

PAOLO RUGGERO ERRANTE

*Universidade de São Paulo, USP, São Paulo,  
SP, Brasil; Universidade Federal de São  
Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.*

*Recebido em fevereiro de 2020.  
Aprovado em agosto de 2020.*

## SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DE CÉLULAS CONTRÁTEIS EXCITÁVEIS MEDIADAS PELO $Ca^{2+}$ NA HOMEOSTASE E NA DOENÇA

### RESUMO

**Introdução:** O sistema cardiovascular faz com que o sangue circule e transporte oxigênio e nutrientes para o corpo através da contração das células cardíacas. Durante este processo, inúmeros eventos de sinalização intracelular envolvem a participação do  $Ca^{2+}$ . **Metodologia:** A revisão foi realizada por base de dados bibliográficos obtidos através da pesquisa em LILACS, MEDLINE e PubMed. **Resultados:** A concentração citoplasmática basal de  $Ca^{2+}$  é regulada por canais de  $Ca^{2+}$ , ATPases, transportadores e proteínas de ligação do  $Ca^{2+}$ . A entrada de  $Ca^{2+}$  promove a liberação de mais  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático por meio dos receptores de rianodina, que se ligam a troponina C causando o movimento da tropomiosina e exposição do sítio receptor da miosina, permitindo a ligação com a actina e contração celular. Para que ocorra o relaxamento celular, o  $Ca^{2+}$  precisa ser removido do citosol por recaptação pela isoforma cardíaca do retículo sarcoplasmático  $Ca^{2+}$ -ATPase; extrusão pelo canal trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$ ; ação da  $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática e recaptação mitocondrial de  $Ca^{2+}$ . Alterações nestes mecanismos levam a reativação de genes expressos durante a vida fetal, contribuindo para o processo de hipertrofia cardíaca. **Conclusão:** A manutenção destes mecanismos de sinalização com a participação do  $Ca^{2+}$  são fundamentais para a homeostase das células cardíacas, e alterações neste processo podem levar a sobrecarga funcional e hipertrofia das células cardíacas.

**Palavras-Chave:** coração; células contráteis excitáveis; sistema acoplamento excitação-contração;  $Ca^{2+}$ ; hipertrofia.

## INTRACELLULAR SIGNALING OF EXCITABLE CONTRACTILE CELLS MEDIATED BY $Ca^{2+}$ IN HOMEOSTASIS AND DISEASE

### ABSTRACT

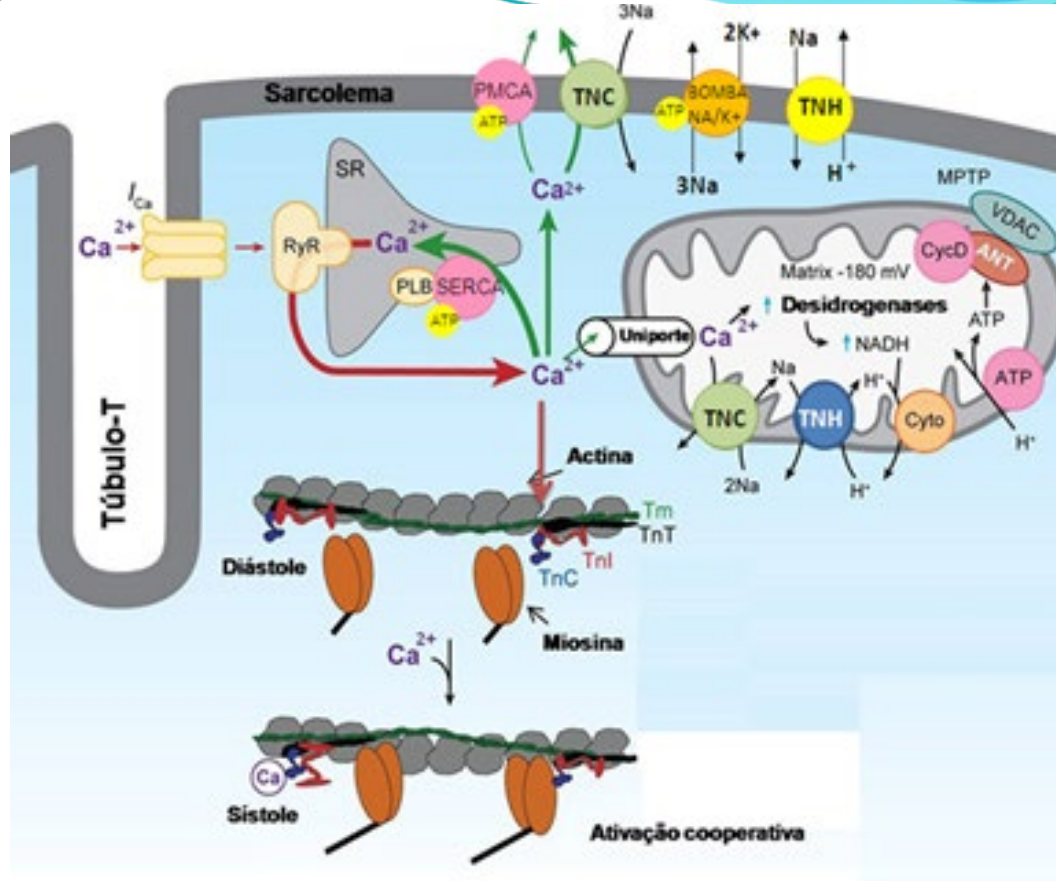
**Introduction:** The cardiovascular system sends blood and transport oxygen and nutrients to the body through the contraction of cardiac cells. During this process, numerous intracellular signaling events involve the participation of  $Ca^{2+}$ . **Methodology:** The review was carried out using bibliographic databases obtained through research in LILACS, MEDLINE and PubMed. **Results:** The basal cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration is regulated by  $Ca^{2+}$  channels, ATPases, transporters and  $Ca^{2+}$  binding proteins. The entry of  $Ca^{2+}$  promotes the release of more  $Ca^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum through the ryanodine receptors, which bind to troponin C causing the movement of tropomyosin and exposure of the myosin receptor site, allowing binding with actin and cell contraction. For cell relaxation to occur,  $Ca^{2+}$  needs to be removed from the cytosol with reuptake by the cardiac isoform of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase; extrusion through the  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger channel; action of plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase and mitochondrial  $Ca^{2+}$  reuptake. Changes in these mechanisms lead to reactivation of genes expressed during fetal life, contributing to the process of cardiac hypertrophy. **Conclusion:** The maintenance of these signaling mechanisms with the participation of  $Ca^{2+}$  is fundamental for the homeostasis of cardiac cells, and changes in this process can lead to functional overload and hypertrophy of cardiac cells.

