



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Efeito dos macrocíclos na regulação de funções vasculares

**Melissa Rodrigues Mariana**

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

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

**Covilhã, outubro de 2013**



**Aos meus Pais**



# Agradecimentos

Em primeiro lugar expresso o meu profundo agradecimento à Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues, pela orientação, disponibilidade, apoio e atenção que sempre demonstrou ao longo deste período de aprendizagem e trabalho. Agradeço a oportunidade de me integrar neste grupo de investigação, onde o profissionalismo e a amizade foram demonstrados todos os dias, elevando assim os meus conhecimentos científicos e a minha vontade de querer saber mais e trabalhar melhor.

Ao Professor Doutor José Ignácio Verde Lusquiños, agradeço a oportunidade que me atribuiu para iniciar um projecto de investigação tão aliciante e a responsabilidade que me incutiu em todas as fases deste trabalho. Expresso também a minha gratidão pela confiança que depositou em mim e pela sua simpatia e disponibilidade.

À Professora Doutora Carla Cruz, agradeço a cedência dos macrociclos por ela sintetizados, assim como a confiança em mim depositada para prosseguir o estudo destes compostos. Muito obrigada pela oportunidade e partilha de conhecimentos.

A toda a equipa do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, por tornarem possível a realização deste trabalho e também por tornarem esta experiência ainda mais agradável.

Agradeço também à Joana, Eduarda e Sara, que além de excelentes colegas de laboratório, se tornaram queridas amigas. Obrigada pela paciência, por todo o apoio que me deram e, principalmente, pela amizade, foi um grande prazer trabalhar, aprender e partilhar tantos momentos com vocês.

Aos meus Pais agradeço tudo o que sou hoje. Se cheguei aqui e tive a oportunidade de seguir os meus sonhos, foi tudo graças a eles. Obrigada por todo o apoio, força e amor e por fazerem os possíveis e impossíveis para me tornar a pessoa que sou hoje. À minha irmã, que sempre foi um exemplo para mim e a melhor irmã que se pode ter, agradeço por ter estado sempre do meu lado. Indicou-me o caminho certo a seguir, aconselhou-me da melhor forma quando as dúvidas insistiam em aparecer e apoiou-me nos momentos mais críticos.

Por último, e talvez o mais importante, quero agradecer ao Gonçalo. Porque esteve comigo desde o início desta etapa, porque acreditou sempre em mim mesmo quando nem eu própria acreditava, porque me ajudou em tudo o que esteve e não esteve ao seu alcance, porque, mesmo nos momentos mais críticos, nunca desistiu de mim, e porque é a pessoa mais importante para mim e sem ele não tinha sido capaz de chegar onde cheguei.



# Resumo

As células do músculo liso (SMC) vascular são fundamentais para a regulação do tônus vascular e têm capacidade de responder a diversos estímulos hormonais e hemodinâmicos. São células altamente especializadas que podem contribuir para o estudo de vários processos de sinalização envolvidos no controlo do tônus vascular, tais como o metabolismo do cálcio e diferentes vias envolvidas na modulação da reatividade vascular. A regulação do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é fundamental para a contração e a sua desregulação pode estar envolvida na patofisiologia de diversas doenças cardiovasculares. A entrada de cálcio nas células do músculo liso vascular através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (LTCC) pode ser desencadeada pela ativação de recetores presentes na membrana plasmática ou por despolarização da membrana. A formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina leva à ativação da cadeia leve de miosina (MLC), e é o estado de fosforilação desta que determina a atividade contráctil do músculo liso.

Os compostos macrocíclicos são macromoléculas cíclicas que podem ser usadas como transportadores moleculares, uma vez que, para além de terem a capacidade de atravessar a membrana celular sem alterar a sua integridade, não são tóxicos nas concentrações usadas e podem transportar outras moléculas. Os macrocíclos são considerados como importantes hospedeiros seletivos em algumas aplicações biológicas, nomeadamente em solubilizadores e estabilizadores de fármacos e agentes anticancerígenos, formando complexos estáveis e específicos. O principal objetivo deste trabalho é analisar se os macrocíclos têm atividade biológica. Assim, foi estudado o efeito de diferentes compostos macrocíclicos (MaC) sobre a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L e sobre a contractilidade das células A7r5.

Utilizou-se a técnica *Patch Clamp* na configuração *whole cell* para medir a atividade dos LTCC nas células A7r5. O efeito de quatro macrocíclos ( $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$ ,  $[16]\text{phenN}_2$ ,  $[32]\text{phen}_2\text{N}_4$ ,  $[30]\text{phen}_2\text{N}_6$ ) foi analisado a diferentes concentrações (0,01 $\mu\text{M}$ , 0,1 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  e 10 $\mu\text{M}$ ) sobre a corrente basal de  $\text{Ca}^{2+}$  e estimulada por Bay K (Bay K8644 - ativador específico dos LTCC). Foi também analisado o efeito destes MaC, nas mesmas concentrações, sobre a contractilidade das SMC vasculares através da técnica de PCSA (*Planar Cell Surface Area*), usando um microscópio de fluorescência. Este efeito foi analisado após contração das células com serotonina e noradrenalina.

Pelos resultados obtidos através do *Patch clamp* e do PCSA pode-se observar que, nas concentrações mais baixas, o  $[32]\text{phen}_2\text{N}_4$  inibe ligeiramente os LTCC, tanto a corrente basal como a corrente estimulada por Bay K. Relativamente à contractilidade, este composto não tem qualquer efeito sobre a contração induzida por serotonina ou por noradrenalina. No que diz respeito ao  $[16]\text{phenN}_2$  e ao  $[30]\text{phen}_2\text{N}_6$ , verifica-se que estes MaC não ativam nem inibem os LTCC mas, por outro lado, induzem redução da área celular. No caso do  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$ , este ativa os LTCC, de forma não significativa, mas este efeito parece não estar concordante com o efeito a nível da contractilidade, pois este MaC não tem efeito significativo sobre a redução da área celular.

Assim, dos macrocíclos estudados, o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> na concentração mais baixa (0,01μM) pode ser considerado como um bom transportador de fármacos, uma vez que não apresenta um efeito prejudicial sobre o sistema cardiovascular.

## Palavras-chave

Contractilidade; Canais de cálcio tipo L; Compostos macrocíclicos; Patch clamp; PCSA.

# Abstract

The vascular smooth muscle cells (SMC) are crucial for the vascular tone regulation and have the ability to respond to various hormonal and hemodynamic stimuli. These are highly specialized cells that can contribute to the study of several signaling processes involved in the control of vascular tone, such as calcium metabolism and different pathways involved in the modulation of vascular reactivity. The regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  flux is pivotal and important for contraction and its deregulation can be involved in the pathophysiology of some cardiovascular diseases. The entry of calcium into vascular smooth muscle cells through L-type calcium channels (LTCC) can be triggered by the activation of receptors present on plasma membrane or by membrane depolarization. The  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex formation leads to the activation of the myosin light chain (MLC), and it is its phosphorylation state that determines the contractile activity in smooth muscle. The macrocyclic compounds are cyclic macromolecules that can be used as molecular carriers, because besides having the ability to cross the cell membrane without altering its integrity, they are nontoxic in the concentrations used. Macrocyclic ligands are considered as important selective hosts in some biological applications, in particular drug solubilizers and stabilizers and anticancer agents, forming stable and specific complexes. The aim of this work is to analyze whether the macrocycles have biological activity. Therefore, it was studied the effect of different macrocyclic compounds (MaC) on the activity of the L-type calcium channels and contractility in A7r5 cells. These studies are the first step before trying to use the MaC as carriers for phosphodiesterases inhibitors.

The whole cell configuration of Patch Clamp technique was used to measure the LTCC activity in A7r5 cells. The effect of four MaC ( $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$ ,  $[16]\text{phenN}_2$ ,  $[32]\text{phen}_2\text{N}_4$ ,  $[30]\text{phen}_2\text{N}_6$ ) was analyzed at different concentrations (0,01 $\mu\text{M}$ , 0,1 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  and 10 $\mu\text{M}$ ) on basal and stimulated (Bay K8644 - a specific stimulator of the LTCC) activity of LTCC. It was also analyzed the effect of the related MaC in the same concentrations (0,01 $\mu\text{M}$ , 0,1 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  and 10 $\mu\text{M}$ ) on vascular SMC contractility by PCSA (*Planar Cell Surface Area*) technique, using a fluorescence microscope. This effect was analysed after contracting the cells with serotonin and norepinephrine.

From the results obtained by Patch Clamp and PCSA techniques, it is observed that at the lowest concentrations the  $[32]\text{phen}_2\text{N}_4$  slightly inhibits LTCC, both basal and Bay K8644 stimulated activity. Regarding contractility, this compound has no effect on the contraction induced by serotonin or noradrenaline. It appears that  $[16]\text{phenN}_2$  and  $[30]\text{phen}_2\text{N}_6$  do not activate or inhibit LTCC but, on the other hand, these MaC induce reduction in cell area. In the case of  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$ , this activates the LTCC but this effect does not seem consistent in terms of contractility, since this MaC does not have no significant effect on reducing cell area.

Thus, from the macrocycles studied, [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> at the lowest concentration (0,01μM) can be considered as a good drug carrier, since it does not display a damaging effect on the cardiovascular system.

## Keywords

Contractility; L-type Calcium Channels; Macrocyclic Compounds; Patch Clamp Technique; PCSA Technique.



# Índice

<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Tecido Muscular</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Estrutura do Músculo Liso .....	1
1.1.2. Proteínas envolvidas no processo contráctil.....	3
Filamentos Finos .....	4
Filamento Grossos .....	5
1.1.3. Ciclo das <i>Pontes Cruzadas</i> .....	6
1.1.4. Proteínas reguladoras presentes no músculo liso .....	7
Cinase das cadeias leves de miosina (MLCK) .....	7
Fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP) .....	7
Calmodulina (CaM) .....	8
<b>1.2. Canais de Cálcio</b> .....	<b>9</b>
1.2.1. Canais de Ca <sup>2+</sup> Dependentes de Voltagem .....	10
Canais de Ca <sup>2+</sup> Dependentes de Voltagem Tipo L .....	12
<b>1.3. Regulação da Contração do Músculo Liso Vascular</b> .....	<b>13</b>
1.3.1. Contração Dependente de Ca <sup>2+</sup> .....	14
Libertação de Ca <sup>2+</sup> do Retículo Sarcoplasmático (SR): .....	15
1.3.2. Regulação do potencial de membrana.....	15
1.3.3. Contração Independente de Ca <sup>2+</sup> .....	17
Sensibilização ao Ca <sup>2+</sup> .....	17
Via das MAPK .....	19
<b>1.4. Regulação do relaxamento</b> .....	<b>20</b>
1.4.1. Nucleótidos Cíclicos.....	21
GMP Cíclico .....	22
AMP Cíclico.....	24
<b>1.5. Fosfodiesterases</b> .....	<b>25</b>
1.5.1. Caracterização e propriedades das famílias das PDE .....	28
Família da PDE1 .....	29
Família da PDE2 .....	29
Família da PDE3 .....	30
Família da PDE4.....	31
Família da PDE5 .....	32

Família da PDE7 .....	33
<b>1.6. Macrocíclcos (MaC) .....</b>	<b>33</b>
1.6.1. Macrocíclcos estudados .....	35
<b>Capítulo II - Objetivos.....</b>	<b>37</b>
<b>Capítulo III - Materiais e Métodos .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Soluções e Materiais .....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Soluções .....	38
3.1.2. Químicos .....	39
3.1.3. Material .....	39
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Cultura de células A7r5.....	40
3.2.2. PCSA - <i>Planar Cell Surface Area</i> .....	41
Marcação das células A7r5 com o fluoróforo.....	41
Análise das células A7r5 no microscópio de fluorescência .....	41
3.2.3. <i>Patch-clamp</i> - Configuração <i>whole-cell</i> .....	42
Princípios gerais.....	42
<i>Patch-clamp</i> na configuração <i>whole-cell</i> .....	43
Medição da corrente dos canais de cálcio tipo L ( $I_{CaL}$ ) .....	44
3.2.4. Análise Estatística .....	45
<b>Capítulo IV - Resultados .....</b>	<b>46</b>
4.1. Efeito dos MaC na contractilidade após contração com Serotonina (5-HT).....	46
4.2. Efeito dos MaC na contractilidade após contração com Noradrenalina (NA) .....	50
4.3. Efeito dos MaC sobre a corrente de $Ca^{2+}$ basal e estimulada por Bay K.....	53
<b>Capítulo V - Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>63</b>



# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Características estruturais das SMC contrácteis e sintéticas.....	3
<b>Figura 2:</b> Fosforilação da miosina no SM.....	6
<b>Figura 3:</b> Parte do mecanismo envolvido na regulação da fosforilação de MLC <sub>20</sub> .....	8
<b>Figura 4:</b> Regulação dos canais de Ca <sup>2+</sup> nas SMC vasculares.....	9
<b>Figura 5:</b> Estrutura das subunidades dos canais de Ca <sup>2+</sup> tipo L.....	11
<b>Figura 6:</b> Representação filogenética das sequências primárias dos canais de cálcio, mostrando a percentagem de identidade entre os diferentes canais de cálcio clonados.....	12
<b>Figura 7:</b> Canais iónicos e tónus vascular.....	16
<b>Figura 8:</b> Regulação dupla da contração do músculo liso vascular pelo sinal de Ca <sup>2+</sup> e pela alteração da sensibilização do aparelho contráctil ao Ca <sup>2+</sup> .....	18
<b>Figura 9:</b> Regulação da contração do músculo liso.....	19
<b>Figura 10:</b> Estrutura geral da cascata de três níveis da via das MAPK.....	20
<b>Figura 11:</b> Regulação do relaxamento do músculo liso.....	21
<b>Figura 12:</b> Mecanismos envolvidos na redução da [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> induzida pelas proteínas cinases dependentes de nucleótidos cíclicos.....	23
<b>Figura 13:</b> Mecanismos envolvidos na regulação dos níveis dos nucleótidos cíclicos e ativação das cinases por estes nucleótidos.....	25
<b>Figura 14:</b> Hidrólise dos nucleótidos cíclicos pelas fosfodiesterases.....	26
<b>Figura 15:</b> Organização dos domínios das 11 famílias das fosfodiesterases.....	27
<b>Figura 16:</b> Regulação bifásica, dependente de NO/cGMP, do Ca <sup>2+</sup> intracelular mediada pela PDE2 e PDE3, em miócitos cardíacos humanos.....	31
<b>Figura 17:</b> Estrutura tridimensional da PDE5 nativa de plaquetas humanas, obtida por microscopia electrónica.....	33
<b>Figura 18:</b> Estrutura química dos macrocíclos que possuem piridina ( <i>py</i> ) e fenantrolina ( <i>phen</i> ) na sua constituição.....	36
<b>Figura 19:</b> Representação esquemática dos procedimentos que levam às diferentes configurações do <i>Patch-clamp</i> .....	43
<b>Figura 20:</b> Efeito do [32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (0,01µM, 0,1µM, 1µM e 10µM) sobre as contrações induzidas por serotonina (1µM) em células A7r5.....	46
<b>Figura 21:</b> Efeito do [30]phen <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01µM, 0,1µM, 1µM e 10µM) sobre as contrações induzidas por serotonina (1µM) em células A7r5.....	47
<b>Figura 22:</b> Efeito do [16]phenN <sub>2</sub> (0,01µM, 0,1µM, 1µM e 10µM) sobre as contrações induzidas por serotonina (1µM) em células A7r5.....	48

<b>Figura 23:</b> Efeito do Me <sub>2</sub> [28]py <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por serotonina (1μM) em células A7r5.....	49
<b>Figura 24:</b> Efeito do [32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1μM) em células A7r5.....	50
<b>Figura 25:</b> Efeito do [30]phen <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1μM) em células A7r5.....	51
<b>Figura 26:</b> Efeito do [16]phenN <sub>2</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1μM) em células A7r5.....	52
<b>Figura 27:</b> Efeito do Me <sub>2</sub> [28]py <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1μM) em células A7r5.....	53
<b>Figura 28:</b> Efeito do [32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca <sup>2+</sup> (I <sub>CaL</sub> ).....	54
<b>Figura 29:</b> Efeito do [32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca <sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K.....	54
<b>Figura 30:</b> Efeito do [30]phen <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca <sup>2+</sup> (I <sub>CaL</sub> ).....	55
<b>Figura 31:</b> Efeito do [30]phen <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca <sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K.....	55
<b>Figura 32:</b> Efeito do [16]phenN <sub>2</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca <sup>2+</sup> (I <sub>CaL</sub> ).....	56
<b>Figura 33:</b> Efeito do [16]phenN <sub>2</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca <sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K.....	56
<b>Figura 34:</b> Efeito do Me <sub>2</sub> [28]py <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca <sup>2+</sup> (I <sub>CaL</sub> ).....	57
<b>Figura 35:</b> Efeito do Me <sub>2</sub> [28]py <sub>2</sub> N <sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca <sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K.....	57



# Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das famílias das PDEs.....	28
Tabela 2: Soluções utilizadas durante a realização deste trabalho.....	38
Tabela 3: Composição da solução do meio interno (MIM A1) para a micropipeta e elétrodo do <i>Patch-clamp</i> .....	38
Tabela 4: Composição da solução do meio externo (RCs Ca <sub>3</sub> ) para as placas utilizadas no <i>Patch-clamp</i> .....	39
Tabela 5: Descrição do material/equipamento e as respetivas marcas usados para a realização deste trabalho.....	40



# Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina ( <i>Serotonin or 5-Hydroxytryptamine</i> )
AC	Adenilato ciclase ( <i>Adenylcyclase or Adenyl cyclase or Adenylate cyclase</i> )
ATP	Trisfosfato de adenosina ou Adenosina trisfosfato ( <i>Adenosine Triphosphate</i> )
ATPase	Trisfosfatase de Adenosina ( <i>Adenosine Triphosphatase</i> )
A7r5	Linha celular do músculo liso vascular da aorta embrionária de rato ( <i>cell line derived from the smooth muscle of embryonic rat aorta</i> )
Bay K8644	Di-hidropiridina que funciona como agonista dos canais de cálcio tipo L ( <i>Dihydropyridine that functions as a calcium channel agonist</i> )
BSA	Albumina de soro bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular ( <i>Intracellular Calcium concentration</i> )
$Ca^{2+}$	Íon cálcio ( <i>Calcium ion</i> )
CaM	Calmodulina ( <i>Calmodulin</i> )
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina ( <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> )
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina ( <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i> )
CICR	Libertação de $Ca^{2+}$ induzida por $Ca^{2+}$ ( <i><math>Ca^{2+}</math>-Induced <math>Ca^{2+}</math> Release</i> )
$Cl_{Ca}$	Canais de $Cl^-$ ativados por $Ca^{2+}$ ( <i>Calcium-activated chloride channels</i> )
$Cl_{VR}$	Canais de $Cl^-$ regulados pelo volume ( <i>Volume-regulated chloride channels</i> )
DAG	Diacilglicerol ( <i>Diacylglycerol</i> )
DHP	Di-hidropiridina ( <i>Dihydropyridine</i> )
ERK	Cinase regulada por estímulos extracelulares ( <i>Extracellular signal-regulated Kinases</i> )
FBS	Soro fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
GTP	Guanosina trifosfato ( <i>Guanosine triphosphate</i> )
HVA	Canais de $Ca^{2+}$ ativados por alta voltagem ( <i>High-Voltage Activated <math>Ca^{2+}</math> Channels</i> )
$I_{CaL}$	Intensidade da corrente dos canais de $Ca^{2+}$ tipo L ( <i>L-Type <math>Ca^{2+}</math> Current</i> )
IICR	Libertação de $Ca^{2+}$ induzida por $IP_3$ ( <i><math>IP_3</math>-Induced <math>Ca^{2+}</math> Release</i> )
$IP_3$	1,4,5-Trisfosfato de Inositol ( <i>Inositol-1,4,5-Triphosphate</i> )
$IP_3R$	Recetor do $IP_3$ ( <i>Inositol-1,4,5-Triphosphate Receptor</i> )
IVA	Canais de $Ca^{2+}$ ativados por voltagem intermédia ( <i>Intermediate-Voltage Activated <math>Ca^{2+}</math> Channels</i> )
$K_{ATP}$	Canais de $K^+$ sensíveis a ATP ( <i>ATP -Sensitive Potassium Channels</i> )
$K_{Ca}$	Canais de $K^+$ ativados por $Ca^{2+}$ ( <i>Calcium-Activated Potassium channels</i> )
$K_{IR}$	Canais de $K^+$ retificadores internos ( <i>Inwardly Rectifying Potassium Channels</i> )
$K_V$	Canais de $K^+$ operados por Voltagem ( <i>Voltage-Gated Potassium Channels</i> )
LTCC	Canais de $Ca^{2+}$ tipo L ( <i>L-Type Calcium Channels</i> )
LVA	Canais de $Ca^{2+}$ ativados por baixa voltagem ( <i>Low-Voltage Activated <math>Ca^{2+}</math> Channels</i> )
MaC	Macrocíclo ( <i>Macrocycles</i> )
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
MAPKK	Proteína cinase das MAPK ( <i>Mitogen-activated protein Kinase Kinase</i> )
MAPKKK	Proteína cinase das MAPKK ( <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> )
MLC <sub>17</sub>	Cadeias Leves Essenciais da Miosina ( <i>Myosin Essential Light Chains</i> )

<b>MLC<sub>20</sub></b>	Cadeias Leves Reguladoras da Miosina ( <i>Myosin Regulatory Light Chains</i> )
<b>MLCK</b>	Proteína Cinase das Cadeias Leves da Miosina ( <i>Myosin-Light-Chain Kinase</i> )
<b>MLCP</b>	Proteína Fosfatase das Cadeias Leves da Miosina ( <i>Myosin-Light-Chain Phosphatase</i> )
<b>MYPT1</b>	Fosfatase da Miosina-1 ( <i>Myosin Phosphatase Target Protein-1</i> )
<b>NCX</b>	Permutador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ( <i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>PDE</b>	Fosfodiesterases ( <i>Phosphodiesterase</i> )
<b>pGC</b>	Guanilato ciclase particular ou membranar ( <i>Particulate Guanylyl Cyclase</i> )
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil Inositol 4,5-Bifosfato ( <i>Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate</i> )
<b>PKA</b>	Proteína Cinase A ( <i>Protein Kinase A or Cyclic AMP-dependent Protein Kinase</i> )
<b>PKC</b>	Proteína Cinase C ( <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PKG</b>	Proteína Cinase G ( <i>Protein Kinase G or Cyclic GMP-dependent Protein Kinase</i> )
<b>PLC</b>	Fosfolipase C ( <i>Phospholipase C</i> )
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> ATPase da Membrana Plasmática ( <i>Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPases</i> )
<b>PP1c</b>	Proteína fosfatase-1 ( <i>Protein Phosphatase 1</i> )
<b>ROCC</b>	Canais de Ca <sup>2+</sup> Operados por Recetores ( <i>Receptor-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels</i> )
<b>SACC</b>	Canais de Ca <sup>2+</sup> Ativados por Stress Físico ( <i>Stretch -Activated Ca<sup>2+</sup> Channels</i> )
<b>SAPK/JNK</b>	Cinases Jun N-terminal/proteínas cinases ativadas por stress ( <i>Stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i> )
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático ( <i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> )
<b>sGC</b>	Guanilato ciclase solúvel ou citosólica ( <i>Soluble Guanylyl Cyclase</i> )
<b>SMC</b>	Células do músculo liso ( <i>Smooth Muscle Cells</i> )
<b>SOCC</b>	Canais de Ca <sup>2+</sup> operados por depósitos intracelulares ( <i>Store Operated Ca<sup>2+</sup> Channels</i> )
<b>SR</b>	Retículo Sarcoplasmático ( <i>Sarcoplasmic Reticulum</i> )
<b>VOCC</b>	Canais de Ca <sup>2+</sup> operados por voltagem ( <i>Voltage Operated Ca<sup>2+</sup> Channels</i> )



# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1. Tecido Muscular

O tecido muscular é responsável pelos movimentos corporais, e por alterações no tamanho e forma dos órgãos internos. Trata-se de um tecido altamente especializado, de modo a permitir contração ou encurtamento forçados (Junqueira and Carneiro, 1999; Michael H. Ross, 2003; Rod R. Seeley, 2003). É constituído por agregados de células especializadas e alongadas, arranjadas em paralelo, que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos responsáveis pela contração. Estas células, de origem mesodérmica, sofrem diferenciação devido a um processo de alongamento gradativo, com simultânea síntese de proteínas filamentosas (Junqueira and Carneiro, 1999; Michael H. Ross, 2003).

Pelas características morfológicas e funcionais distinguem-se diferentes tipos de tecido muscular, e de uma forma geral este pode ser dividido em estriado e liso. As células do músculo estriado apresentam estriações cruzadas a nível microscópico, como é o caso dos músculos esquelético, cardíaco e visceral. Estas estriações altamente organizadas são produzidas pelo arranjo específico dos miofilamentos, sendo este arranjo igual em todos os tipos de músculo estriado. No caso das células do músculo liso (SMC), estas não apresentam estriações cruzadas uma vez que os miofilamentos não se encontram suficientemente organizados, ou seja, não atingem o mesmo grau de organização (Michael H. Ross, 2003).

### 1.1.1. Estrutura do Músculo Liso

O **músculo liso** é o tipo de músculo mais difusamente distribuído no corpo humano e é aquele que executa um maior número de funções. Existe em diferentes estruturas do corpo humano, como: vasos sanguíneos, paredes do tubo digestivo, vias respiratórias, músculos intrínsecos do olho, uréteres e útero. Desempenha as mais variadas funções, como impelir a urina através das vias urinárias, misturar os alimentos no estômago e intestino, dilatar e contrair a pupila e regular o fluxo de sangue nos vasos sanguíneos (Hilgers and Webb, 2005; Rod R. Seeley, 2003).

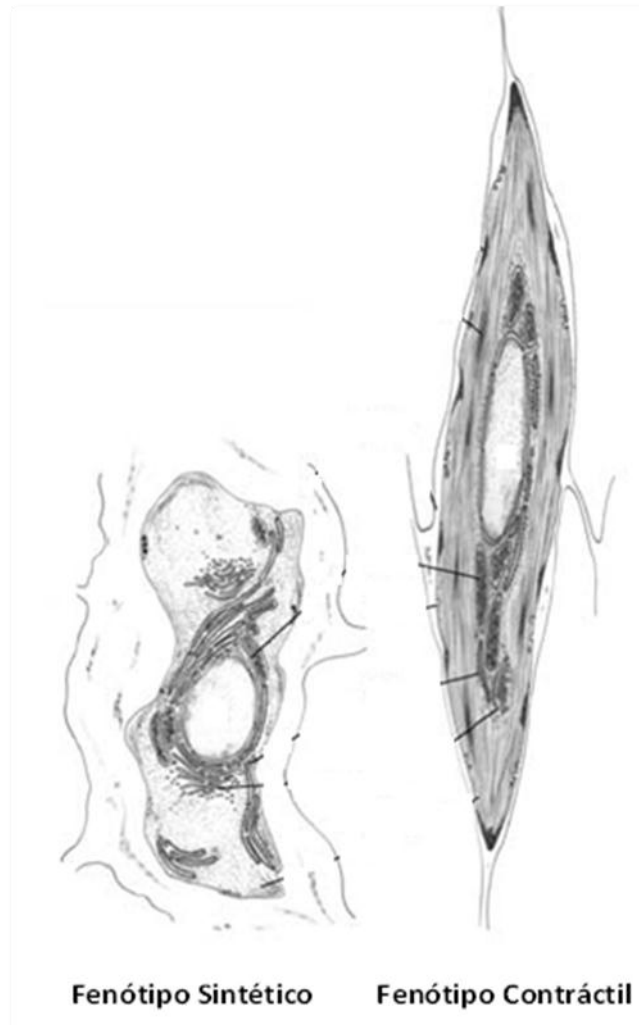
Este tipo de músculo apresenta-se em feixes de células fusiformes alongadas com extremidades finamente afuniladas, sendo o centro da célula mais espesso. Possuem um núcleo único e central e os diferentes organelos, como mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (RER), ribossomas, grânulos de glicogénio e pequenos complexos de Golgi, concentram-se na extremidade do núcleo. O tamanho destas células pode variar entre 15 a 200µm de comprimento e 5 a 10µm de diâmetro, dependendo do órgão em que se encontram.

A superfície de cada uma destas células é revestida por uma camada extracelular espessa, denominada de lâmina basal. Além deste revestimento, que funciona principalmente como suporte, existe uma rede muito delicada de fibras reticulares que mantém as células juntas (Brownell and Slavkin, 1980; Junqueira and Carneiro, 1999; Michael H. Ross, 2003; Rod R. Seeley, 2003).

As células do músculo liso (SMC) vascular são responsáveis pelo tónus vascular, e têm capacidade de responder a diversos estímulos hormonais e hemodinâmicos. O uso destas células é fundamental para o estudo de vários processos de sinalização envolvidos no controlo do tónus vascular, como é o caso do metabolismo do  $Ca^{2+}$  e de diferentes vias envolvidas na modulação da reatividade vascular. Além disso, estas células são altamente especializadas e expressam uma grande variedade de proteínas contrácteis, diferentes tipos de canais iónicos e moléculas de sinalização. Estes são alguns dos componentes que regulam o fenómeno de contração (Cairrao et al., 2009; Hilgers and Webb, 2005; Owens et al., 1996).

