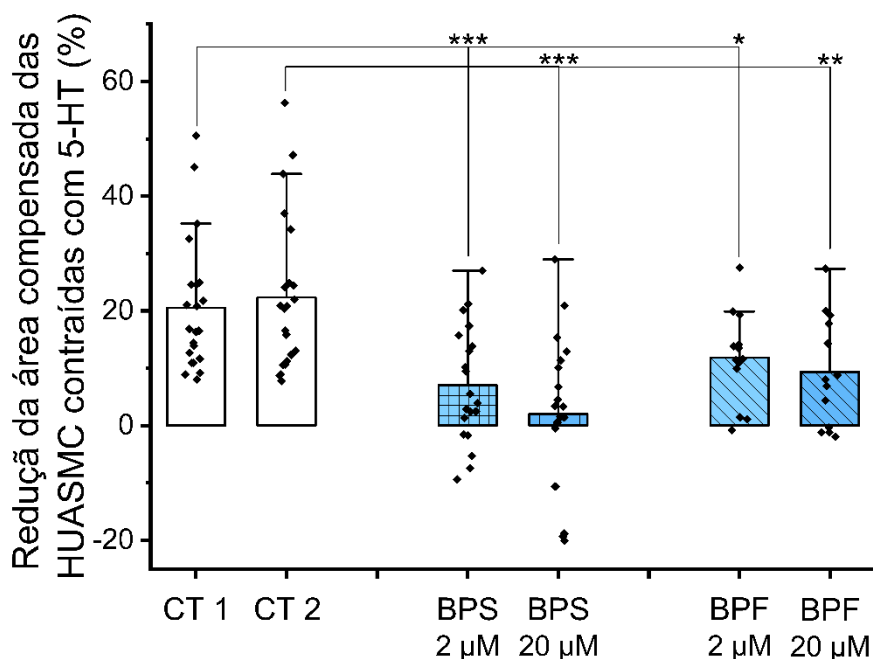


Figura 19. Efeito do BPS e do BPF (0 μM – 20 μM) sobre as células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs) contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de redução da área compensada que avalia variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle.

4.2.2. Efeitos dos bisfenóis na vasculatura das HUAs contraídas por 5-HT

De modo a avaliar os efeitos genómicos do BPS e do BPF 20 μM , as HUASMCs foram incubadas durante 24 horas com estes bisfenóis, sendo que posteriormente foram contraídas com 5-HT 1 μM (Figura 20). Tanto para as HUASMCs incubadas com BPS, como para as HUASMCs incubadas com BPF, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com os grupos controlo e entre si ($p = 0,077$). Portanto, verifica-se que ambos os compostos nestas concentrações não modificaram a resposta contrátil à 5-HT, tal como já tinha sido previamente observado na técnica de Banho de Órgãos para o BPF.

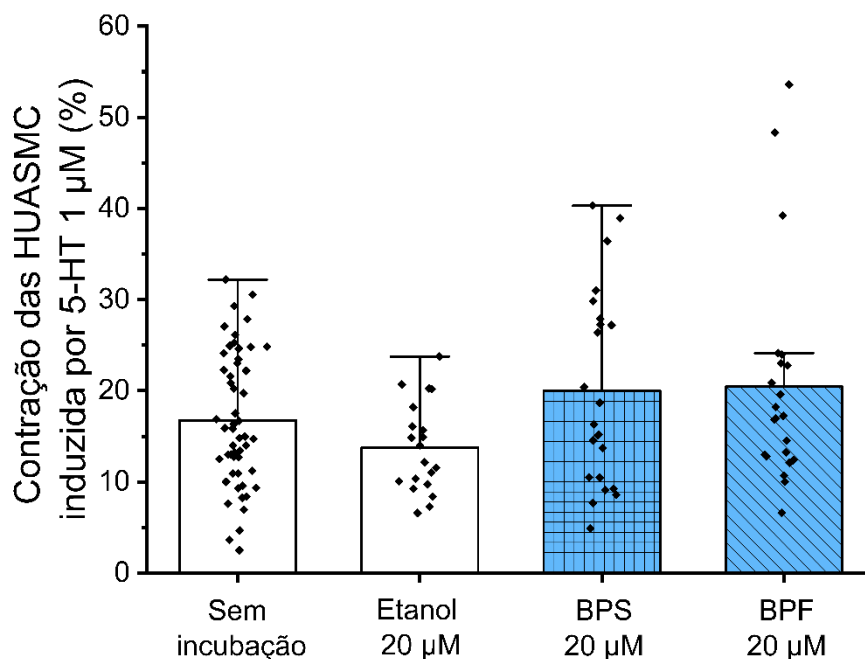


Figura 20. Efeito da serotonina (5-HT; 1 µM) sobre as células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs) incubadas com BPS ou BPF (0 µM – 20 µM). As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *one-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*.

4.2.3. Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na relaxação das HUASMCs induzida pelos bisfenóis

Após as HUASMCs terem sido incubadas durante 24 horas com BPS ou BPF 20 µM, foi estudado o envolvimento dos nucleótidos cíclicos na resposta celular induzida por estes bisfenóis. Para tal, as HUASMCs incubadas e contraídas com 5-HT 1 µM foram submetidas à ação do SNP 10 µM (Figura 21). Contudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as diferentes incubações de bisfenóis e o grupo de controlo ($p=0,602$) (Figura 22). Estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo BPF, pela técnica de Banho de Órgãos.

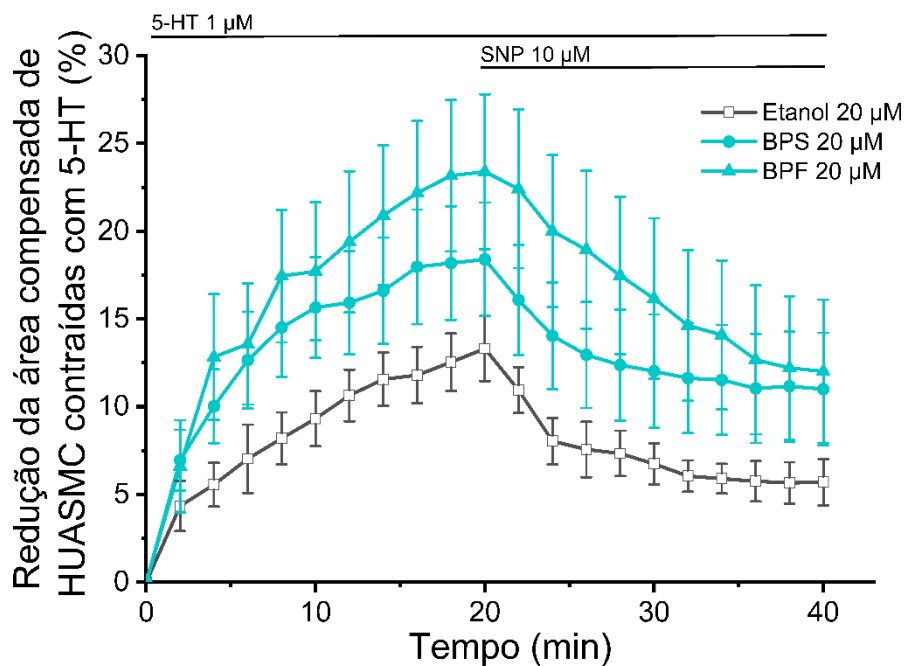


Figura 21. Perfil temporal de contração induzida por serotonina (5-HT; 1 µM), seguida de relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP; 10 µM) em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASCs). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de redução da área compensada que avalia variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. Os pontos representam a média e as linhas verticais o erro padrão (S.E.M.).

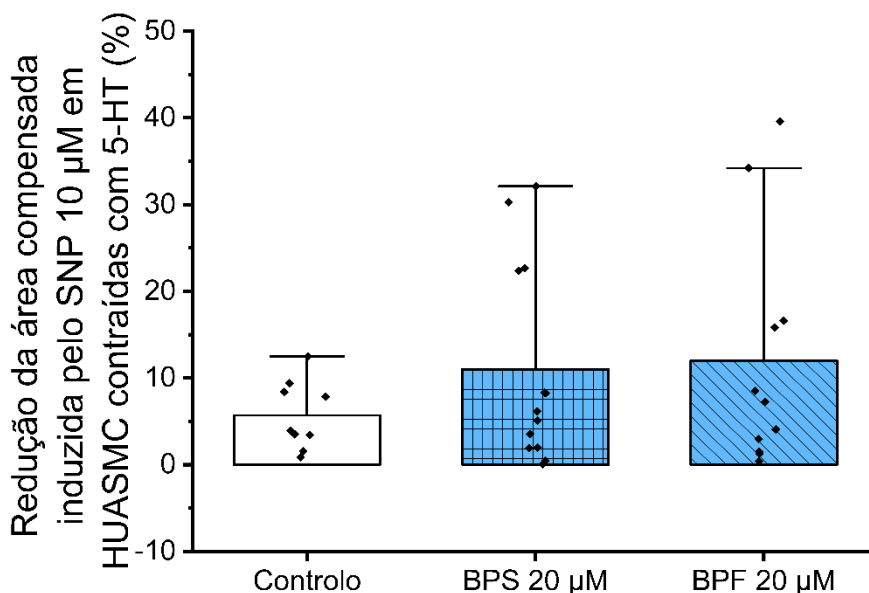


Figura 22. Percentagem (%) de redução da área compensada das células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASCs), contraídas com serotonina (5-HT; 1 µM) e sujeitas ao nitroprussiato de sódio (SNP; 10 µM). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de redução da área compensada que avalia variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *one-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*.

4.2.4. Análise do envolvimento dos canais de cálcio na relaxação das HUASMCs induzida pelos bisfenóis

Após as HUASMCs terem sido incubadas durante 24 horas com BPS ou BPF 20 μM , foi também estudado o envolvimento dos canais de Ca^{2+} na resposta celular induzida por estes bisfenóis. Para tal, as HUASMC incubadas e contraídas com 5-HT 1 μM foram submetidas à ação da Nif 1 μM (Figura 23). Relativamente às HUASMC incubadas com BPS 20 μM , observou-se um aumento significativo do valor de redução de área compensada induzida pela Nif 1 μM , em comparação com o controlo ($p=0,017$) (Figura 24). Isto é, verificou-se que nestas células o efeito relaxante induzido pela Nif foi inferior ao observado no grupo controlo. Já no caso das HUASMCs incubadas com BPF 20 μM , a resposta relaxante induzida pela Nif foi semelhante à do grupo controlo, não tendo sido observadas diferenças significativas ($p=0,889$). Estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo BPF, pela técnica de Banho de Órgãos. Relativamente aos efeitos da Nif entre os dois bisfenóis, verificou-se que o valor de redução de área compensada foi superior para as HUASMCs incubadas com BPS 20 μM do que para as HUASMCs incubadas com BPF 20 μM ($p=0,024$). Ou seja, o efeito relaxante induzido pela Nif foi inferior nas células incubadas com 20 μM BPS.

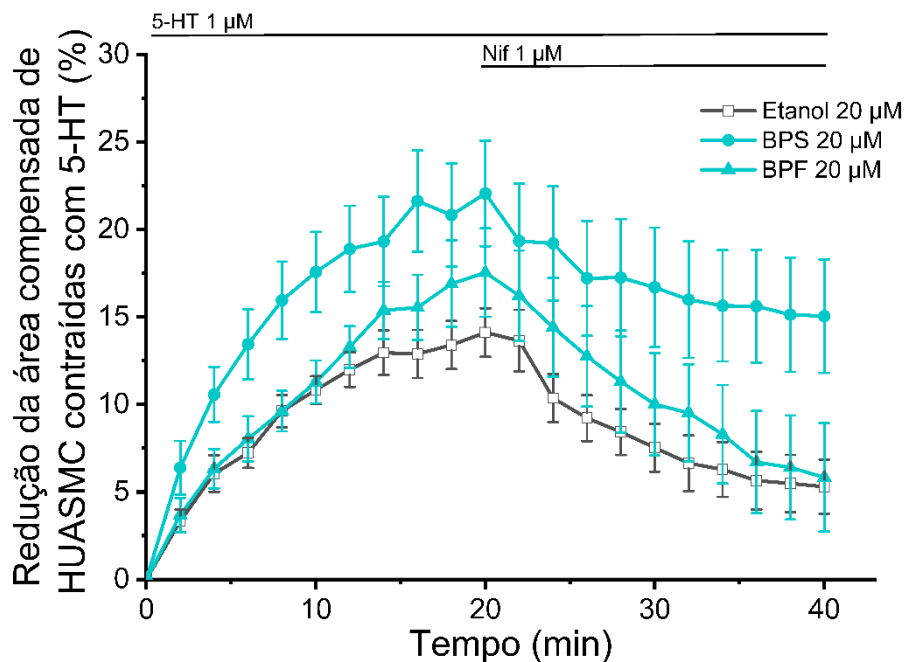


Figura 23. Perfil temporal de contração induzida por serotonina (5-HT; 1 μM), seguida de relaxamento induzido pela nifedipina (Nif; 1 μM) em células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de redução da área compensada que avalia variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. Os pontos representam a média e as linhas verticais o erro padrão (S.E.M.).