**Keywords:** heart; excitable contractile cells; excitation-contraction coupling system;  $Ca^{2+}$ ; hypertrophy.

## INTRODUÇÃO

A sinalização celular faz parte do processo de comunicação que regula a capacidade de resposta a estímulos internos e externos, sendo classificada com base no tipo do sinal como mecânico quando são exercidas forças mecânicas na célula; e bioquímico, que pode ser desencadeado por diferentes moléculas que entram em contato com a superfície celular (WANG et al., 2017). Para as células cardíacas diferentes íons, moléculas, receptores e vias de sinalização estão envolvidos na homeostase, função contrátil e sobrevivência. Em condições fisiológicas a contração dos cardiomiócitos é dependente da sincronização do influxo e efluxo transmembrana de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), que regula o mecanismo de acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco, força de contração muscular cardíaca e o ritmo cardíaco (KHO, LEE, HAJJAR, 2012).

A concentração citoplasmática basal de  $Ca^{2+}$  é regulada por canais de  $Ca^{2+}$ , ATPases, transportadores e proteínas de ligação do  $Ca^{2+}$ . Para que o  $Ca^{2+}$  entre no interior das células cardíacas, ocorre um potencial de ação que despolariza o sarcolema, permitindo que o  $Ca^{2+}$  se difunda do meio extracelular para o intracelular através dos canais dependentes de  $Ca^{2+}$  do tipo-L. A entrada de  $Ca^{2+}$  promove a liberação de mais  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático por meio dos receptores de rianodina, que se ligam a troponina C causando o movimento da tropomiosina e exposição do sítio receptor da miosina, permitindo a ligação com a actina e contração celular. Para que ocorra o relaxamento celular, o  $Ca^{2+}$  precisam ser removido do citosol por quatro diferentes processos: 1) recaptção pela isoforma cardíaca do retículo sarcoplasmático  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA), sendo a isoforma SERCA2a responsável pela recaptção do  $Ca^{2+}$  no coração (TADA, KATZ, 1982); 2) extrusão pelo canal trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  (SHATTOCK et al., 2015); 3) ação da  $Ca^{2+}$  ATPase da membrana plasmática (BRINI et al., 2013); e 4) recaptção mitocondrial de  $Ca^{2+}$  (Figura 1) (MISHRA et al., 2017).

Figura 1. Sincronismo do influxo transmembrana e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células cardíacas.

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SR) através do canal de rianodina (RyR). O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a troponina C e promove a interação da troponina C com a troponina I, fazendo com que a troponina I se mova do local ativo da actina, deslocamento da tropomiosina, troponina T e contração muscular. Após a contração, o  $\text{Ca}^{2+}$  é transportado pelo SERCA para o SR. O trocador mitocondrial de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mTNC) transporta o  $\text{Ca}^{2+}$  para a matriz mitocondrial pelo uniporter mitocondrial (MU) e da matriz para o citosol. O  $\text{Na}^+$  é transportado para fora das mitocôndrias pela bomba  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (TNH). O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial ativa desidrogenases que geram espécies reduzidas (NADH) para estimular a síntese de ATP. O gradiente de potencial estabelecido pelas mitocôndrias é mantido através do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPTP).

Fonte: Caricati-Neto et al., 2019.

## ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DAS CÉLULAS CARDÍACAS

O evento que ocorre a partir da despolarização do sarcolema e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático é chamado de acoplamento excitação-contração, que se inicia com a propagação do potencial de ação pelo sarcolema e ao longo do túbulo transversal, e termina com a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. A membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático possui um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  denominado receptor de rianodina (RyR), onde ocorre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático para o citosol (DULHUNTY, 2006).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L localizados no sarcolema e nos túbulos-T são canais de voltagem sensíveis a íons que se abrem em resposta a despolarização permitindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  a favor do seu gradiente eletroquímico. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  leva a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido pela ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  ao RyR onde uma pequena quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular desencadeia a liberação maciça de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático para o citosol causando contração de células cardíacas. O mecanismo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido pelo  $\text{Ca}^{2+}$  envolve o canal trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  no sarcolema,

que transporta uma molécula de  $Ca^{2+}$  através do sarcolema acoplado com movimento recíproco de três moléculas de  $Na^{+}$  (BERS, 2008).

