



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Diogo António Gonçalves Candeias da Guerra Maio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Orientador: Doutor Flávio Reis

Covilhã, Outubro de 2012

Dedicatória

“The best love is the kind that awakens the soul and makes us reach for more, that plants a fire in our hearts and brings peace to our minds and that’s what you’ve given me.”

Para ti, Fátima

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer toda a ajuda e orientação, todo o conhecimento e ensinamentos dados pelos meus orientadores, Professor Doutor Ignácio Verde e Doutor Flávio Reis, assim como à Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues pelos conhecimentos transmitidos e contribuição no desenvolvimento deste projeto de investigação. Com o vosso incentivo, paciência e dedicação cresci como investigador e o meu conhecimento sobre os mais variados temas só aumentou com a vossa paixão.

À minha adorada família, à minha mãe Isilda, aos meus irmãos Henrique e António por todo o amor, sacrifício e apoio quero agradecer-vos do fundo do meu coração porque sem vocês ao meu lado não teria chegado até aqui. Todo o meu sucesso e felicidade se devem a vocês.

À Fátima Santos por toda a força e amor que me dá e pela pessoa fantástica e maravilhosa que sempre estará a meu lado e que me dá a maior felicidade. Quero estar na felicidade do teu coração agora e sempre. O maior beijo de amor para ti e obrigado por me mostrares o que é um amor para a vida.

A todos os membros do CICS-UBI e do IBILI um obrigado pelos sorrisos diários e por toda a boa convivência e disponibilidade para alcançarmos um bem comum.

Aos meus verdadeiros amigos Filomena Augusta, Rita Martins, Paulo Saldanha, José Sereno e o colega Luís, um muito obrigado por todos os sorrisos e incentivos durante este longo período de investigação. O vosso apoio incondicional, palavras de amizade e verdadeiro conhecimento tornaram-me ainda melhor investigador mas acima de tudo um melhor amigo.

Obrigado a todos!

Resumo

A hipertensão arterial (HTA) pós-transplante é um fator de risco cardiovascular que pode comprometer a longo prazo a eficácia do transplante. A Ciclosporina A (CsA) é um dos imunossuppressores mais utilizados na prevenção da rejeição de órgãos em doentes transplantados, bem como em doenças autoimunes. No entanto, o seu uso clínico é prejudicado pelo desenvolvimento de HTA, pela sua significativa nefrotoxicidade e, também, pelo desenvolvimento de disfunção endotelial e vasculopatia a nível do transplante. O Sirolimus (rapamicina, SRL) é uma lactona macrocíclica com um novo mecanismo de ação imunossupressora. O seu alto grau de sinergismo com a CsA permite uma eficiente prevenção da rejeição assim como uma minimização da toxicidade induzida pela CsA. Contudo, muito pouco é conhecido tendo em consideração os supostos mecanismos associados à proteção cardiorenal e aos efeitos vasomotores, distintos dos associados à CsA. O objetivo desta atividade experimental foi avaliar os efeitos vasculares do SRL e/ou CsA em culturas de células da aorta de rato (A7r5) e, também, comparar os efeitos cardiorenais dos dois fármacos num modelo animal (rato). As técnicas de *whole cell patch clamp* e de *planar cell surface area* (PCSA) foram utilizadas para analisar a atividade dos canais de cálcio tipo L (LTCC) e a contratilidade celular, respetivamente. As respostas de relaxamento induzidas pela CsA e SRL no efeito contrátil da noradrenalina (NA, 1 μ M), serotonina (5-HT, 1 μ M) e Bay-K (0.1nM) foram determinadas por PCSA. A CsA teve um efeito de relaxamento até um máximo de 140% sobre o efeito contrátil da 5-HT, 120% sobre o efeito da NA e 110% sobre o efeito do Bay-K. O SRL exibiu uma percentagem máxima de relaxamento de 100% sobre os efeitos contráteis da 5-HT e da NA e um máximo de 125% sobre o efeito do Bay-K. A combinação dos dois compostos evidenciou um efeito de relaxamento sobre a ação dos agentes contráteis (45-140%). As análises eletrofisiológicas do *whole cell patch clamp* demonstraram um efeito inibitório da CsA (8nM-12nM) e SRL (10nM-10 μ M) sobre os LTCC. A adição da concentração de 10 μ M de SRL à CsA 4 μ M potenciou este efeito inibitório sobre este tipo de canais de cálcio. Estes resultados indicam que o efeito de relaxamento das células A7r5 do SRL e da CsA é mediado pela inibição dos LTCC. O modelo animal de 9 semanas com ratos envolveu o uso de concentrações dos fármacos que mimetizam as usadas na prática clínica. A CsA promoveu disfunção cardiorenal, caracterizada por desenvolvimento de HTA arterial, taquicardia, aumento da ureia sérica, juntamente com dislipidemia. O SRL promoveu menos efeitos secundários cardiorenais, mas demonstrou ser igualmente pró-hipertensiva e pró-dislipidémica. Em conclusão, este trabalho permitiu esclarecer alguns aspetos relativos aos efeitos cardiorenais dos dois fármacos imunossuppressores; todavia merece continuação, de forma a permitir a compreensão dos mecanismos celulares/moleculares destes fármacos, o que será muito importante para a prevenção destes efeitos secundários graves pós-transplante. Para além disso, poderá ser essencial para o desenvolvimento de novos imunossuppressores, tão específicos e eficazes como os atuais, mas menos tóxicos a nível

cardiovascular e renal, de forma a melhorar a sobrevida dos enxertos e prolongar a vida do doente transplantado.

Palavras-Chave: ciclosporina A, sirolimus, células A7r5, *whole cell patch clamp*, *planar cell surface area*, canais de cálcio, modelo animal, efeitos cardiorenais

Abstract

Post transplantation hypertension (HTA) produces serious cardiovascular risks that jeopardize a long-lasting, successful organ transplant. Cyclosporine (CsA) is among the most widely used immunosuppressant for preventing graft rejection and autoimmune diseases. However, its clinical use is hampered by its significant nephrotoxicity and has also been implicated in the development of endothelial dysfunction and transplant vasculopathy. Sirolimus (rapamycin, SRL), is a macrocyclin lactone with a novel mechanism of immunosuppressive action. Its high degree of synergy with CsA would not only more efficiently prevent rejection but also allow minimization of CsA-induced toxicity. However, little is known concerning the mechanisms underlying the putative cardio-renal protection afforded and whether the vasomotor effects are distinct from those for CsA. Preliminary studies using animal models have provided conflicting results. The aim of this study was to determine the vascular effects of SRL and/or CsA in clonal cell line culture from embryonic rat thoracic aorta (A7r5) and also to compare the cardiorenal effects in an animal model of both drugs. Whole cell patch clamp and the planar cell surface area (PCSA) techniques were used to analyze L-type calcium channels (LTCC) activity and cell contractility, respectively. The relaxation responses induced by CsA and SRL on noradrenaline (NA, 1 μ M), serotonin (5-HT, 1 μ M) and Bay-K (0.1nM) contractions were assessed using PCSA. CsA relaxed to a maximum of 140% over the contractile effect of 5-HT, 120% over NA and 110% over Bay-K effects. SRL relaxed to a maximum of 100% over the contractile effects of 5-HT and NA and to a maximum of 125% over Bay-K effect. Both compounds relaxed the effect of the contractile agents (45-140%). The electrophysiological analysis showed that CsA (8nM-12 μ M) and SRL (10nM-10 μ M) inhibit LTCC. Combination of SRL (10 μ M) with CsA (4 μ M) action potentiated the LTCC inhibition. Our data suggest that SRL and CsA cause relaxation of A7r5 cells through the inhibition of LTCC. The 9-weeks rat animal model involved the use of drugs' doses that mimic those of the clinical practice. CsA promoted cardiorenal impairment such as HTA, tachycardia, increased urea production, together with dyslipidaemia. SRL promoted less cardiorenal side effects, but showed pro-hypertensive and pro-dyslipidaemic effects. Understanding the molecular mechanisms of these drugs will be important to prevent the serious side-effects post-transplantation and could be pivotal for designing specific and less toxic immunosuppressant therapy that could efficiently control blood pressure thus improving long term transplant outcomes.

Keywords: cyclosporine, sirolimus, A7r5, whole cell patch clamp, planar cell surface area, calcium channels

Tabela de Conteúdos

Capítulo I.....	1
Introdução	1
1.1. Fármacos Imunossupressores	1
1.2. Doenças cardiovasculares - a Hipertensão	11
1.3. O tónus vascular e o endotélio.....	15
1.4. Mecanismos de remodelação vascular	16
1.5. Artérias.....	17
1.6. Disfunção renal e a hipertensão	18
1.7. Músculo Liso	19
1.8. Regulação da Contratilidade do Músculo liso Vascular.....	21
1.9. Potencial de Membrana	25
1.10. Mecanismo de ação dos vários mensageiros	28
1.11. Canais de Cálcio	30
1.12. O <i>stress</i> oxidativo e a hipertensão	36
Capítulo II.....	38
Objetivos	38
Capítulo III	39
Metodologias	39
3.1. Materiais	39
3.2. Cultura de Células A7r5	39
3.3. Experiências Eletrofisiológicas - <i>Whole Cell Patch Clamp</i>	41
3.4. Experiências Contratilidade - <i>Planar Cell Surface Area</i>	43
3.5. Modelo animal.....	45
3.6. Análise Estatística	48
Capítulo IV.....	49
Resultados e discussão	49
Capítulo V.....	70
Conclusão e Perspetivas Futuras	70
Referências Bibliográficas.....	73

Lista de Figuras

Figura 1 - Efeitos a nível celular de alguns agentes imunossupressores conhecidos..	2
Figura 2 - Local de ação da ciclosporina e sirolimus no ciclo celular.	4
Figura 3 - Esquema representativo da hipertrofia do ventrículo esquerdo	6
Figura 4 - Administração crónica de ciclosporina conduz à disfunção renal.	7
Figura 5 - Mecanismo de ação do sirolimus (rapamicina)..	9
Figura 6 - Principais fatores de risco da doença cardiovascular a nível mundial.	11
Figura 7 - Variações de pressão arterial sistólica e diastólica na HTA arterial.	12
Figura 8 - Doença cardiovascular - possíveis efeitos da aterosclerose.	13
Figura 9 - Mecanismos patofisiológicos da HTA.	14
Figura 10 - Efeitos da HTA no endotélio e consequências no músculo liso.	16
Figura 11 - Constituição das artérias dos vasos sanguíneos humanos.	18
Figura 12 - Características ultraestruturais das células do músculo liso	20
Figura 13 - Papel do cálcio na regulação do estado contráctil das VSMCs.	23
Figura 14 - Modelo de contração e relaxamento no músculo vascular.	24
Figura 15 - Diagrama esquemático de uma célula do músculo liso arteriolar	27
Figura 16 - Ativação da proteína G acoplada ao recetor.	29
Figura 17 - Esquema hipotético da estrutura geral dos VOCC..	34
Figura 18 - Organização estrutural dos LTCC.	35
Figura 19 - Imagens microscópicas das culturas celulares de A7r5.	40
Figura 20 - Células A7r5 inviáveis para o estudo e eliminação total da fluorescência	43
Figura 21 - Células A7r5 marcadas com WGA numa ampliação de 40x e de 10x.	44
Figura 22 - Efeitos da aplicação direta de CsA sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica <i>whole cell patch clamp</i> .	49
Figura 23 - Efeitos da aplicação direta de SRL sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica <i>whole cell patch clamp</i> .	50
Figura 24 - Efeitos da aplicação combinada de CsA e SRL sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica <i>whole cell patch clamp</i> .	51
Figura 25 - Efeitos da aplicação de CsA, após estimulação com BAY 0,1 nM, sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica <i>whole cell patch clamp</i> .	52
Figura 26 - Efeitos direto das diferentes concentrações de CsA (0,008 - 12 μ M) em células de cultura A7r5 usando a técnica de <i>whole cell patch clamp</i> .	53
Figura 27 - Efeitos direto das diferentes concentrações de SRL (0,01 - 10 μ M) em células de cultura A7r5 usando a técnica de <i>whole cell patch clamp</i> . Os dados encontram-se expressos em percentagem (%) de inibição da intensidade de corrente dos LTCC (ICa ²⁺ , L).	54

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Figura 28 - Efeitos direto das diferentes concentrações de SRL (10 μM), CsA (4 μM) e concentração combinados dos fármacos em células de cultura A7r5 usando a técnica de whole cell patch clamp.	55
Figura 29 - Efeito da aplicação do agente CsA 4 μM (VIOLETA) sobre o efeito da NA 1 μM (AZUL) na resolução 40x - <i>ESQUERDA</i> ; Efeito da aplicação do agente SRL 10 μM (VERDE) sobre o efeito da NA 1 μM (AZUL) na resolução 40x - <i>DIREITA</i>	56
Figura 30 - Combinação dos resultados das experiências em PCSA.	57
Figura 31 - Efeito de relaxamento, em percentagem, da CsA (0,4-8 μM) em células da linha A7r5 contraídas previamente com 5-HT (1 μM), noradrenalina (1 μM) e Bay-K 8644 (0,1nM). ..	58
Figura 32 - Efeito de relaxamento, em percentagem, do SRL (0,1-10 μM) em células da linha A7r5 contraídas previamente com 5-HT (1 μM), noradrenalina (1 μM) e Bay-K 8644 (0,1nM). ..	59
Figura 33 - Peso corporal (em gramas) dos grupos de ratos sujeitos aos diferentes tratamentos, no início (semana 0) e no final do estudo (semana 9)	62
Figura 34 - Frequência cardíaca de ratos dos 3 grupos de ratos em estudo no final do tratamento (semana 9).	63
Figura 35 - Peroxidação lipídica (esquerda) na artéria aorta e pressão arterial sistólica (direita) e nos 3 grupos em estudo à nona semana de tratamento..	64
Figura 36 - <i>Ratio</i> peso do coração/peso do ventrículo esquerdo dos 3 grupos de ratos em estudo no final do tratamento (semana 9)	65
Figura 37 - Marcadores de nefrotoxicidade: níveis de ureia (esquerda) e de peroxidação lipídica no rim - TBARS (direita) nos 3 grupos em estudo à nona semana de tratamento.	67
Figura 38 - Diferentes lesões renais verificadas nas análises histopatológicas com amostras dos grupos de tratamento de CsA e SRL.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Funções Fisiológicas e Farmacológicas dos canais de Ca^{2+}	32
Tabela 2 - Efeito de relaxamento da CsA (4 μ M), SRL (10 μ M) e combinado em células A7r5 contraídas com: serotonina (5-HT;1 μ M); noradrenalina (NA; 1 μ M); and Bay-K (0,1 nM).	59
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos analisados durante as 9 semanas de tratamento.	66
Tabela 4 - Semi-quantificação das lesões renais vasculares com os diferentes grupos de tratamento.....	68

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (<i>Serotonin or 5-Hydroxytryptamine</i>)
ATP	Trifosfato de Adenosina (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
ATPase	Trifosfatase de Adenosina (<i>Adenosine Triphosphatase</i>)
BAY	(-) -Bay K 8644
Ca ²⁺	Cálcio (<i>Calcium</i>)
Ca-CaM	Complexo (Ca ²⁺) ₄ -Calmodulina (<i>Calcium-Calmodulin Complex</i>)
CaM	Calmodulina (<i>Calmodulin</i>)
cGMP	Monofosfato Cíclico 3'5'- Guanosina (<i>Cyclic Guanosine 3,5' - Monophosphate</i>)
ConA	Concanavalina A (<i>Concanavalin A</i>)
CsA	Ciclosporina (<i>Cyclosporin or Cyclosporine A</i>)
DAG	1,2-Diacilglicerol (<i>1,2-Diacylglycerol</i>)
DMEM - F12	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FBS	Soro Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
GTP	Trifosfato de Guanosina (<i>Guanosine Triphosphate</i>)
HTA	Hipertensão (<i>Hypertension</i>)
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de Inositol (<i>Inositol-1,4,5-Triphosphate</i>)
K ⁺	Potássio (<i>Potassium</i>)
K _{ATP}	Canais de K ⁺ Sensíveis a ATP (<i>ATP -Sensitive Potassium Channels</i>)
K _{ca}	Canais de Potássio ativados por Cálcio (<i>Calcium-activated Potassium Channels</i>)
KCl	Cloreto de Potássio (<i>Potassium Chloride</i>)
K _{IR}	Canais de K ⁺ Retificadores (<i>Inwardly Rectifying Potassium Channels</i>)
K _V	Canais de K ⁺ Operados por Voltagem (<i>Voltage-Gated Potassium Channels</i>)
LTCC	Canais de cálcio operados por voltagem tipo L (<i>L-Type Calcium Channel</i>)
MgCl ₂	
MLC ₁₇	
MLC ₂₀	Cadeias Leves Reguladoras da Miosina (<i>Myosin Regulatory Light Chains</i>)
NA	Noradrenalina (<i>Noradrenaline</i>)
Na ⁺	Sódio (<i>Sodium</i>)
ms	Milissegundo (<i>Milisecond</i>)
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio (<i>Sodium Bicarbonate</i>)
NCX	Permutador Na ⁺ /Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ Exchanger</i>)
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOs	Sintetase do Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
PCSA	Planar Cell Surface Area
PLC	Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

PBS	Tampão Fosfato-Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RE	Retículo Endoplasmático (<i>Endoplasmic Reticulum</i>)
RyR	Receptor de Rianodina (<i>Ryanodine receptor</i>)
SAC	Canais Ativados por <i>Stress</i> Físico (<i>Stretch-activated channel</i>)
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do Retículo Sarco-Endoplasmático (<i>Sarco-/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPases</i>)
SMC	Células do músculo liso (<i>Smooth Muscle Cells</i>)
SOC	Canais Operados por Depósitos Intracelulares (<i>Store-operated channel</i>)
SRL	Sirolimus (<i>Sirolimus or Rapamycin</i>)
TEA	Tetraetilamónio (<i>tetraethylammonium</i>)
VOCC	Canais de Cálcio Operados por Voltagem (<i>Voltage Operated Calcium Channel</i>)
VSMC	Células vasculares do músculo liso (<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>)
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Capítulo I

Introdução

1.1. Fármacos Imunossupressores

1.1.1. Breve resenha da evolução da terapêutica imunossupressora

A imunossupressão, uma diminuição da atividade do sistema imunológico após o transplante de órgãos, ficou por muito tempo restrita à administração empírica e não monitorizada de fármacos, como a azatioprina e a prednisona. A terapia da imunossupressão adequada é imprescindível para evitar a rejeição aguda de transplantes de órgãos, evitando assim a perda do enxerto. Porém, doses elevadas e/ou não-controladas desses medicamentos conduzem ao desenvolvimento de toxicidade. As opções terapêuticas para rejeição, como globulina anti-linfocítica e o anticorpo anti-linfocitário monoclonal (CD3), precederam a introdução da CsA e reduziram a frequência e a intensidade do processo inflamatório e da rejeição aguda quando administradas de forma profilática. A grande mudança ocorreu a partir da década de 80, com a utilização da CsA como principal base da imunossupressão que, associada à azatioprina e à prednisona configurou o esquema terapêutico ideal (Garcia, 2004).

O desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores mais efetivos e eficazes promoveu uma redução na incidência de rejeição aguda para menos de 20%, com um aumento paralelo da esperança de vida de 40% para próximo de 90% no primeiro ano de transplante, a maioria ultrapassando os cinco anos com função normalizada do órgão. No início de 1980, foi introduzida a CsA, um imunossupressor que revolucionou o transplante de órgãos. No entanto, problemas associados à dosagem vieram à tona devido a sua pouca e imprecisa absorção, estreita janela terapêutica e seus efeitos colaterais, especialmente a nefrotoxicidade. Com a disponibilização de outros fármacos, como o tacrolimus (FK506) e o sirolimus, houve um aprimoramento no controlo dessas terapias e os fármacos imunossupressores passaram a ser quantificados em níveis sanguíneos. A CsA e o FK506, inibidores da calcineurina, são a base da imunossupressão clínica, podendo conduzir a efeitos tóxicos, especialmente a nefrotoxicidade relacionada com a dose (Korom, 2009). O mecanismo de ação de alguns imunossupressores encontra-se representado na figura 1.

Como os fármacos imunossupressores representam um problema devido à estreita faixa entre a dose terapêutica e seus efeitos tóxicos, existe um potente estímulo para a monitorização biológica desses fármacos, bem como para a necessidade de conhecer de forma cabal os seus parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. É fundamental a manutenção de fármacos

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

imunossupressores em níveis estáveis que sejam suficientemente altas para prevenir a rejeição mas, ao mesmo tempo, abaixo do limiar tóxico para minimizar os efeitos secundários, como a nefro e a neurotoxicidade (Garcia, 2004; Reis et al., 2003).

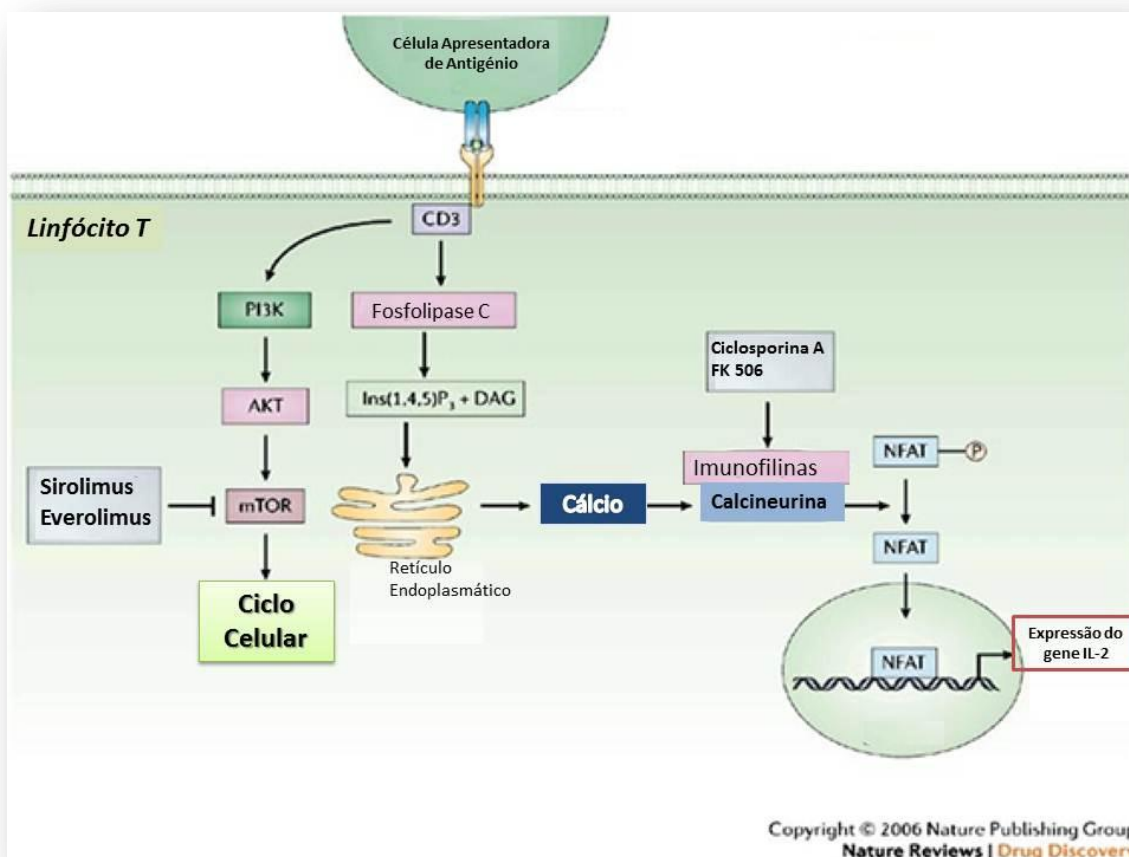


Figura 1 - Efeitos a nível celular de alguns agentes imunossupressores conhecidos. Adaptado de Nature, 2006.

1.1.2.A Ciclosporina A - eficácia vs toxicidade

A CsA é um agente imunossupressor, da família dos inibidores de calcineurina, derivado de um metabolito do fungo *Cylindrocarpon lucidum* Booth e *Tolypocladium inflatum* Gams, introduzido na década de 70 para provável uso em transplante de órgãos sólidos (Garcia, 2004; Morton & Powell, 2000). No entanto, a sua aplicação efetiva ocorreu em 1983 no *European Multicenter Trial Group* e, a partir desta data, tem melhorado substancialmente a esperança média de vida de vários doentes submetidos a transplantes cardíaco, renal, hepático, pancreático e pulmonar. Trata-se de uma substância lipofílica com características polipeptídicas cíclicas e, constituída por 11 aminoácidos (Podder et al., 2001; Rouillet, 1994; Kahan, 1989). A sua principal característica farmacológica é a atividade imunossupressora (Borel, 1976; Garcia, 2004) pois apresenta uma faixa muito reduzida de ação antifúngica para ser utilizada com essa finalidade. A CsA provoca lesão endotelial e vasoconstrição que produzem isquemia renal, devido a uma maior síntese de proteínas da matriz extracelular. Influencia ainda a deposição de proteínas nos interstícios renais através de mecanismos não

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

hemodinâmicos. Este efeito pode ser direto ou indireto; por mediadores como citocinas, fatores de crescimento e tromboxanos (Kopp & Klotman, 1990). É altamente hidrofóbica, tendo assim uma alta capacidade de interação biológica e sintética com os fosfolípidos da bicamada lipídica (Kopp & Klotman, 1990). Todas as evidências sugerem que a CsA atua especificamente e de maneira reversível nos linfócitos. Ao contrário dos agentes citostáticos, este agente não deprime a hematopoiese e não tem efeito algum sobre a função das células fagocitárias.

Os inibidores da calcineurina são os mais utilizados no tratamento imunossupressor sendo o uso da CsA mais frequente do que o da FK 506 (57% vs 37% (Garcia, 2004)). O desenvolvimento de HTA é mais evidente nestes inibidores. Assim, a terapêutica encontra-se muitas vezes combinada com inibidores de proliferação mTOR, como SRL, e múltiplos corticosteróides (63%) durante o primeiro ano após o transplante (Korom, 2009). A utilização de corticosteróides apresenta efeitos secundários assinaláveis como a perda de conteúdo ósseo.

O uso clínico da CsA está associado ao desenvolvimento de HTA em 30% dos casos (Grzešek et al., 2012). Em vários ensaios clínicos, a combinação com o SRL reduziu com sucesso a toxicidade induzida pela CsA (Mota et al., 2004). A CsA não é um fármaco abrangente exercendo o seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupa as outras células de linhagem mielóide, o que lhe confere certa seletividade (Roulet, 1994). Na formulação inicial, a CsA apresenta grande variação na absorção e na velocidade de metabolismo, resultando na biodisponibilidade média de 30% (Garcia, 2004). Tanto a CsA como o FK506 alteram a hemodinâmica glomerular com redução da filtração, alterações histológicas caracterizadas pela presença de vacuolização tubular, fibrose intersticial e hialinose arteriolar (Garcia, 2004). Relativamente à administração oral, a absorção da CsA produz-se, principalmente, no intestino delgado, a nível do duodeno e do jejuno (Drewe, 1992), de forma rápida mas incompleta, sendo que a biodisponibilidade absoluta da CsA situa-se nos 30%. A expressão da glicoproteína P na membrana dos enterócitos parece ser o principal determinante da biodisponibilidade da CsA e da sua variabilidade. Esta atua como uma “bomba” que expelle o fármaco, entre outras substâncias estranhas, impedindo a sua entrada na circulação sistémica, mediante o transporte de moléculas lipofílicas desde o interior do enterócito até ao lúmen intestinal. A maior percentagem de ligação da CsA às lipoproteínas plasmáticas produz-se na fracção HDL (43-57%) e LDL (25%) (Gurecki, 1985). As LDL actuam como transportadores da CsA e facilitam a sua entrada no interior das células.

Mecanismo de Ação

A ação imunossupressora da CsA envolve a interação da CsA com a calcineurina fosfatase, o que reduz a produção de interleucina-2 (IL-2). O mecanismo de ação da CsA baseia-se na inibição específica e reversível das células linfocitárias T na fase G0 ou G1 do ciclo celular (Borel, 1977) como se observa na figura 2. O processo é iniciado pela ligação da CsA às FKPBs,

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

imunofilinas citoplasmáticas, em que a isoforma FKBP12 é o principal efetor do efeito imunossupressor (Rauch et al., 2009). A CsA liga-se com alta afinidade à ciclofilina, existindo uma correlação entre a capacidade imunossupressora e a de ligação (Dick, 1997). O complexo fármaco-recetor inibe a ativação da fosfatase da calcineurina, um segundo mensageiro na desfosforilação e ativação do factor nuclear de ativação das células T (NF-AT). A NF-AT é uma proteína reguladora que promove a transcrição e produção de IL-2 e outras citocinas que promovem a proliferação e crescimento das células T e B. A inibição da produção de IL-2 pela CsA reduz a proliferação e ativação das células t citotóxicas e *helper* (Naesens, 2009; Pallet, 2011; Yoon & Yang, 2009).

A calcineurina é um complexo heterodimérico composto por uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora β , que possui actividade enzimática fosfatase serina/treonina dependente do complexo Ca^{2+} -calmodulina (Pitt, 2007; Saimi & Kung, 2002), a qual é inibida pelo complexo CsA-ciclofilina (Clipstone, 1992; Liu et al., 1992; Liu et al., 1991; O'Keefe et al., 1991; Swanson et al., 1992). Na ausência da CsA, a calcineurina desfosforila o NF-AT, levando à sua translocação para o núcleo celular.

O resultado dos efeitos da CsA nos linfócitos é o bloqueio do ciclo celular e a inibição da expressão do mRNA que codifica a síntese proteica. Desconhece-se a existência de um mecanismo semelhante no tecido vascular, já que as vias de transmissão de sinal da CsA estão por caracterizar nas células endoteliais e do músculo liso vascular.

As estratégias de minimização dos efeitos secundários da CsA passam por terapia conjunta com outros fármacos, diminuição das doses utilizadas ou remoção do imunossupressor (Serenio et al., 2012). A não-utilização de inibidores de calcineurina está associada com uma maior taxa de rejeição sendo que este protocolo foi descartado. As estratégias baseadas na redução das doses de CsA ainda permanecem por elucidada de forma mais cabal. Os protocolos actuais mais utilizados passam por uma terapêutica de conversão (precoce ou tardia) de CsA para SRL, como forma de manter a necessária imunossupressão e reduzir a nefrotoxicidade).

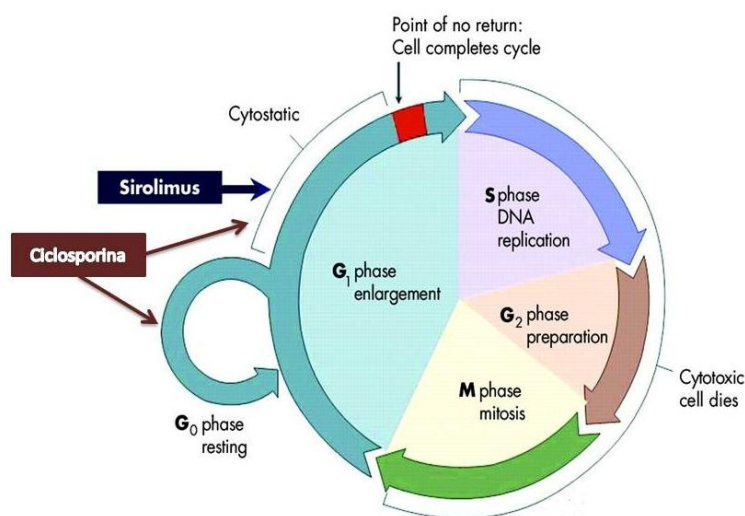


Figura 2 - Local de ação da ciclosporina e sirolimus no ciclo celular.

Principais efeitos secundários - a HTA e nefrotoxicidade

Estudos epidemiológicos, avaliando predominantemente os regimes terapêuticos com CsA, demonstraram que variações na creatina sérica durante o primeiro ano após transplante são indicadoras da sobrevivência a longo-prazo. A CsA é um fármaco muito importante na terapêutica imunossupressora, mas está associada a efeitos secundários graves, como a HTA e nefrotoxicidade continuando a ser usada na clínica devido à sua eficácia. O uso da CsA introduziu a monitorização farmacocinética na imunossupressão. Foi demonstrada, tanto para a CsA como para o FK506, uma correlação entre o nível residual mínimo com a eficácia e a toxicidade. O uso contínuo e em altas doses destes fármacos têm como limitação principal a nefrotoxicidade.

Consequências como o aumento de peso, de pressão arterial (PA) e risco cardiovascular aumentado são mais frequentes na terapia com a CsA. Também está relacionada com elevado risco cardiovascular e nefrotoxicidade, derivados da elevada reatividade vascular, mudanças na produção de substâncias endógenas vasoativas como tromboxanos, endotelina, serotonina e renina/angiotensina; e atividade nervosa simpática alterada com libertação de catecolaminas (Reis et al. 2000). A CsA promove a peroxidação lipídica e os seus efeitos hipertensivos estão associados com deficiências em diferentes vias cardiovasculares (Reis et al., 2009; Sereno et al., 2012). A CsA induz vasoconstrição transitória e intensa no rim após a administração, reversível com doses mais pequenas ou descontinuadas do fármaco. Os inibidores da calcineurina contraem as arteríolas eferentes, causando flutuações na perfusão glomerular e um aumento da creatinina sérica. Esta vasoconstrição é dependente da concentração e irreversível (Issa, 2012). A atividade máxima da calcineurina requiere a presença simultânea de Ca^{2+} , calmodulina e outros catiões bivalentes como o Mn^{2+} , Ni^{2+} e Mg^{2+} como ativadores (Hulin et al., 2012). A inibição da calcineurina fosfatase, indispensável para o efeito imunossupressor da CsA, atenua a produção de óxido nítrico (NO) e, assim, diminui a vasodilatação periférica.

A complicação clínica mais relevante da CsA é a nefropatia crónica, caracterizada por uma progressiva disfunção renal, arteriopatía aferente, influxo de células inflamatórias, fibrose tubulointersticial e imunogeneidade intrarenal aumentada (Yoon & Yang, 2009). A CsA causa um aumento desproporcional dos níveis de ureia plasmática e hipercalcemia. Os mecanismos desses efeitos não são claros, mas evidências experimentais demonstram toxicidade tubular e ação sobre os vasos renais com consequente lesão vascular. Os túbulos renais são os sítios primários do efeito nefrotóxico da CsA. A função renal pode sofrer alterações discretas no início do tratamento com CsA, porém deteriora-se rapidamente no primeiro mês.

As mudanças hemodinâmicas observadas no rim são provavelmente resultado da vasoconstrição renal das arteríolas aferentes. Estudos em ratos concluíram que grandes doses de CsA estão associadas com ativação da endotelina plasmática. Alterações no balanço entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores produzidos pelo endotélio, como a endotelina, os

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

eicosanóides e o EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*), poderiam contribuir para as mudanças na hemodinâmica renal durante a terapia com CsA.

A concentração de CsA que permite um *ratio* risco/benefício ótimo ainda não foi estabelecido. Nos últimos anos, várias estratégias de minimização foram propostas para reduzir os elevados níveis de exposição aos agentes imunossupressores necessários com o objetivo de limitar os efeitos adversos (Etienne et al., 2010). Apesar destes efeitos secundários extremos, os mecanismos subjacentes não foram ainda elucidados, sendo este trabalho experimental mais um passo para desvendar os mecanismos associados à toxicidade do fármaco.

A hipertrofia ventricular esquerda é um potente fator de risco para a ocorrência de complicações cardiovasculares, tal como ilustrado na figura 3. O aumento do ventrículo esquerdo (VE) que ocorre em pacientes com HTA essencial produz um alto risco para o desenvolvimento de arritmias ventriculares, disfunção sistólica e diastólica, bem com insuficiência cardíaca, o que também se verifica em pacientes com HTA induzida pela CsA.