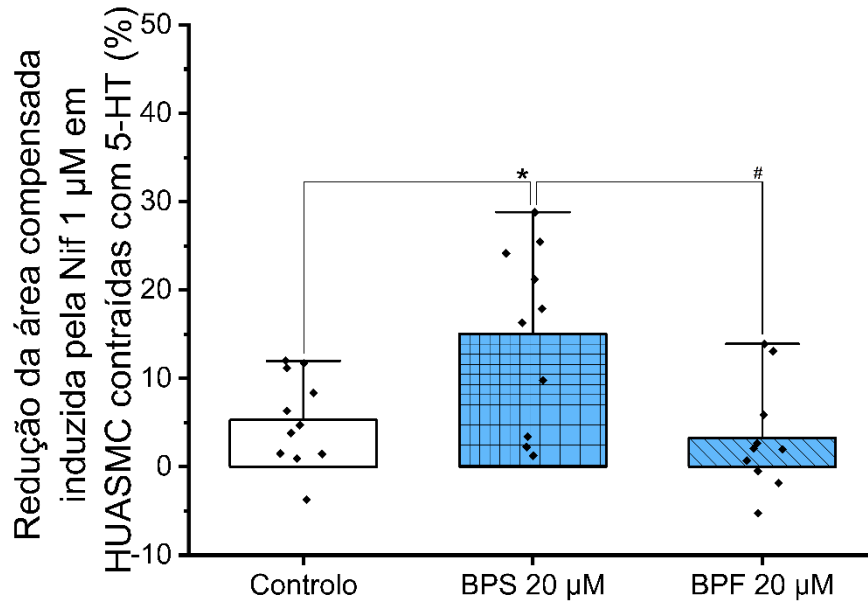


Figura 24. Percentagem (%) de redução da área compensada das células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM) e sujeitas à nifedipina (Nif; 1 μM). Os resultados estão expressos em percentagem (%) de redução da área compensada que avalia variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média, as linhas verticais o desvio padrão (S.D.) e os pontos o número de anéis (n) utilizados. A análise estatística foi realizada pelo teste de *one-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak*, onde * $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo e # $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas entre os bisfenóis.

5. Discussão

Ao longo dos anos, os compostos análogos do BPA, tais como o BPF e BPS, têm vindo a substituir o BPA em diversos produtos do quotidiano, visto que a exposição a este composto tem vindo a ser associada ao desenvolvimento de diversas patologias, nomeadamente no sistema cardiovascular [9, 172]. Porém, recentemente têm vindo a ser levantadas questões quanto à segurança e aos benefícios desta substituição. De facto, alguns estudos já relacionaram a exposição a estes substitutos do BPA com a perturbação do normal funcionamento e morfologia do sistema cardiovascular. Por exemplo, a exposição aos bisfenóis já foi associada com alterações na frequência cardíaca [41, 159, 165], no tamanho de diversas regiões do coração [21, 160, 161] e com modificações nas correntes de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ [165].

Deste modo, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos que BPF e o BPS exercem ao nível da vasculatura de grávidas, a fim de tentar perceber se, por sua vez, estes são mais prejudiciais ou não do que os causados pelo BPA. Para tal, numa primeira fase, foram efetuados estudos de contratilidade arterial em HUAs através da técnica de Banho de Órgãos. Para isso, o endotélio foi previamente removido das HUAs de modo a garantir que os efeitos observados se deviam apenas à ação do BPA, BPS ou BPF sobre o músculo liso.

Inicialmente, foram feitos estudos para avaliar os efeitos vasculares diretos destes bisfenóis sobre a contratilidade das HUAs. Deste modo, aos anéis de HUAs não incubados e contraídos com 5-HT ou KCl foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de BPA, BPS, BPF ou etanol (controlo). Em ambos os casos, os resultados demonstraram que o efeito induzido pelos compostos adicionados depende da concentração, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (BPA/BPS/BPF/etanol vs. concentração adicionada). Isto é, de um modo geral, verificou-se que os três bisfenóis induzem relaxamentos a curto prazo e dependentes da concentração nas HUAs sem endotélio quando estas foram contraídas por ambos os agentes vasoativos. Além disso, os resultados demonstraram que estes bisfenóis causam efeitos rápidos e reversíveis. Visto que o endotélio não estava presente nestes anéis de HUAs, podemos concluir que os efeitos vasorelaxantes observados não estão relacionados com a síntese de NO, ou seja, estes efeitos são independentes de endotélio. Estes resultados estão em concordância com o observado num estudo efetuado pelo nosso grupo de investigação em que também foram avaliados os efeitos rápidos do BPA em HUAs sem endotélio [173]. Por outro lado, verificou-se que o relaxamento máximo induzido pelos bisfenóis foi atingido para a concentração máxima adicionada (100 μM). Já comparando os efeitos vasorelaxantes entre o BPA e os seus substitutos, verifica-se que o BPS apresentou efeitos superiores para todas as concentrações testadas, quando as HUAs foram contraídas com ambos os agentes vasoativos.

Relativamente ao BPF verificou-se que os efeitos vasorelaxantes foram superiores aos observados para o BPA para todas as concentrações adicionadas (exceto para a concentração 0,002 μM) e para a concentração de 100 μM quando as HUAs foram contraídas com 5-HT e KCl, respetivamente. Já quando comparámos os efeitos causados pelos dois substitutos do BPA, verificámos que para ambos os agentes contráteis, a concentração de BPF 100 μM induz uma maior relaxação nos anéis de HUAs do que o BPS 100 μM . De facto, estes resultados estão de acordo com um estudo efetuado pelo nosso grupo de investigação, em artérias aorta de rato contraídas com KCl [174]. Isto é, analisando os resultados obtidos no trabalho efetuado por Vicente et al., verificamos que também em artérias aorta de rato contraídas com KCl, o BPS e o BPF aparentam ter um efeito vasodilatador maior do que o BPA e que, sua vez, para as concentrações mais elevadas o BPF induz efeitos mais pronunciados do que o BPS [174]. Estes resultados são concordantes com um estudo efetuado em embriões de peixe zebra em que se verificou que a exposição ao BPF induziu efeitos mais cardiotoxicos do que o BPS [157]. Mais especificamente, os autores verificaram que a exposição ao BPF e BPS estava associada ao desenvolvimento de edema cardíaco [157]. Porém, para além disso, a exposição ao BPF foi ainda relacionada com o aparecimento de hemorragias cranianas, que os autores pensam poderem estar relacionadas com o enfraquecimento da rede de vasos sanguíneos locais [157]. Por outro lado, neste trabalho verificou-se ainda que para concentrações intermédias (0,2; 2 e 20 μM) o BPS revelou efeitos vasorelaxantes significativamente superiores aos do BPF, quando os anéis de HUAs foram contraídos com KCl, contudo o mesmo não foi observado nas artérias aorta de rato [174]. Portanto, de um modo geral, verifica-se que o BPA, BPS e BPF induzem efeitos não genómicos sobre os anéis de HUAs.

Concordantemente, os resultados a nível celular, recorrendo à técnica de PCSA, demonstraram que o efeito induzido pelos bisfenóis depende da concentração, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (BPS/BPF/etanol vs. concentração adicionada). Além disso, também nas HUASMCs o BPS e o BPF induziram efeitos relaxantes significativos, similares entre si. Assim sendo, os nossos resultados sugerem que ambos os substitutos do BPA induzem um vasorelaxamento direto e independente do endotélio nas HUAs. Estes resultados estão em concordância com diferentes estudos com outros EDCs a nível arterial [97, 98, 170].

Por outro lado, estudos recentes têm documentado a acumulação dos substitutos do BPA em amostras de plasma materno, cordão umbilical e placenta [37, 130-133], sugerindo a sua bioacumulação nestes tecidos e uma possível transferência materno-fetal, como já evidenciada em modelos animais [33, 175, 176] e humanos [37, 132, 133]. Deste modo, podemos colocar a hipótese, que para além dos efeitos vasorelaxantes rápidos induzidos

pelos bisfenóis, estes possam também exercer efeitos a longo-prazos na grávida e no feto, resultantes desta bioacumulação.

Com base nesta suposição, o passo seguinte deste trabalho foi avaliar quais os efeitos vasculares de longo prazo, ou seja, os efeitos genômicos associados à exposição aos bisfenóis. Para este propósito, alguns anéis de HUAs sem endotélio foram incubados com BPA e BPF (0,002; 0,2 e 20 μM) durante 24 horas, sendo que depois foram contraídos com os agentes vasoativos 5-HT e KCl. Relativamente às contrações induzidas por 5-HT verificou-se que quando os anéis de HUAs foram incubados com BPA, a capacidade contrátil dos mesmos reduziu em comparação com o controlo. Estes resultados sugerem que a exposição prolongada a este bisfenol poderá modular a homeostase vascular, interferindo com os recetores de 5-HT (5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} e 5-HT₇). Isto é, os dados parecem indicar que o BPA poderá diminuir a expressão ou atividade dos recetores 5-HT_{2A} (acoplado a uma proteína G_q) e 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} (acoplado a uma proteína G_{i/o}) e, conseqüentemente, reduzir a capacidade contrátil dos anéis de HUAs. Por outro lado, este efeito também poderá estar relacionado com o aumento da atividade ou expressão do recetor 5-HT₇ (acoplado a uma proteína G_s), desencadeando um efeito vasorelaxante fraco. Deste modo, o balanço dos mecanismos que culminam na contração das HUAs poderá estar alterado. Isto é, por um lado as vias intracelulares que promovem a contração (relacionadas com os recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}) poderão estar diminuídas e as que induzem um vasorelaxamento fraco poderão estar aumentadas (relacionados com o recetor 5-HT₇), o que, por conseguinte, poderá diminuir a capacidade contrátil das HUAs. Este efeito também já foi observado quando as HUAs foram expostas durante 24 horas a outros EDCs, nomeadamente, ao tributyl estanho (TBT; 100 μM) [97] e ao tetrabromobisfenol A (2,6-dibromo-4-[2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol; TBBPA; 50 μM) [98]. No entanto, no trabalho realizado por Fonseca et al. a incubação com diferentes concentrações de BPA não pareceu alterar as contrações induzidas por 5-HT, em relação ao controlo [173]. Por outro lado, quanto às contrações induzidas por KCl verificou-se que quando os anéis de HUAs foram incubados com BPA 0,002 e 0,2 μM , a capacidade contrátil dos mesmos também reduziu em comparação com o controlo. Deste modo, estes resultados parecem indicar que a capacidade contrátil do KCl depende da exposição a diferentes concentrações deste bisfenol. Além disso, os resultados sugerem ainda que a exposição continuada a concentrações reduzidas de BPA poderá modular a homeostase vascular interferindo também com os canais de Ca²⁺, nomeadamente, com os LTCC. Isto é, estas concentrações de BPA poderão diminuir a expressão ou abertura destes canais, reduzindo o influxo de Ca²⁺ e, conseqüentemente, a capacidade contrátil das HUAs [70]. Há ainda a assinalar que já foram observados resultados semelhantes para HUAs incubadas durante 24 horas com TBBPA 50 μM [98]. Porém, mais uma vez, no trabalho efetuado por Fonseca et al., a incubação com

diferentes concentrações de BPA não pareceu alterar significativamente a resposta contrátil das HUAs ao KCl [173]. Já no que diz respeito ao BPF, verifica-se que nenhuma das incubações alterou a resposta vasocontrátil induzida por ambos os agentes vasoativos, em comparação com o controlo. Estes primeiros resultados parecem sugerir que o BPF pode ser menos prejudicial para o sistema cardiovascular do que o BPA, como sugerido por Prudencio et al. [165].

Numa segunda fase, foi avaliado o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de Ca^{2+} na vasorelaxação das HUAs induzida pelo BPA e pelo BPF, visto que os principais mecanismos responsáveis por este processo ocorrem por ativação da via NO/sGC/cGMP/PKG e/ou por ativação/inibição de canais iónicos [69].

Para avaliar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos, foram estudados os efeitos de diferentes concentrações de SNP (um estimulador da sGC) em HUAs incubadas com BPA ou BPF (0,002; 0,2 e 20 μ M) e contraídas com 5-HT ou KCl. Nas artérias não incubadas e contraídas com 5-HT ou KCl, verificou-se que o SNP induziu um efeito relaxante, tal como foi observado noutros estudos [69, 98, 112, 113].

