

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JANYERSON DANNYS PEREIRA DA SILVA

**Caracterização dos efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD
em artérias isoladas**

Indícios de que os canais TRPV4 participam da regulação das funções
da célula endotelial



RIBEIRÃO PRETO

2012

JANYERSON DANNYS PEREIRA DA SILVA

**Caracterização dos efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD
em artérias isoladas**

Indícios de que os canais TRPV4 participam da regulação das funções
da célula endotelial

Dissertação apresentada ao Departamento
de Farmacologia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Professora Dra. Rita de Cássia
Aleixo Tostes Passaglia

RIBEIRÃO PRETO

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Janyerson Dannys Pereira da

Caracterização dos efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD em artérias isoladas – Indícios de que os canais TRPV4 participam da regulação das funções da célula endotelial. Ribeirão Preto, 2012.

101 f. :il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Passaglia, Rita de Cássia Aleixo Tostes.

1. Relaxamentos dependentes de endotélio. 2. TRPV4. 3. Cálcio. 4. Artérias isoladas. 5. GSK1016790A. 6. 4 α PDD. 7. HC-067047.

SILVA JDP. **Caracterização dos efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD em artérias isoladas** – Indícios de que os canais TRPV4 participam da regulação das funções da célula endotelial.

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / _____

Banca Examinadora

-Professora Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)

Julgamento: _____

Assinatura: _____

-Professora Dra. Lusiane Maria Bendhack

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)

Julgamento: _____

Assinatura: _____

-Professora Dra. Caden Souccar

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP)

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Janyerson Dannys Pereira da Silva foi bolsista do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante o período de Julho de 2010 a Junho de 2012.

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO	11
1.1- Dos relaxamentos dependentes do endotélio	11
1.2- Do fator de relaxamento derivado das células endoteliais	15
1.3- Da função dos íons Ca^{2+} na ativação das células endoteliais	21
1.4- Canais TRP e relaxamentos dependentes de endotélio	26
1.5- Objetivos	43
2- MÉTODOS	44
2.1- Animais	44
2.2- Parte experimental	44
2.2.1- Preparações de órgão isolado	44
2.3- Figuras e Representação gráfica dos resultados	46
2.4- Imunorreatividade para TRPV4	47
2.4.1- Western blot.....	47
2.4.2- Imunohistoquímica.....	47
3- RESULTADOS	48
3.1- Imunorreatividade para TRPV4 na aorta torácica de rato	48
3.2- Efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD em artérias isoladas de rato, coelho, camundongo e de cobaia	50
3.3- Relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD na aorta torácica de rato e de coelho requerem a presença de cálcio extracelular	60
3.4- Efeitos da hidroxocobalamina (vitamina B12a), da L-NNA e do ODQ nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD	64
3.5- Efeitos do vermelho de rutênio e do HC-067047 nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD	68
3.6- Efeitos do vermelho de rutênio e do HC-067047 nos relaxamentos dependentes de endotélio produzidos pela acetilcolina, histamina, taspigargina e pelo A23187 ...	69

3.7- Efeitos do PYR3 nos relaxamentos produzidos pela acetilcolina e pelo GSK1016790A	76
3.8- Efeitos da capsaicina em anéis da aorta torácica e em tiras de bexiga isoladas de rato	76
3.9- Experimentos feitos com a adição na mesma preparação de substâncias com diferentes mecanismos para produzir relaxamentos	79
4- DISCUSSÃO	81
5- CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

APRESENTAÇÃO

Em 1966, Sir Howard Florey comentava o quão longe estava de ser definitivo o nosso conhecimento a respeito das células que se situavam entre o fluxo sanguíneo e as células dos tecidos, dispendo-se como uma linha entre esses, e como ele estava ansioso por esperar pelos próximos 10 anos, na expectativa de que surgisse uma rica colheita de novos conhecimentos a respeito de suas funções. Pouco mais de 10 anos depois – exatamente em maio do ano de 1978 – Robert Furchgott, em seus experimentos, faz uma observação, considerada por ele mesmo como um acidente, ou *serendipity*, que mudaria todo o conhecimento e, principalmente, a maneira como víamos essas células que um dia foram tratadas como ‘não mais que uma camada de celofane’, e ainda, como o ‘epitélio dos vasos sanguíneos’. Curiosamente, foi para distingui-las das células epiteliais que Wilhelm His, em 1865, usou pela primeira vez o termo ‘endotélio’ para se referir à camada composta por estas células que também revestiam as ‘cavidades do corpo’.

Nesta Dissertação de Mestrado, tentamos descrever – e algumas vezes, reinterpretar – as observações iniciais que levaram o professor Robert Furchgott à descoberta de uma nova função para as células endoteliais. Como contribuição ao conhecimento a respeito da regulação das funções dessas células, descrevemos a função de uma proteína denominada de TRPV4 na produção de relaxamentos dependentes do endotélio em artérias isoladas.

Gostaríamos de agradecer ao Dr. William Martin (*University of Glasgow*), ao Dr. Roger Hardie (*Cambridge University*), ao Dr. Peter Hochstrate (*Universität Düsseldorf*) e ao Dr. Baruch Minke (*Hebrew University of Jerusalem*) por gentilmente nos enviarem artigos e referências fundamentais para o entendimento do assunto que abordamos nesta dissertação.

Gostaríamos de agradecer também à Eleni T. Gomes, pela ajuda com a técnica de imunohistoquímica, e à Fabíola Mestriner, pela ajuda com a técnica de *Western blot*.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4 α PDD** – *4-alpha-Phorbol 12, 13 didecanoate*, ativador de canais TRPV4
- A23187** – ionóforo de cálcio
- B12** – hidroxocobalamina, vitamina B12a, *scavenger* de NO
- BAY-41** – BAY 41-2272, ativador da ciclase de guanilato
- Br-GMPc** – 8-Bromo-GMP cíclico, análogo do GMP cíclico
- Caps** – capsaicina, ativador de canais TRPV1
- DFH** – difenidramina
- EDHF** – *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*
- EDRF** – *Endothelium-Derived Relaxing Factor*
- GSK** – GSK1016790A, ativador de canais TRPV1 e TRPV4
- HC** – HC067047, HC-067047, bloqueador de canais TRPV4
- HC-030** – HC-030031, bloqueador de canais TRPA1
- L-NNA** – N^G-nitro-L-Arginina, inibidor das sintases de NO
- NO** – monóxido de nitrogênio
- NOS** – sintases de NO
- ODQ** – *1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*, inibidor da ciclase de guanilato
- PYR3** – Pyr3, *1-[4-[(2,3,3-Trichloro-1-oxo-2-propen-1-yl)amino]phenyl]-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylic acid*, bloqueador de canais TRPC3
- SK&F96365** – SKF96365, SK&F 96365, SKF-96365, inibidor não seletivo do influxo de cálcio
- Taps** – tapsigargina, inibidor da Ca²⁺-ATPase de membrana do retículo endoplasmático
- trp** – *transient receptor potential*
- VR** – vermelho de rutênio, bloqueador de canais TRPA1 e TRPV1-V4

RESUMO

SILVA JDP. Caracterização dos efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD em artérias isoladas – Indícios de que os canais TRPV4 participam da regulação das funções da célula endotelial. Dissertação [Mestrado] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. 101f.

A produção e liberação de substâncias vasodilatadoras pelas células endoteliais requer uma elevação sustentada na concentração intracelular de cálcio; essa elevação é consequente a um influxo de cálcio. Porém, a identidade do (s) canal (is) envolvido (s) nesse influxo ainda não foi (ram) determinada (s) conclusivamente. Existem evidências de que o gene *TRPV4* (que codifica uma proteína permeável a cátions, inclusive ao cálcio) é expresso em células endoteliais. Porém, a falta de agentes que modulem especificamente a função dessa proteína não permitiu que o papel do TRPV4 no controle da função endotelial pudesse ser elucidado. Recentemente foram descritos dois novos compostos, o GSK1016790A (GSK) e o HC-067047 (HC), com ação ativadora e bloqueadora seletiva desse canal, respectivamente. Consequentemente, nesta dissertação descrevemos e interpretamos os resultados obtidos em experimentos concebidos para caracterizar o efeito do GSK1016790A (e com fins comparativos o efeito do 4 α PDD) em artérias isoladas de várias espécies. Para isso, empregamos anéis de artérias suspensos em cubas para órgão isolado para registro da tensão desenvolvida por esses anéis durante a contração isométrica provocada pela adição de fenilefrina; todos os experimentos foram realizados com solução de Krebs contendo diclofenaco (10 μ M). Inicialmente verificamos mediante imunohistoquímica a presença de imunorreatividade para o TRPV4 no endotélio da aorta torácica de rato. A adição de concentrações isoladas ou cumulativas de GSK produziu relaxamentos dependentes da concentração na aorta torácica de rato (CE_{50} =0,5 nM; $IC_{95\%}$ =0,35-0,72 nM; n=7); o 4 α PDD (1-10 μ M), em concentrações isoladas, também produziu relaxamentos na aorta torácica de rato. Resultados semelhantes foram observados para o GSK na aorta torácica de coelho (CE_{50} = 4,3 nM; $IC_{95\%}$ =3,58-5,14 nM; n=5), de camundongo (CE_{50} =1,4 nM; $IC_{95\%}$ =0,85-2,24 nM; n=3) e de cobaia (CE_{50} =0,2 nM; $IC_{95\%}$ =0,12-0,22 nM; n=4). GSK relaxou também a aorta abdominal (CE_{50} =6,5 nM; $IC_{95\%}$ =3,71-11,3 nM; n=3) e a artéria femoral de coelho (CE_{50} =17 nM; $IC_{95\%}$ =16,8-18,7 nM; n=4); Os relaxamentos produzidos por ambas as drogas apareceram 1-2 min após a adição e atingiram o máximo em 5-8 min, foram reversíveis e não apresentaram taquifilaxia. Em todas as artérias os relaxamentos foram estritamente dependentes de endotélio e da presença de cálcio no meio extracelular. Na aorta torácica de rato, a pré-incubação com HC (5 minutos) aboliu o efeito do GSK sem afetar os relaxamentos produzidos pela acetilcolina. Em todas as artérias testadas os efeitos do GSK e do 4 α PDD foram revertidos completamente pelo HC (1-3 μ M) ou pelo vermelho de rutênio (aorta torácica de rato e artérias de coelho, 1 μ M, VR). Esses resultados demonstram que os canais TRPV4 estão presentes na célula endotelial e que a sua ativação leva à produção de fatores relaxantes. Como corolário, esses resultados constituem indícios de que os canais TRPV4 podem participar da regulação da função das células endoteliais em situações fisiológicas e/ ou fisiopatológicas.

Descritores: Relaxamentos dependentes de endotélio. TRPV4. Cálcio. Artérias isoladas. GSK1016790A. 4 α PDD. HC-067047.

ABSTRACT

SILVA JDP. Characterization of the effects of GSK1016790A and 4 α PDD in isolated arteries. Clues for a role of TRPV4 channels in the regulation of endothelial cell functions. Thesis [Mestrado] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. 101f.

Production and release of vasodilator substances by endothelial cells require a sustained elevation of intracellular calcium which depends on calcium influx. The identity of the channels involved in this influx remains to be established. There is evidence that the TRPV4 gene (which encodes for a cation permeable channel including calcium) is expressed in endothelial cells; the lack of pharmacologic agents that selectively modulate the activity of TRPV4 channels has hindered the elucidation of its function in endothelial cells. Recently two new compounds, GSK1016790A (GSK) and HC-067047 (HC), which selectively activate or block TRPV4 channels, respectively, were described. This dissertation consists in the description and interpretation of results from experiments conceived to characterize the effect of GSK (and of 4 α PDD for comparison) in isolated arterial rings from several animal species. To this aim we used arterial rings mounted in isolated organ chambers; we recorded continuously the tension developed by them during isometric contractions elicited by phenylephrine (Phe); all the experiments were conducted using Krebs solution containing diclofenac (10 μ M). Initially, we confirmed by immunohistochemistry the presence of anti-TRPV4 immunoreactivity in the endothelium of rat thoracic aorta. In rat thoracic aortic rings pre-constricted with Phe (0.1 μ M) the addition of different concentrations of GSK (either single or cumulative concentrations) caused concentration-dependent relaxations (EC_{50} =0.5 nM, 95%CI=0.35-0.72 nM, n=7); 4 α PDD (in single concentrations) also caused relaxations of rat thoracic aortic rings. Similar results were observed for GSK in thoracic aortic rings from rabbit (EC_{50} =4.3 nM, 95%CI=3.58-5.14 nM, n=5), mouse (EC_{50} =1.4 nM, 95%CI=0.85-2.24 nM, n=3) and guinea-pig (EC_{50} =0.2 nM, 95%CI=0.12-0.22 nM, n=4). GSK also produced relaxations of rings from rabbit abdominal aorta (EC_{50} =6.5 nM, 95%CI=3.71-11.3 nM, n=3) and femoral artery (EC_{50} =17 nM, 95%CI=16.8-18.7 nM, n=4). Relaxations caused by both GSK and 4 α PDD started 1-2 min after their addition and reached a steady-state in 5-8min; they were reversible after washing-out and did not exhibit tachyphylaxis. In all the studied arteries GSK or 4 α PDD induced- relaxations were strictly endothelium- and extracellular calcium- dependent. Pre-incubation of rat thoracic aortic rings with HC (1 μ M for 5min) abolished the effect of GSK but did not affect relaxations elicited by Ach (1 μ M). In all the arterial rings HC (1-3 μ M) also completely reverted the relaxations caused by GSK or 4 α PDD; in rabbit and rat thoracic aortic rings ruthenium red (1 μ M) also completely reverted the relaxations caused by GSK or 4 α PDD. The present findings showing that TRPV4 channels are present in endothelial cells and that their activation results in the production and release of relaxing factors constitute an indication that TRPV4 channels could be involved in the regulation of endothelial cell functions under physiological or pathophysiological conditions.

Keywords: Endothelium-dependent relaxations. TRPV4. Calcium. Isolated arteries. GSK1016790A. 4 α PDD. HC-067047.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Dos relaxamentos dependentes do endotélio

No início dos anos de 1950, o professor Robert Furchgott, na Universidade de Washington (Estados Unidos), desenvolveu uma preparação de tira helicoidal de aorta torácica de coelho para possibilitar a realização de estudos *in vitro* das respostas do músculo liso vascular a diferentes drogas e para o estudo quantitativo da interação droga-receptor (Furchgott e Bhadrakom, 1953; Furchgott, 1954; Furchgott, 1960). Utilizando essa preparação descreveu os efeitos de várias substâncias, entre elas: catecolaminas, histamina, nitrito de sódio e acetilcolina.

Em seus experimentos, observou um fenômeno que o deixou intrigado e que não sabia como explicar: a acetilcolina, uma potente substância hipotensora *in vivo* (Dale, 1914), produziu apenas contrações em tiras helicoidais de artérias *in vitro* (Furchgott e Bhadrakom, 1953; Furchgott, 1954). Esse resultado ficou conhecido como “o paradoxo da acetilcolina” e permaneceu sem solução durante mais de 25 anos.

Em maio de 1978, o professor Furchgott (agora no Downstate Medical Center, New York, Estados Unidos) deparou-se com uma nova observação que o deixou surpreso e novamente intrigado: acetilcolina produziu relaxamentos em preparações de anéis da aorta torácica de coelho. Curiosamente, esse resultado era agora inesperado, e assim, o professor Furchgott e seu técnico assistente, John Zawadzki, começaram a investigar então porque agora acetilcolina havia produzido relaxamentos.

Uma das diferenças observadas foi o tipo de preparação: agora os experimentos estavam sendo feitos em anéis da aorta ao invés de tiras helicoidais. Entre as inúmeras variáveis imaginadas que pudessem explicar a diferença de respostas utilizando anéis ou tiras, uma que chamou a atenção foi o manuseio da artéria durante a preparação da tira helicoidal: para a sua confecção era feita bastante fricção na camada íntima do segmento arterial.

Em outro conjunto de experimentos, o professor Furchgott e John Zawadzki observaram que a acetilcolina produziu relaxamentos em preparações isoladas de anéis da aorta torácica de coelho pré-contraídos com norepinefrina somente em anéis que não haviam sofrido fricção da camada íntima; já em anéis que foram submetidos a uma fricção (intencionalmente ou não) durante a montagem da preparação, a acetilcolina não produziu qualquer relaxamento e, em muitos casos, até aumentou a contração; por outro lado, a fricção da camada adventícia não alterou os relaxamentos produzidos com a acetilcolina. Na análise microscópica dos segmentos das artérias utilizadas, foi observado que a fricção da camada íntima se associava com uma perda das células endoteliais; observou-se também que as preparações que exibiram entre 80 e 100% de relaxamento, geralmente mantiveram entre 60 e 75% das suas células endoteliais intactas, enquanto que em anéis em que a íntima foi propositalmente danificada, a acetilcolina não causou nenhuma resposta relaxante e houve sempre uma perda total das suas células endoteliais. Em outro protocolo, alguns segmentos da aorta torácica tiveram a sua camada íntima exposta à colagenase; a acetilcolina não produziu relaxamentos em preparações de anéis desses vasos, e, na análise histológica, foi observado que a exposição à colagenase causou uma remoção do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980). Finalmente, em outro experimento, tiras helicoidais foram preparadas e montadas com todo o cuidado para não friccionar a camada íntima e danificar as células endoteliais. Dessa maneira, acetilcolina produziu relaxamentos também nesse tipo de preparação.

Com base nesses dados, o professor Furchgott descobriu que a acetilcolina requer a presença das células endoteliais para produzir relaxamentos em preparações de aorta torácica de coelho *in vitro* (sejam anéis ou tiras), e frente a esse descobrimento, formulou a seguinte pergunta: por que as células endoteliais são necessárias para a acetilcolina produzir relaxamentos nas células musculares adjacentes?

Uma das possibilidades para explicar esse fenômeno era que as células endoteliais poderiam liberar alguma substância relaxante em resposta à acetilcolina. Para testar essa hipótese, desenvolveram então outro tipo de preparação arterial, agora na qual duas tiras de aorta de coelho foram justapostas. Por esse motivo, essa preparação ficou historicamente conhecida como preparação de “sanduíche”. O objetivo do sanduíche era que uma das tiras funcionasse como detectora de uma

possível substância liberada enquanto a outra seria utilizada como a doadora dessa substância. Para isso, a tira doadora foi montada com endotélio enquanto que a detectora teve o endotélio propositalmente removido, e, para a montagem do sanduíche, as duas tiras foram feitas com a mesma largura e mesmo comprimento e foram montadas de maneira a permitir o contato da camada íntima de uma tira com a da outra. Outro requerimento desse tipo de preparação era que durante o experimento toda a variação registrada na tensão do sanduíche teria que ser devido somente às contrações da tira detectora. Com esse fim, cada tira foi preparada com cortes específicos feitos em diferentes sentidos de um segmento de aorta. Considerando a aorta torácica descendente um cilindro reto com bases circulares, que o *eixo* de um cilindro é o segmento de reta que liga os centros das bases, e que na aorta as fibras musculares estão dispostas helicoidalmente em relação ao eixo, a tira doadora (que também foi chamada de tira longitudinal) foi feita com cortes paralelos ao eixo do cilindro, enquanto que a tira detectora (ou transversal) foi cortada no sentido perpendicular a esse eixo.

Primeiramente, as duas tiras foram montadas separadamente. Os resultados observados foram os seguintes: nenhuma variação na tensão foi registrada na tira longitudinal com a adição de norepinefrina ou de acetilcolina. Na tira transversal, tanto norepinefrina como acetilcolina produziram somente contração. Entretanto, no sanduíche, a adição de acetilcolina produziu relaxamento da tira transversal, isto é, a tira de aorta que não respondia à acetilcolina com relaxamento, apresentou essa resposta quando em contato com uma tira que possuía endotélio. A interpretação mais simples para esses resultados proposta pelo professor Furchgott foi de que a acetilcolina estava estimulando a liberação de uma substância (ou substâncias) do endotélio da tira longitudinal. Essa interpretação implica que a acetilcolina produz seu efeito relaxante no músculo liso vascular de uma maneira indireta: estimulando as células endoteliais a liberar alguma (s) substância (s) que iria (m) atuar diretamente nas células musculares provocando o relaxamento das mesmas (Furchgott e Zawadzki, 1980).

Essa hipótese levou o professor Furchgott à próxima pergunta: qual a natureza ou composição química da (s) substância (s) que era (m) liberada (s) pelas células endoteliais?

Em experimentos iniciais realizados para responder essa pergunta, o professor Furchgott observou que bradicinina e prostaciclina (PGI₂) nas várias

concentrações testadas não produziram relaxamentos da aorta de coelho; indometacina e aspirina (drogas que inibem as ciclo-oxigenases) não alteraram os relaxamentos produzidos pela acetilcolina. Esses resultados permitiram descartar que a substância liberada pelas células endoteliais pudesse ser bradicinina, prostaciclina ou outros produtos das ciclo-oxigenases; entretanto, ainda assim não obteve resultados que pudessem ajudá-lo a chegar a uma conclusão quanto à natureza química de tal substância; conseqüentemente, passou a se referir a essa (s) substância (s) como *fator de relaxamento derivado do endotélio* (EDRF, em inglês, para *endothelium-derived relaxing factor*, Cherry et al., 1982).

O professor Furchgott mostrou ainda que os relaxamentos produzidos pela acetilcolina em diversas outras artérias e em diferentes espécies também eram dependentes do endotélio, por exemplo: nas artérias mesentérica superior, pulmonar e da orelha de coelho; aorta torácica de rato e de cobaio; artérias mesentérica superior, pulmonar, ilíaca, aorta abdominal e torácica de gato. Em preparações vasculares isoladas do leito mesentérico de coelho e de rato perfundidos a fluxo constante, a redução na pressão de perfusão produzida pela acetilcolina foi completamente inibida após a perfusão de colagenase, sugerindo que a acetilcolina, para relaxar as pequenas artérias e arteríolas, também requer a presença das células endoteliais (Carvalho e Furchgott, 1981; Furchgott et al., 1987).

Após a descoberta de que os relaxamentos produzidos pela acetilcolina em preparações vasculares isoladas eram dependentes do endotélio, outras substâncias que produzem relaxamentos dependentes do endotélio foram identificadas em várias preparações vasculares e mesmo em diferentes espécies, por exemplo: a bradicinina nas artérias celíaca, mesentérica superior, renal, pulmonar, coronária, esplênica, gástrica e femoral de cães (Chand e Altura, 1981; Cherry et al., 1982), e ainda em preparações obtidas de ramos das artérias mesentéricas superior e inferior de humanos (Cherry et al., 1982) e na aorta de porco (Gordon e Martin, 1983); a histamina em anéis de aorta torácica de ratos e na artéria pulmonar de cobaio (Van de Voorde e Leusen, 1983; Satoh e Inui, 1984); a serotonina, na artéria coronária de cão (Cocks e Angus, 1983; Cohen et al., 1983); trombina, nas artérias femoral, pulmonar, esplênica e coronária de cão (De Mey e Vanhoutte, 1982; De Mey et al., 1982; Ku, 1982); a substância P, em artérias isoladas de coelhos, cães e gatos (Zawadzki et al., 1981, 1983; Furchgott et al., 1983); a vasopressina, na artéria basilar de cão (Katusic et al., 1984); o ATP e o

ADP na artéria femoral de cães e na aorta isolada de coelho (De Mey e Vanhoutte, 1980, 1981; Furchgott, 1981); o ionóforo de cálcio, A23187, na aorta torácica de coelho e em muitas outras artérias (Zawadzki et al., 1980; Furchgott, 1981; Furchgott et al., 1983); a tapsigargina, na aorta torácica de rato e de cobaio (Matsuyama et al., 1993; Zheng et al., 1994); o ácido ciclopiazônico, na aorta torácica de rato (Moritoki et al., 1994).

Portanto, o fenômeno do relaxamento dependente de endotélio, que podia ser explicado pela liberação de um EDRF, não era específico a um tipo de vaso ou a uma espécie, e a sua produção poderia ser estimulada por outras substâncias além da acetilcolina.

1.2 - Do fator de relaxamento derivado das células endoteliais

Em 1980, o professor Furchgott apresentou os resultados de seus estudos com aorta torácica de coelho que o levaram à descoberta do EDRF em um seminário no Departamento de Farmacologia da Universidade de Virginia (Estados Unidos). Uma das pessoas que assistiam a esse seminário era Ferid Murad, na ocasião professor naquele departamento; o professor Murad estava estudando a regulação da atividade da ciclase de guanilato – enzima que catalisa a conversão de trifosfato de guanosina a 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMP cíclico) – e as funções do GMP cíclico.

No ano de 1977, Murad e colaboradores (Katsuki et al., 1977a, 1977b) haviam descrito que em homogenatos de músculo liso da traquéia de boi e de cobaia, *taenia cecum* e ventrículo de cobaia, substâncias como nitroprussiato de sódio, azida de sódio, nitrito, monóxido de nitrogênio (NO) e nitratos orgânicos estimulavam a ciclase de guanilato, aumentando a concentração de GMP cíclico nesses tecidos. Essas substâncias também são potentes vasodilatadores; além disso, no ano de 1979, o professor Louis Ignarro tinha descrito que nitroprussiato de sódio e NO relaxam a artéria coronária de boi e estimulam a formação de GMP cíclico (Gruetter et al., 1979). O professor Murad sugeriu então ao professor Furchgott realizar experimentos para determinar as concentrações de GMP cíclico em suas preparações arteriais; os resultados desses experimentos talvez pudessem

ajudá-lo em sua pesquisa para identificar a natureza do EDRF (Murad, 1999a, 1999b, 2006).

Baseando-se nos resultados descritos pelo professor Murad, em 1981, o professor Furchgott sugeriu que o EDRF poderia estar produzindo relaxamentos via um aumento da concentração de GMP cíclico no músculo liso vascular por estimular a ciclase de guanilato (Furchgott et al., 1981); entretanto os resultados de seus experimentos foram publicados somente no ano de 1984.

Nos anos seguintes, alguns estudos foram feitos com o objetivo de investigar essa hipótese. Holzmann (1982) observou que acetilcolina produziu relaxamentos e aumentou as concentrações de GMP cíclico em preparações de tiras da artéria coronária de boi somente na presença de endotélio; Rapoport e Murad (1983) documentaram que, na aorta torácica de rato, acetilcolina, histamina e A23187 produzem relaxamentos e aumentam as concentrações de GMP cíclico, enquanto que a remoção do endotélio aboliu tanto os relaxamentos como o aumento das concentrações de GMP cíclico; Diamond e Chu (1983) descreveram que em anéis da aorta torácica de coelho, a acetilcolina produziu aumento de GMP cíclico somente em presença de endotélio. Esses resultados foram consistentes com a idéia de que os relaxamentos dependentes do endotélio ocorrem via aumento de GMP cíclico no músculo liso vascular, como o professor Furchgott havia sugerido.

Como Murad et al. (1979) tinham descrito que a ciclase de guanilato era inibida por hemoglobina, e Gruetter et al. (1981) que, em preparações da artéria coronária de boi, os relaxamentos e o aumento da concentração de GMP cíclico produzidos por nitrovasodilatadores e pelo NO eram inibidos pelo azul de metileno, professor Furchgott decidiu testar essas substâncias também nos relaxamentos dependentes de endotélio. O professor Furchgott observou que tanto os relaxamentos como o aumento na concentração de GMP cíclico produzidos pela acetilcolina e pelo A23187 na aorta torácica de coelhos foram inibidos pela hemoglobina e pelo azul de metileno (Furchgott et al., 1984; Martin et al., 1985), e que hemoglobina também inibiu os relaxamentos dependentes de endotélio produzidos na aorta de rato (Martin et al., 1986).

Quanto à sugestão de que o EDRF era uma substância que se difundia do endotélio para as células do músculo liso, outra abordagem utilizada para estudar e identificar a natureza dessa substância foi a realização de experimentos em sistemas denominados de 'cascata' ou 'bioensaio' semelhantes àqueles descritos e

utilizados por John Gaddum (1959) e por Vane (1964). Para se estudar um possível EDRF, as preparações usadas como doadoras foram segmentos de artérias com endotélio ou culturas de células endoteliais, e essas montadas de maneira que a solução com a qual se encontram em contato possa ser transferida para preparações arteriais sem endotélio (anéis, tiras ou segmentos de artérias). Nesse sistema, se alguma substância for produzida e liberada das células endoteliais os seus efeitos podem ser observados e quantificados na segunda preparação (detectora). Em 1984, Ulrich Förstermann e colaboradores observaram que quando segmentos da aorta torácica de coelhos ou da artéria femoral de cães com endotélio eram estimulados com acetilcolina, o efluente do perfusato dessas artérias produziu relaxamentos em segmentos da artéria femoral de coelho sem endotélio; Griffith et al. (1984) utilizando como artéria doadora um segmento da aorta de coelho com endotélio e como detectora a artéria coronária de coelho sem endotélio observaram que a estimulação da artéria doadora com acetilcolina ou com A23187 produzia relaxamentos na preparação detectora; Gabor Rubanyi e Paul Vanhoutte (Rubanyi et al., 1985) observaram que após a estimulação com acetilcolina, o efluente de artérias femorais de cães com endotélio produziu relaxamentos em anéis da artéria coronária de cão sem endotélio; Cocks et al. (1985) utilizaram como preparação doadora cultura de células endoteliais de bovinos aderidas à superfície externa de microesferas e perfundidas com solução fisiológica, e anéis sem endotélio de artéria coronária de cão e de porco como tecidos detectores. Bradicinina e A23187, quando adicionados ao líquido que perfundia as microesferas recobertas com células endoteliais, causaram relaxamentos nas artérias detectoras; Gryglewski e colaboradores (1986) descreveram que o efluente de culturas de células endoteliais da aorta de porco estimuladas com bradicinina produziu relaxamentos em tiras da aorta torácica de coelho sem endotélio. A interpretação mais simples para esses resultados é que as células endoteliais produziram e liberaram uma substância relaxante, assim como professor Furchgott havia imaginado para explicar seus resultados obtidos na preparação de sanduíche. Os trabalhos de Cocks et al. (1985) e Gryglewski et al. (1986) documentaram ainda que a produção de uma substância vasodilatadora também pode ser observada em cultura de células endoteliais. Nesses experimentos, curiosamente, acetilcolina não produziu liberação do EDRF de células endoteliais em cultura.

Todos os resultados desses experimentos foram consistentes com a sugestão de que ocorre liberação de uma substância, porém os mesmos não permitiram identificar que substância (s) poderia (m) ser o EDRF.