Em repouso ou diástole, o trocador usa o gradiente eletroquímico de  $Na^{+}$  e remove o  $Ca^{2+}$  para o meio extracelular. Durante a despolarização, o gradiente eletroquímico para o  $Na^{+}$  é reduzido, e quando o potencial transmembrana atinge valores abaixo de  $-20$  mV, o canal trocador de  $Na^{+}/Ca^{2+}$  funciona da maneira inversa, ocorrendo influxo de  $Ca^{2+}$  e efluxo de  $Na^{+}$ . No modo reverso, o canal trocador de  $Na^{+}/Ca^{2+}$  auxilia no processo de liberação de  $Ca^{2+}$  induzida pelo  $Ca^{2+}$ . No modo direto, esse sistema induz o relaxamento muscular pela remoção de  $Ca^{2+}$  intracelular (REN, PHILIPSON, 2013).

Na membrana do retículo sarcoplasmático está localizada a bomba de  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) que transporta o  $Ca^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático, importante para o processo de relaxamento muscular, que ocorre pela diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico com recaptção de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático pela SERCA e pela extrusão de  $Ca^{2+}$  pelo canal trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPase sarcolemal e uniporter mitocondrial (PERIASAMY, BHUPATHY, BABU, 2008).

A atividade da SERCA é regulada pela fosfolamban, que impede a recaptção de  $Ca^{2+}$  pela SERCA. A fosforilação do fosfolamban pela proteína quinase A (PKA) ou proteína quinase II dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) causa redução da expressão de fosfolamban e ativação da SERCA com recaptção de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático. Isto causa aumento na força de contração e velocidade de relaxamento do músculo cardíaco (BHUPATHY, BABU, PERIASAMY, 2007).

O  $Ca^{2+}$  liberado liga-se ao seu sítio na subunidade C da troponina e ativa a contração, induzindo o movimento da tropomiosina em direção ao sulco do filamento fino com a exposição do sítio de ligação da miosina. O resultado é a formação de pontes cruzadas e geração de tensão e/ou encurtamento do sarcômero. Existem quatro sítios de ligação do  $Ca^{2+}$  na troponina C. Dois desses sítios têm alta afinidade pelo  $Ca^{2+}$  e estão envolvidos no controle e aumento da interação entre as subunidades troponina I e troponina T. Os outros dois sítios têm baixa afinidade pelo  $Ca^{2+}$ , sendo ocupados quando a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  é elevada pela liberação do retículo sarcoplasmático (GRABAREK, 2005).

## SINALIZAÇÃO INTRACELULAR NA CÉLULA CARDÍACA MEDIADA PELO $Ca^{2+}$

O  $Ca^{2+}$  atua como mensageiro intracelular por possuir forte e específica ligação ao receptor, além de possuir um raio atômico que lhe confere uma geometria ideal para a ligação de proteínas. O  $Ca^{2+}$  desempenha um papel importante na geração e modulação da atividade elétrica e regulação da contração do músculo cardíaco. Esse papel é mediado pelos RYR; canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem; trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$ ;  $Ca^{2+}$ -ATPase do sarcolema (SERCA) e canais de  $Ca^{2+}$ ; canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de  $Ca^{2+}$ ; proteína G; uniportador mitocondrial; nucleotídeos cíclicos; receptores de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3) e purinas (DECROCK et al., 2017).

### Receptores de rianodina

Os receptores de rianodina (RyR) estão localizados na membrana do retículo sarcoplasmático e amplificam os sinais mediados pelo  $Ca^{2+}$ , liberando o  $Ca^{2+}$  mitocondrial. Nos mamíferos existem três isoformas de RyR, RYR1, RYR2 e RYR3. O RYR1 é a isoforma presente no músculo esquelético, com papel no sistema de acoplamento excitação-contração; a isoforma RYR2 está presente nas células cardíacas e permite a liberação de  $Ca^{2+}$  induzida pelo  $Ca^{2+}$  (CICR), importante para o processo de contração regulado pela proteína quinase A (PKA). A isoforma RYR3 é expressa no diafragma e cérebro (ABU-OMAR et al., 2018). Quando ativado, o RyR permite a saída do  $Ca^{2+}$  armazenado no retículo sarcoplasmático para o citoplasma, causando a contração da célula cardíaca. O principal ativador do RyR é o  $Ca^{2+}$  proveniente da abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L



durante a despolarização. Os RyR são modulados por proteínas que aumentam ou diminuem sua abertura. A calestabilina é essencial para manter o receptor no estado fechado, e as proteínas quinase A e CaMKII aumentam sua abertura (PETROU et al., 2017).

### Canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem

Os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem pertencem a uma família de canais seletivos para íons dependentes de voltagem. O canal de Ca<sup>2+</sup> dependente de voltagem contém um sensor de voltagem formado por quatro subunidades ou domínios internos repetidos (I-IV). Cada domínio contém seis regiões transmembranares (S1-S6) em disposição  $\alpha$ -hélice. O domínio I é responsável pela ativação do canal e a região S4 faz parte do sensor de tensão. Os domínios localizados entre as regiões S5 e S6 constituem o poro do canal. As subunidades alfa-1 ( $\alpha$ 1) dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem têm uma localização transmembrana e constituem o canal de voltagem e poro seletivo para o Ca<sup>2+</sup>, sendo o subtipo  $\alpha$ 1C (CACNA1C; tipo L) encontrado no coração (ALMAGOR et al., 2012).

Os canais de Ca<sup>2+</sup> possuem resíduos de glutamato com cadeias laterais de carboxila que atingem o lúmen do poro e bloqueiam o fluxo de Na<sup>+</sup>, mas permitem o fluxo de Ca<sup>2+</sup> controlado pelo potencial elétrico transmembrana. Existem seis tipos de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes da voltagem: -L, -N, -P, -Q, -R e -T. O principal papel deste canal é realizar o processo de acoplamento excitação/contração, permitindo a entrada do Ca<sup>2+</sup> extracelular para o sarcoplasma, estimulando a contração celular pela fixação do Ca<sup>2+</sup> a troponina C (CHRISTEL, LEE, 2012).

O canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L é um canal sensível a mudanças de voltagem. Nos ventrículos e átrios este canal está presente em grande concentração na membrana dos túbulos-T. O canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L participa da fase de platô do potencial de ação e desempenha um papel primário no acoplamento excitação-contração. Quando um potencial de ação é gerado no cardiomiócito, uma onda de despolarização se propaga através da membrana plasmática e túbulos-T. Ao atingir os canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L, ocorre abertura do canal, permitindo a entrada de Ca<sup>2+</sup> na célula. O influxo de Ca<sup>2+</sup> através desse canal inicia a liberação de mais Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, levando a contração muscular (MALAN, FLEISCHMANN, 2012).

Os canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo T estão localizados no sistema nervoso, coração e músculo liso; são ativados por despolarização próxima ao potencial de repouso, e estão associados a ação potencial rítmica das células cardíacas e neurônios. Os canais Ca<sup>2+</sup> do tipo -N, -P, -Q e -R são ativados por despolarização, sendo responsáveis pela liberação de neurotransmissores a partir do terminal pré-sináptico (PEERS, ELIES, GAMPER, 2015).

### Trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

O trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> está localizado na membrana plasmática tem a função de remover o Ca<sup>2+</sup> intracelular, auxiliando no processo de relaxamento dos cardiomiócitos (LIAO et al., 2012).

O trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> remove uma molécula de Ca<sup>2+</sup> em troca de três moléculas de Na<sup>+</sup> para gerar uma corrente despolarizante. Como o transporte é eletrogênico, a despolarização da membrana pode reverter a direção do trocador, o que contribui para aumento da quantidade do Ca<sup>2+</sup> intracelular na fase inicial do platô. Com a repolarização, o Ca<sup>2+</sup> é removido da célula. O trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> contribui para o processo de contração e auxilia no processo de relaxamento dos cardiomiócitos. Quando os níveis intracelulares de Na<sup>+</sup> estão aumentados ou o nível extracelular se encontra diminuído, o trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transporta o Ca<sup>2+</sup> de modo reverso (REN, PHILIPSON, 2013).

## Retículo sarcoplasmático $Ca^{2+}$ -ATPase

O retículo sarcoplasmático  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) é uma bomba de  $Ca^{2+}$  dependente de ATP localizada na membrana do retículo sarcoplasmático. A taxa de recaptação do  $Ca^{2+}$  pela SERCA determina a taxa de relaxamento do músculo cardíaco, sendo a atividade da SERCA regulada pelo fosfolamban, uma fosfoproteína expressa nas células dos ventrículos cardíacos (SATO, SHANNON, BERS, 2016). A fosforilação do fosfolamban pela proteína quinase A (PKA) ou proteína quinase II dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) aumenta a atividade da SERCA, aumentando a recaptação de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático e o processo de acoplamento excitação-contração das células cardíacas (BHUPATHY, BABU, PERIASAMY, 2007).

O SERCA possui duas isoformas, SERCA2a e SERCA2b. A SERCA2a é a isoforma mais abundante no tecido cardíaco, e transporta o  $Ca^{2+}$  citoplasmático para o retículo sarcoplasmático, causando relaxamento muscular, ao passo que a SERCA2b está presente no músculo liso e no tecido dérmico (SATO, SHANNON, BERS, 2016).

## Proteína G

As proteínas G são um grupo de proteínas ativadas por estímulos extracelulares que promovem a transdução intracelular de sinal e ativam enzimas amplificadoras ou canais iônicos. A família de proteínas G possui os membros  $G_s$  (estimulam a adenilato ciclase pelos receptores beta-adrenérgicos e aumentam a condutância do  $Ca^{2+}$  no coração);  $G_i$  (inibem a adenilato ciclase pelos receptores alfa-2 adrenérgicos);  $G_t$ ; e  $G_o$  (controlam os canais de  $Ca^{2+}$ );  $G_k$  (regulam os canais de  $K^+$ ); e  $G_p$  (regulam fosfolipases) (COPENHAVER, KÖGEL, 2017).

Todas as proteínas G são compostas por três subunidades, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ), e as isoformas das proteínas G são classificadas em função da subunidade  $\alpha$  em  $G_s$ ,  $G_i$  e  $G_q$ . A isoforma  $G_s$  estimula o aumento da síntese de adenilil ciclase e AMPc; a isoforma  $G_i$  estimula a diminuição da síntese de adenilato ciclase, AMPc e a frequência cardíaca quando os canais de  $K^+$  do músculo cardíaco estão abertos; e a isoforma  $G_q$  promove o aumento dos níveis citoplasmáticos de fosfolipase C, IP3, diacilglicerol e  $Ca^{2+}$  (ZHANG, SCOU MANNE, CHEN, 2010).

A proteína G pode ativar a fosfolipase C liberando 1,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 promove a liberação do  $Ca^{2+}$  intracelular com ativação do complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, e o DAG aumenta a afinidade do  $Ca^{2+}$  pela proteína quinase C (PKC) (COPENHAVER, KÖGEL, 2017). Outro sistema de sinalização inclui a guanilato ciclase monofosfato cíclico (GMPc) e óxido nítrico (NO). O GMPc atua como segundo mensageiro associado ao relaxamento do músculo liso, e o NO está envolvido no processo de dilatação da parede dos vasos sanguíneos (SMILJIC, NESROROVIC, SAVIC, 2014).