As diferentes funções que as SMC exercem traduzem-se numa diversidade de fenótipos destas células, que vão desde o contráctil ao sintético. Estes dois fenótipos, que representam as duas extremidades de um espectro de SMC com fenótipos intermédios, apresentam morfologias claramente diferentes. Enquanto as células com fenótipo contráctil possuem uma forma fusiforme alongada, as células com fenótipo sintético são menos alongadas e têm uma morfologia referida como rombóide (Hao et al., 2003; Rensen et al., 2007). Quando são realizadas culturas destas células, podem-se desenvolver padrões fenotípicos contrácteis ou sintéticos, os quais são caracterizados por alterações na morfologia, proliferação e expressão de diferentes proteínas. As células com fenótipo contráctil caracterizam-se por apresentarem uma baixa taxa de proliferação e atividade sintética e expressarem, principalmente, proteínas envolvidas na regulação da contração (proteínas contrácteis, canais iónicos e recetores membranares), ao contrário das SMC sintéticas que apresentam elevadas taxas de proliferação e atividade migratória e contêm um elevado número de organelos envolvidos na síntese de proteínas (Cairrao et al., 2009; Owens et al., 1996).

A capacidade das SMC para alterar as suas propriedades através da modulação fenotípica garante que cada vaso se pode adaptar a alterações crónicas. Assim, a diversidade destas células não compromete o desempenho dos vasos mas sim confere a flexibilidade que é necessária em diferentes situações fisiológicas ou patológicas (Rensen et al., 2007). No entanto, Rensen *et al.* (2007), assim como Cairrao e colaboradores (2009) demonstraram que após permanecerem 24 horas em meio sem soro, as culturas destas células exibem principalmente o fenótipo contráctil (Cairrao et al., 2009; Rensen et al., 2007).



**Figura 1** - Características estruturais das SMC contrácteis e sintéticas. Adaptado de (Rensen et al., 2007).

### 1.1.2. Proteínas envolvidas no processo contráctil

A atividade contráctil do músculo liso está relacionada com a estrutura e organização dos seus filamentos de actina e miosina. Podem observar-se diferentes tipos de filamentos no citoplasma destas células, os filamentos finos e os grossos, nos quais se encontram as proteínas participantes no mecanismo contráctil, e um citoesqueleto de filamentos intermédios. Os filamentos finos são compostos principalmente por actina, e os grossos são constituídos por miosina II, e é a interação destes a responsável pela contração das células musculares (Junqueira and Carneiro, 1999; Michael H. Ross, 2003; Rod R. Seeley, 2003). Contudo, segundo alguns autores, no músculo liso vascular, intercalados com os filamentos finos encontram-se os filamentos intermédios, que são constituídos predominantemente por vimentina e desmina (Gabbiani et al., 1981; Michael H. Ross, 2003).

- Filamentos Finos

Os filamentos finos contêm actina e tropomiosina que estão envolvidas na interação geradora de força com moléculas de miosina II, possuem também caldesmona, proteína que se liga à F-actina bloqueando o local de ligação à miosina, e ainda calponina. A ação da tropomiosina e caldesmona é controlada pela ação de moléculas reguladoras dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Michael H. Ross, 2003).

A actina é uma proteína *scaffold* de 375 aminoácidos, que sofre polimerização da sua forma monomérica, G-actina, formando uma macromolécula filamentosa, conhecida como F-actina. Esta possui uma estrutura helicoidal flexível, de 10nm de diâmetro, importante na função da actina como uma rede filamentosa dinâmica (Hodgkinson, 2000). Foram identificadas quatro isoformas de actina em vários tecidos do músculo liso, que incluem duas variantes específicas do músculo liso ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) e duas variantes citoplasmáticas ( $\beta$  e  $\gamma$ ) (Fatigati and Murphy, 1984; Vandekerckhove and Weber, 1978).

O músculo liso contém duas isoformas principais da tropomiosina,  $\alpha$  e  $\beta$ , presentes em quantidades relativamente iguais (Cummins and Perry, 1974). Estas isoformas são constituídas por duas hélices  $\alpha$  altamente homólogas de elevado peso molecular, cada uma contendo 284 resíduos de aminoácidos (Phillips et al., 1986; Whitby and Phillips, 2000). A ligação da tropomiosina à actina é altamente cooperativa com uma estequiometria de ligação de uma molécula de tropomiosina para sete monómeros de actina. Pensa-se que a tropomiosina desempenha um papel importante na contração, contudo a sua função fisiológica nas SMC ainda é pouco conhecida (Hodgkinson, 2000).

A caldesmona é uma proteína de ligação à actina que está envolvida na regulação da contração do músculo liso e na formação do citoesqueleto (Gusev, 2001). Estão identificadas duas isoformas desta proteína, a leve (*l-caldesmon*) e a pesada (*h-caldesmon*). A isoforma *h-caldesmona* é uma molécula longa e flexível de 793 aminoácidos, com cerca de 75nm de comprimento, e encontra-se apenas nos filamentos finos das SMC diferenciadas (Hayashi et al., 1989; Hodgkinson, 2000). A caldesmona possui quatro domínios na sua estrutura e locais de ligação para a miosina, actina, tropomiosina e  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina (Alahyan et al., 2006; Sobue et al., 1981). O C-terminal do domínio 4 é o responsável pelas propriedades inibitórias da ATPase em que, na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (como a calmodulina), este domínio interage fortemente com a actina e inibe a atividade da actomiosina ATPase (amATPase), quer por si próprio ou através da sua ação sobre a tropomiosina (Gusev, 2001; Marston and Redwood, 1993). Segundo Marston e os seus colaboradores os filamentos finos do músculo liso vascular contêm cerca de 1 molécula de caldesmona por 2 de tropomiosina e 14 de actina (Hodgkinson, 2000; Marston, 1990; Marston and Lehman, 1985; Marston and Smith, 1984).

A calponina é uma proteína de 297 aminoácidos que, segundo estudos realizados por Stafford *et al.* (1995), possui uma estrutura elipsoidal com cerca de 16nm de comprimento e 2,6nm de diâmetro (Stafford et al., 1995). Foram identificadas diversas isoformas, sendo a

mais abundante no músculo liso a  $\alpha$ -calponina (ou calponina básica) (Hodgkinson, 2000). A calponina interage com a actina, tropomiosina, miosina e calmodulina, e tem capacidade para inibir a atividade da Mg-ATPase da actomiosina (Gusev, 2001; Stull et al., 1991).

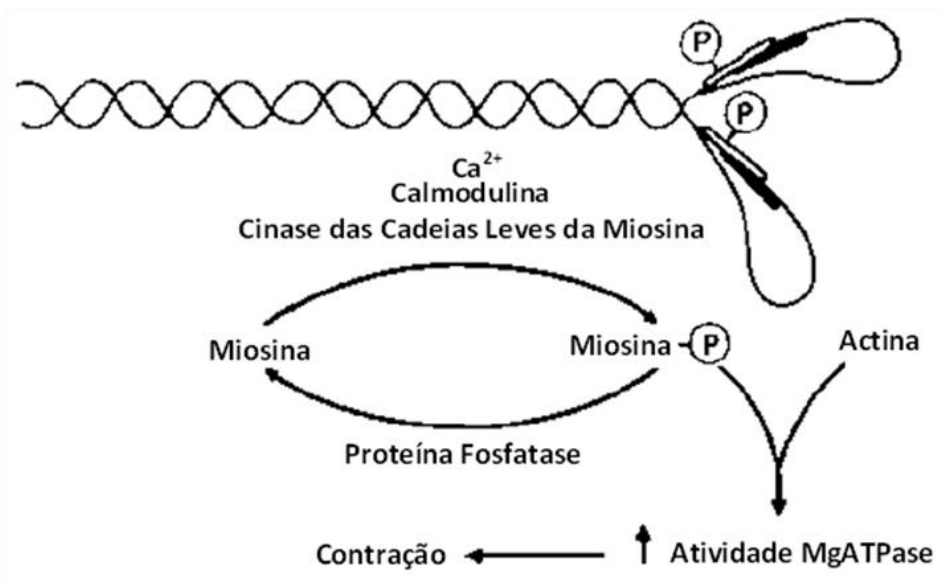
- Filamento Grossos

Os filamentos grossos têm 15-18nm de diâmetro, são constituídos por miosina e são altamente lábeis, com tendência para se perder durante a preparação do tecido (Michael H. Ross, 2003).

A miosina é composta por seis polipéptidos, dois de cadeia pesada, com aproximadamente 200 kDa cada um, e quatro de cadeia leve. Cada par de cadeias leves é constituído por uma cadeia reguladora com 20kDa (MLC<sub>20</sub>) e uma essencial com 17kDa (MLC<sub>17</sub>), e é a fosforilação de um dos dois tipos de cadeias leves, pela cinase da cadeia de leve de miosina (MLCK - *Myosin light-chain kinase*), que inicia a contração do músculo liso (Michael H. Ross, 2003; Stull et al., 1991). A forma hexamérica nativa da miosina organiza-se numa longa cauda formada por duas hélices alfa entrelaçadas e duas regiões de cabeça globular, sendo que estas contêm distintos locais de ligação para a actina, hidrólise de ATP e associação de subunidades de cadeias leves (Stull et al., 1991).

A fosforilação da miosina é o principal fator que regula a contração do músculo liso. A cadeia leve reguladora (MLC<sub>20</sub>) é fosforilada na serina-19, pela MLCK dependente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina e provoca alterações conformacionais que afetam a hidrólise de ATP e a ligação para a actina (Figura 2). A fosforilação das duas cabeças de miosina é aleatória, isto é, a fosforilação de uma das cabeças não parece influenciar a taxa de fosforilação da outra cabeça (Persechini et al., 1986). Contudo, estudos bioquímicos revelaram que ambas as cabeças de uma molécula de miosina têm que ser fosforiladas antes do aumento da atividade da MgATPase (Sellers et al., 1983). Existem dois locais na molécula de miosina que são influenciados pela fosforilação das cadeias leves, sendo estes o local para a ligação à actina e a junção entre a cabeça e o “pescoço”. Especificamente, a fosforilação das MLC aumenta a flexibilidade nesta junção, o que facilita a atividade da MgATPase ativada por actina (Hodgkinson, 2000; Stull et al., 1991).

As proteínas de miosina são empilhadas verticalmente de modo a que o seu eixo longo seja perpendicular ao eixo longo do filamento grosso. Desta forma, as cabeças de miosina podem formar “*pontes cruzadas*” com a actina ao longo do comprimento dos filamentos grossos (Fox and Khong, 1990).



**Figura 2** - Fosforilação da miosina no SM. No topo: representação esquemática da molécula de miosina, evidenciando as duas cadeias pesadas com a respectiva cauda entrelaçada e a região das cabeças globulares. Associada a cada cabeça estão os dois tipos de cadeia leve, a reguladora de 20 kDa (identificada com P) e a essencial de 17 kDa (identificada a sombreado). Em baixo: diagrama que mostra a via para a iniciação da contração no SM. A cadeia leve reguladora é fosforilada (Miosina-P) pela MLCK dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina e é desfosforilada por uma proteína fosfatase. A miosina fosforilada liga-se à actina, resultando no aumento da atividade da MgATPase e contração. Adaptado de (Stull et al., 1991).

### 1.1.3. Ciclo das *Pontes Cruzadas*

Existem diferenças significativas na transformação da energia química em energia mecânica nos diversos tipos de músculo, mas no entanto, este processo é semelhante entre os músculos liso e esquelético.

No caso do músculo esquelético, este é regulado a nível dos filamentos finos. O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à troponina C, induzindo uma alteração conformacional na troponina 1 e na tropomiosina, revelando os locais de ligação para a miosina presentes na actina (Gordon et al., 2000). As pontes cruzadas de miosina ativadas ligam-se ao filamento fino, levando à formação do ciclo das pontes cruzadas e à geração de força. A quantidade de força depende do número de locais de ligação livres para a miosina na actina, ou seja, a força depende da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ligada à troponina C (Rembold et al., 2004).

Como o músculo liso não expressa troponina, o  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à CaM e ativa a MLCK, que por sua vez regula a miosina por fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  na Ser19. Esta fosforilação leva ao aumento da atividade da ATPase da miosina ativada por actina em aproximadamente 1000 vezes (Persechini et al., 1981). Uma vez fosforilada, as pontes cruzadas da miosina podem-se ligar à actina, produzindo força através do ciclo das pontes cruzadas (Rembold et al., 2004). Sob tensão, estas pontes cruzadas podem permanecer ligadas à actina sem serem fosforiladas, o que resulta num ciclo de pontes cruzadas mais lento, que requer sete vezes menos ATP. A este processo dá-se o nome de Mecanismo *Latch* (Clark and Pyne-Geithman, 2005).

#### 1.1.4. Proteínas reguladoras presentes no músculo liso

No músculo liso existem diversos processos de fosforilação que controlam a atividade contráctil e a sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ , e são coordenados por sistemas de proteínas cinases e fosfatases. A cinase das cadeias leves de miosina (MLCK), a fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP) e a calmodulina (CaM) são algumas das proteínas reguladoras da contração presentes no músculo liso (Clark and Pyne-Geithman, 2005; Michael H. Ross, 2003).

- Cinase das cadeias leves de miosina (MLCK)

A MLCK é a proteína cinase responsável pelo início da contração fisiológica no músculo liso. Esta proteína tem sido caracterizada a partir de uma variedade de músculos lisos e tecidos não musculares (Gallagher et al., 1991), levando à identificação de dois grupos, incluindo isoformas dos músculos liso e esquelético. As sequências de aminoácidos das MLCK do músculo liso são altamente conservadas (Stull et al., 1991). Processos de sinalização celular que provocam o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  nas SMC ativam a MLCK dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Esta cinase fosforila um local específico no N-terminal da cadeia leve reguladora da miosina (MLC<sub>20</sub>), especificamente na serina 19 (Ser19), que permite à actina ativar a ATPase da miosina e consequente contração. A ativação da MLCK dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel importante no desenvolvimento de força do músculo liso (Kamm and Stull, 2001; Mizuno et al., 2008).

- Fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP)

A MLCP é a proteína fosfatase responsável pela rápida desfosforilação da cadeia leve de miosina. Trata-se de uma haloenzima heterotrimérica constituída por três subunidades que incluem: uma subunidade catalítica com 38kDa, e duas subunidades não catalíticas, de 110kDa e 20kDa, respetivamente. A subunidade catalítica é a isoforma  $\delta$  da proteína fosfatase-1 (PP1c), a subunidade de 110kDa liga-se à miosina, sendo assim denominada de fosfatase da miosina 1 (MYPT), e a subunidade de 20kDa é a mais pequena e da qual ainda não se conhece função específica (Hartshorne and Hirano, 1999; Hartshorne et al., 1998; Stull et al., 1991). Estas três subunidades estão ligadas entre si, com a região N-terminal da subunidade MYPT ligada à subunidade PP1c e a região C-terminal ligada à subunidade de 20kDa (Hartshorne and Hirano, 1999; Hirano et al., 1997).

Existem várias isoformas da MYPT, sendo a MYPT1 a mais expressa no músculo liso vascular. A MYPT1 desempenha um papel muito importante na regulação da atividade da MLCP, uma vez que, para além de direccionar a fosfatase para os filamentos de miosina, também aumenta a especificidade do substrato da MLCP para a miosina e regula a atividade enzimática da MLCP. A atividade da MLCP pode ser regulada de três formas: 1) por dissociação da estrutura heterotrimérica, 2) pelo efeito inibitório da fosforilação da MYPT1, e 3) através da inibição das proteínas inibidoras (Hirano et al., 2003). A conformação heterotrimérica da MLCP e a interação entre a subunidade MYPT1 e miosina contribuem para

aumentar a atividade da MLCP para  $MLC_{20}$ , levando à inativação da ATPase pela actina. Assim, a extensão da fosforilação da  $MLC_{20}$  resulta do balanço das atividades das MLCK e MLCP (Hirano, 2007; Mizuno et al., 2008).

○ Calmodulina (CaM)

Muitas vias de sinalização intracelulares dependem da ligação do cálcio a proteínas específicas, como a calmodulina. Esta proteína de 17 kDa foi identificada como um regulador de várias enzimas alvo diferentes (Klee et al., 1980; Michael H. Ross, 2003). As interações da CaM com outras proteínas classificam-se em seis grupos distintos, de acordo com a ligação e regulação dependentes ou independentes de  $Ca^{2+}$  (Chin and Means, 2000). A sua interação com o  $Ca^{2+}$  tem um papel importante no melhoramento da corrente de  $Ca^{2+}$ , e a sua ação pode dever-se à ativação da proteína cinase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina ( $Ca^{2+}$ /CaM-PK) e fosforilação de uma proteína que afeta a função dos canais  $Ca^{2+}$  tipo L (Xiong and Sperelakis, 1995).

A calmodulina possui quatro locais de ligação, em que dois deles se encontram num domínio globular N-terminal e os outros dois num domínio globular C-terminal, separados por uma hélice alfa flexível. Na presença de  $Ca^{2+}$ , cada um destes domínios adota uma conformação aberta expondo o centro hidrofóbico que torna a CaM funcional para a ligação com as sequências alvo. Trata-se de uma ligação de alta afinidade que é apenas parcialmente responsável pela ativação da enzima, uma vez que os resíduos que se encontram à superfície da calmodulina podem interagir com outras zonas da enzima (Stull, 2001; Su et al., 1994; Zhi et al., 1998).

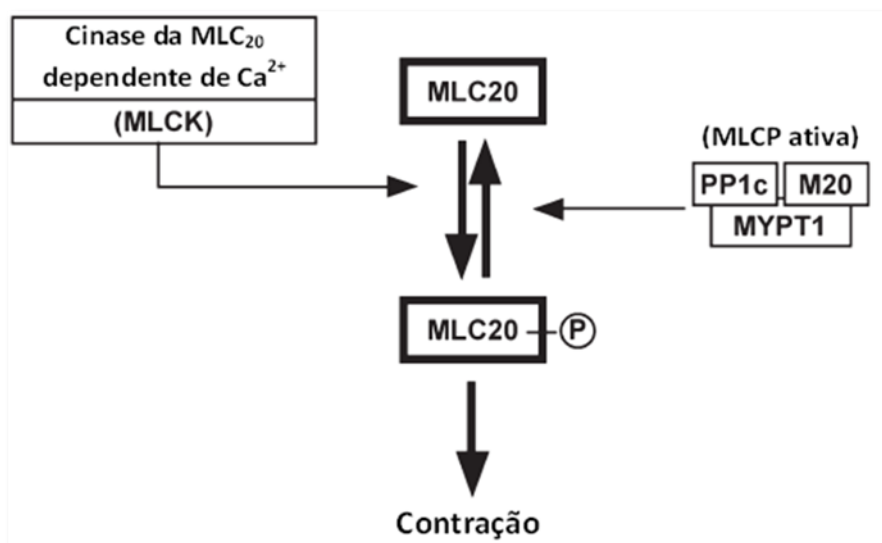


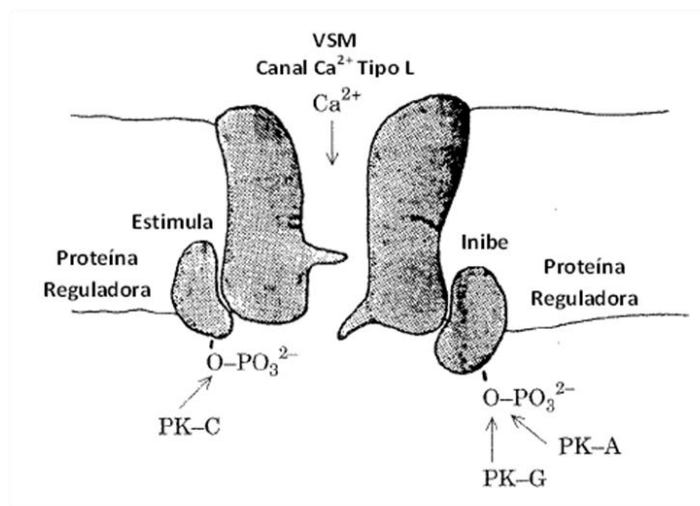
Figura 3 - Parte do mecanismo envolvido na regulação da fosforilação de  $MLC_{20}$ . Adaptado de (Hirano, 2007).

## 1.2. Canais de Cálcio

A contração do músculo liso é regulada pela concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) e pela sensibilidade dos elementos contrácteis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , em resposta a alterações do ambiente que circunda a célula (Karakı et al., 1997). Além do importante papel na excitação-contracção, o  $\text{Ca}^{2+}$  também atua como segundo mensageiro, por exemplo na ativação de algumas enzimas e de três tipos de canais (canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , canais não seletivos ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  e canais de  $\text{Cl}^-$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Xiong and Sperelakis, 1995). A modulação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo potencial de membrana ou segundos mensageiros afeta a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e, por sua vez, a resistência vascular periférica (Obejero-Paz et al., 1993).

Em algumas SMC vasculares, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocorre durante a despolarização da membrana celular é regulado por proteínas cinase dependentes de nucleótidos cíclicos (*Protein Kinases - PK*), através da fosforilação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Se esta fosforilação for desencadeada pela proteína cinase A (PKA) ou proteína cinase G (PKG), a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L é inibida provocando vasodilatação (relaxamento), mas caso seja pela PKC, ocorre estimulação da atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L levando à vasoconstricção (contração) (Xiong and Sperelakis, 1995).

Foi proposta a presença de um tipo de proteínas reguladoras de associação nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L das SMC vasculares. Esta proteína pode estimular a atividade do canal quando fosforilada pela PKC, em vez de inibir como no caso das PKA e PKG. Desta forma, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L presentes na membrana celular podem ter dois tipos de proteínas reguladoras associadas: a proteína  $R_i$ , que inibe a atividade do canal quando fosforilada pela PKA e/ou PKG, e a proteína  $R_s$ , que estimula a atividade do canal quando fosforilada pela PKC (Xiong and Sperelakis, 1995).



**Figura 4** - Regulação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nas SMC vasculares. Modelo de um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  lento incorporado na bicamada lipídica da membrana celular de uma SMC vascular. Estão representadas duas proteínas reguladoras (inibidora e estimuladora) associadas ao canal, com locais de fosforilação que afetam a sua função. A fosforilação da proteína inibidora por PKA ou por PKG inibe a função do canal iônico, por exemplo, diminui a probabilidade de abertura do canal a potenciais de despolarização, e a fosforilação da proteína estimuladora por PKC estimula o canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a probabilidade de abertura, por exemplo. Assim, a função do canal é regulada pelos nucleótidos cíclicos e por diacilglicerol. Adaptado de (Xiong and Sperelakis, 1995).

Os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulares podem entrar nas SMC através de diferentes tipos de canais presentes na membrana plasmática (Cairrao et al., 2005; Evans and Gelband, 1999; McFadzean and Gibson, 2002; Setoguchi et al., 1997):

- Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (*Voltage Operated Calcium Channels* - VOCC);
- Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos intracelulares (*Store Operated Calcium Channels* - SOCC);
- Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por recetores (*Recetor Operated Calcium Channels* - ROCC);
- Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados pelo *stress* físico (*Stretch Activated Calcium Channels* - SACC);
- Canais catiónicos não seletivos permeáveis a  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.2.1. Canais de $\text{Ca}^{2+}$ Dependentes de Voltagem

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VOCC) medeiam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares, como contração, secreção, neurotransmissão e expressão genética. Pertencem a uma superfamília de proteínas de canais iónicos transmembranares, e sua atividade é responsável pela produção de sinais eléctricos nas membranas celulares (Catterall, 1995).

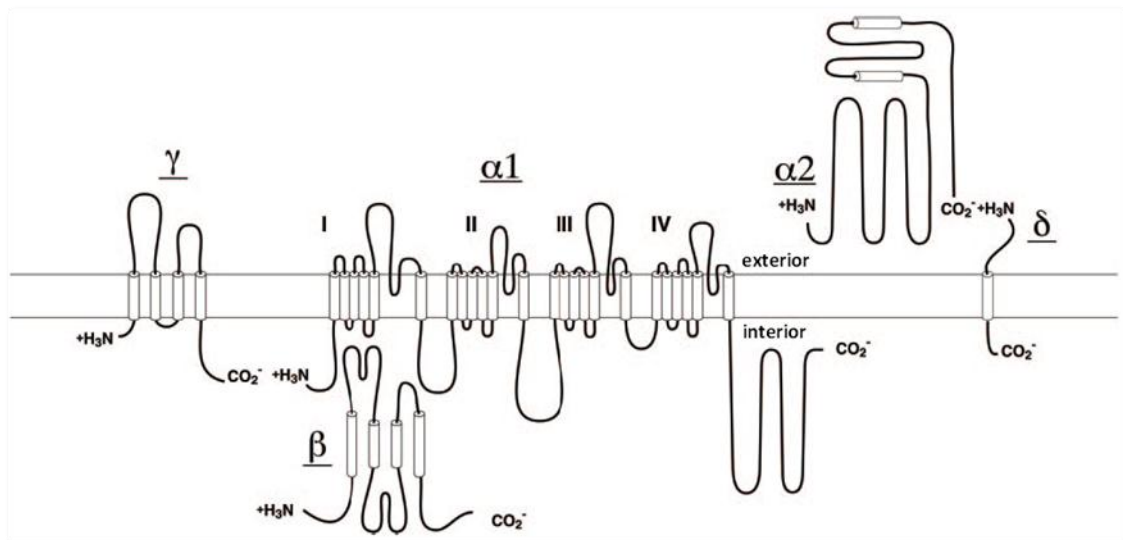
A possível existência de diferentes canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem foi demonstrada primeiramente por Hagiwara *et al.* (1975), através de estudos usando a membrana celular de ovos de estrela-do-mar (Hagiwara et al., 1975). Propuseram a existência de diferentes tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  com diferentes potenciais limiares de ativação e diferentes cinéticas de abertura e encerramento. Através de características eletrofisiológicas, classificaram os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  pela sua cinética de abertura e encerramento, condutância e tempo de vida de cada canal. Foram Carbone e Lux (1984) que dividiram os canais em duas classes: canais de cálcio ativados por alta voltagem (*High-Voltage Activated* - HVA) e por baixa voltagem (*Low-Voltage Activated* - LVA) (Carbone and Lux, 1984; Dolphin, 2006).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA são ainda divididos em quatro subtipos: tipo L, tipo N, tipo P/Q e tipo R; os canais LVA consistem apenas nos canais do tipo T. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo R podem também ser classificados de canais ativados por voltagem intermédia (*Intermediate-Voltage Activated* - IVA) (Yamakage and Namiki, 2002).

As correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  registadas em diferentes tipos de células possuem diversas propriedades farmacológicas e fisiológicas, de acordo com o tipo de canal a que estão associadas, desta forma existem diversas características que permitem distinguir os diferentes tipos de canais dependentes de voltagem (Tsien et al., 1995). No caso dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, que são considerados de longa duração, estes requerem uma forte despolarização da membrana para serem ativados e são as principais correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  das

células musculares e endócrinas, onde provocam a contração e a secreção, respetivamente. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dos tipos N, P/Q e R requerem uma forte despolarização membranar para a sua ativação, são expressos principalmente em neurónios, onde iniciam a neurotransmissão e intervêm na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para os corpos celulares e dendrites. Por último, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T são ativados por uma fraca e transitória despolarização da membrana e são expressos numa grande variedade de células, onde estão envolvidos na formação de potenciais de ação, no controlo de padrões de disparo repetitivo e na proliferação celular (Catterall et al., 2003; Ertel and Ertel, 1997).

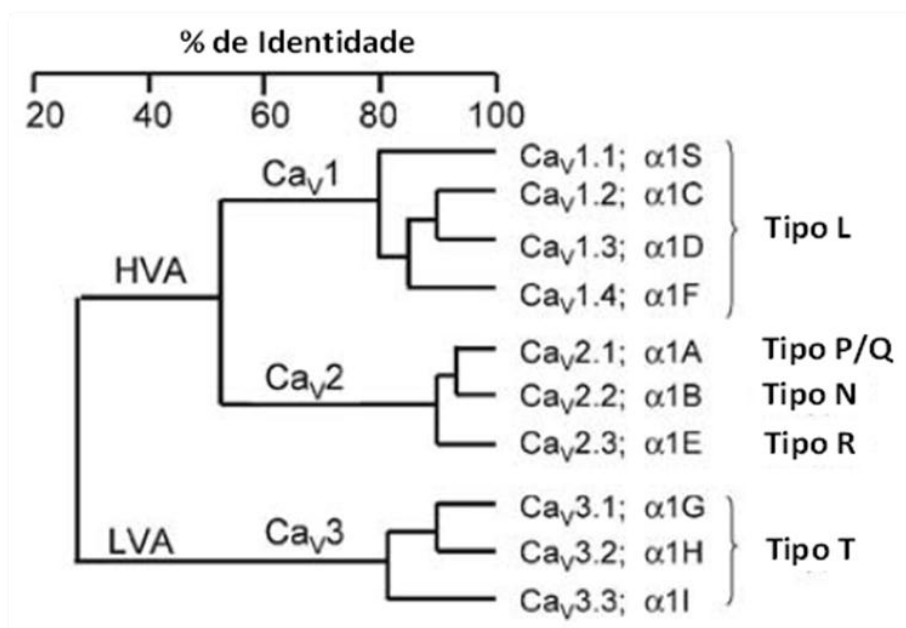
Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são proteínas complexas formadas por quatro ou cinco subunidades distintas, que são codificadas por múltiplos genes. A maior é a subunidade  $\alpha_1$ , de 190-250 kDa, que incorpora o poro de condução dos iões, o sensor de voltagem e os locais de regulação por segundos mensageiros, fármacos ou toxinas. Esta subunidade está organizada em quatro domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos transmembranares (S1-S6). O segmento S4 serve como sensor de voltagem e o *loop* entre os segmentos transmembranares S5 e S6 em cada domínio determina a condutância e seletividade iónicas. Para além desta subunidade, existem ainda as subunidades auxiliares  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  e  $\gamma$  que, embora modulem as propriedades dos canais, não têm incidência sobre as diversidades farmacológica e eletrofisiológica, pois estas provêm principalmente da subunidade  $\alpha_1$  (Catterall et al., 2003).



**Figura 5** - Estrutura das subunidades dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Estrutura e composição das subunidades dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do músculo esquelético. Adaptado de (Catterall et al., 2005).