Nesses sistemas de cascata, aumentando a distância entre as preparações doadoras e os tecidos detectores, conseqüentemente aumentando o intervalo de tempo que a substância liberada levava para entrar em contato com as preparações sem endotélio, foi observado que o EDRF produziu relaxamentos com magnitudes cada vez menores (Förstermann et al., 1984; Griffith et al., 1984; Rubanyi et al., 1985). Da mesma forma, quando foi permitido que o efluente dos tecidos doadores (contendo o EDRF) passasse através de sucessivas preparações arteriais sem endotélio, a magnitude dos relaxamentos produzidos pelo EDRF foi se reduzindo conforme passava pelos tecidos detectores (Gryglewski et al., 1986). Em ambas situações, a atividade ou efeito do EDRF foi sendo perdido, conseqüentemente o tempo para redução ou desaparecimento do efeito das substâncias liberadas pode ser determinado. Um parâmetro utilizado nesses trabalhos foi o intervalo de tempo observado em que os relaxamentos produzidos pelo EDRF foram reduzidos em 50%, que foi considerado como o tempo de meia-vida do EDRF. Dependendo das preparações biológicas e das condições experimentais utilizadas, foram encontrados valores de meia-vida do EDRF entre 4 a 6 segundos (Griffith et al., 1984; Cocks et al., 1985) e entre 50 a 60 segundos (Förstermann et al., 1984). Para explicar essas observações, a interpretação proposta foi que o EDRF seria uma substância quimicamente instável ou reativa com outras substâncias presentes nas condições em que os experimentos foram realizados.

Rubanyi e Vanhoutte (1986) utilizaram sistema de cascata tendo como preparação doadora a artéria femoral de cães (com endotélio) e anéis da artéria coronária de cão sem endotélio como tecido detector. Observaram que após estimulação da artéria doadora com acetilcolina, o seu efluente produziu relaxamentos na preparação sem endotélio. Alterando a distância entre os tecidos doadores e detectores, encontraram para o EDRF um tempo de meia-vida igual a 8 segundos. A administração da enzima que catalisa a dismutação de ânions superóxido (dismutase de superóxido, ou SOD, em inglês *superoxide dismutase*) aumentou a magnitude dos relaxamentos produzidos após a administração de acetilcolina. Na presença de SOD, o tempo de meia-vida do EDRF foi de

aproximadamente 16 segundos; Gryglewski et al. (1986), também em um sistema de cascata, observaram que a bradicinina estimulou a liberação de uma substância de células endoteliais da aorta de porco em cultura que produziu relaxamentos em tiras da aorta torácica de coelho. Esses relaxamentos foram inibidos pela hemoglobina e pelo azul de metileno, e foram potencializados na presença da SOD. Tanto Rubanyi e Vanhoutte (1986) e Gryglewski et al. (1986) sugeriram que a administração de SOD possivelmente evitou a inativação do EDRF por ânions superóxido presentes ou produzidos nas condições experimentais utilizadas.

Esses resultados revelaram que o EDRF possuía as seguintes características: o EDRF aumentava as concentrações de GMP cíclico, seus relaxamentos eram inibidos por hemoglobina e pelo azul de metileno, e seus efeitos eram aumentados pela presença de SOD. Considerando o conjunto dessas características, que substância (s) poderia (m) ser então o EDRF?

Em 1977, Murad e colaboradores haviam observado que o NO e os nitrovasodilatadores estimulavam a ciclase de guanilato e aumentavam as concentrações de GMP cíclico em várias preparações (Arnold et al., 1977). E em 1981, Ignarro e colaboradores observaram que tanto os relaxamentos produzidos por essas substâncias como o aumento das concentrações de GMP cíclico foram inibidos pela hemoglobina e pelo azul de metileno (Gruetter et al., 1981).

O professor Furchgott decidiu então realizar experimentos para caracterizar os efeitos do NO na aorta torácica de coelhos. Nos seus experimentos Furchgott utilizou NO formado em soluções de nitrito de sódio (NaNO_2) dissolvidos em ácido clorídrico (HCl, suficiente para se obter um valor de $\text{pH}=2$). Nos seus experimentos observou que NO produziu relaxamentos em anéis da aorta torácica de coelhos que foram independentes da presença de endotélio, e inibidos pela hemoglobina, pelo azul de metileno, e por substâncias geradoras de ânions superóxido. Porém, na presença de SOD a magnitude desses relaxamentos foi aumentada. Todas essas características foram semelhantes àquelas encontradas para o EDRF. Baseado nessa similaridade entre EDRF e monóxido de nitrogênio, em 1986, durante a apresentação e discussão desses resultados no IV simpósio *Mechanisms of Vasodilatation*, realizado em Rochester, Minesota (Estados Unidos), entre os dias 10 a 12 de Julho, o professor Furchgott propôs que o EDRF poderia ser o NO (Furchgott, 1988). Nesse mesmo congresso, o professor Louis Ignarro apresentou resultados de experimentos realizados em seu laboratório em que havia

utilizado sistema de cascata com preparações da artéria pulmonar de boi, tendo segmentos com endotélio como doadores e como detectoras tiras sem endotélio. O professor Ignarro havia observado que tanto o EDRF (obtido com a perfusão das artérias doadoras com acetilcolina) e NO produziam relaxamentos nessas preparações e os relaxamentos de ambos eram inibidos por hemoglobina, azul de metileno, pirogalol e aumentados pela SOD e, com esses dados, também propôs que o EDRF poderia ser o NO (Ignarro et al., 1988).

Após esse congresso, outros laboratórios realizaram experimentos com o objetivo de comparar os efeitos do EDRF e do NO. Em 1987, Hutchinson et al., utilizando a mesma metodologia e preparações que Gryglewski et al. (1986), observaram que os relaxamentos produzidos pelo EDRF bem como aqueles produzidos pelo NO também foram inibidos por hidroquinona e pelo pirogalol. Nessas mesmas condições, Palmer et al. (1987) observaram que tanto EDRF (obtido após estimulação das células endoteliais com bradicinina) e NO produziram relaxamentos de mesma magnitude na aorta torácica de coelhos sem endotélio, e esses relaxamentos foram inibidos por hemoglobina e aumentados na presença de SOD.

Palmer et al. (1987) também utilizaram outra abordagem com o objetivo de determinar se o NO poderia ser o responsável pelos efeitos do EDRF. Sabia-se previamente que o NO reage com o ozônio (O_3) formando como produtos oxigênio (O_2) e dióxido de nitrogênio em um estado eletrônico metaestável (NO_2^*). Essa forma metaestável decai a um estado de maior estabilidade (NO_2) emitindo um elétron na forma de fóton; O número de fótons emitidos pode ser medido por uma célula fotodetectora; e fornecendo uma concentração em excesso de O_3 , teoricamente todo o NO reagirá com o O_3 presente, e assim a 'quantidade' de fótons emitidos durante essa reação será proporcional à concentração de NO. Dessa maneira, a concentração de NO presente em uma amostra pode ser calculada. Utilizando esse método, Palmer et al. (1987) observaram que a magnitude dos sinais detectados pela reação do EDRF (o efluente da cultura de células endoteliais da aorta de porco estimuladas com bradicinina) com O_3 se assemelharam à magnitude dos sinais que foram produzidos pela reação de soluções de NO (com concentrações conhecidas) com o O_3 .

Ignarro et al. (1987), em sistemas de cascata com preparações da artéria pulmonar de boi (semelhante a Ignarro et al., 1988), observaram que os

relaxamentos produzidos tanto por NO como pelo EDRF têm suas magnitudes aumentadas na presença de SOD, e são inibidos pelo pirogalol. Tanto o EDRF como NO aumentaram a concentração de GMP cíclico nessas preparações. Esses resultados também foram observados em preparações da veia pulmonar de boi. Ignarro et al. (1987) também documentaram que o espectro da absorvância do produto da reação do EDRF (obtido com cultura de células endoteliais da aorta de boi estimuladas com A23187) com deoxihemoglobina se assemelhava ao espectro do produto da reação do NO com deoxihemoglobina; Furchgott et al. (1988), em sistemas de cascata com preparações da aorta torácica de coelhos, observaram que EDRF (após a estimulação com acetilcolina) e soluções de NO (preparado a partir de NaNO₂ acidificado ou com NO gasoso) relaxaram anéis da aorta torácica sem endotélio, que SOD aumentou os relaxamentos produzidos, enquanto que foram inibidos por hemoglobina, pirogalol, FeSO₄ e hidroquinona e que, aumentando a distância entre as preparações doadoras e os tecidos detectores, os relaxamentos produzidos pelo EDRF e por NO foram reduzidos.

Esses resultados mostraram que o NO mimetiza os efeitos do EDRF em preparações de artérias isoladas e em sistemas de cascata, indicando que o EDRF poderia ser NO ou uma substância que possui molécula (s) de NO na sua estrutura química e, sendo quimicamente instável, libera essas molécula (s) de NO nas condições experimentais utilizadas.

1.3- Da função dos íons Ca²⁺ na ativação das células endoteliais

Após a descoberta que acetilcolina produzia relaxamentos de preparações de artérias isoladas somente na presença de endotélio, o professor Furchgott descreveu também que o composto A23187 produzia relaxamentos endotélio dependentes em várias preparações de artérias isoladas (Zawadzki et al., 1980; Furchgott, 1981). Como a ação atribuída a tal composto era de transportar (ou mover) cátions através de membranas biológicas (i. e., ionóforo), possuindo uma maior seletividade para os íons cálcio (Ca²⁺) (Reed e Lardy, 1972; Pressman e Fahim, 1982), o professor Furchgott sugeriu então que os íons cálcio poderiam estar envolvidos em uma etapa importante nos mecanismos que culminam na produção e

liberação do EDRF pelo endotélio, e que um aumento na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) poderia ser essencial na seqüência de eventos envolvidos na ativação das células endoteliais (Furchgott et al., 1981).

Nos anos seguintes, a função desse cátion na produção e liberação do EDRF foi estudada em experimentos realizados em que preparações de artérias (ou cultura de células) foram incubadas com solução fisiológica preparada sem a adição de cálcio (solução nominalmente sem cálcio) e com o desenvolvimento de técnicas que permitiram determinar a concentração intracelular de cálcio citoplasmático com o uso de indicadores fluorescentes.

Singer e Peach, em 1982, observaram, em anéis de aorta torácica de coelho, que os relaxamentos dependentes de endotélio produzidos pela metacolina foram reduzidos e aqueles produzidos pelo A23187 foram abolidos em preparações incubadas em solução sem cálcio; da mesma forma, anéis de aorta torácica de rato, quando incubadas com solução nominalmente sem cálcio e pré-contraídas com fenilefrina, não exibiram quaisquer relaxamentos para a acetilcolina e nem para o A23187, porém os relaxamentos induzidos nessas artérias pelo nitroprussiato de sódio (que são independentes do endotélio) não foram modificados (Winquist et al., 1985); Long e Stone (1985) fizeram um sistema de 'cascata', onde um segmento de aorta de rato com endotélio intacto (artéria 'doadora') foi montada de maneira que a solução com a qual esta era perfundida poderia ser transferida para outra preparação de tira de aorta de rato sem endotélio (o EDRF poderia ser detectado pela observação dos seus efeitos na segunda tira). Nessas condições, eles observaram que após adicionar acetilcolina na tira doadora e a solução ser transferida para a tira detectora, um relaxamento foi produzido nesta última, indicando que o EDRF havia sido liberado da primeira tira com endotélio intacto. Agora, incubando-se a tira doadora em solução livre de cálcio e repetindo-se o mesmo protocolo, nenhum relaxamento foi observado na tira detectora e, após se readicionar o cálcio, uma resposta relaxante foi produzida quase imediatamente. Resultados semelhantes foram observados por Griffith et al. (1986), também em um sistema de cascata, tendo como artéria doadora um segmento da aorta de coelho com endotélio e como detectora a artéria coronária de coelho sem endotélio.

Todos os resultados desses experimentos indicaram que a síntese e a liberação do EDRF estimuladas pela acetilcolina e pelo A23187 dependiam da presença de cálcio extracelular. Essas observações levaram à seguinte pergunta: as

substâncias que produzem relaxamentos dependentes de endotélio seriam capazes de aumentar a concentração intracelular de cálcio na célula endotelial?

Em 1986, Hallam e Pearson observaram que o ATP produziu aumento na concentração intracelular de cálcio em cultura de células endoteliais da aorta torácica de boi. O aumento observado foi bifásico: após um pico inicial, a concentração de cálcio caiu a um patamar mantido; já em solução nominalmente sem cálcio, o ATP só produziu o aumento inicial transitório. Hamilton e Sims (1987) descreveram que trombina e histamina produzem aumento de cálcio intracelular em células endoteliais de veia umbilical humana em cultura. As respostas produzidas tanto por histamina quanto por trombina também se caracterizaram por um aumento inicial transitório seguido de uma fase sustentada. Na ausência de cálcio extracelular, a magnitude da fase inicial foi diminuída e a fase sustentada foi abolida; Colden-Stanfield et al. (1987) observaram que a administração de bradicinina aumenta a concentração intracelular de cálcio de células endoteliais da aorta torácica de boi em cultura; e Morgan-Boyd et al. (1987), em cultura de células da artéria pulmonar de boi, observaram que o aumento da concentração intracelular de cálcio produzido pela bradicinina também é bifásico: caracterizado por um aumento inicial rápido e transitório seguido por uma fase mantida ou “sustentada”. Observaram também que quando as células endoteliais foram incubadas em solução nominalmente sem cálcio, a bradicinina produziu somente um aumento transitório; observações semelhantes foram realizadas em células da artéria pulmonar de boi (Cannell e Sage, 1989) e da aorta de boi (Schilling et al., 1988; Buchan e Martin, 1991) em cultura estimuladas com bradicinina, e em células endoteliais de veia umbilical humana em cultura estimuladas com histamina (Jacob, 1990). Portanto, bradicinina, ATP, trombina, histamina, aumentam a concentração de cálcio em células endoteliais. Entretanto, uma exceção curiosa é a acetilcolina que, embora produza relaxamentos dependentes de endotélio e da presença de cálcio extracelular, não foi capaz nem de aumentar a concentração de cálcio e nem de estimular a liberação do EDRF nas culturas de células endoteliais utilizadas nesses experimentos.

Existiria alguma correlação quantitativa entre o aumento da concentração do cálcio citosólico e a produção e liberação do EDRF estimulada por essas substâncias?

Em células endoteliais da aorta descendente de fetos bovinos em cultura, Korenaga et al. (1993) observaram que ATP, bradicinina e A23187 aumentaram a concentração intracelular de cálcio e a magnitude desse aumento foi proporcional às concentrações destas substâncias. Quando as células em cultura foram incubadas em solução sem cálcio, o aumento na concentração intracelular de cálcio foi abolido, observando-se apenas uma elevação transitória. Em outro protocolo, células endoteliais cultivadas e, aderidas em microesferas, foram perfundidas e o efluente foi gotejado em anéis sem endotélio isolados da aorta torácica de coelhos. Quando estimuladas com ATP, bradicinina e A23187, o efluente das células endoteliais produziu relaxamentos na preparação detectora; intrigantemente, a acetilcolina nem aumentou a concentração intracelular de cálcio nas células endoteliais e nem produziu a liberação do EDRF. A magnitude dos relaxamentos observados (que foi usada como indicador da quantidade de EDRF liberado) correlacionou-se com as concentrações de ATP, bradicinina e A23187 utilizadas. Incubando-se as células endoteliais em solução sem cálcio, a estimulação com ATP, bradicinina e A23187 não causou relaxamentos na artéria detectora. Isto é, o EDRF foi liberado somente quando ocorreu um aumento na concentração intracelular de cálcio nas células endoteliais e a magnitude dos relaxamentos produzidos foi proporcional à concentração intracelular de cálcio observados. O fato da presença de cálcio extracelular ser necessária para que possa ocorrer uma elevação do cálcio intracelular suficiente para estimular a produção do EDRF, implica que esse aumento é conseqüente a um influxo.

O aumento da concentração citoplasmática de cálcio na célula endotelial pode ser explicado por dois mecanismos principais que foram propostos: pela liberação do cálcio armazenado nos estoques intracelulares, ou pela entrada de cálcio a partir do meio extracelular (o influxo de cálcio) através de vários canais permeáveis a esse cátion (Graier et al., 1994).

Iouzen et al. (1996), em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana, investigaram os efeitos do composto SK&F96365 (utilizado como bloqueador não seletivo do influxo de cálcio) na concentração de cálcio citosólico, medidas com o indicador fluorescente fura-2, e na quantidade de óxido nítrico produzido, detectado continuamente com um microsensor porfirínico. Independente da quantidade extracelular de cálcio (50 nM ou 1 mM), SK&F96365 aumentou a concentração citoplasmática de cálcio, indicando que esse aumento foi devido

possivelmente à liberação de cálcio armazenado nos estoques intracelulares, porém não resultou na produção de óxido nítrico. Em contraste, taspigargina aumentou a concentração citosólica de cálcio e estimulou a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais. Quando as células em cultura foram incubadas com SK&F96365 ou a concentração extracelular de cálcio foi reduzida de 1 mM para 50 nM, a taspigargina não aumentou a concentração de cálcio citoplasmático e tampouco estimulou a produção de NO. Uma explicação para o efeito dessas drogas é que tanto a taspigargina quanto o SK&F96365 liberaram cálcio dos estoques intracelulares; entretanto, somente a taspigargina promoveu influxo de cálcio. Portanto, a formação de NO pelas células endoteliais dependeu mais do aumento de cálcio resultante do influxo do que daquele produzido pela mobilização dos estoques intracelulares de cálcio.

A dependência de cálcio extracelular para a produção de NO também foi observada para bradicinina, ATP e taspigargina em células endoteliais da aorta de boi em cultura (Mügge et al., 1991; Wang et al., 1996), e para a histamina em células endoteliais da veia umbilical humana (Lantoine et al., 1998).

Além de NO, as células endoteliais são capazes de sintetizar prostaciclina (PGI₂). A produção desse fator relaxante também requer influxo de cálcio?

Brothertone e Hoak (1982, 1983) observaram que o A23187 também estimula a formação de PGI₂ em cultura de células endoteliais da veia umbilical humana, indicando que um aumento na concentração intracelular de cálcio é também necessário para a produção de PGI₂. Whorton et al. (1984) observaram que a bradicinina e o A23187 estimularam a produção de PGI₂ em cultura de células endoteliais da aorta torácica de porco, e que essas respostas foram estritamente dependentes da presença de cálcio extracelular; Lückhoff (1988) observou uma correlação entre a concentração intracelular e a quantidade de PGI₂ formada em cultura de células endoteliais da aorta torácica de boi estimuladas com bradicinina.

Em células endoteliais da veia umbilical humana em cultura, Hallam et al. (1988) observaram que a formação de prostaciclina é precedida por um aumento na concentração intracelular de cálcio e dependente de cálcio extracelular.

Essas observações indicaram que os íons Ca²⁺ estão envolvidos nos mecanismos de produção e liberação de substâncias vasodilatadoras pelas células endoteliais, como o professor Furchgott sugeriu a partir da observação inicial que o

A23187 era um composto potente para produzir relaxamentos dependentes do endotélio em várias preparações vasculares.

A partir desses estudos, podemos inferir que o aumento sustentado da concentração de cálcio intracelular na célula endotelial consequente de influxo é a “via final comum” das substâncias que estimulam essas células a produzirem e liberarem fatores relaxantes (NO, PGI₂) do músculo liso vascular.

Considerando que ocorre um influxo de cálcio para a ativação das células endoteliais, isso implica na participação de canais que são permeáveis a esse íon. Porém, a identidade molecular dos canais que medeiam esse influxo em resposta a diferentes estímulos que promovem relaxamentos dependentes de endotélio ainda não foi (ram) identificada (s) conclusivamente.

1.4- Canais TRP e relaxamentos dependentes de endotélio

Em 1969, Derek Cosens e Aubrey Manning identificaram uma cepa de mutantes de *Drosophila* que em um ambiente com baixa iluminação apresentaram fototaxia positiva, mas não em um ambiente com iluminação de maior intensidade. As moscas nativas em ambos os ambientes apresentaram comportamento fototático. Em um outro teste, em que foi utilizado um aparato optomotor para analisar o movimento e a orientação das moscas frente a sinais luminosos, as moscas mutantes também não responderam, enquanto que as moscas nativas mudaram a direção do seu movimento de acordo com a direção dos sinais luminosos. Na cepa de mutantes, Cosens e Manning (1969) ainda mapearam e localizaram uma mutação no cromossomo de número três do genoma da *Drosophila melanogaster*. Para tentar explicar os comportamentos, Cosens e Manning imaginaram que esses insetos fossem cegos, e então resolveram determinar como estava o potencial dos fotorreceptores desses insetos por meio do uso do electroretinograma. Para isso, mediram a despolarização dos fotorreceptores frente a estimulação contínua (prolongada) com luz.

Apesar do estímulo prolongado com luz, Cosens e Manning observaram que o eletroretinograma dos mutantes se caracterizou somente por uma resposta

transitória, diferente da resposta observada com as moscas do tipo nativo, cujo eletroretinograma é caracterizado por uma resposta mantida (ou sustentada).

No ano de 1975, Dr. Baruch Minke e colaboradores começaram a estudar esses mutantes e com o consentimento de Cosens, passaram a se referir às mesmas simplesmente como *trp* (para *transient receptor potential*, Potencial de Receptor transitório), em referência às características observadas no seu eletroretinograma (Minke et al., 1975).

No ano de 1989, Craig Montell e Gerald Rubin (1989) e Wong et al. (1989) clonaram e sequenciaram um gene localizado na região do cromossomo de número 03 do genoma da *Drosophila*. A proteína codificada por esse gene seria constituída por 1275 aminoácidos, com peso molecular aproximadamente de 143 kd, e sua sequência de aminoácidos não apresentou nenhuma similaridade com qualquer outra proteína conhecida. Observaram ainda, por meio da técnica de *Western blot*, que essa proteína de 143 kd estava ausente em amostras obtidas das moscas mutantes, mas estava presente naquelas obtidas de moscas nativas (Montell e Rubin, 1989; Wong et al., 1989). Com esses resultados, independentemente, os autores inferiram que essa proteína era codificada pelo gene *trp*, e ainda propuseram que a sua ausência na cepa de mutantes era o motivo pelo qual as moscas apresentavam um Potencial de Receptor transitório. Nas palavras do Dr. Craig Montell: “portanto, o fenótipo é devido mais a ausência da proteína do que a expressão de um produto defeituoso do gene” (Montell e Rubin, 1989).

Que função teria essa proteína nos fotorreceptores da *Drosophila*, de maneira que a sua ausência nos mutantes fosse responsável pelo aparecimento do fenótipo *trp*?

Uma das observações que ajudaram a começar entender que função teria a proteína TRP foi feita neste mesmo ano de 1989 pelo Dr. Peter Hochstrate.

Estudando as propriedades eletrofisiológicas dos fotorreceptores de moscas da espécie *Calliphora erythrocephala*, cujo eletroretinograma também se caracteriza por uma resposta mantida frente a contínua estimulação com luz. Hochstrate (1989) observou que, após a aplicação de lantânio, o eletroretinograma de moscas do tipo nativo ficou semelhante àquele observado nos mutantes *trp*, e sugeriu então que tanto a mutação *trp* quanto os íons lantânio afetavam o mesmo processo celular.

Baseados nas observações descritas por Hochstrate (1989), Dr. Baruch Minke e colaboradores realizaram um estudo mais detalhado dos efeitos do lantânio no potencial dos fotorreceptores de três espécies de moscas: *Musca domestica*, *Lucilia cuprina* e *Drosophila melanogaster*. Nos seus experimentos, observaram que, com a aplicação de lantânio, o eletroretinograma dessas espécies também se assemelhou àquele observado na mosca *trp* do gênero *Drosophila* (Suss-Toby et al., 1991).

Nesse mesmo ano, Roger Hardie, em Cambridge, e Ranganathan e colaboradores, em San Diego (California, Estados Unidos), publicaram seus estudos descrevendo uma preparação de retina de *Drosophila* que permitia o uso da técnica de *patch clamp* dos fotorreceptores. Isso revolucionou o estudo da fototransdução na *Drosophila* pois permitiu a realização de experimentos e medidas que não podiam ser cogitadas antes.

Utilizando esse procedimento, Hardie (1991) mostrou pela primeira vez que nos fotorreceptores da *Drosophila* existiam canais iônicos que eram permeáveis ao cálcio, e ainda, que esses canais eram aproximadamente 25 vezes mais permeáveis ao cálcio que a cátions monovalentes.

Em um trabalho conjunto em 1992, Hardie e Minke observaram que a remoção de cálcio extracelular também mimetizou o fenótipo *trp* nas moscas nativas. Utilizando a técnica de *patch clamp* introduzida por Hardie (1991), concluíram que a permeabilidade a cátions dos canais presentes nos fotorreceptores das moscas *trp* está alterada, e que a maior redução observada foi em relação a permeabilidade ao íon cálcio; e medidas semelhantes às encontradas nos fotorreceptores dos mutantes *trp* foram observadas em preparações dos fotorreceptores das moscas nativas incubadas com lantânio. Para conciliar todas essas observações, e como uma das ações do lantânio é a de bloquear não seletivamente canais permeáveis ao cálcio, Hardie e Minke (1992) sugeriram que a proteína codificada pelo gene *trp* poderia ser um canal permeável ao cálcio, propondo assim uma função específica para essa proteína e por isso, conseqüentemente, passaram a se referir a essa proteína como o *canal TRP*.

Na procura por possíveis genes homólogos em mamíferos, foram encontrados genes que codificam mais de 20 proteínas que podem permitir a passagem regulada de cátions como cálcio, sódio e magnésio através das membranas biológicas. Como essas proteínas nunca haviam sido descritas

anteriormente, foi então preciso atribuir um nome para se referir ao conjunto delas. Como são estruturalmente relacionadas à proteína codificada pelo gene que está mutado em moscas do gênero *Drosophila* que apresentam em seu eletroretinograma um Potencial de Receptor transitório, o nome do grupo ou família criado para denominá-las de uma maneira geral foi *Família* ou *Grupo de Canais do Tipo TRP*. Comumente essa Família é referida somente por *Canais TRP*.

Mesmo após denominar e agrupar o conjunto dessas proteínas de canais TRP alguns problemas ainda persistiram quanto ao nome de alguns desses canais, pois alguns genes com menor homologia entre si possuíam nomes parecidos, enquanto outros genes com maior homologia, possuíam nomes completamente distintos; em outros casos, a mesma proteína possuía mais de um nome. Por isso, em 2002, para minimizar as dúvidas e confusões e ainda para poder facilitar a denominação de possíveis novos membros dessa Família, um grupo de pesquisadores (entre eles: Dr. Craig Montell, Dr. Lutz Birnbaumer, Dr. David Clapham, Dr. David Julius e Dr. Veit Flockerzi) criaram e propuseram uma nomenclatura unificada para o conjunto dos Canais TRP, baseando-se na homologia da seqüência de aminoácidos (Montell et al., 2002).

O grupo de proteínas que possuem a maior homologia com a proteína TRP descrita na *Drosophila* foi denominado de TRPC, uma referência às palavras *Canonical* ou *Classical*. Essa subfamília TRPC é composta por sete membros, chamados de TRPC1, TRPC2, TRPC3 e assim por diante; um outro grupo inclui proteínas com homologia ao receptor descrito para a capsaicina e para a resiniferatoxina. Por essas substâncias possuírem o grupo funcional químico *vanillil* em sua estrutura, o nome que foi originalmente dado a esse receptor foi de *Vanilloid receptor subtype 1* (VR1) (Caterina et al., 1997). E em referência à essa designação de *vanilloid*, esse grupo de proteínas passou a compor a subfamília dos canais TRPV. Esse grupo é composto até agora por seis proteínas, chamadas de TRPV1 (anteriormente VR1, o membro fundador dessa família), TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 e TRPV6; um outro número de proteínas possui homologia com um gene cuja expressão estava diminuída em células de melanoma, e que foi denominado de *Melastatin* (Duncan et al., 1998). Essas foram agrupadas em uma subfamília denominada de TRPM, para primeira letra de *Melastatin*, que foi o primeiro membro dessa subfamília de proteínas relacionadas ao TRP, e que agora é chamado de TRPM1. Esse grupo é composto atualmente por oito proteínas. Da mesma maneira

que nas subfamílias anteriores (TRPC e TRPV), os respectivos nomes são: TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4 e assim por diante.

Além dessas três subfamílias, existem ainda outros quatro grupos de proteínas com menor homologia com o TRP da *Drosophila*: um grupo de proteínas semelhantes à codificada pelo gene que está relacionado com o aparecimento da doença do rim policístico, denominado de PKD2 (para *Polycystic Kidney Disease*, Mochizuki et al., 1996) ou *polycystin-2*, e que, por possuir homologia com os canais TRP (Littleton e Ganetzky, 2000; Koulen et al., 2002), esta subfamília é denominada de TRPP, para *Polycystins*, e é composta por três membros – TRPP1, TRPP2 e TRPP3.

No ano 2000, três laboratórios – que estavam investigando de forma independente os determinantes genéticos que pudessem ser responsáveis, ou que pudessem estar relacionadas com o aparecimento da *Mucopolidose tipo IV* (MLIV) – identificaram um gene que apresentava mutações específicas em pacientes com essa doença (Bargal et al., 2000; Bassi et al., 2000; Sun et al., 2000) que poderia ser o responsável pelo aparecimento da MLIV. Esse gene foi denominado de *MCOLN1* e a proteína codificada por esse gene de *Mucolipin-1* (Sun et al., 2000). Sun et al. (2000) observaram também que essa proteína apresentava homologia com as proteínas TRP. Em 2002, Di Palma e colaboradores clonaram dois outros genes relacionados ao *MCOLN1*, e por isso foram nomeados de *MCOLN2* e *MCOLN3*. As proteínas codificadas por esses outros dois genes (*Mucolipin-2* e *Mucolipin-3*) também mostraram similaridade às proteínas da família dos canais TRP. Essas três proteínas são então agrupadas em uma outra subfamília de canais TRP, chamada de TRPML, para *Mucolipin*, e também são denominadas de TRPML1, TRPML2 e TRPML3, respectivamente.

E por fim, há duas subfamílias que são, excepcionalmente dentro da família de proteínas TRP, caracterizadas por possuírem em suas estruturas uma longa sequência de aminoácidos homóloga àquela presente nas Anquirinas.

Em 1999, Jaquemar e colaboradores encontraram um gene cuja expressão estava diminuída ou mesmo ausente em fibroblastos que haviam sido submetidos a uma transformação oncogênica e em outras linhagens de células tumorais de humanos. A possível proteína codificada por esse gene possuiria dois domínios distintos: um contendo 18 sequências homólogas às presentes nas Anquirinas na sua região N-terminal, e uma outra região composta por 6 segmentos

transmembranares, com características de um canal para íons. Jaquemar et al. (1999) notaram que, por essa estrutura, a nova proteína poderia ser um novo integrante do conjunto de proteínas do tipo TRP; em 2003, o grupo do Doutor Ardem Patapoutian se utilizou de bioinformática para realizar uma procura por proteínas com semelhanças estruturais às proteínas TRP já conhecidas, e em sua pesquisa também encontrou uma proteína com uma sequência de domínios homólogos aos presentes nas Anquirinas e uma região com 6 segmentos transmembranares. Doutor Patapoutian e colaboradores (Story et al., 2003) notaram que tratava-se da mesma proteína descrita por Jaquemar et al. (1999) a qual foi então denominada de ANKTM1 (para em inglês *Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains*). À essa nova proteína também foi dado o nome de TRPA1, e passou a compor a subfamília TRPA (para *Ankyrin*), sendo o único representante dessa subfamília em mamíferos.