Relativamente às artérias incubadas com BPA ou BPF e contraídas com 5-HT, os resultados demonstraram que o efeito induzido pelo SNP depende da concentração de bisfenóis incubada, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (incubação com BPA/BPF vs. concentração de SNP). Os anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 e 0,2 μ M apresentaram um aumento significativo no relaxamento induzido pelo SNP (0,1; 1 e 10 μ M), em comparação com o controlo. Foi observado o mesmo padrão de relaxamento nos anéis de HUAs incubados com as mesmas concentrações de BPF (0,002 e 0,2 μ M) para as concentrações de SNP 0,01 a 10 μ M. Por oposição, nas artérias incubadas com BPA 20 μ M e BPF 20 μ M, o relaxamento induzido pelo SNP diminuiu em comparação com o controlo para as concentrações de SNP de 1 a 100 μ M e para todas exceto 10 μ M, respetivamente. Contudo, comparando os efeitos do SNP entre o BPA e o BPF, verificou-se que o vasorelaxamento observado nos anéis de HUAs incubados com BPA é menor do que nos anéis incubados com BPF. Isto é, estes efeitos foram apresentados por anéis de HUA incubados com: BPA/BPF 0,002 μ M para todas as concentrações de SNP, excetuando a mais elevada; BPA/BPF 0,2 μ M para as concentrações de SNP 0,01 e 0,1 μ M; e BPA/BPF 20 μ M para todas as concentrações de SNP. Deste modo, constata-se que estes dois EDCs parecem partilhar a mesma via de sinalização, no que diz respeito ao envolvimento dos nucleótidos cíclicos, embora a disrupção causada pelo BPF pareça ser mais pronunciada.

Já relativamente às artérias incubadas com BPA ou BPF e contraídas com KCl, os resultados demonstraram que o efeito induzido pelo SNP depende da concentração de bisfenóis incubada, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (incubação com BPA/BPF vs. concentração de SNP). Quanto aos anéis de HUAs incubados com BPA, apenas para a

incubação de 20 μM foi observado um vasorelaxamento superior para a concentração de SNP 0,1 μM , em comparação com o controlo. Já os anéis de HUAs incubados com BPF 0,002 e 0,2 μM demonstraram vasorelaxamentos maiores para as concentrações de SNP 0,1 a 100 μM e SNP 0,1 a 10 μM , respetivamente. Já nos anéis de HUAs incubados com BPF 20 μM , a vasorelaxação induzida pelo SNP 1; 10 e 100 μM foi significativamente inferior ao grupo controlo. Comparando os efeitos do SNP (0,1 a 100 μM) entre o BPA e o BPF 0,002 e 0,2 μM , verificou-se que o vasorelaxamento observado nos anéis de HUAs incubados com BPA é menor. No entanto, nos anéis de HUAs incubados com BPA 20 μM , a vasorelaxação induzida pelo SNP (0,1 a 100 μM), foi superior à verificada nos anéis de HUAs incubados com BPF 20 μM .

Assim sendo, nos anéis de HUAs contraídos com 5-HT, o mecanismo vascular de ambos os bisfenóis parece ativar a via de sinalização cíclica dos nucleótidos (NO/sGC/cGMP/PKG) para as incubações de 0,002 e 0,2 μM , sendo que esta parece ser mais ativada pelo BPF do que pelo BPA. Pelo contrário, no caso das HUAs incubadas com BPA/BPF 20 μM a atividade desta via parece estar diminuída, principalmente nas HUAs incubadas com BPA, induzindo dessa forma uma diminuição da resposta vasorelaxante. Relativamente às HUAs contraídas com KCl e incubadas com BPA 20 μM e BPF 0,002 e 0,2 μM a via de sinalização cíclica dos nucleótidos NO/sGC/cGMP/PKG parece estar ativada, principalmente nas HUAs incubadas com BPF. Por oposição, o mecanismo vascular induzido pelo BPF 20 μM parece reduzir a ativação desta via de sinalização, o que culmina numa resposta vasorelaxante inferior. Concordantemente, em 2022, Fatai et al. também verificaram em 80 ratos machos Wistar que após a exposição ao BPF (10, 30 e 50 mg/kg) por via oral, as concentrações plasmáticas de NO e de cGMP no músculo liso do corpo cavernoso do pénis, estavam diminuídas em todos os grupos expostos [177]. Além disso, verificaram que estas alterações eram diretamente dependentes da dose (nas doses mais elevadas a redução era maior) e não aparentavam ser reversíveis após 28 dias de cessão do tratamento. Deste modo, os autores sugeriram que o BPF ao perturbar esta via de sinalização poderá afetar negativamente a qualidade da performance sexual e consequentemente a qualidade da descendência [177]. Por outro lado, a diminuição da produção de NO, após exposição ao BPA (10 e 25 mg/kg) também já foi observada em corações de ratos machos Wistar [178]. Esta alteração poderá promover o aumento de stress oxidativo e posteriormente o desenvolvimento de CVD, nomeadamente, de hipertensão [178]. Assim, segundo estes autores, os nossos resultados também poderão indicar que tanto o BPA como o BPF, ao perturbarem esta via de sinalização, podem ser promotores do desenvolvimento de CVD, como já reportado em diferentes investigações [167, 169, 172].

Por outro lado, para avaliar o envolvimento dos canais de Ca^{2+} , nomeadamente dos LTCC, na vasorelaxação das HUAs induzida pelos bisfenóis, foram estudados os efeitos de

diferentes concentrações de Nif (antagonista específico dos LTCC) em HUAs incubadas com BPA ou BPF (0,002; 0,2 e 20 μM) e contraídas com 5-HT e KCl. Nas artérias não incubadas e contraídas com 5-HT ou KCl, verificou-se que a Nif induziu um efeito relaxante, tal como foi observado noutros estudos [69, 98].

Relativamente às artérias incubadas com BPA ou BPF e contraídas com 5-HT, os resultados demonstraram que o efeito induzido pela Nif depende da concentração de bisfenóis incubada, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (incubação com BPA/BPF vs. concentração de Nif). Relativamente aos anéis de HUAs incubados com BPA (0,002 e 20 μM) e BPF (0,002 a 20 μM) e contraídos com 5-HT, verificou-se que o relaxamento induzido por todas as concentrações de Nif foi significativamente superior ao do grupo de controlo (exceto pela Nif 1 μM no caso das HUAs incubadas com BPF 0,2 e 20 μM). Já na incubação de BPA 0,2 μM o relaxamento induzido pela Nif 0,01 μM também foi superior ao grupo controlo, mas o relaxamento induzido pela Nif 0,1 μM foi inferior. Comparando os efeitos da Nif entre o BPA e o BPF 0,002 e 0,2 μM (para as concentrações de Nif 0,01 e 1 μM e de Nif 0,01 e 0,1 μM , respetivamente) o vasorelaxamento induzido foi inferior para os anéis de HUAs incubados com BPA. Pelo contrário, nos anéis de HUAs incubados com BPA e BPF 20 μM , o vasorelaxamento induzido pela Nif 0,1 e 1 μM foi inferior nos anéis de HUAs incubados com BPF. Portanto, embora se verifiquem algumas diferenças, ambos os bisfenóis parecem modificar influxo de Ca^{2+} . Isto é, para incubações mais baixas o BPF parece apresentar um efeito inibidor maior sobre os canais de Ca^{2+} , nomeadamente sobre os LTCC, do que o BPA, ao contrário do que se observa para a incubação mais elevada.

Já relativamente às artérias incubadas com BPA ou BPF e contraídas com KCl, os resultados demonstraram que o efeito induzido pela Nif depende da concentração de bisfenóis incubada, uma vez que houve uma interação entre os dois fatores (incubação com BPA/BPF vs. concentração de Nif). Quanto aos anéis de HUAs incubados com BPA 0,002 μM e BPA 0,2 μM e contraídas com KCl, o efeito vasorelaxante induzido por todas as concentrações de Nif (exceto pela Nif 1 μM no caso das HUAs incubadas com BPA 0,002 μM) foi inferior ao observado no grupo controlo. Já na incubação de BPA 20 μM , o efeito da Nif foi superior para a concentração de 0,01 μM e inferior para as concentrações de 0,1 e 1 μM , em relação ao controlo. Portanto, verifica-se que nas HUAs incubadas com BPA e contraídas com KCl, existe uma relação não linear entre a dose da incubação e os efeitos observados, ou seja, observa-se uma resposta típica de não-monotocidade [152, 179, 180]. Estes resultados são concordantes com o estudo de Feiteiro et al. onde se verificou que em SMCs da linha celular A7r5, o BPA inibiu as correntes de Ca^{2+} associadas aos LTCC de uma forma não linear [152]. Esta relação complica a definição de limites de dose de exposição que não acarretem efeitos mais nocivos para a saúde humana, visto que se observa que a exposição a concentrações reduzidas deste bisfenol pode estar associada a alterações na vasorelaxação das HUAs. Isto

pode ser particularmente preocupante, nomeadamente, nas fases de maior vulnerabilidade como é o caso da gravidez [9]. Já nos anéis de HUAs incubados com BPF (0,002 a 20 μM) e contraídos com KCl, verificou-se que o relaxamento induzido pela Nif 0,01 e 0,1 μM foi significativamente superior ao do grupo de controlo (exceto pela Nif 0,1 μM no caso das HUAs incubadas com BPF 0,002 μM). Por outro lado, nos anéis de HUAs incubados com BPF 20 μM verificou-se que a Nif 0,01 μM induziu um vasorelaxamento de cerca de 100%, pelo que surgiu a necessidade de avaliar os efeitos causados por concentrações mais baixas de Nif para ser possível avaliar se os efeitos eram aditivos ou similares. Deste modo, verificou-se que para as concentrações de Nif 0,0001 e 0,001 já foi possível observar uma resposta vasorelaxante menos pronunciada do que para as concentrações mais elevadas, evidenciando que os efeitos observados são aditivos. Desta forma, verifica-se que a exposição a longo prazo a esta incubação de BPF parece perturbar de forma bastante significativa a resposta vasorelaxante das HUAs. Além disso, comparando os efeitos da Nif entre o BPA e o BPF, constatou-se que o relaxamento induzido por todas as concentrações de Nif foi inferior para todos os anéis de HUAs incubados com BPA do que com BPF. Portanto, os resultados parecem demonstrar que o BPF apresenta um efeito inibidor maior do que o BPA sobre os canais de Ca^{2+} , nomeadamente sobre os LTCC.

Deste modo, os resultados parecem indicar que o BPA e o BPF podem modificar o mecanismo de ação da Nif, interferindo com o influxo de Ca^{2+} . Isto é, estes bisfenóis parecem apresentar o mesmo modo de ação que a Nif, atuando, por isso, como inibidores competitivos, ou seja, ambos inibem os LTCC, induzindo a vasorelaxação. De facto, ao longo dos anos, têm sido efetuados alguns estudos em que se avaliaram os efeitos que a exposição ao BPA pode causar ao nível da homeostase do Ca^{2+} [152, 181-183]. De um modo geral, através de experiências de *Patch Clamp*, verificou-se que este EDC conseguiu inibir os canais iónicos presentes em diversos tipos de células, tais como, SMCs da linha celular A7r5 e em corações de rato excisados, inibindo as correntes de Ca^{2+} [152, 181-183]. Resultados similares foram obtidos por Prudencio et al. para o BPA, BPS e BPF, em que os autores verificaram que tanto o BPA como o BPF inibiram a atividade dos LTCC nestas células, inibindo assim as correntes iónicas associadas aos mesmos. Assim, segundo estes autores, os nossos resultados também poderão indicar que tanto o BPA como o BPF, ao perturbarem o influxo de Ca^{2+} , podem prejudicar a homeostase vascular das HUAs e, conseqüentemente, promover o desenvolvimento de CVD, visto que as alterações na homeostase deste ião já foram associadas ao desenvolvimento destas patologias [9].

