



julho 2025

**Sumário pormenorizado do seminário
“Estrutura e Função de Alvos Terapêuticos:
Implicações para o Desenvolvimento de Terapias
Farmacológicas mais Eficientes”**

CARMEN DINIZ PEREIRA

**PROVAS DE AGREGAÇÃO
FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

Relatório sobre uma unidade curricular elaborado nos termos do artigo 5º, alínea b), do Decreto-Lei nº 239/2007, publicado no Diário da República nº 116 (I Série) de 19 de junho de 2007, para apreciação no âmbito de provas para atribuição do título académico de Agregado em Ciências Farmacêuticas, especialidade de Farmacologia e Farmacoterapia

Índice Geral

Sumário Pormenorizado do Seminário

<i>Nota Prévia</i>	<i>5</i>
<i>Breve Contextualização e Estrutura.....</i>	<i>7</i>
<i>Imuno(histo/cito)química Aplicada à Caracterização Estrutural e Funcional de Alvos Terapêuticos.....</i>	<i>10</i>
<i>Avaliação Morfofuncional de Alvos Terapêuticos em Modelos Fisiopatológicos.....</i>	<i>12</i>
<i>Potencial Terapêutico de Novos Compostos: Interação com Vias de Sinalização e Alvos Celulares</i>	<i>14</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>16</i>

Nota Prévia

De acordo com o disposto no artigo 5.º, alínea c), do Decreto-Lei n.º 239/2007, de 19 de junho, apresenta-se um seminário subordinado ao tema “Estrutura e Função de Alvos Terapêuticos: Implicações para o Desenvolvimento de Terapias Farmacológicas mais Eficientes”, no âmbito do ramo do conhecimento ou especialidade em que são apresentadas as provas para atribuição do título académico de Agregado em Ciências Farmacêuticas, concretamente na área de Farmacologia e Farmacoterapia. Trata-se de um seminário concebido para contexto académico e científico, cuja pertinência e relevância estão diretamente associadas à área de especialização da autora.

No contexto académico, está prevista a apresentação parcial deste seminário no âmbito da unidade curricular de Anatomia e Histologia, integrada no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICEF) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP). Esta unidade curricular, objeto do relatório pedagógico integrante das provas de agregação, visa proporcionar aos estudantes uma compreensão aprofundada do corpo humano, com ênfase na correlação entre estrutura (micro e macro) e função. Este conhecimento é particularmente relevante na formação de estudantes das ciências da saúde, em especial das ciências farmacêuticas, na medida em que facilita a compreensão da existência e do papel de alvos terapêuticos na abordagem e tratamento de diversas patologias.

Além de se adequar ao plano de estudos da unidade curricular referida, o seminário é igualmente pertinente para outras áreas do saber, como Farmacologia, Fisiopatologia e Farmacoterapia, podendo também ser adaptado a contextos académicos mais avançados, como cursos de pós-graduação, mestrados e programas doutorais.

Do ponto de vista científico, o seminário mostra-se igualmente relevante, podendo ser direcionado para a atualização de conhecimentos sobre a quantificação de elementos estruturais e funcionais. Neste âmbito, destaca-se a aplicação de técnicas como a imunohistoquímica e/ou imunocitoquímica, bem como a

respetiva análise quantitativa, que permitem complementar a informação funcional relativa às proteínas ou aos alvos terapêuticos em estudo. O conteúdo pode ainda ser adaptado a interesses mais específicos, como o estudo da importância dos recetores (ou outras proteínas-alvo) na resposta terapêutica em determinadas condições clínicas.

A atividade docente universitária e a investigação científica constituem um binómio indissociável e sinérgico, representando uma mais-valia fundamental para o processo de ensino-aprendizagem no ensino superior. Este tipo de seminário, que integra elementos de ambos os domínios, contribui para estimular a curiosidade científica dos estudantes e promover o interesse pela investigação, aproximando-os do trabalho desenvolvido na FFUP.

Nesse sentido, um dos objetivos adicionais deste seminário é divulgar e contextualizar a investigação desenvolvida pela autora ao longo do seu percurso científico, nomeadamente enquanto docente e investigadora no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências do Medicamento da FFUP.