Durante os anos 90, o grupo do Dr. Charles Zuker realizava experimentos para responder à seguinte pergunta: como estímulos mecânicos são transformados em estímulos elétricos? Para seus estudos escolheram como modelo animal moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, pois poderiam combinar manipulações genéticas com registros do potencial de membrana das estruturas responsáveis por detectar os estímulos mecânicos, mecanorreceptores, e ainda, por que a perda da função de alguma proteína geralmente resulta em um fenótipo observável ou que é possível ser reconhecido. Assim, selecionaram vários indivíduos dessa espécie que não respondiam a alguns estímulos mecânicos ou que apresentaram alterações no registro do potencial dos mecanorreceptores. Nesses, identificaram alterações em sete genes localizados no cromossomo de número 2 do genoma da *Drosophila*. Alguns mutantes não apresentavam despolarização dos mecanorreceptores, e foram denominados por tal fenótipo eletrofisiológico de *nomp* para, em inglês, “*no mechanoreceptor potential*” (Kernan et al., 1994). Esse tipo de fenótipo foi associado a três desses genes, que foram denominados de *nompA*, *nompB* e *nompC*. Um desses mutantes, *nompC*, além do fenótipo eletrofisiológico apresentava um movimento desajeitado ou desorganizado. Zuker e colaboradores mapearam e clonaram esse gene, e identificaram a sua sequência de nucleotídeos. A estrutura da possível proteína codificada por esse gene possuiria uma sequência de 29 domínios Anquirinas na região N-terminal, e os outros resíduos restantes com uma semelhança com os canais da família TRP (Walker et al., 2000). Devido a essa

homologia, esta proteína NOMPC foi considerada ser um membro distante da família dos TRPs. E passou a compor a subfamília TRPN (para a primeira letra de *nompC*). Ainda não existem evidências para se sugerir a presença dessas proteínas em mamíferos.

Em resumo: os canais TRP são organizados nas seguintes subfamílias: TRPC (1-7), TRPV (1-6), TRPM (1-8), TRPP (1-3), TRPML (1-3), TRPA e TRPN.

Os canais TRP são permeáveis a cátions (di e monovalentes). A seletividade varia entre membros de diferentes subgrupos e mesmo dentro da mesma subfamília. Em relação ao íon cálcio, somente dois são impermeáveis (TRPM4 e TRPM5) e outros dois possuem uma seletividade maior para esse íon (TRPV5 e TRPV6) comparada à outros cátions. É possível que essas proteínas possam permitir o influxo de cálcio em muitos tipos de células.

Considerando as evidências que: (1) a formação e liberação de fatores pelas células endoteliais são conseqüentes a um aumento no cálcio livre na célula endotelial; (2) esse aumento é principalmente devido ao influxo de cálcio do meio extracelular; e (3) os canais TRP são permeáveis a cátions inclusive ao cálcio, surgiu a hipótese de que alguns desses canais poderiam estar mediando o influxo de cálcio na célula endotelial. Como primeira parte para avaliar essa hipótese, vários experimentos foram realizados para responder a seguinte pergunta: **canais TRP estão presentes em células endoteliais?**

A presença ou não de alguns desses canais nas células endoteliais têm sido estudada utilizando técnicas de imunohistoquímica, *Western blot* e detecção do RNA mensageiro.

Em relação aos canais da subfamília TRPC, a maioria dos estudos envolveu o uso de RT-PCR. Com essa técnica, a presença de RNAm para os canais TRPC1, C3, C4, C5 e C6 foi detectada em células endoteliais da aorta de boi em cultura por Chang et al. (1997) e por Garcia e Schilling (1997); além deles, Moore e colaboradores (1998) encontraram RNAm para TRPC1 em células endoteliais isoladas da artéria pulmonar de rato e de humanos; Groschner et al. (1998) descreveram a presença de TRPC1, C3 e C4 em cultura de células endoteliais da veia umbilical humana; e Kohler e colaboradores (2001), a presença de RNAm para o TRPC1 e o TRPC3 em cultura de células endoteliais isoladas da artéria mesentérica humana; Antoniotti et al. (2002) também encontraram RNAm para

TRPC1 em cultura de células endoteliais da aorta de boi; Facemire et al. (2004) descreveram a presença de RNAm para TRPC1, C3 a C6 na artéria renal e na aorta de rato; e Paria et al. (2004), a presença de RNAm para TRPC1, C3, C4 e C6 em células endoteliais da artéria pulmonar de humanos em cultura. Resultados semelhantes foram encontrados por esses pesquisadores em células endoteliais da veia umbilical humana, onde também foi detectado RNAm para o TRPC7; Yip et al. (2004) realizaram um estudo mais elaborado combinando, além de RT-PCR, experimentos com imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Em cultura de células endoteliais da artéria coronária de humanos, com RT-PCR, descreveram a presença de RNAm para os canais TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5 e TRPC6. Na imunohistoquímica, observaram imunorreatividade no endotélio da artéria cerebral e da coronária de humanos para TRPC1, C3 a C7.

Fantozzi e colaboradores (2003) detectaram o RNAm para alguns membros da subfamília TRPM (1, 3, 4, 6, 7 e 8) de células endoteliais da artéria pulmonar de humanos em cultura; Nilius et al. (2003), usando a técnica de *Northern blot*, descreveram a presença de RNA para TRPM4 em células endoteliais isoladas da aorta de camundongo; e Hecquet e colaboradores (2008) descreveram a presença do TRPM2 (RNAm e proteína) em cultura de células endoteliais da artéria pulmonar de humanos; Inoue e Xiong (2009) detectaram a presença de RNAm para TRPM7 em cultura de células endoteliais da veia umbilical de humanos.

Em relação ao TRPA1, Earley et al. (2009) detectaram, por RT-PCR, a presença de RNAm para TRPA1 em células endoteliais isoladas da artéria cerebral de ratos, assim como observaram imunorreatividade para TRPA1 no endotélio desse vaso. Em segmentos de artéria que tiveram o endotélio removido, nenhuma imunorreatividade foi observada.

Da subfamília dos TRPP, Ong et al. (1999), utilizando imunohistoquímica, descreveram a presença do TRPP1 (*polycystin 2*) no endotélio de microvasos cerebrais de humanos e Berrout et al. (2011), utilizando RT-PCR, imunocitoquímica e *Western blot*, observaram imunorreatividade para o TRPP1 em cultura de células endoteliais de microvasos do cérebro de camundongos.

Dos canais da subfamília TRPV, a presença de RNAm para o canal TRPV1 foi detectada com RT-PCR em células endoteliais da artéria pulmonar de humanos (Fantozzi et al., 2003) e em cultura de células endoteliais de capilares e microvasos cerebrais de humanos (Golech et al., 2004); Bratz et al. (2008),

utilizando imunohistoquímica, observaram imunorreatividade para TRPV1 no endotélio da artéria coronária de porco; e segundo Yang et al (2010), usando imunofluorescência, TRPV1 está presente no endotélio da artéria mesentérica e em células endoteliais isoladas da aorta de camundongos.

A presença de RNAm para o canal TRPV2 foi detectada por RT-PCR em células endoteliais da artéria pulmonar de humanos por Fantozzi et al. (2003).

Earley et al. (2010), utilizando imunofluorescência, observaram imunorreatividade com anticorpo anti-TRPV3 no endotélio da artéria cerebelar superior de rato, e nenhuma imunorreatividade foi observada em preparações sem endotélio.

Em relação à proteína denominada de TRPV4 [antes da nomenclatura proposta por Montell et al. (2002), também era chamada de VRL-2, TRP12, OTRPC4 ou VR-OAC], o RNAm foi detectado em células endoteliais da aorta torácica de camundongo (Wissenbach et al., 2000; Vriens et al., 2005) e em células endoteliais da artéria pulmonar de humanos (Fantozzi et al., 2003) e da artéria carótida de rato (Kohler et al., 2006); Marelli et al. (2007) encontraram RNAm em células endoteliais isoladas da artéria cerebral média de ratos e imunorreatividade foi observada no endotélio da artéria cerebral média de rato.

Imunorreatividade para o TRPV4, por meio de técnica de imunohistoquímica, foi observada no endotélio da artéria carótida de camundongo (Hartmannsgruber et al., 2007; Loot et al., 2008) e no endotélio da artéria pulmonar de rato (Willette et al., 2008); Zhang et al. (2009) encontraram RNAm para TRPV4 na aorta torácica, artérias carótida e mesentérica de camundongo, e também observaram imunorreatividade para TRPV4 no endotélio da aorta de camundongo.

Gao et al. (2009), com *Western blot*, observaram imunorreatividade em extrato de proteínas extraídas de ramos da artéria mesentérica de ratos; e com imunohistoquímica, Gao e Wang (2010a e 2010b) observaram imunorreatividade tanto na adventícia quanto no endotélio da artéria mesentérica de ratos, mas não na camada correspondente ao músculo liso.

Mendoza et al. (2010) utilizando RT-PCR detectaram presença de RNAm para TRPV4 nas células endoteliais mas não em células musculares da artéria mesentérica de camundongos e, utilizando imunofluorescência, observaram imunorreatividade para o TRPV4 no endotélio de ramos de primeira e de segunda

ordem da artéria mesentérica de camundongos, mas não em preparações isoladas de camundongos TRPV4-KO.

Ma et al. (2011), usando *Western blot*, observaram imunorreatividade com anti-TRPV4 em cultura de células endoteliais isoladas da artéria mesentérica de rato; e Bulboz et al. (2011) detectaram presença de RNAm para TRPV4 e observaram imunorreatividade (por meio de *Western blot*) em células endoteliais isoladas de arteríola coronária de humanos. E ainda observaram imunorreatividade (com imunohistoquímica) para o TRPV4 no endotélio de preparações de arteríolas da coronária de humanos.

Podemos inferir desse conjunto de resultados que alguns membros da Família dos genes TRP estão expressos em células endoteliais de certos vasos, o que nos leva à próxima pergunta: **A ativação desses canais leva à produção de relaxamentos dependentes de endotélio em preparações arteriais isoladas?**

Em relação ao modo de ativação dos canais TRP, essas proteínas podem ser ativadas por diversos estímulos, entre os quais: estímulos mecânicos, temperatura, componentes lipídicos da membrana plasmática e por ligantes exógenos (por produtos obtidos de plantas e por compostos sintéticos). Contudo, um dos principais problemas encontrados ao se estudar uma possível função dos canais TRP em determinadas preparações, situações fisiopatológicas e mesmo em células isoladas tem sido a carência tanto de substâncias seletivas para ativar como de bloqueadores específicos para cada proteína. Existem substâncias que bloqueiam de maneira inespecífica vários canais (por exemplo: *vermelho de rutênio*, que bloqueia canais TRPV1-V4 e TRPA1; capsazepina, que bloqueia tanto TRPV1 e TRPM8), e outras que funcionam como agonistas de mais de um canal. Uma das alternativas para isso tem sido o uso de animais modificados geneticamente, que não possuem o gene para expressar determinada proteína – conhecidos como animais *knockout* (KO) – ou ainda o uso de um RNA que interfere com a síntese de proteínas a um nível pós-transcricional (siRNA, para *small interfering RNA* ou shRNA, para *short hairpin RNA*).

Embora alguns estudos indiquem que canais TRPC estejam presentes no endotélio de algumas artérias, a questão se a ativação química deles pode causar relaxamentos dependentes de endotélio ainda não pôde ser respondida por ainda não serem conhecidos ativadores seletivos dessas proteínas. Porém, alguns autores

sugeriram que o aumento de cálcio produzido pelo ATP em cultura de células endoteliais da coronária de humanos envolve a participação de canais TRPC3 (Smedlund et al., 2008); que o influxo de cálcio produzido por trombina está reduzido em células endoteliais isoladas da artéria pulmonar de camundongos TRPC4-KO (Tirupathi et al., 2002); e em HUVECs, que o aumento de cálcio produzido pela tapsigargina foi reduzido com o uso de siRNA para TRPC3 (Antigny et al., 2011), e foi inibido ao reduzir-se a expressão tanto de canais TRPC1 quanto de canais TRPV4 com os seus respectivos siRNA (Ma et al., 2011).

Golech et al. (2004) observaram que capsaicina, ativador de TRPV1, produziu aumento de cálcio em cultura de células endoteliais de capilares e microvasos do cérebro de humanos; Bratz et al. (2008) observaram que a capsaicina produziu relaxamentos em anéis da artéria coronária de porco pré-contraídos. Esses relaxamentos foram inibidos com a remoção do endotélio e com a incubação de capsazepina (substância utilizada como bloqueador de canais TRPV1); Yang et al. (2010) observaram que capsaicina produz aumento na concentração intracelular de cálcio em células endoteliais da aorta torácica de camundongos em cultura. Essa resposta foi inibida por 5'-iodo-resiniferatoxina (um bloqueador seletivo de TRPV1), e não foi observada em culturas de células endoteliais isoladas da aorta de camundongos TRPV1-KO. Além desses resultados, Yang et al. (2010) observaram que capsaicina produziu relaxamentos dependentes de endotélio em preparações da artéria mesentérica de camundongos nativos, mas não em preparações isoladas de TRPV1-KO.

Aydin et al. (2007) observaram que o carvacrol (agonista de TRPV3 e TRPA1) produziu hipotensão em ratos anestesiados. Earley et al. (2010) observaram que carvacrol produziu aumento na concentração intracelular de cálcio em células endoteliais isoladas da artéria cerebral de rato. Essa resposta foi dependente da presença de cálcio extracelular, e não foi observada em cultura de células do músculo liso isolados desse mesmo tipo de tecido. Para os estudos funcionais, micropipetas foram inseridas nas extremidades de segmentos isolados da artéria cerebral, e esses submetidos a uma pressão de perfusão constante. Essas condições permitiram o registro contínuo dos diâmetros interno e externo do vaso com auxílio de um sistema computadorizado de aquisição de dados. Nessas preparações, observou-se que o carvacrol produziu vasodilatação dependente de endotélio, e que essa resposta foi completamente inibida pelo vermelho de rutênio

(bloqueador não seletivo de canais TRPV1-4), mas não foi bloqueada pelo composto HC-030031 (antagonista de TRPA1).

Em relação ao canal TRPV4, Watanabe et al. (2002) estavam estudando as propriedades e mecanismos de ativação desse canal. Como a ativação do membro fundador da subfamília TRPV – o canal TRPV1 (VR-1) – era sensibilizada pela quinase de proteínas do tipo C (PKC, para *Protein Kinase C*), decidiram testar se ativadores dessa quinase poderiam estimular o TRPV4. Para isso, usaram compostos derivados do éster do forbol, previamente conhecidos por sua atividade sobre a PKC. Watanabe et al. (2002) observaram que o *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) produziu aumento de cálcio em cultura de células do astrocitoma de humanos transfectadas com TRPV4, mas não em células não-transfectadas. Indicando que o PMA ativou TRPV4. Como o controle negativo, testaram o *4-alpha-Phorbol 12, 13 didecanoate* (4 α PDD), outro derivado do éster do forbol mas que não ativa a PKC. Curiosamente, observaram que o 4 α PDD não só produziu aumento de cálcio nessas células em cultura, como também foi mais potente que o PMA e as respostas produzidas foram de maior magnitude. Com esse resultado inesperado, Watanabe et al. (2002) propuseram que o 4 α PDD é um potente ativador de canais TRPV4, e com isso, disponibilizaram uma ferramenta para estudar os possíveis efeitos decorrentes da ativação de canais TRPV4.

Nesse mesmo estudo, Watanabe et al. (2002) descreveram ainda que o vermelho de rutênio bloqueou as respostas produzidas tanto pelo PMA quanto pelo 4 α PDD.

Na caracterização feita dos efeitos do 4 α PDD, Watanabe et al. (2002) observaram que o 4 α -PDD aumentou a concentração de cálcio em células endoteliais da aorta de camundongos, entretanto não determinaram se o 4 α PDD teria algum efeito em uma preparação biológica, por exemplo se esse aumento de cálcio na célula endotelial resultaria na liberação de fatores relaxantes da aorta de camundongo; Kohler et al. (2006) também observaram que, em células endoteliais da aorta de rato, 4 α -PDD produziu aumento de cálcio que foi sensível ao bloqueio pela administração de vermelho de rutênio e pela redução da concentração extracelular de cálcio. Kohler et al. (2006) descreveram ainda que na artéria carótida e na artéria do músculo gracilis de rato – montadas em miógrafo e perfundidas a pressão constante para registro dos diâmetro interno e externo – 4 α PDD produziu vasodilatação estritamente dependente de endotélio, e esses relaxamentos foram

bloqueados pelo vermelho de rutênio e inibidos ainda pelo BAPTA-AM (substância utilizada para quelar o cálcio intracelular). Curiosamente, Kohler et al. (2006) observaram ainda que a vasodilatação produzida pelo estímulo mecânico do fluxo (*shear stress*) foi inibido pelo vermelho de rutênio; em metodologia semelhante, Hartmannsgruber et al. (2007) observaram que o 4 α -PDD também produziu vasodilatação dependente de endotélio na artéria carótida de camundongos, mas esses relaxamentos não foram observados na artéria isolada de camundongos TRPV4-KO, indicando que possivelmente todo o efeito produzido pelo 4 α -PDD poderia ser atribuído à ativação de TRPV4. Os mesmos autores descreveram que a dilatação produzida pelo *shear stress* estava ausente na artéria carótida isolada de camundongo TRPV4-KO; Loot et al. (2008) também observaram que, na artéria carótida de camundongo, o 4 α -PDD produziu relaxamentos resistentes à combinação de inibidores das sintases de NO e das ciclooxigenases, mas não em artérias isoladas de animais TRPV4-KO, e ainda, que os relaxamentos produzidos pelo aumento do fluxo foram bloqueados pelo vermelho de rutênio.

Essas observações permitiram formular uma nova hipótese: a ativação de canais TRPV4 leva a relaxamentos dependentes de endotélio, e o TRPV4 seria o canal (ou um dos) responsável (is) pela vasodilatação dependente de endotélio produzida pelo *shear stress*.

Com o objetivo de identificar compostos que pudessem ativar o TRPV4, Willette et al. (2008) fizeram um *screening* utilizando cultura de células derivadas de rim embrionário humano (células HEK, para *Human Embryonic Kidney Cells*) transfectadas com TRPV4, nas quais era medida a concentração intracelular de cálcio. Após testarem inúmeros compostos, encontraram um composto que produziu aumento de cálcio em células HEK somente quando transfectadas com TRPV4. Esse composto recebeu a denominação de GSK1016790A. Willette et al. (2008) documentaram alguns dos seus efeitos: observaram que GSK1016790A produziu relaxamentos na aorta torácica de rato (somente na presença de endotélio) e na aorta torácica de camundongos; sua administração endovenosa (por perfusão contínua) produziu redução na pressão arterial de camundongos e de cães, mas não em camundongos TRPV4-KO. Willette et al. (2008) ainda descreveram que esse composto em maiores concentrações também ativa canais do tipo TRPV1.

Esse estudo então identificou outro composto sintético capaz de ativar canais TRPV4, disponibilizando assim mais uma droga para o estudo desse canal.

Chama a atenção ainda, que se todos os efeitos *in vivo* mostrados por Willette et al. (2008) puderem ser atribuídos unicamente à ativação de TRPV4, a estimulação do TRPV4 torna-se um mecanismo para produzir hipotensão em camundongos e em cães. Essas observações podem nos levar a uma série de outras inferências a respeito de uma possível função do TRPV4 na regulação da pressão arterial nessas espécies.

Junto a essas observações, Gao et al. (2009) documentaram que a administração endovenosa de 4 α -PDD (2,5 e 5 mg/kg) causou hipotensão em ratos que foi bloqueada pela prévia administração de vermelho de rutênio. E, curiosamente, quando administrado, o vermelho de rutênio produziu aumento nos valores de pressão arterial média. Resultados semelhantes foram observados por Gao e Wang (2010a e 2010b). Nesses experimentos, chama a atenção o efeito do vermelho de rutênio na pressão arterial. Existiria uma ativação 'basal' (fisiológica) do TRPV4? No entanto, isso não pode ser respondido simplesmente com esse experimento, porque o vermelho de rutênio apresenta mais de três ações, e por assim dizer uma farmacologia complexa. E nas doses utilizadas não podemos afirmar se é devido a uma delas ou a uma combinação.

Em 2009, Zhang et al. observaram que 4 α -PDD produziu aumento de cálcio no endotélio de ramos da artéria mesentérica de camundongos *in situ*. Esse aumento foi bloqueado pelo vermelho de rutênio e não foi observado em preparações obtidas de camundongos TRPV4-KO. Além disso, observaram que 4 α -PDD produziu relaxamentos dependentes de endotélio em ramos da artéria mesentérica de camundongos; no mesmo tipo de preparação, observações semelhantes com o 4 α -PDD foram feitas por Mendoza et al. (2010). Esses autores observaram que GSK1016790A (100 nM) também produziu aumento do cálcio intracelular em células endoteliais isoladas dessas artérias. Esse aumento também foi bloqueado pelo vermelho de rutênio e ausente em células isoladas de camundongos TRPV4-KO. Da mesma forma, GSK1016790A produziu relaxamentos dependentes de endotélio em ramos da artéria mesentérica de camundongos nativos, mas esses foram ausentes nas artérias isoladas de camundongos TRPV4-KO. E por fim, o vermelho de rutênio bloqueou os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A.

Finalmente, Ma et al. (2011) observaram que 4 α -PDD produz aumento na concentração intracelular de cálcio em células endoteliais da artéria mesentérica de

rato e Bulboz et al. (2011) observaram que 4 α -PDD produziu aumento de cálcio em células endoteliais da artéria coronária de humanos em cultura. Esse aumento foi dependente de cálcio extracelular e bloqueado pelo vermelho de rutênio. Nos estudos funcionais, 4 α -PDD produziu relaxamentos dependentes de endotélio em arteríolas isoladas.

Em relação ao TRPA1 e a produção de relaxamentos dependentes de endotélio, existe apenas um estudo feito por Earley et al. (2009) que observaram que alil-isotiocianato (AITC, ativador de TRPA1) produziu relaxamento e hiperpolarização do músculo liso vascular da artéria cerebral de ratos, ambos de maneira dependente do endotélio. Esse relaxamento foi bloqueado pelo HC-030031 (antagonista de TRPA1).

Podemos dizer então, que existem evidências de que determinados membros que compõem o grupo dos TRP estão presentes em células endoteliais e que alguns autores sugerem que a sua ativação poderia levar à produção de relaxamentos. Porém, essas evidências não são conclusivas; por exemplo, a presença do produto de alguns desses genes foi descrita com base na observação que o seu RNAm pôde ser detectado em determinados tipos de células endoteliais mediante RT-PCR, o que não significa obrigatoriamente que a proteína codificada pelo gene é expressa em concentrações suficientes para ter influência sobre a função dessas células; outrossim, as observações que sugerem a participação desses canais no aumento da concentração intracelular de cálcio foram feitas em cultura de células, o que não indica necessariamente que esse aumento ocorre em preparações vasculares intactas e tampouco que o mesmo resultará na síntese e liberação de fatores relaxantes pelo endotélio; outros trabalhos utilizaram ativadores inespecíficos desses canais; e quando foram utilizados animais KO, não foram considerados ou investigados os possíveis mecanismos compensatórios decorrentes da deleção de um desses genes. Por exemplo um ganho de função de outra (s) proteína (s). Devido a essas limitações experimentais, nos anos seguintes à descoberta dessas proteínas, pesquisas foram feitas com o objetivo de identificar ou sintetizar compostos que possuam (ao menos dentro de uma faixa de concentrações) seletividade para apenas um canal, pois poderiam funcionar como ferramentas para se desenvolver estudos à respeito de uma possível função dessas

proteínas em vários tipos de células ou fenômenos. Entre elas, determinar se esses canais estão envolvidos nos relaxamentos dependentes de endotélio produzidos pelas substâncias que produzem relaxamentos dependentes de endotélio.

Um dos genes cuja presença (a nível de expressão da proteína) têm sido extensivamente descrita em células endoteliais é aquele, pertencente à subfamília *Vanilloid*, denominado de *TRPV4*. Além disso, diferentes autores têm sugerido que a proteína codificada por esse gene pode ser o canal responsável pela vasodilatação causada pelo *shear stress*. Porém, a falta de agentes que modulem especificamente a função dessa proteína ainda não permitiu que o papel do TRPV4 no controle da função endotelial pudesse ser elucidado ou caracterizado sistematicamente.

Por exemplo, considerando os resultados descritos na literatura surgem as seguintes perguntas:

- a ativação química de canais TRPV4 leva à produção de relaxamentos em preparações de artérias isoladas?
- caso leve à produção de relaxamentos, seriam esses específicos ou mesmo restritos a vasos de algumas espécies?
- seriam esses relaxamentos dependentes do endotélio e consequentes de um influxo de cálcio?
- os relaxamentos dependentes do endotélio produzidos pela acetilcolina (ou outros agonistas) envolveriam a participação de canais TRPV4?

Recentemente foram descritos dois novos compostos com ação ativadora e bloqueadora seletiva desse canal: em 2008, Willette et al. identificaram o GSK1016790A (como descrito acima) e Everaerts et al. (2010), também por meio de um *screening* utilizando medidas da concentração de cálcio intracelular em células transfectadas com TRPV4 humano, identificaram um composto que foi capaz de bloquear os efeitos do 4 α PDD. Esse composto recebeu a denominação de HC-067047. Segundo os autores, o HC-067047 também foi capaz de bloquear o aumento de cálcio produzido por outros estímulos do TRPV4 e pelo GSK1016790A. Everaerts et al. (2010), em experimentos preliminares para determinarem a

seletividade do HC-067047, descreveram que o HC-067047 é seletivo para bloquear os canais TRPV4, discriminando-o de outros canais da família TRP.

Consequentemente, nesse estudo concebemos experimentos para caracterizar o efeito da ativação química de canais TRPV4 em preparações de artérias isoladas. Para isso, determinamos e caracterizamos os efeitos do GSK1016790A em artérias isoladas de várias espécies. Com fins comparativos, também determinamos o efeito do 4 α PDD, que foi observado ativar TRPV4 em células transfectadas com esse gene; também determinamos o efeito desses compostos em preparações arteriais incubadas em solução nominalmente sem cálcio; e finalmente, avaliamos o efeito de bloqueadores mais seletivos de canais TRPV4 nas respostas produzidas pelo GSK1016790A, pelo 4 α PDD e pela acetilcolina.

1.5 - Objetivos

Neste estudo tivemos como objetivo realizar experimentos para tentar responder as seguintes perguntas:

- Qual o efeito do GSK1016790A e do 4 α PDD na aorta torácica de rato?
- O GSK1016790A produziria efeitos em outras artérias de rato ou de outras espécies?
- Caso essas drogas produzam relaxamentos, seriam esses dependentes do endotélio?
- Seriam esses relaxamentos dependentes da presença de cálcio extracelular?
- Poderiam os possíveis efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD ser atribuídos à ativação de canais TRPV4?
- Quais seriam os efeitos do HC-067047 (bloqueador de canais TRPV4) nos relaxamentos dependentes do endotélio produzidos pela acetilcolina e por outros agonistas?

2 – MÉTODOS

2.1 – Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos Swiss (machos, 30-35 g), ratos e ratas Wistar (180-200 g), coelhos New Zealand (fêmeas, 2.5-3.0 kg) e cobaias da cepa inglesa (machos, 200-220g). Todos os animais foram fornecidos pelo Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Este projeto, protocolado sob o número 024/2011, foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CETEA-USP) e considerado estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

2.2 – Parte experimental

2.2.1 - Preparações de órgão isolado:

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (dose de 50 mg/kg, administrada por via intraperitoneal em ratos, camundongos e cobaias, e por via endovenosa em coelhos) e então foi feito o dessangramento por meio da secção dos vasos cervicais.

As seguintes artérias foram removidas: aorta torácica e abdominal e artéria femoral de coelho; aorta torácica de rato, de cobaia e de camundongo. Em seguida, as artérias foram transferidas para uma placa de Petri contendo solução modificada de Krebs para retirada de tecidos aderentes. A solução de Krebs foi preparada com a seguinte composição em mM: 116.0 NaCl, 4.5 KCl, 1.16 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1.14 NaH₂PO₄, 25.0 NaHCO₃, 11.1 Glicose. Em todos os experimentos

realizados diclofenaco (na concentração de 10 μ M) foi adicionado à solução de Krebs utilizada.

Os segmentos de artérias foram então seccionados em anéis com comprimento entre 3,5 a 4 mm (artérias de coelho, cobaia e de rato) ou 4,5 a 5 mm (aorta de camundongo). Esses foram suspensos em cubas para órgão isolado (10 mL) contendo solução de Krebs (mantida a 37°C) e continuamente borbulhados com mistura de 95%O₂/ 5%CO₂, por meio de ganchos finos de aço inoxidável inseridos no lúmen de cada anel. Um desses suportes metálicos foi conectado a um transdutor de força, e as variações na tensão desenvolvida durante a contração isométrica foram registradas por meio de um sistema de aquisição de dados e visualizadas em um computador. Alguns experimentos tiveram as variações de tensão registradas em polígrafo.

Durante todos esses procedimentos, todo o cuidado foi tomado para não danificar a camada endotelial das preparações. Entretanto, quando desejado, algumas preparações tiveram o seu lúmen friccionado contra uma superfície de metal na tentativa de remover o endotélio.

Após serem suspensas na cuba para órgão isolado, as preparações arteriais foram submetidas a uma tensão inicial: anéis de artérias de rato e de coelho foram submetidos a uma tensão de 2 g, e anéis da aorta de camundongo e de cobaia à tensão de 1 g. Antes de iniciarmos os protocolos experimentais, as preparações foram deixadas em um período de estabilização às condições experimentais em que foram colocadas. O período de estabilização variou de acordo com a preparação utilizada: 1 hora, para artérias isoladas de rato; 2 horas, para aorta de camundongo e de cobaia; ou 2-3 horas, para artérias de coelho. Durante o período de estabilização, a solução de Krebs com a qual os tecidos ficam em contato foi sendo trocada a cada 20 minutos. Esse procedimento de troca da solução é comumente chamado de 'lavagem' das preparações. Geralmente, nos primeiros 20 minutos da 'lavagem', as preparações sofreram uma redução na tensão inicial a que foram submetidas. Nessas situações a tensão foi reajustada ao valor inicial desejado.