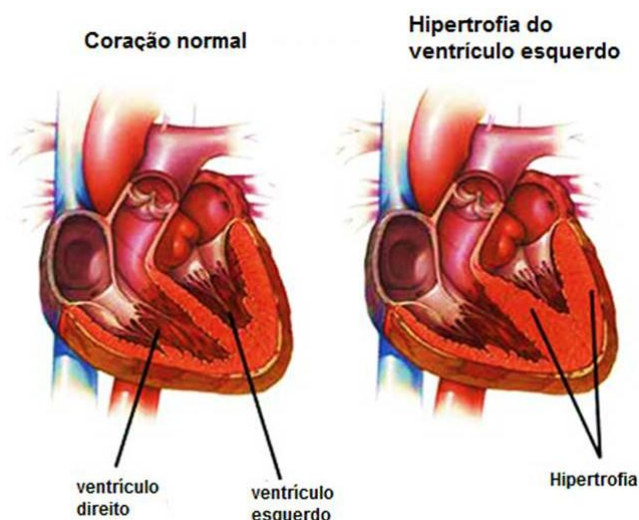


Figura 3 - Esquema representativo da hipertrofia do ventrículo esquerdo

Nesta terapêutica, verifica-se um aumento da massa ventricular superior ao normal, associado a uma diminuição da função sistólica do VE, levando à diminuição da fração de ejeção. A redução da concentração de CsA e o uso de fármacos renoprotetoras (antagonistas dos recetores de angiotensina II, estatinas) são as possíveis soluções encontradas na atualidade (Yoon & Yang, 2011).

A nefrotoxicidade crónica da CsA (figura 4) é caracterizada por uma disfunção renal progressiva, arteriopatía aferente, influxo inflamatório e fibrose intersticial. Uma administração a longo prazo de CsA rapidamente diminui a taxa de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal induzindo vasoconstrição ou aumento da resistência vascular intrarenal que resulta em último caso em dano isquémico. Esta isquémia crónica está associada com a formação anormal de espécies reativas de oxigénio e peroxidação lipídica (Reis et al., 2003;

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Yoon & Yang, 2009). Após redução ou completo corte na terapêutica com inibidores de calcineurina, uma melhoria na função renal foi observada (Yoon & Yang, 2009).

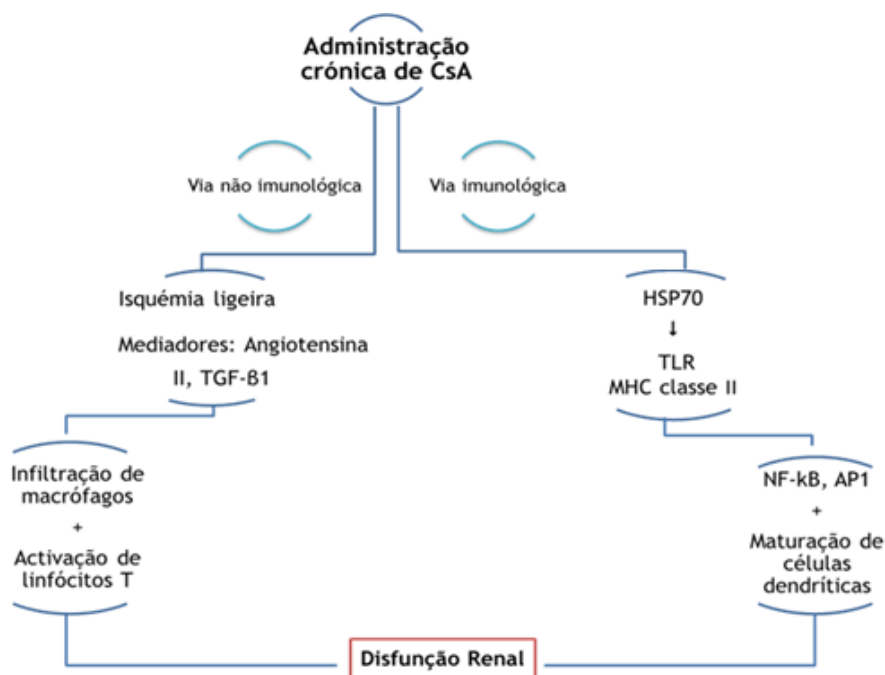


Figura 4 - Administração crónica de ciclosporina conduz à disfunção renal.

Os efeitos adversos da CsA devem-se em parte à irregular distribuição das ciclofilinas nos tecidos e ao seu conteúdo lipídico (Bueno, 2002). Mas os efeitos, embora dependentes da dose, apresentam uma grande heterogeneidade entre os diversos indivíduos e uma insuficiente correlação com os níveis plasmáticos de CsA (Myers, 1986).

Estudos tanto *in vitro* como *in vivo* têm descrito de forma consistente que a CsA exerce uma potente acção na vasculatura. Outra implicação destas observações é de que a HTA induzida pela CsA pode resultar de uma sensibilidade vascular alterada às substâncias vasoconstritoras e/ou vasodilatadoras.

Um aumento transitório do cálcio intracelular é fundamental na mediação das respostas contrácteis do músculo liso vascular (Marks, 2000). A CsA pode aumentar tanto o influxo de Ca^{2+} a partir dos compartimentos extracelulares (Meyer-Lehnert e Schrier, 1989; Rego et al, 1990) como a partir dos compartimentos intracelulares que o armazenam (Bokemeyer et al, 1994), factos que levam a colocar a hipótese de que os mecanismos de armazenamento e de libertação do cálcio estarem alterados após o tratamento (Grześk et al., 2012).

1.1.3. Sirolimus - nova opção em imunoterapia

As propriedades imunossupressoras do SRL só foram reconhecidas alguns anos após a sua descoberta quando se verificou a supressão da produção de IgE em várias patologias (Morelon, 2001). Também, verificou-se o potencial fungicida (particularmente contra *Candida*) e a sua

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

ação antitumoral em vários estudos *in vitro* pelo Instituto Nacional do Cancro nos EUA (Morelon, 2001). Apesar de tudo, a investigação não continuou e só em 1989 este fármaco reapareceu em vários estudos clínicos como imunossupressor em transplantes de órgãos (Chapman et al., 2007). Este ressurgimento deveu-se às suas semelhanças estruturais com a FK506 (Abraham & Wiederrecht, 1996; Rangan et al., 2009).

Este fármaco aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), desde 1999, é utilizado para a prevenção da rejeição de transplante renal (Rapamune®), apresentando um mecanismo de ação por ligação a proteínas citosólicas específicas, chamadas imunofilinas.

Muitas comparações e protocolos experimentais revelaram que o SRL exibe mínima nefrotoxicidade a doses imunossupressoras clínicas quando comparada com a CsA (Rangan et al., 2009).

Os efeitos nefrotóxicos da administração de inibidores de calcineurina criaram a necessidade da procura de agente imunossupressores com menos efeitos secundários. O SRL apresenta efeitos adversos em menor quantidade e extensão na função cardiorenal (Stallone, 2009). Apesar de tudo quando combinada com antagonistas da calcineurina, há um aumento na toxicidade derivada da interação farmacocinética existente (Mota et al., 2004). Uma combinação eficaz será a que utiliza os inibidores de calcineurina numa taxa de exposição menor que 80% mais o SRL.

O SRL é rapidamente absorvida, num máximo de 2 horas, com baixa biodisponibilidade oral e uma proporção linear a nível de dose. O tempo médio de vida é de 62 horas e a *clearance* é dependente do indivíduo e dose (Dupont, 2003). Após uma repetida administração oral, o SRL acumula-se nos órgãos, sendo as maiores concentrações encontradas no intestino, fígado, coração e rim, numa concentração descendente.

Apesar de todos os estudos demonstrados na literatura ao longo dos anos, o mecanismo preciso pelo qual o SRL atua como terapia continua a evoluir (Rangan et al., 2009). Pouco é conhecido dos efeitos vasomotores do SRL e estudos preliminares em vários modelos animais conduziram a resultados conflituosos.

Mecanismo de acção

O SRL atua através de um mecanismo intracelular diferente da CsA, que passa pela inibição da mTOR (*mammalian target of rapamycin*), apresentando aparentemente uma menor cardio e nefrotoxicidade (Reis et al., 2009). É uma lactona macrocíclica lipofílica isolada do fungo *actinomycete Streptomyces hygroscopicus*, com estrutura análoga a FK506, que após formar um complexo com o receptor intracelular FKBP12 (*FK506 binding protein-12*), liga-se ao mTOR, ao nível do domínio FRB (*FKBP12-rapamycin binding domain*). O complexo binário SRL/FKBP12 não se liga à calcineurina, não tendo um perfil neurotóxico e nefrotóxico tão pronunciado como na terapêutica com inibidores desta (Morrisett et al., 2002).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

O mTOR tem um papel crítico como promotor do crescimento e diferenciação celular assim como apoptose. O complexo SRL/FKBP12 liga-se ao mTOR, uma cinase regulatória essencial. A disrupção da mTOR impede a sinalização pelas citocinas, resultando na inibição do crescimento e diferenciação linfocitário. Em células T estimuladas pela IL-2, o SRL impede a progressão do ciclo celular na transição G1/S, resultando numa paragem na etapa G1 devido à inibição da atividade enzimática (Dupont, 2003) (figura 5). Devido ao carácter anti-proliferativo deste imunossupressor é desenvolvido um ambiente que favorece a apoptose das células que reagem a antígenos específicos do transplante, sendo desenvolvida a tolerância deste modo (Dupont, 2003).

A mTOR, proteína cinase serina/treonina que existe numa forma de proteína multimérica sensível à rapamicina (mTORC1) e insensível à rapamicina (mTORC2), funciona como um sensor de energia e regula a síntese proteica e funções maiores celulares (Haidinger et al., 2010; J. Ma et al., 2010). A mTORC1 promove a progressão G1 e a proliferação celular através de múltiplos mecanismos, sendo que a sua inibição pelo SRL é específica a nível celular. Contudo, algumas linhas de fibroblastos e linhas celulares hepáticas são insensíveis ao fármaco (Cruzado et al., 2011; Krämer et al., 2008; Rangan et al., 2009). A mTOR possui um papel bastante essencial na homeostase lipídica, fato observável pelos efeitos adversos do SRL, que incluem a hiperlipidémia, aumento de peso e resistência à insulina (Brown, 2007). A hiperlipidémia é um efeito adverso relevante numa terapêutica com SRL e frequentemente conduz à doença cardiovascular e a lesões renais pós transplante (Morrisett et al., 2002).

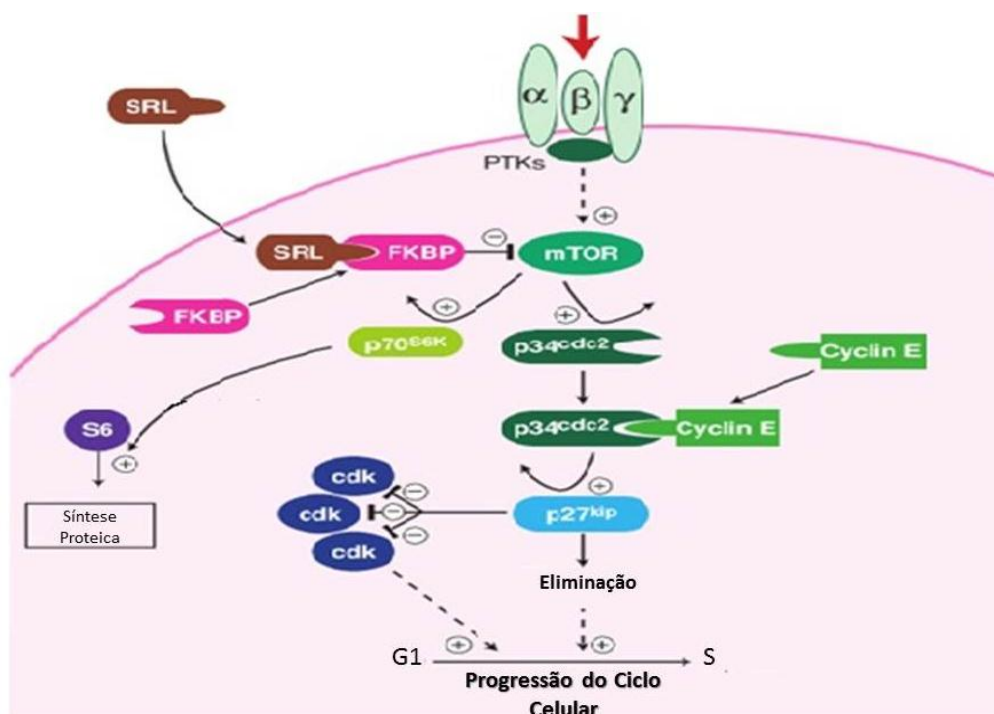


Figura 5- Mecanismo de ação do sirolimus (rapamicina). Ligação SRL com FK506 forma complexo que se associa ao mTOR (mammalian target of rapamycin). Este complexo inibe as vias bioquímicas que são necessárias para a progressão do ciclo celular na fase G1, existindo assim um boqueio na transdução do sinal. Adaptado de *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Oxford University, 2000.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Os inibidores da mTOR apresentam consideráveis efeitos secundários que são por vezes limitantes da terapêutica, afetando cerca de 30-50% dos doentes. Alguns destes efeitos secundários são o aumento do nível lipídico sérico, hemoglobina reduzida, edemas periféricos, distúrbios gastrointestinais, entre outros. A nível renal, estes inibidores afetam a estrutura e a sua função (Morath et al., 2007). Num rim saudável, o SRL é considerada não nefrotóxica enquanto num lesionado, o SRL pode ser benéfica ou prejudicial (Rangan et al., 2009).

Efeitos cardiovasculares e renais - eventual renoproteção

Inicialmente, o SRL foi utilizado em terapêutica coadjuvante, substituindo a azatioprina, mas devido à sua baixa nefrotoxicidade tem potencial para ser aplicada em monoterapia (Dupont, 2003; Lee, 2012). Os efeitos a nível celular do SRL são mediados pela ligação ao seu recetor citosólico, a proteína FK506, o que resulta num bloqueio na progressão do ciclo celular na transição G1/S (figura 5). Os efeitos inibitórios no crescimento celular e na migração em vasos sanguíneos são atualmente reconhecidos e têm um papel significativo na sua eficácia clínica. Apesar disto, os efeitos funcionais nos vasos sanguíneos são desconhecidos e, particularmente, importantes quando o SRL é libertado diretamente na circulação onde pode afetar o fluxo sanguíneo e a perfusão dos tecidos. Uma exposição crónica ao SRL pode alterar o diâmetro arterial causando disfunção no endotélio e consequências a nível da PA. Por fim, a sua lipofilicidade pode ser importante na absorção, distribuição e retenção nas paredes das artérias (Ghatta, 2007). Pouco é conhecido dos efeitos vasomotores do SRL e estudos preliminares em vários modelos animais conduziram a resultados conflituosos (Sehgal, 1998; Rangan et al., 2009).

A nível tumoral, verifica-se que os níveis dos alvos downstream da TORC1, como por exemplo o VEGF (*vascular endothelium growth factor*) encontram-se aumentados. Assim, o tratamento com inibidores desta proteína cinase TORC1 tem potencial terapêutico (Rangan et al., 2009), verificando-se um carácter anti-proliferativo. Durante a administração de SRL, os níveis de colesterol plasmático, LDL e níveis de triglicéridos encontram-se aumentados até um máximo de 50%. Estas modificações a nível de concentração são reversíveis, repetíveis e dependentes da dose. Estes resultados demonstram que o SRL afeta a via de sinalização da insulina aumentando/diminuindo a atividade da lipase dos adipócitos, resultando num aumento da síntese hepática de triglicéridos, na secreção de VLDL e hipertriglicéridemia (Morrisett et al., 2002).

A dislipidemia é definida como a presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue. As anormalidades nos lipídios e lipoproteínas são extremamente comuns na população geral e são consideradas um factor de risco altamente modificável para doenças cardiovasculares, devido à influência do colesterol.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Para o diagnóstico são medidos laboratorialmente os níveis plasmáticos de colesterol total, LDL, HDL e triglicéridos (Ma, 2007). O efeito anti-ateroesclerótico do SRL está relacionado com mudanças no local de metabolismo lipídico e com o seu efeito anti-proliferativo e anti-inflamatório (Rangan & Coombes, 2007). A hiperlipidémia está associada com a progressão da doença renal crónica. O SRL encontra-se associado com a hiperlipidémia nos transplantes renais, pancreáticos e hepáticos mas o seu impacto na função renal é inconclusivo (Rangan et al., 2009). De realçar o facto de que a investigação feita neste fármaco ter permitido revelar a importância biológica da sinalização do mTOR no organismo e em várias patologias, permitindo a criação de novas terapias para várias patologias (Rangan et al., 2009).

1.2. Doenças cardiovasculares - a Hipertensão

As doenças cardiovasculares são um grupo de patologias do coração e dos vasos sanguíneos e incluem a doença coronária aguda, cerebrovascular, cardíaca congénita e trombozes e embolias pulmonares (Black, 2006; Izzo & Black, 2003; Kaplan, 2012).

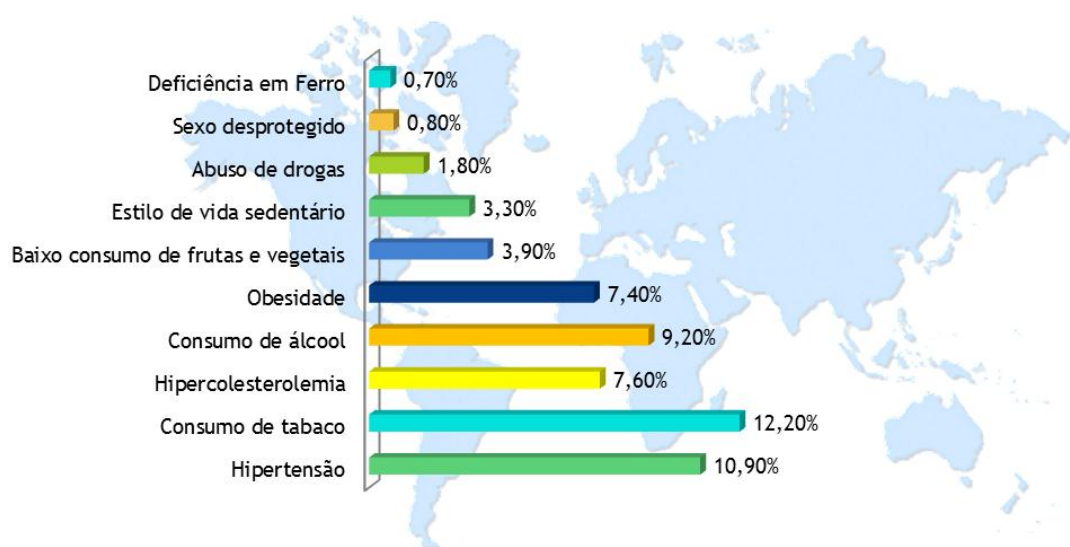


Figura 6 - Principais fatores de risco da doença cardiovascular a nível mundial.

O enfarte agudo do miocárdio ocorre porque há diminuição do fluxo sanguíneo para as coronárias do coração e provocam isquémia localizada. As causas mais comuns a nível dos países desenvolvidos são o tabagismo (12,2%), seguido pela HTA (10,9%) e aterosclerose ou formação de placas de ateroma nas paredes dos vasos sanguíneos (7,6%) como observamos na figura 6. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são responsáveis por 35% da mortalidade mundial. A projeção da OMS é que esse grupo de doenças seja a primeira causa de morte em todos os países em desenvolvimento até 2015. As doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 40% dos óbitos em Portugal, liderando a nível europeu a taxa de mortalidade por acidente vascular cerebral. Os fatores considerados

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

mais importantes são os de impacto independente e significativo no risco para doenças isquêmicas e acidente vascular cerebral; e os modificáveis ou passíveis de controlo (Black, 2006; Izzo & Black, 2003; Kaplan, 2012). Por apresentarem esses três critérios de relevância, enfatiza-se o controlo dos factores de risco como diabetes, obesidade, sedentarismo, tabaco ou HTA. A HTA é um desafio para a saúde pública mundial devido à elevada prevalência e o seu concomitante risco cardiovascular e renal (Michael et al., 2008).

Para a OMS, a HTA pode ser definida como uma elevação dos valores da PA sistólica e/ou diastólica acima de 140 e 90 mmHg, valores variáveis para diferentes sexos e idades: os homens apresentam valores mais elevados do que as mulheres e os idosos valores mais altos do que indivíduos mais jovens. A prevalência e seriedade da HTA aumenta acentuadamente com a idade e algumas estatísticas referem que 90% dos adultos acima dos 70-80 anos irão sofrer HTA sistólica (Black, 2006; Kaplan, 2012; Kotlikoff & Hall, 2003).

Para 95% das pessoas com PA elevada, a causa é desconhecida. Esta HTA é designada por essencial ou primária. Quando as causas são conhecidas designa-se por HTA secundária. A HTA essencial é assintomática e multifatorial. As causas mais comuns da HTA secundária (menos frequente) são disfunções ao nível da maquinaria vascular e do fluxo sanguíneo sistémico, especialmente no rim (doenças do parênquima ou estenose da artéria renal) ou nas glândulas endócrinas (Black, 2006; Filipa & Castro, 2010; Kaplan, 2012).

A incidência da HTA e a consequente insuficiência cardíaca apresenta consequências ao nível estrutural e funcional. A maior mudança é o espessamento dos vasos que leva a um aumento do nível sistólico na PA com uma pressão diastólica reduzida como se observa na figura 7.

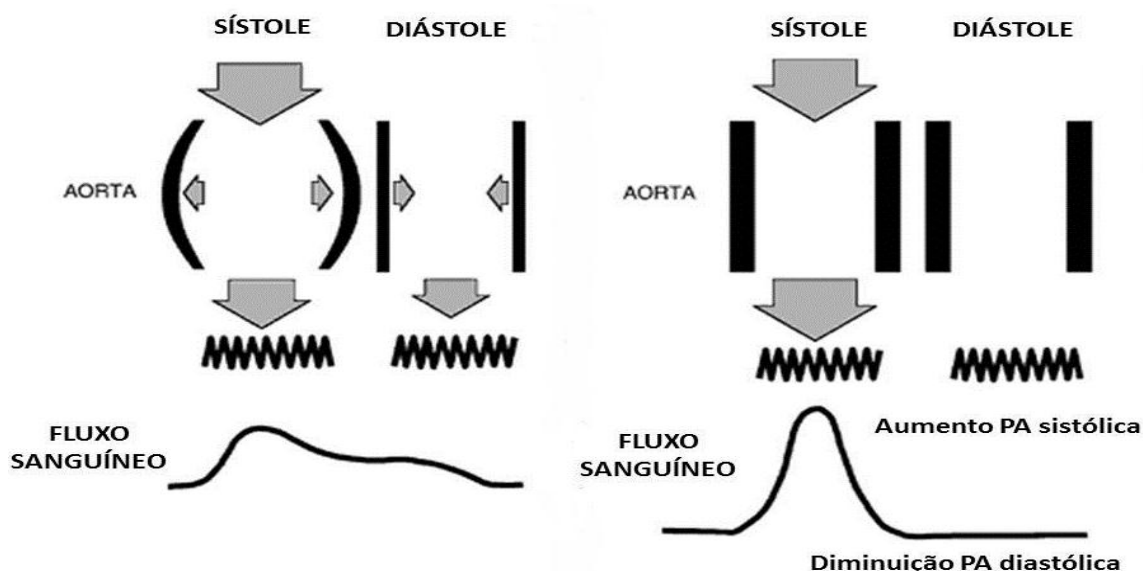


Figura 7 - Variações de pressão arterial sistólica e diastólica na HTA arterial.

O desenvolvimento da HTA tem por base a interação entre a predisposição genética de um dado indivíduo e fatores ambientais, ainda que não sejam completamente conhecido como estas interações ocorrem. Sabe-se que a HTA é acompanhada por alterações funcionais do

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

sistema nervoso autónomo simpático, da atividade renal, do sistema renina-angiotensina, para além de outros mecanismos humorais e de disfunção endotelial (Black, 2006; Brunner, 1983; Kaplan, 2012). A HTA resulta de várias alterações estruturais do sistema cardiovascular, que amplificam o estímulo hipertensivo e causam dano cardiovascular como podemos observar na figura 8, que inclui o exemplo da aterosclerose.

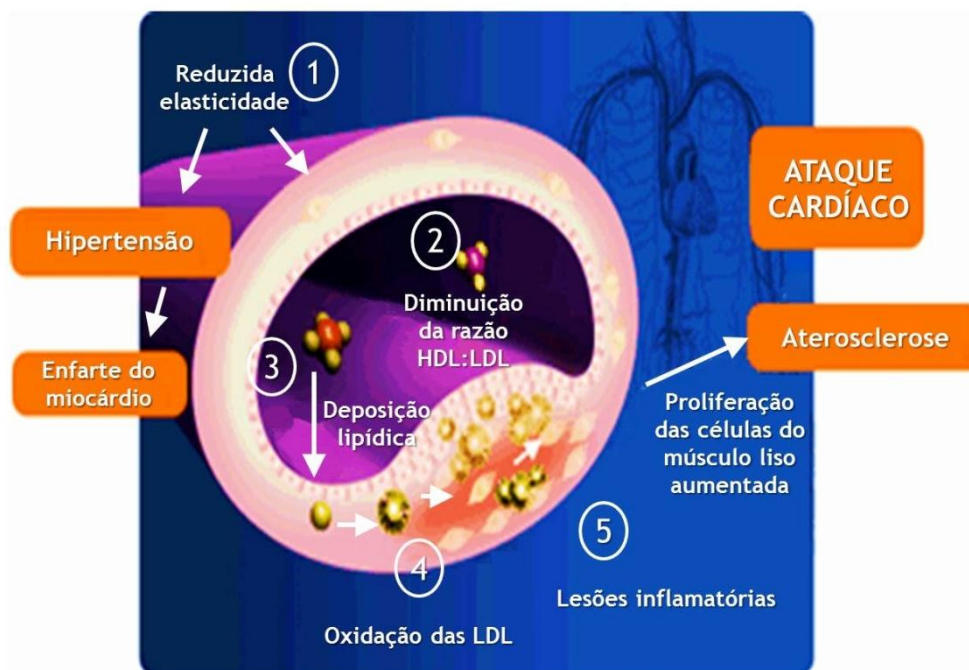


Figura 8 - Doença cardiovascular - possíveis efeitos da aterosclerose, como por exemplo a HTA, a nível das artérias e outros vasos.

Estas alterações hemodinâmicas iniciam mudanças adaptativas nos vasos de condução e de resistência caracterizadas por hipertrofia e hiperplasia do músculo liso da média, aumento da matriz extracelular, diminuição da *compliance* e aumento da resistência.

Nos modelos - animal e humano da HTA essencial - foi demonstrado que o tónus vascular em repouso e a resposta contráctil a um número elevado de estímulos fisiológicos encontram-se aumentados face aos normotensos (Rensen, 2007). Estas duas modificações contribuem para um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo. Na vasculatura do músculo liso existe uma permeabilidade iónica alterada em cenários hipertensivos que pode conduzir a danos patofisiológicos a longo prazo (Kaplan, 2012; Martens & Gelband, 2008). A duração e iniciação do tratamento, local de administração e agente usado são importantes na eficácia da reversão dos danos causados, embora não esteja totalmente claro se a permeabilidade iónica alterada segue as mudanças na PA ou se os danos são irreversíveis a nível das concentrações dos canais iónicos (Martens & Gelband, 2008). Em suma, vários fatores estão envolvidos neste processo como observado na figura 9 aos quais se acrescenta:

- i. Alterações histológicas nos vasos sanguíneos: endotélio, íntima e média.
- ii. Aumento da permeabilidade da membrana a vários iões como sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- iii. Alteração do metabolismo do Ca^{2+} que leva a um aumento intracelular, facto que facilita a contração desencadeada pelas substâncias vasoconstritoras.
- iv. Redução da atividade da Ca^{2+} -ATPase da membrana celular e do retículo sarcoplasmático e da troca $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, aumentando o Ca^{2+} livre intracelular.
- v. Modificação da atividade da bomba de Na^+ da membrana plasmática.
- vi. Alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona.
- vii. Alteração do endotélio vascular com produção de substâncias vasoconstritoras e facilitando a produção de mitogénios.
- viii. Presença de substâncias endógenas que inibem a bomba de Na^+ presente nas células musculares lisas vasculares e nos terminais nervosos noradrenérgicos. Esta inibição aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} , ao facilitar o influxo de Ca^{2+} através do permutador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, aumento do tónus vascular e da libertação de noradrenalina (NA), respetivamente.

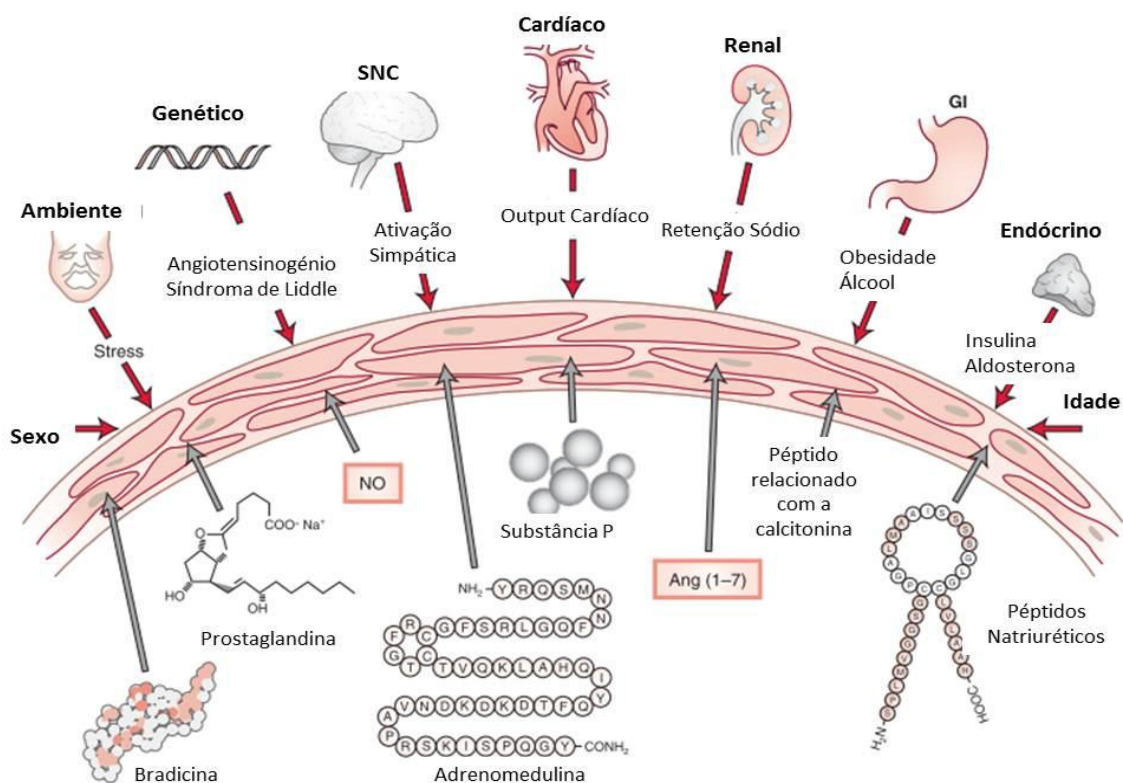


Figura 9 - Mecanismos patofisiológicos da HTA. Setas vermelhas: mecanismos hipertensores; setas cinzentas: mecanismos opostos à HTA; Ang (1-7), angiotensina (1-7); SNC, sistema nervoso central; GI, gastrointestinal; NO, óxido nítrico. Adaptado de (Black, 2006).

Apesar dos recentes avanços farmacológicos, as doenças cardiovasculares estão associadas a um declínio na qualidade e esperança de vida. Os transplantes de coração mantêm-se como a única opção terapêutica suficientemente eficaz para estes doentes. Importa referir que nos últimos anos a esperança de vida dos transplantados regista um aumento para os 84%, não obstante ainda seja verificável falta de doadores para colmatar as necessidades. A HTA pós-

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

transplante é reconhecida como factor de risco para uma falha no transplante (Black, 2006; Izzo & Black, 2003; Kaplan, 2012).

Qualquer inovação na terapêutica hipertensiva responde a vários critérios: (i) capacidade para aumentar o controlo da PA, (ii) eficácia no tratamento da HTA resistente e (iii) potencial na redução de riscos pelo impacto a nível funcional, estrutural e metabólico (Saurina et al., 2006). Em adição às patologias já existentes, o efeito combinado de corticosteróides, a inibição da calcineurina e a redução da função renal levam a picos na PA de cerca de 65-100%. A maioria dos estudos identifica a terapia com CsA como a maior responsável por esta HTA. O SRL partilha o mesmo final da via de inibição da calcineurina mas difere em termos de potência e magnitude dos efeitos indesejáveis mais facilmente controláveis (Dupont, 2003; Reis, 2009; Saurina et al., 2006).

Os níveis plasmáticos de triglicéridos e colesterol - LDL podem também aumentar o risco de doença coronária, embora não haja certezas no seu grau de independência em relação ao colesterol - HDL baixo e outros fatores de risco interrelacionados (incluindo LDL pequenas e densas, resistência à insulina e determinados perfis de coagulação). Devido às relações metabólicas recíprocas entre os níveis plasmáticos de colesterol - HDL e de triglicéridos, os fatores de risco que influenciam a redução de colesterol HDL associam-se também a elevação dos níveis de triglicéridos (Cristina & Pereira, 2008). Vários autores afirmam que a disfunção de canais iónicos, mais precisamente os canais de potássio e dos canais de cálcio, poderá levar à HTA. Defeitos na função do canal de potássio poderá provocar uma vasoconstrição e assim levarem a alterações que podem envolver mecanismos patogénicos como a HTA (Nelson and Quayle, 1995).

1.3. O tónus vascular e o endotélio

O tónus vascular, isto é, o grau de contração sustentada do sistema vascular, regula a resistência vascular periférica. O sistema vascular periférico responde com vasoconstrição e hemostase ao trauma e com hipertrofia e crescimento à HTA luminal. O tónus vascular é ativamente aumentado pela redução da magnitude absoluta do potencial membranar. Despolarizações na ordem dos 5-20mV têm sido demonstradas em vários modelos de HTA (Bratz et al., 2002; Fisher, 2010).

O endotélio assume uma posição anatómica estratégica na parede vascular uma vez que se localiza entre o sangue circulante e a musculatura lisa vascular, ocupando uma área de 1000 m². Regula a vasoatividade, mantém a fluidez do sangue, contribui para o correto balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios assim como a atividade pro e anticoagulante (Malyszko, 2010). A integridade do endotélio apresenta-se essencial no controlo do tónus vascular. A HTA pode causar disfunção ou desintegração endotelial, resultando no desaparecimento dos vasos pequenos e hipoxia tecidual (Malyszko, 2010). Uma função renal

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

diminuída pode afetar os níveis de várias moléculas inflamatórias como a proteína C reativa, IL-6 e ácido hialurônico, correlacionado inversamente com a *clearance* de creatina (Malyszko, 2010). A regulação do sistema vascular periférico está dependente da modificação do diâmetro dos vasos de resistência (predominantemente as arteríolas), i.e., da vasoconstrição e da vasodilatação, respetivamente. As células endoteliais desempenham um papel crucial na regulação do tónus vascular através da libertação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras (Barany, 1996). A presença de endotélio é imprescindível para ação relaxante vascular de vários agentes como a acetilcolina, ATP, serotonina, histamina, entre outros. Em processos hipertensivos, uma disfunção no sistema endotelial advém da dificuldade na libertação dos fatores relaxante e contrátil derivado do endotélio (Verde, Orallo, & Gil-Longo, 2010). Um desequilíbrio no balanço entre vasopressores e vasodepressores tem sido identificado em várias doenças cardiovasculares, incluindo a HTA arterial, a aterosclerose e a diabetes (Vanhoutte, 1989) e *stress* oxidativo (Chiu & Chien, 2011) como podemos ver na figura 10.