Breve Contextualização e Estrutura

Os alvos terapêuticos são componentes biológicos específicos que, quando modulados (inibidos, ativados ou alterados), produzem o efeito terapêutico desejado. Estes alvos estão frequentemente associados a processos celulares fundamentais e, portanto, a sua localização, distribuição e organização estrutural na superfície e/ou no interior da célula são cruciais para a compreensão da sua função [1]. A relação entre os alvos terapêuticos e a estrutura celular é um critério relevante na investigação biomédica e nas ciências farmacêuticas, uma vez que a eficácia e a especificidade de um fármaco dependem diretamente da sua interação com componentes celulares específicos, como recetores, enzimas, canais iónicos ou transportadores, localizados em diferentes compartimentos da célula [2,3]. De facto, a compreensão da estrutura celular é essencial para identificar e validar alvos terapêuticos precisos, permitindo o desenvolvimento de medicamentos mais seletivos, com menor incidência de efeitos secundários e maior potencial terapêutico [4]. Nesse contexto, as técnicas morfológicas desempenham um papel fundamental, incluindo a microscopia ótica, a microscopia de fluorescência, a microscopia eletrónica, a imunohistoquímica, a imunocitoquímica e outras técnicas de imagem de alta resolução [5,6], permitindo: i) identificar e localizar alvos terapêuticos no contexto celular ou tecidual, permitindo uma melhor compreensão da sua relevância biológica; ii) correlacionar a localização subcelular com a função do alvo, o que é crucial para entender como a sua modulação pode afetar vias de sinalização fisiológicas ou patológicas; e iii) avaliar alterações morfológicas induzidas por terapias direcionadas, que podem atuar como marcadores de eficácia terapêutica ou de toxicidade potencial [7,8].

Nesse contexto, a imunohistoquímica (IHQ) — quando aplicada a tecidos — e a imunocitoquímica (ICQ) — quando aplicada a células isoladas — são técnicas versáteis que permitem, através da utilização de anticorpos específicos marcados, detetar com precisão proteínas-alvo, possibilitando a análise do seu padrão de expressão nos diferentes compartimentos celulares, como organelas ou membrana plasmática, e simultaneamente, estimar/discriminar, pela sua localização, potenciais efeitos funcionais nas mais variadas condições quer em contextos fisiológicos quer patológicos [9-11]. Além disso, a análise

quantitativa de imagens obtidas por IHQ/ICQ permitem a identificação de padrões, a discriminação de diferenças sutis e a revelação de alterações estruturais que complementam a informação funcional revelando o contributo de uma proteína em particular para o processo fisiopatológico [12-14], e desse modo, a sua identificação como potencial alvo terapêutico. Essa intersecção entre a caracterização morfológica e a identificação de alvos farmacológicos estabelece uma ponte clara com as Ciências Farmacêuticas, sendo justamente essa conexão o foco do presente seminário.

O seminário propõe evidenciar a importância crescente da identificação e caracterização de alvos terapêuticos no avanço da medicina personalizada e no desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras. Através da integração entre metodologias morfológicas, como a imunohistoquímica e a imunocitoquímica, e abordagens funcionais, foi possível demonstrar como a análise da localização, expressão e função de proteínas específicas pode esclarecer mecanismos fisiopatológicos subjacentes a diversas doenças. Ao longo das diferentes secções, ficou patente que o estudo da estrutura celular e da distribuição subcelular de recetores e transportadores é fundamental não só para compreender o seu papel biológico, mas também para validar a sua relevância clínica como potenciais alvos farmacológicos. Exemplos concretos — desde patologias cardiovasculares como a hipertensão, até a doenças oncológicas como o cancro da mama triplo negativo — reforçaram o impacto real e potencial desta abordagem multidisciplinar. Além disso, a exploração de novos compostos bioativos, sejam de origem natural, sintética ou resultantes da valorização de subprodutos industriais, abre portas para estratégias terapêuticas inovadoras e sustentáveis, com implicações relevantes para a saúde pública e para a indústria farmacêutica.

O seminário encontra-se organizada em três secções principais: uma primeira parte mais metodológica em que se explica utilizando como exemplo um recetor(s)(alvo), a metodologia de marcação por IHQ e a análise quantitativa, realçando a capacidade de visualização da proteína/recetor(s)(alvo) e, simultaneamente, a capacidade de se fazer a identificação de padrões estruturais e a sua correlação com dados funcionais; uma segunda parte em que se aplica a IHQ para determinar alterações estruturais que em conjunto com abordagens funcionais permite um estudo amplo dos mecanismos fisiopatológicos induzidos por doenças; uma terceira parte em que se explora, em condições patológicas, a capacidade de novos compostos (naturais ou sintéticos) alterarem a expressão e/ou função reduzindo a

progressão/tratando a doença, incluindo em situações em que se verifica resistência a fármacos atualmente disponíveis na clínica.