Por fim, importa referir que a análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de Ca^{2+} na relaxação das HUASMCs foi também avaliada. Isto é, os efeitos induzidos pelo SNP 10 μM e pela Nif 1 μM foram avaliados em HUASMC incubadas durante 24 horas com BPF 20 μM . Verificou-se que os resultados obtidos são concordantes com os observados

pela técnica de Banho de Órgãos, o que reforça a robustez dos dados. Além disso, embora os efeitos da exposição prolongada ao BPS não tenham sido avaliados pela técnica de Banho de Órgãos, o efeito do SNP e da Nif nas concentrações referidas foi avaliado em HUASMCs incubadas com BPS 20 μM , de modo a ser possível ter uma breve ideia dos efeitos causados por este substituto. Deste modo, verificou-se que tal como foi observado nas HUASMCs incubadas com BPF 20 μM , também as células incubadas com BPS 20 μM não apresentaram um relaxamento induzido pelo SNP significativamente diferente do controlo. Estes dados parecem demonstrar que nesta situação os efeitos causados por ambos os substitutos do BPA são semelhantes. Pelo contrário, o relaxamento das HUASMCs incubadas com BPS 20 μM induzido pela Nif foi inferior ao observado para as HUASMCs incubadas com BPF 20 μM e não incubadas. Portanto, estes dados parecem indicar que o BPS pode perturbar os mecanismos relacionados com o influxo de Ca^{2+} . No estudo efetuado por Gao et al., a exposição a concentrações reduzidas deste EDC foi associada à perturbação da homeostase do Ca^{2+} em miócitos ventriculares isolados de corações de rato Sprague-Dawley [41]. No entanto, noutro estudo, a exposição a baixas concentrações deste substituto do BPA foi associada à diminuição da taxa de contração e relaxação de miócitos isolados de corações de murganhos CD-1 [42]. Por outro lado, no trabalho efetuado por Prudencio e colaboradores, verificou-se que o BPS não alterou nenhum dos parâmetros de eletrofisiologia cardíaca testados [165]. Deste modo, percebe-se que os estudos realizados até ao momento não são muito concordantes entre si quanto aos potenciais efeitos do BPS na homeostase vascular, pelo que devem continuar a ser efetuadas mais investigações.

Em suma, este estudo demonstrou que o BPA, BPS e BPF induzem efeitos não genómicos sobre os anéis de HUAs. Isto é, os resultados parecem indicar que estes bisfenóis induzem relaxamentos a curto prazo e dependentes da concentração nas HUAs sem endotélio, sendo que este efeito foi superior para os substitutos do BPA. A nível genómico, os resultados parecem indicar que o mecanismo contrátil das HUAs incubadas com BPA se encontra alterado, o que parecia sugerir que o BPF poderia ser menos prejudicial para o sistema cardiovascular do que o BPA. Porém, os nossos dados sugerem, que a nível genómico, tanto o BPA e o BPF parecem alterar os principais mecanismos responsáveis pela relaxação das HUAs, tendo-se verificado que, por vezes, a resposta vasorelaxante foi mais modificada após exposição ao BPF do que ao BPA. Por fim, os dados preliminares das experiências de PCSA parecem indicar que o BPS também poderá ter alguns efeitos genómicos nas HUASMCs, nomeadamente ao nível do envolvimento dos canais de Ca^{2+} , o qual poderá estar assim envolvido também no desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Deste modo, estes resultados demonstram que estes substitutos não parecem ser seguros a nível cardiovascular, sendo este o objetivo para o qual também foram desenvolvidos. Assim,

propõe-se a síntese de novos substitutos mais seguros para a saúde humana, nomeadamente a cardiovascular.

6. Conclusão e perspectivas futuras

Este trabalho demonstrou que a exposição ao BPA e aos seus substitutos (BPS e BPF) altera a resposta contrátil das HUAs a nível arterial e celular. Isto é, a nível não genómico, os resultados permitiram observar que os três bisfenóis induziram um relaxamento a curto prazo dependente da concentração, sendo que estes efeitos foram mais pronunciados para os substitutos do que para o BPA.

Por um lado, a nível genómico, os resultados parecem indicar que a capacidade contrátil dos anéis de HUAs incubados com BPA se encontra alterada, ao contrário do que se verifica para o BPF. Por outro lado, a nível genómico verificou-se também que os resultados parecem sugerir que o BPA e o BPF podem interferir com as principais vias responsáveis pela vasorelaxação das HUAs (NO/sGC/cGMP/PKG e ativação/inibição de canais iónicos). Contudo, de um modo geral, os resultados parecem demonstrar que, na exposição a longo prazo, o BPF pode modificar mais a resposta vasorelaxante das HUAs do que o BPA. Deste modo, a substituição do BPA por estes compostos análogos, não aparenta acarretar benefícios para a saúde humana vascular, visto que os nossos dados sugerem que estes bisfenóis podem induzir a modulação da resposta vascular (ainda que com algumas diferenças), nomeadamente, em períodos de maior suscetibilidade como acontece na gravidez. Estas alterações, por sua vez, são muito preocupantes, pois podem aumentar as taxas de morbilidade e mortalidade maternas e fetais.

Assim, é de salientar que futuramente os efeitos vasculares destes EDCs devem continuar a ser avaliados de modo a clarificar os seus modos de ação e implicações futuras na saúde materno-fetal. Por exemplo, os efeitos genómicos associados à exposição ao BPS devem ser estudados, de modo a ser possível compreender melhor quais as consequências associadas, sendo que para tal poderá recorrer-se à técnica de Banho de Órgãos. Além disso, será importante continuar a realizar estudos de contratilidade celular para que se consiga reforçar a robustez dos resultados obtidos nas experiências de contratilidade arterial, ou mesmo para avaliar se existirão diferenças entre as respostas arteriais e celulares. Por outro lado, será importante estudar também quais os efeitos genómicos destes bisfenóis na expressão de genes envolvidos nas propriedades contráteis das HUASMCs.

7. Bibliografia

1. Ghassabian, A.; Trasande, L., Disruption in Thyroid Signaling Pathway: A Mechanism for the Effect of Endocrine-Disrupting Chemicals on Child Neurodevelopment. *Frontiers in endocrinology* **2018**, *9*, 204.
2. Rahman, A.; Kumarathasan, P.; Gomes, J., Infant and mother related outcomes from exposure to metals with endocrine disrupting properties during pregnancy. *The Science of the total environment* **2016**, 569-570, 1022-1031.
3. Bakoyiannis, I.; Kitraki, E.; Stamatakis, A., Endocrine-disrupting chemicals and behaviour: A high risk to take? *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2021**, *35*, (5), 101517.
4. Kelley, A. S.; Banker, M.; Goodrich, J. M.; Dolinoy, D. C.; Burant, C.; Domino, S. E.; Smith, Y. R.; Song, P. X. K.; Padmanabhan, V., Early pregnancy exposure to endocrine disrupting chemical mixtures are associated with inflammatory changes in maternal and neonatal circulation. *Sci Rep* **2019**, *9*, (1), 5422.
5. Gingrich, J.; Ticiani, E.; Veiga-Lopez, A., Placenta Disrupted: Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **2020**, *31*, (7), 508-524.
6. Malaisé, Y.; Lencina, C.; Cartier, C.; Olier, M.; Ménard, S.; Guzylack-Piriou, L., Perinatal oral exposure to low doses of bisphenol A, S or F impairs immune functions at intestinal and systemic levels in female offspring mice. *Environmental health : a global access science source* **2020**, *19*, (1), 93.
7. Banker, M.; Puttabyatappa, M.; O'Day, P.; Goodrich, J. M.; Kelley, A. S.; Domino, S. E.; Smith, Y. R.; Dolinoy, D. C.; Song, P. X. K.; Auchus, R. J.; Padmanabhan, V., Association of Maternal-Neonatal Steroids With Early Pregnancy Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy Outcomes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2021**, *106*, (3), 665-687.
8. Kiess, W.; Häußler, G.; Vogel, M., Endocrine-disrupting chemicals and child health. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2021**, *35*, (5), 101516.
9. Lorigo, M.; Cairrao, E., Fetoplacental vasculature as a model to study human cardiovascular endocrine disruption. *Molecular aspects of medicine* **2021**, 101054.
10. O'Shaughnessy, K. L.; Fischer, F.; Zenclussen, A. C., Perinatal exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopment: How articles of daily use influence the development of our children. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2021**, *35*, (5), 101568.
11. Chen, D.; Kannan, K.; Tan, H.; Zheng, Z.; Feng, Y. L.; Wu, Y.; Widelka, M., Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environmental science & technology* **2016**, *50*, (11), 5438-53.
12. Eckardt, M.; Simat, T. J., Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017. *Chemosphere* **2017**, *186*, 1016-1025.
13. Pelch, K.; Wignall, J. A.; Goldstone, A. E.; Ross, P. K.; Blain, R. B.; Shapiro, A. J.; Holmgren, S. D.; Hsieh, J. H.; Svoboda, D.; Auerbach, S. S.; Parham, F. M.; Masten, S. A.; Walker, V.; Rooney, A.; Thayer, K. A., A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology* **2019**, *424*, 152235.
14. Zhang, Y. F.; Shan, C.; Wang, Y.; Qian, L. L.; Jia, D. D.; Zhang, Y. F.; Hao, X. D.; Xu, H. M., Cardiovascular toxicity and mechanism of bisphenol A and emerging risk of bisphenol S. *The Science of the total environment* **2020**, *723*, 137952.
15. Flint, S.; Markle, T.; Thompson, S.; Wallace, E., Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *Journal of environmental management* **2012**, *104*, 19-34.
16. Rochester, J. R.; Bolden, A. L., Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect* **2015**, *123*, (7), 643-50.

17. Eladak, S.; Grisin, T.; Moison, D.; Guerquin, M. J.; N'Tumba-Byn, T.; Pozzi-Gaudin, S.; Benachi, A.; Livera, G.; Rouiller-Fabre, V.; Habert, R., A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility* **2015**, 103, (1), 11-21.
18. Gramec Skledar, D.; Peterlin Mašič, L., Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environmental toxicology and pharmacology* **2016**, 47, 182-199.
19. Liao, C.; Liu, F.; Guo, Y.; Moon, H. B.; Nakata, H.; Wu, Q.; Kannan, K., Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental science & technology* **2012**, 46, (16), 9138-45.
20. Rosenmai, A. K.; Dybdahl, M.; Pedersen, M.; Alice van Vugt-Lussenburg, B. M.; Wedebye, E. B.; Taxvig, C.; Vinggaard, A. M., Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2014**, 139, (1), 35-47.
21. Mi, P.; Tang, Y. Q.; Feng, X. Z., Acute fluorene-9-bisphenol exposure damages early development and induces cardiotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety* **2020**, 202, 110922.
22. Zhang, H.; Zhang, Y.; Li, J.; Yang, M., Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. *The Science of the total environment* **2019**, 655, 607-613.
23. Liao, C.; Liu, F.; Moon, H. B.; Yamashita, N.; Yun, S.; Kannan, K., Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions. *Environmental science & technology* **2012**, 46, (21), 11558-65.
24. Yamazaki, E.; Yamashita, N.; Taniyasu, S.; Lam, J.; Lam, P. K.; Moon, H. B.; Jeong, Y.; Kannan, P.; Achyuthan, H.; Munuswamy, N.; Kannan, K., Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and environmental safety* **2015**, 122, 565-72.
25. Song, S.; Song, M.; Zeng, L.; Wang, T.; Liu, R.; Ruan, T.; Jiang, G., Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **2014**, 186, 14-9.
26. Česen, M.; Lenarčič, K.; Mislej, V.; Levstek, M.; Kovačič, A.; Cimrmančič, B.; Uranjek, N.; Kosjek, T.; Heath, D.; Dolenc, M. S.; Heath, E., The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *The Science of the total environment* **2018**, 616-617, 744-752.
27. Liao, C.; Liu, F.; Kannan, K., Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environmental science & technology* **2012**, 46, (12), 6515-22.
28. Liao, C.; Kannan, K., Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, 61, (19), 4655-62.
29. Björnsdotter, M. K.; Jonker, W.; Legradi, J.; Kool, J.; Ballesteros-Gómez, A., Bisphenol A alternatives in thermal paper from the Netherlands, Spain, Sweden and Norway. Screening and potential toxicity. *The Science of the total environment* **2017**, 601-602, 210-221.
30. Wu, L. H.; Zhang, X. M.; Wang, F.; Gao, C. J.; Chen, D.; Palumbo, J. R.; Guo, Y.; Zeng, E. Y., Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *The Science of the total environment* **2018**, 615, 87-98.
31. Catanese, M. C.; Vandenberg, L. N., Bisphenol S (BPS) Alters Maternal Behavior and Brain in Mice Exposed During Pregnancy/Lactation and Their Daughters. *Endocrinology* **2017**, 158, (3), 516-530.