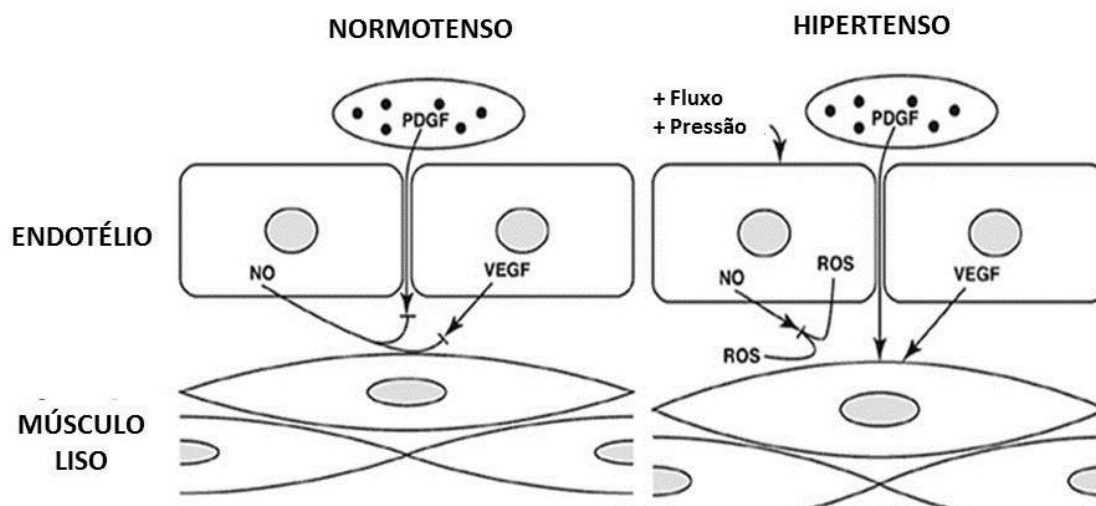


Figura 10 - Efeitos da HTA no endotélio e consequências no músculo liso.

1.4. Mecanismos de remodelação vascular

A hipertrofia cardíaca é uma resposta compensatória/adaptativa à pressão ou um volume exagerado para tentar preservar a função cardíaca. Há uma forte ligação entre um processo hipertrófico prolongado e a falha cardíaca (Ding et al., 1999; Hannigan, 2007). A remodelação vascular descreve uma variedade de modificações na estrutura vascular, incluindo a hipertrofia. Na hipertrofia, a remodelação ocorre com a diminuição no diâmetro do lúmen, associado com um aumento da parede do vaso e uma divisão e alargamento celular (Giles, 1997). A hipertrofia do VE e o aumento da massa do coração ocorrem frequentemente na HTA e na doença coronária arterial. Estas mudanças podem ser revertidas através da remodelação

ventricular que permite ao coração adaptar-se a mudanças hemodinâmicas mas acaba, por comprometer a estrutura ventricular e função diastólica (Kushwaha et al., 2008). O objetivo da terapia antihipertensiva é diminuir a PA e intervir nestes fatores patofisiológicos que promovem a hipertrofia e a disfunção diastólica do VE (Kosaka, 2009). A HTA crônica aumenta a peroxidação lipídica na parede do vaso. As espécies reativas de oxigênio reduzem a presença de NO com as consequências esperadas. Apesar das VSMCs terem um baixo ritmo de proliferação na parede vascular, em estados patológicos, elas podem perder o seu estado de diferenciação e proliferação e contribuir para a remodelação vascular como na aterosclerose e HTA (Cribbs, 2006).

1.5. Artérias

As artérias são geralmente constituídas por três túnicas que se distinguem pela sua diferente morfologia como se observa na figura 11. A camada interna é designada de túnica íntima, constituída por células endoteliais e controla a permeabilidade e tónus vascular. A camada intermédia é designada de túnica média constituída pelas células do músculo liso (SMC) e constituintes da matriz extracelular (proteoglicanos e fibras). As SMC são responsáveis pela contratilidade das artérias. A túnica média é mais proeminente nas artérias e pouco distinta nas veias (Izzo & Black, 2003; Kaplan, 2012). Por último, a camada externa é designada de túnica adventícia. A túnica adventícia é constituída por fibroblastos, colagénio e elastina, sendo o colagénio uma proteína mecanicamente rígida que serve tipicamente para limitar o raio de distensão dos vasos a grandes fluxos (Gosline et al., 2002). Os fibroblastos são normalmente definidos como células de origem mesenquimais que produzem uma variedade de componentes da matriz extracelular, incluindo vários tipos de colagénio assim como fibronectinas (Souders et al., 2009). A principal função da elastina é fornecer a elasticidade e subsequente distensão/contração das artérias, fazendo que estas se contraíam/distendam para fornecer um pulso ao fluxo sanguíneo (Dobrin, 1978; Ferguson and Dodson, 2009; Gosline et al., 2002; Lu et al., 2004).

A importância e a complexidade destas três túnicas dependem do tipo de artéria. O sistema arterial possui artérias de grande calibre (1-2,5 cm), de médio calibre (0,1-1 cm) e arteríolas (menores de 0,1 cm). As artérias elásticas, de maior diâmetro, como a aorta e as artérias pulmonares, têm uma grande capacidade de expansão. Graças a este mecanismo, o sangue que sai do coração com grande turbulência transforma-se num fluxo contínuo que chega a todo o organismo. A parede rica em tecido elástico, permite a dilatação ou expansão das artérias de forma eficiente, não provocando ao seu rompimento após alguns ciclos cardíacos (Kaplan, 2012).

As artérias musculares são vasos de diâmetro mediano, distribuídos por todo o organismo, e contam com uma grande proporção de fibras musculares dispostas de forma concêntrica. As

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

arteríolas são as artérias de menor diâmetro, um pouco como as ramificações finais da rede arterial, que imediatamente se transformam em capilares. Relativamente às arteríolas pode-se referir que estas apresentam uma ou duas camadas de células musculares lisas. Estas recebem um fluxo sanguíneo elevado que provém das artérias do qual, cerca de 80% de fluxo que recebem é excessivo para a sua capacidade, o que faz com que sejam consideradas parte da resistência vascular. A sua principal função é a regulação da hemodinâmica, contribuindo para o controlo da pressão sanguínea e distribuição do sangue por cada região (Martinez-Lemus, 2011).

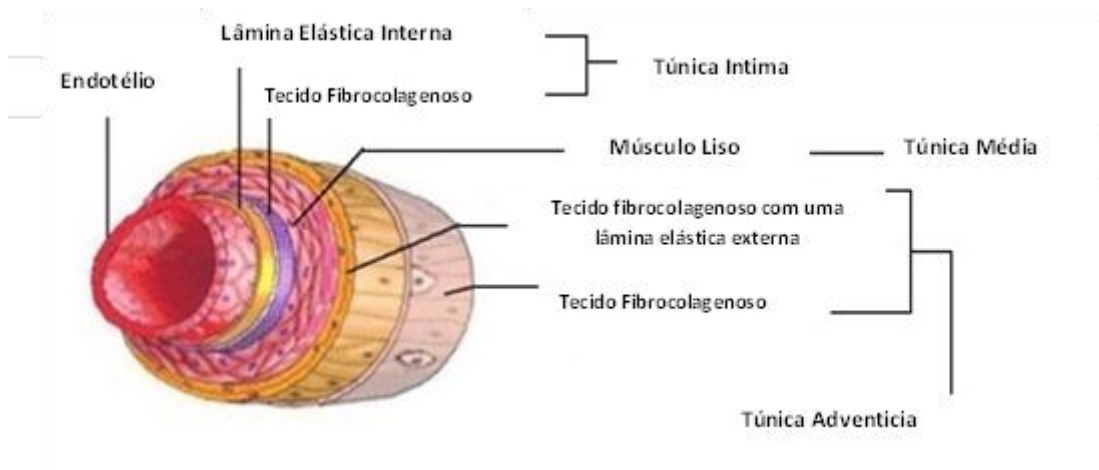


Figura 11 - Constituição das artérias dos vasos sanguíneos humanos.

A classificação do sistema venoso é similar ao descrito para o arterial; assim, este sistema possui vénulas e veias de grande e médio calibre. Na circulação sistémica, o sistema venoso tem como função recolher o sangue dos órgãos e transportá-lo para o coração. Este sistema funciona a pressões baixas já que estes vasos expandem-se para recolher o sangue.

1.6. Disfunção renal e a hipertensão

A incidência de doença renal terminal está a aumentar no Mundo inteiro, o que determina um grande encargo a nível económico para os Países. Na última década, a população em diálise tem aumentado num ritmo constante de 7% ao ano. Atualmente, aproximadamente um milhão de pessoas encontram-se em hemodiálise, transplantação ou farmacoterapia, número que irá duplicar em dez anos (Chaaya et al., 2011; Chen et al., 2008; Gagliardini & Benigni, 2006).

O rim desempenha processos essenciais à manutenção da vida e participa da manutenção da composição do meio extracelular necessária para o funcionamento celular. Esta é obtida pela excreção de produtos do metabolismo, regulação da concentração de eletrólitos, como sódio, potássio, hidrogénio, por meio da filtração glomerular, secreção e reabsorção tubulares e manutenção da volémia mediante a regulação da concentração urinária (Malyszko, 2010).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

A fisiologia renal é um processo muito complexo, que começa com a filtração e vai até a formação final da urina. Em cada minuto o rim recebe entre 1.200 a 1.500 ml de sangue (os quais são filtrados pelos glomérulos) e geram 180 ml/minuto de um fluido praticamente livre de células e proteínas. Os túbulos proximal e distal, a ansa de Henle e o ducto coletor encarregam-se de garantir o equilíbrio homeostático, regulado por uma série de hormonas, destacando-se o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a hormona antidiurética (ADH), além de outras substâncias, como o NO (Higgins, 2004).

Uma função renal reduzida está associada com uma alta taxa de mortalidade em doentes hipertensivos e caracteriza-se por um aumento na creatinina sérica acima dos 2mg/dl assim como alterações na *clearance* e/ou na presença de albumina ou de outras proteínas na excreção urinária. A creatinina é um derivado de aminoácido com 113-Da oriunda do metabolismo muscular e da ingestão de carne, formada no músculo a partir de uma reação não enzimática da creatina e fosfocreatina (Leoncini et al., 2004; Luis, 2007). A fibrose intersticial renal, ou seja, a acumulação anormal de proteínas da matriz extracelular no interstício renal é um fator determinante na progressão de várias doenças do foro renal, envolvendo diretamente níveis fisiológicos de TGF- β alterados (Gagliardini & Benigni, 2006; Wang, 2010).

A proteinúria é reconhecida como um importante fator de risco cardiovascular e pode ser um indicador de dano terminal nos órgãos. Altos níveis de proteínas na urina estão associados com um progresso avançado da doença (Gagliardini & Benigni, 2006). Estas variações são exacerbadas pelas modificações patológicas na PA e na arquitetura renal (Price, 2005).

O rim e a PA elevada encontram-se intimamente relacionados. Uma capacidade deficiente em lidar com os níveis de sódio ingeridos resulta em desregulações renais ou uma resposta inadequada do órgão a um mecanismo externo, levando ao processo hipertensivo. Além disto, a excessiva vasoconstrição renal é uma característica nos estágios iniciais da HTA. Em estágios mais avançados, a resistência vascular renal encontra-se permanentemente elevada devido a lesões estruturais nos vasos renais (Ruilope, 2001). A persistência de níveis de PA elevados determina alterações estruturais progressivas nas artérias e arteríolas renais, com hipertrofia da camada muscular, duplicação da lâmina elástica interna e espessamento da camada íntima, algumas vezes com deposição de material hialino subintimal. Em virtude do estreitamento das arteríolas renais aferentes e eferentes, ocorrem danos glomerulares e tubulointersticiais (Luis, 2007; Reis, 2010).

1.7. Músculo Liso

O tecido muscular liso é um constituinte de diferentes estruturas do corpo humano, como por exemplo, paredes do tubo digestivo, vias respiratórias, artérias, veias e grandes vasos linfáticos (Karakı et al., 1997). Embora se possa generalizar, cada órgão possui um tipo de

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

músculo liso específico (Gabbiani et al., 1981; Webb, 2003). A classificação mais funcional é a dicotomia fásico/tônico. O fásico é característico do sistema gastrointestinal e urogenital devido à atividade rítmica contrátil. O tônico é característico das artérias e veias de grande porte e encontra-se permanentemente contraído (Karaki et al., 1997).

O músculo liso vascular é uma estrutura altamente especializada tendo como principais funções a contração e regulação do tônus vascular, pressão sanguínea e fluxo sanguíneo (Yoshida & Owens, 2005). As células responsáveis pela contratilidade são as células musculares lisas (SMC) que possuem proteínas contráteis, canais iônicos e outros elementos (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007; Rzedzido et al., 2007; Shi and Tarbell, 2011; Wagenseil and Mecham, 2009).

O uso destas células é essencial para o estudo de várias vias de sinalização, como por exemplo, o metabolismo do cálcio e reatividade vascular (Cairrão, 2009).

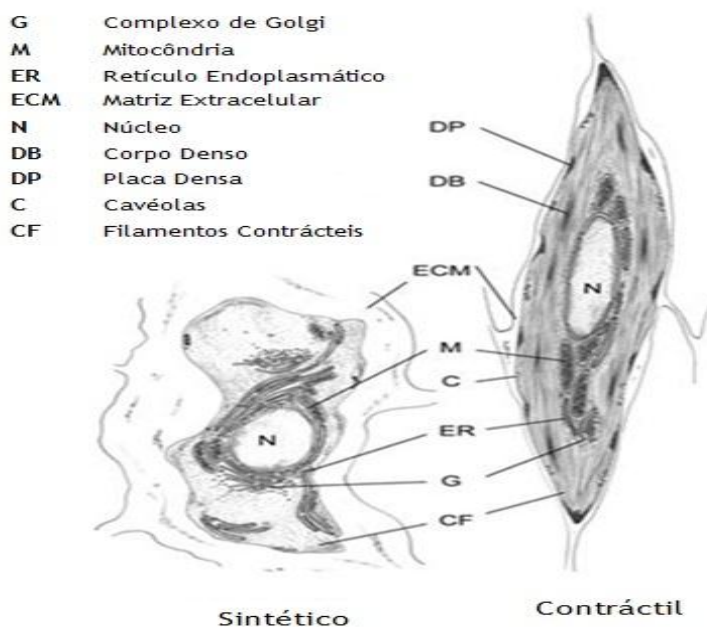


Figura 12 - Características ultraestruturais das células do músculo liso Adaptado (Rensen, Doevendans et al. 2007).

As SMC das artérias podem apresentar múltiplos fenótipos e por isso uma elevada heterogeneidade que vão desde o contrátil até ao sintético. Quando se realizam culturas, a presença de fatores de crescimento leva a um aumento de células com fenótipo sintético, com grande número de organelos para síntese proteica e elevada taxa de crescimento como se observa na figura 12.

Contrariamente, células com fenótipo contrátil apresentam reduzida atividade sintética e proliferativa apresentando proteínas implicadas na regulação da contração vascular, canais iônicos e enzimas (Rensen et al., 2007; Yoshida & Owens, 2005). Assim, a identificação dos fenótipos ocorre com a análise de presença/expressão de algumas proteínas assim como pela morfologia celular, sendo o fenótipo contrátil mais alongado e o sintético com maior semelhança com células endoteliais (Gabbiani et al., 1981; Webb, 2003).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Em resposta a lesão arterial, as SMC passam do estado quiescente e contrátil para proliferativo e sintético. Esta mudança de fenótipo leva a um aumento de componentes da matriz extracelular (ECM), proliferação e migração das SMC (cruciais na resposta à lesão) que leva à redução do fluxo sanguíneo (Daniel and Sedding, 2011). A variabilidade fenotípica assim como a elevada taxa de proliferação, migração e capacidade sintética são essenciais na reparação vascular (Owens et al., 2004).

O citoesqueleto é constituído por microfilamentos (actina), microtúbulos e filamentos intermédios, sendo grande mediador das propriedades mecânicas da célula (Nakamura et al., 2000). Canais e outros transportadores iónicos estão integrados na membrana plasmática e ligados, principalmente, aos filamentos de actina (Nakamura et al., 2000). A proteína mais abundante ao nível das células é a actina que existe sob a forma solúvel ou filamentosa. A actina filamentosa apresenta-se numa estrutura polimérica assimétrica bilobada de cerca de 42-kDa de monómeros organizados numa dupla estrutura helical. Nas SMC, os filamentos de actina encontram-se na membrana através de um complexo de proteínas de adesão associado às cadeias citoplasmáticas das integrinas, enquanto o citoesqueleto se liga à matriz extracelular (Gunst & Zhang, 2008).

1.8. Regulação da Contratilidade do Músculo liso Vascular

Sydney Ringer (Ringer, 1883) ficaria surpreendido com as implicações da sua simples experiência há 120 anos demonstrando que o músculo cardíaco não batia na ausência de Ca^{2+} . Este papel do Ca^{2+} influenciou a investigação e conhecimento sobre a função cardíaca normal, mas também o progresso de falência cardíaca como em casos de hipertrofia, HTA e morte súbita por doença cardiovascular (Bodi, 2005; Hill-eubanks et al., 2012).

O Ca^{2+} é um determinante crítico do paradigma estímulo-resposta, incluindo excitação-contracção e estímulo-secreção, ativação de genes e morte celular, servindo como um segundo mensageiro e como transportador de corrente (Cribbs, 2006; Martonosi & Pikula, 2003; Orallo, 1996). A desregulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular pode levar a processos patológicos ao nível do tecido e da célula (Orallo, 1996; T. Zhang, 2004). Normalmente, dentro da célula, o Ca^{2+} está armazenado na mitocôndria e/ou no retículo endoplasmático. O retículo sarcoplasmático (SR) tem um papel de relevo na regulação da concentração do Ca^{2+} intracelular como ativador, assim como tampão desta mesma ativação pelo Ca^{2+} nas VSMCs. O SR contém dois tipos de canais de libertação de Ca^{2+} , não dependentes de voltagem, sendo eles os sensíveis ao IP3 e os sensíveis à rianodina que se encontram colocalizados na membrana do retículo (Akata, 2007). A maioria do Ca^{2+} extracelular existe não na forma iónica mas sim ligado através de interacções iónicas na superfície celular (Loutzenhiser & van Breemen, 1983). Por exemplo, os grupos carboxilo do ácido siálico na camada glicoproteica

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

exterior servem de sítios de ligação ao Ca^{2+} com baixa ou alta afinidade levando ao seu influxo (H Karaki & Weiss, 1979).

A contração das SMC é controlada pelo sistema nervoso autónomo, sistema hormonal e ação parácrina, dependendo da modificação da concentração intracelular de Ca^{2+} (Ledoux et al., 2006). Durante a excitação, a concentração intracelular de Ca^{2+} eleva-se, tanto pela entrada de iões pela membrana plasmática ou canais ligados a voltagem, como pela libertação das vesículas intracelulares. Os sensores de Ca^{2+} que controlam a atividade de bombas, enzimas e outros alvos detetam os níveis elevados de Ca^{2+} e controlam o processo de homeostase. Em estado de repouso, existe um gradiente de concentração muito elevado. O Ca^{2+} intracelular é mantido a concentrações extremamente baixas apesar das concentrações plasmáticas nos milimolar. Um só estímulo produz um aumento (10-100 μM) a nível local (~1% do volume da célula), aumentando o nível intracelular até <2nM (Berridge et al, 2003; Jaggar et al., 2000). Os principais mecanismos que controlam o aumento de Ca^{2+} no citosol incluem: canais e transportadores situados na membrana plasmática (ROC, SAC, SOC, VOCC, PMCA e NCX); e na membrana do ER (SERCA, IP3R e RYR) (Berridge et al., 2003).

A miosina é uma proteína assimétrica de grande tamanho que é constituída por seis cadeias polipeptídicas altamente conservadas. Possui duas cadeias pesadas idênticas que formam um dímero e dois pares de cadeias leves diferentes, duas cadeias reguladoras de 20kDa (MLC₂₀) e duas cadeias essenciais de 17 kDa (MLC₁₇) (Cole & Welsh, 2011; Gunst & Zhang, 2008).

Durante a contração muscular, as “cabeças” de miosina formam pontes com os filamentos de actina, originando um complexo químico conhecido como actomiosina (Bootman et al., 2001; Owens, 1995).

No músculo-esquelético, a interação actina-miosina e o ciclo das “pontes cruzadas” começa com a ligação do Ca^{2+} à subunidade C da troponina C dos filamentos delgados. O músculo liso não expressa troponina, mas contém no seu lugar uma grande quantidade de outra proteína reguladora, a calmodulina (CaM). A CaM é uma proteína solúvel de 17 kDa muito abundante no músculo liso, sendo essencial a sua ligação ao Ca^{2+} e interação com uma população heterogénea de proteínas alvo (Saimi & Kung, 2002).

O mecanismo contrátil é ativado pelo recetor de ativação mecânica das proteínas contráteis actina e miosina como se observa na figura 13. Uma mudança de potencial de membrana ou através de canais iónicos na membrana plasmática também podem ativar a contração das células (Hilgers, 2005). O mecanismo inicia-se pela ligação do Ca^{2+} à CaM e pela formação do complexo Ca^{2+} -CaM (Ca-CaM) (Morgado & Cairrao, 2011). O complexo 4Ca^{2+} -CaM liga-se e ativa a proteína cinase das cadeias leves da miosina (MLCK). A MLCK é uma proteína cinase de serina/treonina, da qual se conhecem três isoformas, a MLCK curta com um peso molecular de 140 kDa, e duas MLCK de elevado peso molecular, uma de forma embrionária expressa em células sem atividade muscular e uma forma expressa nas células endoteliais (Arner & Pfitzer, 1999).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

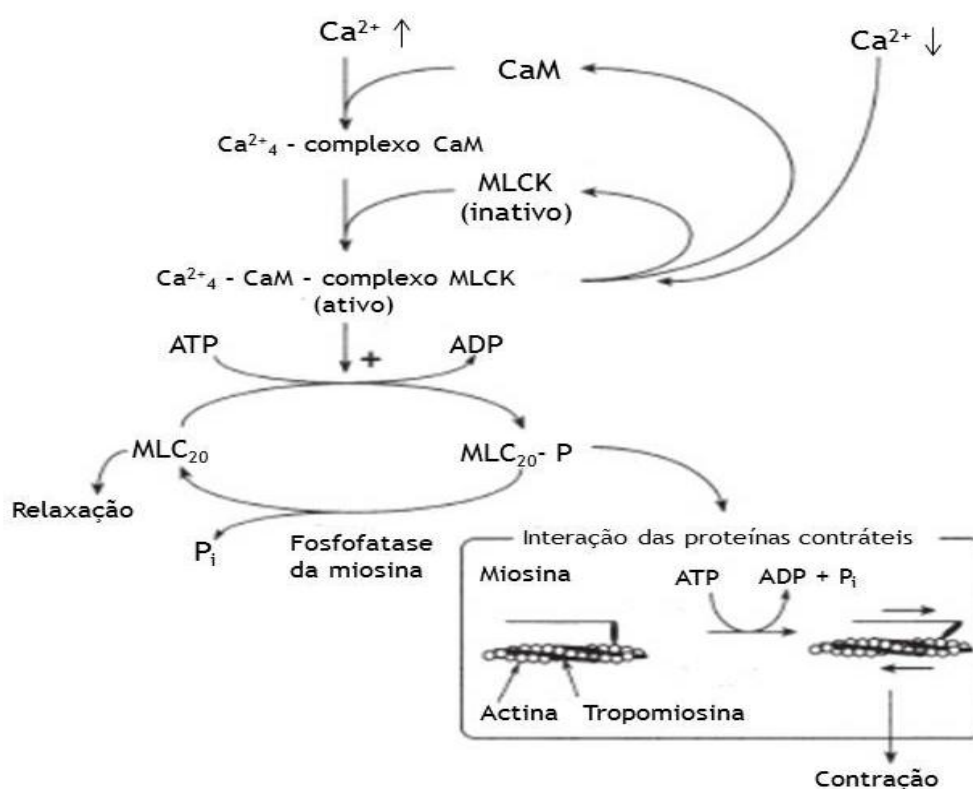


Figura 13 - Papel do cálcio na regulação do estado contráctil das células vasculares do músculo liso. Abreviaturas: setas para cima = aumento; setas para baixo = diminuição; sinal+= estimulação; ADP adenosina 5'-difosfato; CaM= calmodulina; MLCK= cadeia leve da cinase da miosina; MLC_{20} =20kd cadeia leve da miosina (reguladora); $MLC_{20}-P$ = MLC_{20} fosforilado; P_i = fosfato inorgânico. Adaptado de (Akata, 2007).

O complexo Ca-CaM-MLCK fosforila a MLC_{20} , permitindo à miosina adenosina trifosfatase ser ativada pela actina, ocorrendo contração do músculo liso vascular (Akata, 2007; Somlyo & Somlyo, 1994). Por outro lado, quando a concentração de Ca^{2+} cai para níveis inferiores a $1\mu M$, o complexo Ca^{2+} -calmodulina fica dissociado e inativa a cinase (Akata, 2007). A desfosforilação da MLC_{20} realizada pela fosfatase das cadeias leves da miosina (MLCP) conduz à desativação do mecanismo contráctil (Arner & Pfitzer, 1999).

O ciclo de pontes cruzadas de actomiosina é reconhecido como o mecanismo fundamental para o desenvolvimento de uma tensão que leva ao encurtamento de todas as formas do músculo, assim como na contração das células não musculares (Gunst and Zhang, 2008).

A ativação da miosina por um estímulo contráctil permite que os filamentos de miosina deslizem pelos filamentos de actina através da atividade ATPase da cabeça da miosina resultando num encurtamento (contração) ou num gerar de tensão pelas células.

As duas principais fontes de Ca^{2+} usadas na sinalização celular são: (i) a sua libertação a partir dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático (transiente e rápido) e (ii) a sua entrada através da membrana plasmática (Santos-Silva, 2010) como observado figura 14.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Em resposta a um estímulo vasoconstritor, um aumento no Ca^{2+} intracelular acontece devido à abertura dos canais na membrana plasmática permitindo o influxo de Ca^{2+} ou através da libertação das reservas como as existentes no retículo sarcoplasmático (Morgado & Cairrao, 2011).

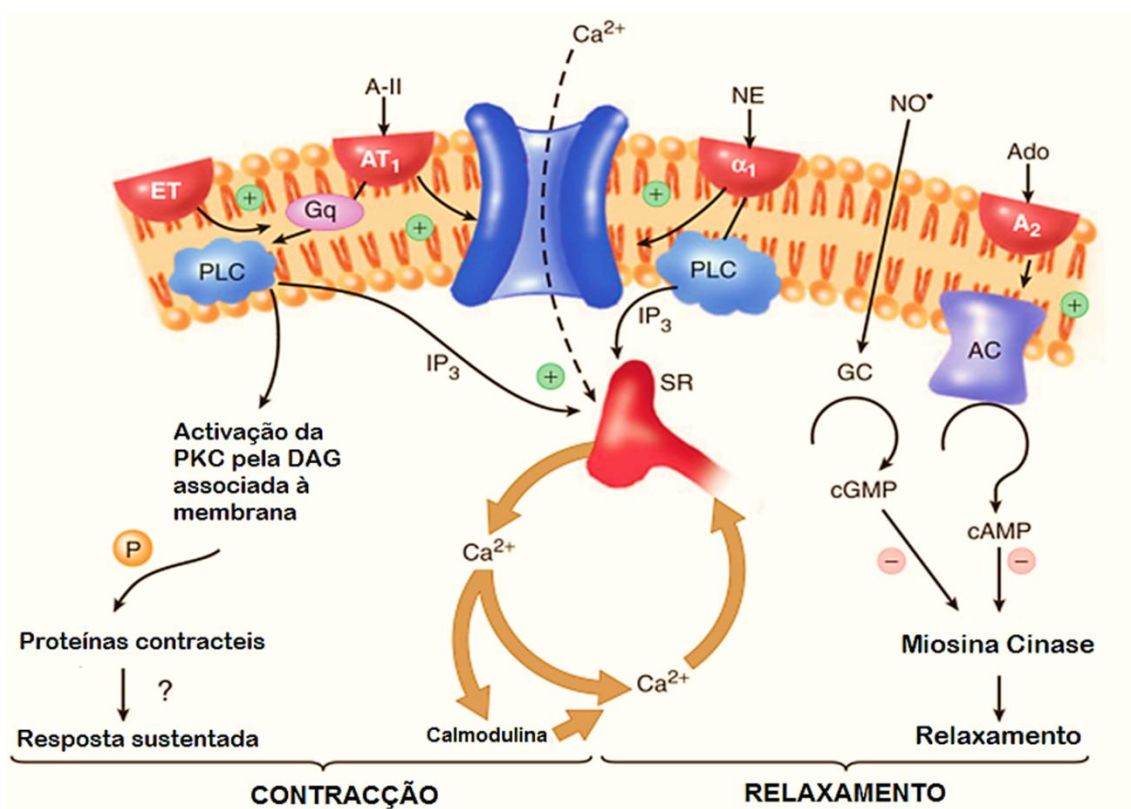


Figura 14 - Modelo de contração e relaxamento no músculo vascular. (Adaptado de Opie LH: Heart Physiology: From Cell to Circulation. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004. © LH Opie, 2004.)

Em resposta a um estímulo vasodilatador ou remoção do estímulo vasoconstritor, a concentração citosólica de Ca^{2+} diminui, principalmente devido à extrusão plasmática de Ca^{2+} e/ou a absorção de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, levando à inativação da MLCK e, por conseguinte, ao relaxamento (Morgado & Cairrao, 2011).

A ligação agonista de vasoconstritores como a norepinefrina ou a angiotensina II à proteína G estimula a atividade da fosfolipase C, resultando na produção de DAG e PIP_2 . A ligação deste último a receptores no retículo resulta na libertação controlada de Ca^{2+} para o citosol, sendo uma entrada também mediada por canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. A abertura dos canais dependentes da voltagem ocorre em resposta a mudanças no potencial de membrana e a cascatas de sinalização mediadas intracelularmente pelo DAG. O movimento pelos canais ocorre de 6 tipos diferentes, sendo os tipos L e T essenciais para alterações cardiovasculares (Bodi et al., 2005; Cribbs, 2006b; Pintérová et al., 2009).

Uma característica relevante dos bloqueadores dos canais de Ca^{2+} é a sua capacidade seletiva de inibição do fluxo de iões Ca^{2+} . Os bloqueadores específicos dos canais de cálcio tipo-L demonstraram-se eficientes no controlo da PA, sendo toleráveis com poucos efeitos

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

secundários Esta redução na PA ocorre pela redução da resistência vascular periférica e resultante vasodilatação das artérias coronárias para melhorar a oxigenação do miocárdio (Liao et al., 2005).

Todos os processos envolvidos na vasoconstrição são suportados pela energia fornecida pela fosforilação oxidativa e pela glicólise aeróbia. A fosforilação oxidativa fornece ATP principalmente a elementos contráteis, sendo que a glicólise aeróbia fornece energia às bombas de iões membranares (Karaki et al., 1997).

A proteína G de baixo peso molecular, RhoA, e o seu alvo Rho-cinase, têm um papel direto na regulação da MLC fosfatase (Martin-Martin et al., 2012). A Rho-cinase, uma cinase de serina/trionina, fosforila a subunidade de ligação à miosina inibindo a sua atividade e promovendo o estado de fosforilação. Isto é importante pois a adesão celular à matriz extracelular resulta da ativação da Rho (K. Lee et al., 2012). Em vários estudos, Y-27632, um inibidor seletivo da Rho-cinase, induz relaxamento de vasos contráteis e diminui a PA em ratos hipertensivos mas não normotensos. Assim, podemos dizer que a Rho-cinase contribui para uma resistência periférica elevada na HTA essencial (Asano & Nomura, 2003).

A MLC cinase e a MLC fosfatase são reguladas por outros fatores. A proteína cinase II dependente da calmodulina diminui a sensibilidade da cinase ao Ca^{2+} , promovendo a vasodilatação. Independente da MLC, múltiplas proteínas como a caldesmona e calponina modelam a actina influenciando a ligação.

O mecanismo de vasodilatação ocorre como resultado da diminuição do Ca^{2+} intracelular e a atividade aumentada da MLC fosfatase (Hirano K, 2004). Vários mecanismos envolvendo o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática estão implicados na remoção do Ca^{2+} citosólico. A absorção de Ca^{2+} no SR é concomitante com a hidrólise do ATP e é dependente do ATP e Mg^{2+} . Esta Ca, Mg-ATPase, quando fosforilada, liga 2 Ca^{2+} e são translocados para o lúmen do SR e depois libertado. Mg^{2+} liga-se ao lado catalítico do Ca,Mg-ATPase para mediar a reação. A membrana plasmática também contém Ca,MgATPases que ajudam à remoção de Ca^{2+} da célula. Estas enzimas diferem das proteínas do SR pois possuem um domínio autoinibitório que se pode ligar à calmodulina e estimular a bomba de cálcio na membrana. As bombas de extrusão de Ca^{2+} localizadas na membrana plasmática ajudam no decréscimo do Ca^{2+} intracelular.

1.9. Potencial de Membrana

No geral, a contração do músculo liso arterial deve-se a um aumento na concentração de Ca^{2+} , podendo este aumento ocorrer pela ativação induzida por agonistas de recetores específicos e pela despolarização da membrana.

Devido às diferentes concentrações dos iões no meio intracelular e extracelular, as SMC têm um potencial de membrana em repouso que, dependendo do vaso sanguíneo, varia entre -40 e -60 mV. Estas variações levam à contração e ao relaxamento das SMC vasculares devido à

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

ativação de canais dependentes de voltagem (VOCC) o que faz com que a concentração intracelular de iões oscile (Jackson, 2000).

Os canais de potássio regulam o potencial da membrana nas SMC vasculares. A abertura dos canais de K^+ nas SMC vasculares provoca um aumento da saída de iões do meio intracelular para o meio extracelular, o que pode causar hiperpolarização/repolarização da membrana celular. Estes mecanismos encerram os VOCC, com conseqüente diminuição da entrada de iões de Ca^{2+} para o interior da célula, provocando assim o relaxamento vascular (vasodilatação). Inversamente, o encerramento dos canais do K^+ pode causar despolarização, abertura dos VOCC, aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e vasoconstrição (Ghatta, 2006; Zhang et al., 2012). Como foi referido anteriormente, quatro tipos de canais de potássio foram identificados como reguladores do potencial de membrana nas SMC vasculares. Os canais K_v regulam o potencial de membrana em resposta à despolarização da membrana. Os canais K_{Ca} respondem a alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular e parecem ter um papel fundamental na regulação do tónus das artérias de maior resistência, auxiliando na regulação da resposta arterial à pressão e aos vasoconstritores. Os canais K_{IR} parecem mediar a vasodilatação provocada pelo K^+ extracelular, sendo ativados por hiperpolarização, permitindo assim o influxo de iões K^+ (Jackson, 2000). Os canais K_{ATP} constituem o alvo de numerosos estímulos vasodilatadores (Jackson, 2000).

Na membrana plasmática, a distribuição dos canais iónicos não é homogénea, existindo *clusters* de canais essenciais para o desenvolvimento das respostas fisiológicas. Nas SMC, a abertura dos RYR localizados em zonas do ER próximas da membrana plasmática provoca a libertação muito rápida e breve de Ca^{2+} , alterando significativamente a concentração no microdomínio mas não a concentração global intracelular deste ião (McCarron et al., 2006). Esta libertação pode ser responsável pela contração do músculo liso vascular mas pode ter o efeito inverso (McCarron et al., 2006). Quando a concentração inicial de Ca^{2+} atinge no microdomínio valores de aproximadamente de 1 μM , ocorre uma profunda alteração no potencial de membrana nesta zona, despolarizando-a. Assim, ocorre a abertura dos VOCC do tipo L do microdomínio e provoca um grande aumento na concentração de Ca^{2+} , proveniente do meio extracelular, dando origem às *calcium sparks*. Por outro lado, existem os picos de Ca^{2+} que são pequenas quantidades de Ca^{2+} libertadas pelo SR, espontaneamente e localmente, na ausência da abertura dos canais de Ca^{2+} tipo-L. A quantidade libertada é muito reduzida o que não provoca a ativação dos canais de cálcio na vizinhança e assim o processo contrátil não é iniciado. Quando os canais de Ca^{2+} dos túbulos T se encontram abertos, várias centenas de picos de Ca^{2+} podem combinar-se para formar uma onda despolarizante iniciadora da contração. Em patologias diversas, quando o SR se encontra sobrecarregado, estes picos podem conduzir a despolarizações, sendo o risco de arritmia e o processo contrátil anormal bastante elevado. A libertação prolongada de Ca^{2+} intracelular nos reservatórios leva ao seu esgotamento. Isto é ultrapassado pela entrada de Ca^{2+} extracelular, através da membrana citoplasmática, por canais catiónicos denominados SOCs (“Store Operated Channels”), que permitem reencher os reservatórios de Ca^{2+} (Jaggard et al., 2000).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Quando a concentração de Ca^{2+} nos microdomínios atinge valores mais elevados (figura 15), na ordem dos $10 \mu\text{M}$, ocorre a ativação de correntes de saída espontânea através da estimulação dos canais de K_{Ca} . Nesta situação, são ativados os K_{Ca} , provocando hiperpolarização da membrana, encerramento dos VOCC do tipo L e vasodilatação (Er et al., 2007; Jaggar et al., 2000; Zamponi, 2003).