Ao longo do seminário serão apresentados exemplos de trabalhos da autora referentes a cada uma das partes do seminário e que refletem não só o contributo para o conhecimento nesta área bem como as dificuldades inerentes subjacentes à própria metodologia e/ou associação com metodologias funcionais. O conhecimento aqui partilhado visa, assim, não só transmitir conceitos fundamentais, mas também inspirar o aprofundamento da investigação e a aplicação prática desses conhecimentos em benefício da sociedade. O seminário termina com uma reflexão sobre os desafios emergentes e a inovação, estimulando nos estudantes o seu espírito crítico, a sua sede de conhecimento e de aprendizagem.

Imuno(histo/cito)química Aplicada à Caracterização Estrutural e Funcional de Alvos Terapêuticos

Os alvos terapêuticos são essenciais no desenvolvimento de tratamentos direcionados, e a compreensão de sua estrutura e função é fundamental para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e com menos efeitos adversos [15]. No contexto dos recetores metabotrópicos, que representam uma grande parte dos alvos terapêuticos, sua ação ocorre principalmente por meio da ativação de proteínas G, conhecidas como GPCRs (G protein-coupled receptors), que iniciam uma cascata de sinalização intracelular, modulando diversas funções celulares [16,17]. Recetores de adenosina e recetores [18] de angiotensina [19] são dois exemplos de recetores metabotrópicos, com papéis significativos em sistemas fisiológicos variados, pelo que se efetua uma breve descrição dos seus diferentes subtipos e respetivas funções mais relevantes para melhor enquadramento e compreensão.

Desde o início do século XX, a imunohistoquímica (IHQ) tem desempenhado um papel fundamental na visualização de antígenos em tecidos [10,20]. Um marco significativo ocorreu na década de 1940, quando Coons e colaboradores [21] introduziram o uso de anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para localizar antígenos, estabelecendo os fundamentos da imunofluorescência [22,23]. A especificidade das reações antígeno-anticorpo tornou possível a identificação precisa de moléculas como citocinas, enzimas, fatores de transcrição, recetores e transportadores, diretamente em tecidos biológicos [24].

Inicialmente utilizada de forma predominantemente qualitativa, a IHQ servia como complemento a colorações histológicas. Um exemplo relevante é o trabalho da autora, publicado em 2003, que descreve a presença e o padrão de distribuição de recetores de adenosina do tipo A2 no canal deferente de rato, estabelecendo uma relação entre a informação obtida com a modulação exercida por estes recetores sobre a contração muscular induzida por estimulação elétrica — sendo este um dos primeiros estudos a explorar uma abordagem em que se relaciona o binómio estrutura e função [25].

Com os avanços tecnológicos, a IHQ passou a ser aplicada também em análises quantitativas, especialmente na avaliação de biomarcadores, proteínas de diagnóstico e alvos terapêuticos. A quantificação de elementos imunomarcados em tecidos permite uma compreensão mais aprofundada de dados funcionais, enriquecendo consideravelmente a

informação obtida por análise qualitativa. Essa abordagem será ilustrada com diversos trabalhos da autora [26-30].

A descoberta pioneira de que a angiotensina II (Ang II) pode induzir alterações ultraestruturais nas células após ser injetada na zona nuclear, observada em 1971 [31], desafiou a visão tradicional de que os GPCRs estavam restritos à membrana plasmática. Desde então, evidências acumuladas demonstraram que diversos GPCRs podem translocar-se para o núcleo celular, onde desempenham funções regulatórias essenciais [32].

Uma das principais limitações na investigação dos GPCRs nucleares é a dificuldade em distinguir claramente entre a marcação nuclear e a membranar. Muitas metodologias utilizadas para estudar os GPCRs foram desenvolvidas para os receptores localizados na membrana plasmática, como células permeáveis a corantes fluorescentes ou biossensores direcionados adequadamente. Isso torna a segmentação precisa entre as marcações nuclear e membranar um desafio técnico significativo [32,33]. Para superar estas limitações, a autora usou uma estratégia [34] que envolve o isolamento prévio dos núcleos a partir de células em cultura, permitindo a análise direta de proteínas de interesse no núcleo. Esse método de imunomaração segue um protocolo semelhante ao utilizado nas células, mas com a vantagem de proporcionar uma separação mais clara entre as estruturas nucleares e membranares. Assim, a IHQ aliada a técnicas aprimoradas de isolamento de núcleos e análise de proteínas, tem permitido avanços significativos na compreensão da localização e função dos GPCRs no núcleo celular. Essas abordagens oferecem informação valiosa sobre os mecanismos moleculares subjacentes a processos fisiológicos e patológicos, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias direcionadas e personalizadas.