No ano 2000, foi adotada uma nomenclatura para os diferentes tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , baseada na nomenclatura dos canais de  $\text{K}^+$ . Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  foram nomeados usando o símbolo químico do principal íon permeável ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o principal regulador fisiológico (voltage). O número de identificação corresponde à subunidade  $\alpha_1$  seguido pela ordem de descoberta. Sendo assim tem-se (Catterall et al., 2003):

- Subfamília  $\text{Ca}_V1$  ( $\text{Ca}_V1.1$  a  $\text{Ca}_V1.4$ ) inclui os canais que contêm  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1F}$  que intervêm nas correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.
- Subfamília  $\text{Ca}_V2$  ( $\text{Ca}_V2.1$  a  $\text{Ca}_V2.3$ ) inclui os canais que contêm  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1E}$  que intervêm nas correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q, tipo N e tipo R, respectivamente.
- Subfamília  $\text{Ca}_V3$  ( $\text{Ca}_V3.1$  a  $\text{Ca}_V3.3$ ) inclui os canais que contêm  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ ,  $\alpha_{1I}$  que intervêm nas correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T.



**Figura 6** - Representação filogenética das sequências primárias dos canais de cálcio, mostrando a percentagem de identidade entre os diferentes canais de cálcio clonados. Adaptado de (Dolphin, 2006).

○ Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  Dependentes de Voltage Tipo L

No músculo liso os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltage do tipo L (*L Type Calcium Channels* - LTCC) são considerados como a maior via de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a excitação para iniciação e regulação da força de contração do músculo. São regulados por nucleótidos cíclicos e fosforilados por proteínas cinases (Karaki et al., 1997; Xiong and Sperelakis, 1995). Possuem cinéticas de ativação e inativação mais lentas, logo a corrente destes canais ( $I_{\text{Ca(L)}}$ ) é ativada e inativada lentamente. O intervalo de voltage a que estes canais operam, ou seja, os potenciais de repouso e de inativação, são maiores nestes canais do que nos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, sendo a sua voltage de inativação entre -45 a -35 mV (Xiong and Sperelakis, 1995).

Evidências sugerem que um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estável através dos LTCC é importante para manter o tônus basal do músculo liso, principalmente nas artérias de ratos (Rubart et al., 1996; Sada et al., 1990). A aplicação de forças mecânicas, como é o caso do alongamento (stretch), sobre as artérias coronária e basilar provoca contração miogénica por mobilização de dois mecanismos que envolvem os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo estes o influxo transmembranar de  $\text{Ca}^{2+}$  e a libertação deste das reservas intracelulares (Nakayama and Tanaka, 1993).

Os LTCC podem ser ativados por recetores  $\beta$ -adrenérgicos. Apesar da abertura destes canais aumentar a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pelo menos numa parte das SMC, a estimulação dos recetores  $\beta$ -adrenérgicos induz relaxamento e não contração, como seria de esperar pelo aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Esta discordância pode ser explicada pelo aumento de cAMP, devido à estimulação dos recetores  $\beta$ -adrenérgicos, que resulta na inibição da contração do músculo liso. Além disso, a presença de um compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  não-contráctil na célula também pode ser uma das causas deste relaxamento (Karakı et al., 1997; Obejero-Paz et al., 1993).

Este tipo de canal é ativado por despolarização membranar e inibido por bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Godfraind et al., 1986). Os agonistas abrem este canal por despolarização da membrana celular através da ativação de um canal catiónico não seletivo (Pacaud and Bolton, 1991), inibição dos canais de  $\text{K}^+$  e/ou ativação dos canais de  $\text{Cl}^-$ , ou, na ausência de despolarização membranar, também podem abrir os LTCC direta ou indiretamente através de proteínas de ligação a GTP (Karakı et al., 1997).

Estudos farmacológicos adicionais demonstraram que os LTCC são sensíveis a di-hidropiridinas (DHP), uma vez que estas podem atuar como ativadores ou inibidores dos canais. Desta forma, pensa-se que as DHP atuam alostericamente alterando o estado do canal para aberto ou fechado, em vez de obstruírem o canal (Catterall et al., 2003; Dolphin, 2006). Neste grupo das di-hidropiridinas estão incluídos a nifedipina, um importante antagonista que se liga diretamente às proteínas dos canais bloqueando a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ , e também o Bay K8644, este é o principal agonista dos canais, é quimicamente semelhante à nifedipina e estimula a corrente basal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além deste grupo de fármacos, existem ainda outros que atuam como bloqueadores dos LTCC, sendo estes as fenilalquilaminas, como o verapamil, e as benzotiazepinas (Cairrao et al., 2005; Catterall et al., 2003; Xiong and Sperelakis, 1995).

### 1.3. Regulação da Contração do Músculo Liso Vascular

A ativação de recetores presentes na superfície das células por hormonas e neurotransmissores inicia uma série de processos celulares que levam à contração do músculo liso vascular. Este é um processo que pode ser desencadeado pelo aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e que é regulado, principalmente, pela ativação das proteínas contrácteis actina e miosina (Stull et al., 1991; Webb, 2003). No entanto, existem outros mecanismos de regulação da contração que dependem de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.3.1. Contração Dependente de $\text{Ca}^{2+}$

As vias de sinalização envolvidas na regulação do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ou na liberação deste ião das reservas intracelulares estão envolvidas no aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . No músculo liso, tal como no músculo esquelético, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é o principal determinante da contração (Stull et al., 1991).

O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular deve-se à liberação de cálcio das reservas intracelulares, como é o caso do retículo sarcoplasmático (SR), assim como à entrada deste ião a partir do espaço extracelular através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os agonistas (norepinefrina, angiotensina, endotelina, entre outros) ligam-se a recetores acoplados à proteína G e estimulam a atividade da fosfolipase C. Esta enzima é específica para fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ), que catalisa a formação de dois potentes segundos mensageiros:  $\text{IP}_3$  e DAG. Estes segundos mensageiros têm a capacidade de afetar os mecanismos de influxo de cálcio, uma vez que o  $\text{IP}_3$  se liga a recetores presentes no SR, levando à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol, e o DAG, juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$ , ativa a proteína cinase C (PKC) (Webb, 2003). Esta proteína cinase modula vários canais iónicos, incluindo os LTCC, em vários tipos de células, e no caso das SMC vasculares a sua ativação está envolvida no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por agonistas, que é responsável pela fase tónica da contração do músculo liso (Campbell et al., 1985). Existem várias isoenzimas da PKC no músculo liso, e cada uma delas tem uma função específica nos tecidos (Karakı et al., 1997; Webb, 2003).

A distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma não é uniforme, uma vez que nos compartimentos citosólicos o ião cálcio regula os elementos contrácteis, enquanto nos compartimentos próximos da membrana plasmática regula mecanismos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática (canais iónicos, bombas iónicas e enzimas). As concentrações de cálcio nestes compartimentos são reguladas de forma independente (Karakı et al., 1997). Em regiões específicas do citosol, um aumento espontâneo da concentração de cálcio por liberação deste ião do SR, denomina-se *calcium spark*. Normalmente os *sparks* de cálcio são apenas aumentos locais, mas, quando a concentração de cálcio no retículo está aumentada, esses *sparks* podem-se propagar por todo o citosol formando *calcium waves*. Nelson et al. (1995) propuseram que estes aumentos locais da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , logo abaixo da superfície da membrana, se deviam à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através de recetores de rianodina no SR, e que podiam ativar canais de  $\text{K}^+$ , hiperpolarizar a membrana e provocar a relaxação do músculo (Karakı et al., 1997; Nelson and Quayle, 1995).

○ Libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  do Retículo Sarcoplasmático (SR):

A atividade dos LTCC é também regulada pelo retículo sarcoplasmático. Este é considerado o retículo endoplasmático das células musculares, é especializado no armazenamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , que são libertados desta reserva quando a célula muscular é estimulada. Existem dois tipos de mecanismo de libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  do SR nas SMC. O primeiro mecanismo, designado por libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), é ativado por  $\text{Ca}^{2+}$  e tem como agonista e antagonista seletivos a cafeína e a rianodina, respetivamente (Karakaki et al., 1997; Zucchi and Ronca-Testoni, 1997). Relativamente ao segundo mecanismo, libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{IP}_3$  (IICR), é, como o nome indica, ativado por  $\text{IP}_3$ . Este é regulado não só por  $\text{IP}_3$  mas também por  $\text{Ca}^{2+}$ , e é reforçado por concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  inferiores a 300nM e, acima desta concentração, o  $\text{Ca}^{2+}$  inibe IICR. Tem como antagonista a heparina (Ferris and Snyder, 1992; Karaki et al., 1997).

### 1.3.2. Regulação do potencial de membrana

O movimento de íons através de canais iónicos determina, em grande escala, o potencial de membrana. Este, juntamente com a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , regula e modula o influxo e a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais iónicos e a também a sensibilidade da maquinaria contráctil ao  $\text{Ca}^{2+}$ . As SMC vasculares expressam diferentes tipos de canais iónicos que podem estar envolvidos na regulação do tónus vascular.

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem desempenham um papel muito importante na regulação do tónus vascular por potenciais de membrana: a hiperpolarização fecha estes canais e leva à vasodilatação, enquanto a despolarização abre os canais resultando na vasoconstrição. Estes canais são modulados por vários sistemas de sinalização e parecem ser ativados por vasoconstritores que ativam a via da PKC assim como a via da Rho cinase (ROCK). Estes canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem são inibidos pelo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula e pela ação de vasodilatadores que ativam as proteínas cinases dependentes de cGMP (PKG) e cAMP (PKA). Além de entrar nas SMC vasculares pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, o cálcio também pode entrar pelos SOCC, que são ativados quando há libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares através de uma via de sinalização que ainda não está bem definida, e pelos SACC, que são ativados por *stress* físico ou por estiramento da membrana (Hughes, 1995; Jackson, 2000).

Os canais de potássio são a principal via de condução de íons nas células do músculo vascular. Como tal, a sua atividade contribui para a determinação e regulação do potencial de membrana e do tónus vascular. O gradiente eletroquímico do  $\text{K}^+$  é tal que a abertura de canais de  $\text{K}^+$  resulta na difusão deste catião para fora das células e provoca hiperpolarização da membrana, e o encerramento de canais de  $\text{K}^+$  tem o efeito oposto (Nelson and Quayle, 1995). As SMC vasculares expressam quatro tipos de canais de potássio diferentes. Os canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$  são importantes na regulação do potencial de membrana de repouso e também parecem

participar no mecanismo de ação de diversos vasodilatadores, como a adenosina e a prostaciclina. Estes canais fecham com o aumento da concentração de ATP intracelular, contudo são também regulados por várias vias de sinalização independentes de ATP (Jackson, 2000; Nelson and Quayle, 1995). Os canais  $K_{Ca}$  são ativados pelo aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular e pela despolarização membranar. Nelson e os seus colegas (1995) defenderam que estes canais têm um papel central na regulação do tónus vascular devido a aumentos de  $Ca^{2+}$  subsarcolemal ( $Ca^{2+}$  sparks), devido à libertação deste ião através de recetores de rianodina no SR (Nelson and Quayle, 1995). Os canais  $K_V$  são ativados por despolarização da membrana com potenciais limiar para ativação substancial de, aproximadamente, -30mV. Também participam no mecanismo de ação de vasodilatadores, que atuam através da cascata de sinalização do cAMP abrindo os canais, e de vasoconstritores, que fecham os  $K_V$  por mecanismos que envolvem o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular e a PKC (Jackson, 2000; Nelson and Quayle, 1995). Acerca da função dos canais  $K_{IR}$  na regulação do potencial de membrana e do tónus vascular pouco se sabe, no entanto estes canais são ativados por hiperpolarização da membrana celular, permitindo assim o influxo de iões  $K^+$  quando a membrana se encontra hiperpolarizada e a saída destes quando o potencial de membrana aumenta (Jackson, 2000).

Por fim, os canais de cloro ( $Cl^-$ ) também têm sido propostos como reguladores do tónus vascular. Tal como acontece com os canais de  $K^+$ , o gradiente eletroquímico do  $Cl^-$  é tão grande que a abertura dos canais de  $Cl^-$  provoca o efluxo deste ião das células do músculo vascular. No entanto, devido à carga negativa, este efluxo vai causar despolarização e vasoconstrição, e o encerramento dos canais terá o efeito oposto. As SMC vasculares expressam apenas dois tipos de canais de  $Cl^-$ : canais de  $Cl^-$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $Cl_{Ca}$ ) e canais de  $Cl^-$  regulados pelo volume ( $Cl_{VR}$ ) (Jackson, 2000; Large and Wang, 1996; Nelson et al., 1997).

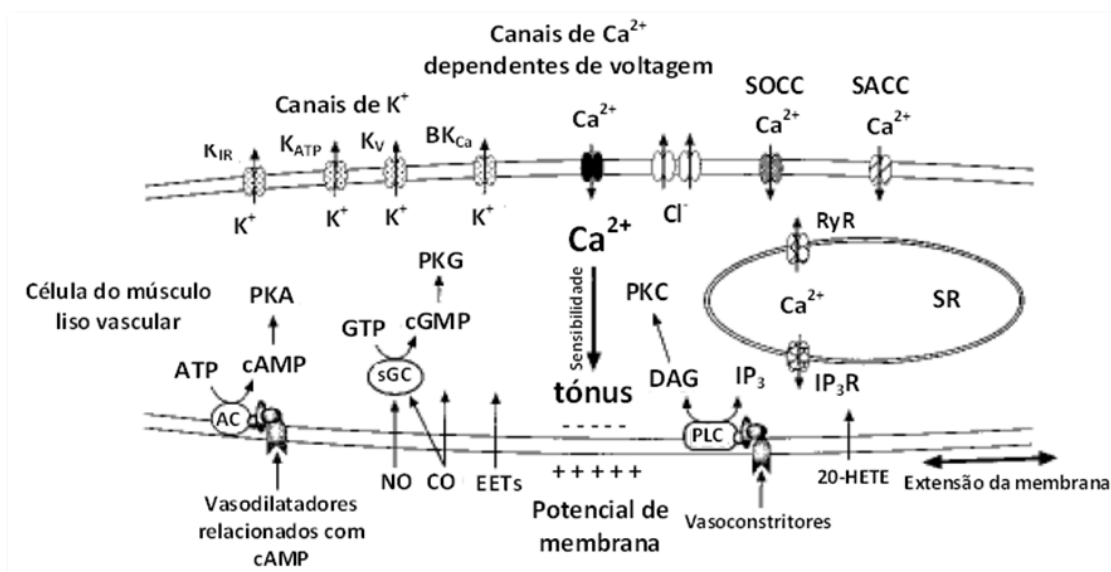


Figura 7 - Canais iônicos e tónus vascular. Adaptado de (Jackson, 2000).

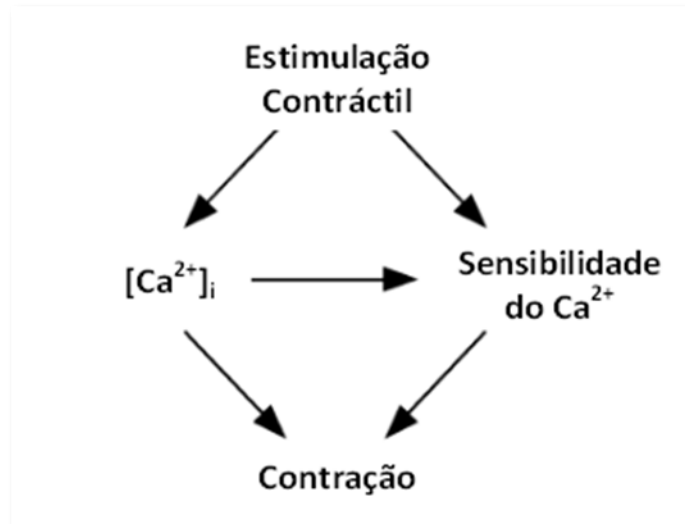
### 1.3.3. Contração Independente de $\text{Ca}^{2+}$

Nas últimas décadas tem havido um grande progresso no estudo dos movimentos do  $\text{Ca}^{2+}$  e a sua distribuição nas SMC. Avaliações simultâneas da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e contração em células intactas e tecidos do músculo liso, usando vários tipos de indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, têm permitido a análise da sensibilidade dos elementos contrácteis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A permeabilização da membrana celular possibilitou o estudo da contração na presença de concentrações constantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP e outras substâncias na célula. A comparação do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  e contração sugere um papel do cálcio localizado na regulação de diferentes mecanismos em partes diferentes da célula (Karaki et al., 1997).

Existe uma via de regulação que abrange alterações na atividade da MLCK. Como já foi referido anteriormente, esta proteína é ativada pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM e fosforila a cadeia leve reguladora da miosina que, por sua vez, vai interagir com a actina para induzir contração. A quantidade de MLC fosforilada depende do balanço entre a MLCK e a MLCP. Contudo, durante estimulação contínua, há uma redução gradual da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e da quantidade de MLC fosforilada, enquanto que a força isométrica aumenta, o que indica que a miosina não fosforilada também parece estar envolvida na manutenção da contração. Agonistas e segundos mensageiros modificam o rácio MLC cinase/MLC fosfatase independentemente da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Este mecanismo, conhecido como *sensibilização ao cálcio*, provoca a alteração da força contráctil mesmo na presença de um nível constante da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sendo assim independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os nucleótidos cíclicos também fosforilam a MLCK, diminuindo a sua sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto o cAMP como o cGMP alteram o balanço MLC cinase/MLC fosfatase e induzem relaxamento (Karaki et al., 1997; Xiong and Sperelakis, 1995).

- Sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$

A contração do SM vascular é submetida a uma dupla regulação: pelo sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  e pela alteração da sensibilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  (ver figura 8). Existem diversas hipóteses para a regulação da sensibilização ao cálcio, que incluem mecanismos dependentes ou independentes da fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$ , mas considera-se que o mecanismo dependente da fosforilação tem um papel fundamental na regulação deste processo (Hirano, 2007).



**Figura 8** - Regulação dupla da contração do músculo liso vascular pelo sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  e pela alteração da sensibilização do aparelho contráctil ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Adaptado de (Hirano, 2007).

A fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina ( $\text{MLC}_{20}$ ) pela MLCK e a desfosforilação pela MLCP são sujeitas a cascatas moduladoras que influenciam a sensibilidade da fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  e, conseqüentemente, a contração.

Existem agonistas que são capazes de provocar contrações musculares independentemente da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . A força de contração induzida por estes agonistas é maior do que a provocada pela despolarização da membrana induzida pelo aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , devido a mecanismos de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes mecanismos responsáveis pela sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  envolvem, principalmente, a inibição da atividade da MLCP por acoplamento entre os recetores de ligandos, proteínas G, e fatores de ligação de nucleótidos de guanina (Somlyo and Somlyo, 2003).

Foram identificadas duas vias principais para a inibição da atividade da MLCP no músculo liso: uma via que envolve a RhoA/Rho-cinase e outra que envolve a PKC. Na primeira via dá-se a ativação da proteína RhoA e da Rho-cinase pela ligação do recetor com proteínas G heterotriméricas, principalmente  $G_{12/13}$ . A Rho-cinase fosforila a subunidade reguladora da MLCP (MYPT1) no resíduo treonina-694 e/ou no treonina-850, levando à inibição da atividade da MLCP nas células e tecidos do músculo liso (Mizuno et al., 2008; Somlyo and Somlyo, 2003). A segunda via envolve a ativação da PKC através da ligação à proteína  $G_{q/11}$  e à fosfolipase CB. A proteína CPI-17 é um polipéptido de 17kDa e um potencial mediador da sensibilização ao cálcio, que no músculo liso é fosforilada pela PKC (Kitazawa et al., 2000). A fosforilação da CPI-17 no resíduo treonina-38 aumenta sua potência para inibir a atividade da MLCP (Mizuno et al., 2008).

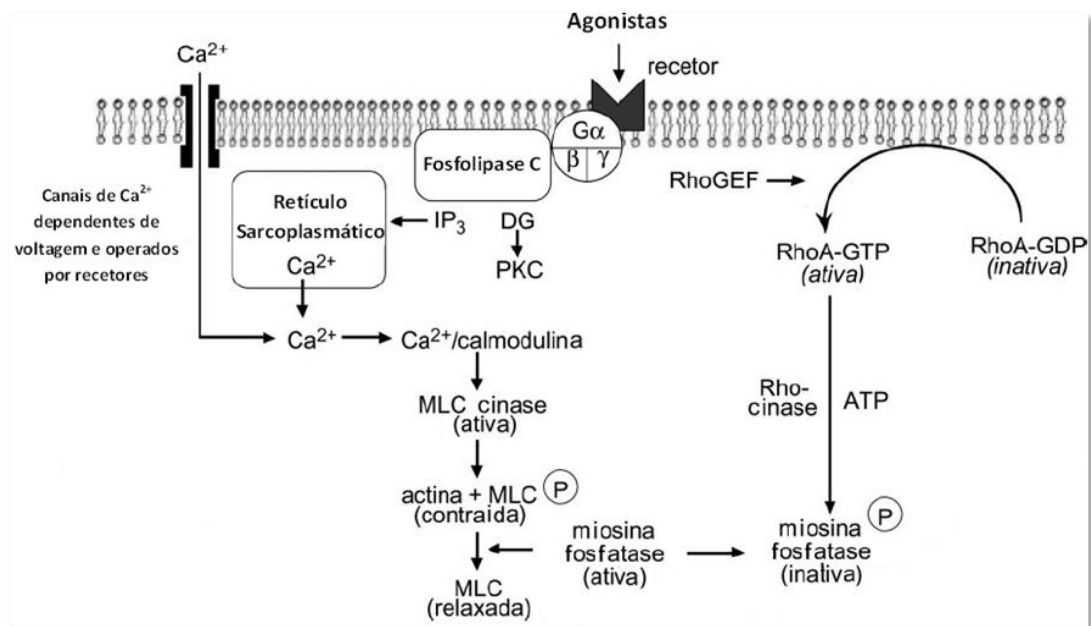
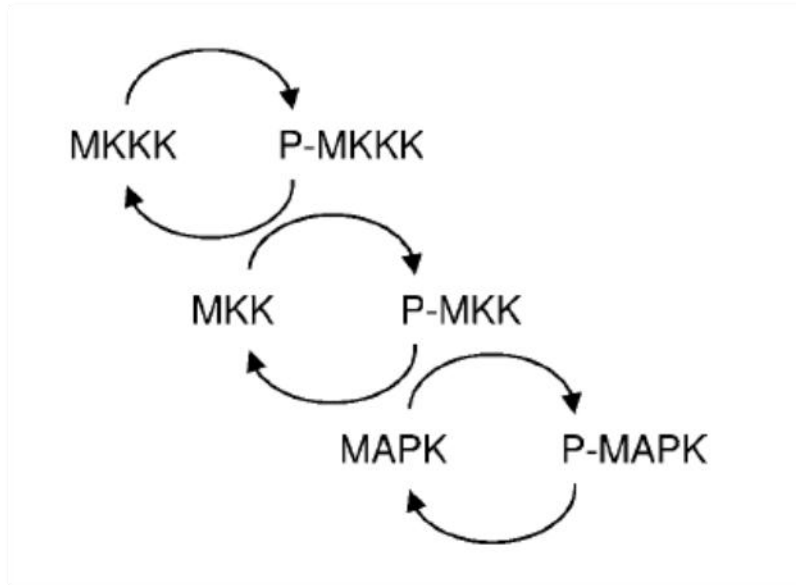


Figura 9 - Regulação da contração do músculo liso. Adaptado de (Webb, 2003).

#### o Via das MAPK

Além da fosforilação da  $MLC_{20}$ , existem outras vias independentes de  $Ca^{2+}$  que provocam contração, como por exemplo a via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK). Esta é uma das vias de sinalização mais importantes e mais intensivamente estudadas, sendo considerada como um paradigma para a transdução de sinal uma vez que tem um papel central em processos celulares essenciais, que vão desde o controle de crescimento, diferenciação e sobrevivência celulares à contração do músculo liso vascular (Cobb, 1999; Orton et al., 2005).

A via de sinalização MAPK consiste em três ciclos cinase/fosfatase construídos numa cascata de três níveis, que incluem a MAPK cinase cinase (MAPKKK), a MAPK cinase (MAPKK) e a MAPK terminal (Muslin, 2008; Orton et al., 2005). As MAPKKK, que são cinases de serina/treonina, são ativadas por fosforilação e/ou como resultado da interação com uma pequena proteína de ligação ao GTP da família Ras/Rho, em resposta a estímulos extracelulares (Kolch, 2000). A ativação da MAPKKK conduz à fosforilação e ativação da MAPKK, que por sua vez estimula a atividade de MAPK através de dupla fosforilação nos resíduos treonina e tirosina. Uma vez ativadas, as MAPKs fosforilam substratos-alvo em resíduos serina ou treonina seguidos por uma prolina, no entanto, a seletividade do substrato é geralmente conferida por motivos específicos de interação localizados nos substratos fisiológicos (Roux and Blenis, 2004). As MAPK são desativadas por uma família de fosfatases denominada MAPK fosfatase (MKP) (Farooq and Zhou, 2004).



**Figura 10** - Estrutura geral da cascata de três níveis da via das MAPK. Um sinal é propagado ao longo desta cascata por fosforilação sequencial. *In* (Orton et al., 2005).

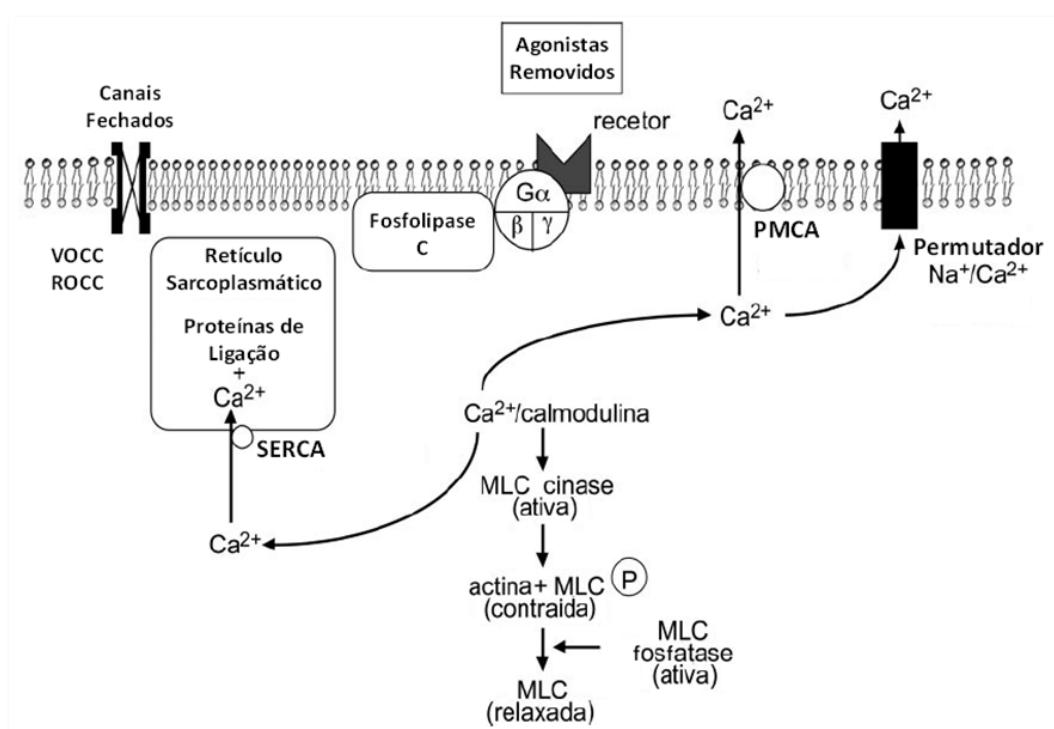
As MAPK dividem-se em três famílias diferentes: cinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK), cinases Jun N-terminal/proteínas cinases ativadas por stress (SAPK/JNK) e p38MAPK. Das ERK conhecem-se duas isoformas, a ERK1 e a ERK2; no caso das SAPK/JNK, estas são formadas por JNK1, JNK2 e JNK3 (também conhecidas como SAPK $\gamma$ , SAPK $\alpha$  e SAPK $\beta$ , respetivamente); e por último, a p38MAPK possui quatro isoformas p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  e p38 $\delta$  (Roux and Blenis, 2004).

#### 1.4. Regulação do relaxamento

O relaxamento do músculo liso vascular pode ocorrer tanto como resultado da remoção do estímulo contráctil como pela ação direta de substâncias que inibem o mecanismo contráctil. Não obstante, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de cálcio intracelular e um aumento da atividade da MLC fosfatase (Morgan, 1990; Somlyo et al., 1999).

Existem diversos mecanismos implicados na remoção do Ca<sup>2+</sup> citosólico que envolvem a Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), a Ca<sup>2+</sup>-ATPase da membrana plasmática (PMCA), o permutador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) e proteínas citosólicas de ligação ao Ca<sup>2+</sup> (Akata, 2007a). Tanto a SERCA como a PMCA desempenham um papel crucial na regulação da homeostase do cálcio citosólico. Em condições fisiológicas, a diminuição da concentração de cálcio resulta, principalmente, da passagem do Ca<sup>2+</sup> para o espaço extracelular mediada pela PMCA, ou da absorção do cálcio para as reservas intracelulares (nomeadamente o SR) mediada pela SERCA (Laporte and Laher, 1997; Marin et al., 1999). O NCX também está localizado na membrana plasmática e ajuda na diminuição do Ca<sup>2+</sup> intracelular. Este antiporte de baixa

afinidade está intimamente acoplado a níveis intracelulares de cálcio e pode ser inibido por amilorida e quinidina (Webb, 2003). Além destes três mecanismos, a inibição dos VOCC e dos ROCC localizados na membrana plasmática também pode provocar relaxamento. Antagonistas específicos dos LTCC, como dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas ligam-se a recetores distintos que existem nestes canais, inibindo assim a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas SMC (Webb, 2003). Por outro lado, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  também pode diminuir por inibição da libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  do SR. A rianodina e a heparina são antagonistas dos mecanismos de libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  desta reserva intracelular (Karakı et al., 1997). As proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  do SR também contribuem para a diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, como é o caso da calsequestrina e da calreticulina (Webb, 2003). Sob estas condições, a MLCP desfosforila a  $\text{MLC}_{20}$  induzindo relaxamento das SMC vasculares.