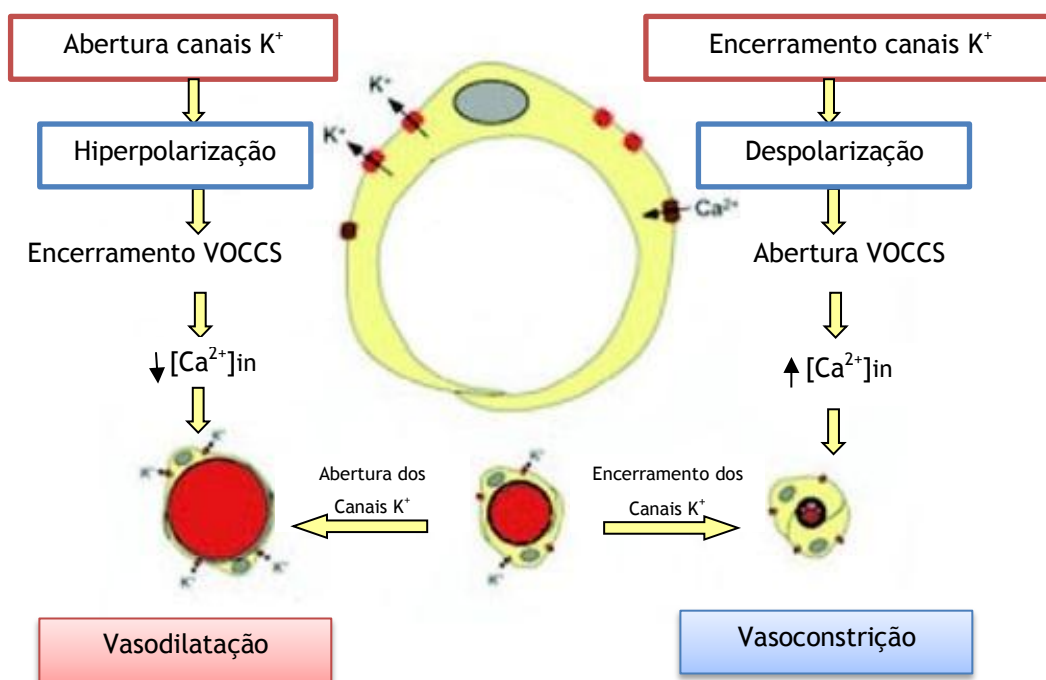


Figura 15 - Diagrama esquemático de uma célula do músculo liso arteriolar com canais de potássio abertos ou fechados. Adaptado de (Jackson, 2005).

As VSMCs são altamente especializadas e expressam uma variedade de proteínas contráteis, canais iónicos e moléculas de sinalização que regulam a contração. A atividade contrátil resulta da interação entre Ca^{2+} e calmodulina para estimular a fosforilação da cadeia leve da miosina. Esta sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} é modelada pelo sistema de sinalização RhoA/Rho-cinase (Hilgers et al., 2005).

As células mantêm um balanço homeostático que necessita de uma regulação do volume e do pH intracelular. Os mecanismos de controlo do volume celular são ainda desconhecidos mas as possibilidades incluem modificações nas concentrações dos eletrólitos citoplasmáticos, mudanças conformacionais na célula e alterações nas cinases que regulam a forma, como as Rho-cinases e a MLC. A regulação do volume é naturalmente importante nas VSMCs; estas não só mudam rapidamente de volume durante as contrações mas também modificam lentamente o seu volume durante casos de hipertrofia. As modificações na forma das células acontecem por mudanças no citoesqueleto, principalmente envolvendo a actina, ou pelas forças geradas pela rede actinmiosina (Cinnamon et al., 2009).

1.10. Mecanismo de ação dos vários mensageiros

Diversos estímulos externos provocam respostas fisiológicas nas SMC, devido à existência de recetores e de mecanismos intracelulares de transdução do sinal, nos quais podem participar diferentes mensageiros químicos extracelulares e intracelulares. A superfamília dos recetores associados às proteínas G heterotriméricas possui vários recetores para muitas hormonas, neurotransmissores e neuromodeladores com importantes funções fisiológicas (Kristiansen, 2004).

Todas as proteínas G heterotriméricas seguem o mesmo principal ciclo de ativação/inativação permitindo uma reversível transmissão específica do sinal dentro das células (Cabrera-Vera et al., 2003). Quando o GDP se liga à subunidade α , o complexo associado com as subunidades $\beta\gamma$ para formar um heterotrimerio inativo. Quando se liga um agonista o recetor torna-se ativado e sofre uma mudança conformacional resultado numa maior afinidade para a proteína G. Este por sua vez permite uma libertação rápida da GDP do local de ligação na subunidade α . Em condições fisiológicas o GDP é substituído por uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP) cuja concentração excede a do GDP.

A mudança leva a uma redução na afinidade da subunidade α para a o complexo $\beta\gamma$ levando à dissociação do heterotrimerio. Estas subunidades dissociadas podem ativar várias proteínas efetoras, entre as quais canais iónicos, vias de sinalização das proteínas cinase e cinases de tirosina.

O estado ativado da subunidade α dura até a mesma hidrolisar o GTP em GDP pela sua atividade intrínseca de GTPase, voltando depois à sua conformação inicial inativa, assim como a sua afinidade pelo dímero $\beta\gamma$, formando de novo o complexo inicial (Kristiansen, 2004).

O aumento do Ca^{2+} intracelular é um passo essencial para aumentar a atividade contrátil das VSMCs. A proteína G estimula a fosfolipase C beta (PLCB) que vai catalisar um lípido de membrana, o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em dois importantes segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) como se observa na figura 16.

A ligação do IP_3 ao seu recetor específico (IP_3R) no reticulo sarcoplasmático induz a libertação de Ca^{2+} , que por sua vez vai ativar as proteínas contráteis e iniciar a contração. A PKC, que fosforila múltiplas proteínas envolvidas na sinalização das SMC vasculares, vai inibir a fosfatase da miosina, que não é desfosforilada, na cadeia leve da miosina, levando à contração.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

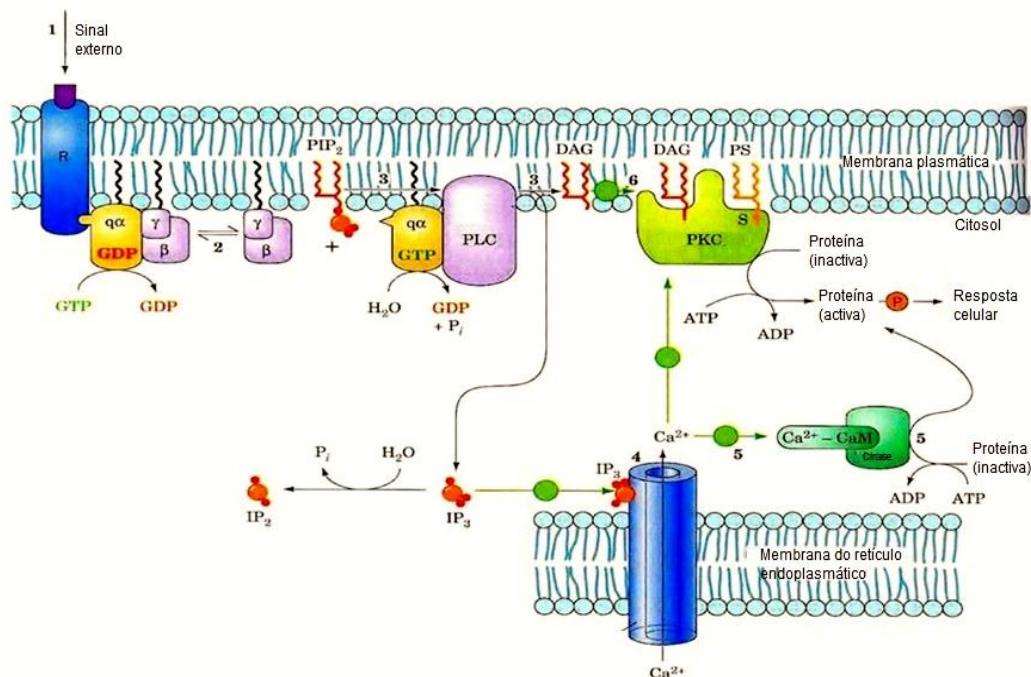


Figura 16 - Ativação da proteína G acoplada ao recetor e que resulta numa quebra do PIP₂ mediada pela PLC. R, recetor; GDP, guanósina-5'-difosfato; GTP, guanósina-5'-trifosfato; PLC, fosfolipase C; PIP₂, fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; proteína G, guanósina-5'-trifosfato ligada a proteína; IP₃, inositol 1, 4, 5-trifosfato; DG, 1,2-diacilglicerol. Adaptado de (Akata, 2007).

Esta cinase possui outros alvos como o recetor no retículo sarcoplasmático, o recetor de rianodina (RyR). Os RyR formam uma classe de canais de Ca²⁺ intracelulares encontrados em várias formas de tecido animal excitável, como músculos e neurónios. São importantes mediadores da libertação de Ca²⁺ induzida pelo próprio ião em células animais (Bastin and Heximer, 2011). Agonistas como noradrenalina, angiotensina II, ATP, serotonina e endotelina provocam uma contração via recetores acoplados a fosfolipase C.

Outra via é a entrada do Ca²⁺ pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCC), que vai provocar um aumento do Ca²⁺ intracelular, levando à formação do complexo Ca²⁺ calmodulina. Este complexo leva à contração das cadeias de actina e miosina levando assim à contração do músculo (Akata, 2007; Webb, 2003).

A calponina é uma proteína ligante a Ca²⁺ que inibe a atividade ATPásica da miosina na musculatura lisa. A sua fosforilação liberta a inibição da ATPase do músculo liso (Gunst & Zhang, 2008). A caldesmona liga-se à actina e à calmodulina, provocando inibição da interação actina-miosina por competição com a cabeça de miosina. Esta inibição é revertida aquando da fosforilação da caldesmona.

A contração necessita de ser sustentada para permitir que o tónus vascular tenha efeito na regulação da PA. Deste modo, a contração vascular é do tipo tónico e pode ser explicada pelo mecanismo de formação das *latchbridges*. Após a ligação inicial da miosina com a actina, estas proteínas mantêm-se unidas e só relaxam após novo estímulo. Deste modo, a tensão inicial requer cerca do dobro do nível de Ca²⁺ citosólico do necessário para manter a tensão

subsequente. À medida que aumenta a concentração do catião, liga-se, na razão de 4/1, à proteína calmodulina, cooperativamente.

As células musculares lisas vasculares possuem dois tipos de canais do Ca^{2+} sujeitos a diferentes estímulos. Os VOCC operam em resposta à estimulação adrenérgica, à despolarização induzida pelo potássio e à automaticidade espontânea. Os canais de cálcio dependentes de recetores (ROC) respondem à estimulação dos recetores da endotelina, da angiotensina II, por exemplo.

1.11. Canais de Cálcio

No coração humano em condições de repouso, o tempo necessário para ocorrer despolarização, libertação de Ca^{2+} , relaxamento e recuperação é de 600 ms. Este processo ocorre aproximadamente 70 vezes por minuto e mais de 2 mil milhões de vezes no tempo de vida médio de um adulto. O Ca^{2+} é necessário para a manutenção da integridade celular e expressão génica assim como o crescimento e desenvolvimento do coração no estado embrionário.

As células estão delimitadas por uma membrana impermeável contendo proteínas especializadas para troca de átomos ou moléculas entre o meio intra e extracelular. Os transportadores, como as bombas de Ca^{2+} , as bombas de sódio-potássio e o permutador sódio-cálcio, transportam iões contra gradientes de concentração e/ou elétricos e acoplados ao consumo energético. A entrada de Ca^{2+} envolve vários tipos de canais de Ca^{2+} , os quais podem ser classificados canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e independentes de voltagem (Lacínova, 2005). Os canais independentes de voltagem incluem canais como: os canais operados por recetores (ROCs) os quais são regulados por interação agonista-recetor; os canais operados por depósitos intracelulares (SOCs) os quais são ativados pela libertação do Ca^{2+} dos depósitos intracelulares; e os canais ativados por *stress* físico (SACs) os quais são ativados por estiramento das membranas das SMC (Guibert et al., 2008).

O canal de Ca^{2+} é parte integrante da complexa estrutura definida como recetor de rianodina que controlam os canais de libertação do catião e, também, funcionam como proteínas *scaffold* regulatórias. Estas proteínas contêm a molécula estabilizadora FKBP-12.6 que responde à fosforilação coordenando a abertura controlada dos canais próximos. O processo de libertação de Ca^{2+} por este complexo induz uma mudança conformacional e influxo de iões. Este aumento leva à contração e termina quando a onda despolarizante passa e mais nenhum ião entra, não existindo mais libertação por parte do retículo sarcoplasmático (SR), para não haver um *overload* indesejável (disfunções no ciclo cardíaco, taquicardias e arritmias). Este *turn-off* deve-se à inativação e resistência dos recetores de rianodina e à depleção do cálcio existente no SR.

Os modelos de excitação/contração descrevem um papel essencial dos canais de cálcio dependentes de voltagem tipo-L. Estes canais são macromoléculas criadoras de poros que

ficam na bicamada lipídica do sarcolema permitindo uma via de alta seletividade para a transferência de íons na célula cardíaca quando os canais passam para o estado ativado. Os canais iônicos têm 2 possíveis estados: permeabilidade e abertura, sendo a despolarização a que permite a ativação. Os canais de cálcio tipo-T estão envolvidos na regulação da proliferação celular. Por seu turno, os canais de cálcio tipo-L regulam o processo contrátil sendo a principal via de entrada de Ca^{2+} (Santos-Silva, 2010).

1.11.1. Canais de Cálcio Dependentes da Voltagem

Os VOCC são membros da superfamília de genes dos canais iónicoproteicos transmembranares que regulam o fluxo de Ca^{2+} em resposta a uma despolarização e processos intracelulares como a contração, secreção, neurotransmissão e expressão génica em vários tipos de células (Catterall et al., 2005; Ledoux et al., 2006). Assim, os VOCC são proteínas membranares que aumentam a entrada de Ca^{2+} durante a despolarização e diminuem-na durante a repolarização.

A sua atividade é essencial para ligar sinais elétricos a eventos fisiológicos na superfície da célula. A abertura do canal é um fenómeno termodinamicamente favorável que ocorre em alguns milissegundos (ms) após a despolarização, enquanto o encerramento ocorre aproximadamente em 1 ms depois da repolarização da membrana (Carafoli, 1994; Zamponi, 2005). A inativação é basicamente o encerramento do canal durante uma despolarização e pode ocorrer por dois mecanismos diferentes, um dependente do Ca^{2+} (rápido) e outro provocado pela despolarização prolongada da membrana (lento). Ocorre principalmente pela entrada de íons Ca^{2+} para a célula, que causam uma modificação para um estado não condutor. Por outro lado, o mecanismo dependente da voltagem é similar para os vários VOCC, e ocorre durante uma despolarização prolongada (Lacinova, 2005; Welling, Technischen, & Str, 2009). Como os VOCCs são ativados perto do potencial de repouso das células do músculo liso podem ter um papel importante no controlo dos processos dependentes do cálcio intracelular como a regulação do tónus vascular (Akaike et al., 1989).

A classificação dos VOCCs é distinta quer eletrofisiologicamente quer farmacologicamente, existindo vários canais: L (tabela 1), N, P/Q, R, I e tipo T. Os canais tipo L são primariamente modulados por fosforilação e os N, P/Q e tR são modulados pelas proteínas G.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Tabela 1 - Funções Fisiológicas e Farmacológicas dos canais de Cálcio Adaptado (Catterall et al., 2005)

Funções Fisiológicas e Farmacológicas dos canais de Cálcio				
Canal	Corrente	Localização	Antagonistas	Funções Celulares
$Ca_v1.1$	L	Músculo-esquelético, túbulos transversos	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Excitação-contração de acoplamento;
$Ca_v1.2$	L	Miócitos cardíacos e do músculo liso, células endócrinas;	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Libertação da hormona; regulação da transcrição, integração sináptica
$Ca_v1.3$	L	Células endócrinas; cardíaca atrial miócitos e células <i>pacemaker</i> ;	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Libertação da hormona;; <i>pacemaker</i> cardíaco; audição;
$Ca_v1.4$	L	Bastonetes da retina e células bipolares, medula espinhal, glândula adrenal; mastócitos	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Libertação de neurotransmissores de fotorreceptores

Vários estudos permitiram observar que alguns canais eram ativados por baixos níveis de despolarização de membrana, próximos do potencial de repouso, enquanto outros eram ativados por valores de voltagem elevados (Lacinova, 2005). Segundo este critério, os canais de Ca^{2+} foram divididos em dois grandes grupos: canais de “baixo limiar” e de “elevado limiar”. Os canais de baixo limiar (-50mV) são os canais do tipo T (do inglês “tiny” e “transiente”) devido à sua baixa condutância e ao seu encerramento rápido (Triggle, 1998). Os canais do tipo T parecem desempenhar um papel primordial em várias funções fisiológicas, como na proliferação celular e no ciclo celular das SMC vasculares (Cribbs, 2006). São ativados por níveis de despolarização da membrana próximos do potencial de repouso (a partir dos -50mV), possuem uma baixa condutância e são caracterizados por rápidas ativações/inativações (Perez-Reyes, 2003). Os canais do tipo T são igualmente permeáveis para os iões de Ca^{2+} e Ba^{2+} (Zamponi, 2005). As SMC vasculares em cultura, durante a fase proliferativa, isto é, até atingirem a confluência, apresentam predominantemente correntes de Ca^{2+} do tipo T (Perez-Reyes, 2003). Estes canais foram também relacionados com o ciclo celular das SMC vasculares, sendo a sua expressão predominante na fase S (Akaike, 1989). A estrutura destes canais continua sobre intensa investigação e aparentemente não têm a subunidade β . Relativamente às restantes subunidades auxiliares, ainda não foi demonstrada a sua presença e o potencial efeito na modulação/regulação da subunidade principal. O poro deste tipo de canal é mais reduzido em relação aos canais de cálcio do tipo L (LTCC) (Cataldi, 2002).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Os canais de elevado limiar (-20mV) apresentam uma elevada condutância e uma cinética de inativação mais lenta, sendo designados por canais de cálcio tipo L (do inglês “large” e “long-lasting”) (Zamponi, 2003; Zuccotti, Clementi, & Reinbothe, 2011). Birnbaumer analisou, através da utilização de bancos de cDNA, os diferentes tipos de subunidades dos VOCC (Birnbaumer et al., 1994; Zamponi, 2003). As experiências de clonagem revelaram que os canais de Ca^{2+} eram formados por complexos com multissubunidades onde se destacam uma subunidade principal α_1 e subunidades auxiliares (β , α_2/δ e γ). Cada uma das subunidades auxiliares possui várias isoformas com diferentes funções reguladoras. A subunidade principal é responsável pelas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas, como a cinética e limiar de ativação. A subunidade α_1 é a maior subunidade (190 a 250 kDa) e nela está incorporada o poro condutor, o sensor de voltagem e a zona de ligação de segundos mensageiros, fármacos e toxinas (figura 17).

A subunidade α_1 é formada por quatro domínios homólogos (I-IV), com seis domínios transmembranares, cada um (S1-S6). O segmento S4 foi identificado como o sensor de voltagem. O *loop* entre o segmento S5 e S6 determina a seletividade dos iões e a sua condutância. Várias subunidades α_1 foram já identificadas nos canais de Ca^{2+} do tipo L. A subunidade β , intracelular, é transmembranar e ligada por pontes dissulfureto à subunidade α_2/δ (Morgado et al., 2011).

O potencial de membrana nas VSMCs, como determinado *in vitro* usando as técnicas eletrofisiológicas como o *whole cell patch clamp*, compreende-se entre -45 e -70mV (Orallo, 1996; Somlyo & Somlyo, 1994). No entanto, este potencial medido *in vivo* é mais positivo (-40 a -55mV) englobando a faixa de ativação dos LTCC demonstrando o seu papel de relevo na manutenção do tónus vascular (Gollasch & Nelson, 1997; Orallo, 1996). Dos 6 canais descritos, as VSMCs possuem os canais do tipo-L e do tipo-T (Hughes, 1995; J R Martens & Gelband, 1998).

Com o avançar da ciência, a deteção de novos canais, assim como novas propriedades dos canais, levou a que vários autores denominassem um canal com várias nomenclaturas (Catterall et al., 2005; Sonkusare et al., 2006). A última a ser adotada foi a de Ertel et al. na qual a denominação dos canais segue o esquema Ca_v x.y, onde x é o número da subfamília do canal e y o número do membro da subfamília. Esta classificação permite assim dividir os canais, de acordo com a sua estrutura e funcionalidade.

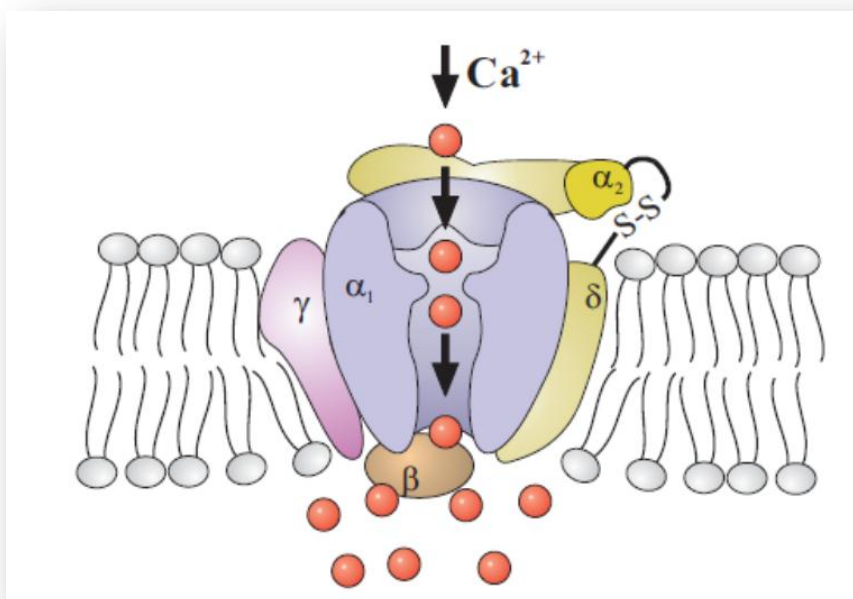


Figura 17 - Esquema hipotético da estrutura geral dos VOCC. A subunidade principal α_1 é uma proteína transmembranar que contém o poro do canal, através do qual os íons de cálcio passam, uma vez aberto. Esta subunidade é regulada pelas subunidades auxiliares, a subunidade β citosólica, o complexo α_2/δ e a subunidade γ transmembranar. Adaptado de (Lacinova, 2005).

Canais de cálcio tipo L (LTCC)

Apesar das origens diversas, há um fator comum em todos estes tipos de HTA: o tônus vascular alterado que é mediado pelo influxo de Ca^{2+} pelos LTCC (Satin, 2011; Sonkusare et al., 2006). O interesse nos LTCC começou na Bioquímica e continuou para uma caracterização molecular, culminando na clonagem na subunidade α_1 , formadora do poro e da subunidade acessória α_2/δ do músculo-esquelético de rato (Bodi et al., 2005). Os LTCC são regulados pelo sistema nervoso adrenérgico e interagem com recetores acoplados à proteína G (Bodi et al., 2005). Cada LTCC no sarcolema controla 6-20 canais de libertação no SR devido à aproximação anatómica dos canais de cálcio no túbulo T com os do SR.

Os LTCC têm um papel essencial na secreção endócrina, assim como no mecanismo de excitação/contração no músculo-esquelético, liso e cardíaco. Além da sua expressão no miocárdio e vasculatura, os LTCC encontram-se também presentes no nóculo sinoatrial e atrioventricular no coração onde ajudam na propagação do potencial de ação. No tratamento da HTA e arritmia, estes canais são alvos ideais para uma intervenção terapêutica, devido ao seu papel essencial no controlo da atividade cardíaca e na regulação do tônus vascular periférico. Estes canais são ativados por despolarizações de membrana mais positivas (a partir dos -20 mV), possuem uma condutância elevada e a sua inativação é mais lenta e biexponencial pois é dependente da voltagem e da concentração de Ca^{2+} (300 a 600 ms)(Hughes, 1995; Santana & Navedo, 2009; Sonkusare et al., 2006). Os LTCC da família de genes Ca_v 1,2 são estruturas heteromultimétricas constituídas por uma subunidade α_1C constitutiva e uma subunidade reguladora β e por subunidades α_2/δ nas células vasculares do

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

músculo liso, músculo-esquelético e coração (figura 18). A seletividade do poro para o ião Ca^{2+} é dependente da presença, em cada domínio homólogo, de um par de resíduos de glutamato (Cataldi et al., 2002; Sonkusare et al., 2006). A subunidade α_1 (190-250 kDa) contém o poro do canal, o sensor de voltagem e o controlo da abertura e encerramento do canal, sendo esta regulação mediada pelos locais de ligação de segundos mensageiros, fármacos e toxinas (Catterall et al., 2005; Moosmang et al., 2005). A sua estrutura inclui 4 domínios com 6 segmentos transmembranares. O terminal carboxilo e amino têm um papel específico na transdução do sinal dependente do Ca^{2+} incluindo a ligação constitutiva à calmodulina. Várias linhas de investigação sugerem que a CaM é um sensor crítico na mediação do processo de inativação do LTCC. A CaM liga-se a um motivo na subunidade principal do canal, sendo um motivo constituído por isoleucina e glutamina, exercendo assim a sua função de autorregulação (Bodi et al., 2005).

A subunidade auxiliar β (~53-71 kDa) é principalmente citosólica e o complexo α_2/δ (170 kDa) está maioritariamente localizado na face extracelular glicoproteica da membrana plasmática, sendo a subunidade α_2 inteiramente extracelular. Esta última está ligada por pontes dissulfídicas à subunidade δ , apresentando uma pequena região intracelular que serve de âncora entre a subunidade α_2 e a membrana plasmática. O complexo α_2/δ regula a amplitude das correntes de Ca^{2+} e a cinética de ativação/inativação dos canais. A subunidade beta intervém na regulação da cinética e dos limiares de ativação e inativação destes canais (Sonkusare et al., 2006).

A entrada de Ca^{2+} citosólico via LTCC estimula uma grande libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático via RyR e recetor de IP3. Os LTCC são inativados pelo aumento da voltagem durante a despolarização, acima do potencial necessário para a ativação, e pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (Guibert et al., 2008; Satin et al., 2011).

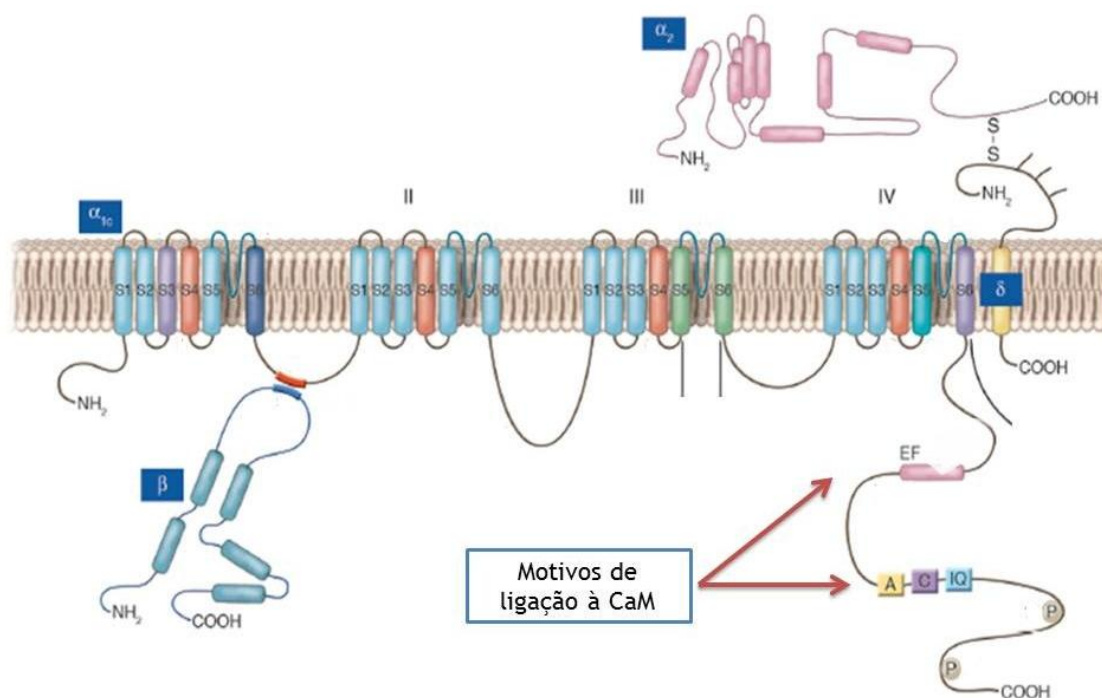


Figura 18 - Organização estrutural dos LTCC. A organização topológica na membrana das unidades essenciais e subunidades estruturais encontram-se apresentadas. Os domínios EF, A, C e IQ são motivos estruturais de ligação à calmodulina. Adaptado de (Lacinova, 2005).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

No caso hipertensivo, um maior influxo de Ca^{2+} leva a disfunções a nível do tónus vascular e resistência vascular periférica. Uma PA elevada parece promover a expressão deste tipo de canais e associado a este aumento está o estímulo da despolarização da membrana (Amberg et al., 2003). Inicialmente, durante aumentos agudos na PA, pequenas artérias e arteríolas sofrem uma imediata despolarização e uma constrição chamada de resposta miogénica, que advém da abertura dos LTCC. Estes pequenos aumentos podem amplificar a subida inicial e conduzir a uma PA permanentemente elevada (Sonkusare et al., 2006).

Os LTCC atuam rapidamente sob a ação de agentes anti-hipertensivos o que pode afetar negativamente a função cardíaca por ativação do tónus simpático, que vai induzir o aumento do ritmo cardíaco, taquicardia reflexa que está associada a um aumento da mortalidade em doentes com condição cardiovascular (Shimizu, 2003).

1.12. O *stress* oxidativo e a hipertensão

O sistema cardiovascular está num constante estado de vasodilatação ativa dependente da formação de NO. O NO é uma importante molécula mensageira e está envolvido em diversas funções fisiológicas como a neurotransmissão, a regulação do tónus vascular, a integridade da parede vascular, a reatividade plaquetar e a citotoxicidade mediada pelo sistema imunitário. É marcadamente lipofílico, o que lhe permite atravessar as membranas por um processo de difusão simples não utilizando transportadores de membrana específicos. A manutenção do tónus vascular normal resulta, para além da intervenção do sistema nervoso simpático, da interação dos mediadores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio. Em condições fisiológicas basais, este balanço resulta a favor da vasodilatação (Vanhoutte, 1989). O mecanismo através do qual o NO relaxa os vasos sanguíneos consiste na interação deste com o centro heme da guanilciclase solúvel resultando na formação de cGMP (Ignarro et al., 1981; Katsuki e col., 1977). A acumulação de cGMP resulta na ativação da proteína cinase dependente do cGMP, na diminuição da fosforilação das cadeias leves de miosina e no relaxamento (Fiscus, Rapoport e Murad, 1984). Esta ação do cGMP é desencadeada através da diminuição do Ca^{2+} livre intracelular (Cornwell, 1988; Johnson, 1985).

O *stress* oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, sendo privilegiada a primeira. Esta disfunção pode levar a danos a nível macromolecular como por exemplo na membrana celular, lípidos, proteínas e DNA (Al-Khyatt & Al-Gazally, 2011). As VSMCs formam a camada intermédia dos vasos sanguíneos e representam um componente dinâmico na vasculatura. Com um estímulo patológico, podem conduzir à hipertrofia ou a um fenótipo indiferenciado, sintetizando um excesso de matriz extracelular e citocinas inflamatórias, dividindo-se e migrando para a íntima (Clempus & Griendling, 2006). As ROS estão implicadas nestes processos (Nishiyama et al., 2003). As VSMCs contêm inúmeras fontes de ROS como as NADPH, xantina oxidase, cadeia respiratória mitocondrial e as óxido nítrico sintetases (NOs) (Djamali et al., 2007).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Como os ROS possuem um tempo de meia-vida muito baixo, o *stress* oxidativo é determinado indiretamente pelos níveis plasmáticos das substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) que se encontra aumentado em casos de falha renal aguda e relacionado com a reatividade vascular dependente do endotélio e pressão sistólica (Malyszko, 2010). Os TBARS são formados como um produto secundário da peroxidação lipídica que pode ser detetada por um ensaio usando o ácido tiobarbitúrico como reagente.

Este teste mede o malondialdeído (MDA) presente na amostra, assim como o resultante dos hidroperóxidos lipídicos pelas condições hidrolíticas da reação. O MDA é um dos vários produtos finais na decomposição da peroxidação lipídica. A oxidação de lipídios inicia-se com a formação de radicais livres e os produtos da oxidação lipídica podem desencadear a peroxidação, resultando em problemas de saúde. A membrana celular é muito atingida pela peroxidação lipídica. Há perda da seletividade na troca iónica e libertação do conteúdo de organelos e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), conduzindo à morte celular.

A diminuição do conteúdo da elastina na aorta relacionada com a HTA e o aumento da dureza vascular são outros dos efeitos patogénicos do *stress* oxidativo. Alterações na síntese de NO, na sinalização pela via NO-cGMP e na redução da bioviabilidade do NO derivado do endotélio pelo aumento do *stress* oxidativo são elementos chave da patogénese da HTA. (Pacher, Beckman, & Liaudet, 2011).

Capítulo II

Objetivos

A CsA e SRL são dois fármacos usados como imunossuppressores para prevenir a rejeição de órgãos em transplantação, que atuam por diferentes mecanismos intracelulares. Contudo, ambos apresentam efeitos secundários importantes, que para o caso da CsA são essencialmente aumento da tensão arterial e a nefrotoxicidade, efeitos destes que parecem ser maioritariamente originados por perturbações a nível vascular. O SRL, por sua vez, parece ser menos nefrotóxico, apresentando um carácter anti-proliferativo, o que pode ser um importante fator para os diferentes efeitos vasculares que poderão apresentar. O SRL apresenta um diferente mecanismo de ação imunossupressora com elevada eficácia de prevenção da rejeição e uma minimização da toxicidade dos inibidores de calcineurina. No entanto, os efeitos diretos destes fármacos ao nível do músculo liso vascular, na atividade vasomotora direta sobre o tónus e proteção cardiorenal ainda não foram analisados. A7r5 é uma linha celular de células de aorta de rato que pode ser um bom instrumento para avaliar os diferentes efeitos destes dois fármacos imunossuppressores a este nível.

O objetivo do protocolo experimental é avaliar os efeitos vasculares do SRL e/ou CsA em culturas de células A7r5 através de experiências eletrofisiológicas e de contratilidade. A compreensão destes mecanismos celulares será essencial para a prevenção de efeitos secundários graves pós-transplante.