Avaliação Morfofuncional de Alvos Terapêuticos em Modelos Fisiopatológicos

O seminário prossegue explorando a aplicação da IHQ para determinar alterações estruturais em contexto fisiopatológico. Recorrendo a modelos experimentais de doença, *in vivo* ou *in vitro*, a utilização das metodologias descritas na seção anterior permite estabelecer padrões, discriminar diferenças e revelar alterações estruturais, complementando informação funcional e revelando o contributo de uma proteína/alvo) no processo fisiopatológico (quando se comparam situações na ausência e na presença de patologia). A combinação de métodos funcionais e morfológicos permite avaliar as alterações verificadas ao nível dos recetores em estudo e estabelecer uma razão causal para as alterações funcionais observadas.

Na hipertensão arterial — uma condição crónica que representa um fator de risco significativo para doenças cardiometabólicas — foram estudadas alterações na expressão dos recetores de adenosina e dos transportadores de nucleósidos [35]. Estas alterações influenciam diretamente a interação entre os recetores de adenosina e o sistema nervoso simpático, com implicações importantes na regulação da pressão arterial e da resposta inflamatória [36-40]. A adenosina, uma molécula sinalizadora chave no sistema cardiovascular, possui efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e citoprotetores reconhecidos, regulando o fluxo sanguíneo, a inflamação e o metabolismo. No entanto, na hipertensão, a disfunção das suas vias de sinalização pode contribuir para o dano endotelial [30,39], disfunção vascular e progressão de lesões em órgãos. Esta disfunção está também associada a um aumento do risco de doenças metabólicas, como a diabetes tipo 2 [41,42] agravando o quadro clínico.

Uma forma de hipertensão que tem vindo a ser cada vez mais estudada nos últimos anos diz respeito ao aumento da pressão arterial como resposta tardia a condições adversas durante o desenvolvimento fetal. Esta condição foi inicialmente descrita por Barker na década de 1990 [43], no contexto da hipótese da origem fetal das doenças do adulto (“Developmental Origins of Health and Disease” - DOHaD). Durante o desenvolvimento fetal, exposições adversas — como restrição do crescimento intrauterino, desnutrição materna, hipóxia ou exposição a glucocorticoides — podem induzir alterações epigenéticas e estruturais nos órgãos e sistemas em desenvolvimento. Estas modificações, muitas vezes silenciosas até à

idade adulta, contribuem para uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em particular hipertensão arterial. Neste contexto, a autora tem vindo a caracterizar, em diferentes modelos experimentais e faixas etárias, alterações estruturais e funcionais associadas à programação fetal da hipertensão [44-50]. Especial atenção tem sido dada à interação entre o sistema nervoso simpático e os recetores acoplados à proteína G (GPCRs), cuja desregulação pode amplificar a resposta vasoconstritora e contribuir para o aumento sustentado da pressão arterial [45]. Adicionalmente, estas alterações repercutem-se no funcionamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), exacerbando os efeitos pró-hipertensivos deste sistema. Paralelamente, tem sido observada uma acentuação do stress oxidativo (inclusive observado na sequência da ativação de recetores a AT1 e AT2 nucleares [50]), associada a uma modulação endotelial comprometida [46,47]. Estes fatores, em conjunto, contribuem para um fenótipo cardiovascular disfuncional e aumentam o risco de hipertensão e outras comorbilidades ao longo da vida.

Para além do seu envolvimento em doenças cardiovasculares como a hipertensão, os recetores de adenosina têm sido objeto de crescente interesse em outras condições patológicas, incluindo o cancro. Particularmente no cancro da mama triplo negativo (TNBC, Triple-Negative Breast Cancer), estes recetores emergem como alvos terapêuticos promissores devido ao seu papel crítico na progressão tumoral, resistência aos tratamentos e modulação do microambiente tumoral. O TNBC é uma forma agressiva de cancro da mama, caracterizada pela ausência de expressão dos recetores hormonais de estrogénio (ER) e progesterona (PR), bem como do recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Esta ausência limita significativamente as opções terapêuticas atualmente disponíveis, tornando o TNBC particularmente desafiante do ponto de vista clínico. Neste contexto, a comparação entre o padrão de marcação dos recetores de adenosina de células mamárias saudáveis e de células TNBC foi estudado [51].

Potencial Terapêutico de Novos Compostos: Interação com Vias de Sinalização e Alvos Celulares

Dando continuidade ao trabalho desenvolvido até à data, e com o objetivo de avaliar o impacto na expressão e/ou função de alvos terapêuticos específicos, foram analisados compostos naturais e sintéticos obtidos através de colaborações com diversos laboratórios e instituições. O propósito é identificar estratégias inovadoras que permitam restringir a progressão ou tratar patologias em estudo, nomeadamente doenças não transmissíveis com elevada prevalência, como as doenças cardiovasculares, ou com mau prognóstico, como o TNBC ou melanoma. Esta parte do seminário foca-se, assim, no estudo do efeito de novos compostos — de origem natural ou sintética — com potencial para promover a saúde, explorando a sua interação com alvos moleculares envolvidos em mecanismos fisiopatológicos e/ou vias de sinalização celular (em relação a controlos, positivos e negativos). Através de uma abordagem integradora, que combina amostras clínicas, sistemas celulares e modelos animais, utilizados isoladamente ou em associação, procurou-se avaliar o efeito de novos compostos na melhoria de estratégias terapêuticas existentes e identificar novas aplicações ou possibilidades de reutilização de subprodutos industriais.