**Figura 11** - Regulação do relaxamento do músculo liso. VOCC: Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem; ROCC: Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por recetores. Adaptado de (Webb, 2003).

#### 1.4.1. Nucleótidos Cíclicos

A ativação da adenilato ciclase ou guanilato ciclase por recetores membranares e o acoplamento à proteína G provocam o aumento dos nucleótidos cíclicos cAMP e cGMP. Nas SMC vasculares, o aumento destes nucleótidos está implicado no relaxamento e representa uma estratégia útil para induzir uma variedade de efeitos farmacológicos benéficos em diferentes patologias cardiovasculares. Os seus níveis intracelulares são resultado do balanço entre a taxa da sua síntese e da taxa da sua degradação (Lincoln and Cornwell, 1991; Morgado et al., 2012; Xiong and Sperelakis, 1995).

Agentes que aumentam cAMP e cGMP nas SMC vasculares, levam ao declínio de  $I_{Ca(L)}$ , provavelmente pela ativação das respetivas proteínas cinases e subsequente fosforilação. Sendo assim, um dos mecanismos de ação de vários tipos de vasodilatadores é exercido pelo aumento de cGMP e/ou cAMP, resultando na ativação de PKG e PKA. Estas proteínas cinases podem fosforilar os LTCC, inibindo a abertura do canal, e os canais de  $K^+$ , estimulando a sua abertura. Ambos os mecanismos inibem os potenciais de ação dependentes de  $Ca^{2+}$  e, desta forma, inibem a atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  (Ishikawa et al., 1993; Sperelakis and Ohya, 1990; Xiong and Sperelakis, 1995).

o GMP Cíclico:

O monofosfato cíclico de 3'5'-guanosina (cGMP) pode ser sintetizado nas SMC vasculares por dois tipos de guanilato ciclase que diferem na sua localização celular e na sua ativação: a guanilato ciclase particular ou membranar (pGC) e a guanilato ciclase solúvel ou citosólica (sGC). A primeira, tal como o nome indica, está presente na membrana plasmática e é ativada pelos péptidos natriuréticos auricular (ANP), cerebral (BNP) e tipo C (CNP) (Potter et al., 2006), a sGC está presente no citosol e pode ser ativada pelo óxido nítrico (NO) ou pelos dadores do NO (Cary et al., 2006; Morgado et al., 2012).

Existem diversos mecanismos celulares envolvidos no aumento dos níveis de cGMP, que incluem a inibição de vários subtipos de fosfodiesterases (PDE), a ativação de guanilato ciclase solúvel e a ativação da guanilato ciclase membranar (Polson and Strada, 1996; Schulz and Waldman, 1999; Sonnenburg and Beavo, 1994; Vaandrager and de Jonge, 1996; Wang, 1998). O aumento dos níveis de cGMP conduz à ativação da PKG, que, por sua vez, reduz a  $[Ca^{2+}]_i$  e a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, nas SMC vasculares, causando assim vasorelaxamento (Akata, 2007b; Nishimura et al., 1992; Vaandrager and de Jonge, 1996). São as fosfodiesterases que catalisam a hidrólise do cGMP para a sua forma biológica inativa (5'-GMP), limitando assim a atividade destas moléculas sobre o seu substrato (PKG) (Lugnier, 2006; Morgado et al., 2012; Omori and Kotera, 2007).

A PKG é uma cinase de serina/treonina, composta por três domínios distintos: o amino-terminal, o de regulação e o catalítico (Hofmann et al., 2006). O domínio de regulação contém dois locais de ligação para o cGMP, e a ocupação de ambos os locais liberta a inibição do centro catalítico, permitindo assim a fosforilação de resíduos de serina/treonina nas proteínas-alvo e no local de autofosforilação do amino-terminal. Além de controlar a ativação e inibição do centro catalítico, o terminal  $NH_2$  está envolvido noutras duas funções (Hofmann et al., 2006): na dimerização dos homodímeros da PKG que são mantidos juntos por um zipper de leucina, e no direcionamento da PKG para diferentes localizações subcelulares (Morgado et al., 2012).

Embora o aumento do cGMP seja uma das principais causas do relaxamento, o seu mecanismo vasodilatador ainda não é totalmente compreendido. No entanto, têm sido propostos vários mecanismos que explicam a redução da  $[Ca^{2+}]_i$  mediada por PKG. Estes incluem:

- 1) Ativação da captação de cálcio pelas reservas intracelulares, por fosforilação do fosfolambam e ativação da SERCA (Orallo, 1996; Vaandrager and de Jonge, 1996);
- 2) Aumento do efluxo de  $Ca^{2+}$ , por estimulação da PMCA e do permutador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Orallo, 1996; Vaandrager and de Jonge, 1996);
- 3) Inibição da libertação de  $Ca^{2+}$  do SR, através da fosforilação do  $IP_3R$  mediada por PKG e/ou pela inibição da síntese de  $IP_3$  (Orallo, 1996; Vaandrager and de Jonge, 1996);
- 4) Hiperpolarização da membrana através da ativação direta ou indireta dos canais de  $K^+$  (Orallo, 1996; Vaandrager and de Jonge, 1996);
- 5) Inibição direta dos VOCC, devido à fosforilação destes pela proteína fosfatase 2A (Orallo, 1996; Vaandrager and de Jonge, 1996);
- 6) Redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  induzida por PKG, devido à redução da fosforilação da  $MLC_{20}$  (possivelmente por desfosforilação da  $MLC_{20}$  pela MLCP) (Akata, 2007b; Orallo, 1996; Somlyo and Somlyo, 1994, 2000; Vaandrager and de Jonge, 1996).

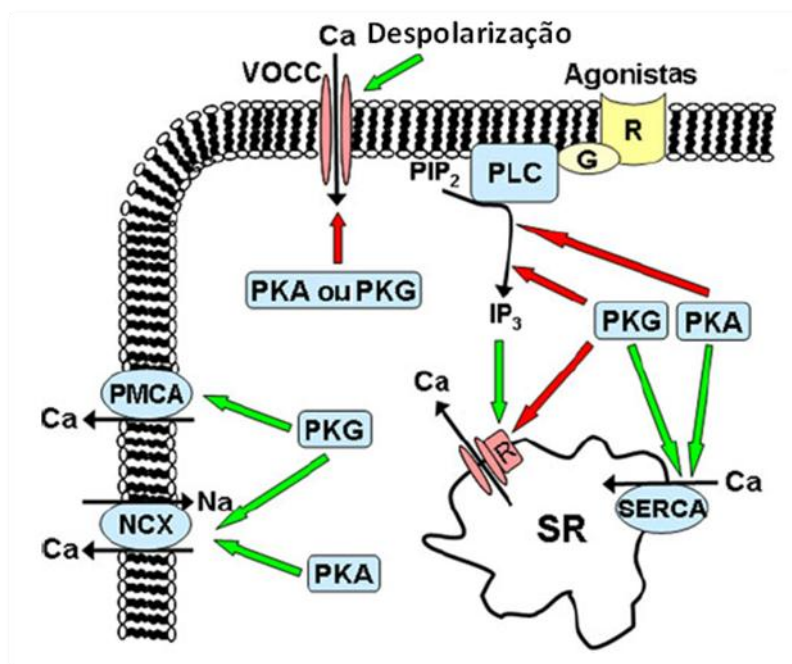


Figura 12 - Mecanismos envolvidos na redução da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelas proteínas cinases dependentes de nucleótidos cíclicos. (Setas verdes: estimulação; Setas vermelhas: inibição; SR: retículo sarcoplasmático; G: proteína G; R: recetor da proteína G Adaptado de (Morgado et al., 2012).

○ AMP Cíclico:

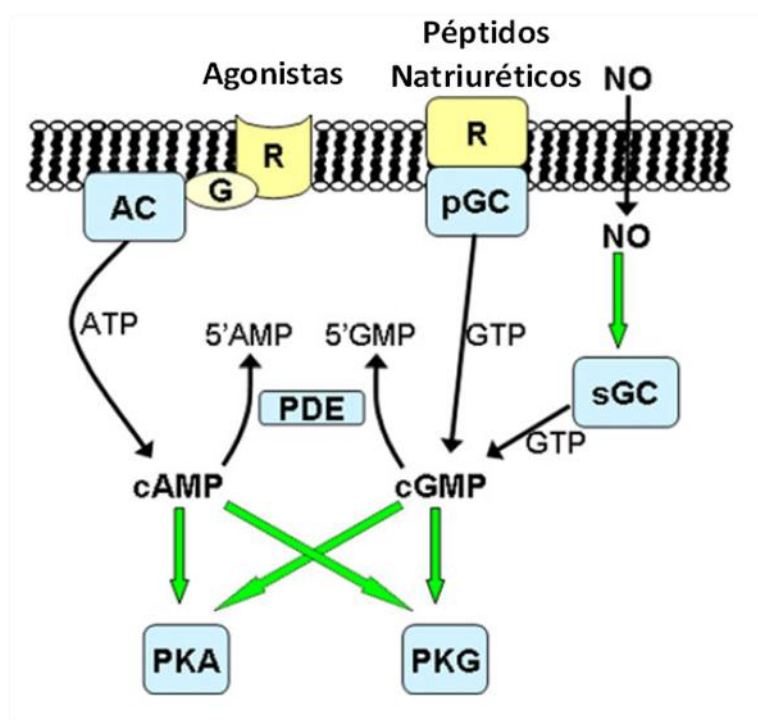
O cAMP é sintetizado a partir do ATP intracelular pela adenilato ciclase, que por sua vez é ativada por um primeiro estímulo externo (neurotransmissor, hormona ou fármaco) que se liga a um recetor acoplado à proteína G (Fig. 13). Existem cerca de nove isoformas da adenilato ciclase (AC), desde a AC1 à AC9, que podem ser reguladas de várias formas diferentes (Hanoune and Defer, 2001; Willoughby and Cooper, 2007). Da mesma forma como acontece com o cGMP, o cAMP também pode ser degradado para o seu metabolito inativo, o 5'-AMP, pelas fosfodiesterases (Lugnier, 2006; Morgado et al., 2012; Omori and Kotera, 2007).

O aumento dos níveis de cAMP tem uma grande influência sobre mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  através da ativação da proteína cinase dependente de cAMP (PKA). A PKA é uma proteína cinase que fosforila as proteínas alvo em resíduos de serina e treonina e altera a atividade destas. Estruturalmente, esta proteína heterotrimérica é constituída por uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades reguladoras,  $\beta$  e  $\gamma$  (Oakhill et al., 2011). O domínio catalítico está localizado no N-terminal da subunidade  $\alpha$ , e a sua ativação depende da fosforilação no resíduo Treonina 172 (Stein et al., 2000). A subunidade  $\beta$  possui um domínio de ligação ao glicogénio, é miristoilada (processo que pode localizar a cinase para a membrana celular) e, possivelmente, atua como uma proteína *scaffold*. No caso da subunidade  $\gamma$ , esta contém o local de ligação para o AMP, onde a junção desta molécula induz uma alteração conformacional na subunidade levando à ativação da PKA (Hutchinson et al., 2008; Morgado et al., 2012).

O mecanismo pelo qual ocorre o relaxamento por aumento dos níveis de cAMP permanece pouco claro, no entanto foram propostos vários mecanismos que explicam o envolvimento da PKA no relaxamento, incluindo:

- 1) Inibição da ativação da PLC e dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Minami et al., 1993; Rembold, 1992; Takuwa, 1996);
- 2) Estimulação da PMCA e do permutador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Minami et al., 1993; Rembold, 1992; Takuwa, 1996);
- 3) Estimulação da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o SR, por fosforilação do fosfolambam mediada pela PKA (Minami et al., 1993; Rembold, 1992; Takuwa, 1996);
- 4) Ativação dos canais de  $\text{K}^+$  (Minami et al., 1993; Rembold, 1992; Takuwa, 1996);
- 5) Redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , possivelmente por fosforilação da MLCK, diminuindo a afinidade para o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (Rembold, 1992; Takuwa, 1996).

É ainda importante mencionar que existe uma ativação cruzada que pode estar envolvida na ação vasodilatadora, em que a PKG pode ser ativada pelo cAMP (Rembold, 1992; Vaandrager and de Jonge, 1996) e a PKA pelo cGMP (Akata, 2007b; Takuwa, 1996; Vaandrager and de Jonge, 1996). A ativação da PKG pelo cAMP requer uma concentração de cAMP dez vezes maior que a concentração de cGMP necessária para ativar esta cinase. Da mesma forma, a concentração de cGMP necessária para ativar a PKA é também dez vezes a concentração de cAMP. No músculo liso, o nível citosólico de cAMP é cerca de dez vezes superior ao nível citosólico de cGMP, o que significa que elevações na concentração de cAMP podem levar à ativação tanto de PKA como de PKG, enquanto um aumento de cGMP só deve ativar PKG (Rembold, 1992).



**Figura 13** - Mecanismos envolvidos na regulação dos níveis dos nucleótidos cíclicos e ativação das cinases por estes nucleótidos. (Setas verdes: estimulação; AC: adenilato ciclase; pGC: guanilato ciclase particular; sGC: guanilato ciclase solúvel; R: receptor; PDE: fosfodiesterases; G: proteína G) Adaptado de (Morgado et al., 2012).

## 1.5. Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDE) são um grupo de enzimas intracelulares que controlam os níveis de cAMP e cGMP por hidrólise de 3' do fosfato cíclico ligado a adenosina e/ou guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico, inibindo assim o relaxamento das SMC vasculares. O papel principal destas enzimas na sinalização intracelular designou-as como potenciais alvos terapêuticos, nomeadamente na inflamação, asma, disfunção erétil, hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca, esquizofrenia, acidente vascular cerebral, e depressão (Francis et al., 2011; Lugnier, 2006; Rybalkin et al., 2003).

As PDEs podem ser classificadas de acordo com o seu substrato como: específicas para o cAMP, específicas para o cGMP e de substrato duplo, sendo estas últimas capazes de hidrolisar tanto o cAMP como o cGMP. A especificidade de uma PDE de substrato duplo para cada nucleótido cíclico é determinada pela orientação de um resíduo de glutamina invariante no local de ligação do domínio catalítico da PDE, um mecanismo que é denominado de *glutamine switch*. A orientação da glutamina resulta da presença de resíduos de aminoácidos vizinhos que restringem a rotação da glutamina, permitindo a ligação do anel de purina de um dos nucleótidos cíclicos através da formação de pontes de hidrogénio. A afinidade de ligação ( $K_m$ ), as atividades de hidrólise catalítica ( $V_{máx}$  e  $K_{cat}$ ) e a presença de domínios específicos na região N-terminal podem revelar muita informação acerca da forma como as PDEs regulam as interferências (*crossstalk*) dos nucleótidos cíclicos. A presença de domínios N-terminal é extremamente importante, uma vez que a atividade nestes domínios pode causar alterações conformacionais no domínio catalítico das PDEs, mudando os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  da enzima para os nucleótidos cíclicos (Reiersen et al., 2011).

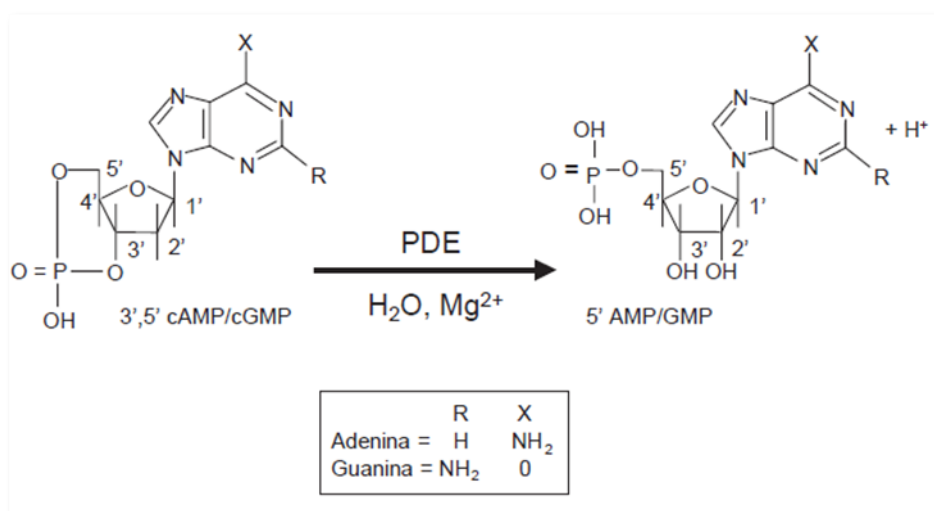
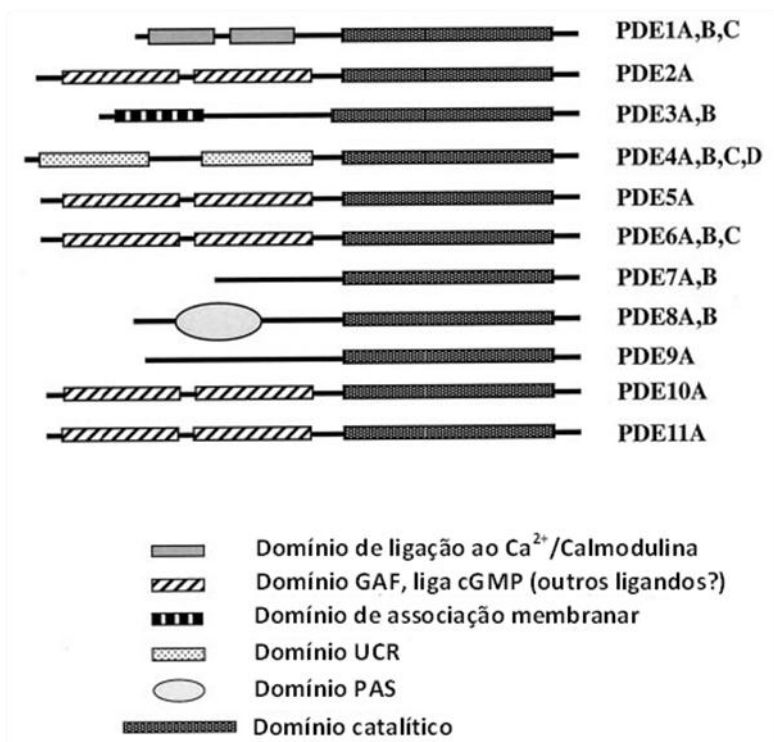


Figura 14 - Hidrólise dos nucleótidos cíclicos pelas fosfodiesterases. Adaptado de (Lugnier, 2006).

Foi estabelecida uma nomenclatura para as fosfodiesterases de acordo com os seus genes, as suas propriedades bioquímicas, a sua regulação e a sua sensibilidade a agentes farmacológicos (Beavo, 1995; Lugnier, 2006). Desta forma, foram identificadas 11 famílias de PDE diferentes (PDE1-PDE11), que podem ser encontradas numa variedade de células (Lugnier, 2006; Morgado et al., 2012; Omori and Kotera, 2007). Estas famílias são codificadas por 21 genes, em que cada uma delas engloba cerca de 2-4 genes distintos, dando assim origem a 50 isoformas (Omori and Kotera, 2007).

Os domínios proteicos envolvidos na regulação da atividade enzimática e na localização subcelular das PDE incluem os domínios catalítico e regulador e estão presentes, principalmente, na região N-terminal. O domínio catalítico, que constitui o núcleo das PDE, é uma região altamente conservada que compreende 270 resíduos de aminoácidos. Entre o N-terminal e o domínio catalítico, encontra-se o domínio regulador, no qual se localizam os locais de ligação da calmodulina na PDE1, os locais alostéricos de ligação ao cGMP, isto é, os domínios GAF nas PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 e PDE11 (Ho et al., 2000; Zoraghi et al., 2004), os locais de fosforilação, as regiões conservadas a montante na PDE4 (UCR), um domínio *per-arnt-sim* na PDE8 (PAS), sequências auto-inibitórias nas PDE1 e PDE4 e um domínio de associação membranaar nas PDE2-4 (Lugnier, 2006; Omori and Kotera, 2007). Por último, entre o domínio catalítico e o C-terminal, existe ainda outro domínio que pode ser fosforilado pela MAPK mas do qual a função ainda se desconhece (Lugnier, 2006).



**Figura 15** - Organização dos domínios das 11 famílias das fosfodiesterases. Todas as PDE partilham uma homologia significativa no seu domínio catalítico, mas diferem bastante nas regiões N-terminais, que contêm diferentes tipos de domínios de regulação. Adaptado de (Rybalkin et al., 2003).

Os membros da família das fosfodiesterases apresentam diferentes especificidades na hidrólise dos substratos cAMP e cGMP. Enquanto as PDE4, PDE7 e PDE8 hidrolisam o cAMP, as PDE5, PDE6 e PDE9 são específicas para o cGMP. As famílias 1, 2, 3, 10 e 11 utilizam ambos os substratos, cAMP e cGMP, apresentando eficácias catalíticas distintas (Rybalkin et al., 2003; Wang et al., 2007). De forma geral, as principais fosfodiesterases presentes no músculo liso arterial são PDE1, PDE3 e PDE5, e no músculo liso de algumas espécies também é expressa uma quantidade substancial de PDE4. Em condições basais, isto é, em condições com baixos

níveis de cálcio, considera-se que, no músculo liso, a PDE mais ativa na hidrólise de cGMP é a PDE5. Quando as concentrações de cálcio se encontram elevadas, por exemplo durante o processo de contração muscular e na divisão celular, uma ou mais variantes da PDE1 podem tornar-se as fosfodiesterases predominantes. Embora a PDE3 não tenha uma capacidade catalítica tão grande como as PDE1 e PDE5, pode ainda desempenhar um papel essencial no controlo de cAMP e talvez de cGMP em compartimentos específicos da célula. Torna-se assim necessário mencionar que estas PDE não possuem obrigatoriamente a mesma localização subcelular e, portanto, são muitas vezes úteis, pelo menos em parte, em diferentes compartimentos funcionais na célula (Rybalkin et al., 2003).

Tabela 1 - Classificação das famílias das PDEs. Adaptado de (Lugnier, 2006)

Família das PDE	Substratos	Propriedades	Inibidores
PDE1	cAMP, cGMP	Ativa Ca <sup>2+</sup> -CaM	Nimodipina
PDE2	cAMP, cGMP	Ativa cGMP	EHNA
PDE3	cAMP, cGMP	Inibe cGMP	Cilostamida, milrinona
PDE4	cAMP	Insensível a cGMP	Rolipram, Ro 20-1724, roflumilast
PDE5	cGMP	Fosforila PKA/PKG	Zaprinast, DMPPPO, E4021, Sildenafil
PDE6	cGMP	Ativa transducina	Zaprinast, DMPPPO, E4021, Sildenafil
PDE7	cAMP	Insensível ao rolipram	BRL 50481, ICI242
PDE8	cAMP	Insensível ao rolipram, Insensível ao IBMX	Desconhecido
PDE9	cGMP	Insensível ao IBMX	Desconhecido
PDE10	cAMP, cGMP	Desconhecida	Desconhecido
PDE11	cAMP, cGMP	Desconhecida	Desconhecido

### 1.5.1. Caracterização e propriedades das famílias das PDE

Tendo em conta que as principais famílias de fosfodiesterases expressas em diversos tipos de músculo liso vascular são as PDE1, PDE2 (músculo liso da artéria aorta de porco), PDE3, PDE4, PDE5 e PDE7, esta secção focar-se-á particularmente nestes seis subtipos.

○ Família da PDE1

A característica que distingue esta família de fosfodiesterases das outras é a sua ativação pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (CaM-PDE). As PDE1 têm na sua constituição dois domínios de ligação ao complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , e para que fiquem completamente ativas é necessária a ligação do cálcio e da calmodulina. Constituem uma grande família de enzimas que é codificada por três genes distintos: PDE1A, PDE1B e PDE1C (Rybalkin et al., 2003). Estas três variantes diferem na sensibilidade para o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Sonnenburg et al., 1995; Yan et al., 1996), na afinidade para os seus substratos e na sua distribuição. Desta forma, podem ser expressas em diversos tipos de células, no interior de tecidos ou regiões dentro de uma célula, e portanto podem contribuir para a regulação de funções celulares específicas (Lugnier, 2006).

As PDE1 são capazes de hidrolisar tanto o cGMP como o cAMP. No caso da PDE1A e da PDE1B, estas possuem uma alta afinidade para o cGMP, mas têm afinidades inferiores e diferentes para o cAMP. A PDE1C difere das outras duas variantes, pela sua capacidade de hidrolisar igualmente bem o cGMP e o cAMP (Loughney et al., 1996; Rybalkin et al., 2003).

**Inibidores:** A *nimodipina* é um inibidor específico da PDE1. Trata-se de uma di-hidropiridina que antagoniza especificamente os LTCC, mas este efeito não está relacionado com a sua propriedade antagonista do cálcio, uma vez que inibe, na escala micromolar, a PDE1 basal e estimulada por calmodulina (Lugnier et al., 1984). Como a baixas concentrações a *nimodipina* bloqueia os LTCC, só pode ser utilizado para estimar a participação da PDE1 em células e tecidos homogeneizados (Georget et al., 2003). Muitos compostos considerados como inibidores da PDE1 não interagem diretamente com o sítio catalítico desta enzima atuando durante a ativação, quer ao nível de locais de ligação da calmodulina, como o composto *KS505a* (Ichimura et al., 1996), ou diretamente sobre o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , como o *bepril*, a *flunarizina* e a *amiodarona* (Lugnier, 2006; Lugnier et al., 1984; Nokin et al., 1989).

○ Família da PDE2

Esta família de PDE está distribuída em diversos tecidos e células, principalmente na medula adrenal, no coração, no cérebro, no fígado, em células endoteliais e macrófagos (Bender et al., 2004; Lugnier, 2006). Ainda não foi detetada em SMC vascular, com exceção de extratos da artéria aorta de porco onde foi encontrada uma atividade muito baixa desta PDE. A PDE2A hidrolisa os dois nucleótidos cíclicos com taxas máximas semelhantes e valores de  $K_m$  relativamente elevados. É alostericamente estimulada pela ligação do cGMP ao seu domínio GAF (Martinez et al., 2002) que permite a regulação mútua da sinalização do cAMP e do cGMP (Omori and Kotera, 2007). Foi mostrado que esta PDE tem um papel funcional no coração, uma vez que regula a corrente basal de cálcio nos miócitos auriculares humanos (Lugnier, 2006; Rivet-Bastide et al., 1997).

**Inibidores:** O EHNA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina), inibidor da adenosina desaminase, comporta-se também como um inibidor seletivo da PDE2 (Mery et al., 1995; Podzuweit et al., 1995). Este composto reverte o efeito inibitório de elevadas concentrações de cGMP ou de dadores de NO sobre a corrente de  $Ca^{2+}$ , em miócitos auriculares humanos (Fischmeister et al., 2006; Kirstein et al., 1995; Vandecasteele et al., 2001).

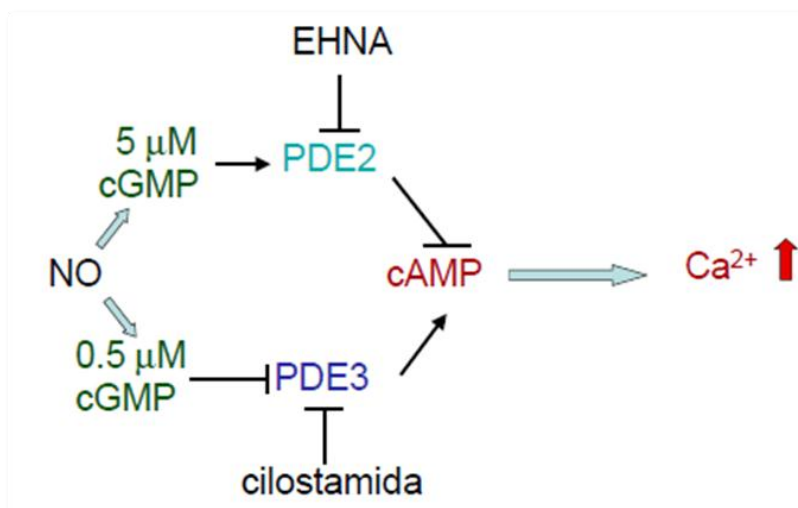
- Família da PDE3

A PDE3 é caracterizada pela sua elevada afinidade para o cAMP e pela sua capacidade de hidrolisar tanto cAMP como o cGMP (Lugnier, 2006). No entanto, o cGMP é considerado como um inibidor competitivo para a hidrólise de cAMP, uma vez que o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  para este nucleótido é muito superior (cerca de 4-10 vezes maior) ao do cGMP (Degerman et al., 1997). Assim, esta família de fosfodiesterases pode também ser designada de “PDE inibida pelo cGMP”. O mecanismo pelo qual o cGMP inibe a atividade catalítica da PDE3 dá-se pela competição com o cAMP para o local catalítico (Omori and Kotera, 2007; Rybalkin et al., 2003).

Contrariamente a qualquer outra família de fosfodiesterases, o domínio catalítico da PDE3 é caracterizado por uma inserção de 44 aminoácidos que pode estar envolvida na sensibilidade da PDE3 ao cGMP. A PDE3 contém duas isoformas, PDE3A e PDE3B, sendo que a PDE3A é mais sensível ao cGMP do que a PDE3B (He et al., 1998; Lugnier, 2006; Rybalkin et al., 2003).

Relativamente à sua distribuição, a PDE3A encontra-se expressa no músculo liso, plaquetas e coração (Degerman et al., 1997), e a PDE3B está presente, principalmente, no tecido adiposo e hepatócitos. Contudo, ambas as isoformas da PDE3 foram identificadas no músculo liso vascular, onde parecem estar envolvidas em processos regulados por cAMP, como o relaxamento do músculo liso (Rybalkin et al., 2003; Shakur et al., 2001).