Numa fase posterior, comparar-se-ão os efeitos cardiorenais num modelo animal de 9 semanas (rato Wistar) para potenciar a comparação com as experiências eletrofisiológicas (*whole cell patch clamp*) e de contratilidade (*planar cell surface area*), avaliando diversos parâmetros biológicos assim como a função cardíaca e a disfunção renal.

O objetivo final é a compreensão dos efeitos na contratilidade vascular para posteriormente desenvolver novas metodologias e terapêuticas imunossupressoras. Pretendem-se fármacos menos tóxicos a nível sistémico, mais específicos e eficazes do que os atuais para uma melhoria da esperança média de vida dos transplantes e da qualidade de vida dos doentes.

Capítulo III

Metodologias

3.1. Materiais

Para as experiências do modelo animal, utilizou-se ciclosporina (Sandimun Neoral®) da empresa Novartis Farma, Produtos Farmacêuticos, SA (Sintra, Portugal) e sirolimus/rapamicina (Rapamune®) da Wyeth Europe, Ltd. (Berkshire, UK) através dos Laboratórios Pfizer, Lda (Lisboa, Portugal). Para as experiências eletrofisiológicas e de contratilidade, utilizou-se CsA e SRL da Sigma-Aldrich-Química (Sintra, Portugal) inicialmente dissolvidas em etanol absoluto, sendo as soluções experimentais obtidas pela diluição em água ultrapura - sistema MiliQ (Milipore/Waters). A serotonina e noradrenalina também foram dissolvidas nas concentrações experimentais em água sistema Mili-Q. A solução stock de (-)-Bay K 8644 preparou-se em etanol absoluto e armazenada a -20°C. Os reagentes químicos para as soluções fisiológicas foram adquiridos na Merck (Lisboa, Portugal). Tripsina, colagénio, antibióticos, DMEM-F12, BSA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). A solução de PBS, com pH 7,4, contém: 135 mM NaCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 2.68mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.48 mM MgCl₂ e 5.55 mM glucose.

Os restantes reagentes e químicos utilizados foram comprados na Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal) e utilizados sem mais nenhum passo de purificação. As diluições necessárias foram realizadas no dia da experiência, respeitando as normas laboratoriais. Por fim, para não afetar os resultados experimentais, a concentração final de etanol nunca excedeu 0,1% nas experiências.

3.2. Cultura de Células A7r5

Um dos problemas decorrentes da realização de culturas primárias e de subculturas é o fenótipo desenvolvido por estas células. As SMC vasculares em cultura podem apresentar múltiplos fenótipos, que vão desde o contrátil ao sintético. Esta multiplicidade de fenótipos pode ser detetada morfológicamente, através da análise de marcadores de expressão, do potencial proliferativo e das propriedades migratórias (Owens, 2007; Rensen et al., 2007). Entre os marcadores de expressão mais usados para distinguir SMC vasculares com fenótipo contrátil são: a alfa-actina do músculo liso (α -SMA); as cadeias leves de miosina do músculo liso (SM-MHC); a calponina do músculo liso (SM-calponina); a h-caldesmona, e os VOCC tipo L (Owens, 2007; Rensen et al., 2007; Yoshida, 2005). Estas proteínas estão envolvidas na contração das SMC vasculares, como componente estrutural ou de regulação do aparelho contrátil.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

A linha celular A7r5 (figura 19) é uma linha comercial de células vasculares do músculo liso obtidas da aorta de ratos no estado embrionário (Promochem, Spain) (Kimes & Brandt, 1976). Para a obtenção de culturas de A7r5 estes procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar, sob condições de esterilidade. As células cresceram em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM-F12)* (Sigma Aldrich; Portugal) suplementado com NaHCO_3 (1,2 g/L), L-ácido ascórbico (20 mg/L; Sigma-Aldrich), albumina sérica bovina (0.5%; Sigma-Aldrich), soro fetal bovino inativado ao calor (FBS; 10% Biochrom) e uma mistura de penicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), streptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e anfotericina B (250ng/mL) (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas numa atmosfera húmida a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de O_2 . O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias e culturas confluentes obtiveram-se a cada 5-7 dias. Depois de atingirem a confluência, substituiu-se o meio DMEM-F12 com 10% de soro, por meio com mesma composição, mas sem o suplemento de soro, durante as 24 a 48 horas prévias à realização de experiências. A tripsinização ocorreu usando uma solução com tripsina (0,3%) numa solução tampão livre de cálcio e magnésio com EDTA (0.025%). Seguidamente, as células mantiveram-se a 4°C em meio sem FBS até à realização das experiências eletrofisiológicas. Subculturas foram obtidas até à 30ª passagem.

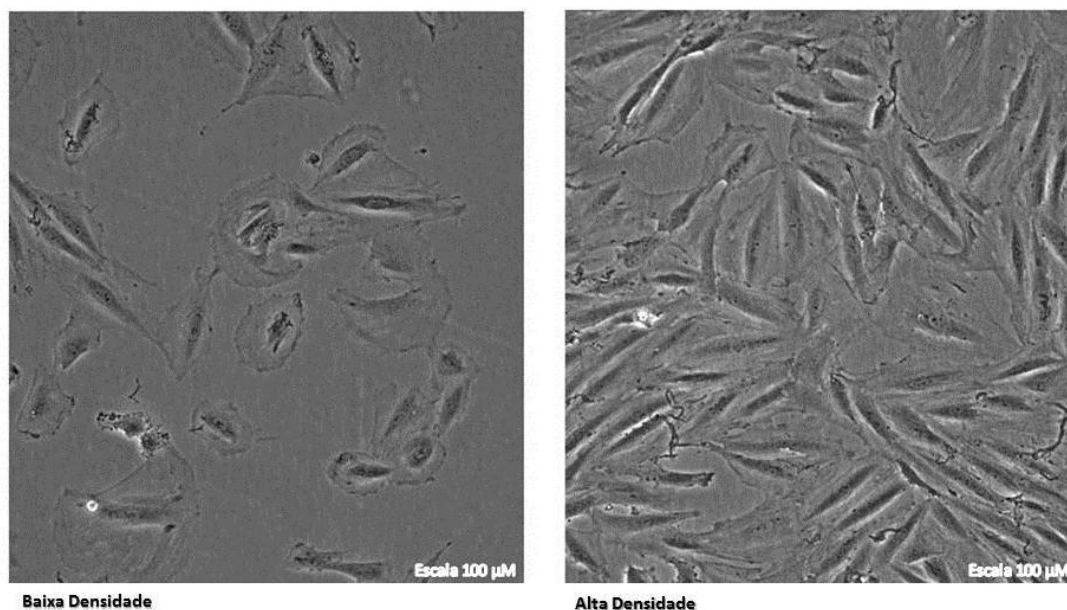


Figura 19 - Imagens microscópicas das culturas celulares de a7r5 de alta e baixa densidade.

Foi recentemente demonstrado que esta linha celular exibe um fenótipo do músculo liso adulto (Firulli et al., 1998). Estas células expressam diferentes marcadores específicos das células musculares lisas, como a miosina, a alfa actina e a calponina (Firulli et al., 1998) e apresentam uma elevada quantidade de um marcador característico das SMC vasculares diferenciadas, o SM22- α . O aparelho contrátil está funcionalmente intacto, uma vez que respondem a concentrações elevadas de KCL, a iónoforos e à vasopressina (Brueggemann et al., 2007). Estas células são consideradas um modelo adequado para o estudo da função

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

contrátil no músculo liso vascular, particularmente no estudo da homeostasia do cálcio. Nestas células coexistem dois tipos diferentes de VOCC, os do tipo L (Cav 1,2) e os do tipo T (Cav 3,1) e canais TRP, os quais também foram detetados em SMC isoladas da aorta de rato (Byron & Taylor, 1995; Marks, 1990; Obejero-Paz, 1991). Estas células são utilizadas convencionalmente para o estudo dos canais do tipo L, existindo atualmente vários trabalhos sobre a cinética e o efeito de vários agentes inibidores e ativadores destes mesmos canais.

A linha celular A7r5 apresenta-se como um conjunto de células de forma *flat ribbon* que se diferenciam em *arrays* de células em forma de fuso, derivadas da aorta torácica de rato no estado embrionário (figura 22). Quando as células se encontram numa fase estacionária há um aumento na miocinase e na atividade da creatina fosfocinase (PKC). Após o fim da divisão celular, um tipo muscular da isoenzima PKC é sintetizada. Após a ressuscitação das células, pode demorar até 7 dias para se formar uma monocamada, sendo o seu crescimento pouco acelerado.

Esta linha celular possui membranas com capacidade de gerar potenciais de ação de Ca^{2+} espontaneamente através da ativação dos canais de cálcio tipo L, processo independente da libertação de Ca^{2+} das vesículas intracelulares. As células encontram-se eletricamente acopladas, sendo que estes *sparks* de Ca^{2+} nas células do músculo liso conduzem a um efeito vasomotor nas arteríolas e artérias de pequena resistência. As atividades específicas das enzimas miocinase e PKC encontram-se 2 a 5 vezes aumentadas.

3.3. Experiências Eletrofisiológicas - *Whole Cell Patch Clamp*

A técnica de Patch Clamp foi desenvolvida há mais de 30 anos e é usada amplamente em investigação da excitabilidade celular manifestada a partir de correntes iónicas transmembranares (um canal ou complexo de canais) e/ou formação de potenciais de ação. A configuração de *whole cell patch clamp* é mais comum para a medição de correntes iónicas e a única a permitir a medição de potenciais de ação. Este método permite, detalhadamente, a análise mecânica e estrutural dos VOCC assim como a análise da regulação da atividade do canal por vias de sinalização intracelulares e agentes farmacológicos (Karmažínová & Lacinová, 2010). Com a aplicação de sucção adicional da membrana, irá ser formado um contato elétrico entre o citoplasma e o elétrodo da pipeta, com solução interna. Adicionalmente, a solução intracelular lentamente difunde-se da pipeta para o citoplasma. A célula a examinar é colocada na câmara experimental cheia com solução BSA e contendo o segundo elétrodo. Este elétrodo mantém o potencial elétrico fora da célula a 0 mV (elétrodo terra) (Karmažínová & Lacinová, 2010). O contato com a célula indicado pela subida na resistência da pipeta. A formação do selo pode ocorrer imediatamente ou não e pode ser ajudado pela polarização da pipeta aos -40 mV (Kaneez, 2012). Uma alta resistência de selo

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

reduz o ruído da gravação, permitindo uma muito boa resolução das correntes dos canais na ordem dos 1 pA.

A estabilidade mecânica do selo entre a membrana e a micropipeta permite a realização de várias configurações para o estudo dos canais iónicos. Quando existe a rutura do patch de membrana dentro da micropipeta, gera-se uma continuidade entre a solução dentro da micropipeta e o interior da célula, originando-se uma via de baixa resistência elétrica entre os dois meios, tornando possível o controlo de voltagem da célula. Esta configuração é designada de “whole-cell”, uma vez que permite medir as correntes iónicas associadas a todos os canais iónicos existentes na membrana da célula.

O equipamento é uma combinação de vários equipamentos mecânicos (microscópio invertido e micromanipuladores) e elétricos (amplificadores, osciloscópio, interface com o computador). A solução interna da micropipeta varia de acordo com as células em estudo e tipos de canais iónicos utilizados. A solução externa utilizada também varia segundo as células/correntes analisadas.

Células A7r5 de diferentes passagens foram tripsinizadas e usadas para experiências eletrofisiológicas. A intensidade da corrente foi medida com diferentes meios externos e internos. A amplitude basal foi medida a cada 3-5 minutos após o selo para permitir o equilíbrio entre a pipeta e as soluções intracelulares. A célula foi mantida num potencial de -80 mV e despolarizada rotineiramente a cada 8 s até um potencial de teste de -10 mV durante 500 ms. Não houve compensação em termos de capacitância e de fugas de corrente. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (21-25° C) e a variabilidade da temperatura não excedeu 1°C. O equipamento utilizado foi o amplificador patch-clamp Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA). As correntes foram mantidas a 10-kHz de frequência e filtradas a 0,05 kHz usando a interface analógica-digital Digidata 1322A (Axon Instruments) ligado a um computador com o *software* Pclamp 8 (Axon Instruments). A solução externa foi aplicada na proximidade da célula colocando-a perto de um tubo capilar de 250 µm com um fluxo de 20 µl/min. A informação recolhida do patch clamp foi obtida e a amplitude da corrente estabilizada, normalmente, após ~3min após a ruptura da membrana celular. Apenas células com uma resistência de entrada de 2-3 GΩ sem run-down foram analisadas. Intensidade de corrente estável foi gravada após 5-10 min e seguiu-se a aplicação dos agentes farmacológicos. A composição da solução interna em A7r5 para se analisar as correntes de canais de cálcio tipo L é: 119,8 mM CsCl, 4,0 mM MgCl₂, 0,06 mM CaCl₂, 3,1 mM Na-ATP, 0,4 mM Na-GTP, 5,0 mM EGTA, 10,0 mM HEPES, 10,0 mM TEA com pH 7,3 (utilização de CsOH). A composição da solução externa em A7r5 para se analisar as correntes de canais de cálcio tipo L é: 124,0 mM NaCl, 5,0 mM CaCl₂, 5,0 mM HEPES, 4,7 mM KCl, 6,0 mM Glucose, 10,0 mM TEA com pH 7,4 (utilização de NaOH).

Os elétrodos para a técnica são feitos de vidro 2-4MΩ (Drummond, Broomall, PA) contendo a solução interna. A presença de Cs⁺ em vez de K⁺ nas soluções tem um efeito bloqueador das correntes de potássio. A configuração whole-cell patch clamp foi usada para analisar a intensidade de corrente dos LTCC (ICa,L) basal e estimulada por BAY (10 nM) na presença de

diferentes concentrações de CsA (8nM - 12µM) e SRL (10nM - 10µM) dissolvidas na solução externa.

3.4. Experiências Contratilidade - *Planar Cell Surface Area*

Uma das experiências inovadoras deste protocolo experimental envolveu estudos de contratilidade em células A7r5 previamente descritas, utilizando novos fluoróforos como a *wheat germ agglutinin* (WGA) e a concanavalina A (ConA). Em contraste com a fluoresceína, estes fluoróforos apresentam um tempo de atividade superior, eliminam o efeito de *photobleaching* e não influenciam os resultados experimentais pois não interagem com o meio onde estão as células como na figura 20. O seu inovador método de aplicação é, também, uma vantagem sobre métodos mais lentos e com vários passos desnecessários. A marcação de células vivas em experiências de contratilidade é indispensável e a alta especificidade destes fluoróforos sobre a fluoresceína é essencial para uma correta análise da reatividade celular.

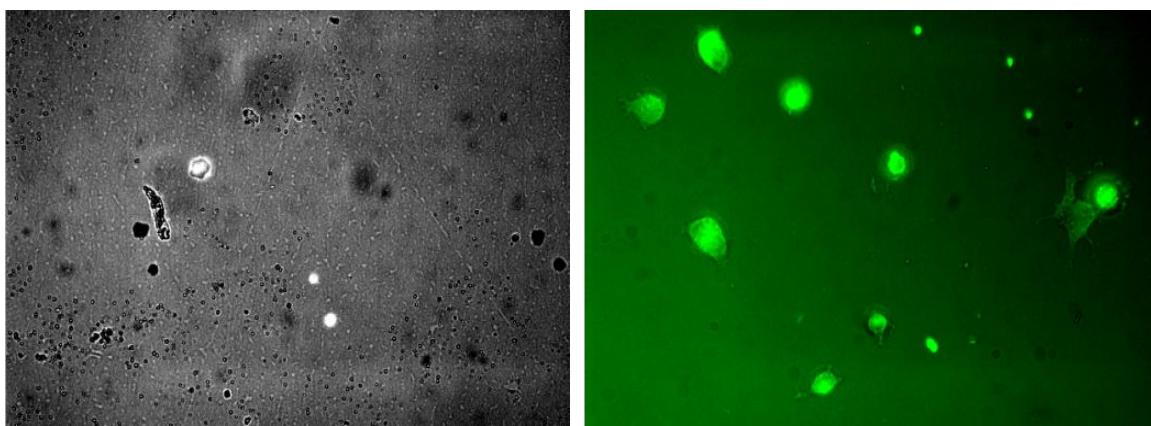


Figura 20 - Células A7r5 inviáveis para o estudo e eliminação total da fluorescência, após utilização da fluoresceína como marcador (*esquerda*). Fenómeno de photobleaching (perda de fluorescência e/ou fluorescência do meio exacerbada), após utilização da fluoresceína como marcador (*direita*). Sistema Zeiss Axio Observer Z1

Assim, este novo método de *planar cell surface área* (PCSA) é extremamente importante para corretamente verificar os efeitos dos dois agentes farmacológicos sobre as células vasculares do músculo liso. Um novo e detalhado protocolo experimental foi elaborado para considerar todas as variáveis em estudo. A nível do desenvolvimento deste protocolo, o marcador ideal será aquele que consegue marcar preparações vivas de células com o mínimo de condições de otimização e que funcione com soluções-tampão fisiológicas e meios de cultura. É pertinente considerar a diferente expressão de proteínas em vários locais da célula e garantir que o fluoróforo não interfira com o funcionamento e desenvolvimento da célula em estudo.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

A WGA (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) apresenta a seguinte constituição: 10mM HEPES; 0,15M NaCl; 0,1mM Ca²⁺ e 0,08% Ázida de Sódio. A ConA (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) apresenta a seguinte constituição: 10mM HEPES; 0,15M NaCl; 0,1mM Ca²⁺; 0,08% Ázida de Sódio; 0,01mM Mn²⁺. A WGA é uma lectina heterodimérica catiónica a pH fisiológico de 36 kDa que protege o trigo (*Triticum Vulgaris*) de agentes nocivos.

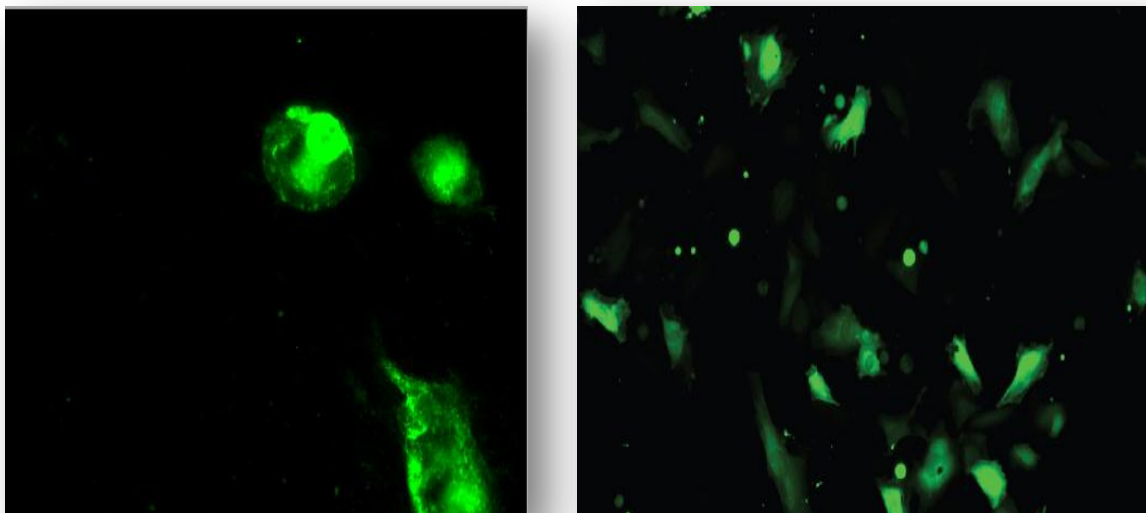


Figura 21 - Células A7r5 marcadas com WGA numa ampliação de 40x (*esquerda*); Imagem microscópica de células A7r5 corretamente marcadas por WGA, numa ampliação de 10x. (*direita*) Sistema Zeiss Axio Observer Z1

Pode ligar-se a oligossacáridos contendo a parte terminal N- acetilglucosamina, presentes em muitas proteínas membranares. Exibe uma excelente ligação temporal e estável, podendo chegar a uma marcação de várias horas, sendo este facto essencial para experiências com estruturas celulares. Apesar da sua lipofilicidade, a WGA está pronta a ser solubilizada em solução aquosa e compatível com soluções-tampão como é o PBS e meios de cultura potenciados ou não com soro. Estas sondas moleculares conseguem marcar seletivamente vários tipos de organelos, citoplasma, núcleo e membrana plasmática, sendo que o pretendido neste estudo é a marcação do perímetro celular para efeitos de contratilidade (figura 21).

A ConA é uma lectina tetramérica de 104 kDa que liga seletivamente resíduos de α -manopirranose e α -glucopirranose. É isolada do feijão *Canavalia ensiformes*, sendo um mitogénio vegetal. Após a succinalização da ConA, ocorre uma conversão irreversível para um dímero com manutenção da capacidade de ligação específica. Durante o processo de otimização, o uso da ConA foi descartado devido a eficácia e especificidade menor e, também, por interagir nocivamente com células vasculares do músculo liso. Na procura da explicação para estes eventos, verificamos que a existência de uma ligação entre a CsA e a ConA. A CsA inibe a resposta de vários mitogénios e esta lectina é a mais sensível à sua ação, sendo assim descartado o seu uso (Al-Aghbar et al., 1986).

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Sumariza-se agora o protocolo experimental desenhado. Todo o procedimento é realizado no escuro, com temperatura ambiente, numa câmara de fluxo laminar esterilizada corretamente. Células A7r5 confluentes foram incubadas com WGA (concentração final 1µg/ml) durante 12 horas com meio de cultura sem soro previamente descrito. Após a tripsinização, as células foram colocadas em placas de fluorescência de 12 mm revestidas com 15 µg/ml de colagénio, previamente incubadas numa atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, a 37°C. A densidade de células nas placas é baixa para permitir uma melhor visualização no microscópio de fluorescência e a adesão das células em estufa ocorre durante cerca de 4 horas, seguida de 2-3 lavagens com PBS. Após este processo, as células foram expostas a diferentes concentrações de CsA (8nM - 12µM) e SRL (10nM - 10µM) em presença prévia de agentes vasoconstritores conhecidos, que são 5-HT, NA e BAY. Em cada experiência, a placa de fluorescência foi analisada usando um microscópio invertido Zeiss Axio Observer Z1 e diferentes imagens em diferentes tempos foram tiradas por uma câmara digital lateral incorporado no equipamento. Estas imagens das diferentes amostras foram analisadas com o *software* Axio Vision Real 4.8 e apenas foram consideradas as células corretamente marcadas. A fluorescência foi excitada com um laser de árgon de 488 nm e detetou comprimentos de onda entre 500-520 nm, correspondentes à zona de ação da WGA e eGFP.

3.5. Modelo animal

Como modelo animal, escolheu-se o rato, visto, entre outras vantagens, ser muito utilizado para estudos de HTA arterial, nomeadamente da HTA induzida pela CsA. Foram utilizados ratos da estirpe *Wistar*, machos, com cerca de três meses de idade e um peso de 310 - 330gr, provenientes do biotério Charles-River (Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos durante as experiências no biotério de manutenção do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com as normas legislativas europeias e em vigor no nosso país, mantidos em gaiolas apropriadas (2 por gaiola) em condições de temperatura (22±1°C) e humidade (50±10%) controlada e ciclos de luz/escuro de 12 horas diários, com dieta sintética de manutenção para rato, IPM-R20 (Letica, Espanha). Tanto a alimentação como a água foram fornecidas *ad libitum*.

3.5.1. Grupo de ratos

Após um período de duas semanas para aclimatização, os ratos foram divididos por forma randomizada em 5 grupos, de 6 ratos cada, com pesos idênticos e submetidos diariamente, durante 9 semanas, às seguintes dietas:

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Grupo controlo - ratos aos quais foi administrado sumo de laranja e fornecida **água destilada ad libitum**.

Grupo ciclosporina A (CsA) - ratos tratados com 5 mg/Kg/dia de ciclosporina A (Sandimmune Neoral®, Sandoz Pharma, Basel, Suíça), diluída em sumo de laranja, e fornecida **água destilada ad libitum**.

Grupo sirolimus (SRL) - ratos tratados com 1 mg/Kg/dia de sirolimus (Rapamune®, Laboratórios Pfizer, Lisboa, Portugal), diluída em sumo de laranja, e fornecida **água destilada ad libitum**.

Os tratamentos foram administrados ao final da tarde e sempre à mesma hora (17h) de cada dia, por sonda esofágica, durante as 9 semanas. Todos os animais, de todos os grupos, completaram o protocolo experimental e o seu peso corporal (PC) foi monitorizado durante o estudo, de uma forma contínua (semanalmente).

Neste modelo experimental (ratos Wistar machos), foi escolhida a via oral para administração da CsA e SRL, na dose de 5 mg/Kg/dia e 1 mg/Kg/dia respetivamente, as quais correspondem aos valores farmacocinéticos normalmente obtidos em doentes sujeitos ao tratamento com uma “dose de manutenção” deste imunossupressor. Tal dose é assim designada por corresponder à chamada a “concentração de vale”, de aproximadamente 0,1 μM , que se mantém durante 20-22 horas. Os fármacos foram administrados durante nove semanas para simular um efeito prolongado no Humano.

3.5.2. Recolha de sangue e tecidos

No final dos tratamentos, os ratos foram injetados com anestesia intraperitoneal com 2mg/kg numa razão 2:1 (v:v) 50 mg/ml de solução de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis, Laboratórios Pfizer, Seixal, Portugal) em 2,5% de cloropromazina (Largatil, Rhône-Poulenc Rover, Laboratórios Vitória, Amadora, Portugal). As amostras de sangue foram imediatamente recolhidas por venopunção na veia jugular com agulhas sem anticoagulante (para recolha de amostras de soro) ou com anticoagulante apropriado (EDTA) para análise das células do sangue. Vários órgãos, como o coração e rins, foram imediatamente removidos, pesados e colocados em tampão Krebs frio.

3.5.3. Medição da pressão arterial e frequência cardíaca

A PA sistólica e diastólica, assim como a frequência cardíaca, foram medidas de forma não invasiva através do método de “tail cuff” previamente descrito usando um esfigmomanómetro (LE 5001 Pressure meter, Letica Scientific Instruments, Espanha) no início (semana 0) e no

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

final do tratamento (semana 9). As medições foram realizadas em ratos conscientes, em condições de repouso para se evitar induzir qualquer tipo de “stress” nos animais, tendo-se submetido a cauda dos ratos a uma temperatura de cerca de 30°C durante 20 minutos, para obter uma dilatação dos vasos periféricos.

3.5.4. Doseamento das concentrações sanguíneas dos fármacos

As concentrações de CsA e de SRL em sangue total foram medidas por imunoenaios, através de métodos automáticos (reagente Flex e equipamento Dimension RxL, Siemens, Alemanha).

3.5.5. Ensaio bioquímicos

Vários parâmetros bioquímicos foram analisados através do soro recolhido, por métodos e equipamentos automáticos e anteriormente validados (Hitachi 717 analyser, Roche Diagnostics Inc, MA, EUA), incluindo ureia, creatinina sérica, proteína C reativa, triglicéridos e colesterol total.

A peroxidação lipídica no coração, rim e vasos (aorta) foi analisada pelo método das TBARS, definido pelos níveis de MDA como previamente descrito (Estepa, Ródenas, & Martín, 2009). Este teste mede o malondialdeído (MDA) presente na amostra, assim como o resultante dos hidroperóxidos lipídicos pelas condições hidrolíticas da reação. Sucintamente, o ácido tiobarbitúrico (TBA) é dissolvido em DMSO seguindo-se a adição de água ultrapura Mili-Q (Milipore, Waters) e utilizado como reagente neste protocolo. Este método baseia-se na reação entre o MDA e TBA, que forma produtos fluorescentes muito estáveis passíveis de quantificação por espectrofotometria de absorção.

3.5.6. Análise Histopatológica

Utilizou-se a coloração com ácido periódico-Schiff (PAS) para avaliar lesões renais. As amostras foram fixadas em formalina 10%, embebidas em parafina e secções de 3 µm foram imersas em água e tratadas subsequentemente com 1% de ácido periódico em solução aquosa e, posteriormente, tratadas com reagente Schiff. Todas as amostras foram examinadas por microscopia, usando o Zeiss Axioplan 2, e o grau de lesão no tecido foi analisado através de uma análise semi-quantitativa, em que 0 representa sem lesão, 1 apresenta até 25% de área com lesão, 2 apresenta entre 25 e 75% de área com lesão e 3 apresenta > 75% de área com lesão.

3.6. Análise Estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média das experiências, para cada condição experimental analisada. A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat Statistical Analysis System, versão 3.5 (2011) e o *software* OriginPro 8.5.2 para desenho gráfico. Significância estatística entre dois grupos foi alcançada com o t-test student. A significância estatística entre os diferentes grupos e o controlo foi analisada usando a one-way ANOVA seguida do teste Dunnet's post hoc. Os níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos ($P < 0,05$). A nível das condições eletrofisiológicas, as amplitudes das $I_{Ca,L}$ foram automaticamente calculadas pela diferença entre o pico máximo de corrente e a *baseline* perto do final de cada pulso de 8 s aplicado e é expresso em percentagem sobre a intensidade de corrente basal dos canais de cálcio tipo-L. A nível das experiências de contratilidade e eletrofisiológicas, n indicam o número de células usadas na experiência. A nível da análise de PA no modelo animal, as diferenças entre duas médias foram avaliadas pelo teste do t de Student para observações emparelhadas ou não-emparelhadas de acordo com a situação ou pelo teste de Fisher*s através da análise da variância de uma via (ANOVA). Os níveis de probabilidade inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como estatisticamente significativos. O número de determinações efetuadas para cada parâmetro é o indicado nos vários gráficos. Os resultados foram expressos em mmHg.

Capítulo IV

Resultados e discussão

O objetivo desta atividade experimental foi a determinação dos efeitos vasculares do SRL e/ou CsA em culturas de células da aorta de rato (A7r5) e, também, para comparar os efeitos cardiorenais num modelo animal com os dois fármacos. As técnicas de *whole cell patch clamp* e de *planar cell surface área* (PCSA) foram utilizadas para analisar a atividade dos canais de cálcio tipo-L (LTCC) e a contratilidade celular, respetivamente, com baixas concentrações dos fármacos. O modelo animal de 9 semanas com ratos mimetizou as doses farmacológicas usadas na prática clínica, para melhor compreender a ação e o sinergismo entre elas.

Em primeiro lugar, realizaram-se as experiências eletrofisiológicas com recurso às metodologias previamente descritas. Estas experiências eletrofisiológicas serviram para demonstrar a ação da CsA e do SRL sobre as células A7r5, sendo estas um modelo adequado para o estudo da função contrátil no músculo liso vascular, particularmente no estudo da homeostasia do cálcio, importante na mecânica da HTA como previamente foi descrito. Todas as experiências eletrofisiológicas foram realizadas à temperatura ambiente.

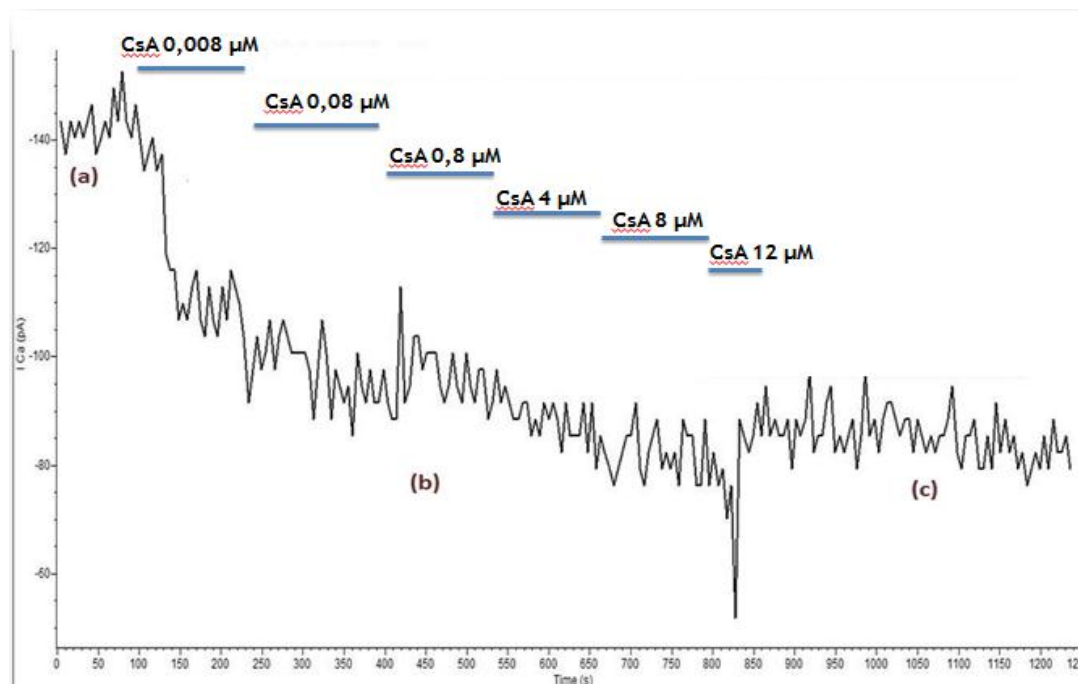


Figura 22 - Efeitos da aplicação direta de CsA sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica *whole cell patch clamp*. (a) controlo; (b) aplicação de várias concentrações de CsA (0,008 - 12 μ M); (c) depois de vários segundos de washing out.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

O efeito da aplicação direta da CsA sobre a intensidade de corrente dos LTCC em A7r5 (figura 22) demonstra o seu efeito de bloqueador dos canais de cálcio tipo-L e não ativador, como seria expectável, tendo em conta o seu carácter vasoconstritor e indutor de disfunções a nível cardiorenal. Este facto não se verifica num efeito dependente da concentração, mas sim num efeito aditivo em que as concentrações mais baixas provocam um efeito bloqueador elevado e a concentração mais alta provoca um efeito inibidor muito elevado. Na maioria das experiências realizadas, inutilizou a célula em estudo, pois o processo de *washing out* não conseguiu reverter o efeito do fármaco na concentração 12 μM , o que pode indicar algum efeito prejudicial a nível de reatividade celular com concentrações mais elevadas do que as consideradas.

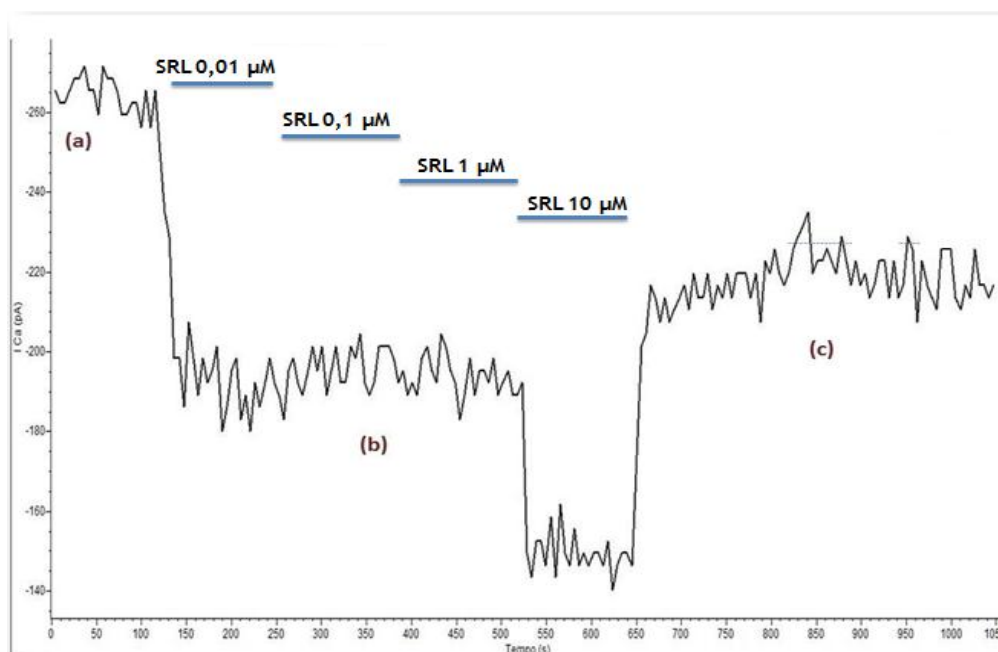


Figura 23 - Efeitos da aplicação direta de SRL sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica *whole cell patch clamp*. (a) controlo; (b) aplicação de várias concentrações de SRL (0,001-10 μM); (c) depois de vários segundos de *washing out*.