## Receptor sensor de $Ca^{2+}$ extracelular

O receptor sensor de  $Ca^{2+}$  extracelular é um receptor acoplado a proteína G que pertence a uma subfamília de receptores acoplados a proteína G. A ativação do receptor sensor de  $Ca^{2+}$  extracelular causa inibição da adenilato ciclase, diminuição da concentração do AMPc e ativação da fosfolipase C, formando DAG e IP3. O DAG ativa a PKC, levando a inibição da SERCA2b, e o IP3 liga-se aos receptores de membrana do retículo sarcoplasmático, induzindo a liberação de  $Ca^{2+}$ . Distúrbios genéticos que envolvem o receptor extracelular de detecção de  $Ca^{2+}$  levam a hipercalcemia hipocalciúrica familiar, hiperparatireoidismo grave neonatal e hipocalcemia autossômica dominante (HAUACHE, 2001).

## Unipoter mitocondrial

Na matriz mitocondrial o  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de formar precipitados inativos com o fosfato, fazendo com que essa organela acumule grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$ . A captação excessiva do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e o estresse oxidativo podem levar a permeabilização mitocondrial não seletiva ou transição de permeabilidade, com abertura de um poro localizado na membrana mitocondrial interna. O  $\text{Ca}^{2+}$  requer que os transportadores sejam capturados e liberados pelas mitocôndrias em um processo dependente de energia, que utiliza os canais iônicos dependentes de voltagem localizados na membrana mitocondrial externa. Uma vez no espaço intermembranar o  $\text{Ca}^{2+}$  é capturado pelas mitocôndrias pelo sistema de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (uniporter mitocondrial) e liberado da matriz mitocondrial pelo trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  (KAMER, MOOTHA, 2015).

## Receptores IP3

O IP3 juntamente com o DAG atuam na transdução do sinal intracelular, sendo formado pela hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) pela fosfolipase C. Sua principal função é a mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  das organelas onde o  $\text{Ca}^{2+}$  é armazenado. Nas células musculares, o IP3 se liga e ativa o receptor IP3 na membrana do retículo sarcoplasmático abrindo os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  liberando  $\text{Ca}^{2+}$  no interior do sarcoplasma. Esse aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa o canal operado pelo RYR no retículo sarcoplasmático, levando ao aumento progressivo da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (HOHENDANNER, MAXWELL, BLATTER, 2015).

## HIPERTROFIA CARDÍACA

Os cardiomiócitos representam 85% da massa cardíaca total e são células contráteis com o citoplasma preenchidas por feixes de miofibrilas com miofilamentos organizados em unidades básicas contráteis, os sarcômeros. Os cardiomiócitos tornam-se terminalmente diferenciados logo após o nascimento, perdendo sua capacidade de proliferar (BERNARDO et al., 2010). Durante a vida fetal, forças hemodinâmicas e fatores presentes na corrente sanguínea regulam a proliferação de cardiomiócitos, como apressão arterial (GIRAUD et al., 2005), angiotensina II (SUNDGREN et al., 2003), cortisol (GIRAUD et al., 2006) e o fator de crescimento insulínico 1 (SUNDGREN et al., 2003).

As forças e fatores que suprimem a proliferação de cardiomiócitos incluem o hormônio tireoidiano triiodotironina (T3) (CHATTERGOON et al., 2012), peptídeo natriurético atrial (O'TIERNEY et al., 2010a) e a redução da carga sistólica (O'TIERNEY et al., 2010b). Na fase perinatal, o crescimento do músculo cardíaco é limitado pela supressão da atividade mitótica dos cardiomiócitos (THORNBURG et al., 2011), e na infância o coração cresce em tamanho para atender as demandas de oxigênio sem capacidade de gerar novas células (BERGMANN et al., 2010). Em adultos, o turnover dos cardiomiócitos é limitado pelas próprias células cardíacas e por outras populações residentes de tecido cardíaco (KAJSTURA et al., 2010).

Em situações de sobrecarga cardiovascular o coração é capaz de aumentar de tamanho, e conforme o estímulo, pode ocorrer hipertrofia cardíaca reduzindo a força do estresse hemodinâmico. O aumento da massa cardíaca ocorre principalmente pela hipertrofia individual dos cardiomiócitos, embora ocorra proliferação de fibroblastos, atividade de células progenitoras de cardiomiócitos e renovação celular (MAILLET, VAN BERLO, MOKKENTIN, 2013).

A hipertrofia cardíaca representa um processo adaptativo do coração em resposta ao aumento da atividade ou sobrecarga funcional com aumento da atividade metabólica. A hipertrofia leva a reativação de genes expressos no período fetal e a estimulação de sua tradução, com alteração da síntese de proteínas contráteis da unidade sarcomérica e do volume celular (MILL, VASSALLO, 2001). A hipertrofia cardíaca é uma

alteração celular adaptativa de natureza fisiológica ou patológica. A hipertrofia cardíaca fisiológica promove o crescimento normal do coração desde o nascimento até a vida pós-natal, ao passo que a hipertrofia cardíaca patológica ocorre em diferentes condições, como estenose aórtica, infarto do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica e doença valvar cardíaca (ROHINI et al., 2010). A hipertrofia cardíaca patológica preserva temporariamente a função miocárdica e reduz o estresse da parede ventricular, mas quando prolongada leva ao aparecimento de arritmias cardíacas e cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca e morte súbita (PARK et al., 2016).