32. Kolatorova, L.; Duskova, M.; Vitku, J.; Starka, L., Prenatal exposure to bisphenols and parabens and impacts on human physiology. *Physiological research* **2017**, *66*, (Suppl 3), S305-s315.
33. Grandin, F. C.; Lacroix, M. Z.; Gayrard, V.; Gauderat, G.; Mila, H.; Toutain, P. L.; Picard-Hagen, N., Bisphenol S instead of Bisphenol A: Toxicokinetic investigations in the ovine materno-feto-placental unit. *Environment international* **2018**, *120*, 584-592.
34. Wan, Y.; Huo, W.; Xu, S.; Zheng, T.; Zhang, B.; Li, Y.; Zhou, A.; Zhang, Y.; Hu, J.; Zhu, Y.; Chen, Z.; Lu, S.; Wu, C.; Jiang, M.; Jiang, Y.; Liu, H.; Yang, X.; Xia, W., Relationship between maternal exposure to bisphenol S and pregnancy duration. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **2018**, *238*, 717-724.
35. Huang, S.; Li, J.; Xu, S.; Zhao, H.; Li, Y.; Zhou, Y.; Fang, J.; Liao, J.; Cai, Z.; Xia, W., Bisphenol A and bisphenol S exposures during pregnancy and gestational age - A longitudinal study in China. *Chemosphere* **2019**, *237*, 124426.
36. Li, J.; Wu, C.; Zhao, H.; Zhou, Y.; Cao, G.; Yang, Z.; Hong, Y.; Xu, S.; Xia, W.; Cai, Z., Exposure Assessment of Bisphenols in Chinese Women during Pregnancy: A Longitudinal Study. *Environmental science & technology* **2019**, *53*, (13), 7812-7820.
37. Pan, Y.; Deng, M.; Li, J.; Du, B.; Lan, S.; Liang, X.; Zeng, L., Occurrence and Maternal Transfer of Multiple Bisphenols, Including an Emerging Derivative with Unexpectedly High Concentrations, in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environmental science & technology* **2020**, *54*, (6), 3476-3486.
38. Melzer, D.; Rice, N. E.; Lewis, C.; Henley, W. E.; Galloway, T. S., Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS one* **2010**, *5*, (1), e8673.
39. Gore, A. C.; Chappell, V. A.; Fenton, S. E.; Flaws, J. A.; Nadal, A.; Prins, G. S.; Toppari, J.; Zoeller, R. T., EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews* **2015**, *36*, (6), E1-e150.
40. Moon, S.; Yu, S. H.; Lee, C. B.; Park, Y. J.; Yoo, H. J.; Kim, D. S., Effects of bisphenol A on cardiovascular disease: An epidemiological study using National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2016 and meta-analysis. *The Science of the total environment* **2021**, *763*, 142941.
41. Gao, X.; Ma, J.; Chen, Y.; Wang, H. S., Rapid responses and mechanism of action for low-dose bisphenol S on ex vivo rat hearts and isolated myocytes: evidence of female-specific proarrhythmic effects. *Environ Health Perspect* **2015**, *123*, (6), 571-8.
42. Ferguson, M.; Lorenzen-Schmidt, I.; Pyle, W. G., Bisphenol S rapidly depresses heart function through estrogen receptor-beta and decreases phospholamban phosphorylation in a sex-dependent manner. *Sci Rep* **2019**, *9*, (1), 15948.
43. Haynes, W. M., *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition*. 95th ed.; CRC Press: Hoboken, 2014.
44. Usman, A.; Ikhlas, S.; Ahmad, M., Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicology letters* **2019**, *312*, 222-227.
45. Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D., *Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants*. American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Vol. 2.
46. Castellini, C.; Di Giammarco, N.; D'Andrea, S.; Parisi, A.; Totaro, M.; Francavilla, S.; Francavilla, F.; Barbonetti, A., Effects of bisphenol S and bisphenol F on human spermatozoa: An in vitro study. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **2021**, *103*, 58-63.
47. Lestido-Cardama, A.; Sánchez, B. M.; Sendón, R.; Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.; Barbosa-Pereira, L., Study on the chemical behaviour of Bisphenol S during the in vitro gastrointestinal digestion and its bioaccessibility. *Food chemistry* **2022**, *367*, 130758.

48. Björnsdotter, M. K.; de Boer, J.; Ballesteros-Gómez, A., Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere* **2017**, 182, 691-706.
49. Di Naro, E.; Ghezzi, F.; Raio, L.; Franchi, M.; D'Addario, V., Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **2001**, 96, (2), 150-7.
50. Moshiri, M.; Zaidi, S. F.; Robinson, T. J.; Bhargava, P.; Siebert, J. R.; Dubinsky, T. J.; Katz, D. S., Comprehensive imaging review of abnormalities of the umbilical cord. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* **2014**, 34, (1), 179-96.
51. Bosselmann, S.; Mielke, G., Sonographic Assessment of the Umbilical Cord. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **2015**, 75, (8), 808-818.
52. Krzyżanowski, A.; Kwiatek, M.; Gęca, T.; Stupak, A.; Kwaśniewska, A., Modern Ultrasonography of the Umbilical Cord: Prenatal Diagnosis of Umbilical Cord Abnormalities and Assessment of Fetal Wellbeing. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **2019**, 25, 3170-3180.
53. Kellow, Z. S.; Feldstein, V. A., Ultrasound of the placenta and umbilical cord: a review. *Ultrasound quarterly* **2011**, 27, (3), 187-97.
54. Ferguson, V. L.; Dodson, R. B., Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **2009**, 144 Suppl 1, S108-13.
55. Arutyunyan, I.; Elchaninov, A.; Makarov, A.; Fatkhudinov, T., Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem cells international* **2016**, 2016, 6901286.
56. Muniraman, H.; Sardesai, T.; Sardesai, S., Disorders of the Umbilical Cord. *Pediatrics in review* **2018**, 39, (7), 332-341.
57. Cairrão, E.; Santos-Silva, A. J.; Alvarez, E.; Correia, I.; Verde, I., Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **2009**, 45, (3-4), 175-84.
58. Hasegawa, J., Ultrasound screening of umbilical cord abnormalities and delivery management. *Placenta* **2018**, 62, 66-78.
59. Alatyat, S. M.; Alasmari, H. M.; Aleid, O. A.; Abdel-Maksoud, M. S.; Elsherbiny, N., Umbilical cord stem cells: Background, processing and applications. *Tissue & cell* **2020**, 65, 101351.
60. Saw, S. N.; Dai, Y.; Yap, C. H., A Review of Biomechanics Analysis of the Umbilical-Placenta System With Regards to Diseases. *Frontiers in physiology* **2021**, 12, 587635.
61. Burton, G. J.; Jauniaux, E., Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *American journal of obstetrics and gynecology* **2018**, 218, (2s), S745-s761.
62. Lorigo, M.; Mariana, M.; Feiteiro, J.; Cairrao, E., Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells: Vascular Function and Clinical Importance. In 2019.
63. Hubbard, L. J.; Stanford, D. A., The Umbilical Cord Lifeline. *Journal of emergency nursing* **2017**, 43, (6), 593-595.
64. Elhassani, S. B., The umbilical cord: care, anomalies, and diseases. *Southern medical journal* **1984**, 77, (6), 730-6.
65. Nanaev, A. K.; Kohnen, G.; Milovanov, A. P.; Domogatsky, S. P.; Kaufmann, P., Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* **1997**, 18, (1), 53-64.
66. Roffino, S.; Lamy, E.; Foucault-Bertaud, A.; Risso, F.; Reboul, R.; Tellier, E.; Chareyre, C.; Dignat-George, F.; Simeoni, U.; Charpiot, P., Premature birth is associated with not fully differentiated contractile smooth muscle cells in human umbilical artery. *Placenta* **2012**, 33, (6), 511-7.

67. Feiteiro, J.; Verde, I.; Cairrão, E., Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in human vascular smooth muscle cells. *Cellular signalling* **2016**, 28, (3), 109-116.
68. Azevedo, R.; Oliveira, N.; Maia, C.; Verde, I., Effects of di(2-ethylhexil) phthalate on human umbilical artery. *Chemosphere* **2019**, 228, 278-286.
69. Lorigo, M.; Quintaneiro, C.; Maia, C. J.; Breitenfeld, L.; Cairrao, E., UV-B filter octylmethoxycinnamate impaired the main vasorelaxant mechanism of human umbilical artery. *Chemosphere* **2021**, 277, 130302.
70. Lorigo, M.; Mariana, M.; Feiteiro, J.; Cairrao, E., How is the human umbilical artery regulated? *The journal of obstetrics and gynaecology research* **2018**, 44, (7), 1193-1201.
71. Basta, M.; Lipsett, B. J., Anatomy, Abdomen and Pelvis, Umbilical Cord. In *StatPearls*, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2022.
72. Mangana, C.; Lorigo, M.; Cairrao, E., Implications of Endothelial Cell-Mediated Dysfunctions in Vasomotor Tone Regulation. **2021**, 1, (2), 231-251.
73. Britto-Júnior, J.; Jacintho, F. F.; Figueiredo Murari, G. M.; Campos, R.; Moreno, R. A.; Antunes, E.; Mónica, F. Z.; De Nucci, G., Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. *Life sciences* **2020**, 243, 117257.
74. Santos-Silva, A. J.; Cairrão, E.; Marques, B.; Verde, I., Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **2009**, 16, (12), 1175-85.
75. Cairrão, E.; Santos-Silva, A. J.; Verde, I., PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *European journal of pharmacology* **2010**, 640, (1-3), 94-101.
76. Lorigo, M.; Oliveira, N.; Cairrao, E., Clinical Importance of the Human Umbilical Artery Potassium Channels. *Cells* **2020**, 9, (9).
77. Martín, P.; Rebolledo, A.; Palomo, A. R.; Moncada, M.; Piccinini, L.; Milesi, V., Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: a review of their roles in human umbilical artery contraction. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **2014**, 21, (4), 432-41.
78. Cairrão, E.; Alvarez, E.; Santos-Silva, A. J.; Verde, I., Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **2008**, 376, (5), 375-83.
79. Santos-Silva, A. J.; Cairrao, E.; Verde, I., Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. *Health* **2010**, 02, (04), 321-331.
80. Owens, G. K.; Kumar, M. S.; Wamhoff, B. R., Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews* **2004**, 84, (3), 767-801.
81. Wang, G.; Jacquet, L.; Karamariti, E.; Xu, Q., Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of physiology* **2015**, 593, (14), 3013-30.
82. Mazza, G.; Roßmanith, E.; Lang-Olip, I.; Pfeiffer, D., Marker profile for the evaluation of human umbilical artery smooth muscle cell quality obtained by different isolation and culture methods. *Cytotechnology* **2016**, 68, (4), 701-11.
83. Shi, J.; Yang, Y.; Cheng, A.; Xu, G.; He, F., Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2020**, 319, (3), H613-h631.
84. Morgado, M.; Cairrão, E.; Santos-Silva, A. J.; Verde, I., Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2012**, 69, (2), 247-66.
85. Huang, C. H.; Ciou, J. S.; Chen, S. T.; Kok, V. C.; Chung, Y.; Tsai, J. J.; Kurubanjerdjit, N.; Huang, C. F.; Ng, K. L., Identify potential drugs for cardiovascular diseases caused by stress-induced genes in vascular smooth muscle cells. *PeerJ* **2016**, 4, e2478.

86. Jensen, L. F.; Bentzon, J. F.; Albarrán-Juárez, J., The Phenotypic Responses of Vascular Smooth Muscle Cells Exposed to Mechanical Cues. *Cells* **2021**, 10, (9).
87. Quan, A.; Leung, S. W.; Lao, T. T.; Man, R. Y., 5-hydroxytryptamine and thromboxane A₂ as physiologic mediators of human umbilical artery closure. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **2003**, 10, (8), 490-5.
88. Haegerstrand, A.; Hemsén, A.; Gillis, C.; Larsson, O.; Lundberg, J. M., Endothelin: presence in human umbilical vessels, high levels in fetal blood and potent constrictor effect. *Acta physiologica Scandinavica* **1989**, 137, (4), 541-2.
89. Bodelsson, G.; Stjernquist, M., Characterization of endothelin receptors and localization of 125I-endothelin-1 binding sites in human umbilical artery. *European journal of pharmacology* **1993**, 249, (3), 299-305.
90. Stjernquist, M.; Bodelsson, G.; Poulsen, H., Vasoactive peptides and uterine vessels. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* **1995**, 9, (2), 165-76.
91. Bogoni, G.; Rizzi, A.; Calo, G.; Campobasso, C.; D'Orleans-Juste, P.; Regoli, D., Characterization of endothelin receptors in the human umbilical artery and vein. *British journal of pharmacology* **1996**, 119, (8), 1600-4.
92. Rizzi, A.; Calo, G.; Battistini, B.; Regoli, D., Contractile activity of endothelins and their precursors in human umbilical artery and vein: identification of distinct endothelin-converting enzyme activities. *Journal of cardiovascular pharmacology* **1998**, 31 Suppl 1, S58-61.
93. Unic, A.; Derek, L.; Hodak, N.; Marijancevic, D.; Ceprnja, M.; Serdar, T.; Krhac, M.; Romic, Z., Endothelins -- clinical perspectives. *Biochemia medica* **2011**, 21, (3), 231-42.
94. Radenković, M.; Grbović, L.; Radunović, N.; Momcilov, P., Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacological reports : PR* **2007**, 59, (1), 64-73.
95. Gupta, S.; Hanff, L. M.; Visser, W.; Steegers, E. A.; Saxena, P. R.; Vulto, A. G.; MaassenVanDenBrink, A., Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *Journal of hypertension* **2006**, 24, (7), 1345-53.
96. Santos-Silva, A. J.; Cairrão, E.; Morgado, M.; Alvarez, E.; Verde, I., PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *European journal of pharmacology* **2008**, 582, (1-3), 102-9.
97. Glória, S.; Marques, J.; Feiteiro, J.; Marcelino, H.; Verde, I.; Cairrão, E., Tributyltin role on the serotonin and histamine receptors in human umbilical artery. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2018**, 50, 210-216.
98. Feiteiro, J.; Rocha, S. M.; Mariana, M.; Maia, C. J.; Cairrão, E., Pathways involved in the human vascular Tetrabromobisphenol A response: Calcium and potassium channels and nitric oxide donors. *Toxicology* **2022**, 470, 153158.
99. Zhang, J.; Gong, Y.; Yu, Y., PG F(2 α) Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology* **2010**, 1, 116.
100. Tufan, H.; Ayan-Polat, B.; Tecder-Unal, M.; Polat, G.; Kayhan, Z.; Oğüş, E., Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life sciences* **2003**, 72, (12), 1321-9.
101. Cribbs, L. L., T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell calcium* **2006**, 40, (2), 221-30.
102. Salemme, S.; Rebolledo, A.; Speroni, F.; Petruccelli, S.; Milesi, V., L, P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **2007**, 20, (1-4), 55-64.
103. Fan, G.; Cui, Y.; Gollasch, M.; Kassmann, M., Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle. *Channels (Austin, Tex.)* **2019**, 13, (1), 505-519.