**Inibidores:** A *cilostamida* (Hidaka et al., 1979) foi descrita como o primeiro inibidor seletivo para a PDE3. A comparação dos efeitos deste inibidor sobre a PDE3 isolada de plaquetas e sobre a PDE3 do músculo liso vascular, bem como o seu efeito relaxante e anti-agregante, salientou a especificidade da cilostamida para a PDE3 das plaquetas, indicando que esta difere da PDE3 do músculo liso vascular (Lugnier, 2006). Além deste, outros inibidores da PDE3 incluem a *milrinona*, *vesnarinona* e *enoximona*, que têm efeitos vasodilatores e inotrópicos significativos (Beavo, 1995). O uso clínico a curto prazo da *milrinona* foi aprovado para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca descompensada (Seino et al., 1995). O *cilostazol*, outro inibidor da PDE3, foi também aprovado para o tratamento de claudicação intermitente, uma doença vascular caracterizada por dores nas pernas (Dawson et al., 1998). É de salientar que estes fármacos são contraindicados para pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Rybalkin et al., 2003).



**Figura 16** - Regulação bifásica, dependente de NO/cGMP, do  $Ca^{2+}$  intracelular mediada pela PDE2 e PDE3, em miócitos cardíacos humanos. O NO estimula a guanilato ciclase solúvel, aumentando os níveis intracelulares de cGMP; a uma concentração baixa, o cGMP inibe a PDE3 (tal como a *cilostamida*) e, consequentemente, aumenta os níveis de cAMP, induzindo uma elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  mediada por PKA; a altas concentrações, o cGMP ativa a PDE2, levando à diminuição dos níveis de cAMP e do  $Ca^{2+}$  intracelular; *EHNA* inverte totalmente o efeito de altas concentrações de cGMP. Adaptado de (Lugnier, 2006).

#### ○ Família da PDE4

Esta família de fosfodiesterases, específica para o cAMP, é expressa, principalmente, no cérebro, tecidos cardiovasculares, células inflamatórias e no músculo liso, mas está ausente nas plaquetas (Lugnier, 2006).

Representa a maior família das PDE, sendo constituída por quatro genes: PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D. A PDE4 hidrolisa seletivamente o cAMP e contém uma região com uma sequência específica de aminoácidos, denominada *Upstream Conserved Region* (UCR1 e UCR2) (Bolger et al., 1993; Lugnier, 2006). A atividade da PDE4 é regulada por fosforilação no local UCR1 pela PKA e no C-terminal pela proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), sendo esta regulação dependente da isoforma (Hoffmann et al., 1999; Houslay and Adams, 2003; Sette and Conti, 1996).

**Inibidores:** O principal inibidor desta fosfodiesterases é o *rolipram*. Este liga-se à PDE4 em dois locais distintos, no local de ligação ao rolipram de baixa afinidade (LARBS - *low-affinity rolipram binding site*) e de alta afinidade (HARBS - *high-affinity rolipram binding site*) (Jacobitz et al., 1996; Schneider et al., 1986). Foi proposto que o efeito anti-inflamatório está associado ao LARBS enquanto a emese está relacionada com o HARBS (Lugnier, 2006).

○ Família da PDE5

Esta família de PDE tem sido identificada em todos os tipos de SMC vascular e visceral (Rybalkin et al., 2003), assim como no coração, pulmões, cerebelo e, em muito menor grau, no cérebro e rins (Lugnier, 2006). A PDE5, como principal família de fosfodiesterases que hidrolisa o cGMP, está em posição para controlar eficazmente a via de sinalização cGMP/PKG, especialmente sob condições de baixos níveis de cálcio (Rybalkin et al., 2003).

Foram identificadas três isoformas da PDE5, que diferem apenas na extremidade do N-terminal, sendo estas a PDE5A1, PDE5A2 e PDE5A3 (Kotera et al., 1998; Loughney et al., 1998). A PDE5A1, originalmente denominada *PDE específica do cGMP*, parece ser a forma predominante na maioria dos tecidos que contêm PDE5. A PDE5A2 além de conter um fragmento N-terminal significativamente menor também tem sido identificada em diferentes espécies (Kotera et al., 1999), e a PDE5A3 é apenas expressa em tecidos humanos (Lin et al., 2000).

A PDE5 é um homodímero altamente específico para a hidrólise de cGMP e contém dois domínios: o domínio regulador N-terminal e o domínio catalítico C-terminal. O domínio N-terminal contém um local de fosforilação (Ser102 nos humanos (Zoraghi et al., 2005)) dependente de PKA ou PKG, e dois domínios reguladores homólogos, definidos como GAF A e GAF B (Aravind and Ponting, 1997; Rybalkin et al., 2003). É a ligação do cGMP ao domínio GAF A que expõe o resíduo de Ser102 para a fosforilação pela PKG e em menor escala pela PKA, que não só ativa a função catalítica da PDE5, como também aumenta a afinidade para a ligação de cGMP (Corbin et al., 2000; Omori and Kotera, 2007; Zoraghi et al., 2005).

O estado de ativação da PDE5 é dependente do nível intracelular de cGMP, que é regulado em três diferentes fases de ativação (Lugnier, 2006):

- 1) Um estado hidrolítico basal baixo na ausência de ccGMP;
- 2) Um estado reversível ativado quando se liga o cGMP ao GAF A, que é um pré-requisito para permitir a fosforilação;
- 3) Uma ativação completa da PDE5.

**Inibidores:** O envolvimento da PDE5 no relaxamento tornou-se claro quando se demonstrou que a inibição específica da PDE5 pelo *zaprinast* induzia um aumento nos níveis de cGMP associados com efeitos de relaxamento (Lugnier et al., 1986; Schoeffter et al., 1987). Desta forma, novos inibidores da PDE5 foram sintetizados a partir do *zaprinast*, com o objetivo final de conceber fármacos anti-hipertensivos ou vasodilatadores coronários. Um desses novos inibidores foi o *sildenafil*, que foi proposto como fármaco anti-hipertensivo, contudo, durante estudos clínicos, o *sildenafil* melhorou a disfunção erétil, apontando a PDE5 como um novo alvo para o tratamento desta disfunção e aumentando o desenvolvimento de inibidores da PDE5 (Lugnier, 2006). Além destes inibidores, existem ainda outros, como o *tadalafil* e o *vardenafile*, que estão também a ser usados no tratamento da disfunção erétil (Padma-Nathan et al., 2001; Rybalkin et al., 2003; Saenz de Tejada et al., 2001).

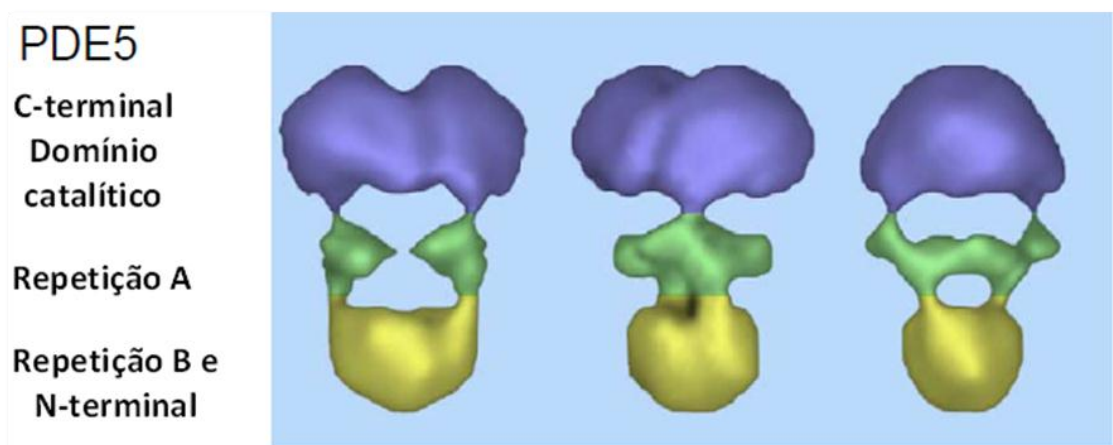


Figura 17 - Estrutura tridimensional da PDE5 nativa de plaquetas humanas, obtida por microscopia eletrônica. Adaptado de (Lugnier, 2006)

#### ○ Família da PDE7

As fosfodiesterases do tipo 7 caracterizam-se por terem uma elevada afinidade para o cAMP e por serem insensíveis tanto ao cGMP como aos inibidores das PDE3 e PDE4, nomeadamente o rolipram. Esta família tem uma sequência de aminoácidos distinta das outras PDEs cujo substrato é o cAMP e não contém domínios reguladores nem domínios GAF, uma vez que é específica para o cAMP. Foram identificados dois genes que codificam estas fosfodiesterases, sendo estes PDE7A e PDE7B. A PDE7A é expressa nas SMC vasculares da artéria pulmonar humana assim como em células do endotélio vascular (Lugnier, 2006; Matsumoto et al., 2003).

**Inibidores:** Os principais inibidores desta família de fosfodiesterases são o IC242, que inibe seletivamente a PDE7, e o *BRL50481*, com um nível aceitável de seletividade (*in vitro*). Além destes, foi descoberta uma nova classe estrutural de inibidores potentes e seletivos para as PDE7, os tiadiazóis.

## 1.6. Macrocíclos (MaC)

Pensa-se que, no passado, o modelo clássico do farmacóforo foi influenciado pela fácil disponibilidade sintética das estruturas em anel, com cinco ou seis membros. Inicialmente o desenvolvimento de novos compostos com utilidade na área da saúde envolvia o isolamento de moléculas a partir de produtos naturais. Assim, os compostos naturais desempenharam um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos e têm sido sugeridos como um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos e muitas abordagens levaram à descoberta de compostos ativos (Nielsen, 2002; Wessjohann et al., 2005).

Entre estes compostos naturais há compostos *Macrocíclicos* (MaC) que apresentam atividades biológicas notáveis e muitos deles (ou os seus derivados) têm sido utilizados para desenvolver fármacos (Newman et al., 2003; Wessjohann et al., 2005). São caracterizados por terem uma estrutura semi-rígida em forma de anel, sendo considerados como macromoléculas cíclicas (Obrecht et al., 2009). Entre este tipo de moléculas temos compostos naturais, por exemplo eritromicina A (antibiótico), vancomicina (antibiótico), anfotericina B (antifúngico), e outros compostos sintetizados em laboratório, como por exemplo o inibidor da enzima convertidora de angiotensina K-13 (Marsault and Peterson, 2011). Os macrocíclos naturais têm muitas vezes estruturas bastante complexas, com uma grande variedade de tamanhos do anel e uma constituição química bastante diversa, e atividades extremamente elevadas. O tamanho do anel, a distribuição do peso molecular, a presença de diferentes elementos e grupos funcionais, o padrão de repetição da distribuição da carga e polaridade dentro da molécula (muitas estruturas mostram um lado apolar e lipofílico e um lado polar hidrofílico), ou até mesmo a presença de uma pequena fração ou um radical aromático substituído, são algumas das propriedades que caracterizam os vários tipos de macrocíclos (Wessjohann et al., 2005).

A maioria dos macrocíclos sintéticos e os seus análogos acíclicos têm estruturas flexíveis e, portanto, cavidades dobráveis. Ao longo da última década, foi feito um progresso substancial na construção de hospedeiros moleculares que simulam bolsas de proteínas, como por exemplo macrocíclos, macrobíclos (Hof and Rebek, 2002). Contrariamente aos bolsos sofisticados das proteínas, a maioria das cavidades sintéticas apenas permitem um pequeno controlo sobre as suas dimensões e funções (Gong, 2008).

As estruturas macrocíclicas grandes têm propriedades físicas únicas, características estruturais peculiares e um comportamento químico que diferem das suas contrapartes menores. As suas cavidades bem definidas podem servir como sítios catalíticos, contudo, a formação de grandes macrocíclos é dificultada pela natureza entrópica do processo de ciclização (Feng et al., 2009). Devido ao grande número de unidades monoméricas e à flexibilidade global dos precursores oligoméricos não cíclicos, os macrocíclos grandes são particularmente difíceis de sintetizar. Desta forma, para melhorar a eficácia das reações de macrociclização várias estratégias foram adotadas, tais como a ciclização utilizando metal, o fecho do anel intramolecular, e a formação de ligações covalentes reversíveis (Feng et al., 2009).

A elevada ocorrência de macrocíclos na natureza pode ser racionalizada pelo facto de que estes compostos constituem um equilíbrio entre a sua conformação e a flexibilidade para conseguir propriedades de ligação óptimas para o seu alvo biológico. Desta forma, as estratégias da natureza para a síntese de macrocíclos complexos são uma grande fonte de inspiração, proporcionando oportunidades tanto para a química sintética bem como para a biotecnologia (Wessjohann et al., 2005). Compostos macrocíclicos, como ciclodextrinas, éteres coroa e poli-heterocíclos com anéis oxazole, são considerados importantes hospedeiros seletivos em algumas aplicações biológicas: como solubilizadores e estabilizadores de

fármacos e como agentes anticancerígenos (Cruz et al., 2011; Georgiades et al., 2010; Murray and Rees, 2009).

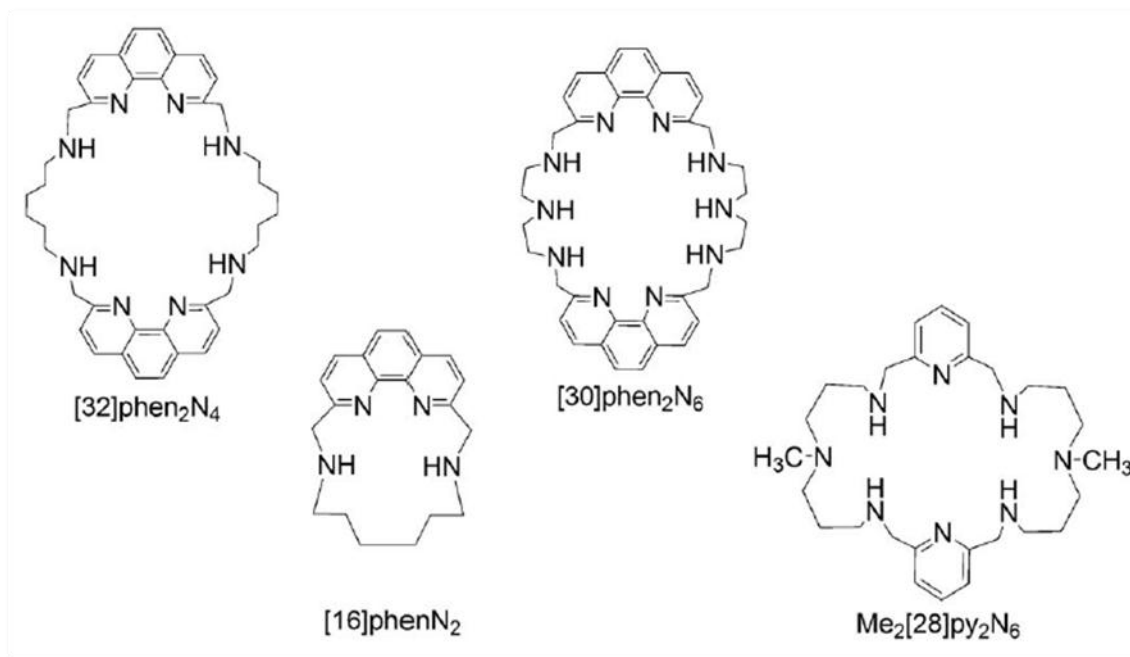
### 1.6.1. Macrocíclos estudados

Na última década, estudos biomédicos têm-se focado em estruturas heterocíclicas devido às suas propriedades químicas e biológicas. As poliaminas macrocíclicas compreendem um grupo característico de heterocíclos que podem ser modulados a fim de ligar seletivamente diferentes espécies de hospedeiros, desde aniões inorgânicos simples a moléculas biológicas, como ATP, DNA e RNA (Llinares et al., 2003; Sharma, 2004). Além disso, alguns estudos mostraram que os ligandos tetra-azamacrocíclos e os seus complexos com metais de transição apresentaram atividade anticancerígena em algumas linhas celulares cancerígenas, devido à sua capacidade de ligação, clivagem e intercalação de DNA ou esgotamento dos níveis de ATP nestas células (Baraldi et al., 2004; Cruz et al., 2012). As poliaminas macrocíclicas cobertas com diversos grupos hidrofóbicos e polares permitem o reconhecimento de sequências específicas de DNA e, ao mesmo tempo, são facilmente absorvidas pelas células por cadeias hidrofóbicas ligadas a anéis poliazas (Cruz et al., 2012).

No presente estudo, foram analisados quatro macrocíclos que possuem anéis de piridina (*py*) e fenantrolina (*phen*) na sua constituição, sendo estes [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, [16]phenN<sub>2</sub> e Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>. Estes MaC foram previamente sintetizados por Cruz *et al* (Cruz et al., 2011; Cruz et al., 2009; Cruz et al., 2003), e pertencem a diferentes tipos de macrocíclos. O [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> e o [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> são poliazamacrocíclos que contêm duas unidades de 1,10-fenantrolina (Cruz et al., 2009). No caso do [16]phenN<sub>2</sub>, este é um precursor versátil para a síntese do macropolicíclo *criptfen*, uma vez que contêm dois grupos amina secundários que podem ser ligados por ciclização 2:2 com porções 1,0-fenantrolina (Cruz et al., 2011). Por fim, o Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub> é também um poliazamacrocíclo, mais concretamente um octaazamacrocíclo de 28 membros derivado do [28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>.

Um poliazamacrocíclo é uma macromolécula cíclica que contém mais de um átomo de azoto no lugar dos átomos de carbono. Estes compostos e os seus complexos metálicos têm sido amplamente estudados no que diz respeito às suas propriedades estruturais, espectrais, redox e biológicas, uma vez que, alguns deles são modelos para os centros ativos de metaloenzimas, são potencialmente bioativos e podem ser utilizados como drogas e catalisadores, e representar novos materiais com propriedades elétricas e magnéticas específicas (Vuckovic et al., 2011; Vuckovic et al., 2009). Relativamente aos octaazamacrocíclos, estes apresentam propriedades de coordenação interessantes, uma vez que, apesar do grande tamanho da cavidade formada pela estrutura do macrocíclo, são capazes de formar complexos de metais mono- e di-nucleares estáveis, bem como estabilizar vários aniões na forma hexaprotonada (Cruz et al., 2003).

O efeito destes MaC foi já estudado em três tipos de células cancerígenas e não cancerígenas, como potenciais sondas fluorescentes para marcar a localização da mitocôndria e do retículo endoplasmático (Cruz et al., 2011). Nesse trabalho realizado por Cruz *et al.*, determinou-se que estes compostos têm uma localização celular específica. Através de microscopia de fluorescência detetou-se a presença destes compostos na mitocôndria mas, no entanto, não houve qualquer dano sobre a integridade deste organelo, o que sugere que, a pH fisiológico, os compostos possuem uma carga positiva deslocalizada, permitindo assim que atravessem as membranas mitocondriais, tal como a membrana plasmática. Os resultados deste estudo também mostram que, além da mitocôndria, os compostos macrocíclicos também estão presentes no retículo endoplasmático, que se pode dever à existência de redes organizadas espacial e funcionalmente, mediadas por proteínas mitocondriais e membranas associadas à mitocôndria que interconectam o RE e a mitocôndria. Para além da localização, foi também analisada a citotoxicidade destes compostos, sugerindo que, de forma geral, estes MaC não são tóxicos nas concentrações usadas, à exceção do [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> que, quando usado em concentrações inferiores a 0,01µM, possui um efeito tóxico em células cancerígenas. Em nenhum destes compostos se verificaram efeitos notáveis de apoptose e necrose (Cruz et al., 2011).



**Figura 18** - Estrutura química dos macrocíclos que possuem piridina (*py*) e fenantrolina (*phen*) na sua constituição. Adaptado de (Cruz et al., 2011).

## Capítulo II - Objetivos

Os compostos macrocíclicos (MaC) estudados são macromoléculas cíclicas que têm a capacidade de atuarem como transportadores moleculares, uma vez que conseguem atravessar a membrana celular sem alterar a sua integridade e não são tóxicos nas concentrações usadas. Assim, pretende-se que sejam usados como transportadores de diferentes tipos de fármacos com ação a nível cardiovascular para minimizar alguns dos problemas destes fármacos, nomeadamente a sua biodisponibilidade.

Para analisar a viabilidade dos macrocíclos para a utilidade indicada anteriormente, realizaram-se culturas de células A7r5 (linha celular de células musculares lisas da artéria aorta embrionária de rato), uma vez que as SMC vasculares são fundamentais para a regulação do tónus vascular. Nestas células, a regulação do fluxo de  $Ca^{2+}$  é fundamental para a contração e a sua desregulação pode estar envolvida na patofisiologia de diversas doenças cardiovasculares.

O principal objetivo deste trabalho é analisar os potenciais efeitos tóxicos e benéficos dos MaC sobre as células A7r5, através do estudo da contractilidade e da atividade dos LTCC destas células. Estes estudos são essenciais para uma posterior análise da atividade dos complexos formados pelos MaC e os fármacos com ação a nível cardiovascular.

Desta forma, foram definidos diferentes objetivos específicos para atingir a correta resolução deste trabalho, sendo estes:

1. Cultura de células A7r5 - linha celular de células musculares lisas da artéria aorta embrionária de rato.
2. Análise do efeito contráctil dos macrocíclos, a diferentes concentrações (0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M), nas células A7r5 através da técnica PCSA - *planar cell surface area*.
3. Análise do efeito dos macrocíclos sobre a atividade dos canais de cálcio das células A7r5, através de um sistema designado *Patch Clamp* na configuração *whole cell*.

## Capítulo III - Materiais e Métodos

### 3.1. Soluções e Materiais

#### 3.1.1. Soluções

Nas tabelas seguintes estão representadas as soluções utilizadas durante a realização deste trabalho, incluindo a sua composição e respetivas concentrações.

Tabela 2 - Soluções utilizadas durante a realização deste trabalho.

Solução	Composição
Solução antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000 U); estreptomicina (10 mg) e anfotericina (25 mg)
Solução de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> /F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 Liofilizado, NaHCO <sub>3</sub> (1,2g/L) e ácido L-ascórbico (20mg/L) pH 7,4
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS - 10%); Albumina de soro bovino (BSA - 0,5%)
Meio de cultura sem soro	DMEM-F12; Albumina de soro bovino (BSA - 0,5%)
Solução <i>phosphate buffered saline</i> (PBS - solução fosfato-salino diluído)	NaCl (110mM); CaCl <sub>2</sub> (0,15mM); KCl (5mM); MgCl <sub>2</sub> (2mM); HEPES (10mM); NaHCO <sub>3</sub> (10mM); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5mM); NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5mM); glicose (10mM) e EDTA (0.49mM) NaCl; KCl; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Solução de PBS-EDTA	PBS com 0,025% de EDTA
Solução de tripsina-EDTA	0,5g de tripsina de porco e 0,2g de EDTA
Solução de BSA (Albumina de soro bovino)	250g BSA e 10mL H <sub>2</sub> O

Tabela 3 - Composição da solução do meio interno (MIM A1) para a micropipeta e elétrodo do *Patch-clamp*.

Composição	Concentração (mM)
HEPES	10,0
EGTA	5,0
CsCl	119,8
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4,0
TEA	10,0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,062
NaATP	3,1
NAGTP	0,42
pH (CsOH)	7,3

Tabela 4 - Composição da solução do meio externo (RCs Ca<sub>3</sub>) para as placas utilizadas no *Patch-clamp*.

Composição	Concentração (mM)
NaCl	107,1
HEPES	10,0
CsCl	40,0
Glucose	5,0
NaPiruvato	5,0
NaHCO <sub>3</sub>	4,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,8
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,8
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,8
pH (NaOH)	7,4

### 3.1.2. Químicos

Durante a realização deste trabalho foram utilizados diversos compostos químicos e drogas. Para o PCSA foi usado um fluoróforo para a marcação das células A7r5, a *Concanavalina A*, adquirido da *VectorLab*. Utilizaram-se também dois agentes contrácteis diferentes, a serotonina e a noradrenalina, previamente obtidos da *Sigma-Aldrich*. O Bay K8644, da marca *Tocris*, é um agonista dos canais de Ca<sup>2+</sup> usado no *Patch-clamp*, e foi inicialmente dissolvido em etanol com concentração final não superior a 0,1%. No final, todas estas drogas são obtidas por diluição em meio externo (RCs Ca<sub>3</sub>). Os macrocíclos, testados por ambas as técnicas, encontram-se dissolvidos em tampão fosfato, no entanto, as soluções das diferentes concentrações foram também obtidas por diluição em meio externo (RCs Ca<sub>3</sub>).

### 3.1.3. Material

Na tabela que se segue estão descritos alguns materiais e equipamentos utilizados para a realização deste trabalho.

Tabela 5 - Descrição do material/equipamento e as respetivas marcas usados para a realização deste trabalho.

	Material/Equipamento	Marca
	Balança digital	Sartorius
	Medidor de pH	Metrohm
	Frasco de cultura/ <i>multiwells</i> (6 wells)	Orange scientific
	Sistema de incubação	Pecon
PCSA (Planar Cell Surface Area)	Caixas de <i>Petri</i> específicas para o microscópio de fluorescência	Sarstedt
	Microscópio de fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
	<i>Software</i> específico do microscópio de fluorescência	Axio Vision program 4,8
Patch-clamp	Caixas de <i>Petri</i> pequenas	Sarstedt
	Eléttodos	Reagente 5, Portugal
	Amplificador <i>Axopatch</i> 200B	Axon Instruments, EUA
	Conversor analógico-digital de interface de Digidata 1322A	Axon Instruments, EUA
	Computador compatível com o <i>software</i> de Pclamp8	Axon Instruments, EUA

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Cultura de células A7r5

As células A7r5 são uma linha celular do músculo liso vascular que deriva da aorta embrionária de rato (Obejero-Paz et al., 1998). Têm sido extensivamente usadas como modelo para investigar a homeostase do cálcio em células vasculares. Além de possuírem várias propriedades funcionais e estruturais iguais às SMC vasculares, as monocamadas confluentes das células A7r5 são eletrofisiologicamente iguais às SMC vasculares (Marks et al., 1990). Estas células expressam o mesmo tipo de canais de cálcio, dependentes de voltagem e ativados por recetores, que as células recém-isoladas do músculo liso vascular da aorta de rato. As correntes de cálcio registadas através de *Patch clamp* na configuração *whole-cell* são maiores nesta linha celular do que nas células recém-isoladas (Marks et al., 1990; Obejero-Paz et al., 1998). Neste sentido, estas células têm uma via de influxo de  $Ca^{2+}$  sensível a voltagem, que resulta da atividade de canais específicos que abrem a potenciais de membrana de repouso, e as medições das correntes observadas em *Patch-clamp* na configuração *whole-cell* indicam que estas correntes se devem à abertura dos LTCC. Além destes canais, estas células também apresentam outro tipo de VOCC, os canais de  $Ca^{2+}$  tipo T. (Obejero-Paz et al., 1998) (Marks et al., 1990).

Por se tratar de uma linha celular, estas células têm como vantagem o fácil e rápido crescimento em laboratório, tornando assim possível realizar estudos bioquímicos em paralelo com estudos eletrofisiológicos. Assim, torna-se benéfico usar esta linha celular para explorar as propriedades das correntes de cálcio do músculo liso vascular (Marks et al., 1990).

Procedeu-se à realização da cultura celular. As células foram colocadas em frascos de cultura, aos quais se adicionou meio de cultura completo (DMEM-F12 com soro fetal bovino a 10% e uma mistura de antibióticos), posteriormente foram transferidos para uma incubadora a 37°C numa atmosfera de ar a 95% e CO<sub>2</sub> a 5%. O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias. Quando as células atingem confluência, são tripsinizadas e transferidas para *multiwells* (6 wells) até voltarem a estar novamente confluentes, altura em que o meio de cultura completo é substituído pelo meio sem soro, 24 ou 48 horas antes de se realizarem o *Patch-clamp* ou o PCSA, respetivamente.

### 3.2.2. PCSA - *Planar Cell Surface Area*

- Marcação das células A7r5 com o fluoróforo

Como foi referido anteriormente, quando as células A7r5 se encontram em confluência plena, o meio de cultura completo é substituído por meio sem soro, 48 horas antes da realização da experiência. Para a marcação das células, foi previamente preparada uma solução *stock* de Concanavalina A (1µg/mL) (diluição de 10x: 1µL de Concanavalina A para 9µL de PBS), da qual se retira 1µL para adicionar a 500µL de meio sem soro. Após adição da solução de meio sem soro com o fluoróforo às células confluentes, estas são incubadas a 37°C numa atmosfera de ar a 95% e CO<sub>2</sub> a 5% durante 24 horas. As células são então tripsinizadas e colocadas (500µL) em caixas de *Petri* que possuem na sua base um vidro específico para a fluorescência. Colocam-se novamente na incubadora, a 37° C numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4 horas. Após este período de incubação, a solução de meio sem soro com concanavalina é removida da caixa e, para remover o excesso de fluoróforo, realizam-se 4 lavagens com 500µL de PBS, e mantém-se a última lavagem como meio para posteriormente levar para o ensaio microscópico.

- Análise das células A7r5 no microscópio de fluorescência

As células foram observadas através do microscópio invertido de fluorescência da marca *Zeiss Axio Observer Z1*. Este é um microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade (*Axio Cam Hsm*) e possui um sistema de incubação incorporado, que permite o controlo da temperatura, determinante para a manutenção da viabilidade das células.