Múltiplos mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento de hipertrofia patológica, que apresentam relação com a carga hemodinâmica imposta ao coração com tensão e deformação dos cardiomiócitos, proliferação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular pela modificação dos mecanismos de sinalização intracelular (HUTCHINSON et al., 2015), alterações do citoesqueleto e canais iônicos sensíveis ao estiramento (EHLER, 2016). Estimulação simpática com liberação de noradrenalina e produção local de fatores endócrinos como o fator de crescimento de fibroblastos e endotelina-1 são produzidos no miocárdio em situações de sobrecarga hemodinâmica, e também fatores neuro-endócrinos contribuem para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (TOUCHBERRY et al., 2013; WANG et al., 2014; SUBEDI et al., 2017).

### Transdução mecano-bioquímica de sinais na hipertrofia das células cardíacas

Durante a transdução mecano-bioquímica o citoesqueleto transmite potência e tensão as estruturas intracelulares e mobiliza em sua estrutura moléculas sinalizadoras, fornecendo a base física para a transdução do sinal mecânico em sinal bioquímico. O citoesqueleto tem acoplamento funcional e estrutural com a matriz extracelular através das integrinas e com outras células através de caderinas e anexinas (BURRIDGE, CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996). A agregação das integrinas leva ao aumento da fosforilação das enzimas Src e Fak e ao recrutamento de proteínas sinalizadoras celulares pela malha de actina. Após a fosforilação, resíduos de tirosina de Fak adicionais são fosforilados por ligação a Src a Fak, que ativa a via de crescimento Ras/Erk1/2 (SCHLAEPFER, HUNTER, 1997).

A distorção do canal iônico causada pelo estímulo mecânico inicia fenômenos elétricos como despolarização ou hiperpolarização da membrana celular, onde a entrada de  $Ca^{2+}$  através de canais não seletivos despolariza a membrana e induz a liberação de  $Ca^{2+}$  induzida pelo  $Ca^{2+}$  e a ativação de proteínas de ligação do  $Ca^{2+}$ , como a calmodulina. O estímulo mecânico também afeta canais iônicos como os canais  $K^+$ -ATP (VAN WAGONER, 1993), canal de  $K^+$  retificador de corrente (SASAKI, MITSUIYE, NOMA, 1992), canais de  $Cl^-$  (HAGIWARA et al., 1992), canais de  $Ca^{2+}$  (MATSUDA et al., 1996) e bomba de  $Na^+/K^+$  (SASAKI et al., 1994). Esses canais sensíveis ao estiramento podem interagir com o citoesqueleto, estimulando a produção e secreção de substâncias que podem mediar a hipertrofia, como a angiotensina II (HARADA et al., 1998), endotelina-1 (BOGOYEVITCH et al., 1994) e o fator de crescimento de fibroblastos (HARDER et al., 1996).

### Sinais intracelulares envolvidos na hipertrofia das células cardíacas

Mecanismos de membrana ativados por estímulos mecânicos, parácrinos/autócrinos ativam diferentes vias de sinalização como proteínas de ligação do GTP, quinases ativadas por mitógenos e quinase II dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) que ativam fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão gênica (ANDERSON, BROWN, BERS, 2012). Além disso, participam da hipertrofia cardíaca a aldosterona (MATSUMURA et al., 2006), angiotensina II e endotelina-1 (YAYAMA et al., 2004).

As famílias de receptores que transmitem sinais através da ativação de proteínas G desempenham papel importante nas células do sistema cardiovascular, estando



implicados na resistência arterial periférica, taxa e força de contração miocárdica (WHEELER-JONES, 2005). Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) estão envolvidos na função cardiovascular normal e respondem a angiotensina II, endotelina-1, epinefrina e norepinefrina, que promovem o crescimento dos cardiomiócitos, estimulam a proliferação das células musculares lisas vasculares e modificam a função das células endoteliais, contribuindo para a hipertrofia cardíaca (CABRERA-VERA et al., 2003).

A aldosterona atua como indutor de aumento da expressão do RNA mensageiro do peptídeo atrial natriurético, da ativação da fosfolipase C e expressão de cardiotropina-1 (MOHAMMED et al., 2010). A angiotensina II e a endotelina-1 se ligam aos GPCRs, ativando a proteína quinase ativada por mitógenos (MPK) com produção de IP<sub>3</sub>, aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, AMPc e modulação da contração celular cardíaca (GUTKIND, 1998).

A quinase II dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMKII) é uma serina/treonina quinase que fosforila proteínas miocárdicas envolvidas no transporte de Ca<sup>2+</sup>, como RyR, SERCA e canais de voltagem dependentes de Ca<sup>2+</sup> do tipo L. A alteração na homeostase do Ca<sup>2+</sup> com redução da expressão da SERCA causa menor recaptção de Ca<sup>2+</sup> para o retículo sarcoplasmático durante a fase diastólica, dificultando o relaxamento cardíaco, levando a maior extrusão de Ca<sup>2+</sup> para o meio extracelular pelo trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, reduzindo o armazenamento intracelular e eficiência contrátil dos cardiomiócitos (SHANNON, POGWIZD, BERS, 2003).

Alterações na homeostase do Ca<sup>2+</sup> ativam a calcineurina prejudicando a atividade da SERCA, que recaptura o Ca<sup>2+</sup> para o retículo sarcoplasmático (SANTANA et al., 2002). A calcineurina ativada pelo sistema Ca<sup>2+</sup>-calmodulina desfosforila o ativador do fator de transcrição nuclear T que se transloca para o núcleo e interage com o GATA-4, um regulador dos genes cardíacos associados ao remodelamento cardíaco na insuficiência cardíaca. Isso causa a re-expressão de genes com expressão na vida fetal, como a cadeia pesada da  $\beta$ -miosina, receptor de angiotensina tipo 1A e peptídeo natriurético atrial, favorecendo a hipertrofia cardíaca (SHIMIZU, MINAMINO, 2016).