104. Carvajal, J. A.; Germain, A. M.; Huidobro-Toro, J. P.; Weiner, C. P., Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of cellular physiology* **2000**, 184, (3), 409-20.
105. MacLennan, D. H.; Kranias, E. G., Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2003**, 4, (7), 566-77.
106. Primeau, J. O.; Armanious, G. P.; Fisher, M. E.; Young, H. S., The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Sub-cellular biochemistry* **2018**, 87, 229-258.
107. Xu, H.; Van Remmen, H., The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skeletal muscle* **2021**, 11, (1), 25.
108. Rebolledo, A.; Speroni, F.; Raingo, J.; Salemme, S. V.; Tanzi, F.; Munin, V.; Añón, M. C.; Milesi, V., The Na⁺/Ca²⁺ exchanger is active and working in the reverse mode in human umbilical artery smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2006**, 339, (3), 840-5.
109. Roldán Palomo, A. R.; Martín, P.; Rebolledo, A.; Enrique, N.; Flores, L. E.; Milesi, V., Human umbilical artery smooth muscle exhibits a 2-APB-sensitive capacitance contractile response evoked by vasoactive substances and expresses mRNAs for STIM, Orai and TRPC channels. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al* **2012**, 36, (2), 73-81.
110. Derler, I.; Jardin, I.; Romanin, C., Molecular mechanisms of STIM/Orai communication. *American journal of physiology. Cell physiology* **2016**, 310, (8), C643-62.
111. Clyman, R. I.; Sandler, J. A.; Manganiello, V. C.; Vaughan, M., Guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate content of human umbilical artery. *The Journal of clinical investigation* **1975**, 55, (5), 1020-5.
112. Provitera, L.; Cavallaro, G.; Griggio, A.; Raffaelli, G.; Amodeo, I.; Gulden, S.; Lattuada, D.; Ercoli, G.; Lonati, C.; Tomaselli, A.; Mosca, F.; Villamor, E., Cyclic nucleotide-dependent relaxation in human umbilical vessels. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **2019**, 70, (4).
113. Lovren, F.; Triggle, C., Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *British journal of pharmacology* **2000**, 131, (3), 521-9.
114. de Lima, R. G.; Silva, B. R.; da Silva, R. S.; Bendhack, L. M., Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2014**, 19, (7), 9628-54.
115. Zhao, Y.; Vanhoutte, P. M.; Leung, S. W., Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of pharmacological sciences* **2015**, 129, (2), 83-94.
116. Jackson, W. F., Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **2017**, 78, 89-144.
117. Jackson, W. F., K(V) channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* **2018**, 25, (1).
118. Brayden, J. E., Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **1996**, 23, (12), 1069-76.
119. Milesi, V.; Raingo, J.; Rebolledo, A.; Grassi de Gende, A. O., Potassium channels in human umbilical artery cells. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **2003**, 10, (6), 339-46.
120. Liu, Y.; Peterson, K. E., Maternal Exposure to Synthetic Chemicals and Obesity in the Offspring: Recent Findings. *Current environmental health reports* **2015**, 2, (4), 339-47.
121. Marie, C.; Cabut, S.; Vendittelli, F.; Sauvart-Rochat, M. P., Changes in Cosmetics Use during Pregnancy and Risk Perception by Women. *International journal of environmental research and public health* **2016**, 13, (4), 383.

122. Rolfo, A.; Nuzzo, A. M.; De Amicis, R.; Moretti, L.; Bertoli, S.; Leone, A., Fetal-Maternal Exposure to Endocrine Disruptors: Correlation with Diet Intake and Pregnancy Outcomes. *Nutrients* **2020**, *12*, (6).
123. Varshavsky, J.; Smith, A.; Wang, A.; Hom, E.; Izano, M.; Huang, H.; Padula, A.; Woodruff, T. J., Heightened susceptibility: A review of how pregnancy and chemical exposures influence maternal health. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **2020**, *92*, 14-56.
124. Padmanabhan, V.; Moeller, J.; Puttabyatappa, M., Impact of gestational exposure to endocrine disrupting chemicals on pregnancy and birth outcomes. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **2021**, *92*, 279-346.
125. Street, M. E.; Bernasconi, S., Endocrine-Disrupting Chemicals in Human Fetal Growth. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, (4).
126. Tanner, E. M.; Hallerbäck, M. U.; Wikström, S.; Lindh, C.; Kiviranta, H.; Gennings, C.; Bornehag, C. G., Early prenatal exposure to suspected endocrine disruptor mixtures is associated with lower IQ at age seven. *Environment international* **2020**, *134*, 105185.
127. Lucaccioni, L.; Trevisani, V.; Passini, E.; Righi, B.; Plessi, C.; Predieri, B.; Iughetti, L., Perinatal Exposure to Phthalates: From Endocrine to Neurodevelopment Effects. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, (8).
128. Rager, J. E.; Bangma, J.; Carberry, C.; Chao, A.; Grossman, J.; Lu, K.; Manuck, T. A.; Sobus, J. R.; Szilagyi, J.; Fry, R. C., Review of the environmental prenatal exposome and its relationship to maternal and fetal health. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **2020**, *98*, 1-12.
129. Zhang, W.; Xia, W.; Liu, W.; Li, X.; Hu, J.; Zhang, B.; Xu, S.; Zhou, Y.; Li, J.; Cai, Z.; Li, Y., Exposure to Bisphenol a Substitutes and Gestational Diabetes Mellitus: A Prospective Cohort Study in China. *Frontiers in endocrinology* **2019**, *10*, 262.
130. Liu, J.; Li, J.; Wu, Y.; Zhao, Y.; Luo, F.; Li, S.; Yang, L.; Moez, E. K.; Dinu, I.; Martin, J. W., Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum. *Environmental science & technology* **2017**, *51*, (4), 2456-2463.
131. Kolatorova, L.; Vitku, J.; Hampl, R.; Adamcova, K.; Skodova, T.; Simkova, M.; Parizek, A.; Starka, L.; Duskova, M., Exposure to bisphenols and parabens during pregnancy and relations to steroid changes. *Environmental research* **2018**, *163*, 115-122.
132. Zhang, B.; He, Y.; Zhu, H.; Huang, X.; Bai, X.; Kannan, K.; Zhang, T., Concentrations of bisphenol A and its alternatives in paired maternal-fetal urine, serum and amniotic fluid from an e-waste dismantling area in China. *Environment international* **2020**, *136*, 105407.
133. Ihde, E. S.; Zamudio, S.; Loh, J. M.; Zhu, Y.; Woytanowski, J.; Rosen, L.; Liu, M.; Buckley, B., Application of a novel mass spectrometric (MS) method to examine exposure to Bisphenol-A and common substitutes in a maternal fetal cohort. *Human and ecological risk assessment : HERA* **2018**, *24*, (2), 331-346.
134. Ferguson, K. K.; Meeker, J. D.; Cantonwine, D. E.; Mukherjee, B.; Pace, G. G.; Weller, D.; McElrath, T. F., Environmental phenol associations with ultrasound and delivery measures of fetal growth. *Environment international* **2018**, *112*, 243-250.
135. Liu, J.; Wattar, N.; Field, C. J.; Dinu, I.; Dewey, D.; Martin, J. W., Exposure and dietary sources of bisphenol A (BPA) and BPA-alternatives among mothers in the APrON cohort study. *Environment international* **2018**, *119*, 319-326.
136. Machtinger, R.; Berman, T.; Adir, M.; Mansur, A.; Baccarelli, A. A.; Racowsky, C.; Calafat, A. M.; Hauser, R.; Nahum, R., Urinary concentrations of phthalate metabolites, bisphenols and personal care product chemical biomarkers in pregnant women in Israel. *Environment international* **2018**, *116*, 319-325.
137. Mustieles, V.; Williams, P. L.; Fernandez, M. F.; Mínguez-Alarcón, L.; Ford, J. B.; Calafat, A. M.; Hauser, R.; Messerlian, C., Maternal and paternal preconception exposure to bisphenols and size at birth. *Human reproduction (Oxford, England)* **2018**, *33*, (8), 1528-1537.

138. Philips, E. M.; Jaddoe, V. W. V.; Asimakopoulos, A. G.; Kannan, K.; Steegers, E. A. P.; Santos, S.; Trasande, L., Bisphenol and phthalate concentrations and its determinants among pregnant women in a population-based cohort in the Netherlands, 2004-5. *Environmental research* **2018**, 161, 562-572.
139. Aker, A. M.; Ferguson, K. K.; Rosario, Z. Y.; Mukherjee, B.; Alshawabkeh, A. N.; Cordero, J. F.; Meeker, J. D., The associations between prenatal exposure to triclocarban, phenols and parabens with gestational age and birth weight in northern Puerto Rico. *Environmental research* **2019**, 169, 41-51.
140. Aung, M. T.; Ferguson, K. K.; Cantonwine, D. E.; McElrath, T. F.; Meeker, J. D., Preterm birth in relation to the bisphenol A replacement, bisphenol S, and other phenols and parabens. *Environmental research* **2019**, 169, 131-138.
141. Hu, J.; Zhao, H.; Braun, J. M.; Zheng, T.; Zhang, B.; Xia, W.; Zhang, W.; Li, J.; Zhou, Y.; Li, H.; Li, J.; Zhou, A.; Zhang, Y.; Buka, S. L.; Liu, S.; Peng, Y.; Wu, C.; Jiang, M.; Huo, W.; Zhu, Y.; Shi, K.; Li, Y.; Cai, Z.; Xu, S., Associations of Trimester-Specific Exposure to Bisphenols with Size at Birth: A Chinese Prenatal Cohort Study. *Environ Health Perspect* **2019**, 127, (10), 107001.
142. Kang, S.; Shin, B. H.; Kwon, J. A.; Lee, C. W.; Park, E. K.; Park, E. Y.; Kim, B., Urinary bisphenol A and its analogues and haemato-biochemical alterations of pregnant women in Korea. *Environmental research* **2020**, 182, 109104.
143. James, W. H., The variations of human sex ratio at birth with time of conception within the cycle, coital rate around the time of conception, duration of time taken to achieve conception, and duration of gestation: a synthesis. *Journal of theoretical biology* **2008**, 255, (2), 199-204.
144. Niu, Y.; Wang, B.; Zhao, Y.; Zhang, J.; Shao, B., Highly Sensitive and High-Throughput Method for the Analysis of Bisphenol Analogues and Their Halogenated Derivatives in Breast Milk. *Journal of agricultural and food chemistry* **2017**, 65, (48), 10452-10463.
145. Grandin, F. C.; Lacroix, M. Z.; Gayrard, V.; Viguié, C.; Mila, H.; de Place, A.; Vayssière, C.; Morin, M.; Corbett, J.; Gayrard, C.; Gely, C. A.; Toutain, P. L.; Picard-Hagen, N., Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure ? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere* **2019**, 221, 471-478.
146. Shi, M.; Sekulovski, N.; MacLean, J. A., 2nd; Hayashi, K., Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2018**, 163, (2), 620-631.
147. Shi, M.; Whorton, A. E.; Sekulovski, N.; MacLean, J. A.; Hayashi, K., Prenatal Exposure to Bisphenol A, E, and S Induces Transgenerational Effects on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2019**, 172, (2), 303-315.
148. Andersson, C.; Vasan, R. S., Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nature reviews. Cardiology* **2018**, 15, (4), 230-240.
149. Soler-Botija, C.; Gálvez-Montón, C.; Bayés-Genís, A., Epigenetic Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in genetics* **2019**, 10, 950.
150. Van Camp, G., Cardiovascular disease prevention. *Acta clinica Belgica* **2014**, 69, (6), 407-11.
151. Francula-Zaninovic, S.; Nola, I. A., Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Current cardiology reviews* **2018**, 14, (3), 153-163.
152. Feiteiro, J.; Mariana, M.; Glória, S.; Cairrao, E., Inhibition of L-type calcium channels by Bisphenol A in rat aorta smooth muscle. *The Journal of toxicological sciences* **2018**, 43, (10), 579-586.
153. Vought, V.; Wang, H. S., Impact of common environmental chemicals bisphenol A and bisphenol S on the physiology of *Lumbriculus variegatus*. *Environmental toxicology and pharmacology* **2018**, 60, 225-229.