Após a primeira observação das células, tiraram-se duas fotografias, com e sem fluorescência, para servirem de controlo, e é adicionado o agente contráctil (serotonina -  $1\mu\text{M}$ ; noradrenalina -  $1\mu\text{M}$ ). Passados 20 minutos tira-se uma nova fotografia, desta vez com fluorescência, e adiciona-se o macrocíclo (uma das quatro concentrações de um dos quatro macrocíclos). Ao fim de 20 minutos volta-se a tirar uma última fotografia, com o efeito que os MaC tiveram sobre a pré-contracção das células. Realizou-se a análise e o tratamento das imagens através do programa *Axionvision 4.8 software*, recorrendo ao suplemento *Automatic measurement programs*, que permitiu medir a diferença de área das células após a adição do agente contráctil e dos MaC.

A partir do momento em que se começa a usar o fluoróforo, assim como os agentes contrácteis, todos os procedimentos são realizados na ausência de luz, e todo o material que contém estes químicos é envolvido em papel de alumínio e deve-se evitar uma exposição prolongada a ambientes luminosos.

### 3.2.3. *Patch-clamp* - Configuração *whole-cell*

- Princípios gerais

Neher e Sakmann (1976) introduziram a técnica de *Patch-clamp* que permitiu, pela primeira vez, observar e determinar o fluxo das correntes de canais iónicos individuais. Para que tal aconteça, uma pequena pipeta de vidro, polida por calor, é pressionada contra a membrana da célula, formando um “selo” eléctrico entre a superfície interna da micropipeta e a membrana celular. A aplicação de uma pressão negativa no interior da micropipeta provoca um aumento na resistência do “selo”, que passa a ser designado de *giga-ohm seal* (resistência  $>10\text{G}\Omega$ ). Forma-se assim a configuração *cell-attached*, que permite que a corrente iónica flua através dos canais abertos na porção da membrana eletricamente isolada para a micropipeta (Hamill et al., 1981). A estabilidade mecânica do “selo” permite a realização de várias configurações para o estudo dos canais iónicos. Uma grande vantagem desta técnica é a capacidade de detetar correntes iónicas em diversos tipos células, nomeadamente nas SMC vasculares (Hamill et al., 1981; Neher et al., 1978).

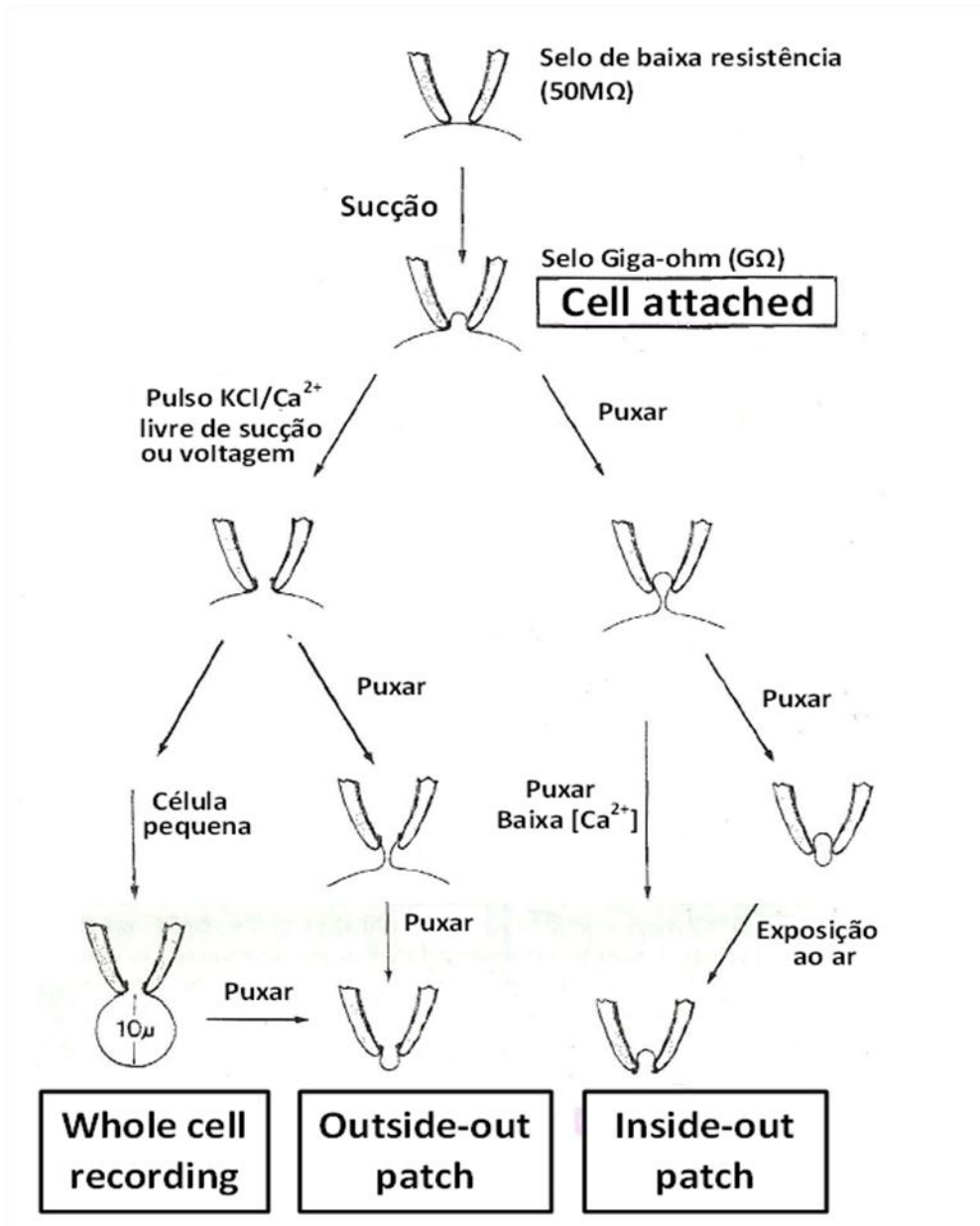


Figura 19 - Representação esquemática dos procedimentos que levam às diferentes configurações do Patch-clamp. Adaptado de (Hamill et al., 1981).

o Patch-clamp na configuração whole-cell

Após a obtenção do “selo”, a membrana que se encontra na micropipeta pode ser quebrada, gerando-se uma continuidade entre a solução da micropipeta e o interior da célula. Forma-se assim uma via de baixa resistência elétrica entre estes dois meios, o que torna possível o controlo da voltagem da célula. A esta configuração dá-se o nome de *whole-cell* uma vez que permite medir as correntes iónicas associadas a todos os canais iónicos existentes na membrana celular (Angus, 1996 ).

Além da capacidade de medir as correntes de todos os canais presentes na membrana celular, esta configuração tem também como vantagem permitir controlar as soluções internas da célula, uma vez que as pipetas utilizados têm um diâmetro relativamente grande para uma fácil permutação entre os conteúdos da célula e da micropipeta (Angus, 1996 ).

A difusão imediata dos constituintes da micropipeta para a célula também tem sido explorada com intuito de modificar a concentração intracelular de segundos mensageiros putativos. Deste modo a sua influência sobre a função do canal pode ser investigada diretamente (Angus, 1996 ).

- Medição da corrente dos canais de cálcio tipo L ( $I_{CaL}$ )

Para a realização do *Patch-clamp* é necessário que as células estejam confluentes e, quando tal acontece, o meio de cultura completo é substituído por meio sem soro, 24 horas antes da realização da experiência, e após este período as células são tripsinizadas e mantidas a 4°C em meio sem soro até se iniciar o procedimento.

Antes de se dar início a esta técnica, é necessário introduzir o meio interno na micropipeta e no elétrodo (feito de vidro macio de borossilicato - *Reagent 5*, Portugal) e o meio externo na caixa de *Petri* onde se colocam as células.

A medição das correntes iónicas foi realizada com o auxílio de um amplificador de voltagem *Axopatch 200B* de *patch-clamp* (*Axon instruments, USA*), a uma frequência de 10kHz através de um conversor analógico-digital de interface de *Digidata 1322A* (*Axon instruments, USA*), ligado a um computador compatível com o *software* de *Pclamp8* (*Axon instruments, USA*). O *Patch-clamp* foi efetuado na configuração *whole-cell* de forma a registar as correntes de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $I_{CaL}$ ), e, para tal, as células A7r5 foram mantidas a um potencial de repouso de -80 mV e despolarizadas a cada 8 segundos a 0 mV durante 500 ms.

Após estabilização das correntes, as soluções de controlo (RCS  $Ca_3$ ) e que contêm as drogas (MaC - 0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) foram aplicadas na caixa de *Petri* que contém o meio externo, colocando a célula junto à abertura de um capilar com 250 $\mu$ m de diâmetro, fluindo com um caudal de 20 $\mu$ L  $min^{-1}$ . Também se testou o efeito destes MaC sobre as correntes estimuladas por Bay K (0,01 $\mu$ M), com uma solução de controlo igual (RCS  $Ca_3$ ) e às soluções que contêm as drogas foi adicionado o Bay K, que sendo um agonista deste tipo de canais estimula as respetivas correntes. Todas estas soluções foram previamente dissolvidas em meio externo.

Todas as experiências eletrofisiológicas foram realizadas à temperatura ambiente, sendo os protocolos de estimulação dependentes da corrente iónica a analisar.

### 3.2.4. Análise Estatística

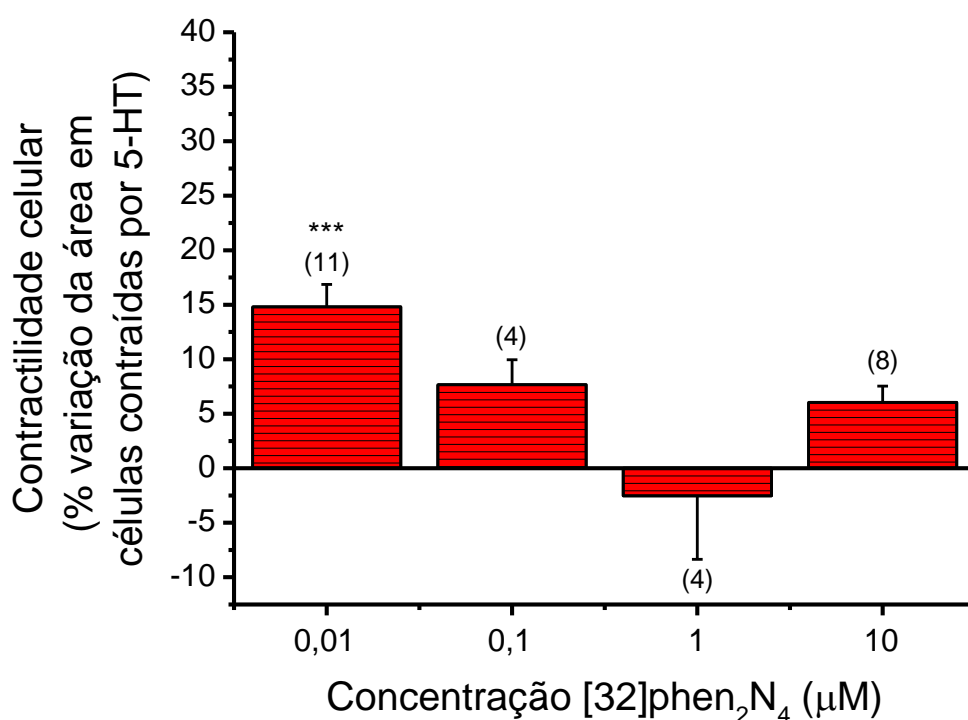
A análise estatística foi realizada utilizando o programa *SigmaStat Statistical Analysis System*, versão 3.5 (2007). Os resultados foram expressos em função da média  $\pm$  S.E.M. de  $n$  experiências. A significância estatística entre dois grupos de dados foi analisada utilizando o teste *t-Student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico). A comparação entre mais de dois grupos de dados foi analisada segundo o método *One-way ANOVA* e o teste *One Way Kruskal-Wallis* (teste não paramétrico). Os níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos ( $P < 0,05$ ).

## Capítulo IV - Resultados

### 4.1. Efeito dos MaC na contractilidade após contração com Serotonina (5-HT)

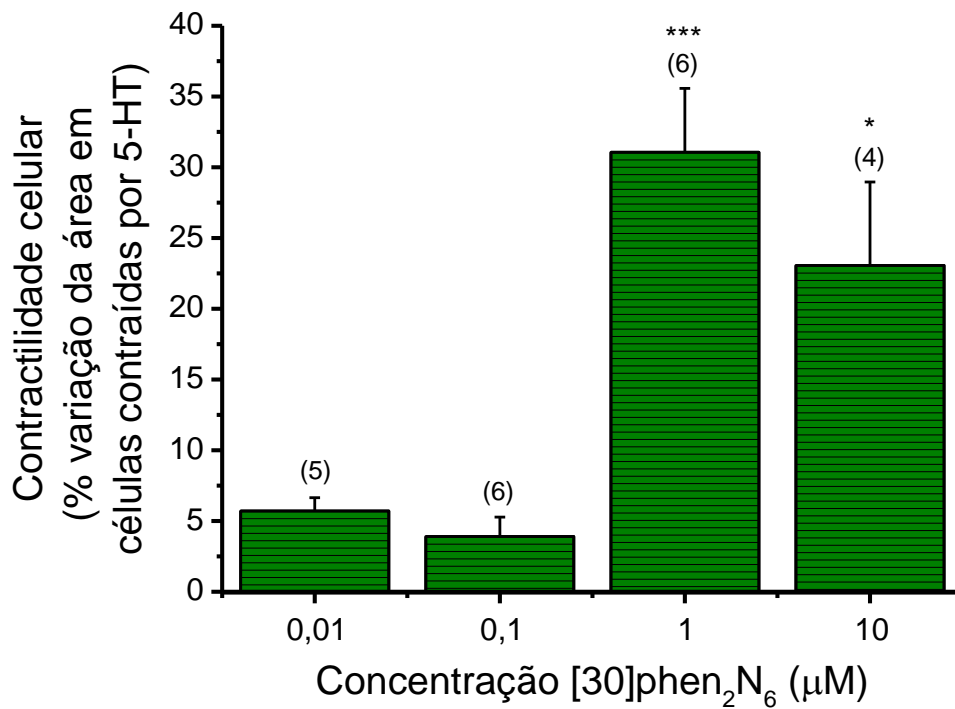
Foi analisado o efeito de diferentes concentrações (0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) de vários macrocíclos em células A7r5 pré-contraídas com 5-HT (1 $\mu$ M).

A elevadas concentrações, o MaC [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> não induziu efeito significativo sobre as contrações induzidas por 5-HT (P>0,05). Só a concentração 0,01 $\mu$ M é que induziu um aumento significativo da contração provocada por 5-HT (P<0,001) (Figura 20).



**Figura 20** - Efeito do [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> (0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) sobre as contrações induzidas por 5-HT (1 $\mu$ M) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \*\*\* P<0,001 versus as contrações induzidas por 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

O MaC [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, a concentrações de 1μM e 10μM, aumentou significativamente a contração induzida por 5-HT em células A7r5 (P<0,001 e P<0,05, respetivamente). Concentrações mais baixas (0,01μM e 0,1μM) não provocaram efeito significativo (P>0,05) (Figura 21).



**Figura 21** - Efeito do [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por 5-HT (1μM) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \* P<0,05 *versus* as contrações induzidas por 5-HT. \*\*\* P<0,001 *versus* as contrações induzidas por 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*.

Só a adição de 0,1 $\mu$ M de [16]phenN<sub>2</sub> às células A7r5 pré-contraídas por serotonina modificou significativamente a percentagem da área celular ( $P < 0,001$ ). Outras concentrações usadas de [16]phenN<sub>2</sub> não provocaram aumentos significativos da contração induzida por 5-HT (Figura 22).

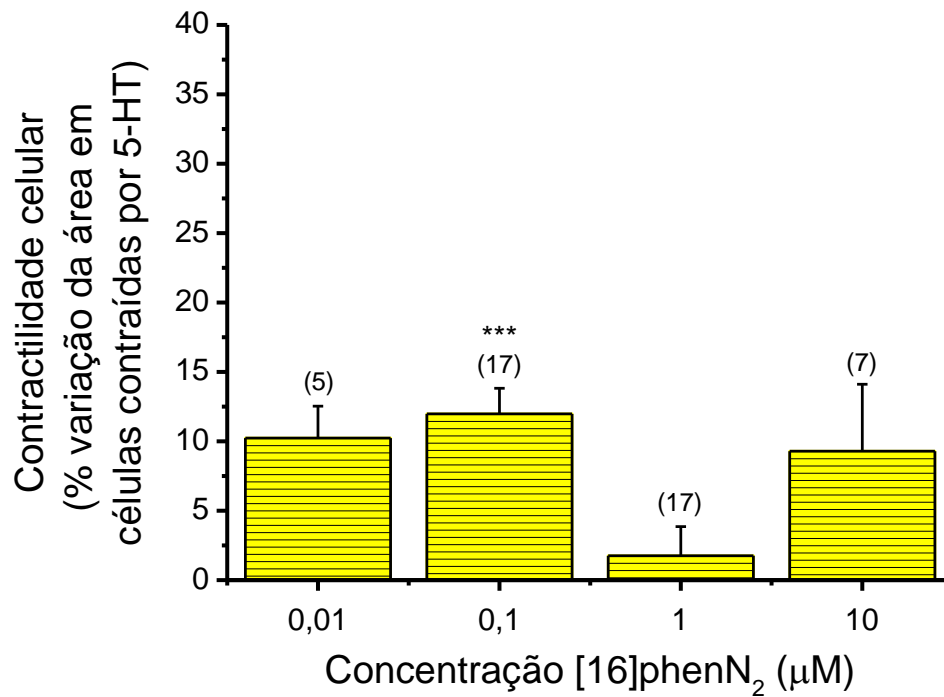
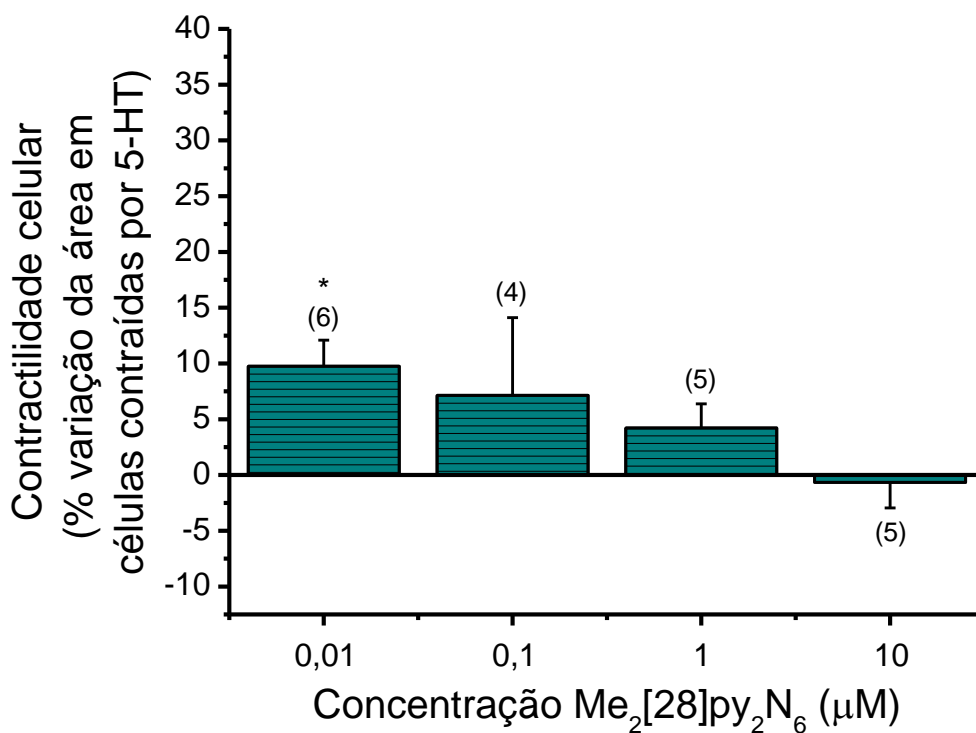


Figura 22 - Efeito do [16]phenN<sub>2</sub> (0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) sobre as contrações induzidas por 5-HT (1 $\mu$ M) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \*\*\*  $P < 0,001$  versus as contrações induzidas por 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*.

Só a adição de  $0,01\mu\text{M}$  de  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  às células A7r5 pré-contraídas por serotonina modificou significativamente a percentagem da área celular ( $P < 0,05$ ). Outras concentrações usadas de  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  não provocaram aumentos significativos da contração induzida por 5-HT ( $P > 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23** - Efeito do  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  ( $0,01\mu\text{M}$ ,  $0,1\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ ) sobre as contrações induzidas por 5-HT ( $1\mu\text{M}$ ) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \*  $P < 0,05$  versus as contrações induzidas por 5-HT. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*.

#### 4.2. Efeito dos MaC na contractilidade após contração com Noradrenalina (NA)

Para além da serotonina utilizou-se ainda outro agente contráctil, a noradrenalina. Ambos os agentes são reguladores fisiológicos da contractilidade vascular mas, no entanto, diferem bastante no modo de atuação. Enquanto a 5-HT atua através da ativação dos recetores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, que se ligam às proteínas G<sub>i</sub> e G<sub>q/11</sub> inibindo a adenil ciclase e ativando a fosfolipase C (PLC), respetivamente, a NA intervém no processo de contração por ligação aos recetores adrenérgicos  $\alpha_1$  que estão associados a diferentes proteínas G<sub>q</sub>, provocando ativação de PLC. Desta forma, e uma vez que as vias de sinalização ativadas por estes agentes contrácteis envolvem diferentes recetores, analisou-se o efeito de cada macrocíclo (0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) sobre a contractilidade induzida por noradrenalina (1 $\mu$ M).

Apenas a adição de 10 $\mu$ M de [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> às células A7r5 pré-contraídas por noradrenalina induziu um aumento significativo da contração provocada por NA (P<0,001). Todas as outras concentrações usadas de [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> não provocaram aumentos significativos da contração induzida por NA (Figura 24).

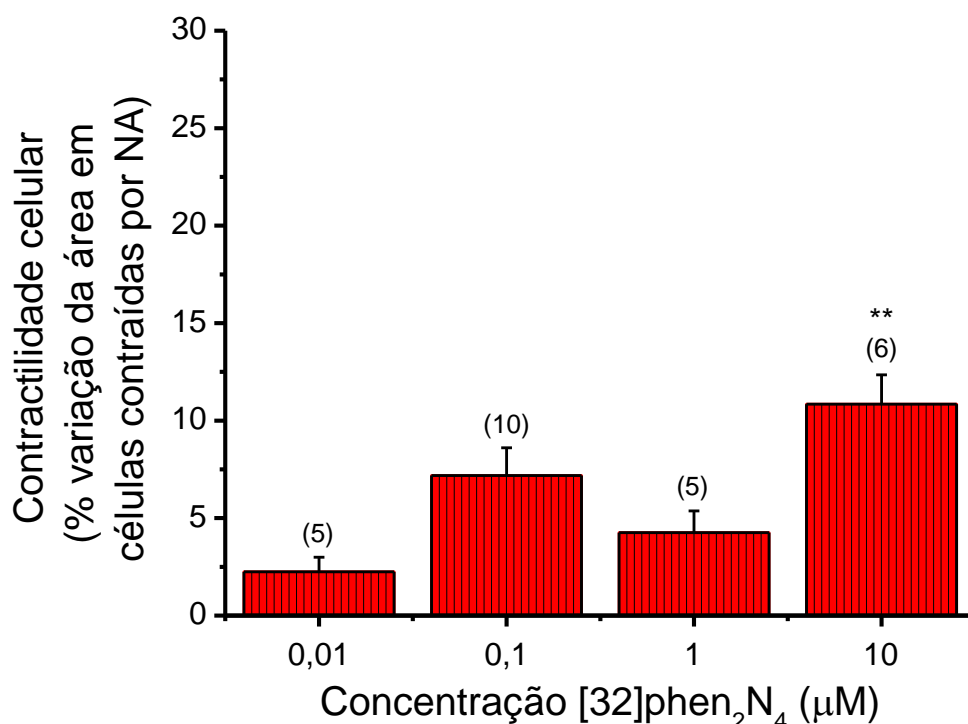


Figura 24 - Efeito do [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> (0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1 $\mu$ M) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \*\* P<0,01 versus as contrações induzidas por noradrenalina. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico)

O [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> provocou aumento da contractilidade induzida por noradrenalina em células A7r5, exceto para a concentração de 1μM que não teve efeito significativo (P>0,05) (Figura 25).

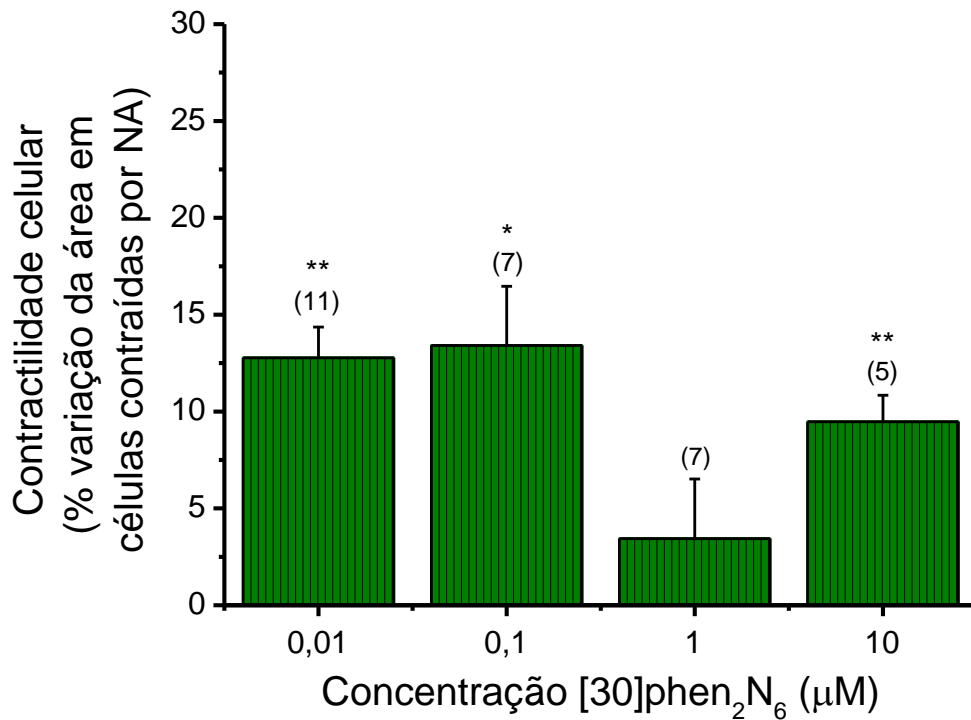
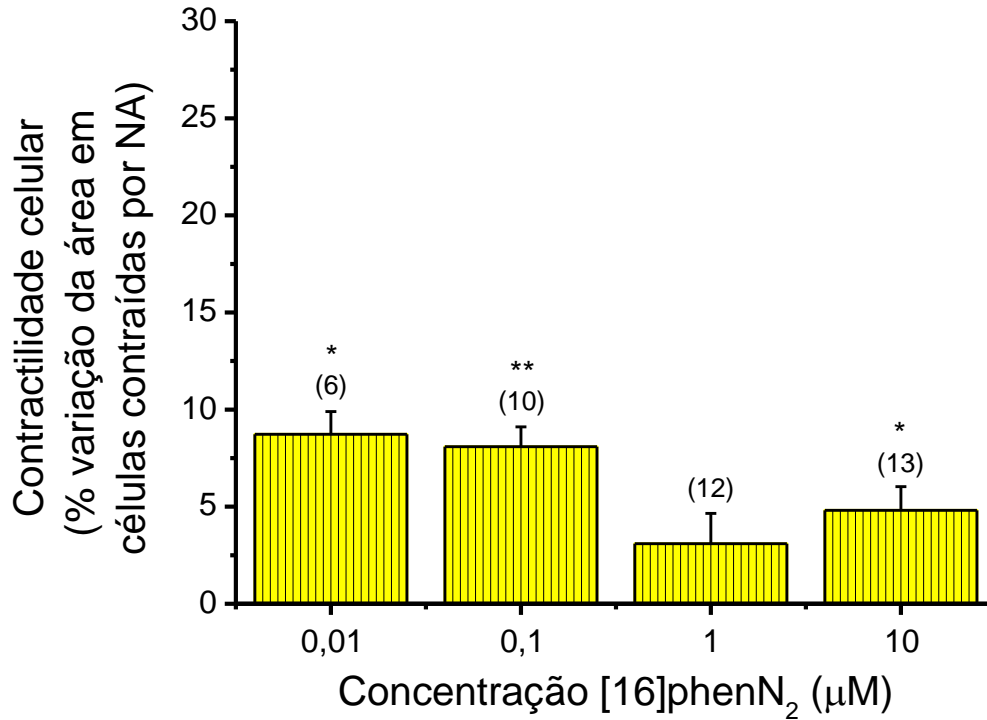


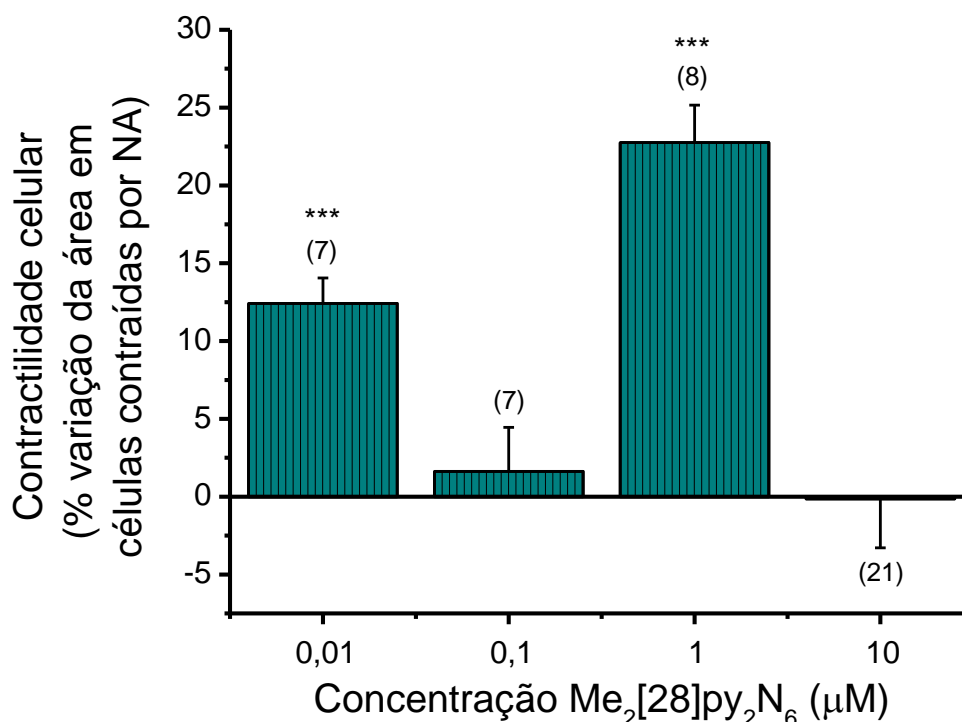
Figura 25 - Efeito do [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1μM) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \* P<0,05 versus as contrações induzidas por noradrenalina. \*\* P<0,01 versus as contrações induzidas por noradrenalina. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

O [16]phenN<sub>2</sub>, a concentrações de 0,01μM, 0,1μM e 10μM, aumentou significativamente o efeito contráctil da noradrenalina nas células A7r5 (P<0,05 e P<0,01), mas a concentração de 1μM de [16]phenN<sub>2</sub> não teve qualquer efeito sobre a contração provocada por noradrenalina (P>0,05) (Figura 26).