O efeito da aplicação direta de SRL (figura 23) sobre a intensidade de corrente dos canais em estudo a partir de uma célula A7r5 com esta técnica é inovador. Após vários resultados controversos na literatura em outras técnicas, tentámos elucidar o efeito a nível das células do músculo liso deste agente farmacológico. Sem nenhum resultado expectável, verificou-se com elevado número de experiências realizadas, um efeito de inibição da corrente dos LTCC, numa razão dependente da concentração e com grande amplitude. Este resultado pode explicar os efeitos mais benéficos verificados em ensaios clínicos com este agente farmacológico assim como verificar que uma baixa concentração de SRL (em relação à prática clínica) pode conduzir a um efeito dilatador de grande impacto. A boa recuperação das células em estudo após o passo de *washing out* vem reforçar a ideia de efeitos potencialmente mais desejáveis para a célula.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Com os resultados evidenciados, potenciou-se o sinergismo entre o protocolo experimental a nível celular com o modelo animal posteriormente realizado. Para esse efeito, pretendeu-se verificar se os resultados de cada agente farmacológico (inibidores dos canais LTCC) se aplicavam com a aplicação combinada dos mesmos. Mais uma vez a literatura é controversa e o método eletrofisiológico foi, também, inovador para este estudo de sinergia com resultados reproduzíveis. Para este estudo utilizou-se a maior concentração de SRL (10 μM), pois não apresentou efeitos indesejáveis na célula e uma concentração média de CsA (4 μM), já que a concentração maior provocara danos irreversíveis na corrente das células no estudo prévio. Pretendia-se verificar ou não o efeito combinado e se seria irreversível, sem causar danos irreparáveis nas células A7r5.

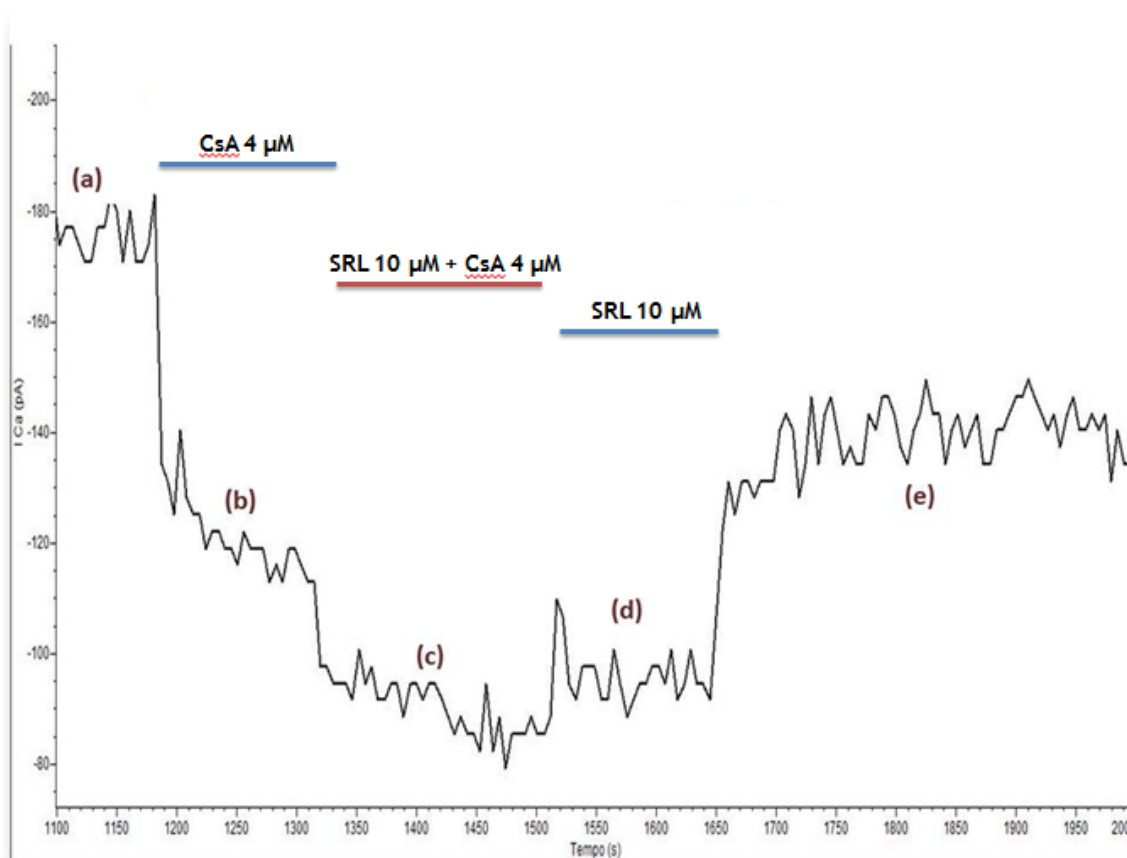


Figura 24 - Efeitos da aplicação combinada de CsA e SRL sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica *whole cell patch clamp*. (a) controlo; (b) aplicação de CsA 4 μM ; (c) efeito combinado dos dois agentes; (d) aplicação de SRL 10 μM ; (e) depois de vários segundos de *washing out*.

Verificou-se, após a aplicação da concentração de CsA, um decréscimo na amplitude de corrente o que corrobora o efeito inibidor sobre os canais LTCC. A aplicação combinada das duas concentrações provocou um potenciamento do efeito inibidor sobre os LTCC para amplitudes de correntes mais perto dos 0 mV como se observa na figura 24. O mais importante após verificar a ação combinada de inibição foi o facto de ser uma sinergia reversível que se observou com a aplicação da concentração de SRL que provocou um

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

aumento na intensidade de corrente. Por fim, o processo de recuperação foi total, não afetando a estabilidade da célula em estudo. A rapidez dos efeitos, a nível celular, sugere que o efeito dos dois agentes terapêuticos é mediado por uma via de sinalização não genómica.

Após a caracterização inovadora do efeito dos dois agentes farmacológicos, tentou apurar-se o efeito direto seria reproduzível, em maior ou menor extensão, numa aplicação indireta, ou seja, após a utilização de um estímulo contrário ao efeito conhecido (figura 25). Assim, para contrariar o efeito inibidor dos LTCC utilizou-se um agente ativador destes mesmos canais. Para isso utilizou-se o BAY, em concentração 0,1nM, e após a sua aplicação verificou-se uma ativação dos canais com um aumento da amplitude sobre o controlo para intensidades mais negativas. Após a observação de que o efeito do BAY se encontrava consonante com a literatura e estudos prévios do nosso grupo, aplicaram-se os dois agentes farmacológicos CsA e SRL assim como a combinação previamente referida. Na figura 25, exemplifica-se uma das experiências analisadas em que o efeito da CsA foi de inibição dos canais de LTCC mesmo após a estimulação com BAY, sendo o efeito totalmente recuperador da ação do BAY, com todas as concentrações de CsA em estudo.

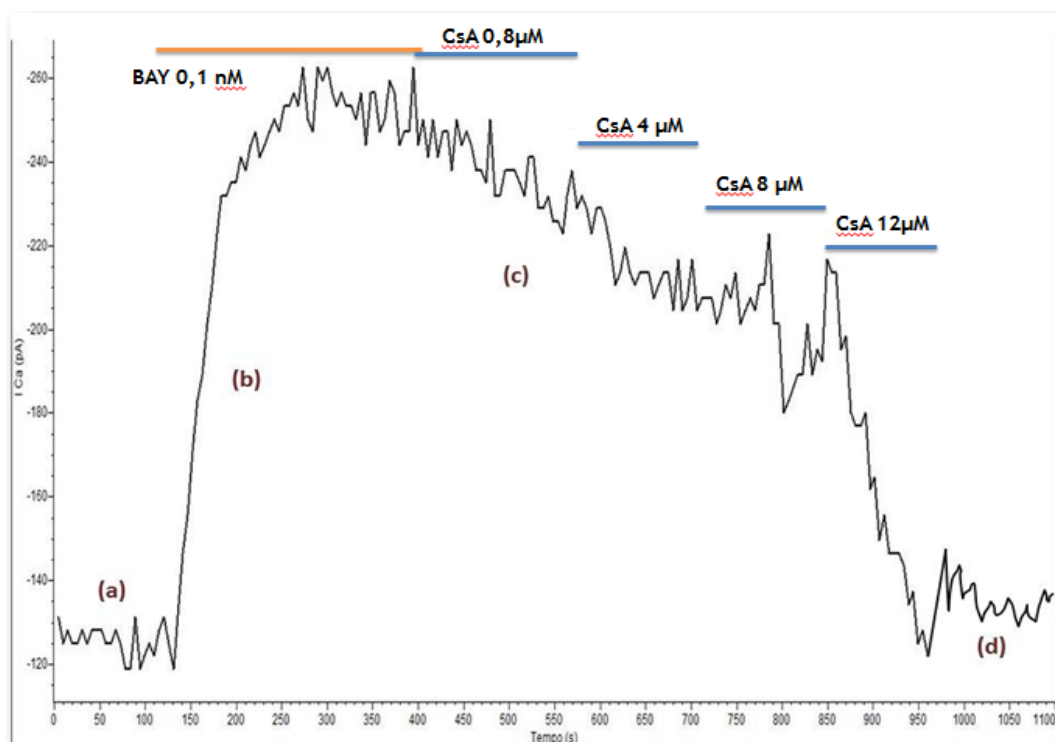


Figura 25 - Efeitos da aplicação de CsA, após estimulação com BAY 0,1 nM, sobre a intensidade de corrente dos canais de cálcio tipo-L gravados a partir de uma célula A7r5 na técnica *whole cell patch clamp*. (a) controlo; (b) aplicação de BAY; (c) aplicação de diferentes concentrações de CsA (0,8 - 12 µM); (d) depois de vários segundos de *washing out*.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Novamente, este efeito inovador corrobora os efeitos prévios e consegue fornecer-nos uma verdadeira ideia da ação do fármaco sobre a intensidade de corrente dos LTCC na célula. Este efeito inibidor sobre um agente vasodilatador conhecido é extensível ao SRL e à ação combinada dos dois fármacos.

Sumariza-se agora os resultados obtidos na totalidade das experiências eletrofisiológicas previamente descritas.

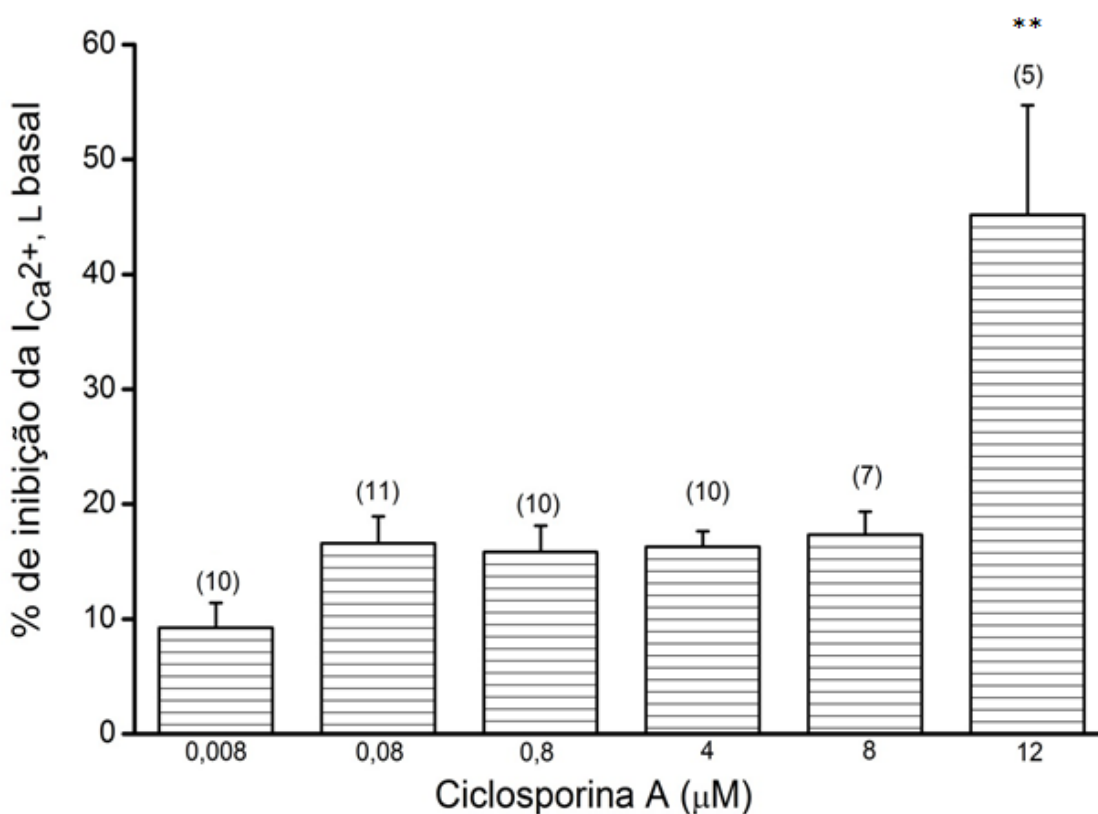


Figura 26 - Efeitos diretos das diferentes concentrações de CsA (0,008 - 12 μM) em células de cultura A7r5 usando a técnica de whole cell patch clamp. Os dados encontram-se expressos em percentagem (%) de inibição da intensidade de corrente dos LTCC ($I_{\text{Ca}^{2+}}$, L). As barras representam o valor médio e as linhas representam o erro padrão da média (S.E.M) das experiências entre parênteses. $P < 0,01$ vs concentração 0,008 μM .

É de salientar a ação não dependente da concentração da CsA, sendo que na totalidade das experiências se observa que as concentrações 0,08 até 8 μM possuem uma percentagem de inibição similar, o que nos permite afirmar a existência de um efeito cumulativo (figura 26). Além disso, verifica-se o caráter prejudicial da concentração de 12 μM , com uma percentagem de inibição bastante elevada de mais de 50%, com elevada significância estatística ($P < 0,01$). As margens de erro e a relevância estatística permitem-nos efetuar uma distinção nos efeitos observados. Em suma, verifica-se que a CsA consegue inibir os canais LTCC e induzir relaxamento nas células A7r5, o que nos permite elucidar pela primeira vez o

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

efeito de uma concentração inferior à prática clínica. Este efeito apresenta potencialidades bastante menos prejudiciais na questão cardiovascular da HTA.

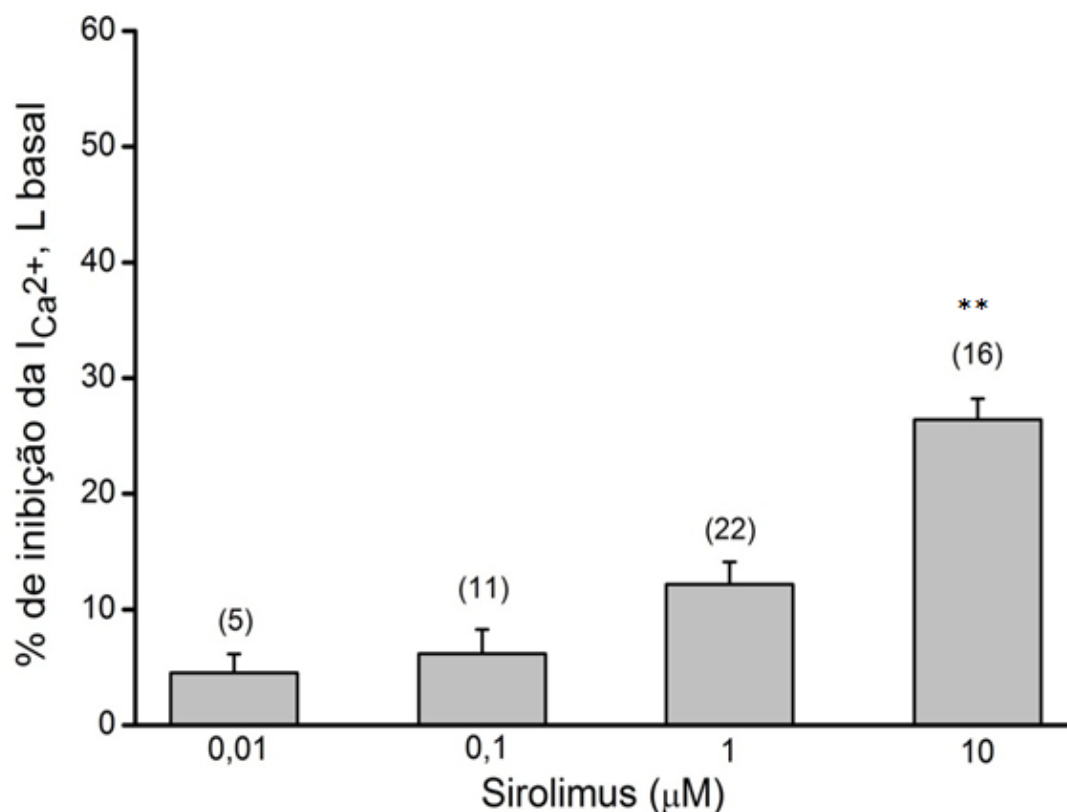


Figura 27 - Efeitos diretos das diferentes concentrações de SRL (0,01 - 10 µM) em células de cultura A7r5 usando a técnica de *whole cell patch clamp*. Os dados encontram-se expressos em percentagem (%) de inibição da intensidade de corrente dos LTCC (I_{Ca2+}, L). As barras representam o valor médio e as linhas representam o erro padrão da média (S.E.M) das experiências entre parênteses. ** P <0,01 vs concentração 0,01 µM.

Na totalidade das experiências em *whole cell patch clamp*, o SRL apresenta um caráter de inibição dos LTCC. A percentagem de inibição aumenta de uma maneira dependente da concentração consoante o aumento da concentração como se observa na figura 27. A percentagem maior é alcançada com a concentração de 10 µM de SRL que é bastante próxima da prática clínica, apresentando uma significância estatística elevada (P <0,01). O protocolo inovador implementado neste trabalho permite concluir que o SRL induz relaxamento nas células A7r5, através da inibição dos LTCC. As margens de erro e a relevância estatística permitem-nos efetuar uma distinção nos efeitos observados. Em suma, estes resultados permitem-nos corroborar os efeitos benéficos, devido ao relaxamento vascular provocado, observados na terapêutica com este fármaco.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

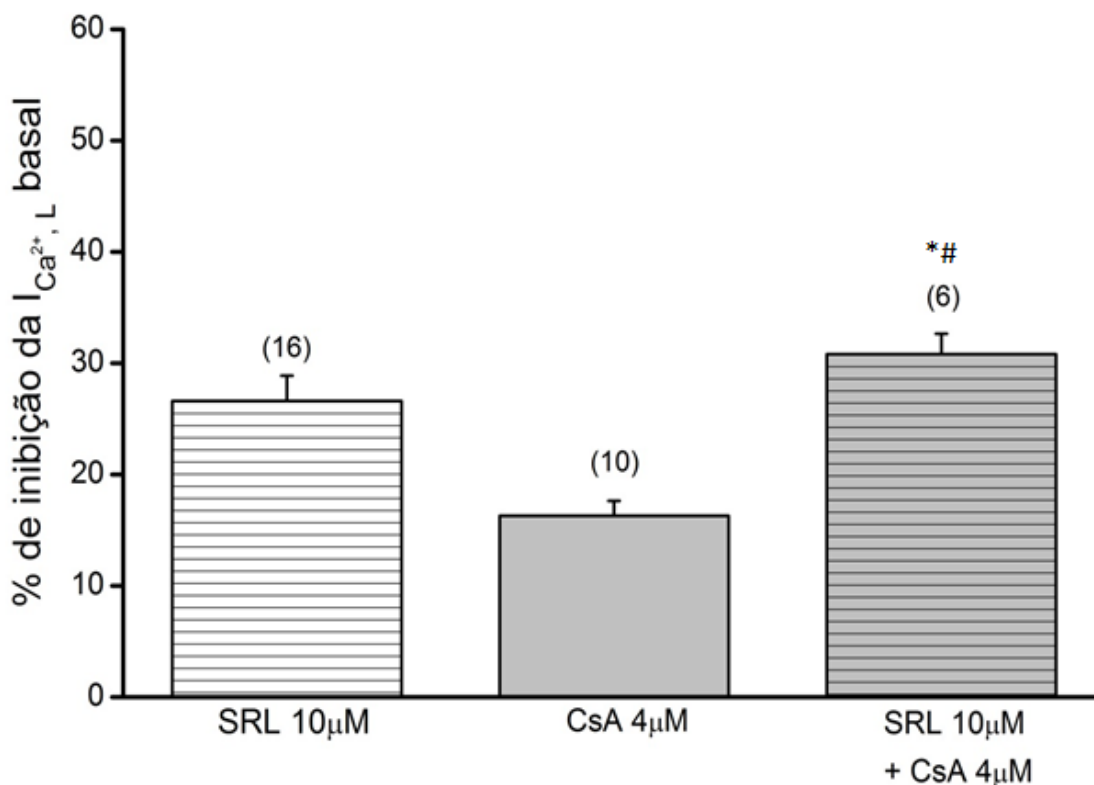


Figura 28 - Efeitos diretos das diferentes concentrações de SRL (10 μ M), CsA (4 μ M) e concentração combinada dos fármacos em células de cultura A7r5 usando a técnica de whole cell patch clamp. Os dados encontram-se expressos em percentagem (%) de inibição da intensidade de corrente dos LTCC ($I_{Ca^{2+}, L}$). As barras representam o valor médio e as linhas representam o erro padrão da média (S.E.M) das experiências entre parênteses. * $P < 0,05$ vs concentração CsA 4 μ M; # $P < 0,05$ vs concentração SRL 10 μ M.

Para terminar a análise das experiências eletrofisiológicas, resumam-se na figura 28 os efeitos verificados nas experiências combinatórias dos fármacos em estudo. Assim, verifica-se que as duas concentrações escolhidas em combinação potenciaram o efeito de relaxamento nas células A7r5, verificável pela maior percentagem de inibição dos LTCC alcançada (cerca de 45%), sendo este aumento estatisticamente significativo sobre os dois grupos de fármacos isoladas ($P < 0,05$). Além disso, salientar o caráter reversível do sinergismo entre fármacos e ainda a capacidade das células A7r5 recuperarem completamente com o processo de *washing-out*, o que demonstra a ação benéfica do SRL quando em sinergia com a CsA. Em suma, pode-se extrapolar com estes resultados inovadores que os tratamentos que utilizem os dois fármacos podem levar a efeitos mais duradouros e menos prejudiciais para a arquitetura renal.

De seguida, procedeu-se à verificação do comportamento de uma cultura de células A7r5 à influência indireta, após estimulação constritora, dos dois agentes farmacológicos. As experiências eletrofisiológicas caracterizaram um modelo em que se verificou a inibição dos canais de cálcio tipo-L mas, também, onde os canais de potássio, extremamente importantes para o mecanismo contrátil, estiveram bloqueados devido à composição das soluções

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

interna/externa utilizadas. A experiência eletrofisiológica analisou especificamente os LTCC devido ao facto de que em todas as formas de disfunção cardiovascular, incluindo a HTA, os canais de cálcio tipo-L se encontrarem envolvidos como foi observado anteriormente.

O objetivo das experiências de contratilidade no planar cell surfsse área (PCSA) é identificar corretamente como se dá o processo contrátil na célula e em que grau. Se as células respondessem com uma dilatação à CsA e/ou SRL, após uma contração com 3 agentes vasoconstritores (noradrenalina - NA; BAY-K; serotonina - 5-HT), isso indicaria com elevada probabilidade que a ação contrátil dos LTCC seria superior à contribuição dos canais de potássio no tipo de células escolhido. Este facto pode ser extremamente importante, porque pode confirmar o carácter vasodilatador dos fármacos e, assim, as suas condições benéficas em concentrações inferiores às da prática clínica. Este facto é de incrível relevância pois com a descoberta de estes mecanismos de ação poderá deixar de existir uma aplicação terapêutica apenas empírica. O procedimento de PCSA aplicado conseguiu com sucesso verificar contrações e dilatações em células A7r5 com concentrações diferentes de vários agentes tanto vasodiladores como vasoconstritores. Os 3 agentes contráteis referidos induzem uma despolarização na membrana plasmática que pode ativar os canais dependentes da voltagem, como os LTCC, que aumentam a concentração de cálcio e levam a um efeito contrátil. Após o extenso processo de otimização e pela primeira vez, estabeleceu-se um protocolo para um correto estudo de contratilidade com recurso ao fluoróforo de alta especificidade e durabilidade WGA.

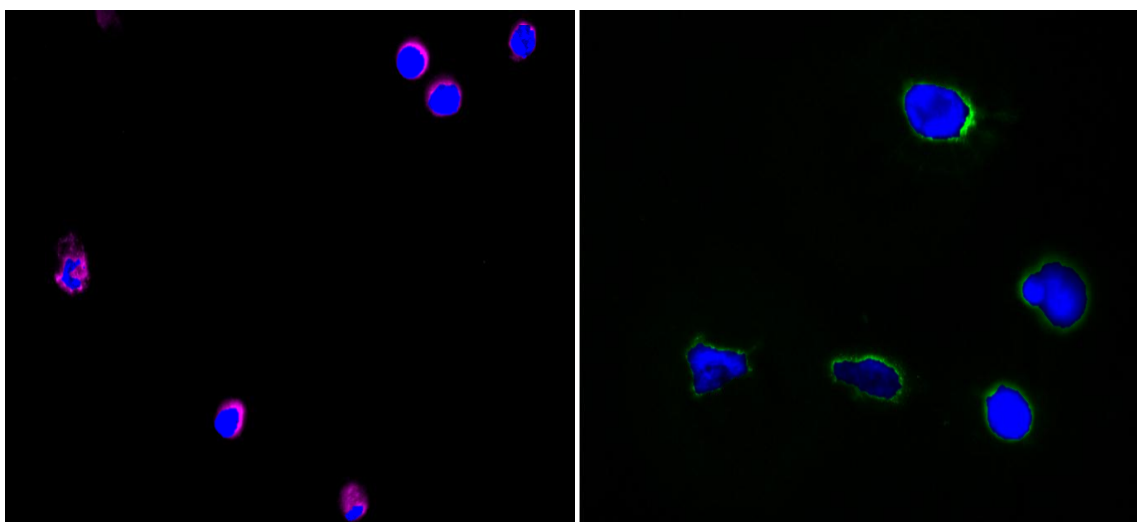


Figura 29 - Efeito da aplicação do agente CsA 4 µM (VIOLETA) sobre o efeito da NA 1 µM (AZUL) na resolução 40x - *ESQUERDA*; Efeito da aplicação do agente SRL 10 µM (VERDE) sobre o efeito da NA 1 µM (AZUL) na resolução 40x - *DIREITA* Sistema Zeiss Axio Observer Z1 com aplicação fluoróforo WGA e diferentes canais para as diferentes variáveis.

Com recurso ao sistema Zeiss Axio Observer Z1, pudemos utilizar o protocolo experimental previamente descrito. A primeira observação é a evidência de que enquanto nas experiências eletrofisiológicas o efeito dos fármacos CsA e SRL era praticamente imediato numa questão de segundos, nas experiências de contratilidade isso não acontece. Após a aplicação do estímulo contrátil (NA, 5-HT ou BAY) especificou-se o tempo 0 da experiência e aplicaram-se

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

as várias concentrações dos fármacos (exemplo figura 29). A monitorização contínua demonstrou que o efeito aconteceu 15 minutos depois, em média. O efeito adquirido tanto com a CsA como com o SRL com os diferentes agentes contráteis foi de dilatação, o que indica que a contribuição dos canais LTCC e a sua inibição sobrepõe-se à contribuição dos outros constituintes envolvidos na maquinaria contrátil. A CsA teve um efeito de relaxamento até um máximo de 140% sobre o efeito contrátil da 5-HT, 120% sobre o efeito da NA e 110% sobre o efeito do Bay-K. O SRL exibiu uma percentagem máxima de relaxamento de 100% sobre os efeitos contráteis da 5-HT e da NA e um máximo de 125% sobre o efeito do Bay-K. A combinação dos dois compostos evidenciou um efeito de relaxamento sobre a ação dos agentes contráteis (45-140%)(figura 30). Além disto, não se verificaram mudanças morfológicas nas células A7r5 utilizadas o que indica o efeito benéfico e de recuperação observado nas experiências eletrofisiológicas.

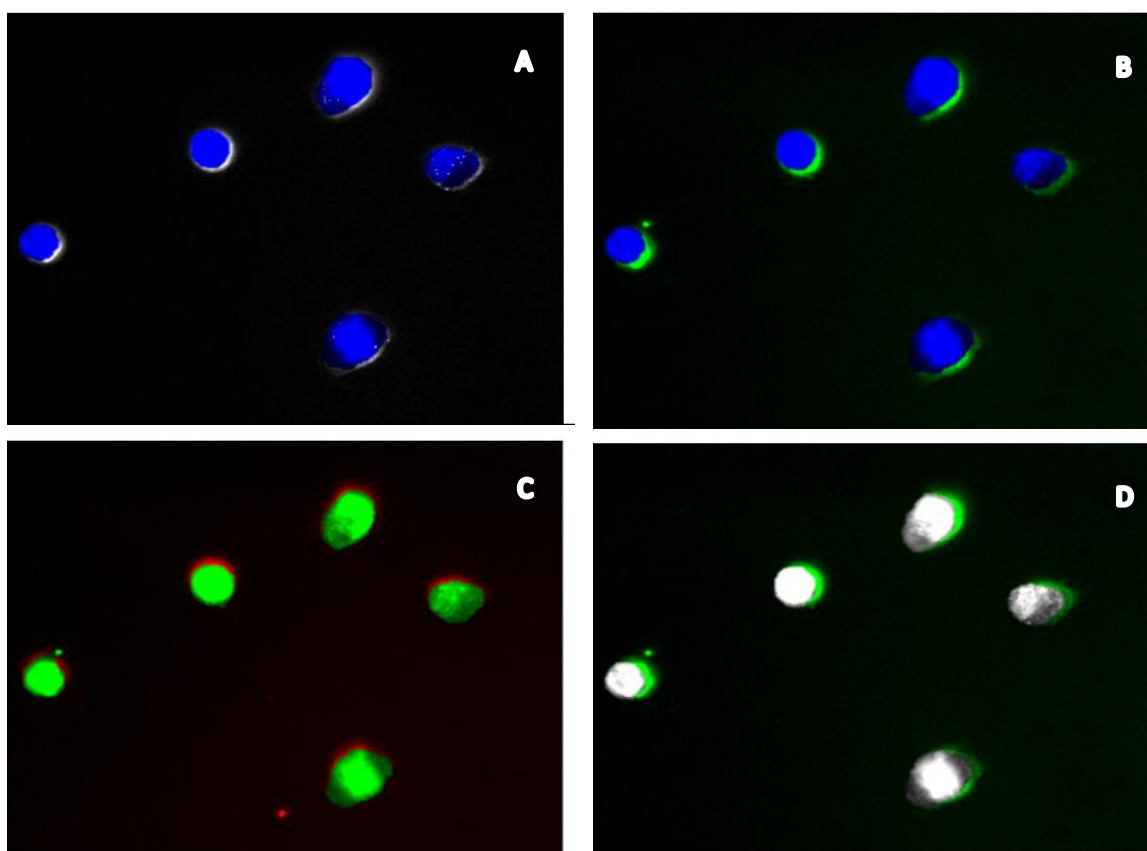


Figura 30 - Combinação dos resultados das experiências em PCSA. (A) efeito 5-HT 1 μM (azul) sobre o basal (branco); (B) efeito CsA 4 μM (verde) sobre o efeito do agente contrátil (azul); (C) efeito SRL 10 μM (vermelho) sobre o efeito de CsA 4 μM (verde); (D) comparação efeito agentes combinados (verde claro) sobre o basal (branco); Sistema Zeiss Axio Observer Z1 com marcação com WGA e diferentes canais para diferentes variáveis.

Sumariza-se agora as experiências de contratilidade realizadas em células A7r5 com os agentes farmacológicos em estudo. De realçar a reproduzibilidade dos efeitos demonstrada pelo elevado número de amostras utilizadas.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

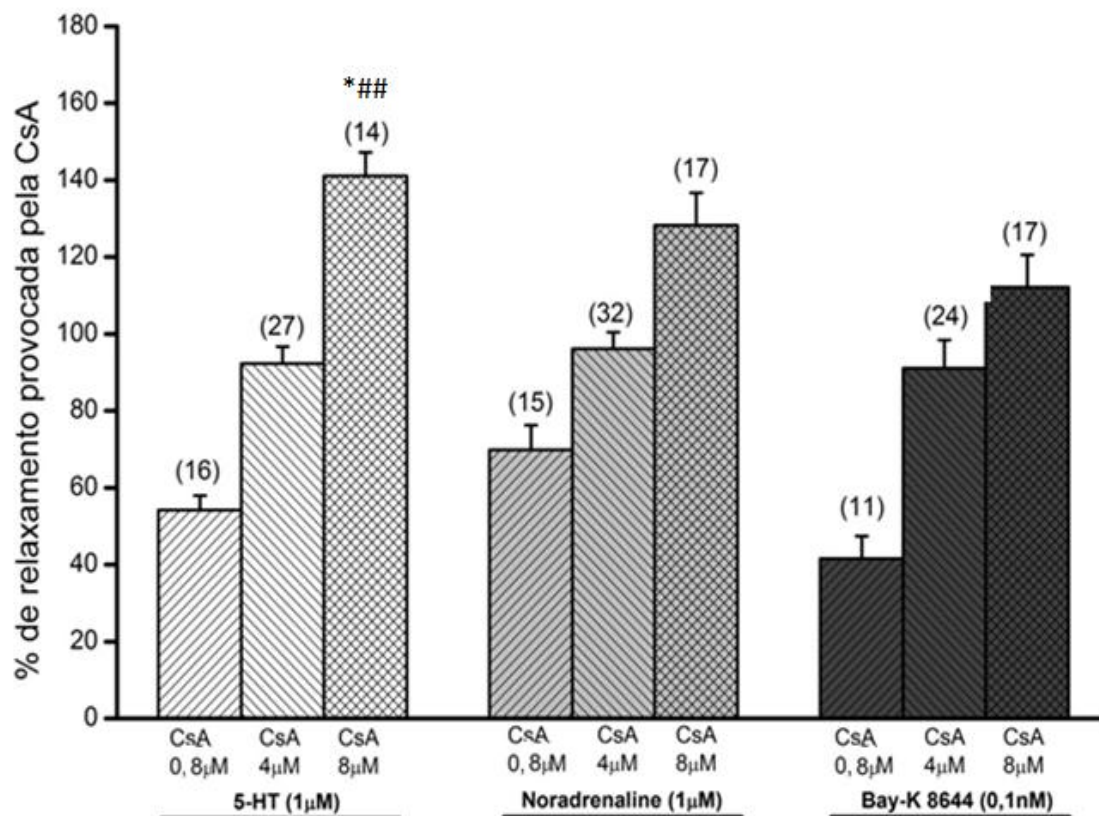


Figura 31 - Efeito de relaxamento, em percentagem, da CsA (0,4-8 μM) em células da linha A7r5 contraídas previamente com 5-HT (1 μM), noradrenalina (1 μM) e Bay-K 8644 (0,1 nM). Os dados estão expressos como percentagem de inibição sobre o efeito contrátil. As barras representam o valor médio e as linhas representam o erro padrão da média (S.E.M) das experiências entre parênteses. * P <0,05 vs concentração CsA 8 μM de NA; ## P <0,01 vs concentração CsA 8 μM de BAY;

Como se observa na figura 31, a CsA teve um efeito de relaxamento até um máximo de 140% sobre o efeito contrátil da 5-HT, 120% sobre o efeito da NA e 110% sobre o efeito do Bay-K, num número elevado de células consideradas, com significância estatística (P <0,01). É importante realçar que o efeito da CsA em análise da contratilidade da célula não aparece como cumulativo, mas sim dependente da concentração, facto que demonstra a existência de um outro mecanismo que explique esta diferença. Apesar de tudo, o relaxamento indica mais uma vez que a CsA inibe os LTCC e demonstra que estes canais são de grande relevância neste tipo de células e, conseqüentemente, um fator importante a considerar na patologia considerada.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

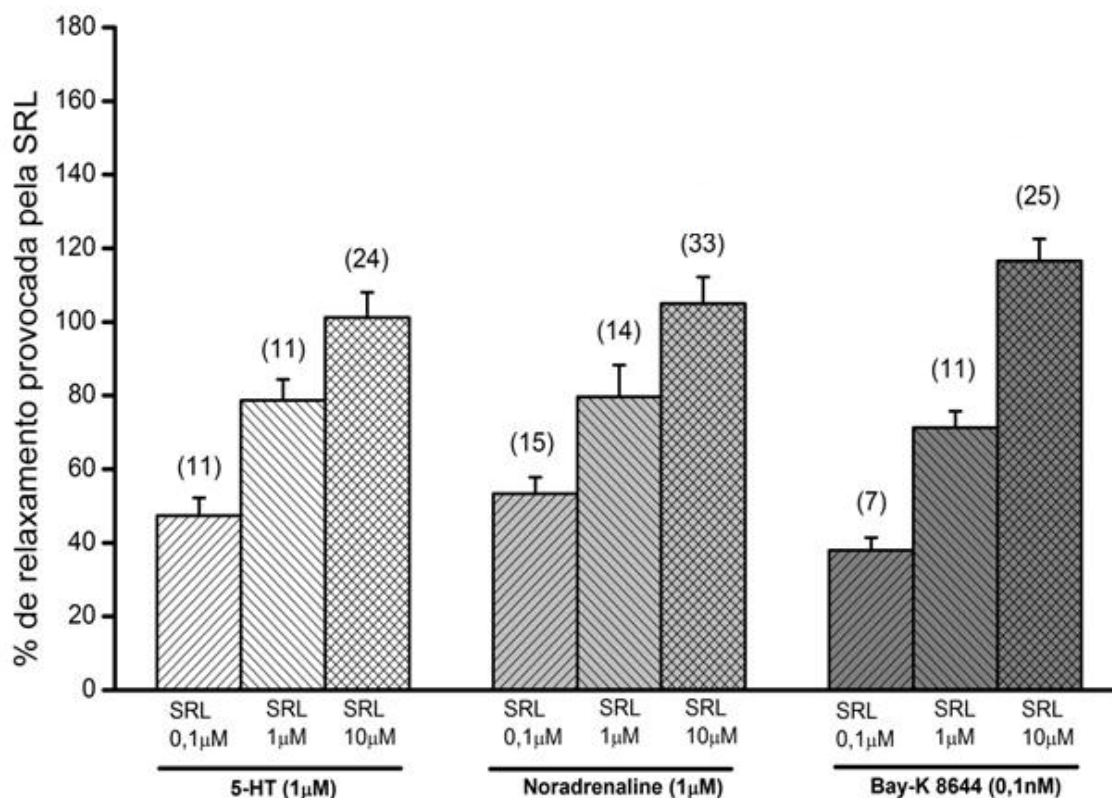


Figura 32 - Efeito de relaxamento, em percentagem, do SRL (0,1-10 μM) em células da linha A7r5 contraídas previamente com 5-HT (1 μM), noradrenalina (1 μM) e Bay-K 8644 (0,1 nM). Os dados estão expressos como percentagem de inibição sobre o efeito contrátil. As barras representam o valor médio e as linhas representam o erro padrão da média (S.E.M) das experiências entre parênteses.