O potencial de novos compostos na otimização de abordagens terapêuticas foi avaliado, com especial foco no tratamento oncológico. Entre os candidatos promissores destacam-se os complexos metálicos à base de paládio, constituídos por aminas biogénicas associadas a um centro metálico. Estes compostos demonstraram atividade antitumoral e anti-invasiva significativa em modelos de cancro, incluindo TNBC e suas formas resistentes, oferecendo uma alternativa eficaz face à resistência observada à quimioterapia convencional [52-58]. Adicionalmente, foi caracterizado o perfil farmacocinético do complexo paládio-poliamina, reforçando a sua viabilidade como futuro agente anticancerígeno [59,60].

Ainda com o objetivo de desenvolver novas estratégias para combater o cancro, polifenóis extraídos de plantas e frutos demonstraram efeitos adjuvantes ou anticancerígenos em modelos de TNBC, representando uma abordagem complementar promissora [61-63]. Por outro lado, compostos sintéticos da família dos isoxazóis foram avaliados em modelos de doenças hematológicas [64], tendo sido identificado um composto com atividade seletiva contra células tumorais hematológicas e baixa toxicidade em células saudáveis. Estes dados

reforçam o seu potencial enquanto agentes adjuvantes ou como base para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas.

No âmbito da valorização de subprodutos industriais e promoção de práticas sustentáveis, foram estudados péptidos bioativos obtidos a partir de subprodutos da indústria cervejeira [65,66]. Estes compostos demonstraram capacidade de inibição da enzima de conversão da angiotensina (ECA), com destaque para a sua ação sobre a ECA vascular, revelando uma eficácia comparável à do fármaco de referência captopril, amplamente utilizado na terapêutica anti-hipertensiva [67-70]. Estes resultados apontam para o potencial dos péptidos em estudo como adjuvantes em estratégias terapêuticas para o controlo da hipertensão. Para além desta avaliação, foi realizado um estudo sobre a administração oral dos péptidos, com especial enfoque na biodisponibilidade e nos efeitos do metabolismo de primeira passagem. Os dados obtidos sugerem a viabilidade da sua utilização como compostos bioativos com eficácia sistémica otimizada.

Referências Bibliográficas

1. Altamura C, Lastraioli E. Novel therapeutic approach in cancer: the role of ion channels and transporters. *Front Pharmacol.* 2024;15:1422127. doi:10.3389/fphar.2024.1422127.
2. Arrowsmith J, Miller P. Trial watch: Phase II and phase III attrition rates 2011–2012. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(8):569–70. doi:10.1038/nrd4090.
3. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(12):993–6. doi:10.1038/nrd2199.
4. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41–58. doi:10.1038/nrd.2018.168.
5. Ronchi P, Beck M. Revealing the architecture of biological systems with cryo-electron tomography. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(3):157–73. doi:10.1038/s41580-020-00305-9.
6. Boer de P, Hoogenboom JP, Giepmans BNG. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! *Nat Methods.* 2015;12(6):503–13. doi:10.1038/nmeth.3400.
7. Bray MA, Singh S, Han H, et al. Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat Protoc.* 2016;11(9):1757–74. doi:10.1038/nprot.2016.105.
8. Tang Q, Sanchez-Garcia RJ, Dempsey GT, et al. Morphological profiling for drug discovery in the era of deep learning. *Nat Rev Drug Discov.* 2024;23:22–39. doi:10.1038/s41573-023-00773-9.
9. Shino, Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289-298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25.
10. Ramos-Vara JA. Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2017;1641:115-128. doi: 10.1007/978-1-4939-7172-5_5.
11. Diniz C, Rocha-Pereira C, Fresco P. Image analysis in microscopy – An historical perspective. In: Diniz C & Pandalai S, editors. *Image Analysis in Life Science*. Trivandrum: Research Signpost; 2009. p. 1–18. ISBN: 978-81-308-0312-8.

12. Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and Quantitative Analysis of Protein Expression. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(7):1026–1030. doi:10.5858/2006-130-1026-IAQAOP.
13. Bauman TM, Ricke EA, Drew SA, Huang W, Ricke WA. Quantitation of Protein Expression and Co-localization Using Multiplexed Immuno-histochemical Staining and Multispectral Imaging. *J Vis Exp*. 2016;110:53837. doi: 10.3791/53837.
14. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, Metzger GJ, Schmechel SC. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol*. 2012;7:42. doi: 10.1186/1746-1596-7-42.
15. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(12):993–6. doi:10.1038/nrd2199.
16. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356–63. doi:10.1038/nature08144.
17. Ghanemi A. Targeting G protein coupled receptor-related pathways as emerging molecular therapies. *Saudi Pharm J*. 2013;21(2):113–21. doi:10.1016/j.jsps.2013.07.007.
18. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):1–34. doi:10.1124/pr.110.003285.
19. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415–72. PMID:10977869.
20. Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. Techniques of immunohistochemistry: Principles, pitfalls, and standardization. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 5th ed. Elsevier; 2019. p. 1–42.
21. Coons AH, Leduc EH, Srebnik J. The demonstration of a specific antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J Immunol*. 1941;40(3):105–8.
22. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol*. 1941;47:200–2.

23. Coons AH, Kalpan MH. Localization of antigens in tissue cells. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*. 1950;91:1–13.
24. Childs GV. History of Immunohistochemistry. In: *Pathobiol Hum Dis*. 2014;3775-3796. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.07401-3.
25. Diniz C, Leal S, Gonçalves J. Regional differences in the adenosine A(2) receptor-mediated modulation of contractions in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*. 2003;460(2–3):191–199. doi:10.1016/s0014-2999(02)02926-6.
26. Diniz C, Fresco P, Leal S, Gonçalves J. Adenosine receptors involved in modulation of noradrenaline release in isolated rat tail artery. *Eur J Pharmacol*. 2004;504(1–2):17–25. doi:10.1016/j.ejphar.2004.09.048.
27. Leal S, Diniz C, Sá C, Gonçalves J, Soares AS, Rocha-Pereira C, Fresco P. Semiautomated computer-assisted image analysis to quantify 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride-immuno stained small tissues. *Anal Biochem*. 2006;357(1):137–143. doi:10.1016/j.ab.2006.07.017.
28. Diniz C, Rocha-Pereira C, Foote K, Leal S, Fresco P. Quantitative image analysis of immunohistochemistry specimens using SACAIA method. In: Diniz C & Pandalai S, editors. *Image Analysis in Life Science*. Trivandrum: Research Signpost; 2009. p. 19–33. ISBN: 978-81-308-0312-8.
29. Leal S, Sá C, Gonçalves J, Fresco P, Diniz C. Immunohistochemical characterization of adenosine receptors in rat aorta and tail arteries. *Microsc Res Tech*. 2008;71(10):703–709. doi:10.1002/jemt.20609.
30. Sousa JB, Vieira-Rocha MS, Arribas SM, Gonzalez MC, Fresco P, Diniz C. Endothelial and neuronal nitric oxide activate distinct pathways on sympathetic neurotransmission in rat tail and mesenteric arteries. *PLoS One*. 2015;10:e0129224. doi:10.1371/journal.pone.0129224.
31. Robertson AL Jr, Khatrallah PA. Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science*. 1971;172(3988):1138–1139. doi:10.1126/science.172.3988.1138.

32. Ribeiro-Oliveira R, Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Vieira-Rocha MS, Sousa JB, Gonçalves J, Diniz C. Nuclear G-protein-coupled receptors as putative novel pharmacological targets. *Drug Discov Today*. 2019;24(11):2192–2201. doi:10.1016/j.drudis.2019.09.003.
33. Tesson F, Vassal G, Bensaid M, et al. Nuclear G protein-coupled receptors: New insights into their structure, function and therapeutic potential. *J Cell Sci*. 2019;132(10):1-11. doi:10.1242/jcs.219019.
34. Moon IS, Lee H, Park SD, Seog DH. Immunonucleochemistry: a new method for in situ detection of antigens in the nucleus of cells in culture. *Cytotechnology*. 2010;62(2):83-93. doi:10.1007/s10616-010-9266-0.
35. Sousa-Oliveira A, Brandão A, Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Sousa JB, Diniz C. Vascular impairment of adenosinergic system in hypertension: increased adenosine bioavailability and differential distribution of adenosine receptors and nucleoside transporters. *Histochem Cell Biol*. 2019;151:407–418. doi:10.1007/s00418-018-1743-0.
36. Rocha-Pereira C, Sousa JB, Vieira-Rocha MS, Fresco P, Gonçalves J, Diniz C. Differential inhibition of noradrenaline release mediated by inhibitory A1-adenosine receptors in the mesenteric vein and artery from normotensive and hypertensive rats. *Neurochem Int*. 2013;62(4):399-405.
37. Rocha-Pereira C, Arribas SM, Fresco P, González MC, Gonçalves J, Diniz C. Impaired inhibitory function of presynaptic A1-adenosine receptors in SHR mesenteric arteries. *J Pharmacol Sci*. 2013;122(2):59-70.
38. Sousa JB, Vieira-Rocha MS, Sá C, Ferreirinha F, Correia-de-Sá P, Diniz C. Lack of endogenous adenosine tonus on sympathetic neurotransmission in spontaneously hypertensive rat mesenteric artery. *PLoS One*. 2014;9(8):e105540.
39. Sousa JB, Fresco P, Diniz C. Endothelial dysfunction impairs vascular neurotransmission in tail arteries. *Neurochem Int*. 2015;80:7-13.
40. Sousa JB, Diniz C. The adenosinergic system as a therapeutic target in the vasculature: new ligands and challenges. *Molecules*. 2017;22(5):752.