A estimulação beta-adrenérgica ativa a via PI3K/AKT que também induz a hipertrofia miocárdica e fibrose intersticial, mediada pela proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e glicogênio sintase quinase 3 (GSK3 $\beta$ ), promovendo aumento da concentração do Ca<sup>2+</sup> intracelular com alteração na atividade dos canais iônicos da membrana plasmática, influxo/efluxo de íons e diminuição do limiar do potencial de ação (MCMULLEN JR et al., 2004; ZHAI et al., 2007).

## CONSIDERAÇÕES

A manutenção da sinalização intracelular fisiológica nas células cardíacas é fundamental para a contração das células cardíacas, mas a sobrecarga cardiovascular leva a reativação de genes expressos no período fetal e a estimulação de sua tradução, com alteração da síntese de proteínas contráteis da unidade sarcomérica e do volume celular, levando a hipertrofia.

## REFERÊNCIAS

- ABU-OMAR, N.; et al., Neuronal ryanodine receptors in development and aging. *Mol Neurobiol.* v.55, n.2, p.1183-1192, 2018.
- ALMAGOR, L.; et al., The role of a voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel intracellular linker: a structure-function analysis. *J Neurosci.* v.32, n.22, p.7602-7613, 2012.
- ANDERSON, M.E.; BROWN, J.H.; BERS, D.M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* v.51, p.468-473, 2012.
- BERGMANN, O.; et al., Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* v.324, p.98-102, 2010.

- BERNARDO, B.C.; et al., Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* v.128, p.191-227, 2010.
- BERS, D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Ann Rev Physiol.* v.70, p.23-49, 2008.
- BHUPATHY, P.; BABU, G.J.; PERIASAMY, M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase. *J Mol Cell Cardiol.* v.42, p.903-911, 2007.
- BOGOYEVITCH, M.A.; et al., Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* v.269, p.1110-1119, 1994.
- BRINI, M.; et al., The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J.* v.280, n.21, p.5385-5397, 2013.
- BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* v.12, p.463-519, 1996.
- CABRERA-VERA, T.M.; et al., Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* v.24, p.765-781, 2003.
- CARICATI-NETO, A.; et al., Recent advances in pharmacological and non-pharmacological strategies of cardioprotection. *Int J Mol Sci.* v.20, n.16, p.1-24, 2019.
- CHATTERGOON, N.N.; et al., Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. *FASEB.* v.26, p.397-408, 2012.
- CHRISTEL, C.; LEE, A. Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta.* v.1820, n.8, p.1243-1252, 2012.
- COPENHAVER, P.F.; KÖGEL, D. Role of APP interactions with heterotrimeric G proteins: physiological functions and pathological consequences. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10:3. doi: 10.3389/fnmol.2017.00003.
- DECROCK, E.; et al., Calcium, oxidative stress and connexin channels, a harmonious orchestra directing the response to radiotherapy treatment? *Biochim Biophys Acta.* v.1864, n.6, p.1099-1120, 2017.
- DULHUNTY, A.F. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v.33, p. 763-772, 2006.
- EHLER, E. Cardiac cytoarchitecture-why the “hardware” is importante for heart function! *Biochim Biophys Acta.* v.1863, p.1857-1863, 2016.
- GIRAUD, G.D.; et al., Cortisol stimulates cell cycle activity in the cardiomyocyte of the sheep fetus. *Endocrinol* v.147, p.3643-3649, 2006.
- GIRAUD, G.D.; et al., Intravascular infusions of plasma into fetal sheep cause arterial and venous hypertension. *J Appl Physiol.* v.99, p.884-889, 2005.
- GRABAREK, Z. Structure of a trapped intermediate of calmodulin: calcium regulation of EF-hand proteins from a new perspective. *J Mol Biol.* v.346, n.5, p.1351-1366, 2005.
- GUTKIND, J.S. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chemist.* v.273, p.1839-1842, 1998.
- HAGIWARA, N.; et al., Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.* v.456, p.285-302, 1992.