Os protocolos experimentais foram então realizados. Inicialmente, a presença ou não de endotélio foi verificada pela adição de acetilcolina ou A23187 em anéis pré-contraídos com fenilefrina. Foram considerados anéis com endotélio aqueles em que acetilcolina reduziu pelo menos 40% (aorta de camundongos) e

80% (aorta de ratos e artérias de coelhos) da contração induzida por fenilefrina. E sem endotélio foram consideradas aquelas preparações que não exibiram respostas à acetilcolina (aorta de rato e de camundongo) ou exibiram uma contração em resposta à adição de acetilcolina (artérias de coelho). Em experimentos feitos na aorta de cobaia, foram considerados com endotélio anéis que responderam com no mínimo 60% de relaxamento à adição de A23187 na concentração de 100 nM. E aqueles que não exibiram relaxamento ao A23187 foram considerados sem endotélio. Substâncias que produzem relaxamentos foram adicionadas no platô das contrações produzidas com a adição de fenilefrina, enquanto que substâncias que foram utilizadas como bloqueadores foram testadas no platô dos relaxamentos.

2.3 – Figuras e Representação gráfica dos resultados

Nas figuras dos resultados, a concentração utilizada de cada substância é indicada por um número negativo, que representa o *logaritmo de base 10* (DEZ) da respectiva concentração em número de moles por litro da substância. Esse número foi colocado abaixo da abreviação do nome de cada droga.

O momento em que cada substância foi adicionada à cuba é indicado por linhas verticais sobre ou próximas à abreviação do nome da substância utilizada.

Em cada registro também é mostrada uma escala para as variações do tempo e da tensão durante o protocolo experimental. A escala do tempo é indicada por uma linha horizontal com o respectivo valor em *minutos* (min), enquanto a escala de tensão é indicada por uma linha vertical, com o respectivo valor em *grama* (g).

Relaxamentos (ou contrações) foram quantificados como redução (ou aumento) na magnitude da pré-contração desenvolvida. Nos gráficos esses resultados foram representados como variação (Δ) na tensão (% da contração desenvolvida). Valores positivos indicam contração, enquanto que valores negativos indicam relaxamentos.

A representação gráfica dos resultados foi feita utilizando o software *GraphPad Prism versão 5.01* de agosto de 2007.

2.4 – Imunorreatividade para TRPV4

2.4.1 – Western blot

A aorta torácica e o rim de rato foram isolados e homogeneizados e dissolvidos em tampão RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay buffer*) modificado. A concentração de proteínas totais foi determinada tendo como controle soluções com concentrações conhecidas de albumina. A separação por eletroforese foi feita em gel de acrilamida 10% (SDS-PAGE, *Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) com volumes correspondentes a 50 e 100 µg de proteínas. Após a separação de proteínas, essas foram transferidas para uma membrana de celulose. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite mólico (7%), e então a membrana de celulose foi incubada com o anticorpo primário. Após essa incubação, as membranas foram 'lavadas' com TBS-T (*Tris-Buffered Saline* e *Tween 20*; da seguinte composição: 10 mM Tris, 100 mM NaCl e 0,1% Tween 20) 3 vezes (por 15 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário sob agitação e à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 3 vezes (10 minutos) com TBS-T. A revelação foi realizada com ajuda de um kit de quimioluminescência e com exposição das membranas a um filme de autoradiografia.

2.4.2 – Imunohistoquímica

Para estudos com a técnica de imunohistoquímica, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS, *Phosphate buffered saline*, pH=7,3) contendo heparina e nitrito de sódio. Após a perfusão com PBS, foi feita a perfusão com solução de paraformaldeído (PFA) a 4%. Após isso, a aorta torácica foi isolada e pós-fixada em PFA 4%. Depois de pós-fixada, foram deixadas em sacarose a 30%, e então congeladas. Para montagem das lâminas, secções de 10µm foram cortadas em criostato a -20°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1%. As lâminas foram incubadas com soro de cabra a 10%, e então incubadas com anticorpo primário (1 µg/mL). O local de ligação do anticorpo anti-TRPV4 foi identificado utilizando o sistema biotina/avidina. A reação foi revelada com DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride).

3 - RESULTADOS

3.1 – Imunorreatividade para TRPV4 na aorta torácica de rato.

Os resultados apresentados aqui são de experimentos iniciais realizados com o objetivo de verificar a presença do TRPV4 na aorta torácica de rato. A figura 1 mostra os resultados das imunorreatividades – com técnicas de *Western blot* e de imunohistoquímica – com anticorpo anti-TRPV4 em amostras de tecidos isolados de rato.

No *Western blot*, observamos imunorreatividade em amostras de 50 e 100 µg de proteínas obtidas de homogenatos da aorta torácica (Figura 1A) e do rim (em Figura 1B) que foram incubadas com anti-TRPV4. Na aorta torácica, observamos imunorreatividade em uma banda correspondente a 99 kDa (próximo ao peso molecular do TRPV4), e em duas outras bandas de peso molecular menor. Em amostras do rim, observamos imunorreatividade em bandas correspondentes a 117 e 99 kDa.

Aparentemente, as outras bandas não correspondem simplesmente a marcações inespecíficas, uma vez que quando as amostras foram pré-incubadas com o antígeno específico deste anticorpo (peptídeo controle) e então incubadas com anti-TRPV4, nenhuma imunorreatividade foi observada no homogenato de proteínas obtidas tanto da aorta torácica quanto do rim (respectivamente nas Figuras 1A e 1B, indicados por *Ab+peptídeo*).

Para o *Western blot* foram utilizados homogenatos de proteínas totais da aorta torácica, assim não é possível inferir a respeito da localização do TRPV4 nessa preparação. Para isso, utilizamos a técnica de imunohistoquímica.

Na imunohistoquímica, também em um experimento inicial, verificamos a presença de imunorreatividade no endotélio de secções da aorta torácica descendente de rato (Figura 1C, indicada por uma seta vermelha).

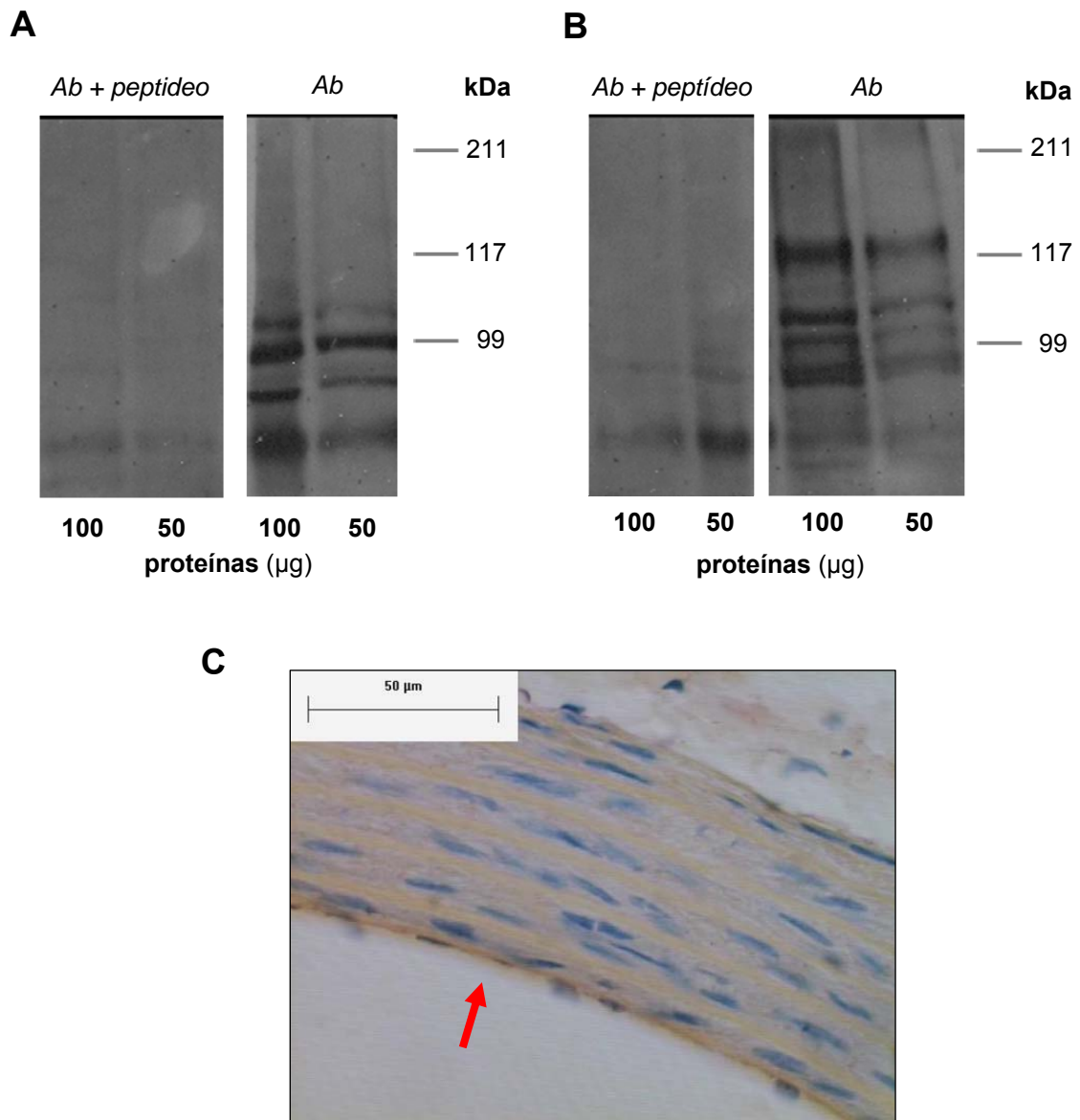


Figura 1 – Imunorreatividades (*Western blot*, WB, em **A** e **B**; Imunohistoquímica, IHQ, em **C**) com anticorpo anti-TRPV4 em amostras de tecidos isolados de rato. WB: imunorreatividade em amostras de 50 e 100µg de proteínas obtidos de homogenatos da aorta torácica (em **A**) e do rim (em **B**). *Ab*=amostras incubadas com anti-TRPV4. *Ab+peptídeo*=amostras foram pré-incubadas com o peptídeo controle e então incubadas com anti-TRPV4; IHQ: imunorreatividade em secções da aorta torácica descendente.

3.2 - Efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD em artérias isoladas de rato, coelho, camundongo e de cobaia.

Nos traçados mostrados na Figura 2, podemos observar que a adição tanto de GSK1016790A como de 4 α PDD produziu relaxamentos em anéis da aorta torácica de rato pré-contraídos com fenilefrina. Esses relaxamentos foram observados somente em preparações que responderam à acetilcolina com relaxamentos (>80%), o que indica a presença de endotélio funcionante (Furchgott e Zawadski, 1980). Podemos inferir então que os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD também são dependentes da presença de endotélio. Mesmo nas preparações sem endotélio, nitroprussiato de sódio (na concentração de 100nM) produziu relaxamentos (Figura 2A), mostrando que nessas preparações o músculo ainda é capaz de relaxar.

GSK1016790A (3-30 nM) e 4 α PDD (1-10 μ M) também produziram relaxamentos dependentes de endotélio na aorta torácica de coelho (Figura 3); e em anéis em que acetilcolina produziu contrações, GSK1016790A e 4 α PDD produziram apenas uma pequena redução na tensão.

Além da aorta torácica de rato e de coelho, GSK1016790A produziu relaxamentos na aorta abdominal e na artéria femoral de coelho (Figura 4), na aorta de camundongo (Figura 5) e na aorta de cobaia (Figura 6). Todos esses relaxamentos foram estritamente dependentes de endotélio, e ainda, a remoção do endotélio (ausência de resposta para acetilcolina) não afetou os relaxamentos produzidos pelo nitroprussiato de sódio; na aorta torácica de camundongo, a magnitude dos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A foi maior que daqueles produzidos pela acetilcolina; na aorta de cobaia, preparação onde GSK1016790A produziu relaxamentos na faixa de concentrações de 0,1-3 nM, seus relaxamentos também apresentaram uma magnitude maior que os relaxamentos causados pelo composto A23187.

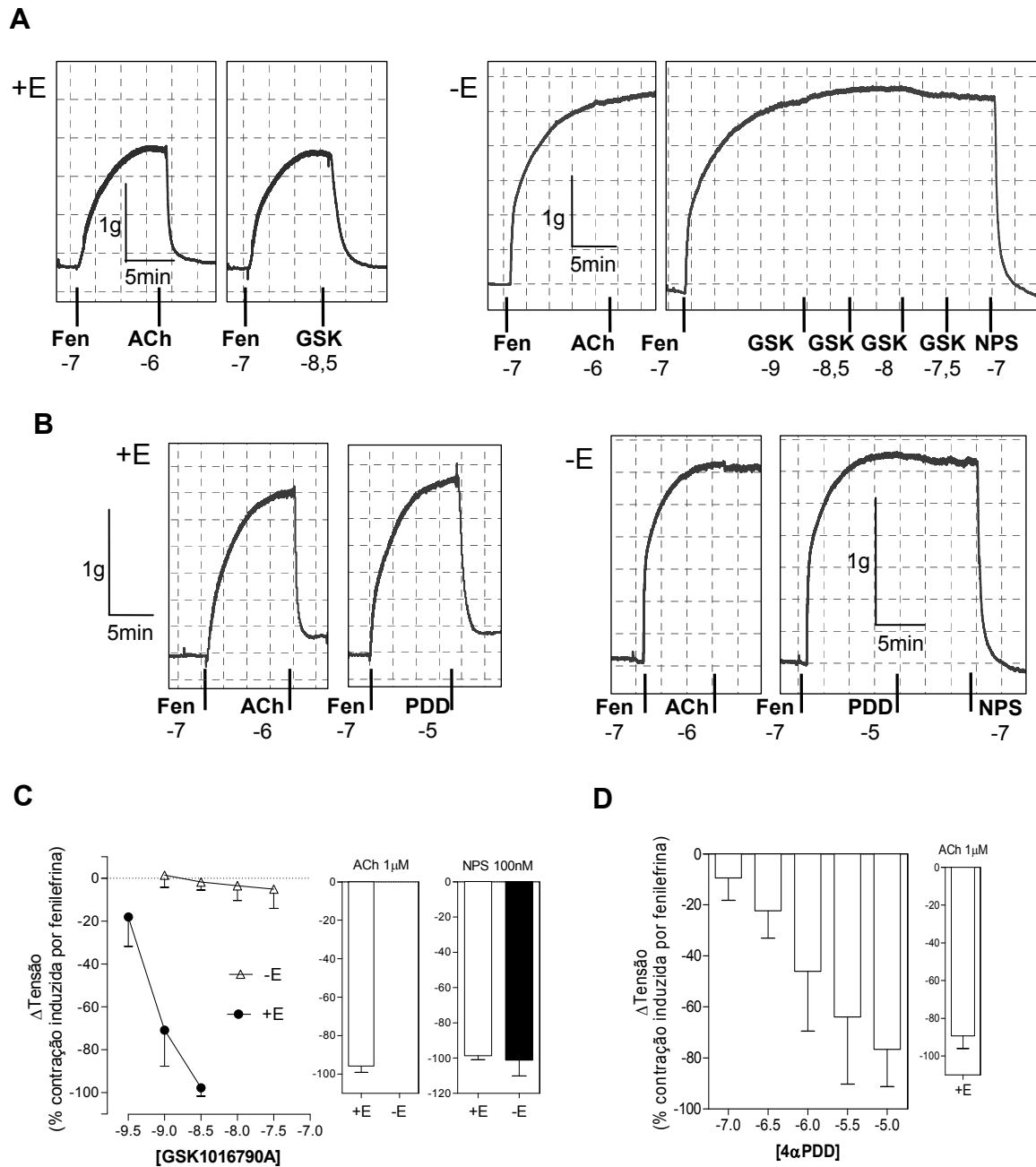


Figura 2 – Registros representativos da força de contração desenvolvida por anéis da aorta torácica de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen) antes e após a adição de GSK1016790A (GSK, em **A**) ou de 4 α PDD (PDD, em **B**) em preparações com (+E) e sem resposta (-E) à acetilcolina (ACh). **C** e **D**: representação gráfica da relação entre a concentração de GSK ou de 4 α PDD e a magnitude do relaxamento (em porcentagem da contração por Fen) observado em preparações com e sem endotélio, e das respectivas respostas obtidas com ACh e nitroprussiato de sódio (NPS) nas preparações utilizadas. Os pontos representam os valores de média \pm desvio padrão. Para GSK: n=7 (experimentos +E) e n=5-9 (experimentos -E). Para 4 α PDD: n=10-22 (+E) e n=10 (-E). Para NPS: n=3 (+E) e n=6 (-E).

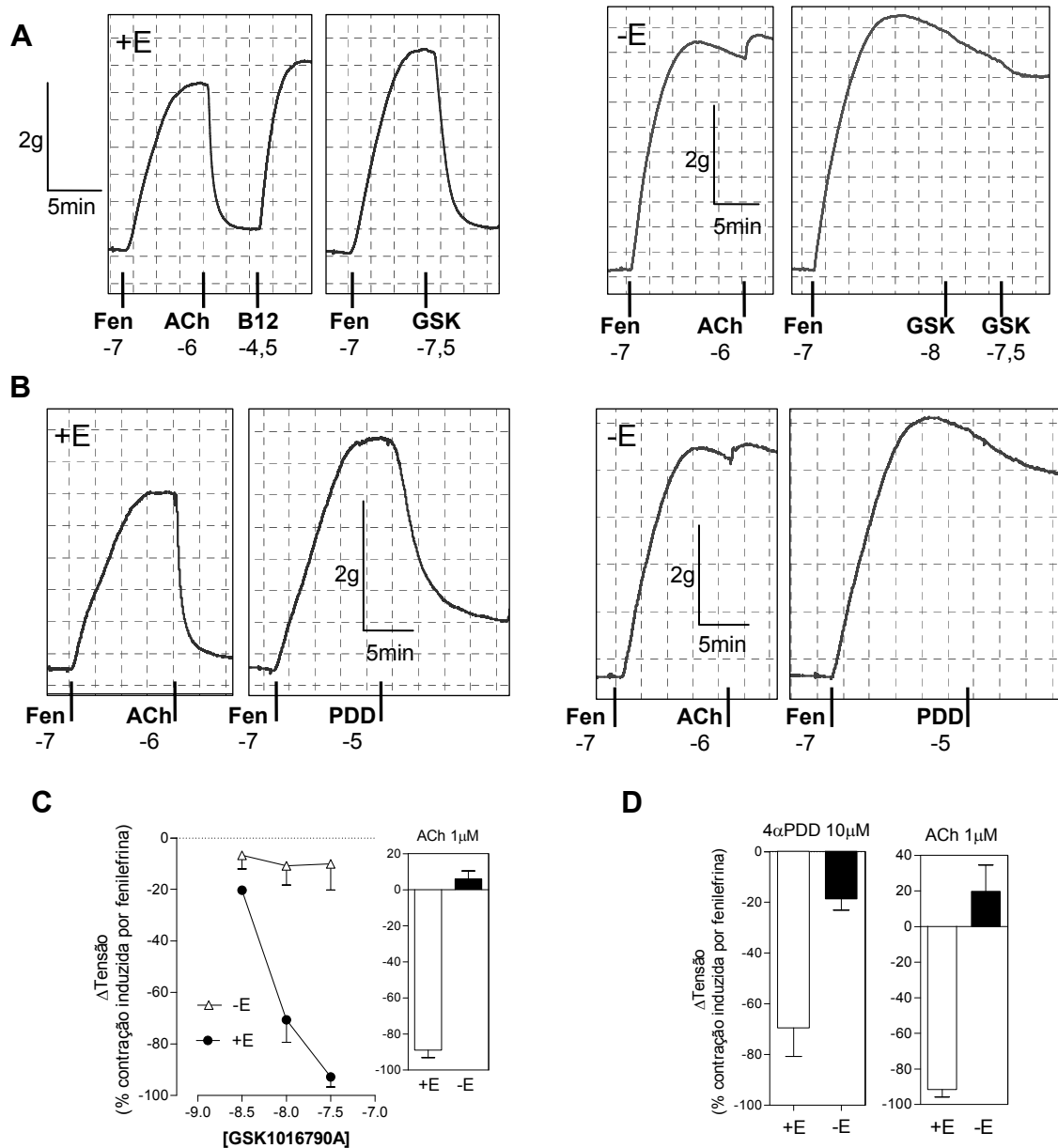


Figura 3 – Registros representativos da força de contração desenvolvida por anéis da aorta torácica de coelho pré-contraídos com fenilefrina (Fen) antes e após a adição de GSK1016790A (GSK, em **A**) ou de 4 α PDD (PDD, em **B**) em preparações que exibiram relaxamentos (+E) e contrações (-E) em resposta à acetilcolina (ACh). **C** e **D**: representação gráfica da relação entre a concentração de GSK ou de 4 α PDD e a magnitude do relaxamento (em porcentagem da contração por Fen) observado em preparações com e sem endotélio, e das respectivas respostas obtidas com ACh nas preparações utilizadas. Os pontos representam os valores de média \pm desvio padrão. Para GSK: n=5 (+E) e n=4-5 (-E). Para 4 α PDD: n=6 (+E) e n=3 (-E); B12=vitamina B12.

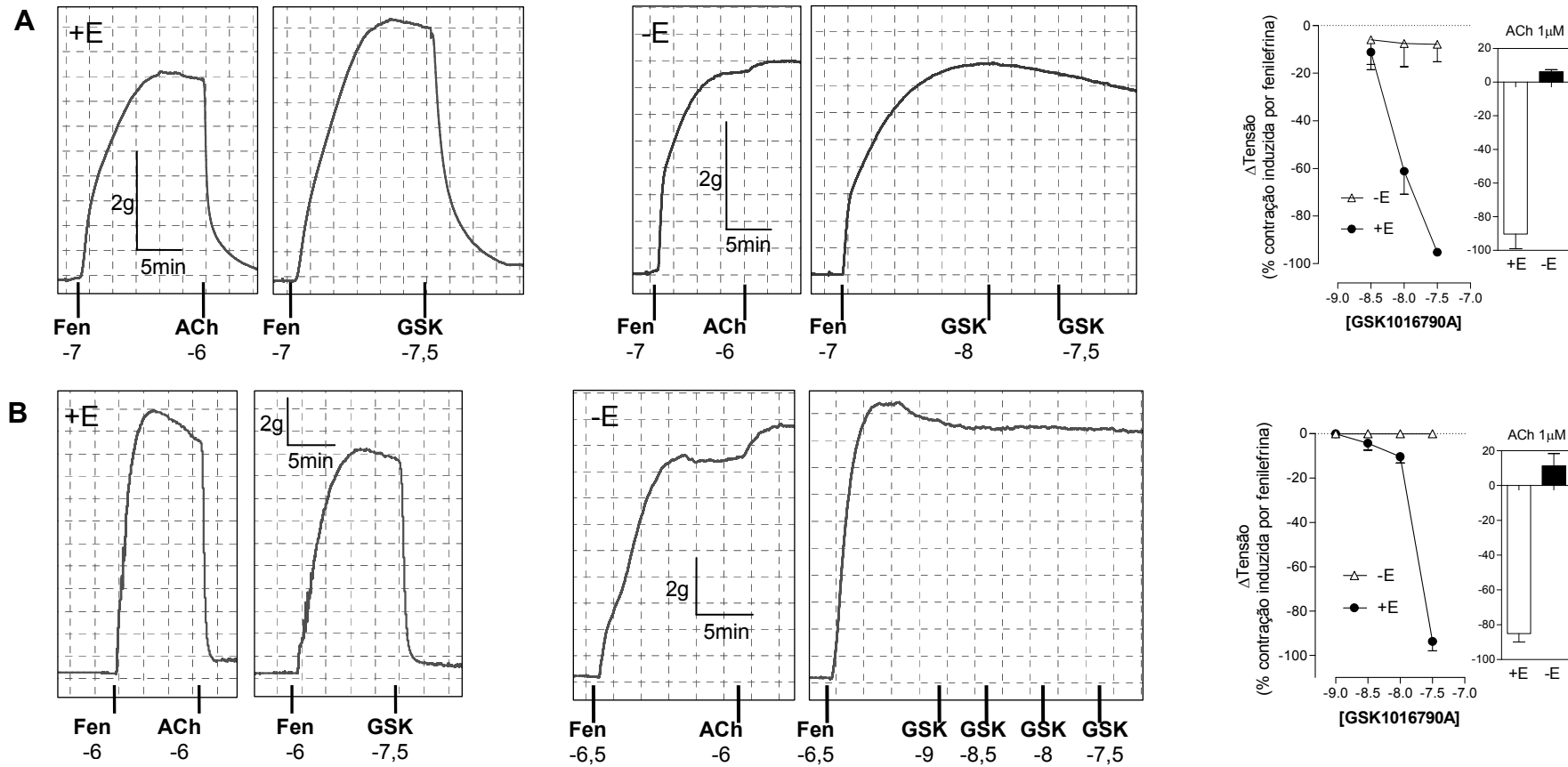


Figura 4 – Registros representativos da variação da força de contração desenvolvida por anéis da aorta abdominal (em **A**) e da artéria femoral (em **B**) de coelho pré-contraídos com fenilefrina (Fen) antes e após a adição de GSK1016790A (GSK) em preparações que exibiram relaxamentos (+E) ou contrações (-E) em resposta à acetilcolina (ACh). Ao lado dos registros, a representação gráfica da relação entre a concentração de GSK e a magnitude do relaxamento observado, e das respostas obtidas com ACh nas preparações utilizadas. Os pontos são os valores de média \pm desvio padrão. Em **A**: n=3 (+E) e n= 3-5 (-E). Em **B**: n=4 (+E) e n=3 (-E).

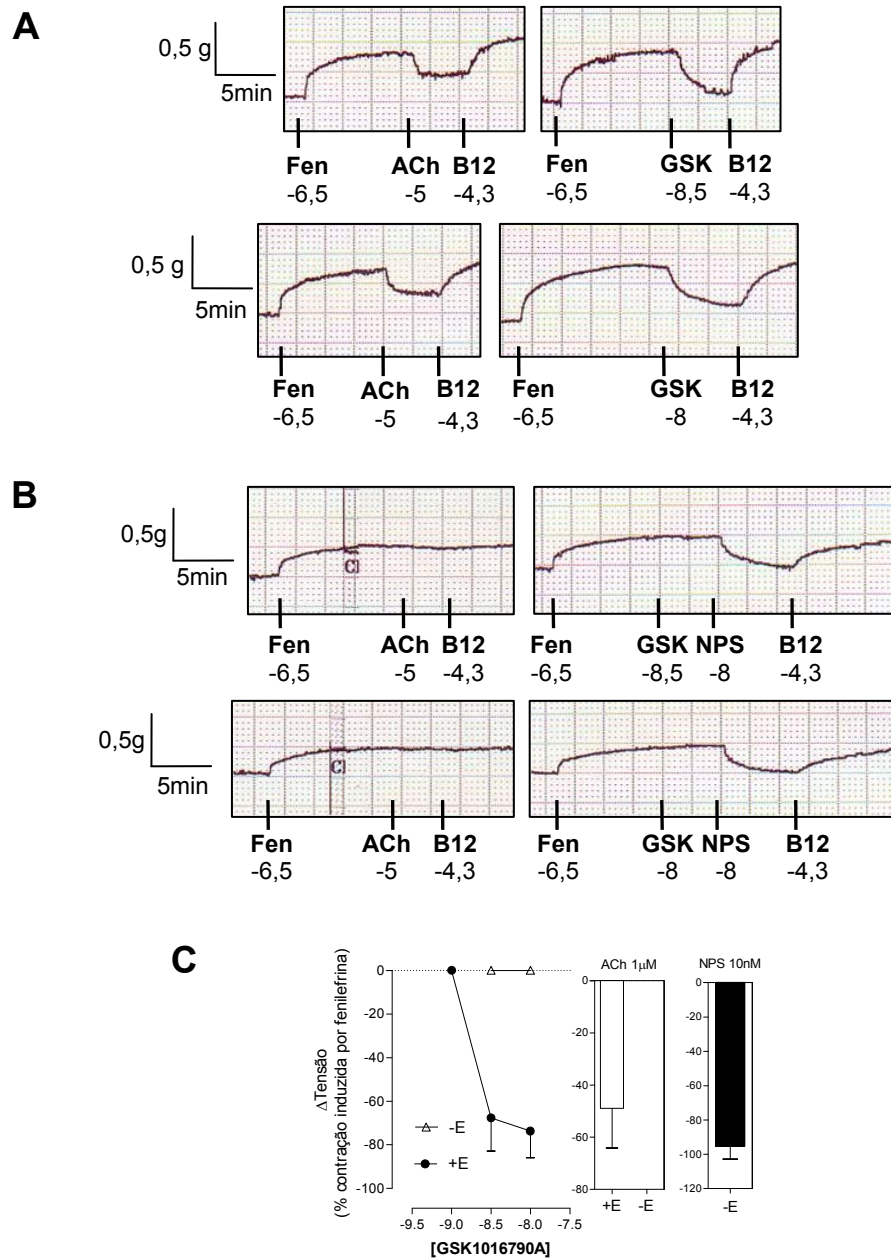


Figura 5 – Registros representativos da força de contração desenvolvida por anéis da aorta torácica de camundongo pré-contraídos com fenilefrina (Fen) antes e após a adição de GSK1016790A (GSK) em preparações com (+E, em **A**) e sem (-E, em **B**) resposta à acetilcolina. Em (**C**): representação gráfica da relação entre a concentração de GSK e a magnitude do relaxamento (em porcentagem da contração por Fen). Também estão representadas graficamente as respostas obtidas com acetilcolina nas preparações utilizadas e as respostas observadas com nitroprussiato de sódio em preparações -E. Os pontos representam os valores de média \pm desvio padrão de 3 experimentos semelhantes; para o NPS: n=6 (-E); B12=vitamina B12.