41. Patinha D, Carvalho C, Abreu C, Cunha OM, Mota M, Afonso J, et al. Diabetes downregulates renal adenosine A2A receptors in an experimental model of hypertension. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217552.
42. Patinha D, Abreu C, Carvalho C, Cunha OM, Mota M, Afonso J, et al. Adenosine A2A and A3 receptors as targets for the treatment of hypertensive-diabetic nephropathy. *Biomedicines*. 2020;8(11):529.
43. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod*. 1997;2(2):105–12.
44. Diniz C, Leal S, Logan K, Rocha-Pereira C, Soares AS, Rocha E, Gonçalves J, Fresco P. Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor types 1 and 2 in the mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Microsc Res Tech*. 2007;70(8):677-681. doi:10.1002/jemt.20453.
45. Vieira-Rocha MS, Sousa JB, Rodriguez-Rodriguez P, Morato M, Arribas SM, Diniz C. Insights into sympathetic nervous system and GPCR interplay in fetal programming of hypertension: a bridge for new pharmacological strategies. *Drug Discov Today*. 2020;25(4):739-747. doi:10.1016/j.drudis.2020.01.019.
46. Vieira-Rocha MS, Rodriguez-Rodriguez P, Ferreira-Duarte M, Faria M, Sousa JB, Morato M, Arribas SM, Diniz C. Fetal undernutrition modifies vascular RAS balance enhancing oxidative damage and contributing to remodeling. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1233. doi:10.3390/ijms2303123.
47. Vieira-Rocha MS, Sousa JB, Rodriguez-Rodriguez P, Arribas SM, Diniz C. Elevated vascular sympathetic neurotransmission and remodelling is a common feature in a rat model of foetal programming of hypertension and SHR. *Biomedicines*. 2022;10(8):1902. doi:10.3390/biomedicines10081902.
48. Rodríguez-Rodríguez P, Vieira-Rocha MS, Quintana-Villamandos B, Monedero-Cobeta I, Prachaney P, López de Pablo AL, et al. Implication of RAS in postnatal cardiac remodeling, fibrosis and dysfunction induced by fetal undernutrition. *Pathophysiology*. 2021;28(2):273–90. doi:10.3390/pathophysiology28020018.

49. Vieira-Rocha MS, Rodríguez-Rodríguez P, Sousa JB, Gonzalez MC, Diniz C. Vascular angiotensin AT1 receptor neuromodulation in fetal programming of hypertension. *Vasc Pharmacol*. 2019;117:27–34.
50. Gonçalves-Monteiro S, Ribeiro-Oliveira R, Vieira-Rocha MS, Vojtek M, Sousa JB, Diniz C. Insights into nuclear G-protein-coupled receptors as therapeutic targets in non-communicable diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(5):439. doi:10.3390/ph14050439.
51. Cerquido A, Vojtek M, Viegas O, Dias-Pereira P, Diniz C. Adenosine overcomes triple-negative breast cancer resistance to platin-derived chemotherapeutic drugs. *Med Sci Forum*. 2022;14(1):146.
52. Carneiro TJ, Batista de Carvalho ALM, Vojtek M, Laginha RC, Marques MPM, Diniz C. Pd₂Spermine as an alternative therapeutic for cisplatin-resistant triple-negative breast cancer. *J Med Chem*. 2024;67(8):6839–53.
53. Vojtek M, Martins CB, Ramos R, Duarte SG, Ferreira IM, Marques MPM, et al. Pd(II) and Pt(II) trinuclear chelates with spermidine: selective anticancer activity towards TNBC-sensitive and -resistant to cisplatin. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1205.
54. Vojtek M, Marques MPM, Batista de Carvalho ALM, Mota-Filipe H, Diniz C. Palladium-spermine complex (Pd₂Spm) triggers autophagy and caspase-independent cell death in triple-negative breast cancer cells. *Med Sci Forum*. 2022;14(1):142.
55. Carneiro TJ, Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Neves JR, Batista de Carvalho ALM, et al. Metabolic impact of anticancer drugs Pd₂Spermine and cisplatin on the brain of healthy mice. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):259.
56. Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Šeminská P, Valova K, Bellon L, Diniz C, et al. Pd₂Spermine complex shows cancer selectivity and efficacy to inhibit growth of triple-negative breast tumors in mice. *Biomedicines*. 2022;10(2):210.
57. Carneiro TJ, Araujo R, Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Batista de Carvalho ALM, et al. Impact of the Pd₂Spm (spermine) complex on the metabolism of triple-negative breast cancer tumors of a xenograft mouse model. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10775.