**Figura 26** - Efeito do [16]phenN<sub>2</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre as contrações induzidas por noradrenalina (1μM) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. P<0,05 *versus* as contrações induzidas por noradrenalina. \*\* P<0,01 *versus* as contrações induzidas por noradrenalina. \* A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

A administração do MaC  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  às células A7r5 pré-contraídas por noradrenalina provocou um efeito variável, estimulando as contrações a concentrações de  $0,01\mu\text{M}$  e  $1\mu\text{M}$  ( $P<0,001$ ), enquanto que a concentrações de  $0,1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$  não provocou variação significativa da contratilidade provocada por noradrenalina ( $P>0,05$ ) (Figura 27).

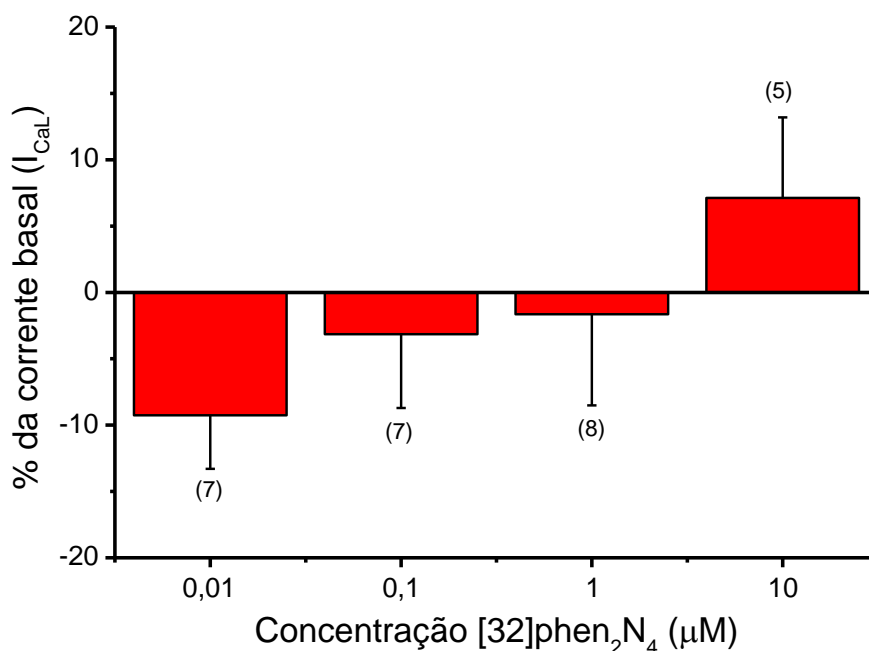


**Figura 27** - Efeito do  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  ( $0,01\mu\text{M}$ ,  $0,1\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ ) sobre as contrações induzidas por noradrenalina ( $1\mu\text{M}$ ) em células A7r5. Os dados foram expressos em percentagem de variação da área celular, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. \*\*\*  $P<0,001$  versus as contrações induzidas por noradrenalina. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

#### 4.3. Efeito dos MaC sobre a corrente basal de $\text{Ca}^{2+}$ e estimulada por Bay K

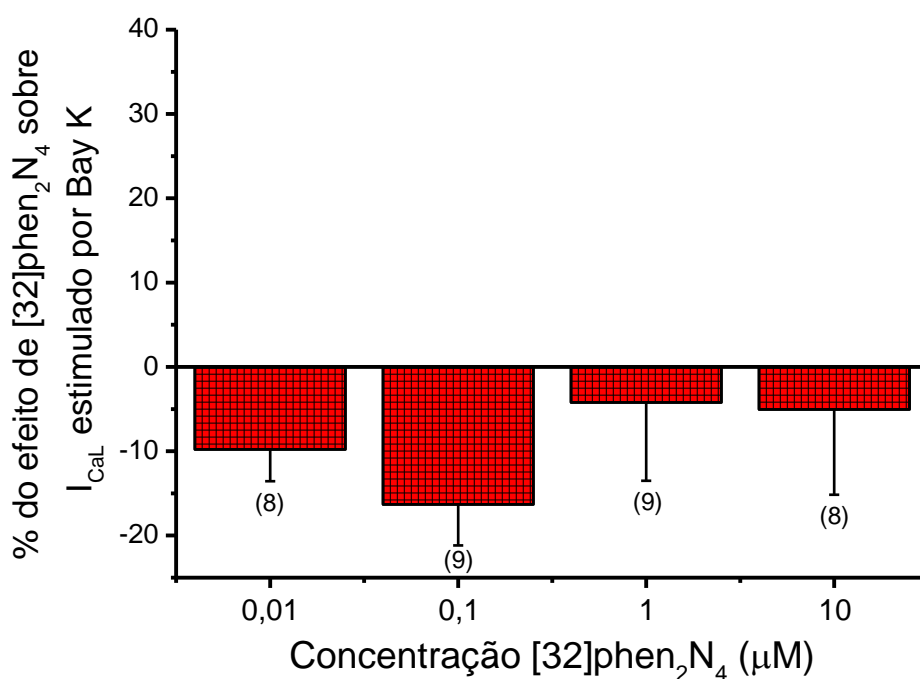
Para analisar o efeito dos MaC sobre a atividade dos LTCC em células A7r5, foi estudado o seu efeito sobre a corrente basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (em ausência de qualquer estímulo) e da corrente estimulada por Bay K ( $0,01\mu\text{M}$ ), uma di-hidropiridina que ativa estes canais. O Bay K estimulou a corrente basal em  $94,94\pm 6,72\%$  da corrente basal.

O  $[32]\text{phen}_2\text{N}_4$ , não afeta significativamente a corrente basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 28), embora nas concentrações mais baixas iniba ligeiramente a corrente.



**Figura 28** - Efeito do [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca<sup>2+</sup> (I<sub>CaL</sub>). Os dados foram expressos em porcentagem da corrente basal, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

O [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> também não afeta significativamente a corrente de Ca<sup>2+</sup> estimulada por Bay K, embora iniba ligeiramente esta corrente (Figura 29).



**Figura 29** - Efeito do [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca<sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K. Os dados foram expressos em porcentagem do efeito do MaC sobre a corrente estimulada por Bay K, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

As figuras 30 e 31 dizem respeito ao efeito do MaC [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, em que se verifica um pequeno aumento não significativo da corrente basal Ca<sup>2+</sup> e não se verifica efeito significativo sobre a corrente estimulada por Bay K.

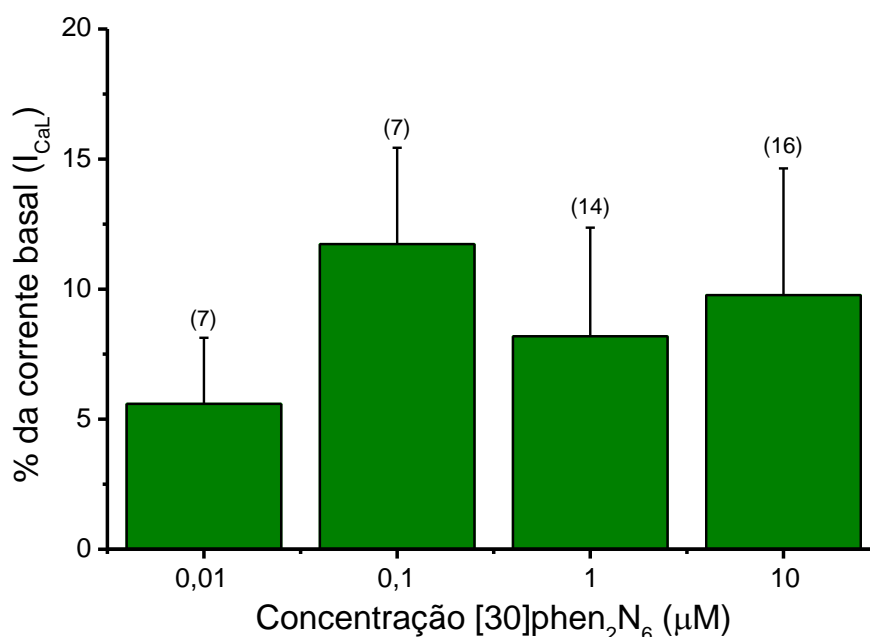


Figura 30 - Efeito do [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca<sup>2+</sup> (I<sub>CaL</sub>). Os dados foram expressos em percentagem da corrente basal, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*.

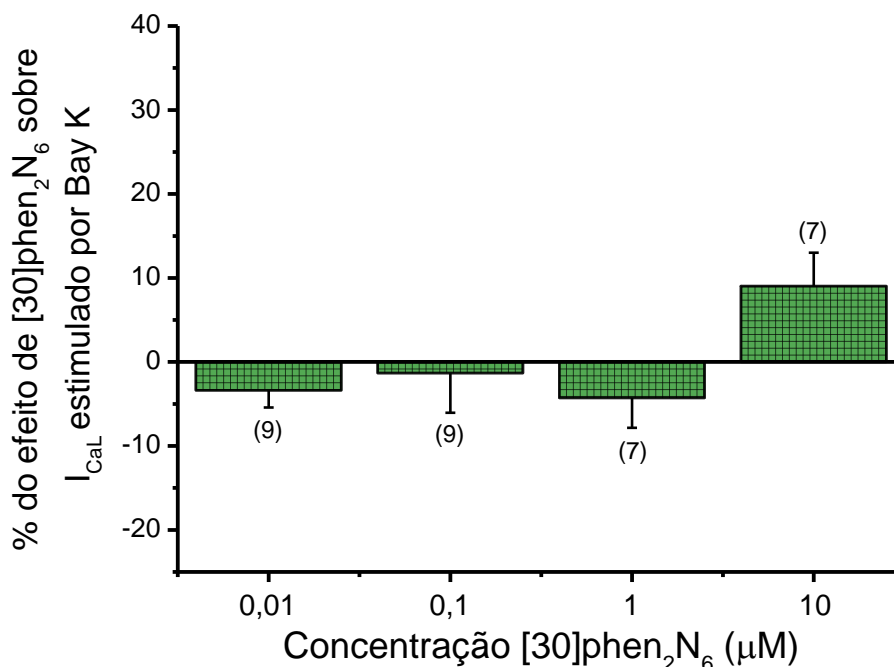
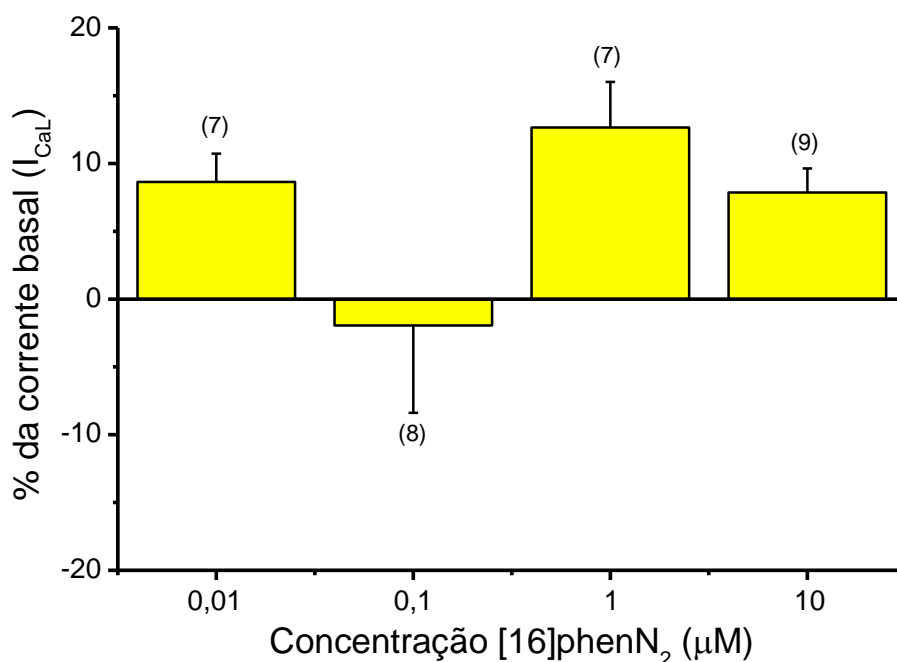
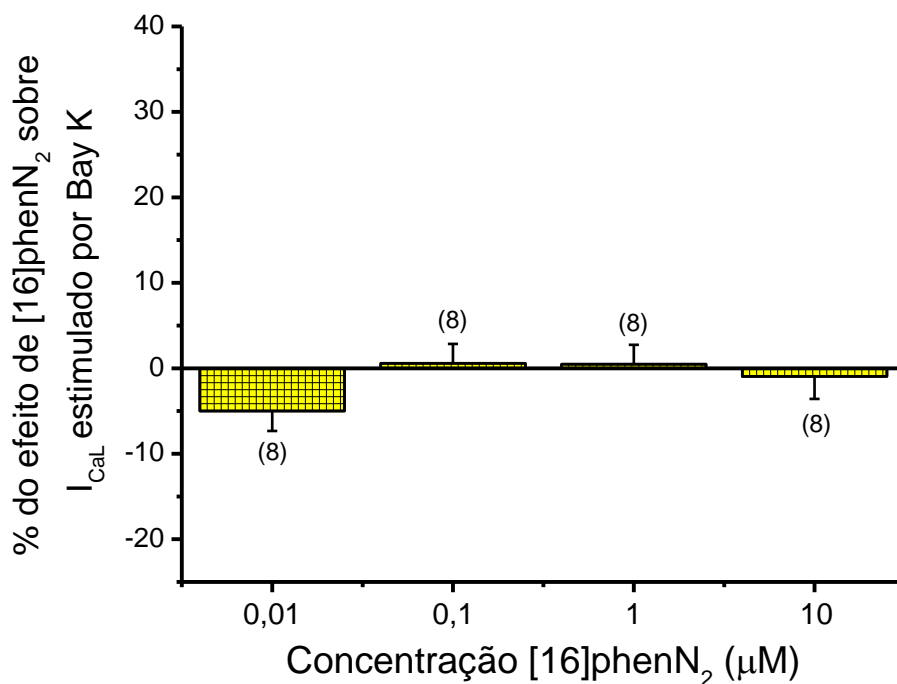


Figura 31 - Efeito do [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca<sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K. Os dados foram expressos em percentagem do efeito do MaC sobre a corrente estimulada por Bay K, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

O macrocíclo [16]phenN<sub>2</sub> provoca um ligeiro aumento não significativo da corrente de basal Ca<sup>2+</sup> para a maioria das concentrações usadas (Figura 32). No entanto, sobre a corrente de Ca<sup>2+</sup> estimulada por Bay K não se verifica efeito significativo (Figura 33).

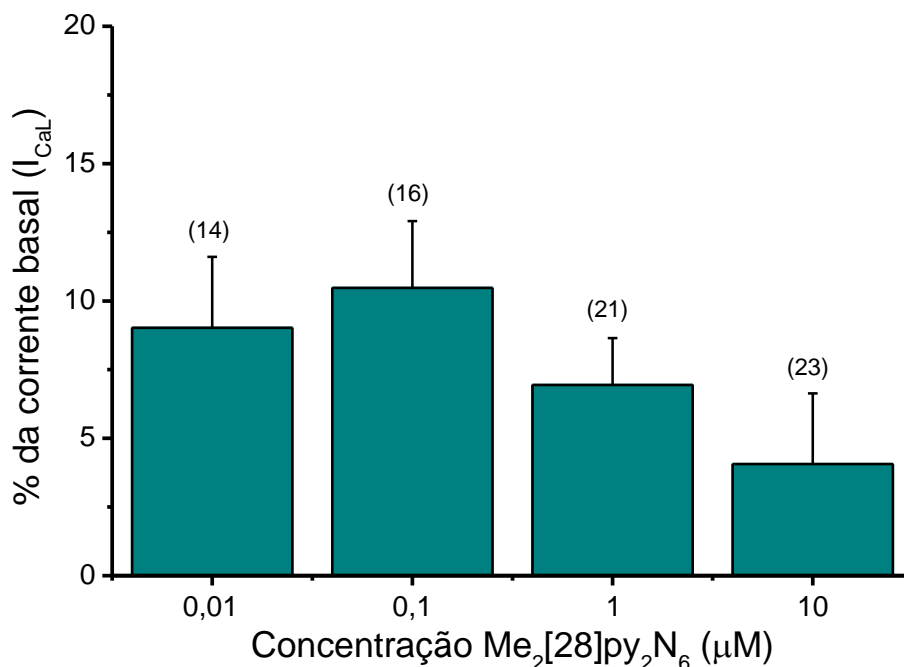


**Figura 32** - Efeito do [16]phenN<sub>2</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente basal de Ca<sup>2+</sup> (I<sub>CaL</sub>). Os dados foram expressos em percentagem da corrente basal, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

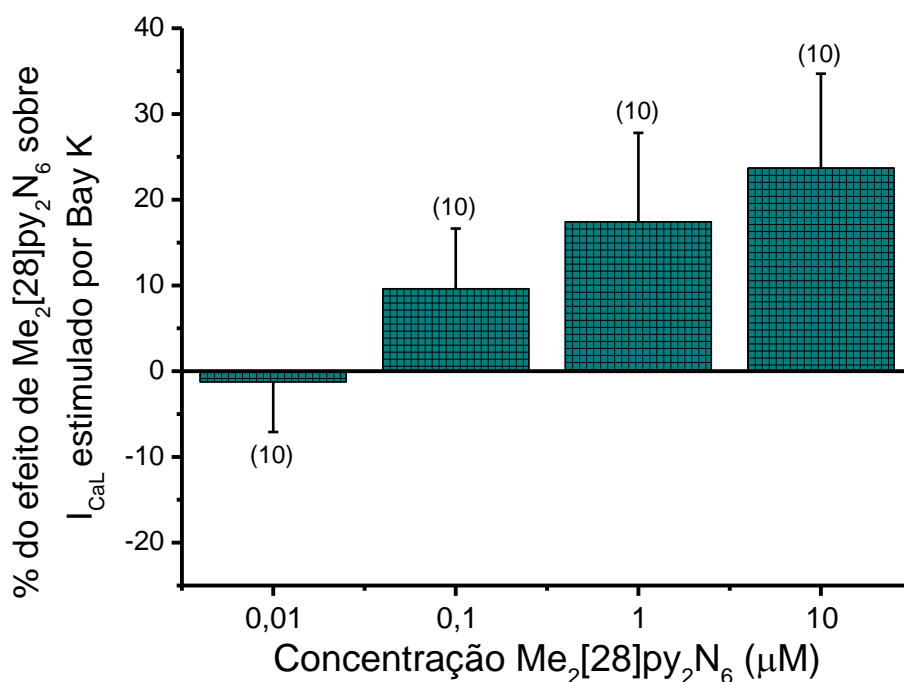


**Figura 33** - Efeito do [16]phenN<sub>2</sub> (0,01μM, 0,1μM, 1μM e 10μM) sobre a corrente de Ca<sup>2+</sup> pré-estimulada por Bay-K. Os dados foram expressos em percentagem do efeito do MaC sobre a corrente estimulada por Bay K, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

Em relação ao efeito do  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  sobre as correntes de cálcio, observou-se que este macrocíclo provocou um aumento não significativo da intensidade das correntes, tanto a nível da corrente basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 34) como a nível da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por Bay K (Figura 35).



**Figura 34** - Efeito do  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  (0,01 $\mu\text{M}$ , 0,1 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  e 10 $\mu\text{M}$ ) sobre a corrente basal de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CaL}}$ ). Os dados foram expressos em percentagem da corrente basal, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).



**Figura 35** - Efeito do  $\text{Me}_2[28]\text{py}_2\text{N}_6$  (0,01 $\mu\text{M}$ , 0,1 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  e 10 $\mu\text{M}$ ) sobre a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pré-estimulada por Bay-K. Os dados foram expressos em percentagem do efeito do MaC sobre a corrente estimulada por Bay K, as barras representam a média e as linhas o erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student* e *Mann-Whitney* (teste não paramétrico).

## Capítulo V - Discussão

Novos compostos têm vindo a ser desenvolvidos com o objetivo de incorporar e transportar moléculas, dos quais se destacam os macrocíclos (MaC). Tendo conhecimento que estas macromoléculas têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática sem danificar a célula e que, de acordo com estudos realizados por Cruz *et al.*, podem ser usados em diferentes tipos de células não sendo tóxicos nas concentrações usadas, decidiu-se observar se teriam efeito sobre as funções das células vasculares. Desta forma, foram analisados os macrocíclos [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, [16]phenN<sub>2</sub> e Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, previamente sintetizados por Cruz e colaboradores, tendo sido escolhidas diferentes concentrações (0,01µM, 0,1µM, 1µM e 10µM) de acordo com estudos realizados anteriormente (Cruz *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2003).

De forma a estudar eficazmente o efeito dos MaC sobre a contractilidade vascular recorreu-se a uma técnica denominada *Planar Cell Surface Area* (PCSA) e, para tal, as células A7r5 foram pré-contraídas com dois agentes contrácteis diferentes, a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA). A escolha destes dois agentes deveu-se ao potente efeito de contração que possuem e ao facto de serem reguladores fisiológicos da contractilidade vascular.

Em cada experiência, após a adição de cada agente contráctil tira-se uma microfotografia e adiciona-se uma das concentrações de um MaC específico, esperando mais tempo para tirar uma nova microfotografia. Os dados são obtidos através das fotografias tiradas e, após processamento com um programa específico, torna-se possível medir a diferença de área das células após a adição dos agentes contrácteis e dos MaC. Neste sentido, relativamente ao efeito contráctil induzido pelos diversos MaC, observa-se que todos eles têm efeitos diferentes nas diferentes concentrações. Após administração tanto de [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> como de Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, não houve qualquer efeito sobre a área celular já contraída com 5-HT, com exceção da administração destes dois compostos na concentração de 0,01µM, em que houve um aumento significativo da contração provocada por 5-HT. No caso do [16]phenN<sub>2</sub>, este MaC apenas aumentou a contração quando adicionado na concentração de 0,1µM, todas as outras concentrações não induziram qualquer efeito sobre a área das células. No que diz respeito ao [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> este provocou um efeito bifásico, uma vez que nas concentrações mais baixas não induziu qualquer efeito, contrariamente às concentrações mais elevadas, em que se observou um efeito contráctil pronunciado relativamente à contração induzida por 5-HT. Nas células pré-contraídas com NA os resultados não são concordantes com os da pré-contração por 5-HT, uma vez que, neste caso, o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> não provocou qualquer efeito sobre a contração pré-induzida por NA quando administrado nas concentrações mais baixas, no entanto, quando usado a 10µM, este MaC provoca um aumento significativo da contração provocada por NA. Contrariamente aos MaC [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> e [16]phenN<sub>2</sub>, que provocaram um aumento da contractilidade induzida por noradrenalina em células A7r5, à exceção da concentração de 1µM que não teve qualquer efeito sobre a área celular. Por fim, o

Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub> apresenta um efeito variável nas diversas concentrações, pois apenas provoca variação significativa da contratilidade provocada por noradrenalina em duas das quatro concentrações usadas.

Comparando assim os efeitos dos MaC sobre a área celular após contração com 5-HT e com NA, verifica-se que no caso do [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, apenas os resultados referentes às concentrações de 0,1µM e 1µM parecem estar concordantes, pois não induzem aumento da variação da área celular e, conseqüentemente, não induzem contração. No caso do MaC [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, somente na concentração mais elevada (10µM) é que houve concordância dos resultados, induzindo contração celular sobre a pré-contração com 5-HT e com NA. Os efeitos do [16]phenN<sub>2</sub> sobre as células A7r5 após contração com os agentes contrácteis apenas foram concordantes nas concentrações intermédias (0,1µM e 1µM), contudo esses efeitos são opostos, uma vez que na concentração 0,1µM se verificou um aumento significativo da contractilidade celular, enquanto que na concentração de 1µM não se verificou qualquer efeito sobre a área celular. Por fim, no caso do Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, a maioria das concentrações apresenta resultados concordantes entre a 5-HT e a NA, verificando-se um aumento da variação da área para 0,01µM, ocorrendo assim uma contração mais significativa, e para 0,1µM e 10µM não se verifica qualquer efeito sobre a área celular.

Neste trabalho os agentes contrácteis foram usados na concentração de 1µM e, pelos resultados obtidos, a percentagem de redução da área celular nas diversas experiências foi mais linear (constante) no caso da NA, situando-se entre 7% e 13% (com exceção das experiências para 10µM de Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>), do que a redução provocada pela 5-HT, entre 6% e 26%. Esta discrepância, assim como os efeitos contraditórios que os MaC apresentaram após contração com os diferentes agentes contrácteis, pode dever-se às diferenças no mecanismo contráctil de cada agente. Os efeitos contrácteis da 5-HT devem-se à ativação dos recetores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, que se ligam à proteína G<sub>i</sub> inibindo a adenil ciclase e à proteína G<sub>q/11</sub> ativando a PLC, respetivamente (Kaumann and Levy, 2006). A NA intervém no processo de contração do músculo liso vascular através da ativação de recetores adrenérgicos α<sub>1</sub> que estão associados a diferentes proteínas G, provocando o aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, e conseqüente contração (Guimaraes and Moura, 2001).

As diferenças observadas na ação dos MaC sobre as células A7r5, após adição dos agentes contrácteis, podem dever-se a diversos fatores. Além dos diferentes mecanismos contrácteis da 5-HT e da NA anteriormente mencionados, podem ainda considerar-se o tempo de estabilização após adição destes mesmos agentes e o aparecimento de *photobleaching*. O tempo de estabilização tanto para a serotonina como para a noradrenalina foi de 20 minutos, igual ao tempo de estabilização dos diferentes MaC. Devido às diferenças nos resultados apresentados, pode considerar-se que este tempo não terá sido o suficiente para a completa estabilização dos agentes. Além disso, como o estudo dos macrocíclos sobre este tipo de células é ainda recente, seria necessário determinar qual o tempo exato que estes compostos demorariam a produzir o seu efeito, podendo esse diferir entre os diferentes MaC estudados. Outra possível explicação para estes resultados está no uso da fluorescência, que pode ser

considerado como uma desvantagem, uma vez que esta promove o aparecimento do *fotobleaching*. Neste processo as moléculas de fluórocromo sofrem destruição química após a exposição à luz, perdendo assim a sua capacidade de fluorescência. Desta forma, para reduzir ao máximo o processo de *fotobleaching*, a exposição à luz das células marcadas deve ser mínima, assim como o número de fotografias não deve ultrapassar as 4, uma vez que estas precisam da fluorescência ligada. Por fim, tendo em consideração que o PCSA é ainda uma técnica relativamente recente, esta discrepância nos resultados pode também dever-se ao facto de ainda não estar completamente otimizada assim como à falta de prática dos seus utilizadores.

Sabendo que a  $[Ca^{2+}]_i$  é o principal determinante da contração do músculo liso (Stull et al., 1991), após a análise do efeito dos MaC sobre a contractilidade, tornou-se necessário estudar o efeito que estes compostos poderiam ter sobre as correntes de  $Ca^{2+}$ , de forma a compreender o mecanismo pelo qual as células contraem e se os canais de  $Ca^{2+}$  estariam envolvidos neste processo. Posto isto, pôs-se em prática o *Patch-clamp* na configuração *Whole-cell*. Através desta técnica analisou-se o efeito dos MaC sobre a corrente basal de  $Ca^{2+}$  assim como sobre a corrente de  $Ca^{2+}$  estimulada por Bay K.

Também nesta técnica se observa, a partir dos resultados obtidos, que os efeitos provocados pelos MaC diferem um pouco entre as correntes basal e estimulada por Bay K. No que diz respeito ao efeito basal da corrente de  $Ca^{2+}$ , destaca-se o macrocíclo  $[32]phen_2N_4$ , pois este inibe ligeiramente a corrente de  $Ca^{2+}$  nas concentrações mais baixas, ao contrário dos outros três macrocíclos estudados, que parecem aumentar, de forma não significativa, a corrente iónica de  $Ca^{2+}$  para todas as concentrações analisadas. Em relação ao efeito destes compostos macrocíclicos sobre a corrente iónica estimulada por Bay K, observa-se que o  $[32]phen_2N_4$  e o  $[16]phenN_2$  não afetam significativamente a corrente de  $Ca^{2+}$  estimulada por Bay K, embora o  $[32]phen_2N_4$  apresente um efeito mais pronunciado, inibindo ligeiramente esta corrente (figuras 29 e 33). O  $[30]phen_2N_6$  parece não ter qualquer efeito sobre a corrente pré-estimulada por Bay K, à exceção da concentração mais elevada ( $10\mu M$ ), em que se observa um ligeiro aumento da corrente. Contrariamente aos outros macrocíclos, o  $Me_2[28]py_2N_6$  é o único que apresenta um aumento não significativo da intensidade da corrente para todas as concentrações, ou seja, parece estimular a corrente de  $Ca^{2+}$  estimulada por Bay K. Pelos resultados obtidos, verifica-se que, ao comparar as duas correntes analisadas (basal e estimulada por Bay K), apenas os MaC  $[32]phen_2N_4$  e  $Me_2[28]py_2N_6$  apresentam efeitos coincidentes, uma vez que o  $[32]phen_2N_4$  inibe e o  $Me_2[28]py_2N_6$  estimula ambas as correntes, de forma não significativa.