154. Yang, S.; Cheng, W.; Li, X.; Liang, F.; Zhou, R.; Wang, H.; Feng, Y.; Wang, Y., Use of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to study cardiotoxicity of bisphenol AF via the GPER/CAM/eNOS pathway. *Toxicology* **2020**, 432, 152380.
155. Ji, K.; Hong, S.; Kho, Y.; Choi, K., Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology* **2013**, 47, (15), 8793-800.
156. Song, M.; Liang, D.; Liang, Y.; Chen, M.; Wang, F.; Wang, H.; Jiang, G., Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* **2014**, 112, 275-81.
157. Moreman, J.; Lee, O.; Trznadel, M.; David, A.; Kudoh, T.; Tyler, C. R., Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environmental science & technology* **2017**, 51, (21), 12796-12805.
158. Yang, Q.; Yang, X.; Liu, J.; Ren, W.; Chen, Y.; Shen, S., Effects of BPF on steroid hormone homeostasis and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of zebrafish. *Environmental science and pollution research international* **2017**, 24, (26), 21311-21322.
159. Mu, X.; Huang, Y.; Li, X.; Lei, Y.; Teng, M.; Li, X.; Wang, C.; Li, Y., Developmental Effects and Estrogenicity of Bisphenol A Alternatives in a Zebrafish Embryo Model. *Environmental science & technology* **2018**, 52, (5), 3222-3231.
160. Gu, J.; Wang, H.; Zhou, L.; Fan, D.; Shi, L.; Ji, G.; Gu, A., Oxidative stress in bisphenol AF-induced cardiotoxicity in zebrafish and the protective role of N-acetyl N-cysteine. *The Science of the total environment* **2020**, 731, 139190.
161. Qiu, W.; Chen, B.; Greer, J. B.; Magnuson, J. T.; Xiong, Y.; Zhong, H.; Andrzejczyk, N. E.; Zheng, C.; Schlenk, D., Transcriptomic Responses of Bisphenol S Predict Involvement of Immune Function in the Cardiotoxicity of Early Life-Stage Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology* **2020**, 54, (5), 2869-2877.
162. Qin, J. Y.; Ru, S.; Wang, W.; Hao, L.; Wei, S.; Zhang, J.; Xiong, J. Q.; Wang, J.; Zhang, X., Unraveling the mechanism of long-term bisphenol S exposure disrupted ovarian lipids metabolism, oocytes maturation, and offspring development of zebrafish. *Chemosphere* **2021**, 277, 130304.
163. Kasneci, A.; Lee, J. S.; Yun, T. J.; Shang, J.; Lampen, S.; Gomolin, T.; Cheong, C. C.; Chalifour, L. E., From the Cover: Lifelong Exposure of C57bl/6n Male Mice to Bisphenol A or Bisphenol S Reduces Recovery From a Myocardial Infarction. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2017**, 159, (1), 189-202.
164. Pal, S.; Sarkar, K.; Nath, P. P.; Mondal, M.; Khatun, A.; Paul, G., Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats. *Toxicology reports* **2017**, 4, 560-565.
165. Prudencio, T. M.; Swift, L. M.; Guerrelli, D.; Cooper, B.; Reilly, M.; Ciccarelli, N.; Sheng, J.; Jaimes, R.; Posnack, N. G., Bisphenol S and Bisphenol F Are Less Disruptive to Cardiac Electrophysiology, as Compared With Bisphenol A. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2021**, 183, (1), 214-226.
166. Liu, J.; Shen, J.; Lu, G.; Xu, X.; Yang, H.; Yan, Z.; Chen, W., Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol F concentrations in *Daphnia magna*. *Chemosphere* **2020**, 240, 124917.
167. Yin, N.; Liang, X.; Liang, S.; Liang, S.; Yang, R.; Hu, B.; Cheng, Z.; Liu, S.; Dong, H.; Liu, S.; Faiola, F., Embryonic stem cell- and transcriptomics-based in vitro analyses reveal that bisphenols A, F and S have similar and very complex potential developmental toxicities. *Ecotoxicology and environmental safety* **2019**, 176, 330-338.
168. Zhou, R.; Xia, M.; Zhang, L.; Cheng, W.; Yan, J.; Sun, Y.; Wang, Y.; Jiang, H., Individual and combined effects of BPA, BPS and BPAF on the cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Ecotoxicology and environmental safety* **2021**, 220, 112366.

169. Jiang, S.; Yang, G.; Zhou, S.; Zhang, X.; Peng, C.; Lu, Q., Bisphenol A, S, and F exposure, ESR1/2, CAT, and eNOS genetic polymorphisms, and the risk of hypertension. *Ecotoxicology and environmental safety* **2021**, 224, 112684.
170. Lorigo, M.; Quintaneiro, C.; Lemos, M. C.; Martinez-de-Oliveira, J.; Breitenfeld, L.; Cairrao, E., UV-B Filter Octylmethoxycinnamate Induces Vasorelaxation by Ca(2+) Channel Inhibition and Guanylyl Cyclase Activation in Human Umbilical Arteries. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20, (6).
171. Mariana, M.; Feiteiro, J.; Cairrao, E.; Verde, I., Mifepristone is a Vasodilator Due to the Inhibition of Smooth Muscle Cells L-Type Ca²⁺ Channels. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **2016**, 23, (6), 723-30.
172. Fonseca, M. I.; Lorigo, M.; Cairrao, E., Endocrine-Disrupting Effects of Bisphenol A on the Cardiovascular System: A Review. *Journal of xenobiotics* **2022**, 12, (3), 181-213.
173. Fonseca, M. I. Efeitos da disrupção endócrina do Bisfenol A na artéria umbilical humana. Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2022.
174. Vicente, T. Efeito a Nível Vascular dos Substitutos do Bisfenol A: Bisfenol F e S. Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2019.
175. Cabaton, N.; Chagnon, M. C.; Lhuguenot, J. C.; Cravedi, J. P.; Zalko, D., Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, 54, (26), 10307-14.
176. Mao, J.; Jain, A.; Denslow, N. D.; Nouri, M. Z.; Chen, S.; Wang, T.; Zhu, N.; Koh, J.; Sarma, S. J.; Sumner, B. W.; Lei, Z.; Sumner, L. W.; Bivens, N. J.; Roberts, R. M.; Tuteja, G.; Rosenfeld, C. S., Bisphenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta-brain axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2020**, 117, (9), 4642-4652.
177. Fatai, O. A.; Aribidesi, O. L., Effect of bisphenol F on sexual performance and quality of offspring in Male Wistar rats. *Ecotoxicology and environmental safety* **2022**, 244, 114079.
178. Aboul Ezz, H. S.; Khadrawy, Y. A.; Mourad, I. M., The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology* **2015**, 67, (1), 145-55.
179. Vandenberg, L. N.; Colborn, T.; Hayes, T. B.; Heindel, J. J.; Jacobs, D. R., Jr.; Lee, D. H.; Shioda, T.; Soto, A. M.; vom Saal, F. S.; Welshons, W. V.; Zoeller, R. T.; Myers, J. P., Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews* **2012**, 33, (3), 378-455.
180. Wu, C. C.; Shields, J. N.; Akemann, C.; Meyer, D. N.; Connell, M.; Baker, B. B.; Pitts, D. K.; Baker, T. R., The phenotypic and transcriptomic effects of developmental exposure to nanomolar levels of estrone and bisphenol A in zebrafish. *The Science of the total environment* **2021**, 757, 143736.
181. Deutschmann, A.; Hans, M.; Meyer, R.; Häberlein, H.; Swandulla, D., Bisphenol A inhibits voltage-activated Ca(2+) channels in vitro: mechanisms and structural requirements. *Molecular pharmacology* **2013**, 83, (2), 501-11.
182. Michaela, P.; Mária, K.; Silvia, H.; L'Ubica, L., Bisphenol A differently inhibits CaV3.1, Ca V3.2 and Ca V3.3 calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **2014**, 387, (2), 153-63.
183. Posnack, N. G.; Jaimes, R., 3rd; Asfour, H.; Swift, L. M.; Wengrowski, A. M.; Sarvazyan, N.; Kay, M. W., Bisphenol A exposure and cardiac electrical conduction in excised rat hearts. *Environ Health Perspect* **2014**, 122, (4), 384-90.

8. Apêndices

Tabela A1. Diferenças estatísticas da percentagem de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M), após exposição a concentrações cumulativas de bisfenol A, bisfenol S ou bisfenol F (0,002 μ M – 100 μ M). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

Log [Agente relaxante] (M)		-8,7	-7,7	-6,7	-5,7	-4,7	-4
Etanol vs. BPA		p=0,995	p=0,253	p=0,011	p=0,005	p<0,001	p<0,001
Etanol vs. BPS		p=0,006	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Etanol vs. BPF		p=0,077	p=0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
BPA vs. BPS		p=0,006	p=0,005	p=0,002	p<0,001	p<0,001	p<0,001
BPA vs. BPF		p=0,081	p=0,015	p=0,045	p=0,022	p<0,001	p<0,001
BPS vs. BPF		p=0,370	p=0,747	p=0,310	p=0,233	p=0,188	p=0,019
Etanol	-8,7	-	p=0,646	p=0,458	p=0,506	p=0,434	p=0,277
	-7,7	-	-	p=0,777	p=0,836	p=0,747	p=0,530
	-6,7	-	-	-	p=0,939	p=0,968	p=0,730
	-5,7	-	-	-	-	p=0,907	p=0,673
	-4,7	-	-	-	-	-	p=0,760
	-4	-	-	-	-	-	-
BPA	-8,7	-	p=0,500	p=0,073	p=0,033	p=0,007	p<0,001
	-7,7	-	-	p=0,262	p=0,144	p=0,043	p<0,001
	-6,7	-	-	-	p=0,732	p=0,363	p<0,001
	-5,7	-	-	-	-	p=0,500	p<0,001
	-4,7	-	-	-	-	-	p<0,001
	-4	-	-	-	-	-	-
BPS	-8,7	-	p=0,569	p=0,082	p=0,015	p<0,001	p<0,001
	-7,7	-	-	p=0,242	p=0,061	p<0,001	p<0,001
	-6,7	-	-	-	p=0,478	p=0,011	p<0,001
	-5,7	-	-	-	-	p=0,066	p<0,001
	-4,7	-	-	-	-	-	p<0,001
	-4	-	-	-	-	-	-
BPF	-8,7	-	p=0,253	p=0,105	p=0,032	p<0,001	p<0,001
	-7,7	-	-	p=0,632	p=0,313	p=0,007	p<0,001
	-6,7	-	-	-	p=0,596	p=0,025	p<0,001
	-5,7	-	-	-	-	p=0,087	p<0,001
	-4,7	-	-	-	-	-	p<0,001
	-4	-	-	-	-	-	-

Tabela A2. Diferenças estatísticas da porcentagem de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM), após exposição a concentrações cumulativas de bisfenol A, bisfenol S ou bisfenol F (0,002 μ M – 100 μ M). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