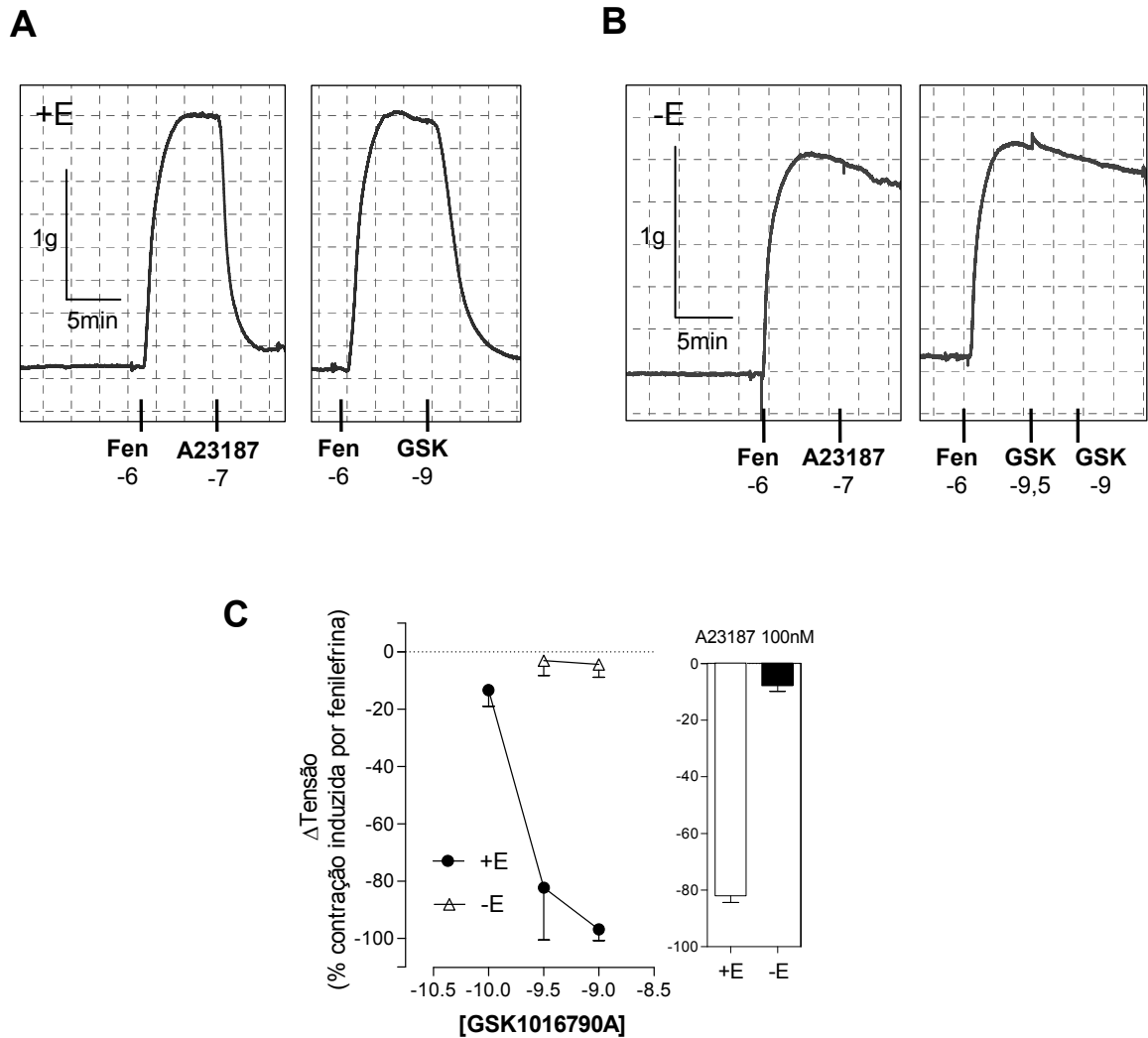


Figura 6 – Registros representativos da força de contração desenvolvida por anéis da aorta torácica de cobaia pré-contraídos com fenilefrina (Fen) antes e após a adição de GSK1016790A (GSK) em preparações com (+E, em **A**) e sem (-E, em **B**) resposta ao A23187. **C**: representação gráfica da relação entre a concentração de GSK e a magnitude do relaxamento (em porcentagem da contração por Fen) observado em preparações com e sem endotélio, e das respectivas respostas obtidas com A23187 nas preparações utilizadas. Os pontos representam os valores de média \pm desvio padrão de 4 (+E) e de 3 (-E) experimentos semelhantes.

Em todas as artérias, a magnitude dos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A foram dependentes da concentração, usando tanto concentrações isoladas como com adição cumulativa de concentrações de GSK1016790A. Os respectivos valores de EC_{50} são mostrados na Tabela I. GSK1016790A apresentou maior potência na aorta torácica de rato e é menos potente na artéria femoral de coelho.

Tabela I – Concentrações efetivas de GSK1016790A para produzir 50 por cento do efeito (CE_{50}) nas artérias das espécies estudadas, com os respectivos valores dos intervalos de confiança (IC95%), da porcentagem de endotélio (%E) e do número de experimentos (n).

Animal	Artéria	%E	CE_{50}	IC95%	n
rato	aorta torácica	95,8±3,3	0,5 nM	0,35 - 0,72 nM	7
coelho	aorta torácica	89,0±4,2	4,3 nM	3,58 - 5,14 nM	5
	aorta abdominal	90,3±8,7	6,5 nM	3,71 - 11,30 nM	3
	artéria femoral	85,0±4,8	17,0 nM	16,80 - 18,70 nM	4
camundongo	aorta torácica	49,0±15,2	1,4 nM	0,85 - 2,24 nM	3
cobaia	aorta torácica	82,0±2,3	0,2 nM	0,12 - 0,22 nM	4

%E=considerado como porcentagem de relaxamento observado em resposta ao A23187 (aorta torácica de cobaia) ou à acetilcolina (demais artérias). Os valores são mostrados como média±desvio padrão.

Em relação aos relaxamentos produzidos pelo 4 α PDD na aorta torácica de rato e de coelho, esses foram estritamente dependentes da presença de endotélio em todas as concentrações testadas, mas, diferentemente do GSK1016790A, a magnitude dos relaxamentos produzidos pelo 4 α PDD não apresentou uma clara dependência da concentração num mesmo anel de aorta, se as concentrações foram adicionadas isoladamente ou de maneira cumulativa. Porém, no conjunto geral de todos os experimentos com diferentes concentrações, observou-se uma tendência ao aumento da magnitude dos relaxamentos relacionada à concentração do 4 α PDD. Por esse motivo, apresentamos a magnitude

dos relaxamentos produzidos pelas diferentes concentrações de 4 α PDD em um gráfico em forma de colunas.

Caracterizamos também o início e a duração dos efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD. Em geral, os relaxamentos produzidos na aorta torácica de rato, coelho e camundongo apareceram 1-2 minutos após a sua adição e atingiram o máximo em 5-8 minutos. Para uma comparação, os relaxamentos provocados pela acetilcolina levam geralmente entre 30 segundos a 1 minuto para terem início e atingem um platô de resposta em menos de 2 minutos após a adição. Diferentemente dessas artérias, observamos que na artéria femoral de coelho, os relaxamentos do GSK1016790A se assemelham em magnitude e ao perfil temporal dos relaxamentos causados pela acetilcolina; e na aorta de cobaia, o perfil temporal das respostas do GSK1016790A se assemelhou ao das respostas produzidas pelo A23187. Em todos os vasos estudados, uma vez que atingiram o platô, os relaxamentos se mantiveram por pelo menos 10 minutos.

Os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD foram reversíveis pela remoção da droga; em anéis da aorta torácica de rato, após observarmos relaxamentos para GSK1016790A ou 4 α PDD, as preparações foram lavadas durante 1 hora e então uma nova contração foi produzida com fenilefrina (de magnitude semelhante à pré-contração anterior); GSK1016790A ou 4 α PDD causaram relaxamentos cuja magnitude foi semelhante à da primeira adição. De forma semelhante, não houve redução na magnitude das respostas observadas para o GSK1016790A na aorta torácica de cobaia (0,1-1 nM) e na aorta abdominal de coelho (1-30 nM), e para o 4 α PDD na aorta torácica de coelho (1-10 μ M); contudo, na aorta torácica de coelho, observamos que a magnitude dos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (30 nM) foram menores.

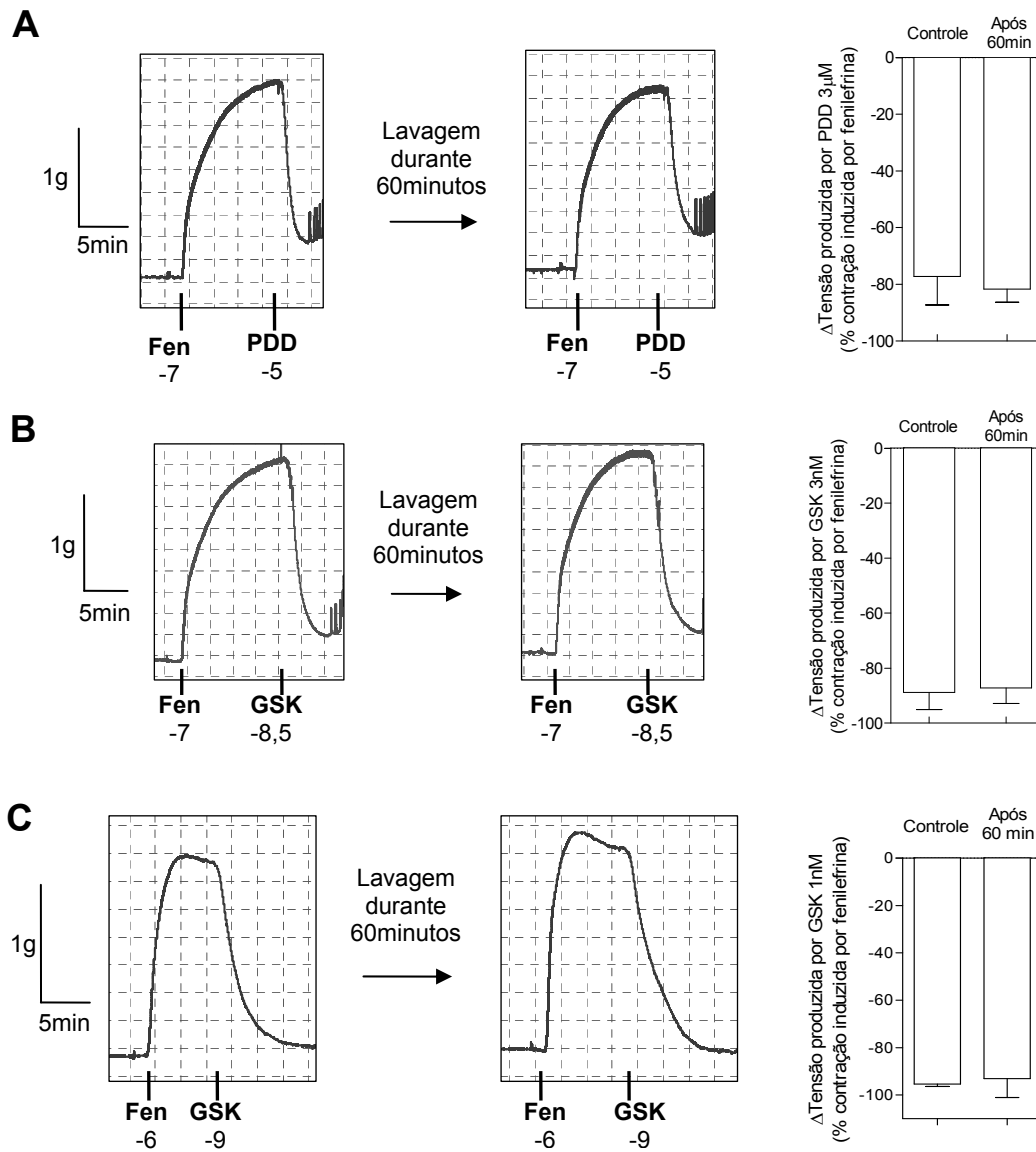


Figura 7 – Registros representativos da variação da força de contração desenvolvida em anéis da aorta torácica de rato (em A e B) e de cobaia pré-contraídos com fenilefrina (Fen) após a adição de 4αPDD (PDD, em A) ou de GSK1016790A (GSK, em B e em C). Uma nova adição de 4αPDD ou de GSK foi feita nas mesmas preparações após um período de lavagem de 60 minutos. Ao lado de cada registro, a representação gráfica com os valores de média ± desvio padrão de 4 (em A e em C) e de 10 (em B) experimentos semelhantes.

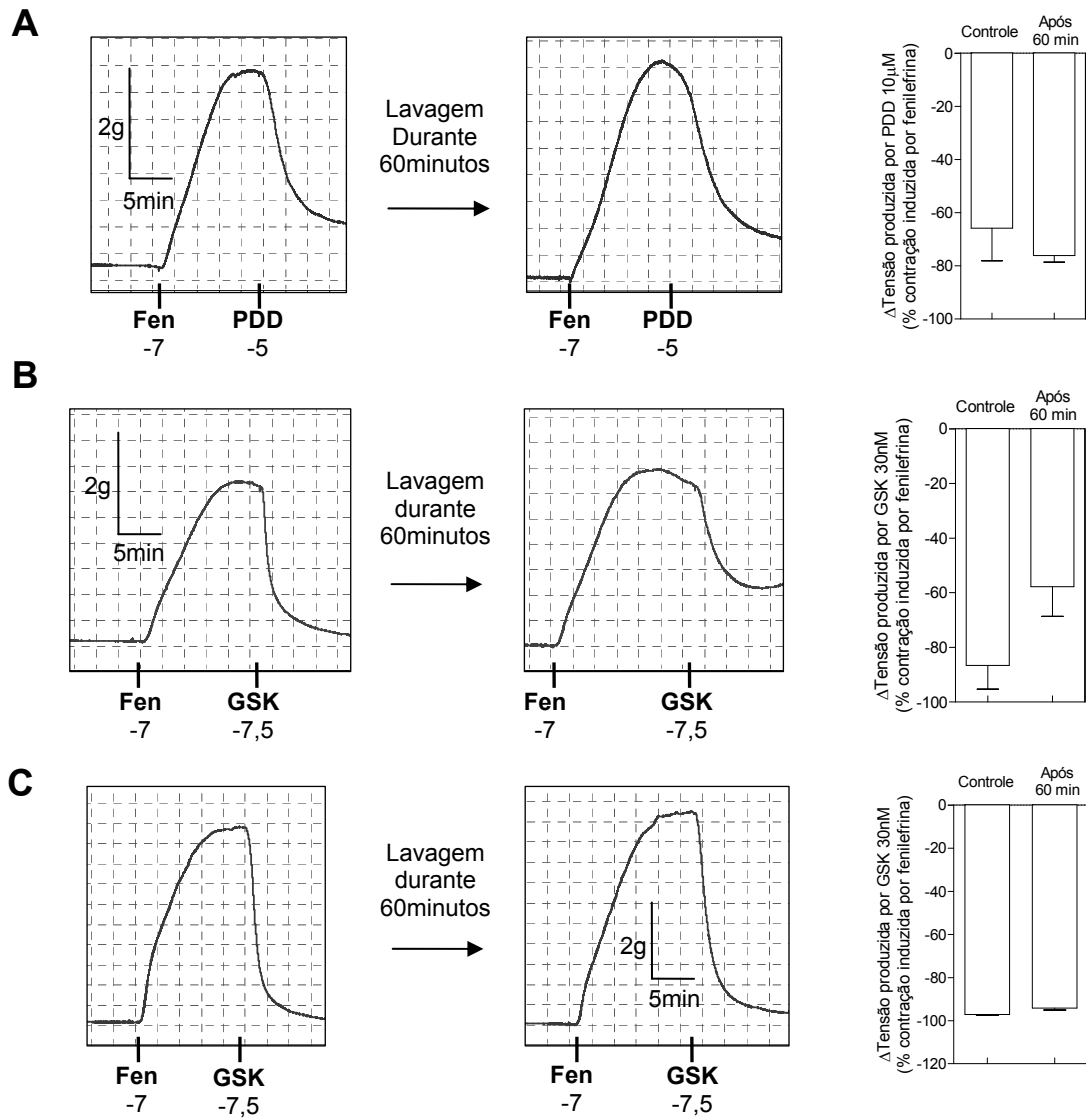


Figura 8 – Registros representativos da variação da força de contração desenvolvida em anéis da aorta torácica (em **A** e **B**) e abdominal (em **C**) de coelho pré-contraídos com fenilefrina (Fen) após a adição de 4 α PDD (PDD, em **A**) ou de GSK1016790A (GSK, em **B** e em **C**). Uma nova adição de 4 α PDD ou de GSK foi feita nas mesmas preparações após um período de lavagem de 60 minutos. Ao lado de cada registro, a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 4 (em **A**), de 6 (em **B**) e de 3 (em **C**) experimentos semelhantes.

3.3 - Relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD na aorta torácica de rato e de coelho requerem a presença de cálcio extracelular.

Para investigar se os efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD requerem a presença de cálcio extracelular em preparações de anéis da aorta de rato e de coelho, inicialmente determinamos o efeito da acetilcolina para confirmar a presença ou não de endotélio. Após a resposta da acetilcolina, todas as preparações foram incubadas em solução de Krebs preparada sem ter Ca²⁺ adicionado (solução nominalmente sem cálcio) durante 40 minutos com lavagens de 5 em 5 minutos. Como controle para a essa condição experimental e para o intervalo de tempo no qual as preparações foram incubadas em Krebs sem cálcio, determinamos o efeito do cloreto de potássio (KCl, 40 mM) nessas condições; observamos que as contrações produzidas pela adição de 40 mM de KCl foram abolidas (figura 9). Assim, em anéis com endotélio e após tal período de incubação em meio nominalmente sem cálcio, readicionamos fenilefrina; para obtermos uma pré-contracção foi necessária uma concentração dez vezes maior de fenilefrina. Essa contracção, embora de menor magnitude na aorta torácica de rato, se caracterizou por ter um início rápido e atingir o platô em poucos minutos. Curiosamente, em anéis da aorta torácica de coelho, observamos que, mesmo em solução nominalmente sem cálcio, as contrações provocadas pela fenilefrina foram de magnitudes comparáveis àquelas observadas na presença de cálcio extracelular e, de maneira semelhante à aorta de rato, essas contrações também tiveram um início rápido, semelhante às preparações de artérias que tiveram o seu endotélio removido. No platô da contracção adicionamos acetilcolina, GSK1016790A ou 4 α PDD. Em seguida, as preparações foram reincubadas em solução de Krebs contendo 2,5 mM de Ca²⁺ durante 60 minutos com lavagens a cada 15 minutos. No fim, sobre uma nova pré-contracção produzida por fenilefrina, as substâncias foram novamente testadas.

Os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD tanto na aorta torácica de rato como na aorta torácica de coelho foram abolidos em preparações com endotélio incubadas em solução de Krebs nominalmente sem cálcio (figuras 10 e 11). Nessas condições, acetilcolina produziu somente relaxamentos transitórios e de menor magnitude.

Quando cálcio foi reintroduzido no tampão, acetilcolina, GSK1016790A e 4 α PDD voltaram a causar relaxamentos. Esses resultados indicam que os relaxamentos endotélio dependentes produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD na aorta de rato e na aorta torácica de coelho requerem a presença de cálcio extracelular.

Após a readição de cálcio extracelular (2,5 mM), os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A apresentaram um início mais rápido (<1min), e também atingiram o platô em um menor intervalo de tempo (3-5 minutos).

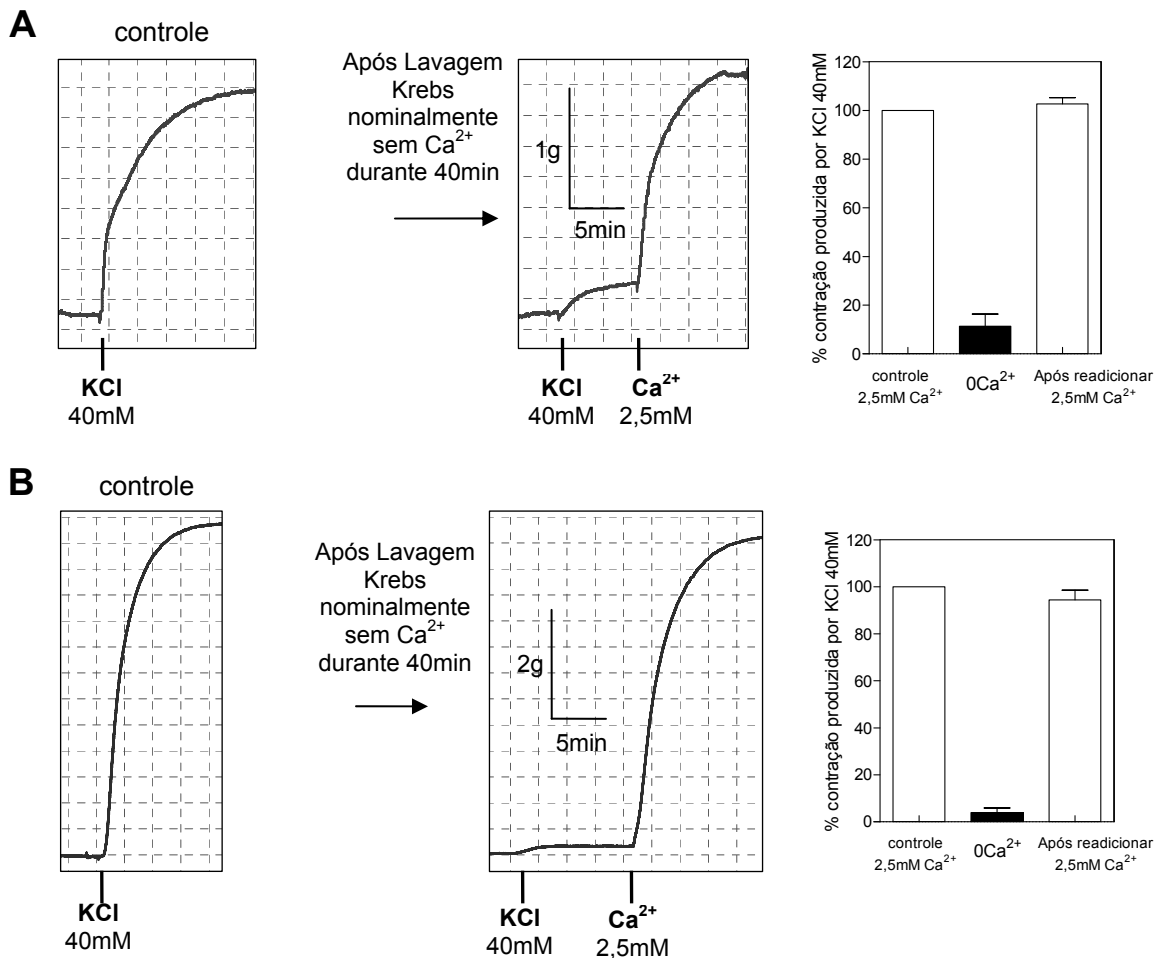


Figura 9 – Registros representativos da variação na força de contração desenvolvida por anéis da aorta torácica de rato (em **A**) e de coelho (em **B**) para a adição de 40mM de KCl na ausência e após a readição de 2,5mM de Ca^{2+} na solução de Krebs. Ao lado de cada registro, a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 3 (em **A**) e de 4 (em **B**) experimentos semelhantes.

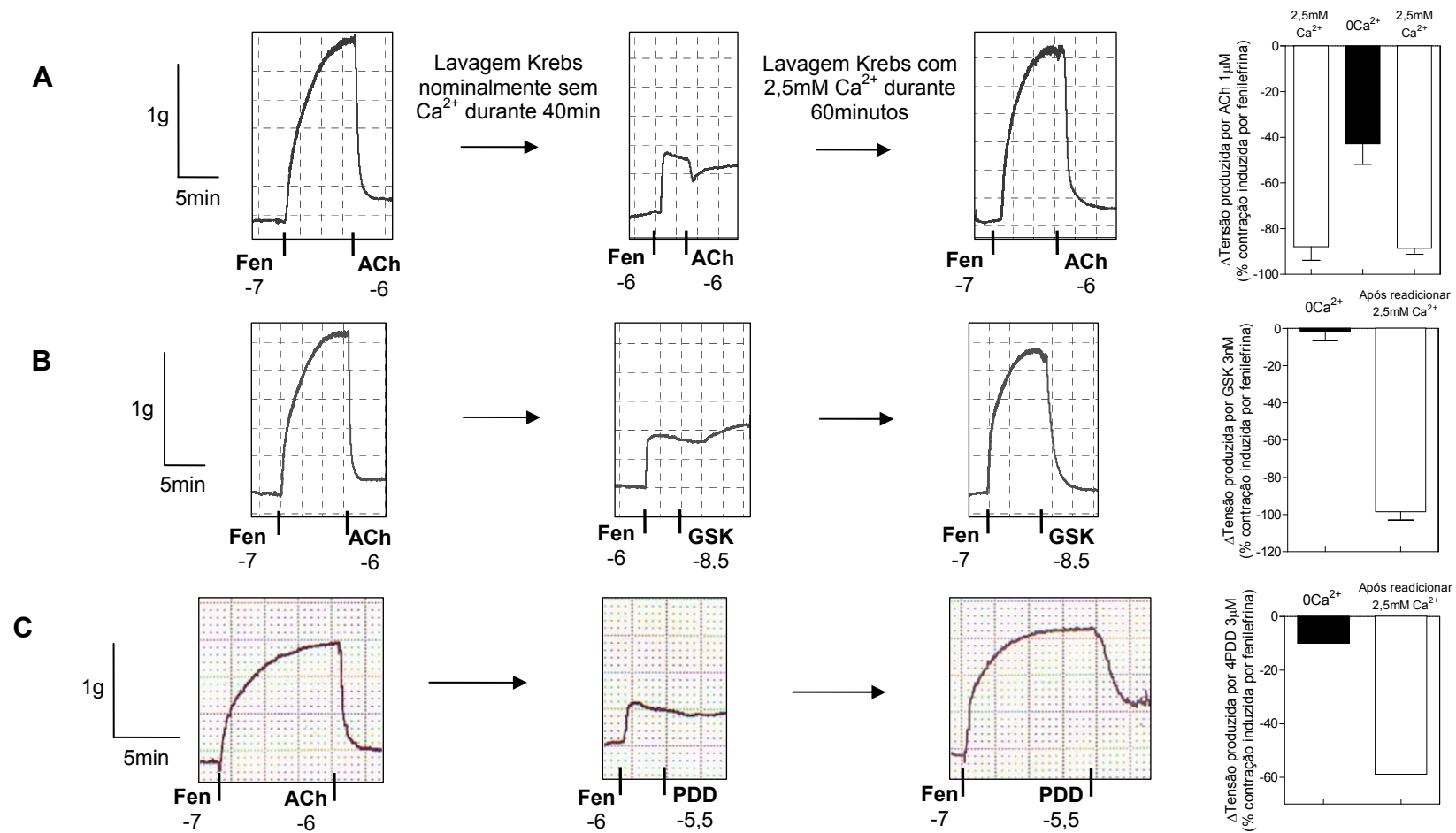


Figura 10 – Registros representativos da força de contração desenvolvida por anéis com endotélio da aorta torácica de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen) para a adição de acetilcolina (ACh, em **A**), GSK1016790A (GSK, em **B**) e 4 α PDD (PDD, em **C**) na ausência e após a readição de 2,5mM de Ca^{2+} na solução de Krebs. Ao lado de cada registro, a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 4 (em **A**), de 5 (**B**) e de 2 (em **C**) experimentos semelhantes.

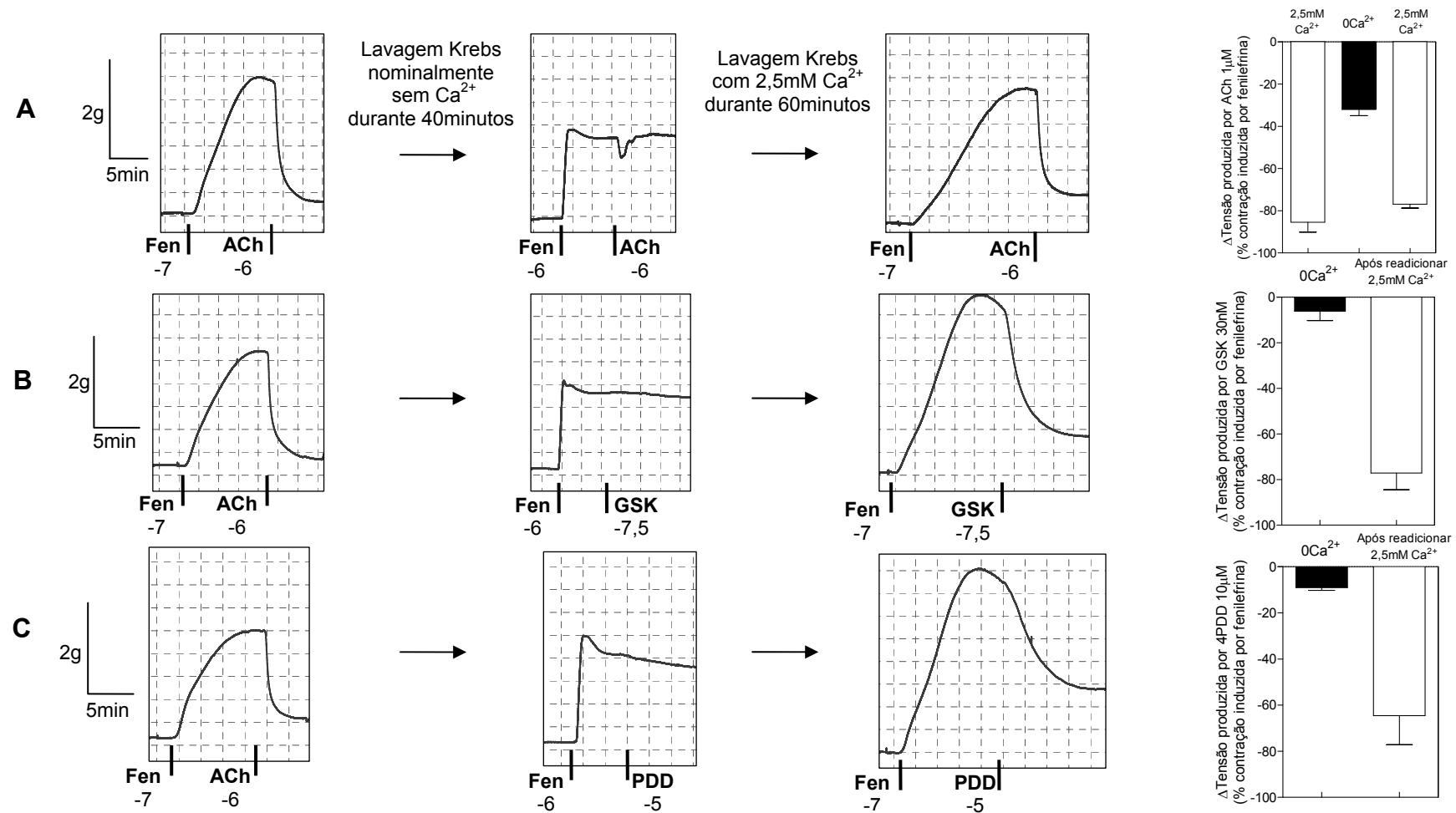


Figura 11 - Registros representativos da força de contração desenvolvida por anéis com endotélio da aorta torácica de coelho pré-contraídos com fenilefrina (Fen) para a adição de acetilcolina (ACh, em **A**), GSK1016790A (GSK, em **B**) e 4 α PDD (PDD, em **C**) na ausência e após a readição de 2,5mM de Ca^{2+} na solução de Krebs. Ao lado de cada registro, a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 4 (em **A** e em **C**) e de 5 (em **B**) experimentos semelhantes.

3.4 - Efeitos da hidroxocobalamina (vitamina B12a), da L-NNA e do ODQ nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD.

Como na aorta torácica de rato, o principal fator relaxante formado e liberado pelas células endoteliais é o NO, e seus efeitos são atribuídos principalmente à ativação da ciclase de guanilato, decidimos então testar o efeito de inibidores da via L-arginina/ NO/ GMPc nos relaxamentos endotélio dependentes produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD.

Uma substância que pode reagir quimicamente com o NO e impedir que produza seus efeitos, atuando assim como um *scavenger*, é a vitamina B12 (Jenkinson et al., 1995; Rochelle et al., 1995; Brouwer et al., 1996; Jiang et al., 1997; Sharma et al., 2003; Broderick et al., 2005). Determinamos então o seu efeito nos relaxamentos dependentes de endotélio.