Como se observa na figura 32, o SRL exibiu uma percentagem máxima de relaxamento de 100% sobre os efeitos contráteis da 5-HT e da NA ($P < 0,05$) e um máximo de 125% sobre o efeito do Bay-K ($P < 0,01$) num número elevado de células A7r5 consideradas. É importante realçar que o efeito do SRL em análise da contratilidade da célula mantém-se dependente e proporcional à concentração utilizada. Este relaxamento indica mais uma vez que o SRL inibe os LTCC e demonstra que estes canais são de grande relevância destes canais neste tipo de células.

Tabela 2 - Efeito de relaxamento da CsA (4 μM), SRL (10 μM) e combinado em células A7r5 contraídas com: serotonina (5-HT; 1 μM); noradrenalina (NA; 1 μM); and Bay-K (0,1 nM).

% de relaxamento no efeito contrátil	SRL 10 μM	CsA 4 μM	SRL 10 μM + CsA 4 μM
5-HT	100,43 ± 3,21	90,86 ± 2,37	150,02 ± 1,05
NA	105,37 ± 2,85	95,45 ± 4,56	150,67 ± 2,34
Bay - K	118,14 ± 1,76	98,91 ± 7,81	140,49 ± 5,68

Os dados estão expressos em percentagem de inibição sobre o efeito contrátil. Os valores são a média ± desvio padrão das experiências realizadas.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Na tabela 2, apresentamos os valores das experiências de contratilidade com os agentes combinados. Assim, verificamos que o SRL (10 μM) e a CsA (4 μM) apresentam valores similares aos registados na experiência com os agentes isolados. A combinação dos dois agentes volta a realçar o potenciamento do efeito inibitório sobre os LTCC e do relaxamento sobre o efeito contrátil de vários agentes. Esta ação combinada pode levar a valores entre os 140 e os 150% sobre o efeito dos agentes vasoconstritores, o que demonstra a eficácia destes agentes farmacológicos no relaxamento das células A7r5.

Estes resultados permitem uma extrapolação para conjunto de células e outros tecidos superiores. A interação presente com outros elementos e o balanço constrição/relaxamento ser favorável para o segundo indica que mesmo com outros fatores os agentes farmacológicos, nestas concentrações, podem ser benéficos e contrariar a toxicidade inerente com as concentrações clínicas empiricamente usadas. A utilização de outros equipamentos pode fornecer uma visão ainda maior do mecanismo de ação do SRL e CsA. A utilização das duas técnicas supracitadas permitiu desvendar um papel mecanístico da CsA e SRL ainda desconhecido, a nível das células vasculares do músculo liso.

Em sùmula, CsA e SRL são bloqueadores dos canais de cálcio, exercendo o seu efeito inibitório na subdivisão L destes canais de extrema importância no processo hipertensivo. Os bloqueadores de canais de cálcio atuam bloqueando os VOCC no músculo cardíaco e vasculatura. Consequentemente, o Ca^{2+} intracelular diminui, levando ao processo contrátil. Nos vasos sanguíneos, esta diminuição leva a uma menor capacidade de contração do músculo liso e, por conseguinte, um aumento no diâmetro arterial - dilatação (estes bloqueadores não atuam nas veias do músculo liso). A vasodilatação diminui a resistência total periférica, enquanto uma diminuição na capacidade contrátil cardíaca reduz o *output* cardíaco. A ação destes bloqueadores diminui a pressão sanguínea, o que pode provocar uma ação reflexa na atividade simpática (ativação do reflexo barorreceptor) que leva a um aumento da contratilidade e frequência cardíaca, sendo estes efeitos indesejáveis e verificáveis pela concentração de catecolaminas (Reis et al., 2000).

Caraterização do modelo animal experimental

Após as experiências iniciais, realizadas primeiramente numa célula isolada e depois na célula na sua totalidade, verificámos que a CsA e o SRL apresentam um perfil inibitório dos canais de cálcio do tipo-L, importantes na maquinaria contrátil e em patologias como a HTA. Este perfil conduz a um relaxamento deste tipo de células no vaso considerado com potencialidades de comparação com a aorta humana. Existiu sinergismo quando se combinaram os fármacos em estudo, o que indica um processo de vasodilatação aumentado e um potencial efeito hipertensivo reduzido.

O passo seguinte passou pela caracterização de um modelo experimental que mimetize o melhor possível as condições da prática clínica, para se poder efectuar uma comparação

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

sustentada e analisar o impacto dos tratamentos prolongados com os fármacos, a nível da sua toxicidade e da evolução da HTA. Os dados anteriores demonstram um relaxamento que não é consistente com os efeitos indesejáveis hipertensivos secundários da CsA.

O nosso grupo de trabalho desenvolveu e caracterizou um modelo animal de HTA arterial secundária à CsA e SRL. Na verdade, o rato Wistar (utilizado neste estudo) reproduz o desenvolvimento humano de HTA arterial sequente à administração dos agentes em estudo. Morfologicamente, através de microscopia electrónica e de técnicas anatomopatológicas, constatou-se a existência de lesões compatíveis com os efeitos secundários dos fármacos:

- i. a nível renal foram encontradas lesões ligeiras, sobretudo com CsA, que pode ou não ser a causa daquela HTA arterial;
- ii. foram registadas alterações cardíacas dependentes da dose elevada;
- iii. as lesões vasculares encontradas apresentavam uma severidade ligeira, predominando a ruptura e a desorganização das fibras elásticas. A aorta apresentava um perfil de lesões arterioscleróticas precoces associadas a alterações hemodinâmicas;
- iv. a nível celular, a microscopia electrónica revelou um aumento da síntese de colagénio com uma aparente relação entre este facto e a ruptura das fibras.

Antes do início dos tratamentos (semana 0) e no final (semana 9) foram avaliados os seguintes parâmetros:

- i. Peso corporal, do coração e do ventrículo esquerdo;
- ii. Concentrações sanguíneas de CsA e SRL;
- iii. Pressão arterial e frequência cardíaca.
- iv. Marcadores séricos de função renal (creatinina e ureia), creatina cinase, perfil lipídico (TGs e colesterol total), e peroxidação lipídica tecidual (aorta e rim);
- v. Análise da histomorfologia renal.

A concentração sanguínea de CsA e SRL, obtida pela administração contínua de doses de 5 mg/kg/dia e 1 mg/kg/dia, respetivamente, encontram-se dentro da média das que são encontradas em modelos humanos com regimes imunossupressores. Assim, nos ratos Wistar deste estudo as concentrações foram de 367.0 ± 45.5 ng/ml (CsA) e de $7,8 \pm 1,9$ ng/ml (SRL). Estes valores são superiores aos utilizados na primeira parte deste projeto com uma finalidade comparativa. Pretende-se avaliar o efeito dos fármacos em diferentes órgãos, sendo efeitos dependentes da presença dos fármacos em concentrações equiparadas às humanas.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

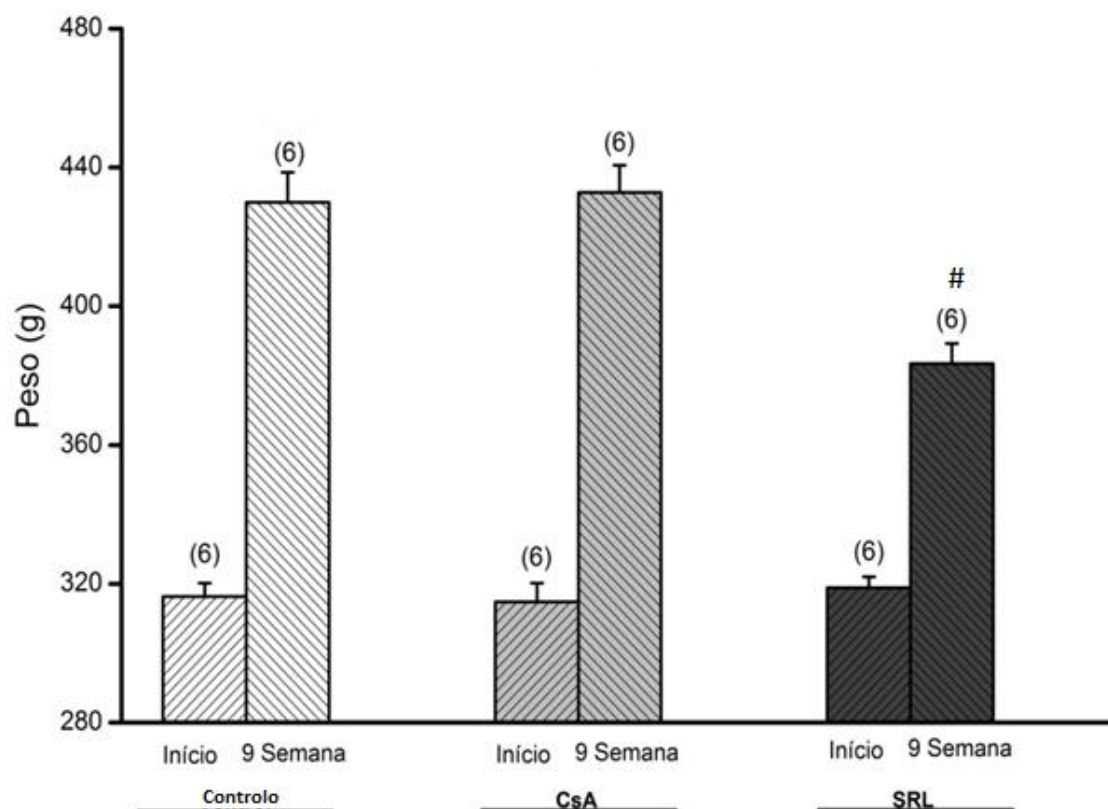


Figura 33 - Peso corporal (em gramas) dos grupos de ratos sujeitos aos diferentes tratamentos, no início (semana 0) e no final do estudo (semana 9). Dados expressos em médias \pm e.p.m. de n=6 em cada grupo. # $P < 0,05$ vs grupo CsA e grupo Controle, semana 9;

Em relação ao peso corporal (figura 33), verificou-se um aumento do peso em todos os grupos mas em diferente extensão. Nos ratos tratados apenas com a CsA registou-se uma variação de peso similar à encontrada no grupo controle. Contudo, nos ratos tratados com SRL verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($P < 0,05$). A diminuição do peso corporal é considerada um efeito secundário da administração de SRL, sendo característica da sua capacidade anti-proliferativa e anti-tumoral, proveniente da sua ação no ciclo celular. O menor peso corporal dos ratos tratados com SRL no tempo final (semana 9) relativamente aos ratos controle e CsA poderá ficar a dever-se a uma diminuição da massa muscular, uma hipótese com alguma relevância, já que a simples observação dos ratos permitia visualizar uma atrofia muscular neste grupo.

No início do estudo (semana 0), os valores de PA e de frequência cardíaca equiparavam-se para os três grupos de ratos em estudo e encontravam-se entre 330 e 335 mmHg.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

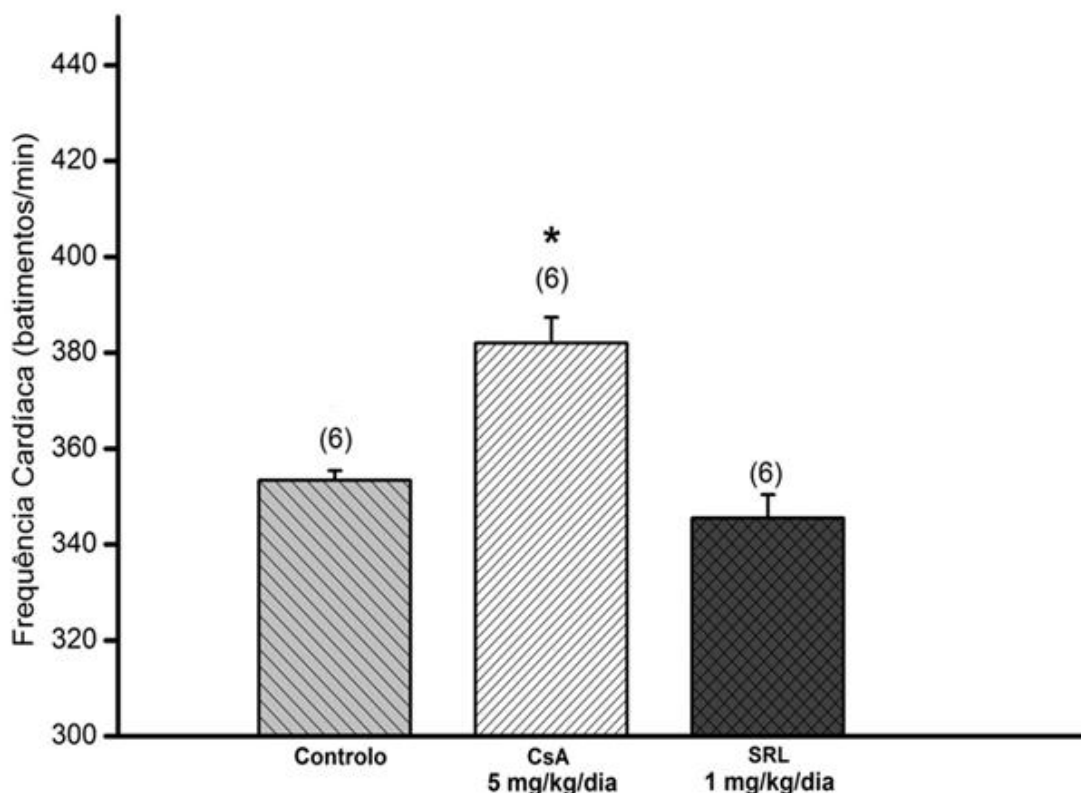


Figura 34- Frequência cardíaca de ratos dos 3 grupos de ratos em estudo no final do tratamento (semana 9). Dados apresenta em médias \pm e.p.m. de n=6 em cada grupo. * P <0,05 vs grupo controle.

No final do estudo (semana 9), como se observa na figura 34, a frequência cardíaca aumentou no grupo tratado com CsA em relação ao controle (P <0,05), sem alterações significativas no grupo tratado com SRL. A resposta simpatoexcitatória associada com a ação imunossupressora deve-se a mecanismo de reinício do reflexo barorreceptor arterial para um nível superior de PA. O rápido aumento da PA activa o reflexo barorreceptor que diminui o tónus simpático e aumenta o tónus vagal. A CsA provoca uma mudança acentuada a nível do controlo da frequência cardíaca associada a este reflexo (Ryuzaki, 1997). O efeito deste fármaco a nível do sistema nervoso simpático, demonstrado pelo aumento na concentração de catecolaminas (Reis *et al*, 2000), também tem influência na função renal, reduzindo o fluxo sanguíneo no rim. Podemos verificar em vários protocolos experimentais com CsA como terapêutica que os níveis de PA sistólica e diastólica assim como a PA média encontram-se bastante aumentados (Bader, 2005) e neste estudo esses valores encontram-se aumentados.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

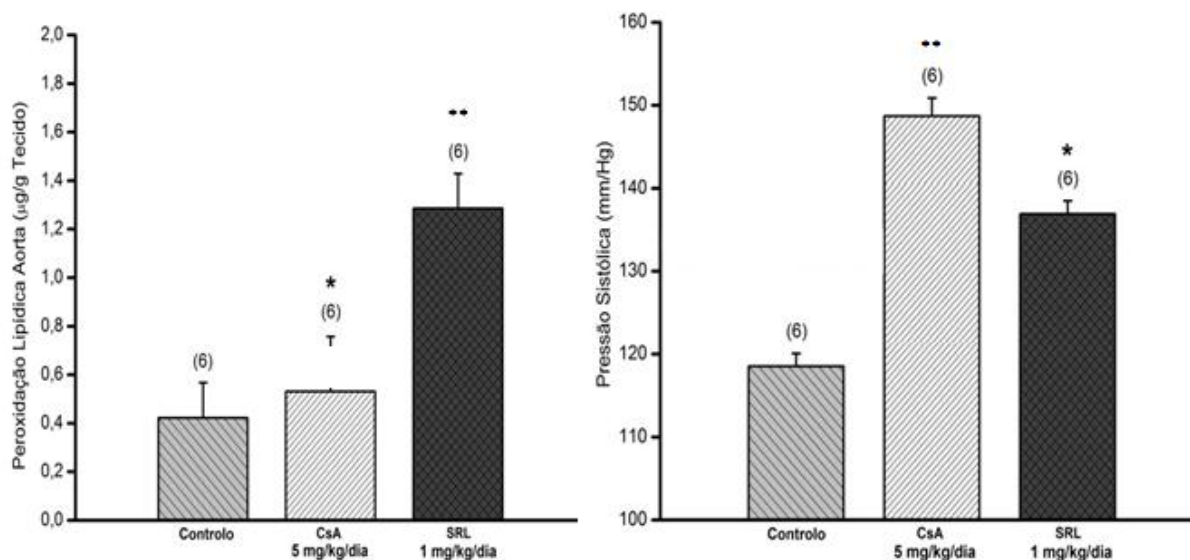


Figura 35 - Peroxidação lipídica (esquerda) na artéria aorta e pressão arterial sistólica (direita) e nos 3 grupos em estudo à nona semana de tratamento. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. de $n=6$ em cada grupo. * $P < 0,05$ vs grupo de controlo e ** $P < 0,01$ vs grupo de controlo.

A análise dos efeitos dos fármacos nos vasos principais, como é a aorta, e no coração, foi feita recorrendo a vários parâmetros, dos quais se destacam a peroxidação lipídica na aorta e a pressão sistólica. Estes parâmetros e as suas conclusões, juntamente com o previamente abordado, podem permitir obter uma ideia mais correta da ação dos fármacos a nível cardiovascular. Pela análise da figura 35, observa-se que a peroxidação lipídica na aorta foi significativamente superior no grupo tratado com SRL ($P < 0,01$) do que nos grupos controlo e CsA, com valores bastante similares. Este facto pode ser explicado pelo metabolismo lipídico alterado provocado pela inibição da mTOR, importante reguladora deste metabolismo. O efeito anti-ateroesclerótico do SRL está relacionado com mudanças no local de metabolismo lipídico nos vários tecidos-alvo e com o seu efeito anti-proliferativo e anti-inflamatório (Rangan, 2009). Este facto é suportado pelos aumentos verificados nos níveis de HDL e de LDL plasmáticos e tecidulares, em vários modelos animal e humano, de acordo com a literatura existente (Ma, 2007). O SRL possui efeitos diretos e específicos no metabolismo dos lípidos, promovendo a beta-oxidação enquanto diminui o fluxo para as vias de anabólicas de armazenamento dos lípidos (Brown, 2007). Juntamente com a actividade alterada e muito elevada da creatina cinase no grupo de tratamento de CsA verifica-se que o estado hipertensivo é, também, alcançado com um aumento substancial na pressão sistólica até perto dos 150 mm/Hg ($P < 0,01$), muita acima do grupo de controlo. O efeito hipertensivo confirma-se ser em menor escala no caso do SRL verificando-se um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) mas não suficientemente patológico ou indutor de estádios de HTA superiores.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

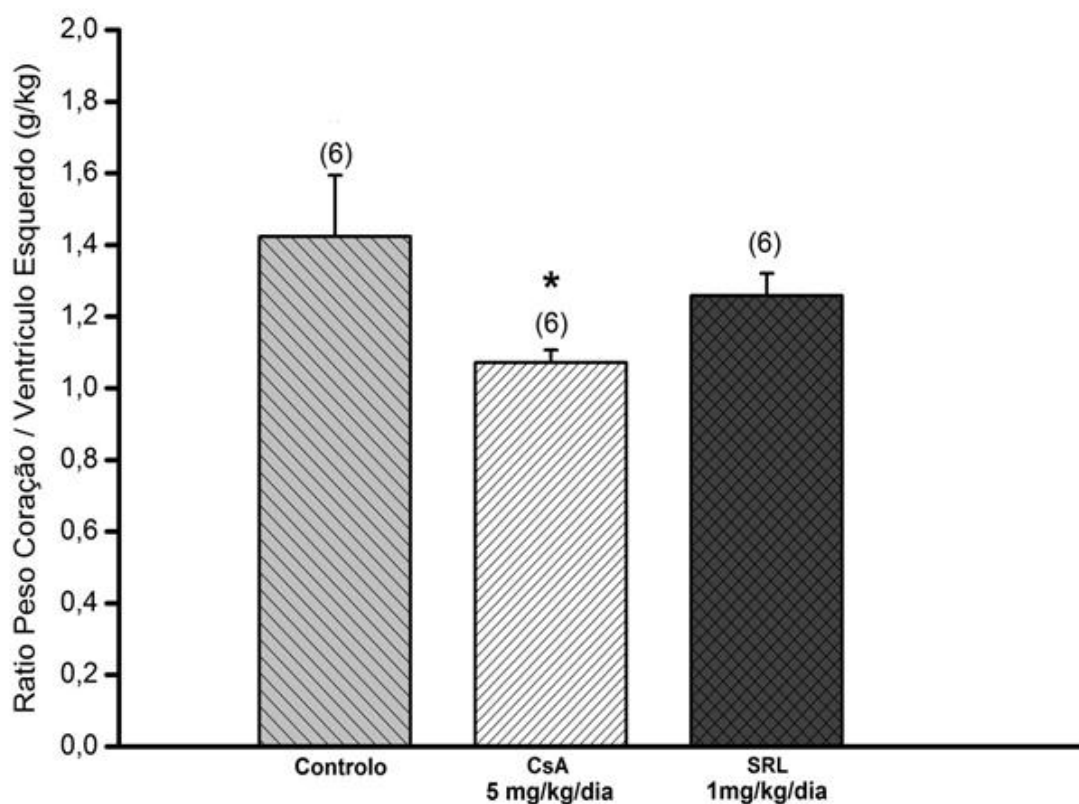


Figura 36 - *Ratio* peso do coração/peso do ventrículo esquerdo dos 3 grupos de ratos em estudo no final do tratamento (semana 9). Dados apresenta em médias \pm e.p.m. de de n=6 em cada grupo. * P <0,05 vs grupo controlo.

Na figura 36, observa-se no grupo tratado com CsA uma redução estatisticamente significativa (P <0,05) da razão peso cardíaco/peso do ventrículo esquerdo, o que sugere uma hipertrofia ventricular esquerda. A hipertrofia do tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) normalmente envolve um aumento da massa cardíaca devido ao crescimento dos cardiomiócitos, conseqüente de uma síntese proteica anormal. A CsA, a nível vascular, é pró-proliferativa sendo que esta característica advém do seu mecanismo de ação. Mais especificamente, provoca a proliferação da íntima que depois dá origem a patologias como a aterosclerose, sendo que também induz a proliferação da massa ventricular, fator exacerbado pelas elevadas pressões arteriais e de ejeção no ventrículo esquerdo.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos analisados às 9 semanas de tratamento.

Parâmetros Séricos	Controlo	CsA (5 mg/kg/dia)	SRL (1 mg/kg/dia)
Triglicéridos (mmol/l)	1,13 ± 0,10	2,22 ± 0,20*	1,48 ± 0,15
Colesterol Total (mmol/l)	1,27 ± 0,04	1,44 ± 0,05*	1,48 ± 0,13*
Creatinina (µmol/l)	33,59 ± 1,43	41,12 ± 2,51*	40,81 ± 2,16
Creatina Cinase (µmol/l)	17342 ± 1452	51094 ± 20221**	28356 ± 8001

Os valores são expressos em média±desvio padrão da média em n=6 ratos por grupo considerado. * P <0,05 vs grupo controlo, ** P <0,01 vs grupo controlo.

Considerando o perfil lipídico, o grupo CsA induziu um aumento nos níveis de triglicéridos em relação ao controlo (P <0,05), sendo este aumento em menor escala no grupo do SRL. Os níveis de colesterol encontram-se aumentados em todos os grupos de tratamento versus o grupo de controlo (tabela 3). Estes valores aumentados podem estar correlacionados com as lesões a nível da vasculatura provocados pelos fármacos, como por exemplo, arteriosclerose e congestão vascular. Os inibidores da calcineurina contraem as arteríolas eferentes, causando flutuações na perfusão glomerular e um aumento da creatinina sérica, cujo valor estava aumentado nos dois grupos tratados com os fármacos versus controlo, em especial para a CsA. Por fim, de assinalar o facto dos níveis de creatina cinase, um indicador de lesão muscular cardíaca, estarem aumentados nos dois grupos de tratamento, sendo o aumento mais acentuado no grupo de CsA (P <0,01). Uma função renal diminuída pode afetar os níveis de várias moléculas inflamatórias como a creatina cinase e creatinina (Malyszko, 2010).

Para além dos níveis de ureia, para a caracterização da eventual nefrotoxicidade foram avaliados parâmetros séricos de ureia e os níveis de peroxidação lipídica no rim (TBARS), bem como à análise da morfologia do tecido renal.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

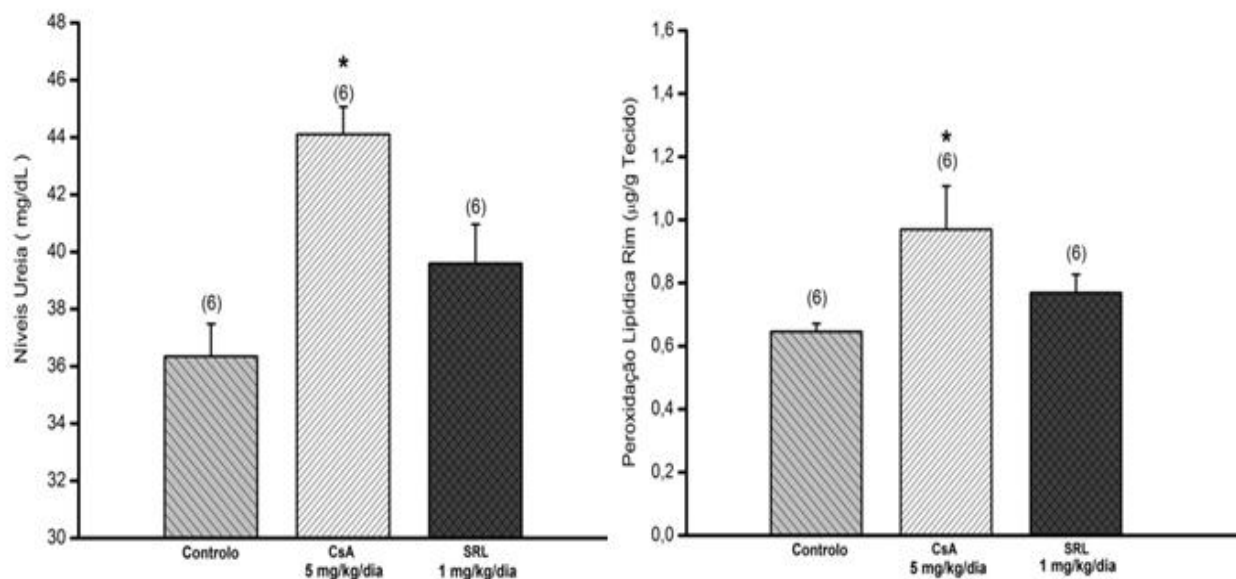


Figura 37 - Marcadores de nefrotoxicidade: níveis de ureia (esquerda) e de peroxidação lipídica no rim - TBARS (direita) nos 3 grupos em estudo à nona semana de tratamento. Dados apresentados em médias \pm e.p.m. de n=6 em cada grupo. * $P < 0,05$ vs grupo de controlo e de SRL 1 mg/Kg/dia.

Na figura 37, considerando os níveis de ureia, verifica-se que o grupo de administração de CsA possui uma elevação estatisticamente significativa em relação aos grupos controlo e de administração de SRL ($P < 0,05$), no qual se verifica uma mínima elevação. Estes níveis de ureia, tal como os de creatinina, são importantes marcadores séricos da (dis)função renal. Ambos os marcadores estão aumentados no grupo tratado com CsA em relação ao grupo controlo, o que sugere disfunção renal, já expectável. Estes dados foram complementados com os níveis de peroxidação lipídica no rim, um marcador da acção nefasta das espécies reativas sobre os lípidos do tecido renal. Foram encontrados níveis elevados de TBARS no grupo tratado com CsA. Estes valores elevados não foram registados no grupo de tratamento com SRL, o que demonstra o carácter menos nefrotóxico deste agente já anteriormente referido. Apresentam-se ainda os dados da análise histopatológica renal efectuada nos grupos em estudo, após as 9 semanas de tratamento. Constata-se, em consonância com os parâmetros séricos de função renal (creatinina e ureia), a existência de lesão renal no grupo tratado com CsA em relação ao grupo controlo, incluindo hiperémia, congestão vascular, arteriosclerose e vacuolização arterial. O tratamento com SRL provocou igualmente algum grau de lesão renal (Tabela 4 e Figura 38).

A CsA danificou significativamente a morfologia renal em comparação com grupos controlo (figura 38), demonstrando uma extensa degeneração na zona cortical, em particular na zona dos túbulos proximais (Tutanc et al., 2011).

A proliferação miointimal é um dos efeitos mais proeminentes nas doenças decorrentes dos transplantes associados a um tratamento com CsA. Além disto, as células endoteliais e do músculo liso apresentam deposição da matriz e assim tem-se a patogénese das lesões

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

vasculares (Esposito et al., 2000). Esta excessiva deposição da matriz extracelular resulta de uma disfunção a nível das proteínas que regulam a matriz.

Fisiologicamente, esta degradação proteica deve-se às metaloproteinases presentes na matriz (Doller et al., 2007). O SRL é mais renoprotectora e menos fibrogénica não apresentando danos tão severos (Luo, 2012).

Tabela 4- Análise semi-quantitativa das lesões renais vasculares com os diferentes grupos de tratamento.

Grupo	Hiperémia	Vacuolização Arterial	Arteriosclerose	Congestão Vascular
Controlo	0	0,17 ± 0,17	0,17 ± 0,17	0
CsA (5 mg/Kg)	1,17 ± 0,31*	1,67 ± 0,33*	1,17 ± 0,40*	0,67 ± 0,07*
SRL (1 mg/Kg)	1,50 ± 0,22*	0,83 ± 0,30	0,23 ± 0,15#	1,00 ± 0,00*

Os dados encontram-se expressos como médias±desvio padrão das médias de cada grupo de 6 ratos. * P <0,05 vs controlo; # P <0,05 vs CsA.

As lesões mais comuns nas imagens histopatológicas foram: hiperémia, vacuolização arterial, arterioesclerose e congestão vascular. A hiperémia resulta da congestão a nível arterial, resultando numa vasodilatação e num aumento do peso do órgão pela acumulação de sangue dentro dos vasos, sendo característica da inflamação aguda. Pode haver rebentamento da circulação para a marginação dos leucócitos. Microscopicamente há uma boa visão dos vasos, que se encontram cheios de sangue e dilatados. Na tabela 4, podemos verificar que a CsA e SRL apresentaram hiperémia em relação ao controlo (P <0,05).

A vacuolização arterial demonstra a presença de vacúolos dentro das paredes das artérias. A arterioesclerose é uma doença multifatorial, com um metabolismo lipídico alterado e uma inflamação crónica seguidos da perda de elasticidade e espessamento. Apenas o grupo da CsA apresentou um dano significativamente considerável em relação ao controlo, no caso da vacuolização arterial, e em relação ao controlo e grupo SRL no caso da arteriosclerose.