Log [Agente relaxante] (M)		-8,7	-7,7	-6,7	-5,7	-4,7	-4
Etanol vs. BPA		p=0,522	p=0,147	p=0,010	p=0,001	p<0,001	p<0,001
Etanol vs. BPS		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Etanol vs. BPF		p=0,017	p=0,012	p=0,004	p<0,001	p<0,001	p<0,001
BPA vs. BPS		p=0,001	p=0,002	p=0,002	p<0,001	p=0,002	p=0,011
BPA vs. BPF		p=0,085	p=0,251	p=0,586	p=0,208	p=0,428	p<0,001
BPS vs. BPF		p=0,120	p=0,061	p=0,018	p=0,021	p=0,030	p=0,001
Etanol	-8,7	-	p=0,614	p=0,507	p=0,794	p=0,639	p=0,699
	-7,7	-	-	p=0,873	p=0,809	p=0,972	p=0,907
	-6,7	-	-	-	p=0,688	p=0,846	p=0,783
	-5,7	-	-	-	-	p=0,836	p=0,900
	-4,7	-	-	-	-	-	p=0,935
	-4	-	-	-	-	-	-
BPA	-8,7	-	p=0,222	p=0,016	p=0,005	p<0,001	p<0,001
	-7,7	-	-	p=0,228	p=0,102	p=0,004	p<0,001
	-6,7	-	-	-	p=0,665	p=0,090	p<0,001
	-5,7	-	-	-	-	p=0,206	p<0,001
	-4,7	-	-	-	-	-	p<0,001
	-4	-	-	-	-	-	-
BPS	-8,7	-	p=0,400	p=0,070	p=0,005	p=0,001	p<0,001
	-7,7	-	-	p=0,328	p=0,050	p=0,014	p<0,001
	-6,7	-	-	-	p=0,322	p=0,135	p<0,001
	-5,7	-	-	-	-	p=0,612	p<0,001
	-4,7	-	-	-	-	-	p<0,001
	-4	-	-	-	-	-	-
BPF	-8,7	-	p=0,606	p=0,320	p=0,042	p=0,007	p<0,001
	-7,7	-	-	p=0,631	p=0,128	p=0,030	p<0,001
	-6,7	-	-	-	p=0,297	p=0,089	p<0,001
	-5,7	-	-	-	-	p=0,510	p<0,001
	-4,7	-	-	-	-	-	p<0,001
	-4	-	-	-	-	-	-

Tabela A3. Diferenças estatísticas da tensão das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μ M – 20 μ M) e contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelos testes de *one-way* ou *two-way ANOVA*, seguidos dos testes *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

		BPA			BPF		
		0,002 μ M	0,2 μ M	20 μ M	0,002 μ M	0,2 μ M	20 μ M
CT		p=0,004	p=0,022	p=0,035	p=0,177	p=0,721	p=0,456
BPA	0,002 μ M	-	p=0,467	p=0,391	p=0,179	-	-
	0,2 μ M	-	-	p=0,883	-	p=0,115	-
	20 μ M	-	-	-	-	-	p=0,056
BPF	0,002 μ M	-	-	-	-	p=0,370	p=0,164
	0,2 μ M	-	-	-	-	-	p=0,622
	20 μ M	-	-	-	-	-	-

Tabela A4. Diferenças estatísticas da tensão das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM) e contraídas com clorteto de potássio (KCl; 60 mM). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelos testes de *one-way* ou *two-way ANOVA*, seguidos dos testes *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

		BPA			BPF		
		0,002 μM	0,2 μM	20 μM	0,002 μM	0,2 μM	20 μM
CT		p<0,001	p<0,001	p=0,640	p=0,164	p=0,064	p=0,575
BPA	0,002 μM	-	p=0,356	p=0,013	p=0,061	-	-
	0,2 μM	-	-	p=0,001	-	p=0,004	-
	20 μM	-	-	-	-	-	p=0,854
BPF	0,002 μM	-	-	-	-	p=0,945	p=0,407
	0,2 μM	-	-	-	-	-	p=0,321
	20 μM	-	-	-	-	-	-

Tabela A5. Diferenças estatísticas da percentagem de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01 – 100 μM). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

Incubação		[SNP]				
		0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	100 μM
CT vs. BPA 0,002 μM		p=0,460	p=0,011	p<0,001	p=0,007	p=0,503
CT vs. BPA 0,2 μM		p=0,193	p=0,049	p<0,001	p<0,001	p=0,916
CT vs. BPA 20 μM		p=0,880	p=0,383	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CT vs. BPF 0,002 μM		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,449
CT vs. BPF 0,2 μM		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,284
CT vs. BPF 20 μM		p=0,008	p<0,001	p=0,001	p=0,552	p<0,001
BPA 0,002 μM vs. BPF 0,002 μM		p<0,001	p<0,001	p=0,004	p<0,001	p=0,917
BPA 0,2 μM vs. BPF 0,2 μM		p=0,022	p<0,001	p=0,257	p=0,254	p=0,262
BPA 20 μM vs. BPF 20 μM		p=0,007	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CT	SNP 0,01 μM	-	p=0,011	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μM	-	-	-	p<0,001	p<0,001
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p<0,001
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-
BPA 0,002 μM	SNP 0,01 μM	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μM	-	-	-	p<0,001	p<0,001
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p<0,001
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-
BPF 0,002 μM	SNP 0,01 μM	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μM	-	-	-	p<0,001	p<0,001
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p=0,010
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-
BPA 0,2 μM	SNP 0,01 μM	-	p=0,003	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μM	-	-	-	p=0,016	p<0,001
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p=0,003
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-

BPF 0,2 μ M	SNP 0,01 μ M	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μ M	-	-	-	p=0,023	p<0,001
	SNP 10 μ M	-	-	-	-	p=0,006
	SNP 100 μ M	-	-	-	-	-
BPA 20 μ M	SNP 0,01 μ M	-	p=0,104	p=0,004	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p=0,193	p=0,011	p<0,001
	SNP 1 μ M	-	-	-	p=0,212	p<0,001
	SNP 10 μ M	-	-	-	-	p<0,001
	SNP 100 μ M	-	-	-	-	-
BPF 20 μ M	SNP 0,01 μ M	-	p=0,003	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μ M	-	-	-	p=0,010	p<0,001
	SNP 10 μ M	-	-	-	-	p<0,001
	SNP 100 μ M	-	-	-	-	-

Tabela A6. Diferenças estatísticas da porcentagem de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μ M – 20 μ M), contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (SNP; 0,01 – 100 μ M). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

Incubação	[SNP]					
	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	
CT vs. BPA 0,002 μ M	p=0,902	p=0,502	p=0,990	p=0,725	p=0,611	
CT vs. BPA 0,2 μ M	p=0,506	p=0,276	p=0,883	p=0,385	p=0,118	
CT vs. BPA 20 μ M	p=0,590	p=0,041	p=0,874	p=0,404	p=0,554	
CT vs. BPF 0,002 μ M	p=0,116	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,001	
CT vs. BPF 0,2 μ M	p=0,086	p<0,001	p<0,001	p=0,001	p=0,050	
CT vs. BPF 20 μ M	p=0,846	p=0,256	p=0,004	p<0,001	p<0,001	
BPA 0,002 μ M vs. BPF 0,002 μ M	p=0,178	p=0,001	p<0,001	p=0,001	p=0,012	
BPA 0,2 μ M vs. BPF 0,2 μ M	p=0,431	p=0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,001	
BPA 20 μ M vs. BPF 20 μ M	p=0,494	p=0,003	p=0,004	p=0,005	p<0,001	
CT	SNP 0,01 μ M	-	p=0,036	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μ M	-	-	-	p=0,045	p<0,001
	SNP 10 μ M	-	-	-	-	p=0,023
	SNP 100 μ M	-	-	-	-	-
BPA 0,002 μ M	SNP 0,01 μ M	-	p=0,021	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p=0,019	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μ M	-	-	-	p=0,041	p<0,001
	SNP 10 μ M	-	-	-	-	p=0,037
	SNP 100 μ M	-	-	-	-	-
BPF 0,002 μ M	SNP 0,01 μ M	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p=0,002	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μ M	-	-	-	p=0,131	p=0,007
	SNP 10 μ M	-	-	-	-	p=0,231
	SNP 100 μ M	-	-	-	-	-
BPA 0,2 μ M	SNP 0,01 μ M	-	p=0,039	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μ M	-	-	p=0,093	p=0,009	p<0,001

	SNP 1 μM	-	-	-	p=0,342	p=0,033
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p=0,237
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-
BPF 0,2 μM	SNP 0,01 μM	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p=0,002	p<0,001	p<0,001
	SNP 1 μM	-	-	-	p=0,126	p=0,011
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p=0,308
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-
BPA 20 μM	SNP 0,01 μM	-	p=0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p=0,168	p=0,025	p<0,001
	SNP 1 μM	-	-	-	p=0,384	p=0,001
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p=0,018
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-
BPF 20 μM	SNP 0,01 μM	-	p=0,357	p=0,024	p=0,002	p=0,001
	SNP 0,1 μM	-	-	p=0,179	p=0,025	p=0,013
	SNP 1 μM	-	-	-	p=0,362	p=0,252
	SNP 10 μM	-	-	-	-	p=0,815
	SNP 100 μM	-	-	-	-	-

Tabela A7. Diferenças estatísticas da percentagem de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μM – 20 μM), contraídas com serotonina (5-HT; 1 μM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina (Nif; 0,01 – 1 μM). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

Incubação	[Nif]		
	0,01 μM	0,1 μM	1 μM
CT vs. BPA 0,002 μM	p=0,023	p<0,001	p<0,001
CT vs. BPA 0,2 μM	p=0,031	p=0,048	p=0,997
CT vs. BPA 20 μM	p=0,002	p<0,001	p<0,001
CT vs. BPF 0,002 μM	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CT vs. BPF 0,2 μM	p<0,001	p=0,005	p=0,231
CT vs. BPF 20 μM	p=0,001	0,000	p=0,306
BPA 0,002 μM vs. BPF 0,002 μM	p=0,029	p=0,070	p=0,041
BPA 0,2 μM vs. BPF 0,2 μM	p=0,028	p<0,001	p=0,241
BPA 20 μM vs. BPF 20 μM	p=0,797	p=0,038	p<0,001
CT	0,01 μM	-	p<0,001
	0,1 μM	-	p<0,001
	1 μM	-	-
BPA 0,002 μM	0,01 μM	-	p<0,001
	0,1 μM	-	p<0,001
	1 μM	-	-
BPF 0,002 μM	0,01 μM	-	p<0,001
	0,1 μM	-	p<0,001
	1 μM	-	-
BPA 0,2 μM	0,01 μM	-	p=0,063
	0,1 μM	-	p<0,001
	1 μM	-	-
BPF 0,2 μM	0,01 μM	-	p<0,001
	0,1 μM	-	p=0,053

	1 μ M	-	-	-
BPA 20 μ M	0,01 μ M	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	p<0,001
	1 μ M	-	-	-
BPF 20 μ M	0,01 μ M	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	p=0,001
	1 μ M	-	-	-

Tabela A8. Diferenças estatísticas da porcentagem de relaxação das artérias umbilicais humanas (HUAs) incubadas com BPA ou BPF (0 μ M – 20 μ M), contraídas com cloreto de potássio (KCl; 60 mM) e sujeitas a concentrações cumulativas de nifedipina (Nif; 0,01 – 1 μ M). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

Incubação	[Nif]				
	0,0001 μ M	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M
CT vs. BPA 0,002 μ M	-	-	p=0,725	p<0,001	p=0,026
CT vs. BPA 0,2 μ M	-	-	p=0,003	p<0,001	p<0,001
CT vs. BPA 20 μ M	-	-	p<0,001	p=0,005	p=0,007
CT vs. BPF 0,002 μ M	-	-	p<0,001	p=0,087	p=0,957
CT vs. BPF 0,2 μ M	-	-	p<0,001	p=0,007	p=0,513
CT vs. BPF 20 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p=0,402
BPA 0,002 μ M vs. BPF 0,002 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p=0,041
BPA 0,2 μ M vs. BPF 0,2 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
BPA 20 μ M vs. BPF 20 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CT	0,01 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	-	p=0,001
	1 μ M	-	-	-	-
BPA 0,002 μ M	0,01 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	-	p<0,001
	1 μ M	-	-	-	-
BPF 0,002 μ M	0,01 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	-	p=0,183
	1 μ M	-	-	-	-
BPA 0,2 μ M	0,01 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	-	p=0,002
	1 μ M	-	-	-	-
BPF 0,2 μ M	0,01 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	-	p=0,242
	1 μ M	-	-	-	-
BPA 20 μ M	0,01 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,1 μ M	-	-	-	p=,001
	1 μ M	-	-	-	-
BPF 20 μ M	0,0001 μ M	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	0,001 μ M	-	-	p<0,001	p<0,001
	0,01 μ M	-	-	p=0,802	p=0,802
	0,1 μ M	-	-	-	p=1,000
	1 μ M	-	-	-	-

Tabela A9. Diferenças estatísticas da percentagem da redução de área compensada das células musculares lisas das artérias umbilicais humanas (HUASMCs) contraídas com serotonina (5-HT; 1 μ M), após exposição a concentrações cumulativas de bisfenol S ou bisfenol F (2 μ M – 20 μ M). As diferenças consideradas estatisticamente significativas pelo teste de *two-way ANOVA*, seguido do teste *post-hoc de Holm-Sidak* estão apresentadas a negrito.

	Etanol 2 μM	Etanol 20 μM	BPS 2 μM	BPS 20 μM	BPF 2 μM	BPF 20 μM
Etanol 2 μM	-	0,597	0,000	-	0,033	-
Etanol 20 μM	-	-	-	0,000	-	0,002
BPS 2 μM	-	-	-	0,171	0,245	-
BPS 20 μM	-	-	-	-	-	0,076
BPF 2 μM	-	-	-	-	-	0,589