Observamos que a vitamina B12 reverteu completamente os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (na aorta torácica de rato, de coelho e de cobaia e na aorta abdominal de coelho) ou pelo 4 α PDD (na aorta torácica de rato e de coelho). Os registros representativos desses experimentos são mostrados na Figura 12. A reversão iniciou em 1-2 minutos após a adição de vitamina B12 à cuba e atingiu um platô em menos de 10 minutos. Na aorta abdominal de coelho, entretanto, a reversão foi mais lenta, levando aproximadamente 2-3 minutos para iniciar e mais de 10 minutos para atingir um platô; vitamina B12 também reverteu os relaxamentos produzidos pela acetilcolina (na aorta torácica de rato e de coelho, Figura 12) e aqueles produzidos pelo nitroprussiato de sódio, mas não reverteu os relaxamentos independentes de endotélio produzidos pelo c e pelo 8-Bromo-GMPc na aorta torácica de rato (Figura 13).

Determinamos também os efeitos da N^G-nitro-L-Arginina (L-NNA) e do ODQ, inibidores das sintases de NO e da ciclase de guanilato, respectivamente. Semelhantes à vitamina B12, L-NNA e ODQ reverteram os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A na aorta torácica de rato, porém, a L-NNA não reverteu os relaxamentos independentes de endotélio produzidos pelo nitroprussiato de sódio (Figura 14) e o ODQ não reverteu os relaxamentos produzidos pelo 8-Bromo-GMPc. Adicionalmente, observamos que os relaxamentos produzidos pelo nitroprussiato de sódio e pelo BAY 41-2272 foram revertidos pelo ODQ (Figura 15).

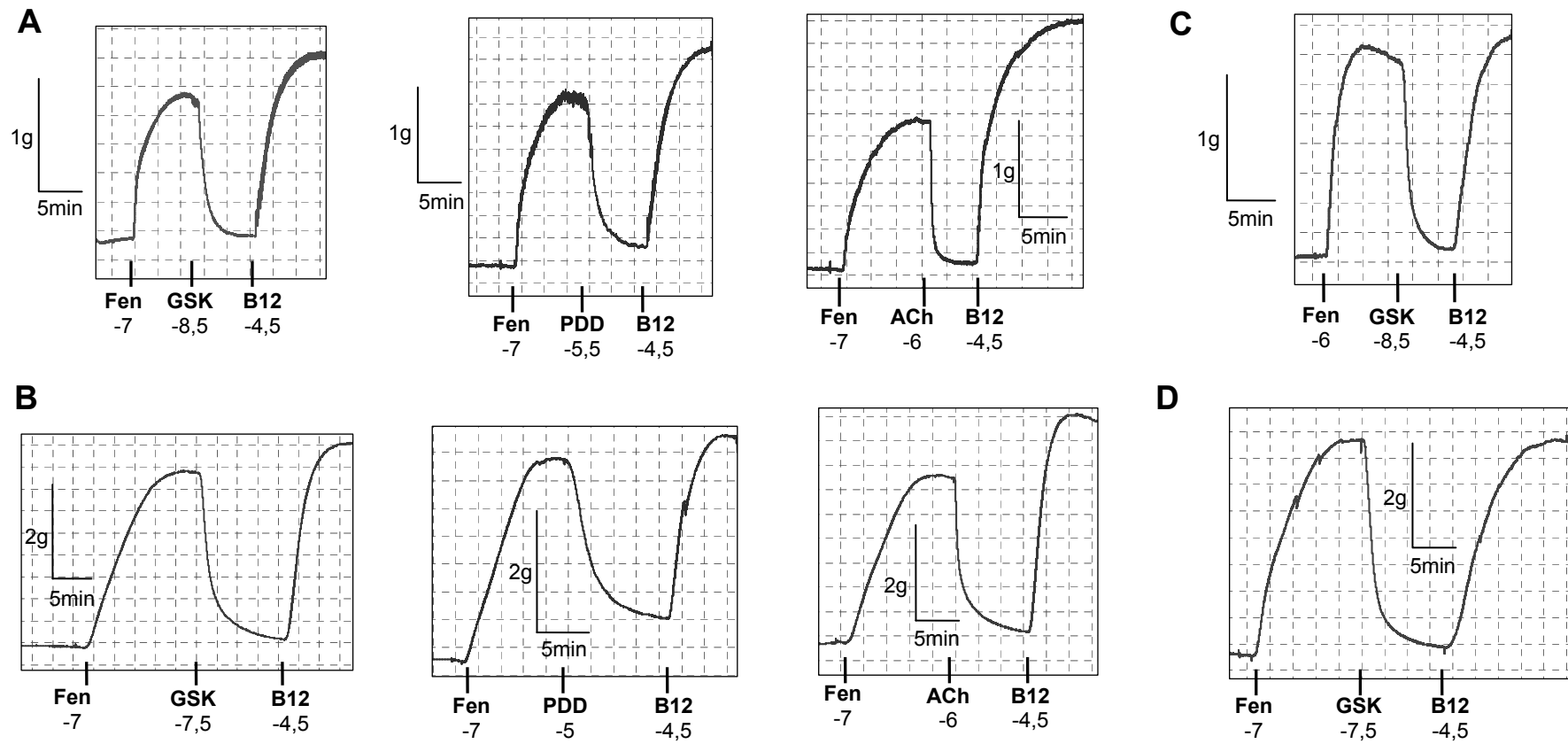


Figura 12 – Registros representativos do efeito da vitamina B12 (B12) nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (GSK; A, n=10; B, n=6; C, n=4; D, n=5), pelo 4αPDD (PDD; em B, n=5; em C, n=4) e pela acetilcolina (ACh; A, n=30; B, n=20) em anéis da aorta torácica descendente de rato (A), de coelho (B) e de cobaia (C) e na aorta abdominal de coelho (D) pré-contraídos com fenilefrina (Fen).

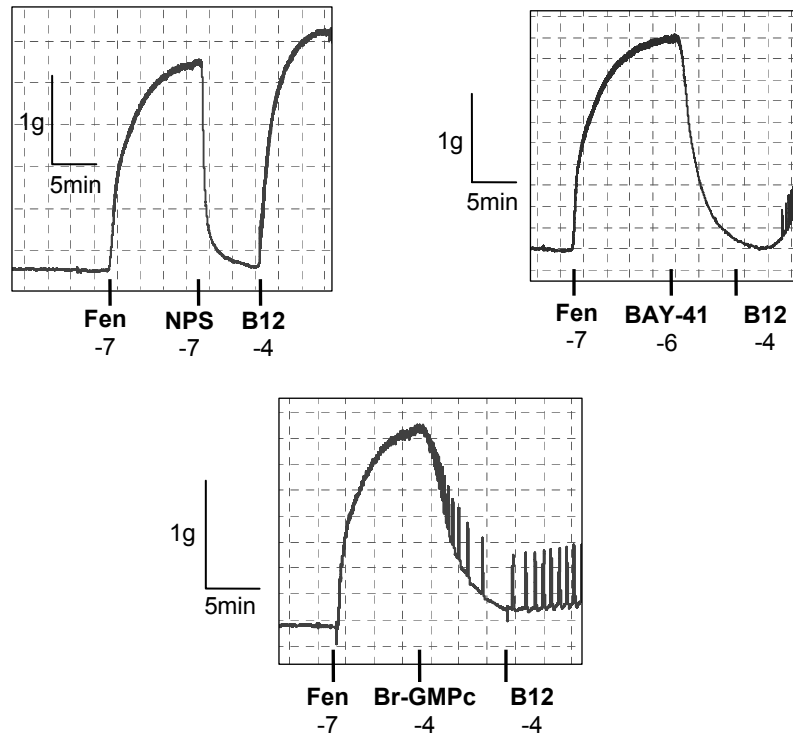


Figura 13 – Registros representativos do efeito do vitamina B12 (B12) nos relaxamentos produzidos pelo nitroprussiato de sódio (NPS, n=8), pelo BAY 41-2272 (BAY-41, n=4) e pelo 8-Br-GMPc (Br-GMP, n=4) em anéis com endotélio da aorta torácica descendente de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen).

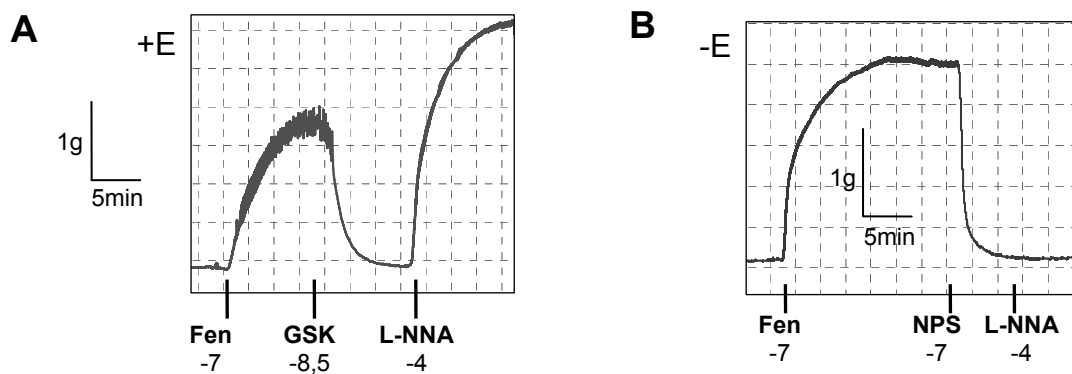


Figura 14 – Registros representativos do efeito da L-NNA nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (GSK, n=5) e pelo nitroprussiato de sódio (NPS, n=4) em anéis da aorta torácica descendente de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen). Em **A**=anel com endotélio (+E). Em **B**=anel sem endotélio (-E).

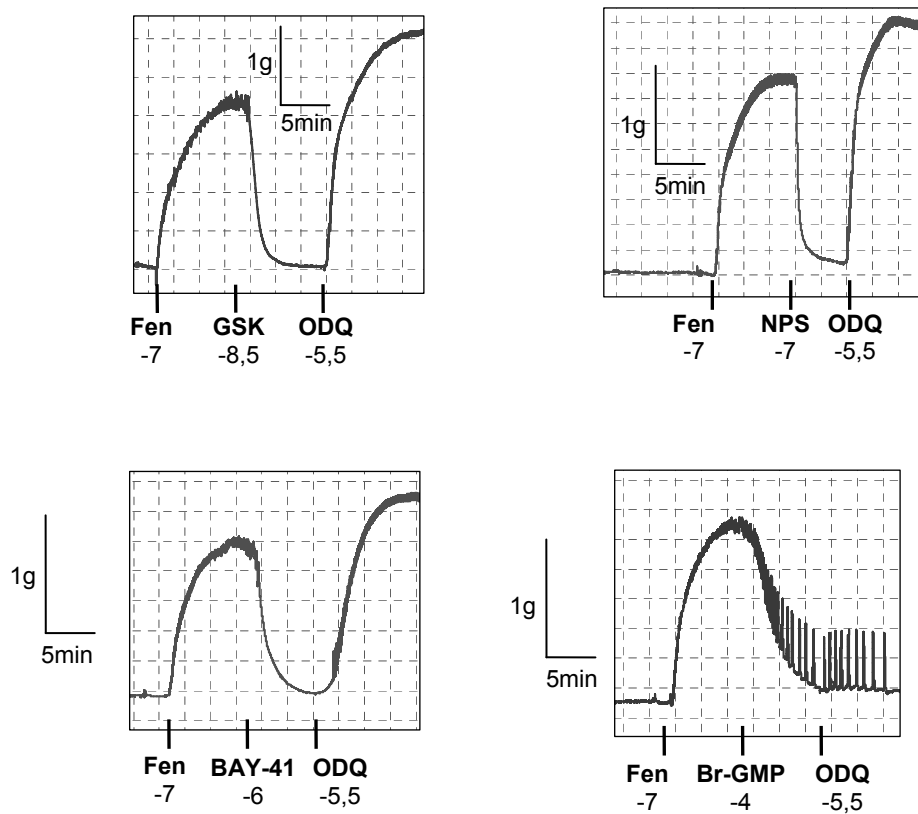


Figura 15 – Registros representativos do efeito do ODQ nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (GSK, n=6), pelo nitroprussiato de sódio (NPS, n=3), pelo BAY 41-2272 (BAY-41, n=5) e pelo 8-Br-GMPc (Br-GMP, n=5) em anéis com endotélio da aorta torácica descendente de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen).

3.5 – Efeitos do vermelho de rutênio e do HC-067047 nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD.

Para determinar os efeitos do vermelho de rutênio e do HC-067047 sobre os efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD, ambas as drogas também foram adicionadas no platô dos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A ou pelo 4 α PDD.

A adição de vermelho de rutênio, na concentração de 1 μ M, reverteu os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD na aorta torácica de ratos (Figura 16). A reversão foi completa (retornando ao valor inicial da pré-contracção) e caracterizada por ocorrer em 5-6 minutos, porém, em algumas preparações a reversão ocorreu totalmente em 3 minutos. Em alguns anéis a reversão caracterizou por um pico inicial rápido seguido de uma fase lenta que durou cerca de 6-8 minutos.

Vermelho de rutênio (1 μ M) também reverteu os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A nas artérias isoladas de coelho (Figura 17).

Em relação aos efeitos do HC-067047, primeiramente determinamos se esse composto possui algum efeito no músculo liso. Em um anel sem endotélio (ausência de resposta à acetilcolina), observamos que o HC-067047 nas concentrações de 1-3 μ M não afetou a magnitude da contracção produzida pela fenilefrina, porém, na concentração de 10 μ M, o HC-067047 causou uma pequena redução da mesma (Figura 18). Portanto, testamos concentrações de HC-067047 inferiores a 10 μ M sobre os relaxamentos dependentes de endotélio.

HC-067047, na concentração de 3 μ M, também reverteu completamente os relaxamentos produzidos tanto pelo GSK1016790A como pelo 4 α PDD (Figura 18) na aorta torácica de rato. Em algumas preparações, a reversão produzida pelo HC-067047 desenvolveu-se lentamente, levando cerca de 10 minutos. Nesses anéis a reversão também se caracterizou pelo aparecimento de um pico inicial rápido seguido de uma fase mais lenta. HC-067047 também reverteu as respostas do GSK1016790A na aorta de cobaia (Figura 18).

Na aorta torácica de rato, a pré-incubação de HC-067047 (1-3 μ M, por 5 minutos) aboliu o efeito do GSK1016790A; na aorta torácica de cobaia, os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A também foram bloqueados com a pré-incubação do HC-067047.

Em relação ao 4 α PDD, observamos que em 03 anéis com endotélio, nos quais produziu relaxamentos com menor magnitude, o seu efeito não foi revertido nem pelo vermelho de rutênio e nem pelo HC-067047.

Observamos ainda que nas preparações em que os relaxamentos do GSK1016790A ou do 4 α PDD foram revertidos com vermelho de rutênio (1 μ M) ou com HC-067047 (3 μ M), mesmo após um período de lavagem de 60 minutos, uma nova adição de GSK1016790A não produziu relaxamentos, no entanto, nessas mesmas condições, o 4 α PDD ainda foi capaz de produzir relaxamentos.

3.6 – Efeitos do vermelho de rutênio e do HC-067047 nos relaxamentos dependentes de endotélio produzidos pela acetilcolina, histamina, tapsigargina e pelo A23187.

Para investigar se o TRPV4 participa dos relaxamentos dependentes de endotélio que são produzidos via ativação de receptores de membrana, resolvemos determinar o efeito do vermelho de rutênio e do HC-067047 nos relaxamentos produzidos pela acetilcolina e pela histamina. E para determinar se o HC-067047 bloqueia de maneira não específica o influxo de cálcio na célula endotelial, esse composto foi adicionado no platô dos relaxamentos produzidos pela tapsigargina e pelo A23187.

Nem vermelho de rutênio (na concentração de 1 μ M) e nem HC-067047 (na concentração de 1-5 μ M) revertem os relaxamentos produzidos pela acetilcolina na aorta torácica de rato (figuras 16 e 19, respectivamente). Vermelho de rutênio também não reverteu o relaxamento produzido pela acetilcolina na aorta de coelho (Figura 17). Além disso, após revertermos os relaxamentos do GSK1016790A ou do 4 α PDD com vermelho de rutênio ou com o HC-067047 e adicionarmos acetilcolina no platô da reversão, ainda observamos relaxamentos de igual magnitude aos observados na ausência dessas drogas (Figura 17 e Figura 19). E nesse mesmo experimento, mesmo na presença de HC-067047, a adição de histamina produziu relaxamentos de magnitudes semelhantes aos da acetilcolina e ao do GSK1016790A.

Os relaxamentos produzidos pela acetilcolina na aorta torácica de rato e de coelho foram completamente revertidos com a adição de atropina (30-100 nM),

porém nessas concentrações, atropina não reverteu os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A na aorta torácica de rato (Figura 20). Nesse mesmo experimento, após adicionarmos atropina no platô do relaxamento produzido pelo GSK1016790A e observarmos que não ocorreu reversão, adicionamos o HC-067047, e observamos que este composto reverteu completamente o relaxamento produzido pela adição daquele mesmo na presença da atropina.

A adição do HC-067047 (3 μ M) também não reverteu os relaxamentos endotélio dependentes produzidos pela taspigargina (30 nM) e pelo A23187 (100 nM) na aorta torácica de rato (Figura 19).

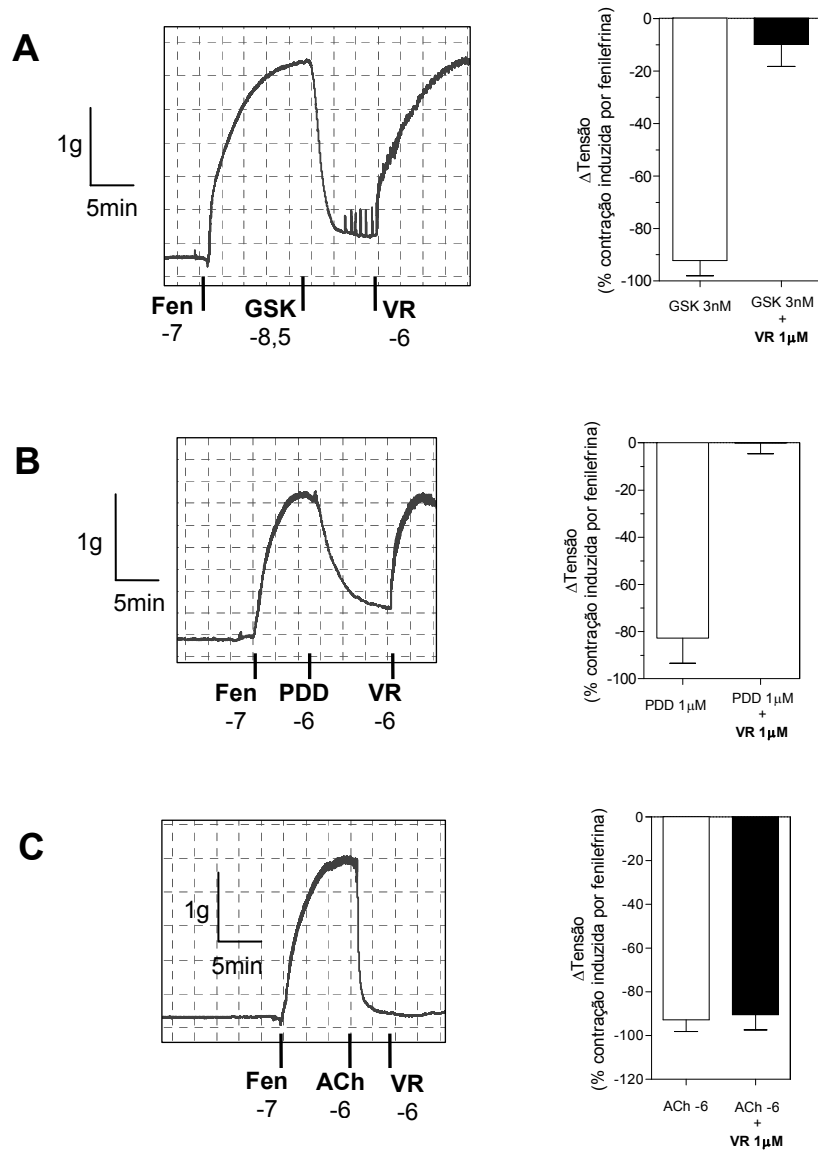


Figura 16 – Registros representativos do efeito do vermelho de rutênio (VR) nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (GSK, em **A**), pelo 4 α PDD (PDD, em **B**) e pela acetilcolina (ACh, em **C**) em anéis da aorta torácica descendente de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen). Ao lado de cada registro se encontra a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 11 (em **A**), de 5 (em **B**) e de 4 (em **C**) experimentos semelhantes.

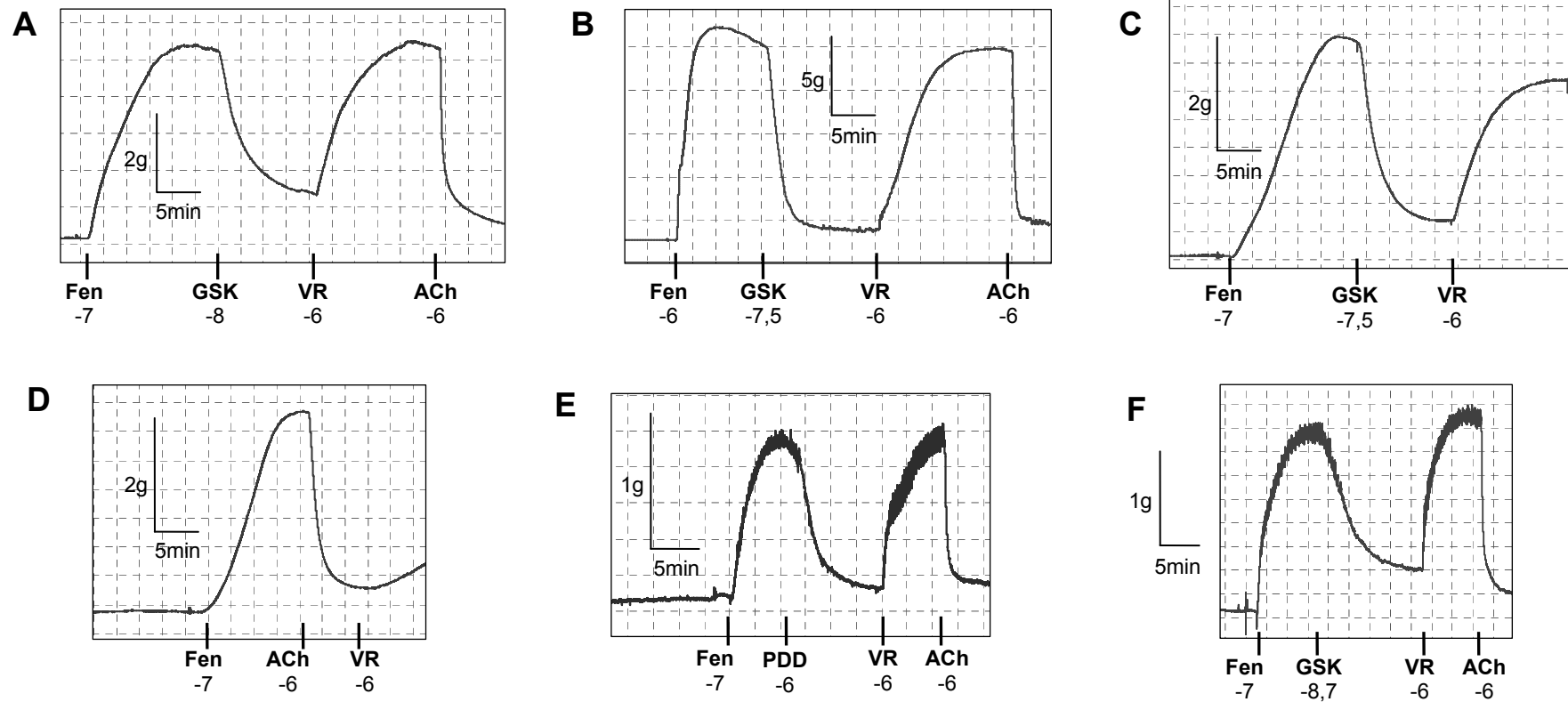


Figura 17 – Registros representativos do efeito do vermelho de rutênio (VR) nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (GSK), pela acetilcolina (ACh) e pelo 4 α PDD (PDD) em anéis de artérias pré-contraídos com fenilefrina (Fen). Em **A**: aorta abdominal de coelho (n=3); **B**: artéria femoral de coelho (n=3); **C** (n=5) e **D** (n=4): aorta torácica de coelho; **E** (n=3) e **F** (n=4): aorta torácica de rato.

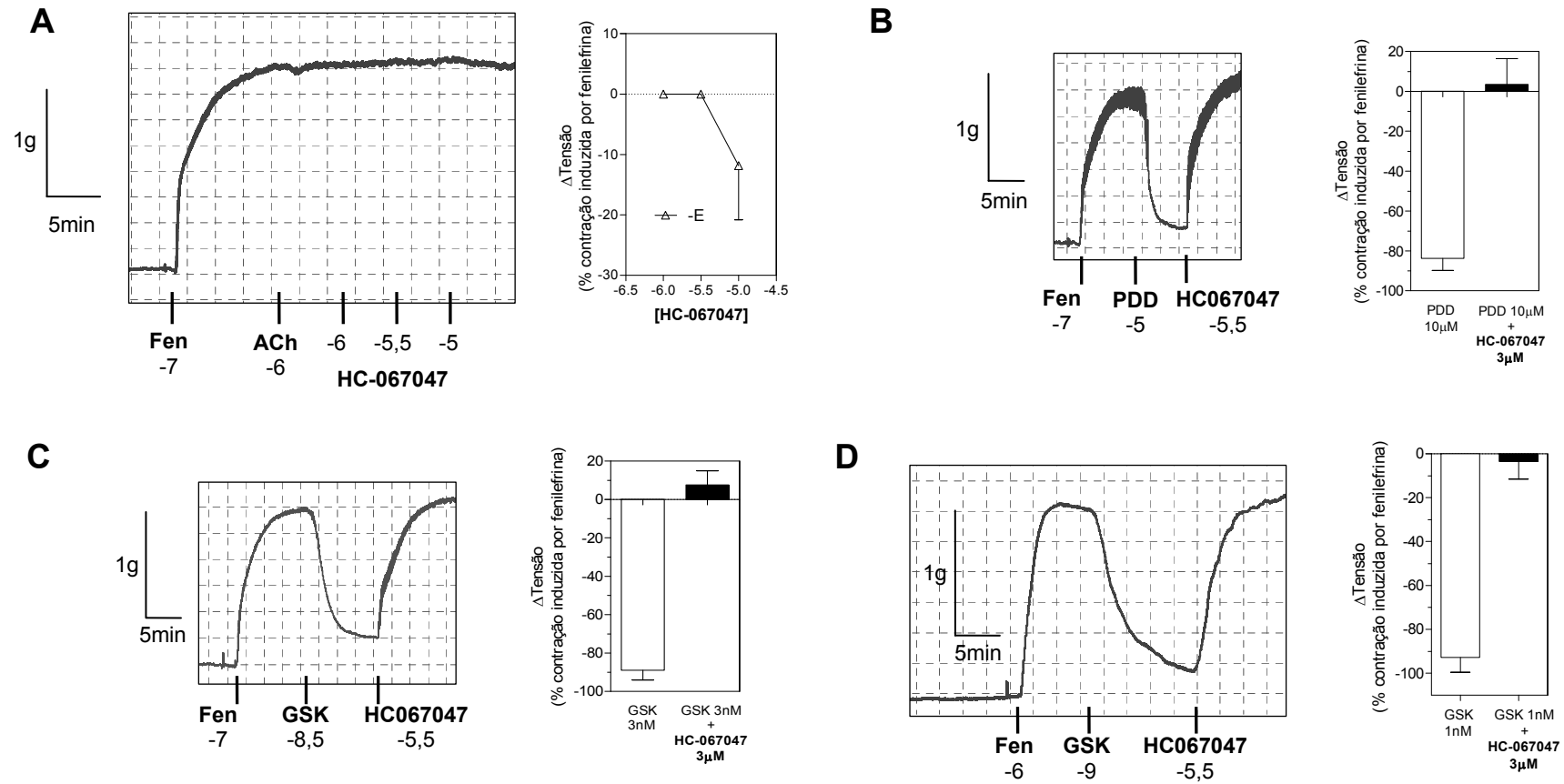


Figura 18 – Registros representativos do efeito do HC-067047 na contração produzida pela fenilefrina em anéis sem endotélio da aorta torácica de rato (em **A**) e nos relaxamentos produzidos pelo 4 α PDD (PDD, em **B**) e pelo GSK1016790A (GSK, em **C**) em anéis da aorta torácica de rato. Em **D**: registro representativo do efeito do HC-067047 nos relaxamentos produzidos pelo GSK em anéis da aorta torácica de cobaia pré-contraídos com fenilefrina (Fen). Ao lado de cada registro se encontra a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 4 (em **A**), de 5 (em **B** e em **D**) e de 11 (em **C**) experimentos semelhantes.