O Bay K 8644, uma di-hidropiridina que atua como um agente inotrópico positivo, é um ativador direto e específico dos LTCC, uma vez que interage diretamente com estes canais promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  (Thomas et al., 1985). O uso deste agonista foi essencial neste estudo uma vez que tem a capacidade de potenciar os efeitos observados sobre as correntes basais, e como se trata de um agente específico para os LTCC, é possível garantir que não

existe qualquer interferência por parte de outro tipo de canais iónicos. Desta forma, as discrepâncias observadas nos resultados obtidos, nomeadamente nos macrocíclos [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> e [16]phenN<sub>2</sub>, podem dever-se a algum tipo de interferência por outras correntes iónicas sobre a corrente basal de Ca<sup>2+</sup>, que não acontece na corrente estimulada por Bay K.

Tendo em conta todos os resultados obtidos é essencial comparar os efeitos exercidos por cada macrocíclo nestas duas técnicas. Desta forma, observa-se que o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> não tem qualquer efeito sobre a contração induzida por serotonina e noradrenalina e, relativamente às correntes iónicas, este composto inibe ligeiramente as correntes de Ca<sup>2+</sup>, tanto a nível basal como a nível da corrente estimulada por Bay K. No que diz respeito ao composto [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, verifica-se que induz um efeito contráctil nas concentrações mais baixas e parece estimular muito ligeiramente apenas a corrente basal de Ca<sup>2+</sup>. O [16]phenN<sub>2</sub>, por sua vez, provoca redução da área celular após adição dos agentes contrácteis mas, no entanto, não exerce qualquer efeito sobre as correntes iónicas, uma vez que não ativa nem inibe os canais de Ca<sup>2+</sup>. Verifica-se então uma oposição nos efeitos que este macrocíclo exerce sobre as células A7r5, uma vez que provoca contração sem ter efeito sobre as correntes de Ca<sup>2+</sup>. Isso é possível devido à existência de outras vias que levam ao processo de contração sem ativarem os canais de Ca<sup>2+</sup>, ou seja, o [16]phenN<sub>2</sub> pode contrair as células através de vias independentes de Ca<sup>2+</sup>, nomeadamente a cascata de fosforilação das MAPK. Por último, o Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub> não apresenta um efeito significativo sobre a redução da área celular mas, no entanto, estimula, de forma não significativa, a corrente basal de Ca<sup>2+</sup> e a estimulada por Bay K, isto é, ativa os LTCC.

Em suma, estes dados sugerem que os macrocíclos podem, de facto, ser usados como transportadores moleculares nas células A7r5, e de todos os MaC estudados, o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> (0,1µM) pode ser considerado como o melhor transportador de fármacos, pois além de inibir as correntes de Ca<sup>2+</sup> não tem qualquer efeito sobre a contração pré-induzida pelos agentes contrácteis analisados. Por outro lado, o Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub> parece ser aquele que não deve ser utilizado como transportador molecular, uma vez que parece provocar um aumento considerável das correntes de Ca<sup>2+</sup>, podendo ser prejudicial para o sistema cardíaco.

## Conclusão

Os compostos macrocíclicos (MaC) utilizados são macromoléculas cíclicas que têm a capacidade atravessar a membrana celular sem alterar a sua integridade e não são tóxicos nas concentrações usadas. São considerados como importantes hospedeiros seletivos em algumas aplicações biológicas, formando complexos estáveis e específicos, e muitos sistemas de libertação de drogas são baseadas nestas características. Desta forma, os dados obtidos neste estudo corroboram a utilização destes macrocíclos como transportadores moleculares nas células em questão, sendo o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> na concentração de 0,1µM o melhor transportador de fármacos de todos os MaC estudados, uma vez que por inibir as correntes de Ca<sup>2+</sup> e não ter qualquer efeito sobre a contração pré-induzida pelos agentes contrácteis, não apresenta um efeito prejudicial sobre o sistema cardiovascular. Por outro lado, os MaC [30]phen<sub>2</sub>N<sub>6</sub> e Me<sub>2</sub>[28]py<sub>2</sub>N<sub>6</sub> parecem ser aqueles que não devem ser utilizados como transportadores moleculares, particularmente este último, uma vez que provoca um aumento considerável das correntes de Ca<sup>2+</sup>, podendo ser prejudicial para o sistema cardíaco. No caso do [16]phenN<sub>2</sub>, este teria que ser alvo de mais estudos, nomeadamente no que diz respeito às vias de sinalização que conduzem à contração, uma vez que se verifica uma oposição nos efeitos que este macrocíclo exerce sobre as células A7r5, provoca contração mas não exerce qualquer efeito sobre as correntes de Ca<sup>2+</sup>.

Uma posterior análise dos complexos MaC-Inibidores de fosfodiesterases e da sua eficiência para inibir as PDE e regular funções vasculares seria necessária para complementar este estudo. No entanto este é apenas o primeiro passo antes de tentar usar os compostos macrocíclicos como transportadores de fármacos.

Para um estudo mais completo, e de forma a comprovar resultados obtidos, seria interessante usar o *Patch-clamp* para estudar o efeito destes compostos macrocíclicos sobre os canais de K<sup>+</sup>, assim como recorrer a técnicas diferentes, nomeadamente o Banho de Órgãos com artérias para observar o efeito contráctil.

## Bibliografia

Akata, T. (2007a). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth* 21, 220-231.

Akata, T. (2007b). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca<sup>2+</sup> mobilization and/or myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth* 21, 232-242.

Alahyan, M., Webb, M.R., Marston, S.B., and El-Mezgueldi, M. (2006). The mechanism of smooth muscle caldesmon-tropomyosin inhibition of the elementary steps of the actomyosin ATPase. *J Biol Chem* 281, 19433-19448.

Angus, C.J.G.a.J.A. (1996 ). *The Pharmacology of Vascular Smooth Muscle*. (Michigan: Oxford University Press, 1996).

Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* 22, 458-459.

Baraldi, P.G., Bovero, A., Fruttarolo, F., Preti, D., Tabrizi, M.A., Pavani, M.G., and Romagnoli, R. (2004). DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med Res Rev* 24, 475-528.

Beavo, J.A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75, 725-748.

Bender, A.T., Ostenson, C.L., Giordano, D., and Beavo, J.A. (2004). Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. *Cell Signal* 16, 365-374.

Bolger, G., Michaeli, T., Martins, T., St John, T., Steiner, B., Rodgers, L., Riggs, M., Wigler, M., and Ferguson, K. (1993). A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol* 13, 6558-6571.

Brownell, A.G., and Slavkin, H.C. (1980). Role of basal lamina in tissue interactions. *Ren Physiol* 3, 193-204.

Cairrao, E., Alvarez, E., Carvas, J.M., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2005). Non-genomic vasorelaxant effects of 17beta-estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca<sup>2+</sup> current inhibition. *Acta Pharmacol Sin* 33, 615-624.

Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., Alvarez, E., Correia, I., and Verde, I. (2009). Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45, 175-184.

Campbell, M.D., Deth, R.C., Payne, R.A., and Honeyman, T.W. (1985). Phosphoinositide hydrolysis is correlated with agonist-induced calcium flux and contraction in the rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 116, 129-136.

Carbone, E., and Lux, H.D. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501-502.

Cary, S.P., Winger, J.A., Derbyshire, E.R., and Marletta, M.A. (2006). Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci* 31, 231-239.

Catterall, W.A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64, 493-531.

Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57, 411-425.

Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P., and Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 55, 579-581.

Chin, D., and Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10, 322-328.

Clark, J.F., and Pyne-Geithman, G. (2005). Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. *Pathophysiology* 12, 35-45.

Cobb, M.H. (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 479-500.

Corbin, J.D., Turko, I.V., Beasley, A., and Francis, S.H. (2000). Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 267, 2760-2767.

Cruz, C., Cairrao, E., Lourenco, O., Almeida, P., Verde, I., and Queiroz, J.A. (2012). Polyazamacrocycles as potential antitumor agents for human prostate cancer cells. *Chem Biol Drug Des* 81, 517-526.

Cruz, C., Cairrao, E., Silvestre, S., Breitenfeld, L., Almeida, P., and Queiroz, J.A. (2011). Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds. *PLoS One* 6, e27078.

Cruz, C., Calisto, V., Delgado, R., and Felix, V. (2009). Design of protonated polyazamacrocycles based on phenanthroline motifs for selective uptake of aromatic carboxylate anions and herbicides. *Chemistry* 15, 3277-3289.

Cruz, C., Carvalho, S., Delgado, R., Drew, M.G.B., Félix, V., and Goodfellowa, B.J. (2003). Metal complexes of a dipyridine octaazamacrocyclic: stability constants, structural and modelling studies. *DALTON TRANSACTIONS*.

Cummins, P., and Perry, S.V. (1974). Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle. *Biochem J* 141, 43-49.

Dawson, D.L., Cutler, B.S., Meissner, M.H., and Strandness, D.E., Jr. (1998). Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation* 98, 678-686.

Degerman, E., Belfrage, P., and Manganiello, V.C. (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272, 6823-6826.

Dolphin, A.C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S56-62.

Ertel, S.I., and Ertel, E.A. (1997). Low-voltage-activated T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* 18, 37-42.

Evans, J., and Gelband, C.H. (1999). A novel Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle? *Circ Res* 85, 651-652.

Farooq, A., and Zhou, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16, 769-779.

Fatigati, V., and Murphy, R.A. (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem* 259, 14383-14388.

Feng, W., Yamato, K., Yang, L., Ferguson, J.S., Zhong, L., Zou, S., Yuan, L., Zeng, X.C., and Gong, B. (2009). Efficient kinetic macrocyclization. *J Am Chem Soc* 131, 2629-2637.

Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (1992). Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu Rev Physiol* 54, 469-488.

Fischmeister, R., Castro, L.R., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevicius, J., Leroy, J., and Vandecasteele, G. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99, 816-828.

Fox, S.B., and Khong, T.Y. (1990). Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta* 11, 59-62.

Francis, S.H., Blount, M.A., and Corbin, J.D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91, 651-690.

Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhashtonay, C., Vandekerckhove, J., Weber, K., and Franke, W.W. (1981). Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 298-302.

Gallagher, P.J., Herring, B.P., Griffin, S.A., and Stull, J.T. (1991). Molecular characterization of a mammalian smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 266, 23936-23944.

Georget, M., Mateo, P., Vandecasteele, G., Lipskaia, L., Defer, N., Hanoune, J., Hoerter, J., Lugnier, C., and Fischmeister, R. (2003). Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J* 17, 1380-1391.

Georgiades, S.N., Abd Karim, N.H., Suntharalingam, K., and Vilar, R. (2010). Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 4020-4034.

Godfraind, T., Miller, R., and Wibo, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev* 38, 321-416.

Gong, B. (2008). Hollow crescents, helices, and macrocycles from enforced folding and folding-assisted macrocyclization. *Acc Chem Res* 41, 1376-1386.

Gordon, A.M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80, 853-924.

Guimaraes, S., and Moura, D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53, 319-356.

Gusev, N.B. (2001). Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. *Biochemistry (Mosc)* 66, 1112-1121.

Hagiwara, S., Ozawa, S., and Sand, O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65, 617-644.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.

Hanoune, J., and Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 145-174.

Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M.L. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1510-1520.

Hartshorne, D.J., and Hirano, K. (1999). Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem* 190, 79-84.

Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdodi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19, 325-341.

Hayashi, K., Kanda, K., Kimizuka, F., Kato, I., and Sobue, K. (1989). Primary structure and functional expression of h-caldesmon complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 503-511.

He, R., Komasa, N., Ekholm, D., Murata, T., Taira, M., Hockman, S., Degerman, E., and Manganiello, V.C. (1998). Expression and characterization of deletion recombinants of two cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3). *Cell Biochem Biophys* 29, 89-111.

Hidaka, H., Hayashi, H., Kohri, H., Kimura, Y., Hosokawa, T., Igawa, T., and Saitoh, Y. (1979). Selective inhibitor of platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase, cilostamide, inhibits platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* 211, 26-30.

Hilgers, R.H., and Webb, R.C. (2005). Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 829-835.

Hirano, K. (2007). Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* 104, 109-115.

Hirano, K., Derkach, D.N., Hirano, M., Nishimura, J., and Kanaide, H. (2003). Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol Cell Biochem* 248, 105-114.

Hirano, K., Phan, B.C., and Hartshorne, D.J. (1997). Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 272, 3683-3688.

Ho, Y.S., Burden, L.M., and Hurley, J.H. (2000). Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J* 19, 5288-5299.

Hodgkinson, J.L. (2000). Actin and the smooth muscle regulatory proteins: a structural perspective. *J Muscle Res Cell Motil* 21, 115-130.

Hof, F., and Rebek, J., Jr. (2002). Molecules within molecules: recognition through self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4775-4777.

Hoffmann, R., Baillie, G.S., MacKenzie, S.J., Yarwood, S.J., and Houslay, M.D. (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J* 18, 893-903.

Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., and Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86, 1-23.

Houslay, M.D., and Adams, D.R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 370, 1-18.

Hughes, A.D. (1995). Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 32, 353-370.

Hutchinson, D.S., Summers, R.J., and Bengtsson, T. (2008). Regulation of AMP-activated protein kinase activity by G-protein coupled receptors: potential utility in treatment of diabetes and heart disease. *Pharmacol Ther* 119, 291-310.

Ichimura, M., Eiki, R., Osawa, K., Nakanishi, S., and Kase, H. (1996). KS-505a, an isoform-selective inhibitor of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem J* 316 ( Pt 1), 311-316.

Ishikawa, T., Hume, J.R., and Keef, K.D. (1993). Regulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 73, 1128-1137.

Jackson, W.F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35, 173-178.

Jacobitz, S., McLaughlin, M.M., Livi, G.P., Burman, M., and Torphy, T.J. (1996). Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding. *Mol Pharmacol* 50, 891-899.

Junqueira, L.C., and Carneiro, J. (1999). *Histologia Básica*. (Guanabara Koogan).

Kamm, K.E., and Stull, J.T. (2001). Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276, 4527-4530.

Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K.J., and Sato, K. (1997). Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 49, 157-230.

Kaumann, A.J., and Levy, F.O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111, 674-706.

Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Benardeau, A., Mercadier, J.J., and Fischmeister, R. (1995). Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 95, 794-802.

Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., and Brautigan, D.L. (2000). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 275, 9897-9900.

Klee, C.B., Crouch, T.H., and Richman, P.G. (1980). Calmodulin. *Annu Rev Biochem* 49, 489-515.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.

Kotera, J., Fujishige, K., Akatsuka, H., Imai, Y., Yanaka, N., and Omori, K. (1998). Novel alternative splice variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 273, 26982-26990.

Kotera, J., Fujishige, K., Imai, Y., Kawai, E., Michibata, H., Akatsuka, H., Yanaka, N., and Omori, K. (1999). Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 262, 866-873.

Laporte, R., and Laher, I. (1997). Sarcoplasmic reticulum-sarcolemma interactions and vascular smooth muscle tone. *J Vasc Res* 34, 325-343.

Large, W.A., and Wang, Q. (1996). Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl<sup>-</sup> conductance in smooth muscle. *Am J Physiol* 271, C435-454.

Lin, C.S., Lau, A., Tu, R., and Lue, T.F. (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 628-635.

Lincoln, T.M., and Cornwell, T.L. (1991). Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 28, 129-137.

Llinares, J.M., Powell, D., and Bowman-James, K. (2003). Ammonium based anion receptors. *Coordination Chemistry Reviews* 240, 57-75.

Loughney, K., Hill, T.R., Florio, V.A., Uher, L., Rosman, G.J., Wolda, S.L., Jones, B.A., Howard, M.L., McAllister-Lucas, L.M., Sonnenburg, W.K., Francis, S.H., Corbin, J.D., Beavo, J.A., and Ferguson, K. (1998). Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 216, 139-147.

Loughney, K., Martins, T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., and Ferguson, K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 271, 796-806.

Lugnier, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109, 366-398.

Lugnier, C., Follenius, A., Gerard, D., and Stoclet, J.C. (1984). Bepridil and flunarizine as calmodulin inhibitors. *Eur J Pharmacol* 98, 157-158.

Lugnier, C., Schoeffter, P., Le Bec, A., Strouthou, E., and Stoclet, J.C. (1986). Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* 35, 1743-1751.

Marin, J., Encabo, A., Briones, A., Garcia-Cohen, E.C., and Alonso, M.J. (1999). Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 64, 279-303.

Marks, T.N., Dubyak, G.R., and Jones, S.W. (1990). Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *Pflugers Arch* 417, 433-439.

Marsault, E., and Peterson, M.L. (2011). Macrocycles are great cycles: applications, opportunities, and challenges of synthetic macrocycles in drug discovery. *J Med Chem* 54, 1961-2004.

Marston, S. (1990). Stoichiometry and stability of caldesmon in native thin filaments from sheep aorta smooth muscle. *Biochem J* 272, 305-310.

Marston, S.B., and Lehman, W. (1985). Caldesmon is a  $Ca^{2+}$ -regulatory component of native smooth-muscle thin filaments. *Biochem J* 231, 517-522.

Marston, S.B., and Redwood, C.S. (1993). The essential role of tropomyosin in cooperative regulation of smooth muscle thin filament activity by caldesmon. *J Biol Chem* 268, 12317-12320.

Marston, S.B., and Smith, C.W. (1984). Purification and properties of  $Ca^{2+}$ -regulated thin filaments and F-actin from sheep aorta smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 5, 559-575.

Martinez, S.E., Wu, A.Y., Glavas, N.A., Tang, X.B., Turley, S., Hol, W.G., and Beavo, J.A. (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13260-13265.

Matsumoto, T., Kobayashi, T., and Kamata, K. (2003). Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res* 39, 67-86.

McFadzean, I., and Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 135, 1-13.

Mery, P.F., Pavoine, C., Pecker, F., and Fischmeister, R. (1995). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 48, 121-130.

Michael H. Ross, G.I.K., Wojciech Pawlina (2003). *Histology - A Text and Atlas*. (Lippincott Williams & Wilkins).

Minami, K., Fukuzawa, K., Nakaya, Y., Zeng, X.R., and Inoue, I. (1993). Mechanism of activation of the  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Life Sci* 53, 1129-1135.

Mizuno, Y., Isotani, E., Huang, J., Ding, H., Stull, J.T., and Kamm, K.E. (2008). Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C358-364.

Morgado, M., Cairrao, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2012). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 69, 247-266.

Morgan, K.G. (1990). The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the  $Ca^{2+}$  indicator aequorin. *Cardiovasc Drugs Ther* 4, 1355-1362.

Murray, C.W., and Rees, D.C. (2009). The rise of fragment-based drug discovery. *Nat Chem* 1, 187-192.

Muslin, A.J. (2008). MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 115, 203-218.

Nakayama, K., and Tanaka, Y. (1993). Stretch-induced contraction and Ca<sup>2+</sup> mobilization in vascular smooth muscle. *Biol Signals* 2, 241-252.

Neher, E., Sakmann, B., and Steinbach, J.H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375, 219-228.

Nelson, M.T., Conway, M.A., Knot, H.J., and Brayden, J.E. (1997). Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J Physiol* 502 ( Pt 2), 259-264.

Nelson, M.T., and Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268, C799-822.

Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66, 1022-1037.

Nielsen, J. (2002). Combinatorial synthesis of natural products. *Curr Opin Chem Biol* 6, 297-305.

Nishimura, J., Moreland, S., Ahn, H.Y., Kawase, T., Moreland, R.S., and van Breemen, C. (1992). Endothelin increases myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in alpha-toxin-permeabilized rabbit mesenteric artery. *Circ Res* 71, 951-959.

Nokin, P., Blondiaux, J.P., Schaeffer, P., Jungbluth, L., and Lugnier, C. (1989). Amiodarone is a potent calmodulin antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 339, 367-373.

Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332, 1433-1435.

Obejero-Paz, C.A., Jones, S.W., and Scarpa, A. (1998). Multiple channels mediate calcium leakage in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *Biophys J* 75, 1271-1286.

Obejero-Paz, C.A., Lakshmanan, M., Jones, S.W., and Scarpa, A. (1993). Effects of dexamethasone on L-type calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *FEBS Lett* 333, 73-77.

Obrecht, D., Robinson, J.A., Bernardini, F., Bisang, C., DeMarco, S.J., Moehle, K., and Gombert, F.O. (2009). Recent progress in the discovery of macrocyclic compounds as potential anti-infective therapeutics. *Curr Med Chem* 16, 42-65.

Omori, K., and Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100, 309-327.

Orallo, F. (1996). Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol Ther* 69, 153-171.

Orton, R.J., Sturm, O.E., Vyshemirsky, V., Calder, M., Gilbert, D.R., and Kolch, W. (2005). Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 392, 249-261.

Owens, G.K., Vernon, S.M., and Madsen, C.S. (1996). Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl* 14, S55-64.

Pacaud, P., and Bolton, T.B. (1991). Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J Physiol* 441, 477-499.

Padma-Nathan, H., McMurray, J.G., Pullman, W.E., Whitaker, J.S., Saoud, J.B., Ferguson, K.M., and Rosen, R.C. (2001). On-demand IC351 (Cialis) enhances erectile function in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 13, 2-9.

Persechini, A., Kamm, K.E., and Stull, J.T. (1986). Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 261, 6293-6299.

Persechini, A., Mrwa, U., and Hartshorne, D.J. (1981). Effect of phosphorylation on the actin-activated ATPase activity of myosin. *Biochem Biophys Res Commun* 98, 800-805.

Phillips, G.N., Jr., Fillers, J.P., and Cohen, C. (1986). Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J Mol Biol* 192, 111-131.

Podzuweit, T., Nennstiel, P., and Muller, A. (1995). Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cell Signal* 7, 733-738.

Polson, J.B., and Strada, S.J. (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 403-427.

Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., and Dickey, D.M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27, 47-72.

Reiersen, G.W., Guo, S., Mastronardi, C., Licinio, J., and Wong, M.L. (2011). cGMP Signaling, Phosphodiesterases and Major Depressive Disorder. *Curr Neuropharmacol* 9, 715-727.

Rembold, C.M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* 20, 129-137.

Rembold, C.M., Wardle, R.L., Wingard, C.J., Batts, T.W., Etter, E.F., and Murphy, R.A. (2004). Cooperative attachment of cross bridges predicts regulation of smooth muscle force by myosin phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C594-602.

Rensen, S.S., Doevendans, P.A., and van Eys, G.J. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15, 100-108.

Rivet-Bastide, M., Vandecasteele, G., Hatem, S., Verde, I., Benardeau, A., Mercadier, J.J., and Fischmeister, R. (1997). cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest* 99, 2710-2718.

Rod R. Seeley, T.D.S., Philip Tate (2003). *Anatomy & Physiology*. (McGraw-Hill Higher Education).

Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344.

Rubart, M., Patlak, J.B., and Nelson, M.T. (1996). Ca<sup>2+</sup> currents in cerebral artery smooth muscle cells of rat at physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations. *J Gen Physiol* 107, 459-472.

Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E., and Beavo, J.A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93, 280-291.

Sada, T., Koike, H., Ikeda, M., Sato, K., Ozaki, H., and Karaki, H. (1990). Cytosolic free calcium of aorta in hypertensive rats. Chronic inhibition of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 16, 245-251.

Saenz de Tejada, I., Angulo, J., Cuevas, P., Fernandez, A., Moncada, I., Allona, A., Lledo, E., Korschen, H.G., Niewohner, U., Haning, H., Pages, E., and Bischoff, E. (2001). The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int J Impot Res* 13, 282-290.

Schneider, H.H., Schmiechen, R., Brezinski, M., and Seidler, J. (1986). Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *Eur J Pharmacol* 127, 105-115.

Schoeffter, P., Lugnier, C., Demesy-Waeldele, F., and Stoclet, J.C. (1987). Role of cyclic AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases in the control of cyclic nucleotide levels and smooth muscle tone in rat isolated aorta. A study with selective inhibitors. *Biochem Pharmacol* 36, 3965-3972.

Schulz, S., and Waldman, S.A. (1999). The guanylyl cyclase family of natriuretic peptide receptors. *Vitam Horm* 57, 123-151.

Seino, Y., Takano, T., Hayakawa, H., Kanmatsuse, K., Saitoh, S., Saitoh, T., Kamishima, G., Watanabe, K., Motomiya, T., Murata, M., and et al. (1995). Hemodynamic effects and pharmacokinetics of oral milrinone for short-term support in acute heart failure. *Cardiology* 86, 34-40.

Sellers, J.R., Chock, P.B., and Adelstein, R.S. (1983). The apparently negatively cooperative phosphorylation of smooth muscle myosin at low ionic strength is related to its filamentous state. *J Biol Chem* 258, 14181-14188.

Setoguchi, M., Ohya, Y., Abe, I., and Fujishima, M. (1997). Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. *J Physiol* 501 ( Pt 2), 343-353.

Sette, C., and Conti, M. (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* 271, 16526-16534.

Shakur, Y., Holst, L.S., Landstrom, T.R., Movsesian, M., Degerman, E., and Manganiello, V. (2001). Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66, 241-277.

Sharma, V. (2004). Radiopharmaceuticals for assessment of multidrug resistance P-glycoprotein-mediated drug transport activity. *Bioconjug Chem* 15, 1464-1474.

Sobue, K., Muramoto, Y., Fujita, M., and Kakiuchi, S. (1981). Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5652-5655.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231-236.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 Pt 2, 177-185.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83, 1325-1358.

Somlyo, A.P., Wu, X., Walker, L.A., and Somlyo, A.V. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134, 201-234.

Sonnenburg, W.K., and Beavo, J.A. (1994). Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol* 26, 87-114.

Sonnenburg, W.K., Seger, D., Kwak, K.S., Huang, J., Charbonneau, H., and Beavo, J.A. (1995). Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 270, 30989-31000.

Sperelakis, N., and Ohya, Y. (1990). Cyclic nucleotide regulation of Ca<sup>2+</sup> slow channels and neurotransmitter release in vascular muscle. *Prog Clin Biol Res* 327, 277-298.

Stafford, W.F., 3rd, Mabuchi, K., Takahashi, K., and Tao, T. (1995). Physical characterization of calponin. A circular dichroism, analytical ultracentrifuge, and electron microscopy study. *J Biol Chem* 270, 10576-10579.

Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., and Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 3, 437-443.

Stull, J.T. (2001). Ca<sup>2+</sup>-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series. *J Biol Chem* 276, 2311-2312.

Stull, J.T., Gallagher, P.J., Herring, B.P., and Kamm, K.E. (1991). Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension* 17, 723-732.

Su, Z., Fan, D., and George, S.E. (1994). Role of domain 3 of calmodulin in activation of calmodulin-stimulated phosphodiesterase and smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 269, 16761-16765.

Takuwa, Y. (1996). Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca<sup>2+</sup>, protein kinase C and myosin light chain phosphatase. *Jpn Heart J* 37, 793-813.

Thomas, G., Chung, M., and Cohen, C.J. (1985). A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circ Res* 56, 87-96.

Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D., Bley, K., and Fox, A. (1995). Reflections on Ca(2+)-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18, 52-54.

Vaandrager, A.B., and de Jonge, H.R. (1996). Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* 157, 23-30.

Vandecasteele, G., Verde, I., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., and Fischmeister, R. (2001). Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* 533, 329-340.

Vandekerckhove, J., and Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126, 783-802.

Vuckovic, G., Antonijevic-Nikolic, M., Tanaskovic, S.B., and Zivkovic-Radovanovic, V. (2011). New Cu(II) and Co(II) octaazamacrocyclic complexes with 2-amino-3-phenylpropanoic acid. *J. Serb. Chem. Society* 76, 719-731.

Vuckovic, G., Tanaskovic, S.B., Antonijevic-Nikolic, M., Zivkovic-Radovanovic, V., and Gojgic-Cvijovic, G. (2009). A study of novel cobalt(II) octaazamacrocyclic complexes with aminocarboxylates or their derivatives. *J. Serb. Chem. Society* 74, 629-640.

Wang, H., Robinson, H., and Ke, H. (2007). The molecular basis for different recognition of substrates by phosphodiesterase families 4 and 10. *J Mol Biol* 371, 302-307.

Wang, R. (1998). Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol* 76, 1-15.

Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201-206.

Wessjohann, L.A., Ruijter, E., Garcia-Rivera, D., and Brandt, W. (2005). What can a chemist learn from nature's macrocycles?--a brief, conceptual view. *Mol Divers* 9, 171-186.

Whitby, F.G., and Phillips, G.N., Jr. (2000). Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution. *Proteins* 38, 49-59.

Willoughby, D., and Cooper, D.M. (2007). Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* 87, 965-1010.

Xiong, Z., and Sperelakis, N. (1995). Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 27, 75-91.

Yamakage, M., and Namiki, A. (2002). Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 49, 151-164.

Yan, C., Zhao, A.Z., Bentley, J.K., and Beavo, J.A. (1996). The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. *J Biol Chem* 271, 25699-25706.

Zhi, G., Abdullah, S.M., and Stull, J.T. (1998). Regulatory segments of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 273, 8951-8957.

Zoraghi, R., Bessay, E.P., Corbin, J.D., and Francis, S.H. (2005). Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J Biol Chem* 280, 12051-12063.

Zoraghi, R., Corbin, J.D., and Francis, S.H. (2004). Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol* 65, 267-278.

Zucchi, R., and Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49, 1-51.