58. Vojtek M, Marques MPM, Ferreira IMPLVO, Mota-Filipe H, Diniz C. Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer. *Drug Discov Today*. 2019;24(4):1044–58.
59. Vojtek M, Pinto E, Gonçalves-Monteiro S, Almeida A, Marques MPM, Diniz C. Fast and reliable ICP-MS quantification of palladium and platinum-based drugs in animal pharmacokinetic and biodistribution studies. *Anal Methods*. 2020;12(39):4806–12.
60. Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Pinto E, Kalivodova S, Almeida A, Marques MPM, et al. Preclinical pharmacokinetics and biodistribution of anticancer dinuclear palladium(II)-spermine complex (Pd₂Spm) in mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;14(2):173. doi:10.3390/ph14020173.
61. Viegas O, Faria MA, Sousa JB, Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Diniz C. Delphinidin-3-O-glucoside inhibits angiogenesis via VEGFR2 downregulation and migration through actin disruption. *J Funct Foods*. 2019;54:393–402. doi:10.1016/j.jff.2019.01.039.
62. Cerquido AS, Vojtek M, Ribeiro-Oliveira R, Viegas O, Sousa JB, Diniz C. Unravelling potential health-beneficial properties of Corema album phenolic compounds: A systematic review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(10):1231. doi:10.3390/ph15101231.
63. Cerquido AS, Vojtek M, Ribeiro-Oliveira R, Gonçalves-Monteiro S, Sousa JB, Diniz C. Corema album leaves mediate DNA damage in triple-negative breast cancer cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2022;44(8):3598–610. doi:10.3390/cimb44080246.
64. Majířská M, Pilátová MB, Kudličková Z, Vojtek M, Diniz C. Targeting hematological malignancies with isoxazole derivatives. *Drug Discov Today*. 2024;29(4):104059. doi:10.1016/j.drudis.2024.104059.
65. Ribeiro-Oliveira R, Diniz C, Ferreira IMPLVO. In vitro strategies to understand the impact of oral intake on the bioavailability and bioactivity of peptides from brewing by-products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2024;1–9. doi:10.1080/10408398.2024.2327021.
66. Ribeiro-Oliveira R, Martins ZE, Sousa JB, Ferreira IMPLVO, Diniz C. The health-promoting potential of peptides from brewing by-products: an up-to-date review. *Trends Food Sci Technol*. 2021;118:143–53. doi:10.1016/j.tifs.2021.09.031.

67. Ribeiro-Oliveira R, Martins ZE, Faria MÂ, Sousa JB, Ferreira IMPLVO, Diniz C. Protein hydrolysates from brewing by-products as natural alternatives to ACE-inhibitory drugs for hypertension management. *Life (Basel)*. 2022;12(10):1554. doi:10.3390/life12101554.
68. Ribeiro-Oliveira R, Martins ZE, Faria MÂ, Sousa JB, Ferreira IMPLVO, Diniz C. Natural brewing peptides with enhanced inhibitory effects on angiotensin I-converting enzyme. *Med Sci Forum*. 2022;14(1):50. doi:10.3390/msf14010050.
69. Ribeiro-Oliveira R, Rodríguez-Rodríguez P, Sousa JB, Ferreira IMPLVO, Diniz C. ACE inhibitory activity elicited by brewing peptides: influence of the oral route and vascular microenvironment. *Clin Sci (Lond)*. 2023;137(9):729–47. doi:10.1042/CS20220591.
70. Ribeiro-Oliveira R, Rodríguez-Rodríguez P, Sousa JB, Ferreira IMPLVO, Diniz C. Managing hypertension using brewing bioactive peptides as angiotensin-converting enzyme inhibitors: impact on vascular tone through ex vivo assays. *PharmaNutrition*. 2024;28:100389. doi:10.1016/j.phanu.2024.100389.