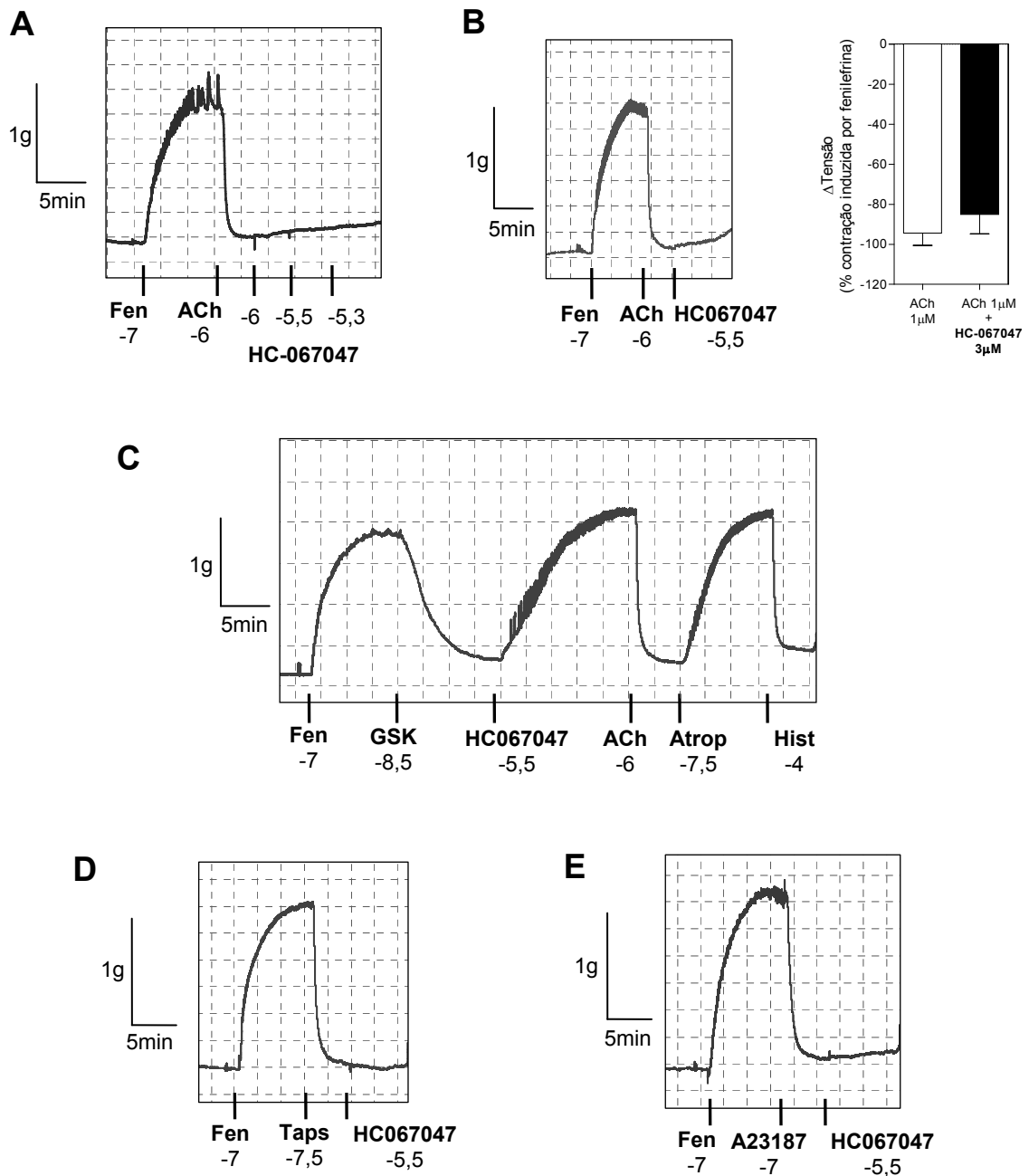


Figura 19 – Registros representativos do efeito do HC-067047 nos relaxamentos dependentes de endotélio produzidos em anéis da aorta torácica de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen). Em **A** e **B**: efeito do HC-067047 nos relaxamentos produzidos pela acetilcolina (ACh). Em **B**: à direita do registro, a representação gráfica com valores de média \pm desvio padrão de 4 experimentos semelhantes. Em **C**, na presença do HC-067047, foram adicionados acetilcolina (ACh), atropina (Atrop) e histamina (Hist). Em **D** e **E**: HC-067047 foi adicionado no platô dos relaxamentos produzidos pela tapsigargina (Taps, n=2) e pelo A23187 (n=2), respectivamente.

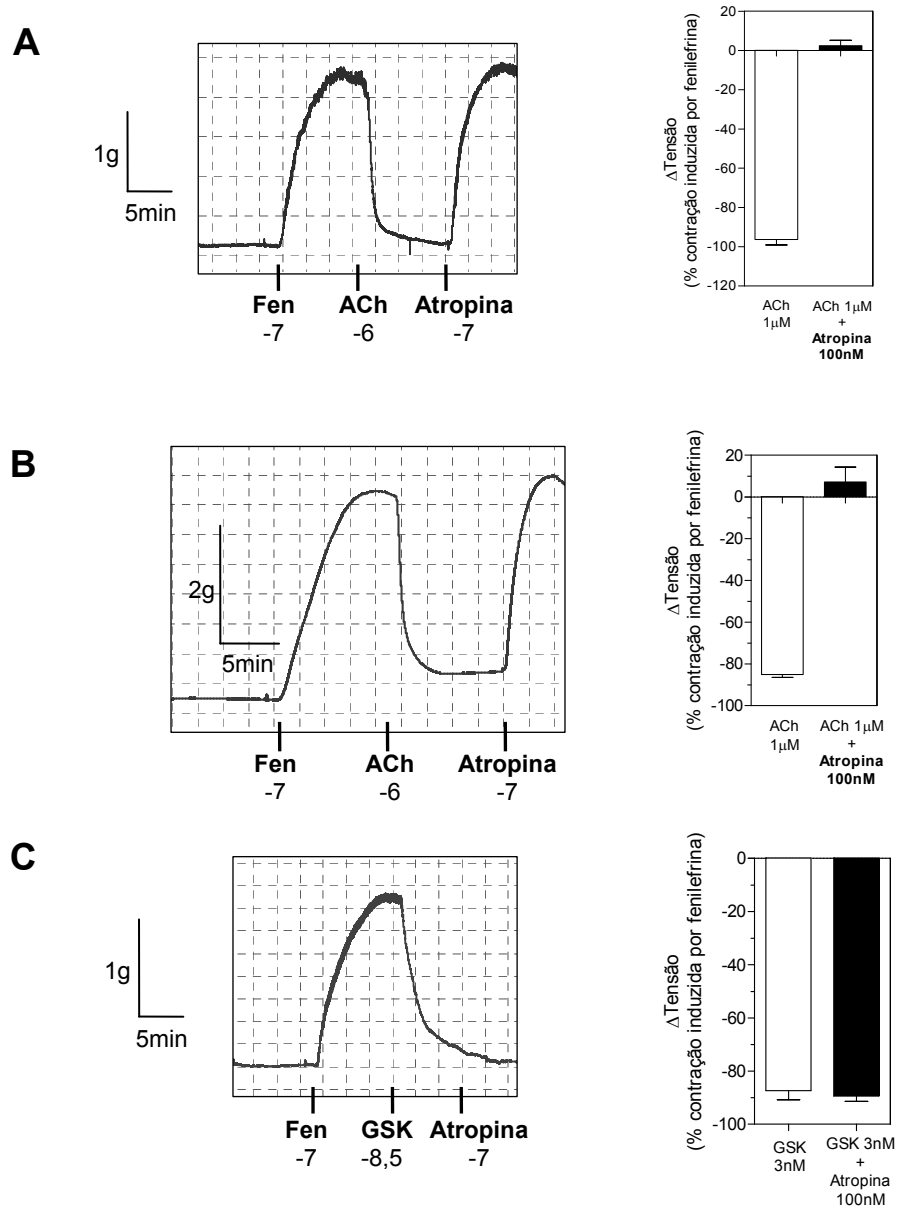


Figura 20 – Registros representativos do efeito da atropina nos relaxamentos produzidos pela acetilcolina (ACh) em anéis da aorta torácica descendente de rato (em **A**) e de coelho (em **B**) e nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A (GSK, em **C**) na aorta torácica de rato. Todas as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (Fen). Ao lado de cada registro se encontra a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 6 (em **A**) e de 3 (em **B** e em **C**) experimentos semelhantes.

3.7 – Efeitos do PYR3 nos relaxamentos produzidos pela acetilcolina e pelo GSK1016790A.

Freichel et al. (2001) observaram que os relaxamentos endotélio dependentes produzidos pela acetilcolina estavam reduzidos em preparações isoladas da aorta torácica de camundongos TRPC4-KO, e que em células endoteliais isoladas desses camundongos, o aumento de cálcio produzido pelo ATP também estava diminuído; e recentemente, dois estudos têm sugerido a participação de canais do tipo TRPC no aumento de cálcio produzido pela taspigargina em células endoteliais em cultura (Antigny et al., 2011; Ma et al., 2011). Todos esses estudos sugerem então uma possível participação de canais do tipo TRPC no aumento da concentração intracelular de cálcio na célula endotelial.

Kiyonaka et al. (2009) descreveram que um composto derivado do trifluoro-pirazol – o PYR3 – bloqueia seletivamente canais TRPC3. Decidimos determinar o efeito do PYR3 nos relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A, para investigar se canais da subfamília TRPC podem participar dos efeitos do GSK1016790A, e para uma comparação, também determinamos o efeito do PYR3 nos relaxamentos endotélio dependentes produzidos pela acetilcolina.

Observamos que a adição do PYR3 (0,3-1 μ M) reverteu completamente os relaxamentos produzidos pela acetilcolina. A reversão teve início em 1-2 minutos e atingiu o platô – que foi um pouco acima do nível da pré-contracção produzida pela fenilefrina – em 6-8 minutos (Figura 21), entretanto, a adição do PYR3 (1 μ M) não reverteu o relaxamento produzido pelo GSK1016790A; e mesmo na presença do PYR3, o HC-067047 continuou revertendo os efeitos do GSK1016790A.

3.8 – Efeitos da capsaicina em anéis da aorta torácica e em tiras de bexiga isoladas de rato.

Como Willette et al. (2008) descreveram que o GSK1016790A também pode ativar canais TRPV1, realizamos alguns experimentos com o objetivo de determinar se a ativação do TRPV1 poderia produzir relaxamentos dependentes de endotélio, e assim contribuir para os efeitos que observamos com o GSK1016790A. Para isso, determinamos o efeito da capsaicina na aorta torácica de rato.

A capsaicina (1-3 μM) não produziu relaxamentos em anéis com endotélio (relaxamento para acetilcolina >80%) da aorta torácica de rato (Figura 22), porém, nesses mesmos anéis, a posterior adição de GSK101790A ainda produziu relaxamentos que foram revertidos pelo HC-067047. E mesmo na presença da capsaicina e do HC-067047, acetilcolina ainda foi capaz de produzir relaxamentos.

Embora não tenha produzido relaxamentos em anéis da aorta torácica de rato, em contrapartida, a adição de capsaicina (1-3 μM) produziu contrações em preparações de tiras isoladas da bexiga de rato; essas contrações se assemelharam em magnitude à das contrações produzidas pela adição de acetilcolina nas mesmas preparações (Figura 22).

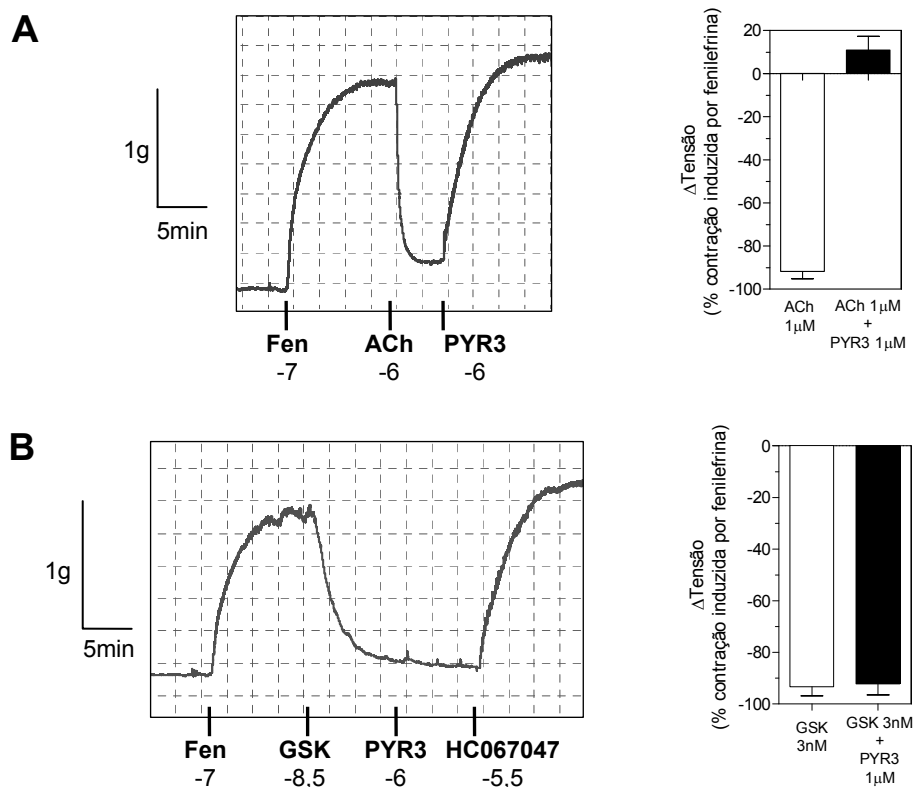


Figura 21 – Registros representativos do efeito do PYR3 nos relaxamentos produzidos pela acetilcolina (ACh, em **A**) e pelo GSK1016790A (GSK, em **B**) em anéis da aorta torácica descendente de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen). Ao lado de cada registro se encontra a representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 4 experimentos semelhantes.

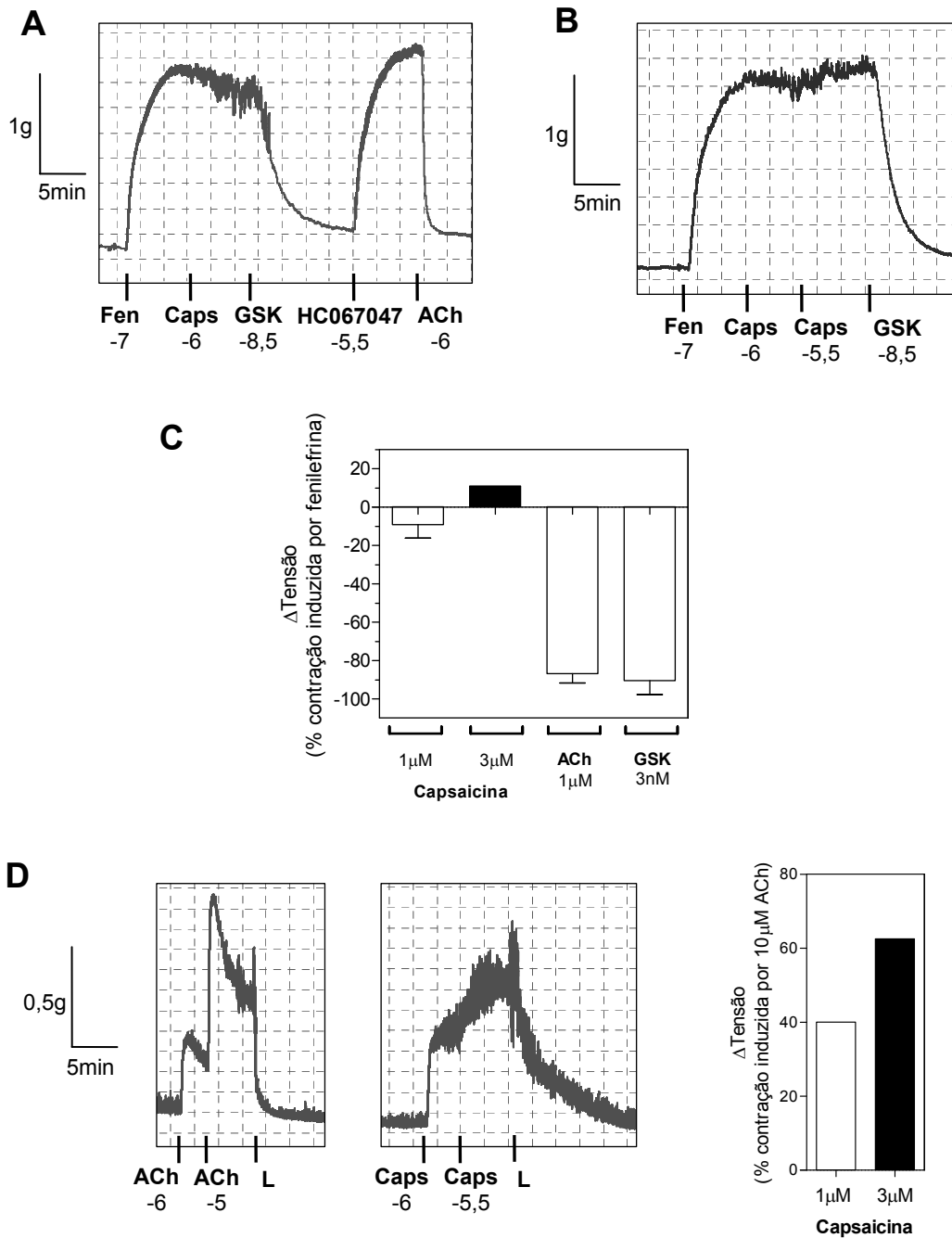


Figura 22 – Registros representativos do efeito da capsaicina (Caps) em anéis com endotélio da aorta torácica de rato (em **A** e em **B**) pré-contraídos com fenilefrina (Fen) e em tiras da bexiga de rato (em **D**). Em **C**: representação gráfica com os valores de média \pm desvio padrão de 5 (capsaicina 1 μ M, acetilcolina, GSK1016790A) e 2 (capsaicina 3 μ M) experimentos semelhantes. Em **D**: à direita dos registros, representação gráfica com valores de média \pm desvio padrão de 2 experimentos semelhantes. ACh=acetilcolina; GSK=GSK1016790A; L=lavagem.

3.9 – Experimentos feitos com a adição na mesma preparação de substâncias com diferentes mecanismos para produzir relaxamentos.

O GSK1016790A produziu relaxamentos dependentes de endotélio que foram revertidos pelo HC-067047. Esse bloqueador de canais TRPV4 não afetou as respostas produzidas por outros agonistas que produzem relaxamento dependente de endotélio. Esses resultados nos permitem afirmar que o mecanismo pelo qual o GSK1016790A produz seus efeitos na aorta torácica de rato parece ser diferente daqueles envolvidos nos efeitos produzidos pelos estímulos clássicos (acetilcolina, histamina, tapsigargina). Dessa maneira, concebemos um experimento no qual estimulamos a produção de relaxamentos dependentes de endotélio no mesmo anel de aorta pré-contraído com fenilefrina com diferentes agonistas. Além disso, cada relaxamento foi revertido com um antagonista dos seus receptores, ou com inibidores da síntese do NO (principal EDRF nessa preparação). Ao final dos experimentos, adicionamos substâncias que produzem relaxamentos independentes de endotélio.

Na Figura 23 são mostrados os registros representativos da tensão desenvolvida em anéis com endotélio da aorta torácica de rato em que realizamos tais experimentos.

HC-067047 reverteu os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A, mas não afetou os relaxamentos produzidos pela acetilcolina, histamina, tapsigargina, nitroprussiato de sódio, pelo Bay 41-2272 e pelo 8-Br-GMPc; na sequência, atropina (30 nM) reverteu os relaxamentos produzidos pela acetilcolina, mas não bloqueou os efeitos da histamina ou da tapsigargina; os efeitos da histamina foram revertidos (mas não completamente) pela difenidramina, e nenhuma dessas drogas afetou os relaxamentos produzidos pela tapsigargina.

Para reverter os relaxamentos da tapsigargina foi utilizada L-NNA, que reverte todos os relaxamentos dependentes de endotélio das drogas precedentes, mas não bloqueia os efeitos do nitroprussiato de sódio, do Bay 41-2272 e pelo 8-Br-GMPc, que são independentes de endotélio.

As respostas do nitroprussiato de sódio foram inibidas com a adição da vitamina B12, que também reverteu todos os outros relaxamentos dependentes de endotélio, mas não afetou os relaxamentos do Bay 41-2272 ou do 8-Br-GMPc.

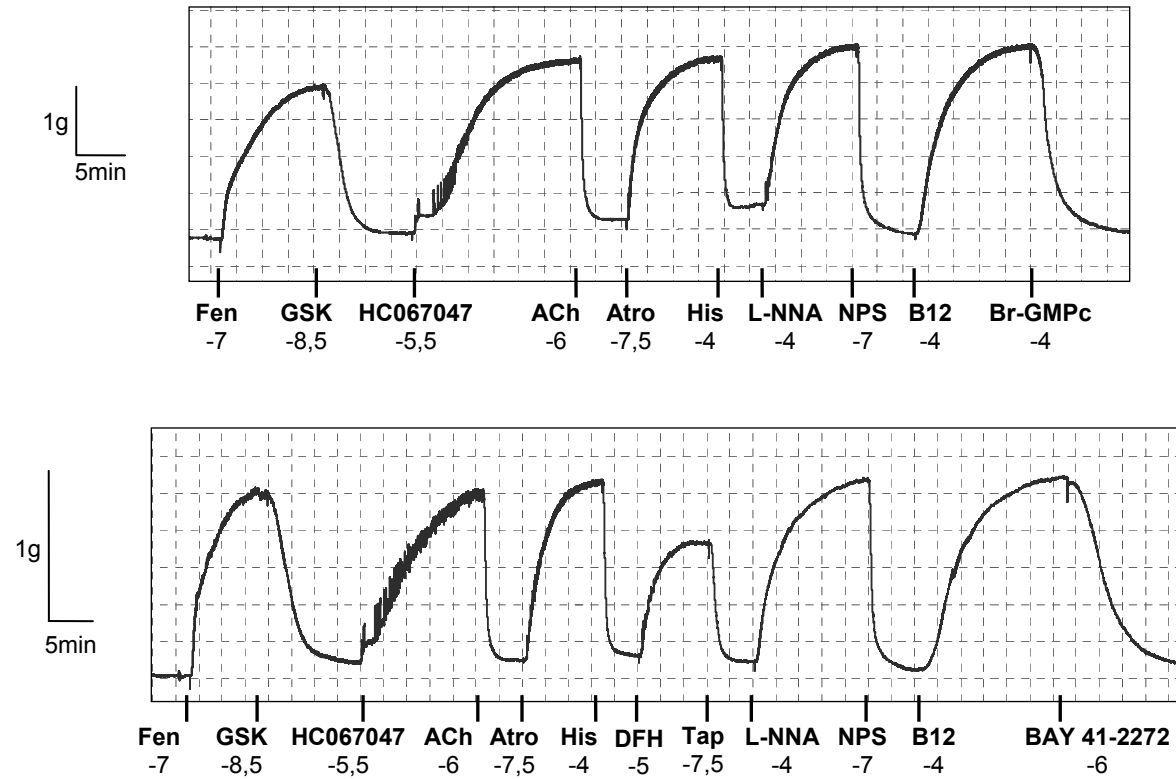


Figura 23 – Registros representativos da tensão desenvolvida durante a contração isométrica em anéis com endotélio da aorta torácica descendente de rato pré-contraídos com fenilefrina (Fen), obtidos com a adição consecutiva de substâncias com diferentes mecanismos para produzir relaxamentos. Os registros acima são representativos de 07 experimentos semelhantes. GSK=GSK1016790A; ACh=acetilcolina; Atro=atropina; His=histamina; DFH=difenidramina; Tap=tapsigargina; NPS=nitroprussiato de sódio; B12=vitamina B12.

4 – DISCUSSÃO

Na presente dissertação são apresentados os resultados de experimentos realizados na tentativa de responder as seguintes perguntas: qual o efeito do GSK1016790A e do 4 α PDD na aorta torácica de rato? O GSK1016790A produziria efeitos em outras artérias de rato, ou de outras espécies? Caso essas drogas produzam relaxamentos, seriam esses dependentes do endotélio? Seriam esses relaxamentos dependentes da presença de cálcio extracelular? Poderiam os efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD ser atribuídos à ativação de canais TRPV4? Quais seriam os efeitos de bloqueadores de canais TRPV4 nos relaxamentos endotélio dependentes produzidos pela acetilcolina e por outros agonistas?

O fato de termos observado, empregando um anticorpo anti-TRPV4, bandas imunorreativas no extrato de proteínas totais da aorta, associado à observação de imunoreatividade positiva na camada endotelial, mediante técnica de imunohistoquímica com o mesmo anticorpo, indica que a proteína codificada pelo gene *TRPV4* é expressa no endotélio da aorta torácica de rato.

Observamos que GSK1016790A e 4 α PDD produziram relaxamentos em anéis isolados da aorta torácica de rato, assim como em artérias isoladas de coelho, de camundongo e de cobaia, o que mostra que os efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD não estão restritos a um tipo de vaso ou mesmo a uma espécie animal.

Também observamos que os efeitos do GSK1016790A e do 4 α PDD foram reversíveis e puderam, após a lavagem durante 1 h a intervalos de 20 minutos, ser repetidos na mesma preparação sem alteração na magnitude. Portanto, seus efeitos são reversíveis e não ocorre taquifilaxia ou dessensibilização, com exceção do efeito do GSK1016790A (30 nM) na aorta torácica de coelho, onde observamos uma redução na magnitude.

O fato desses relaxamentos serem estritamente dependentes de endotélio junto com os resultados observados na artéria do músculo gracilis de rato (Kohler et al., 2006), na artéria carótida de rato e de camundongo (Kohler et al., 2006; Hartmannsgruber et al., 2007; Loot et al., 2008), em ramos da artéria

mesentérica de camundongo (Earley et al., 2009; Zhang et al., 2009; Mendoza et al., 2010, Sonkusare et al., 2012), e em arteríolas isoladas da coronária de humanos (Bulboz, 2011) pode indicar que o GSK1016790A e o 4 α PDD possuem a capacidade de estimular as células endoteliais de todas as artérias estudadas a produzirem fatores relaxantes do músculo liso vascular.

Embora não fosse o objetivo fundamental desse estudo, caracterizamos farmacologicamente que substância poderia ser a mediadora desses relaxamentos na aorta torácica de rato. Inicialmente, descartamos a participação de derivados das ciclo-oxigenases, porque todos os nossos experimentos foram feitos na presença de diclofenaco. O fato de L-NNA, vitamina B12 e ODQ bloquearem esses relaxamentos, além de serem consistentes com a informação de que o NO é o principal EDRF na aorta de rato, indica que GSK1016790A e 4 α PDD podem estimular a produção do mesmo pelas células endoteliais.

A respeito dos efeitos da vitamina B12, observamos que essa droga reverte os relaxamentos dependentes de endotélio e aqueles produzidos pelo nitroprussiato de sódio, mas não bloqueia os relaxamentos resultantes de uma ativação direta da ciclase de guanilato (pelo BAY 41-2272) ou pelo 8-Br-GMP cíclico. A vitamina B12, para reverter os relaxamentos dependentes de endotélio bem como aqueles produzidos pelo nitroprussiato ou outros 'doadores' de NO, pode estar agindo como um *scavenger* de NO (Brouwer et al., 1996).

GSK1016790A e 4 α PDD também são capazes de produzir relaxamentos resistentes à presença de inibidores das ciclo-oxigenases e das sintases de NO na artéria do músculo gracilis de rato e na artéria carótida de camundongo (Kohler et al., 2006; Loot et al., 2008) e em ramos da artéria mesentérica de camundongo (Mendoza et al., 2010; Sonkusare et al., 2012). Esses relaxamentos têm sido atribuídos à existência de um fator relaxante que produz hiperpolarização do músculo liso vascular, e que é denominado de EDHF. De uma maneira geral então, GSK1016790A e 4 α PDD ativam as células endoteliais a sintetizarem fatores relaxantes (NO ou EDHF).

Os relaxamentos do GSK1016790A e do 4 α PDD foram dependentes da presença de cálcio extracelular. Isso é consistente com a observação de que a produção de fatores relaxantes pelas células endoteliais requer cálcio extracelular, e a interpretação mais simples para a observação de que as respostas dessas duas drogas também necessitou da presença de cálcio extracelular é que elas devem

estar promovendo o influxo de cálcio nas células endoteliais, produzindo assim um aumento na concentração intracelular de cálcio.

Nesse sentido, experimentos documentaram um aumento de cálcio em resposta ao GSK1016790A ou ao 4 α PDD em células endoteliais da aorta torácica de camundongo e de rato (Watanabe et al., 2002; Kohler et al., 2006), de ramos da artéria mesentérica de camundongo e de rato (Zhang et al., 2009; Mendoza et al., 2010; Ma et al., 2011; Sonkusare et al., 2012) e da artéria coronária humana (Bulboz et al., 2011). Baseando-se nessas observações, sugerimos que GSK1016790A e 4 α PDD devem estar promovendo um aumento da concentração de cálcio intracelular nas células endoteliais das artérias estudadas.

Em nossos experimentos confirmamos as observações feitas por Singer e Peach (1982) de que, na ausência de cálcio extracelular, os relaxamentos produzidos pela acetilcolina tornam-se transitórios.

Outra observação que chamou a atenção foi o efeito da remoção do cálcio extracelular na cinética da contração produzida pela fenilefrina. As contrações atingiram o platô em 1-2 minutos. O traçado observado no registro mostra que a elevação da tensão provocada pela fenilefrina é praticamente uma perpendicular à linha de base, assemelhando-se a uma preparação de anel que teve o seu endotélio removido. O mais provável é que ao incubarmos as preparações em uma solução nominalmente sem cálcio retiramos a influência do endotélio sobre a contração do músculo liso, possivelmente inibindo a produção de fatores relaxantes. Esse fenômeno já havia sido descrito pela professor Furchgott em artérias isoladas de rato e de coelho, quem o denominou produção 'basal' de EDRF (Martin et al., 1986a, 1986b).

Vermelho de rutênio (1 μ M) e HC-067047 (1-3 μ M) reverteram os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD. O alvo em comum desses bloqueadores é o TRPV4, sugerindo que a reversão ocorre pela inibição do TRPV4.

Vermelho de rutênio também bloqueia as respostas produzidas pelo 4 α PDD na artéria carótida e na artéria do músculo gracilis de rato (Kohler et al., 2006) assim como aquelas produzidas pelo GSK1016790A na aorta torácica de rato (Willete et al., 2008) e em ramos da artéria mesentérica de camundongo (Mendoza et al., 2010). Porém, em alguns desses trabalhos o vermelho de rutênio foi utilizado

em concentrações maiores de 1 μ M, o que não necessariamente indica que o bloqueio das respostas se deve à inibição do TRPV4 .

O fato do HC-067047 reverter os relaxamentos dependentes de endotélio produzidos pelo GSK1016790A e pelo 4 α PDD em concentrações que não afetaram a contração do músculo liso da aorta pode indicar que o HC-067047 age sobre o endotélio para produzir o bloqueio (i.e. a reversão) que observamos. Essa sugestão é consistente com a observação de imunorreatividade positiva para o TRPV4 no endotélio da aorta torácica de rato.

O GSK1016790A, em concentrações acima de 30 nM, também produz aumento de cálcio em células HEK transfectadas com o gene *TRPV1*, sugerindo que esse composto também pode ativar canais do tipo TRPV1 nessas concentrações (Willete et al., 2008). Dessa forma, resolvemos investigar se a ativação de canais TRPV1 poderia contribuir para os efeitos relaxantes do GSK1016790A aqui descritos. O fato da capsaicina não produzir relaxamentos em preparações da aorta torácica de rato, mesmo com endotélio intacto (relaxamento para acetilcolina >80%), indica que não há TRPV1 nessa artéria e portanto permite afirmar que os efeitos relaxantes do GSK1016790A não podem ser atribuídos à ativação de canais TRPV1. A magnitude das respostas observadas em nossos experimentos é semelhante à daquelas observadas recentemente por Hopps et al. (2012); e nossa sugestão da ausência do TRPV1 na aorta torácica de rato é consistente com a descrição feita por Onozawa et al. (2000), que não observaram imunorreatividade para o TRPV1 nessa artéria. Considerando todos esses dados, o mais provável é que os relaxamentos do GSK1016790A sejam decorrentes da ativação de TRPV4.