Por fim, a congestão vascular está relacionada com o aumento da quantidade de sangue dentro do sistema vascular. Os dois grupos de tratamento apresentam um aumento estatisticamente significativo (P <0,05) em relação ao grupo controlo do estudo.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

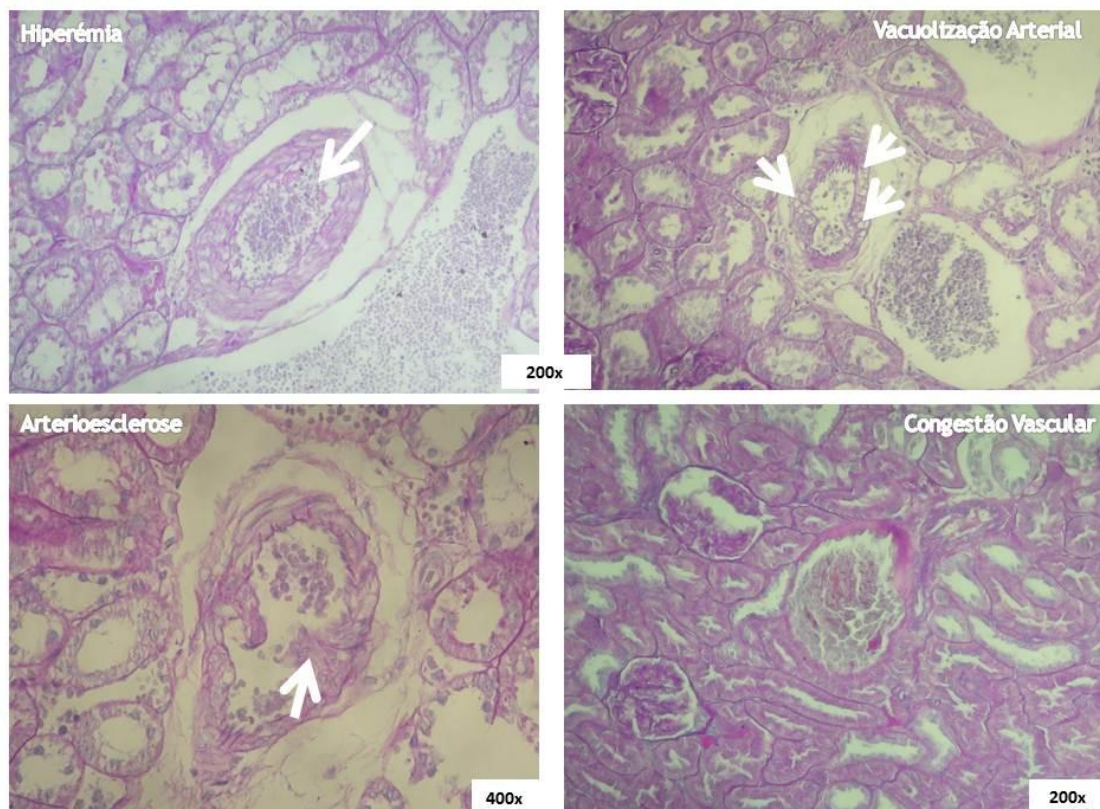


Figura 38 - Diferentes lesões renais verificadas nas análises histopatológicas com amostras dos grupos de tratamento de CsA e SRL.

Capítulo V

Conclusão e Perspetivas Futuras

Após a conclusão deste protocolo experimental, sumarizam-se agora os factos mais relevantes da aplicação deste método assim como as perspetivas futuras para a maior compreensão do efeito e mecanismo de ação da CsA e SRL.

A HTA pós-transplante gera sérios riscos cardiovasculares que podem prejudicar a longo prazo um transplante eficaz. A CsA é um dos imunossuppressores mais utilizados na prevenção da rejeição do transplante e de doenças autoimunes. No entanto, o seu uso clínico é prejudicado pela sua significativa nefrotoxicidade bem como pelo desenvolvimento de disfunção endotelial e vasculopatia a nível do transplante. O SRL é uma lactona macrocíclica com um novo mecanismo de ação imunossupressora e alto grau de sinergismo com a CsA que permite uma eficiente prevenção da rejeição assim como uma minimização da toxicidade induzida pela CsA. Contudo, muito pouco é conhecido tendo em consideração os supostos mecanismos associados à proteção cardiorenal e aos efeitos vasomotores, distintos dos associados à CsA.

Neste estudo utilizaram-se as células da aorta de rato embrionário, A7r5. A célula do músculo liso, de fácil obtenção, permite investigar os diferentes tipos de sinalização intracelular que ocorrem e são o modelo com maior proximidade à fisiologia das células humanas. Assim, foram as escolhidas para mimetizar um modelo para ação dos agentes imunossuppressores considerados.

O objectivo desta atividade experimental foi a determinação dos efeitos vasculares do SRL e/ou CsA em culturas de células da aorta de rato (A7r5) e, também, para comparar os efeitos cardiorenais num modelo animal com os dois fármacos.

O SRL e a CsA têm efeitos não genómicos vasculares que incluem a vasodilatação que parece envolver uma modulação de vários canais iónicos, especialmente os canais de cálcio tipo-L, que são importantes em todos os modelos hipertensivos já estudados na literatura. Neste estudo, analisámos o efeito de dois agentes imunossuppressores, na intensidade de corrente dos LTCC pelo whole cell patch clamp em células A7r5, o que foi uma experiência inovadora nunca antes realizada. Neste estudo, analisámos os efeitos de cada um dos agentes imunossuppressores referenciados sem considerar o processo de transplantação, abordando apenas os efeitos dos agentes, *per se*. No entanto, mesmo que o estudo não verifique a forte influência da transplantação no processo de recuperação e os seus efeitos adversos, este é o primeiro estudo a analisar os efeitos da CsA e do SRL a nível celular e cardiorenal, através de uma cuidada análise desde o sistema celular até ao organismo completo - modelo animal. A complexidade de resultados a nível da ação da CsA sobre preparações multicelulares cardíacas ou apenas de uma célula ainda precisa de ser explicada embora este trabalho tenha elucidado o carácter vasodilatador deste agente, em concentrações menos elevadas mas com

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

poder imunossupressor considerável descrito na literatura. Os inibidores de calcineurina possuem uma toxicidade que é derivada da sua concentração no sangue e nos vários tecidos como se observa pelas diferenças entre utilizar uma concentração superior ou não de CsA e a sua influência na prática clínica actual. O facto inovador deste estudo observado com as concentrações mais baixas de CsA apresenta-se como um bom indicador do verdadeiro mecanismo de ação deste agente. A nível farmacocinético na prática clínica, os fármacos podem ter efeitos imprevisíveis, devido às diferenças entre indivíduos, incluindo grandes diferenças a nível do metabolismo hepático e absorção do fármaco o que pode afetar os resultados observados a nível sistémico. Isto não ocorre com os estudos eletrofisiológicos e de contratilidade apresentados pois consideram os efeitos a nível de células isoladas, respeitantes de várias condições de otimização.

Este protocolo experimental permitiu demonstrar que a CsA inibe os LTCC de uma maneira não dependente da concentração e, a concentrações mais elevadas, induz uma instabilidade celular irreversível, o que pode corroborar a tese de que altas concentrações do fármaco sejam prejudiciais a médio-longo prazo, facto também sustentado pelas lesões na arquitectura renal verificadas no modelo animal. O SRL apresenta uma ação, também, inibitória dependente da concentração considerada e sem provocar disfunção a nível da reatividade celular. Verifica-se o sinergismo entre os dois fármacos com uma inibição dos LTCC potenciada e totalmente irreversível. Estes efeitos demonstram a importância a nível da reatividade vascular e sugerem que este efeito vascular observado não é responsável pelo desenvolvimento de HTA observável em doentes transplantados tratados com estes fármacos. A ação do SRL e CsA na célula na totalidade da célula foi verificada em experiências de contratilidade. O elevado efeito de relaxamento dos dois agentes nas concentrações consideradas sobre a ação de variados agentes contráteis permite afirmar o seu papel de relevância na reatividade vascular, assim como admitir uma contribuição superior dos LTCC sobre os canais de potássio na maquinaria contrátil de excitação-relaxamento.

O modelo animal de 9 semanas com ratos envolveu o uso de doses dos fármacos que mimetizam as usadas na prática clínica em contraste com as experiências eletrofisiológicas e de contratilidade. Este facto permitiu uma comparação dos efeitos dos agentes farmacológicos. Muitas comparações e protocolos experimentais revelaram que o SRL exhibe mínima nefrotoxicidade a concentrações imunossupressoras normais quando comparada com a CsA, o que se observou no modelo animal em estudo. A CsA promoveu disfunção cardiorenal, caracterizada por HTA arterial, taquicardia, aumento da ureia sérica, dislipidémia. O SRL promoveu menos efeitos cardiorenais mas demonstrou ser pró-hipertensiva e pró-dislipidémica. No entanto, a CsA promoveu *stress* oxidativo renal e taquicardia, enquanto o SRL interfere principalmente no perfil lipídico dos grandes vasos (aorta). Os efeitos hipertensivos estão associados com deficiências em diferentes vias cardiovasculares e renais. Pouco é conhecido dos efeitos vasomotores do SRL e estudos preliminares em vários modelos animais conduziram a resultados conflituosos, razão pela qual se pretendeu aprofundar esta temática de elevada relevância clínica. O conhecimento mais aprofundado do mecanismo de

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

vasodilatação provocada pela CsA e SRL pode contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas mais específicas no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares. A compreensão dos mecanismos moleculares destes fármacos poderá ser muito importante para a prevenção e/ou controlo dos graves efeitos secundários pós-transplante que lhes estão associados, o que teria um impacto nas taxas de sobrevivência dos transplantes que, apesar de bastante superiores hoje em dia, ainda podem ser elevadas de forma a melhorar a qualidade de vida dos doentes. A investigação é intensa nesta área, mas existem muitos resultados contraditórios, sendo importante obter confirmações futuras das observações agora obtidas. A reprodutibilidade dos nossos resultados é de especial importância para futuros trabalhos de investigação. O uso de concentrações menos elevadas dos fármacos, mas ainda assim eficazes e dentro da janela terapêutica, especialmente da CsA, pode conduzir à abolição total da nefrotoxicidade e cardiotoxicidade. Estudos eletrofisiológicos devem ser continuados para análise da contribuição de outro tipo de canais na maquinaria contrátil da célula assim como a utilização de concentrações ainda mais reduzidas para potenciar o efeito benéfico verificado na reatividade vascular. Outras linhas celulares, principalmente de linhas celulares do fígado e rim, devem ser estudadas por este inovador protocolo para verificação da extensão sistémica do SRL e CsA. A nível dos estudos de contratilidade, devem-se aplicar diferentes concentrações com outros agentes constritores para definição do balanço relaxamento/constricção nos diferentes tipos celulares. Novas condições experimentais devem ser consideradas assim como utilização de novos fluoróforos para marcação de outras estruturas celulares.

Este protocolo experimental deve ser complementado com experiências em banho de órgãos com aorta e outros tecidos (renal e hepático) para verificação do efeito dos fármacos sobre os mesmos e confirmar a vasodilatação. Além destes protocolos mais específicos devem ser utilizados protocolos para aferir a ação genómica dos dois agentes com análise da expressão de canais de cálcio tipo-L e de potássio para verificar se a vasodilatação se mantém como fator majorante.

Todo este trabalho de investigação, apesar de trabalhoso foi bastante recompensador pelo seu caráter de inovação e pelas potencialidades geradas pelos seus resultados. Estas observações comparadas com as do modelo animal utilizado poderão no futuro ajudar a melhorar o conhecimento sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos secundários cardiorenais dos fármacos. Este conhecimento poderá ser determinante para redução ou controlo daqueles efeitos graves, melhorando assim a sobrevida dos enxertos, reduzindo a mortalidade cardiovascular dos doentes transplantados e melhorando a sua qualidade de vida.

Referências Bibliográficas

- Akaike, N., Kanaide, H., & Kuga, T. (1989). Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *The Journal of physiology*, 416, 141-160. Retrieved from <http://jp.physoc.org/content/416/1/141.short>
- Akata, T. (2007). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone . Part 1 : basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone, 220-231. doi:10.1007/s00540-006-0487-5
- Al-Aghbar, M. N., Alexander, G. J., Nouri-Aria, K. T., Neuberger, J., Eddleston, a L., & Williams, R. (1986). In vitro effect of cyclosporin A on immunoglobulin production and concanavalin A induced suppression in primary biliary cirrhosis. *Gut*, 27(3), 317-23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1433424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Amberg, G. C., Bonev, A. D., Rossow, C. F., Nelson, M. T., & Santana, L. F. (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance , Ca²⁺ activated K⁺ channels in vascular, 112(5), 717-724. doi:10.1172/JCI200318684.Introduction
- Arner, A., & Pfitzer, G. (1999). Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 134, 63-146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087908>
- Asano, M., & Nomura, Y. (2003). Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 26(1), 97-106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12661918>
- Bader, F. M., Hagan, M. E., Crompton, J. A., & Gilbert, E. M. (2005). The effect of beta-blocker use on cyclosporine level in cardiac transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 24(12), 2144-7. doi:10.1016/j.healun.2005.05.002
- Barany, M. (1996). Biochemistry of smooth muscle contraction. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=bFm2_itiQTUC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Biochemistry+of+smooth+muscle+contraction&ots=rEXlyhpiKr&sig=XfDhJ-0Bmhx0Pj_UW0QQqQd0pLU
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), 517-29. doi:10.1038/nrm1155
- Black, H. (2006). Hypertension: A companion to Braunwald's heart disease. *Recherche*. Retrieved from <http://www.lavoisier.fr/livre/notice.asp?id=RKRWXOA2OA2OWX>
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A., & Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart : the beat goes on, 115(12). doi:10.1172/JCI27167.3306
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., et al. (2001). Calcium signalling--an overview. *Seminars in cell & developmental biology*, 12(1), 3-10. doi:10.1006/scdb.2000.0211

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., & Stähelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and actions*, 6(4), 468-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8969>
- Bratz, I. N., Falcon, R., Partridge, L. D., Kanagy, N. L., Zhang, J., Lee, M. Y., Cavalli, M., et al. (2002). Vascular smooth muscle cell membrane depolarization after NOS inhibition hypertension. *AJP: Cell Physiology*. doi:10.1152/ajpheart.00824.2001
- Brown, N. F., Stefanovic-Racic, M., Sipula, I. J., & Perdomo, G. (2007). The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism: clinical and experimental*, 56(11), 1500-7. doi:10.1016/j.metabol.2007.06.016
- Brunner, H. R., Turini, G. A., Waeber, B., Nussberger, J., & Biollaz, J. (1983). The clinical application of converting enzyme inhibitors. *Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice*, 5(7-8), 1355-66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6315273>
- Bueno, O. F., Rooij, E. V., Molkentin, J. D., Doevendans, P. A., & Windt, L. J. D. (2002). Calcineurin and hypertrophic heart disease : novel insights and remaining questions, 53, 806-821.
- Cairrão, E., Alvarez, E., & Correia, I. (2009). Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels, 175-184. doi:10.1007/s11626-008-9161-6
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., & Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 36(2), 107-260. doi:10.1080/20014091074183
- Cataldi, M., Perez-Reyes, E., & Tsien, R. W. (2002). Differences in apparent pore sizes of low and high voltage-activated Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 277(48), 45969-76. doi:10.1074/jbc.M203922200
- Catterall, W. A., Perez-reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology . XLVIII . Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411-425. doi:10.1124/pr.57.4.5.units
- Chaaya, R., Alfarano, C., Guilbeau-Frugier, C., Coatrieux, C., Kesteman, A.-S., Parini, A., Fares, N., et al. (2011). Pargyline reduces renal damage associated with ischaemia-reperfusion and cyclosporin. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(2), 489-98. doi:10.1093/ndt/gfq445
- Chen, J., Li, L., Wen, J., Tang, Z., Ji, S., Sha, G., Cheng, Z., et al. (2008). Observation of efficacy and safety of converting the calcineurin inhibitor to sirolimus in renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation proceedings*, 40(5), 1411-5. doi:10.1016/j.transproceed.2008.03.096
- Chiu, J., & Chien, S. (2011). Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives, 327-387. doi:10.1152/physrev.00047.2009.
- Cinnamon, Y., Feine, O., Hochegger, H., Bershady, A., & Brandeis, M. (2009). Cellular contractility requires ubiquitin mediated proteolysis. *PLoS one*, 4(7), e6155. doi:10.1371/journal.pone.0006155

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- Clempus, R. E., & Griendling, K. K. (2006). Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*, 71, 216-225. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.033
- Cole, W. C., & Welsh, D. G. (2011). Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Archives of biochemistry and biophysics*, 510(2), 160-73. doi:10.1016/j.abb.2011.02.024
- Cribbs, L. L. (2006a). T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. *Cell calcium*.
- Cribbs, L. L. (2006b). T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. *Cell calcium*, 40(April), 221-230. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.026
- Cristina, I., & Pereira, G. (2008). A RELAÇÃO ENTRE DOENÇA CARDIOVASCULAR E SEUS FACTORES DE RISCO.
- Dick, A. D., Azim, M., & Forrester, J. V. (1997). Immunosuppressive therapy for chronic uveitis: optimising therapy with steroids and cyclosporin A, 1107-1112.
- Ding, B., Price, R. L., Borg, T. K., Weinberg, E. O., Halloran, P. F., & Lorell, B. H. (1999). Pressure Overload Induces Severe Hypertrophy in Mice Treated With Cyclosporine, an Inhibitor of Calcineurin. *Circulation Research*, 84(6), 729-734. doi:10.1161/01.RES.84.6.729
- Djamali, A., Sadowski, E. a, Muehrer, R. J., Reese, S., Smavatkul, C., Vidyasagar, A., Fain, S. B., et al. (2007). BOLD-MRI assessment of intrarenal oxygenation and oxidative stress in patients with chronic kidney allograft dysfunction. *American journal of physiology. Renal physiology*, 292(2), F513-22. doi:10.1152/ajprenal.00222.2006
- Drewe, J., Beglinger, C., & Kissel, T. (1992). The absorption site of cyclosporin in the human gastro- intestinal tract, 39-43.
- Dupont, P. (2003). The evolving role of sirolimus in renal transplantation. *Qjm*, 96(6), 401-409. doi:10.1093/qjmed/hcg072
- Er, F., Michels, G., Brandt, M. C., Khan, I., Haase, H., Eicks, M., Lindner, M., et al. (2007). Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: Acute actions antagonize chronic effects, 41, 467-477. doi:10.1016/j.ceca.2006.09.003
- Etienne, I., Toupance, O., Bénichou, J., Thierry, A., Al Najjar, A., Hurault de Ligny, B., Le Meur, Y., et al. (2010). A 50% reduction in cyclosporine exposure in stable renal transplant recipients: renal function benefits. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 25(9), 3096-106. doi:10.1093/ndt/gfq135
- Filipa, A., & Castro, C. D. (2010). *Stress oxidativo e Hipertensão Arterial Essencial Stress Oxidativo e Hipertensão Arterial Essencial Oxidative Stress and Essential Arterial Hypertension*.
- Fisher, S. a. (2010). Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological genomics*, 42A(3), 169-87. doi:10.1152/physiolgenomics.00111.2010
- Gagliardini, E., & Benigni, A. (2006). Role of anti-TGF-beta antibodies in the treatment of renal injury. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(1-2), 89-96. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.005

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- Garcia, S. (2004). Ciclosporina A e tacrolimus : uma revisão, 393-401.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., & Rourke, S. T. O. (2006). Large-conductance , calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications, *110*, 103-116. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.007
- Giles, T. (1997). Hypertension and pathologic cardiovascular remodeling: a potential therapeutic role for T-type calcium antagonists. *Clinical therapeutics*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291897800355>
- Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C., & Savage, K. (2002). Elastic proteins: biological roles and mechanical properties, (February), 121-132. doi:10.1098/rstb.2001.1022
- Grześk, G., Wiciński, M., Malinowski, B., Grześk, E., Manysiak, S., Odrowąż-Sypniewska, G., Darvish, N., et al. (2012). Calcium blockers inhibit cyclosporine A-induced hyperreactivity of vascular smooth muscle cells. *Molecular medicine reports*, *5*(6), 1469-74. doi:10.3892/mmr.2012.847
- Gunst, S. J., & Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *American journal of physiology. Cell physiology*, *295*(3), C576-87. doi:10.1152/ajpcell.00253.2008
- Hannigan, G. E., Coles, J. G., & Dedhar, S. (2007). Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circulation research*, *100*(10), 1408-14. doi:10.1161/01.RES.0000265233.40455.62
- Higgins, R. (2004). Hyponatraemia and hyperkalaemia are more frequent in renal transplant recipients treated with tacrolimus than with cyclosporin. Further evidence for differences between cyclosporin and tacrolimus nephrotoxicities. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *19*(2), 444-450. doi:10.1093/ndt/gfg515
- Hilgers, R. H. P., Webb, R. C., & Ebb, R. C. L. W. (2005). Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 829-835.
- Hill-eubanks, D. C., Werner, M. E., Heppner, T. J., Nelson, M. T., Espinosa-tanguma, R., Neil, C. O., Chrones, T., et al. (2012). Ca²⁺ oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. doi:10.1152/ajpheart.01035.2001
- Hirano K, Hirano M, K. H. (2004). Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *Journal of Smooth Muscle Research*, *40*(6).
- Hughes, A. D. (1995). Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of vascular research*, *32*(6), 353-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562808>
- Hulin, A., Lamrani, L., Sabbagh, F., Tallet, A., Lecerf, F., Bac, P., & German-Fattal, M. (2012). Magnesium-deficiency does not alter calcineurin inhibitors activity in mice. *Transplant immunology*, *26*(1), 55-61. doi:10.1016/j.trim.2011.09.001
- Issa, N., Kukla, A., & Ibrahim, H. N. (2012). The over-exaggerated chronic nephrotoxicity of calcineurin inhibitors. *Arab Journal of Urology*. doi:10.1016/j.aju.2012.02.003
- Izzo, J., & Black, H. (2003). Hypertension primer: the essentials of high blood pressure, 1-173. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=uaPOffac4SEC&oi=fnd&am>

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

p;pg=PR15&dq=Hypertension+Primer:+The+Essentials+of+High+Blood+Pressure&ots=F00YFn_Q-U&sig=wJTvr4_aY0m6xOHBb7xvKfpOpGk

- Jackson, W. F. (2000). Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension*, 35(1), 173-178. doi:10.1161/01.HYP.35.1.173
- Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., Nelson, M. T., Gessner, G., Cui, Y., Otani, Y., et al. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*.
- Kaplan, N. (2012). *Clynical Hypertension. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (9th ed., Vol. 54 Suppl 4, p. NP). doi:10.1093/cid/cis452
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-saito, M., Amano, K., & Harada, K. (1997). Calcium Movements , Distribution , and Functions in, 49(2).
- Kimes, B., & Brandt, B. (1976). Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Experimental Cell Research*, 98(2), 349-366. doi:10.1016/0014-4827(76)90446-8
- Kopp, B., & Klotman, P. E. (1990). Cellular and Molecular Nephrotoxicity, 1(2).
- Korom, S. (2009). Immunosuppression in cardiac transplantation : state of the art and new drugs, 12(10), 272-276.
- Kosaka, T., Nakagawa, M., Ishida, M., & Iino, K. (2009). Cardioprotective effect of an L/N-type calcium channel blocker in patients with hypertensive heart disease. *Journal of*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0914508709001828>
- Kotlikoff, M., & Hall, I. (2003). Hypertension : B testing, 112(5), 654-656. doi:10.1172/JCI200315967.12.
- Kushwaha, S. S., Raichlin, E., Sheinin, Y., Kremers, W. K., Chandrasekaran, K., Brunn, G. J., & Platt, J. L. (2008). Sirolimus affects cardiomyocytes to reduce left ventricular mass in heart transplant recipients. *European heart journal*, 29(22), 2742-50. doi:10.1093/eurheartj/ehn407
- Lacinova, L. (2005). *Voltage-Dependent Calcium Channels*.
- Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E., Nelson, M. T., Shaikh, M. A., Wall, D. J. N., David, T., et al. (2006). Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone Calcium-Activated Potassium Channels. *Physiology*, 69-78. doi:10.1152/physiol.00040.2005
- Leoncini, G., Viazzi, F., Parodi, D., Ratto, E., Vettoretti, S., Vaccaro, V., Ravera, M., et al. (2004). Creatinine clearance and signs of end-organ damage in primary hypertension. *Journal of human hypertension*, 18(7), 511-6. doi:10.1038/sj.jhh.1001689
- Liao, P., Yong, T., Liang, M., Yue, D., & Soong, T. (2005). Splicing for alternative structures of Ca_v1.2 Ca channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovascular Research*, 68(2), 197-203. doi:10.1016/j.cardiores.2005.06.024
- Luis, G. (2007). Measurement of kidney function in patient with hypertension, 14(3), 162-166.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- Malyszko, J. (2010). Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 411(19-20), 1412-20. doi:10.1016/j.cca.2010.06.019
- Marks, a. R. (2000). Cardiac Intracellular Calcium Release Channels : Role in Heart Failure. *Circulation Research*, 87(1), 8-11. doi:10.1161/01.RES.87.1.8
- Martens, J. R., & Gelband, C. H. (2008). Ion Channels in Vascular Smooth Muscle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. doi:10.3181/00379727-218-44286
- Martin-Martin, N., Dan, Q., Amoozadeh, Y., Waheed, F., McMorrow, T., Ryan, M. P., & Szászi, K. (2012). RhoA and Rho kinase mediate cyclosporine A and sirolimus-induced barrier tightening in renal proximal tubular cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(1), 178-88. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.014
- Martonosi, A. N., & Pikula, S. (2003). The network of calcium regulation in muscle ., 50(1).
- McCarron, J. G., Chalmers, S., Bradley, K. N., MacMillan, D., & Muir, T. C. (2006). Ca²⁺ microdomains in smooth muscle. *Cell calcium*, 40(5-6), 461-93. doi:10.1016/j.ceca.2006.08.010
- McDonald, T. F., Pelzer, S., Trautwein, W., & Pelzer, D. J. (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiological reviews*, 74(2), 365-507. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171118>
- Michael, S. K., Surks, H. K., Wang, Y., Zhu, Y., Blanton, R., Jamnongjit, M., Aronovitz, M., et al. (2008). High blood pressure arising from a defect in vascular function.
- Moosmang, S., Lenhardt, P., Haider, N., Hofmann, F., & Wegener, J. W. (2005). Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacology & therapeutics*, 106(3), 347-55. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.12.003
- Morelon, E. (2001). Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(1), 18-20. doi:10.1093/ndt/16.1.18
- Morgado, M., & Cairrao, E. (2011). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. doi:10.1007/s00018-011-0815-2
- Morrisett, J. D., Abdel-fattah, G., Hoogeveen, R., Mitchell, E., Ballantyne, C. M., Pownall, H. J., Opekun, A. R., et al. (2002). Effects of sirolimus on plasma lipids , lipoprotein levels , and fatty acid metabolism in renal transplant patients. *Journal Of Lipid Research*, 43, 1170-1180. doi:10.1194/jlr.M100392-JLR200
- Morton, S. J., & Powell, R. J. (2000). Cyclosporin and tacrolimus : their use in a routine clinical setting for scleroderma. *Clinical Immunology*, 865-869.
- Mota, A., Arias, M., Eero, I., Paavonen, T., Brault, Y., Legendre, C., Claesson, K., et al. (2004). Sirolimus-Based Therapy Following Early Cyclosporine Withdrawal Provides Significantly Improved Renal Histology and Function at 3 Years, 953-961. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00446.x
- Naesens, M., Kuypers, D. R. J., & Sarwal, M. (2009). Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 4(2), 481-508. doi:10.2215/CJN.04800908

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- Nakamura, M., Sunagawa, M., Kosugi, T., Lou, Q., Li, W., & Efimov, I. R. (2000). Actin filament disruption inhibits L-type Ca²⁺ channel current in cultured vascular smooth muscle cells. *AJP: Cell Physiology*.
- Nishiyama, A., Kobori, H., Fukui, T., Zhang, G.-X., Yao, L., Rahman, M., Hitomi, H., et al. (2003). Role of angiotensin II and reactive oxygen species in cyclosporine A-dependent hypertension. *Hypertension*, 42(4), 754-60. doi:10.1161/01.HYP.0000085195.38870.44
- Orallo, F. (1996). Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacology & therapeutics*, 69(3), 153-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8783369>
- Owens, G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews*, 75(3), 487-517. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624392>
- Owens, Gary K. (2007). Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity. *Novartis Foundation symposium*, 283, 174-91; discussion 191-3, 238-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18300422>
- Pacher, L., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2011). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, 315-424. doi:10.1152/physrev.00029.2006.
- Pallet, N., Djamali, A., & Legendre, C. (2011). Challenges in diagnosing acute calcineurin-inhibitor induced nephrotoxicity: from toxicogenomics to emerging biomarkers. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 64(1), 25-30. doi:10.1016/j.phrs.2011.03.013
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews*, 83(1), 117-61. doi:10.1152/physrev.00018.2002
- Pintérová, M., Lišková, S., Dobešová, Z., Behuliak, M., Kuneš, J., & Zicha, J. (2009). Impaired Control of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels in Experimental Hypertension. *Physiological reviews*, 58.
- Pitt, G. S. (2007). Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovascular research*, 73(4), 641-7. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.019
- Podder, H., Stepkowski, S. M., Napoli, K. L., Clark, J., Verani, R. R., Chou, T. C., & Kahan, B. D. (2001). Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 12(5), 1059-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316866>
- Price, C. P., Newall, R. G., & Boyd, J. C. (2005). Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. *Clinical chemistry*, 51(9), 1577-86. doi:10.1373/clinchem.2005.049742
- Rangan, G. K., Nguyen, T., Mainra, R., Succar, L., Schwensen, K. G., Burgess, J. S., & Ho, K. O. (2009). Therapeutic role of sirolimus in non-transplant kidney disease. *Pharmacology & therapeutics*, 123(2), 187-206. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.03.014
- Rauch, M. C., San Martín, a, Ojeda, D., Quezada, C., Salas, M., Cárcamo, J. G., Yañez, a J., et al. (2009). Tacrolimus causes a blockage of protein secretion which reinforces its immunosuppressive activity and also explains some of its toxic side-effects. *Transplant immunology*, 22(1-2), 72-81. doi:10.1016/j.trim.2009.07.001

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

- Reis, F., Parada, B., Lemos, E. T. D., Garrido, P., Dias, A., Piloto, N., Baptista, S., Sereno, J., Eufrásio, P., Costa, E., Figueiredo, A., Mota, A., Teixeira, F., et al. (2009). Hypertension induced by immunosuppressive drugs: a comparative analysis between sirolimus and cyclosporine. *Transplantation proceedings*, 41(3), 868-73. doi:10.1016/j.transproceed.2009.02.005
- Reis, F., Parada, B., Lemos, E. T. D., Garrido, P., Dias, A., Piloto, N., Baptista, S., Sereno, J., Eufrásio, P., Costa, E., Figueiredo, A., Mota, A., & Teixeira, F. (2009). Hypertension Induced by Immunosuppressive Drugs: A Comparative Analysis Between Sirolimus and Cyclosporine. *TPS*, 41(3), 868-873. doi:10.1016/j.transproceed.2009.02.005
- Reis, F., Tavares, P., & Teixeira, F. (2000). The distribution of catecholamines between plasma and platelets in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 41(2), 129-35. doi:10.1006/phrs.1999.0572
- Reis, F. N. F. (2010). The unsolved cyclosporine-induced kidney injury: is paricalcitol a feasible new renoprotective option? *Kidney international*, 77(12), 1055-7. doi:10.1038/ki.2010.93
- Reis, Flávio, Almeida, L., Alcobia, T., Santos-Dias, J. D., Lourenço, M., Palmeiro, A., Ferrer-Antunes, C. a, et al. (2003). Isosorbide-5-mononitrate treatment prevents cyclosporin A-induced platelet hyperactivation and the underlying nitric oxide-cyclic guanosine-3',5'-monophosphate disturbances. *Thrombosis Research*, 110(2-3), 107-115. doi:10.1016/S0049-3848(03)00311-6
- Rensen, S. S. M., Doevendans, P. A. F. M., & Eys, G. J. J. M. V. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity, 15(3), 100-108.
- Ringer, S. (1883). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *The Journal of physiology*. Retrieved from <http://jp.physoc.org/content/4/1/29.full.pdf>
- Roullet, J., Xue, H., Mccarron, D. A., Holcomb, S., & Bennett, W. M. (1994). Vascular Mechanisms of Cyclosporin-induced Hypertension in the Rat, 93(May), 2244-2250.
- Ruilope, L. M., van Veldhuisen, D. J., Ritz, E., & Luscher, T. F. (2001). Renal function: the Cinderella of cardiovascular risk profile. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(7), 1782-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738274>
- Ryuzaki, M., Stahl, L. K., Lyson, T., Victor, R. G., & Bishop, V. S. (1997). Sympathoexcitatory response to cyclosporin A and baroreflex resetting. *Hypertension*, 29(2), 576-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040441>
- Saimi, Y., & Kung, C. (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annual review of physiology*, 64, 289-311. doi:10.1146/annurev.physiol.64.100301.111649
- Santana, L. F., & Navedo, M. F. (2009). Molecular and biophysical mechanisms of Ca²⁺ + sparklets in smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(4), 436-444. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.008
- Santos-Silva, A. J. (2010). Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. *Health*, 02(04), 321-331. doi:10.4236/health.2010.24049
- Saurina, A., Campistol, J. M., Piera, C., Diekmann, F., Campos, B., Campos, N., de las Cuevas, X., et al. (2006). Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft dysfunction: changes in glomerular haemodynamics and proteinuria.

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 21(2), 488-93. doi:10.1093/ndt/gfi266

- Sereno, J., Romão, A. M., Parada, B., Lopes, P., Carvalho, E., Teixeira, F., & Reis, F. (2012). Cardiorenal benefits of early versus late cyclosporine to sirolimus conversion in a rat model. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 3(2), 143-8. doi:10.4103/0976-500X.95513
- Shimizu, M. (2003). Effects of efonidipine, an L- and T-Type Dual Calcium Channel Blocker, on Heart Rate and Blood Pressure in Patients with Mild to Severe Hypertension: An Uncontrolled, Open-Label Pilot Study.
- Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372(6503), 231-6. doi:10.1038/372231a0
- Sonkusare, S., Palade, P. T., Marsh, J. D., Telemaque, S., Pesic, A., & Rusch, N. J. (2006). Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications, 44, 131-142. doi:10.1016/j.vph.2005.10.005
- Stallone, G., Infante, B., & Gesualdo, L. (2009). There is a choice for immunosuppressive drug nephrotoxicity: Is it time to change? *Journal of nephrology*, 22(3), 326-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557709>
- Triggle, D. (1998). The physiological and pharmacological significance of cardiovascular T-type, voltage-gated calcium channels. *American journal of hypertension*. Retrieved from <http://www.nature.com/ajh/journal/v11/n4s/full/ajh19981244a.html>
- Tutanc, M., Arica, V., Yilmaz, N., Nacar, a, Zararsiz, I., Basarslan, F., Tutanc, O. D., et al. (2011). Effects of erdosteine on cyclosporin-A-induced nephrotoxicity. *Human & experimental toxicology*. doi:10.1177/0960327111417907
- Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, 13(6 Pt 2), 658-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2661425>
- Verde, I., Orallo, F., & Gil-Longo, J. (2010). Efecto del Endotelio sobre las contracciones inducidas por Noradrenalina Y K+ en las aortas de rata genéticamente hipertensa y rata normotensa. Retrieved from <http://thesis.ubi.pt/upload/760/t04284pdf.pdf>
- Wang, S., Wilkes, M. C., Leof, E. B., & Hirschberg, R. (2010). Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis. *American journal of physiology. Renal physiology*, 298(1), F142-9. doi:10.1152/ajprenal.00320.2009
- Welling, A., Technischen, T. D., & Str, B. (2009). Calcium Channels, 482(4), 1-12.
- Yoon, H. E., & Yang, C. W. (2009). Established and newly proposed mechanisms of chronic cyclosporine nephropathy. *The Korean journal of internal medicine*, 24(2), 81-92. doi:10.3904/kjim.2009.24.2.81
- Yoshida, T., & Owens, G. K. (2005). Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation research*, 96(3), 280-91. doi:10.1161/01.RES.0000155951.62152.2e
- Zamponi, G. W. (2003). The L-type calcium channel C-terminus: sparking interest beyond its role in calcium-dependent inactivation. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), 333. doi:10.1113/jphysiol.2003.052852

Efeitos da ciclosporina e sirolimus ao nível cardiovascular

Zamponi, G. W., & Ph, D. (2005). *Voltage-Gated Calcium Channels*.

Zhang, R.-J., Zou, L.-B., Zhang, D., Tan, Y.-J., Wang, T.-T., Liu, A.-X., Qu, F., et al. (2012). Functional expression of large-conductance calcium-activated potassium channels in human endometrium: a novel mechanism involved in endometrial receptivity and embryo implantation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(2), 543-53. doi:10.1210/jc.2011-2108

Zhang, T., Miyamoto, S., & Brown, J. (2004). Cardiomyocyte Calcium and Calcium / Calmodulin-dependent Protein Kinase II : Friends or Foes?, 141-168.

Zuccotti, A., Clementi, S., & Reinbothe, T. (2011). Structural and functional differences between L-type calcium channels: crucial issues for future selective targeting. *Trends in*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614711000344>