- HARADA, K.; et al., Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation*. v.97, p.1952-1959, 1998.
- HARDER, B.A.; et al., Influence of fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factor (IGF-I) on cytoskeletal and contractile structures and on atrial natriuretic factor (ANF) expression in adult rat ventricular cardiomyocytes in culture. *J Mol Cell Cardiol*. v.28, p.19-31, 1996.
- HAUACHE, O.M. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. *Braz J Med Biol Res*. v.34, n.5, p.577-584, 2001.
- HOHENDANNER, F.; MAXWELL, J.T.; BLATTER, L.A. Cytosolic and nuclear calcium signaling in atrial myocytes: IP3-mediated calcium release and the role of mitochondria. *Channels*. v.9, n.3, p.129-138, 2015.
- HUTCHINSON, K.R.; et al.; Increased myocardial stiffness due to cardiac titin isoform switching in a mouse model of volume overload limits eccentric remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. v.79, p.104-114, 2015.
- KAJSTURA, J.; et al., Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ Res*. v.107, p.1374-1386, 2010.
- KAMER, J.K.; MOOHA, V.K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Rev Mol Cell Biol*. v.16, n.9, p.545-553, 2015.
- KHO, C.; LEE, A.; HAJJAR, R.J. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling-targets for heart failure therapy. *Nature Rev Cardiol*. v.9, n.12, p.717-733, 2012.
- LIAO, J.; et al., Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science*. v.335, n.6069, p.686-690, 2012.
- MAILLET, M.; VAN BERLO, J.H.; MOKENTIN, J.D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v.14, p.38-48, 2013.
- MALAN, D.; FLEISCHMANN, B.K. Functional expression and modulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in embryonic heart cells. *Pediatr Cardiol*. v.33, n.6, p.907-915, 2012.
- MATSUDA, N.; et al., Enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. *Circ Res*. v.78, p.650-659, 1996.
- MATSUMURA, K.; et al., Role of aldosterone in left ventricular hypertrophy in hypertension. *Am J Hypertens*. v.19, n.1, p.13-18, 2006.
- MCMULLEN JR, et al., Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. v.109, p.3050-3055, 2004.
- MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. Cardiac hypertrophy. *Rev Bras Hiperten*. v.8, n.1, p.63-75, 2001.
- MISHRA, J.; et al., The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter: structure, function, and pharmacology. *Handb Exp Pharmacol*. v.240, p.129-156, 2017.
- MOHAMMED SF, et al., Mineralocorticoid accelerates transition to heart failure with preserved ejection fraction via “nongenomic effects”. *Circulation*. v.122, n.4, p.370-378, 2010.
- O'TIERNEY, P.F.; et al., Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in fetal cardiomyocytes. *J Physiol*. v.588, p.2879-2889, 2010a.

- O'TIERNEY, P.F.; et al., Reduced systolic pressure load decreases cell-cycle activity in the fetal sheep heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v.299, p.R573-R578, 2010b.
- PARK, K.M.; et al., Atrila fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: is the extent of septal hypertrophy important? *Plos One.* v.11, n.6, p.e0156410, 2016.
- PEERS, C.; ELIES, J.; GAMPER, N. Novel ways to regulate T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Channels.* v.9, n.2, p.68-69, 2015.
- PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G.J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res.* v.77, p.265-273, 2008.
- PETROU, T.; et al., Intracellular calcium mobilization in response to ion channel regulators via a calcium-induced calcium release mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* v.360, n.2, p.378-387, 2017.
- REN, X.; PHILIPSON, K.D. The topology of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX1. *J Mol Cell Cardiol.* v.57, p.68-71, 2013.
- ROHINI, A.; et al., Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res.* v.61, p.269-280, 2010.
- SANTANA, L.F.; et al., Functional clouping of calcineurin and protein kinase A in mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* v.544, p.57-69, 2002.
- SASAKI, N.; et al., Increase of the delayed rectifier KC and Na(C)-KC pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ Res.* v.75, p.887-895, 1994.
- SASAKI, N.; MITSUIYE, T.; NOMA, A. Effects of mechanical stretch on membrane currents of single ventricular myocytes of guinea-pig heart. *Jpn J Physiol.* v.42, p.957-970, 1992.
- SATO, D.; SHANNON, T.R.; BERS, D.M. Sarcoplasmic reticulum structure and functional properties that promote long-lasting calcium sparks. *Biophys J.* v.110, n.2, p.382-390, 2016.
- SCHLAEPFER, D.D.; HUNTER, T. Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to Erk2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem.* v.272, p.13189-13195, 1997.
- SHANNON, T.R.; POGWIZD, S.M.; BERS, D.M. Elevated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res.* v.93, p.592-594, 2003.
- SHATTOCK, M.J.; et al., Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *J Physiol.* v.593, n.6, p.1361-1382, 2015.
- SHIMIZU, I.; MINAMINO, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* v.97, p.245-262, 2016.
- SMILJIC, S.; NESROROVIC, V.; SAVIC, S. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. *Med Pregl.* v.67, n.9-10, p.345-352, 2014.
- SUBEDI, K.P.; et al., Signaling pathway for endothelin-1 and phenylephrine-induced cAMP response element binding protein activation in rat ventricular myocytes: role of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and CaMKII. *Cell Physiol Biochem.* v.41, n.1, p.399-412, 2017.
- SUNDGREN, N.C.; et al., Angiotensin II stimulates hyperplasia but not hypertrophy in immature ovine cardiomyocytes. *J Physiol.* v.548, p.881-891, 2003.



- TADA, M.; KATZ, A.M. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Ann Rev Physiol.* v.44, p.401-423, 1982.
- THORNBERG, K.; et al., Regulation of the cardiomyocyte population in the developing heart. *Prog Biophys Mol Biol.* v.106, p.289-289, 2011.
- TOUCHBERRY, C.D.; et al., FGF23 is a novel regulator of intracellular calcium and cardiac contractility in addition to cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v.304, n.8, p.E863-E873, 2013.
- VAN WAGONER, D.R. Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* v.72, .973-983, 1993.
- WANG, H.J.; et al., Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension.* v.64, n.4, p.745-755, 2014.
- WANG, Y.; et al., Extracellular renalase protects cells and organs by outside in signalling. *J Cell Mol Med.* v.21, n.7, p.1260-1265, 2017.
- WHEELER-JONES, C.P.D. Cell signaling in the cardiovascular system: an overview. *Heart.* v.91, p.1366-1374, 2005.
- YAYAMA, K.; et al., Up-regulation of angiotensin II type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressure-overload. *J Pharmacol Exp Therap.* v.308, p.736-743, 2004.
- ZHAI, P.; et al., Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* v.282, p.33181-33191, 2007.
- ZHANG, Y.; SCOUMANNE, A.; CHEN, X. G Protein-coupled receptor 87: a promising opportunity for cancer drug discovery. *Mol Cell Pharmacol.* v.2, p.111-116, 2010.