Em relação ao 4 α PDD, é intrigante o fato de que em algumas preparações em que produziu relaxamentos de pouca magnitude, o seu efeito não foi revertido nem pelo vermelho de rutênio e nem pelo HC-067047; ainda, após os efeitos do GSK1016790A terem sido revertidos com vermelho de rutênio ou com o HC-067047, mesmo após 60 minutos (lavagem de 20 em 20 minutos) os relaxamentos do GSK1016790A ainda estavam bloqueados. Entretanto 60 minutos após os relaxamentos do 4 α PDD terem sido revertidos com o HC-067047, uma nova adição de 4 α PDD ainda produziu novos relaxamentos de magnitudes semelhantes.

Além disso, certas características dos efeitos do 4 α PDD e do GSK1016790A são diferentes: enquanto que com o GSK1016790A foi possível realizar curvas concentração-efeito com adição de concentrações isoladas ou de

maneira cumulativa e os efeitos sempre foram dependentes da concentração, com o 4 α PDD os relaxamentos não foram claramente dependentes da concentração e não foi possível observar relaxamentos com uma adição cumulativa.

Considerando todas essas observações, uma interpretação possível é que o 4 α PDD possua uma ação não relacionada com a ativação do TRPV4. Outra possibilidade é o acesso que o 4 α PDD possa ter aos canais TRPV4, o que poderia variar em diferentes anéis de um mesmo segmento de artéria, o que implicaria que GSK1016790A e 4 α PDD ativam TRPV4 por diferentes mecanismos. Por exemplo, GSK1016790A poderia ativar canais TRPV4 na membrana plasmática agindo do lado extracelular do canal, porém o 4 α PDD para ativar o TRPV4 precisaria entrar na célula, e os mecanismos para um transporte do 4 α PDD variariam de uma célula endotelial para outra. Considerando o conjunto de nossas observações, não é possível afirmar que o 4 α PDD produz relaxamentos dependentes de endotélio unicamente por ser um agonista de canais TRPV4, embora a maior parte dos seus efeitos descritos aqui podem ser atribuídos a sua ação ativadora desses canais.

Alternativamente, considerando que no *Western blot* foi observada imunorreatividade em bandas com diferentes pesos moleculares que podem indicar a existência de diferentes isoformas do TRPV4 presentes na aorta torácica de rato, o GSK1016790A pode ser capaz de ativar todas as isoformas de TRPV4, enquanto que o 4 α PDD pode ativar preferencialmente uma das isoformas de TRPV4.

Podemos afirmar então que a ativação de canais TRPV4 produz relaxamentos dependentes de endotélio, que no caso da aorta torácica das espécies estudadas envolve a produção de NO e a subsequente ativação da ciclase de guanilato nas células musculares lisas.

Os relaxamentos tanto do GSK1016790A como do 4 α PDD apresentaram uma cinética mais lenta que aqueles produzidos pela acetilcolina. Pode ser que para ativar o TRPV4 esses compostos precisem entrar na célula endotelial. Isso também foi proposto por Watanabe et al. (2002) para explicar a lenta ativação pelo 4 α PDD do influxo de cálcio em células transfectadas com o TRPV4. Alternativamente, o canal TRPV4 pode estar localizado em outras regiões que não na membrana plasmática, e GSK1016790A e 4 α PDD produziriam um deslocamento dos TRPV4 para a membrana.

O fato de que após a incubação da aorta torácica de rato em solução nominalmente sem cálcio, os relaxamentos produzidos pelo GSK1016790A

apresentaram um início mais rápido, pode indicar que esse procedimento produziu um aumento no número dos TRPV4 na membrana plasmática da célula endotelial, uma vez que Ma et al. (2010) sugeriram que a depleção dos estoques intracelulares de cálcio em HUVECs induz o deslocamento do TRPV4 para a membrana plasmática.

Tem sido proposto que os TRPV4 mediarão o efeito da acetilcolina em vasos de pequeno calibre, uma vez que os relaxamentos produzidos pela acetilcolina estão diminuídos em preparações de ramos da artéria mesentérica isolados de camundongos TRPV4-KO (Earley et al. 2009; Zhang et al., 2009). Porém, na aorta torácica de rato e de coelho, nem vermelho de rutênio (na concentração de 1 μ M) e nem HC-067047 (na concentração de 3 μ M) bloquearam os relaxamentos produzidos pela acetilcolina. Os relaxamentos produzidos pela acetilcolina nessas artérias ocorrem independentemente da ativação de canais TRPV4. Além dos nossos resultados, Kohler et al. (2006) observaram que vermelho de rutênio não bloqueou os relaxamentos produzidos pela acetilcolina na artéria do músculo gracilis, e Hartmannsgruber et al. (2007) e Loot et al. (2008) não observaram diferenças entre os relaxamentos produzidos pela acetilcolina na artéria carótida de camundongos WT e TRPV4-KO. Não obstante, recentemente, Sonkusare et al. (2012) descreveram que o HC-067047 (1 μ M) bloqueou os relaxamentos produzidos pela acetilcolina em artérias de pequeno calibre. É possível que o TRPV4 participe na mediação dos efeitos da acetilcolina somente em arteríolas e só de alguns territórios vasculares, por exemplo, intestinal ou cerebral e não na musculatura esquelética.

Também observamos que os relaxamentos dependentes de endotélio produzidos pela histamina, tapsigargina e pelo A23187, e que também dependem do influxo de cálcio, não são bloqueados pelo HC-067047. Podemos inferir então que esses também não ocorrem via ativação de TRPV4.

O fato do HC-067047 bloquear seletivamente os relaxamentos do GSK1016790A indica que esse composto não está simplesmente inibindo o influxo de cálcio na célula endotelial ou afetando os mecanismos de relaxamento no músculo liso vascular.

Incidentalmente, observamos que o PYR3 (que bloqueia canais TRPC3) foi capaz de reverter completamente os relaxamentos da acetilcolina, indicando que os canais permeáveis ao cálcio sensíveis ao bloqueio pelo PYR3 (mais

especificamente os TRPC3) podem estar presentes no endotélio da aorta torácica de rato e serem os responsáveis por mediar o influxo de cálcio promovido pela acetilcolina.

Por outro lado, o fato do PYR3 não reverter os relaxamentos endotélio dependentes produzidos pelo GSK1016790A, mas sim aqueles produzidos pela acetilcolina, é consistente com a noção de que o GSK1016790A ativa o influxo de cálcio através de canais TRPV4 e não através daqueles formados por TRPC3.

Com base nesses resultados, podemos concluir que existem diferentes maneiras de produzir relaxamentos do músculo liso vascular, por exemplo, para produzirmos relaxamentos atuando diretamente no músculo liso vascular podemos adicionar substâncias que liberam (ou doam) NO, que ativam a ciclase de guanilato ou adicionar o próprio GMPc; e para produzir relaxamentos dependentes de endotélio podemos estimular diferentes receptores de membrana ou, independente destes, inibir a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático da célula endotelial, ou podemos promover a ativação de canais TRPV4 no endotélio.

Sustentando essa conclusão foi possível demonstrar que o bloqueio seletivo do efeito de substâncias que relaxam o músculo liso vascular de forma dependente de endotélio por mecanismos diferentes não interfere com o efeito das outras.

5 – CONCLUSÕES

GSK1016790A e 4 α PDD produzem relaxamentos em artérias isoladas de diferentes espécies animais. Esses relaxamentos foram dependentes de endotélio e de cálcio extracelular, e foram inibidos por bloqueadores da via L-arginina/ NO. Uma vez que foram bloqueados pelo vermelho de rutênio (bloqueador de canais TRPV1-4 e de TRPA1) e pelo HC-067047 (um bloqueador mais seletivo de TRPV4), esses efeitos podem ser atribuídos à ativação de canais TRPV4 no endotélio. Entretanto, os relaxamentos endotélio dependentes produzidos pela acetilcolina, histamina, A23187 e taspigargina parecem não envolver a participação de canais TRPV4.

Podemos concluir que a ativação dos TRPV4 nas células endoteliais resulta na produção e liberação por essas células de fatores relaxantes.

Como corolário, esses resultados constituem indícios de que os canais TRPV4 podem participar da regulação da função das células endoteliais em situações fisiológicas e/ ou fisiopatológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antigny F, Jousset H, König S, Frieden M. Thapsigargin activates Ca^{2+} entry both by store-dependent, STIM1/Orai1-mediated, and store-independent, TRPC3/PLC/PKC-mediated pathways in human endothelial cells. **Cell Calcium** 49(2):115-27, 2011.

Antoniotti S, Lovisolo D, Fiorio Pla A, Munaron L. Expression and functional role of bTRPC1 channels in native endothelial cells. **FEBS Lett.** 510(3):189-95, 2002.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74(8):3203-7, 1977.

Bargal R, Goebel HH, Latta E, Bach G. Mucopolipidosis IV: novel mutation and diverse ultrastructural spectrum in the skin. **Neuropediatrics** 33(4):199-202, 2002.

Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, Ballabio A, Borsani G. Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolipidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolipidosis type IV. **Am. J. Hum. Genet.** 67(5):1110-20, 2000.

Berrout J, Jin M, O'Neil RG. Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells. **Brain Res.** 1436:1-12, 2012.

Broderick KE, Singh V, Zhuang S, Kambo A, Chen JC, Sharma VS, Pilz RB, Boss GR. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. **J Biol Chem.** 280(10):8678-85, 2005.

Brotherton AF, Hoak JC. Role of Ca^{2+} and cyclic AMP in the regulation of the production of prostacyclin by the vascular endothelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79(2):495-9, 1982.

Brotherton AF, Hoak JC. Prostacyclin biosynthesis in cultured vascular endothelium is limited by deactivation of cyclooxygenase. **J. Clin. Invest.** 72(4):1255-61, 1983.

Brouwer M, Chamulitrat W, Ferruzzi G, Sauls DL, Weinberg JB. Nitric oxide interactions with cobalamins: biochemical and functional consequences. **Blood** 88(5):1857-64, 1996.

Bubolz AH, Mendoza SA, Zheng X, Zinkevich NS, Li R, Gutterman DD, Zhang DX. Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca^{2+} entry and mitochondrial ROS signaling. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 302(3):H634-42, 2012.

Bratz IN, Dick GM, Tune JD, Edwards JM, Neeb ZP, Dincer UD, Sturek M. Impaired capsaicin-induced relaxation of coronary arteries in a porcine model of the metabolic syndrome. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 294(6):H2489-96, 2008.

Buchan KW, Martin W. Bradykinin induces elevations of cytosolic calcium through mobilisation of intracellular and extracellular pools in bovine aortic endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.** 102(1):35-40, 1991.

Cannell MB, Sage SO. Bradykinin-evoked changes in cytosolic calcium and membrane currents in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. **J Physiol.** 419:555-68, 1989

Carvalho MH, Furchgott RF. Vasodilation of the rabbit mesenteric vascular bed by acetylcholine and A23187 (abstr). **Pharmacologist** 23: 223, 1981.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature** (London) 389(6653):816-24, 1997.

Chand, N., and Altura, B. M. Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: role in lung vascular diseases. **Science** 213, 1376-1379, 1981.

Chang AS, Chang SM, Garcia RL, Schilling WP. Concomitant and hormonally regulated expression of trp genes in bovine aortic endothelial cells. **FEBS Lett.** 415(3):335-40, 1997.

Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79: 2106-2110, 1982.

Cocks TM, Angus JA, Campbell JH, Campbell GR. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. **J. Cell Physiol.** 123(3):310-20, 1985.

Cocks, T. M., and Angus, J. A. Endothelium dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature** (London) 305, 627-6, 1983.

Cohen, R. A., Shepherd, J. T, and Vanhoutte, P. M. 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. **Am. J. Physiol.** 245, H1077-H108, 1983.

Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, Kunze DL. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. **Circulation Research** 61(5):632-40, 1987.

Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature** (London) 224(5216):285-7, 1969.

Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 6 (2): 147-190, 1914.

De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 222: 166-173, 1982.

De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. **Circulation Research** 51: 439-447, 1982.

De Mey JG, Vanhoutte PM. Endothelium and relaxation of isolated canine arteries (abstr). **Pharmacologist** 22: 282, 1980.

De Mey JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. **J. Physiol.** 316: 437-355, 1981.

Di Palma F, Belyantseva IA, Kim HJ, Vogt TF, Kachar B, Noben-Trauth K. Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99(23):14994-9, 2002.

Diamond J, Chu EB. Possible role for cyclic GMP in endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by acetylcholine. Comparison with nitroglycerin. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.** 41(3):369-81, 1983.

Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. **Cancer Res.** 58(7):1515-20, 1998.

Earley S, Gonzales AL, Crnich R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. **Circulation Research** 104(8):987-94, 2009.

Earley S, Pauyo T, Drapp R, Tavares MJ, Liedtke W, Brayden JE. TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 297(3):H1096-102, 2009.

Earley S, Gonzales AL, Garcia ZI. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. **Mol. Pharmacol.** 77(4):612-20, 2010.

Everaerts W, Zhen X, Ghosh D, Vriens J, Gevaert T, Gilbert JP, Hayward NJ, McNamara CR, Xue F, Moran MM, Strassmaier T, Uykai E, Owsianik G, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Fanger CM, Voets T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107(44): 19084-9, 2010.

Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT, Yuan JX. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.** 285(6):L1233-45, 2003.

Facemire CS, Mohler PJ, Arendshorst WJ. Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in the rat renal microcirculation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 286:F546–F551, 2004.

Förstermann U, Trogisch G, Busse R. Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived vascular relaxing factor. **European Journal of Pharmacology** 106(3): 639-43, 1984.

Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B. Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. **Nature Cell Biology** 3(2):121-7, 2001.

Furchgott, RF. Dibenamine blockade in strips of rabbit aorta and its use in differentiating receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 111, 265-284, 1954.

Furchgott, R. F. Spiral-cut strip of rabbit aorta for in vitro studies of responses of arterial smooth muscle. In: **Methods in Medical research**, (H.D. Bruner, editor), Chicago, Yearbook Publishers, Inc., 8: 177-186, 1960.

Furchgott RF, Bhadrakom, S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 108: 129-143, 1953.

Furchgott, RF. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. **Trends Pharmacol. Sci.** 2: 173-176, 1981.

Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. **Blood Vessels** 24(3):145-9, 1987.

Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV. Endothelium dependent relaxation of arteries by acetylcholine, bradykinin and other agents. In: **Vascular Neuroeffector Mechanisms** - 4th International Symposium, edited by JA Bevan, M Fujiwara, RA Maxwell, K Mohri, S Shibata, N Toda. New York, Raven Press, pp 37-43, 1983.

Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 6 Suppl 2:S336-43, 1984.

Furchgott RF, Khan MT, Jothianandan D, Khan AS. Evidence that endothelium-derived factor of rabbit aorta is nitric oxide. In: **Sixth International Symposium on Vascular Neuroeffector Mechanisms**, ed. by J. A. Bevan, H. Majewski, R. A. Maxwell and D. F. Story, IRL Press, Oxford, pp. 77-84, 1988.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** (London) 288: 373-376, 1980.

Furchgott RF, Zawadzki JV, Cherry PD, Role of endothelium in the vasodilator response to acetylcholine. In: **Vasodilatation**, ed. by P.M. Vanhoutte and I. Leusen, Raven Press, New York, pp. 49–66, 1981.

Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: basis for the proposal that the acid-activatable component of the inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrate and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: **Mechanisms of Vasodilatation**, ed. by P.M. Vanhoutte, Raven Press, New York, pp. 401–414, 1988.

Furchgott RF, Zawadzki JV. ATP relaxes rabbit aortic smooth muscle by both an indirect action via endothelial cells and a direct action (abstr.). **Pharmacologist** 22, 271, 1980.

Gaddum JH. Bioassay procedures. **Pharmacol. Rev.** 11:241–249, 1959.

Gao F, Sui D, Garavito RM, Worden RM, Wang DH. Salt intake augments hypotensive effects of transient receptor potential vanilloid 4: functional significance and implication. **Hypertension** 53(2):228-35, 2009.

Gao F, Wang DH. Hypotension induced by activation of the transient receptor potential vanilloid 4 channels: role of Ca²⁺-activated K⁺ channels and sensory nerves. **J. Hypertens.** 28(1):102-10, 2010.

Gao F, Wang DH. Impairment in function and expression of transient receptor potential vanilloid type 4 in Dahl salt-sensitive rats: significance and mechanism. **Hypertension** 55(4):1018-25, 2010.

Garcia RL, Schilling WP. Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 239:279–283, 1997.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. **Mol. Brain Res.** 132(1):87-92, 2004.

Gordon JL, Martin W. Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: Relationship to stimulation of Rb efflux from isolated endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.** 79: 531-541, 1983.

Graier WF; Sturek M; Kukovetz WR. Ca²⁺ Regulation and Endothelial Vascular Function. **Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research**, 1543-5261, 1(4):223-236, 1994.

Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature** (London) 308(5960):645-7, 1984.

Griffith TM, Edwards DH, Newby AC, Lewis MJ, Henderson AH. Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. **Cardiovasc. Res.** 20(1):7-12, 1986.

Groschner K, Hingel S, Lintschinger B, Balzer M, Romanin C, Zhu X, Schreiber W. Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. **FEBS Lett.** 437(1-2):101-6, 1998.

Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. **J. Cyclic. Nucleotide Res.** 5(3):211-24, 1979.

Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 219:181-186, 1981.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature** (London) 320(6061):454-6, 1986.

Hallam TJ, Pearson JD. Exogenous ATP raises cytoplasmic free calcium in fura-2 loaded piglet aortic endothelial cells. **FEBS Lett.** 207(1):95-9, 1986.

Hallam TJ, Pearson JD, Needham LA. Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. **Biochem J.** 251(1):243-9, 1988.

Hamilton KK, Sims PJ. Changes in cytosolic Ca^{2+} associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. **J. Clin. Invest.** 79(2):600-8, 1987.

Hardie RC. Whole-cell recordings of the light-induced current in *Drosophila* photoreceptors: evidence for feedback by calcium permeating the light sensitive channels. **Proc Roy Soc Lond B** 245:203-210, 1991.

Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. **Neuron** 8(4):643-51, 1992.

Hartmannsgruber V, Heyken WT, Kacik M, Kaistha A, Grgic I, Harteneck C, Liedtke W, Hoyer J, Köhler R. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. **PLoS ONE** 2, e827, 2007.

Hecquet CM, Ahmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 channel in mediating H_2O_2 -induced Ca^{2+} entry and endothelial hyperpermeability. **Circulation Research** 102(3):347-55, 2008.

Hochstrate P. Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of *Drosophila* in the blowfly *Calliphora*. **J. Comp. Physiol. A** 166:179–187, 1989.

Holzmann S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. **J Cyclic Nucleotide Res.** 8(6): 409-19, 1982.

Hopps JJ, Dunn WR, Randall MD. Vasorelaxation to capsaicin and its effects on calcium influx in arteries. **Eur J Pharmacol.** 681(1-3):88-93, 2012.

Hutchinson PJ, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur. J. Pharmacol.** 141(3):445-51, 1987.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 84(24):9265-9, 1987.

Ignarro LJ, Burke TM, Wood KS, Wolin MS, Kadowitz PJ. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 228(3):682-90, 1984.

Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. In: **Mechanisms of Vasodilatation**, ed. by P.M. Vanhoutte, Raven Press, New York, pp. 427-35, 1988.

Inoue K, Xiong ZG. Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. **Cardiovasc Res.** 83(3):547-57, 2009.

Iouzalén L, Lantoiné F, Pernollet MG, Millanvoye-Van Brussel E, Devynck MA, David-Dufilho M. SK&F96365 inhibits intracellular Ca^{2+} pumps and raises cytosolic Ca^{2+} concentration without production of nitric oxide and von Willebrand factor. **Cell Calcium** 20(6):501-8, 1996.

Jacob R. Agonist-stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells. **J Physiol.** 421:55-77, 1990.

Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **J. Biol. Chem.** 274(11):7325-33, 1999.

Jenkinson KM, Reid JJ, Rand MJ. Hydroxocobalamin and haemoglobin differentiate between exogenous and neuronal nitric oxide in the rat gastric fundus. **Eur J Pharmacol.** 275(2):145-52, 1995.

Jiang F, Li CG, Rand MJ. Effect of hydroxocobalamin on vasodilatations to nitrenergic transmitter, nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor in guinea-pig basilar artery. **Eur J Pharmacol.** 340(2-3):181-6, 1997.

Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J. Cyclic. Nucleotide Res.** 3(1):23-35, 1977.

Katsuki S, Arnold WP, Murad F. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. **J. Cyclic. Nucleotide Res.** 3(4):239-47, 1977.

Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Vasopressin causes endothelium-dependent relaxation of the canine basilar artery. **Circulation Research** 55:575-579, 1984.

Kernan M, Cowan D, Zuker C. Genetic dissection of mechanosensory transduction: mechanoreception-defective mutations of *Drosophila*. **Neuron** 12(6):1195-206, 1994.

Köhler R, Brakemeier S, Kühn M, Degenhardt C, Buhr H, Pries A, Hoyer J. Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of in situ and cultured human endothelial cells. **Cardiovasc. Res.** 51(1):160-8, 2001.

Köhler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, Busch C, Grgic I, Maier T, Hoyer J. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 26:1495–1502, 2006.

Korenaga R, Ando J, Ohtsuka A, Sakuma I, Yang W, Toyo-oka T, Kamiya A. Close correlation between cytoplasmic Ca^{++} levels and release of an endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. **Cell Struct. Funct.** 18(2):95-104, 1993

Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. **Nature Cell Biology** 4(3):191-7, 2002.

Ku D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. **Science** 218:576-578, 1982.

Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. **Proc Natl Acad Sci USA** 106(13):5400-5, 2009.

Lantoine F, Iouzalet L, Devynck MA, Millanvoeye-Van Brussel E, David-Duflho M. Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca^{2+} influx. **Biochem J.** 330(Pt 2):695-9, 1998.

Littleton JT, Ganetzky B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. **Neuron** 26(1):35-43, 2000.

Long CJ, Stone TW. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent. **Blood vessels** 22:205-208, 1985.

Loot AE, Popp RD, Fisslthaler B, Vriens J, Nilius B, Fleming I. Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation. **Cardiovasc. Res.** 80:445–452, 2008.

Lückhoff A. Release of prostacyclin and EDRF from endothelial cells is differentially controlled by extra- and intracellular calcium. **Eicosanoids** 1(1):5-11, 1988.

Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.** 95(1):189-96, 1988.

Ma X, Cao J, Luo J, Nilius B, Huang Y, Ambudkar IS, Yao X. Depletion of intracellular Ca²⁺ stores stimulates the translocation of vanilloid transient receptor potential 4-C1 heteromeric channels to the plasma membrane. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 30(11):2249-55, 2010.

Ma X, Cheng KT, Wong CO, O'Neil RG, Birnbaumer L, Ambudkar IS, Yao X. Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca²⁺ entry in vascular endothelial cells. **Cell Calcium** 50(6):502-9, 2011.

Ma X, He D, Ru X, Chen Y, Cai Y, Bruce IC, Xia Q, Yao X, Jin J. Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. **Br. J. Pharmacol.** 166(1):349-58, 2012.

Marrelli SP, O'neil RG, Brown RC, Bryan RM Jr. PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 292(3):H1390-7, 2007.

Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 237(2):529-38, 1986a.

Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 237(2):539-47, 1986b.

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 232(3):708-16, 1985.

Matsuyama S, Shuntoh H, Katayama S, Tanaka C. Thapsigargin induces an endothelium-dependent, intracellular calcium ion-dependent vasodilation in vitro. **Life Sci.** 53:618–688, 1993.

Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, Suzuki M, Zhang DX. TRPV4-mediated endothelial Ca^{2+} influx and vasodilation in response to shear stress. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 298:H466–H476, 2010.

Minke B, Wu C, Pak WL. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. **Nature** (London) 258:84–87, 1975.

Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. **Science** 272(5266):1339-42, 1996.

Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron** 2(4):1313-23, 1989.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. **Mol Cell.** 9(2):229-31, 2002.

Moore TM, Brough GH, Babal P, Kelly JJ, Li M, Stevens T. Store-operated calcium entry promotes shape change in pulmonary endothelial cells expressing Trp1. **Am. J. Physiol.** 275(3 Pt 1):L574-82, 1998.

Morgan-Boyd R, Stewart JM, Vavrek RJ, Hassid A. Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca^{2+} dynamics in endothelial cells. **Am. J. Physiol.** 253(4 Pt 1):C588-98, 1987.

Moritoki H, Hisayama T, Takeuchi S, Kondoh W, Imagawa M. Relaxation of rat thoracic aorta induced by the Ca^{2+} -ATPase inhibitor, cyclopiazonic acid, possibly through nitric oxide formation. **Br. J. Pharmacol.** 111(3):655-62, 1994.

Mügge A, Peterson T, Harrison DG. Release of nitrogen oxides from cultured bovine aortic endothelial cells is not impaired by calcium channel antagonists. **Circulation** 83(4):1404-9, 1991.

Murad F, Arnold WP, Mittal CK, Braughler JM. Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions of cyclic GMP. **Adv. Cyclic Nucleotide Res.** 11:175-204, 1979.

Murad F. Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation (Nobel-Vortrag). **Angew. Chem.** 111:1976-1989, 1999a.

Murad F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 32(11):1317-27, 1999b.

Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development (Shattuck Lecture). **N. Engl. J. Med.** 355(19):2003-11, 2006.

Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V. Voltage dependence of the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4. **J. Biol. Chem.** 278(33):30813-20, 2003.

Ong AC, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, Pei Y, Harris PC. Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. **Am. J. Pathol.** 154(6):1721-9, 1999.

Onozawa K, Nakamura A, Tsutsumi S, Yao J, Ishikawa R, Kohama K. Tissue distribution of capsaicin receptor in the various organs of rats. **Proc. Japan Acad.** 76(Ser. B): 68-72, 2000.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** (London) 327(6122):524-6, 1987.

Paria BC, Vogel SM, Ahmmed GU, Alamgir S, Shroff J, Malik AB, Tiruppathi C. Tumor necrosis factor- α -induced TRPC1 expression amplifies store-operated Ca^{2+} influx and endothelial permeability. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.** 287(6):L1303-13, 2004.

Pressman BC, Fahim M. Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 22:465-90, 1982.

Ranganathan R, Harris GL, Stevens CF, Zuker CS. A *Drosophila* mutant defective in extracellular calcium-dependent photoreceptor deactivation and rapid desensitization. **Nature** (London) 354(6350):230-2, 1991.

Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circulation Research** 52(3):352-7, 1983.

Reed PW, Lardy HA. A23187: a divalent cation ionophore. **J. Biol. Chem.** 247 (21): 6970-7, 1972.

Rochelle LG, Morana SJ, Kruszyna H, Russell MA, Wilcox DE, Smith RP. Interactions between hydroxocobalamin and nitric oxide (NO): evidence for a redox reaction between NO and reduced cobalamin and reversible NO binding to oxidized cobalamin. **J Pharmacol Exp Ther.** 275(1):48-52, 1995.

Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. **Am. J. Physiol.** 249(1 Pt2):H95-101, 1985.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **Am. J. Physiol.** 250(5 Pt 2):H822-7, 1986.

Satoh H, Inui J. Endothelial cell-dependent relaxation and contraction induced by histamine in the isolated guinea-pig pulmonary artery. **Eur. J. Pharmacol.** 97, 321-324, 1984.

Schilling WP, Ritchie AK, Navarro LT, Eskin SG. Bradykinin-stimulated calcium influx in cultured bovine aortic endothelial cells. **Am. J. Physiol.** 255(2 Pt 2):H219-27, 1988.

Sharma, V.S., Pilz. R.B., Boss, G.R. and Magde, D. Reactions of nitric oxide with vitamin B12 and its precursor, cobinamide. **Biochemistry** 42: 8900-8, 2003.

Singer HA, Peach MJ. Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. **Hypertension** 4(3 Pt 2):19-25, 1982.

Smedlund K, Vazquez G. Involvement of native TRPC3 proteins in ATP-dependent expression of VCAM-1 and monocyte adherence in coronary artery endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 28: 2049–2055, 2008.

Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, Hill-Eubanks DC, Nelson MT. Elementary Ca^{2+} signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. **Science** 336(6081):597-601, 2012.

Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, Acierno JS Jr, Bove C, Kaneshi CR, Nagle J, Bromley MC, Colman M, Schiffmann R, Slaugenhaupt SA. Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. **Hum. Mol. Genet.** 9(17):2471-8, 2000.

Suss Toby E, Selinger Z, Minke B. Lanthanum reduces the excitation efficiency in fly photoreceptors. **J. Gen. Physiol.** 98: 849–868, 1991.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell** 112(6):819-29, 2003.

Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB. Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4^{-/-} mice interferes with increase in lung microvascular permeability. **Circulation Research** 91, 70–76, 2002.

Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, Morisseau C, Hammock BD, Fleming I, Busse R, Nilius B. Modulation of the Ca^{2+} permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. **Circulation Research** 97(9):908-15, 2005.

Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. A Drosophila mechanosensory transduction channel. **Science** 287(5461):2229-34, 2000.

Wang Y, Shin WS, Kawaguchi H, Inukai M, Kato M, Sakamoto A, Uehara Y, Miyamoto M, Shimamoto N, Korenaga R, Ando J, Toyo-oka T. Contribution of sustained Ca^{2+} elevation for nitric oxide production in endothelial cells and

subsequent modulation of Ca^{2+} transient in vascular smooth muscle cells in coculture. **J. Biol. Chem.** 271(10):5647-55, 1996.

Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. **J. Biol. Chem.** 277(16):13569-77, 2002.

Willette RN, Bao W, Nerurkar S, Yue TL, Doe CP, Stankus G, Turner GH, Ju H, Thomas H, Fishman CE, Sulpizio A, Behm DJ, Hoffman S, Lin Z, Lozinskaya I, Casillas LN, Lin M, Trout RE, Votta BJ, Thorneloe K, Lashinger ES, Figueroa DJ, Marquis R, Xu X. Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 326(2):443-52, 2008.

Wissenbach U, Bödding M, Freichel M, Flockerzi V. Trp12, a novel Trp related protein from kidney. **FEBS Lett.** 485(2-3):127-34, 2000.

Whorton AR, Willis CE, Kent RS, Young SL. The role of calcium in the regulation of prostacyclin synthesis by porcine aortic endothelial cells. **Lipids** 19(1):17-24, 1984.

Wong F, Schaefer EL, Roop BC, LaMendola JN, Johnson-Seaton D, Shao D. Proper function of the *Drosophila* trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. **Neuron** 3(1):81-94, 1989.

Yang D, Luo Z, Ma S, Wong WT, Ma L, Zhong J, He H, Zhao Z, Cao T, Yan Z, Liu D, Arendshorst WJ, Huang Y, Tepel M, Zhu Z. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. **Cell Metab.** 12(2):130-41, 2010.

Yip H, Chan WY, Leung PC, Kwan HY, Liu C, Huang Y, Michel V, Yew DT, Yao X. Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. **Histochem. Cell Biol.** 122(6):553-61, 2004.

Zhang DX, Mendoza SA, Bubolz AH, Mizuno A, Ge ZD, Li R, Wartier DC, Suzuki M, Gutterman DD. Transient receptor potential vanilloid type 4-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in vitro and in vivo. **Hypertension** 53(3):532-8, 2009.