**Fernanda Regina Casagrande Giachini**

# Contribuição da via STIM1/Orai1 para as diferenças relacionadas ao sexo na entrada de cálcio em miócitos vasculares durante a hipertensão arterial

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Fernanda Regina Casagrande Giachini

# Contribuição da via STIM1/Orai1 para as diferenças relacionadas ao sexo na entrada de cálcio em miócitos vasculares durante a hipertensão arterial

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia do músculo liso vascular.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Tostes Passaglia

Co-Orientadora: Dra. Zuleica Bruno Fortes

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução tota
l

Giachini, Fernanda Regina Casagrande.
Contribuição da via STIM1/Orai1 para as diferenças relacionadas ao sexo na entrada de cálcio em miócitos vasculares durante a hipertensão arterial / Fernanda Regina Casagrande Giachini. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Diferenças sexuais na contração vascular na hipertensão vascular.

Versão do título para o inglês: Activation of STIM1/Orai1 mediates sex-differences in the calcium influx in vascular miocytes from hypertensive rats.

Descritores: 1. STIM1 2. Orai1 3. Disfunção vascular 4. Hipertensão 5. Diferenças sexuais 6. Hormônios sexuais I. Fortes, Zuleica Bruno, Passaglia, Rita de Cássia Aleixo Tostes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB090/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Fernanda Regina Casagrande Giachini.

Título da Tese: Contribuição da via STIM1/Orai1 para as diferenças relacionadas ao sexo na entrada de cálcio em miócitos vasculares durante a hipertensão arterial.

Orientador(a): Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**( ) Aprovado(a)** **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Ao meu marido Victor, que me presenteia todos os dias com o seu amor e carinho. Obrigada por fazer parte de cada momento da minha vida. Obrigada por fazer tudo valer a pena.

À Dra. Rita Tostes, por toda a dedicação e suporte durante esses anos de convivência. É impossível não admirar o seu engajamento, seja com o seu trabalho, seja com a sua família e amigos. A sua história serve como inspiração para que sempre busquemos ser pessoas melhores e mais comprometidas com os nossos ideais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que é o caminho, a verdade e a vida (Jó 14:6);

Ao meu marido, Victor, uma pessoa incrível. O seu amor e o seu carinho me dão motivos para que eu siga sempre em frente, acreditando nos meus ideais. Você faz com que eu acredite no meu potencial.

Aos meus pais, Ermes e Carmem por me proporcionarem o amor e o suporte para que eu pudesse traçar meu caminho. Obrigada por me proporcionarem a chance de me educar tanto intelectualmente como espiritualmente. Agradeço por vocês nunca terem medido esforços para que esses sonhos se tornassem reais.

Ao meu irmão, Eduardo, por ser esta pessoa incrível, que está sempre pronto a estender a mão. Você é muito especial para mim e sinto muita saudade de você.

A família Vitorino, que me acolheu como filha. Vocês são muito especiais e moram no meu coração.

À Dra. Rita Tostes, por me orientar e me conceder todo o apoio necessário para o desenvolvimento do meu trabalho. Você me ensinou que é muito difícil retribuir as pessoas que nos ajudam. Entretanto, é possível repetir este gesto com outras pessoas.

A família Tostes Passaglia pela maravilhosa convivência durante a a minha estadia junto a esta família. Agradeço por ter tido pessoas tãp especiais por perto, durante a minha chegada nos Estados Unidos. Vocês moram no meu coração.

Ao Dr. Clinton Webb, por permitir ser parte do seu laboratório e me proporcionar momentos importantes em minha carreira. A liberdade de criação que você proporciona aos seus alunos faz com que tenhamos um diferencial em nossas mãos.

Ao casal Fernando e Zidonia. A nossa parceria é imensa, mas maior ainda é a minha admiração por vocês. Tenho certeza de que o futuro de vocês será sempre cheio de luz e sucesso. Vocês são muito especiais em minha vida.

Às docentes do Grupo de Pesquisa de Diabetes e Hipertensão: Dra. Zuleica Bruno Fortes e Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho. O exemplo da dedicação e do profissionalismo que vocês dão ao nosso grupo de pequisa, nos inspira a dar o nosso melhor a cada dia.

Agradeço aos meus amigos de laboratório: Álvaro e Andréia. Nossos caminhos seguiram direções diferentes, mas a amizade de vocês ficará para sempre em minha memória.

Aos meus amigos Fernando, Núbia, Gisele, Simone, Karla e Douglas. Vocês são exemplos de que a dedicação e a persistência são igredientes essenciais para o sucesso. Vocês são muito especiais para mim.

Aos meus amigos do Medical College of Georgia. Brandi, Chin-Wei, Cristal, Christine, David, Fernanda, Fernando, Hicam, Hiehun, Johanna, Joe, Katie, Kyan, Kenia, Rob, Saiprassad. Foi muito bom conviver com culturas diferentes e com pessoas maravilhosas. A nossa convivência ficará registrada em minhas memóricas, cheia de momentos especiais.

As colaboradoras do Medical College of Georgia Shali Zhang, Cathy Davidson, Bobbie Willcox e Beverly Tarver, pela amizade e suporte durante todos estes anos.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa de Diabetes e Hipertensão: Núbia, Fernando, Gisele, Eliana, Simone, Tiago, Graziela C., Luciana, Graziela H., Rossana, Priscila e Murilo. Eu gostaria ter passado mais tempo ao lado de vocês. Mas em todas as ocasiões onde estivemos juntos, sempre me senti parte do grupo. Obrigada por toda a atenção e carinho.

Àos técnicos do Grupo de Pesquisa de Diabetes e Hipertensão: Dra. Rosangela Eichler, Dra. Maria Aparecida Rodrigues, Ana Rita, Marta, Sônia, Antônio e Manoel,

pelo suporte técnico e pela amizade. É muito bom saber que temos profissionais comprometidos à serviço da ciência e tornando nosso dia mais feliz.

Às secretárias do departamento de Farmacologia, Julieta e Selma, que sempre estiveram prontas para ajudar.

Á Dra. Flávia Lúcia David, que desde minha Iniciação Científica foi uma grande incentivadora do meu crescimento profissional. Te admiro muito Flávia, e agradeço por você ter acendido em mim a chama da pesquisa.

Ás Dra. Eliana Akamine, Dra. Silvana Chiavegatoo e Dra. Soraia Katia Pereira Costa, pelas sugestões e críticas durante a realização do exame de qualificação.

Aos meus amigos brasucas de Augusta: Ana, Ana Quênia, Carlos, Edson, Domitila, Haroldo, Kenia, Kyan, Marcelo, Priscila, Vinícia. Foi muito bom ter vocês por perto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Associação Americana do Coração (AHA) – pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Agradeço a Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Farmacologia, por todo o suporte concedido durante este trabalho. Tenho muito orgulho em ser aluna desta instituição reconhecida mundialmente seja por sua excelência na pesquisa ou na graduação.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia do Medical College of Georgia, por me permitir fazer parte de um lugar onde se previligia a pesquisa, o que certamente contribuiu para o meu crescimento profissional.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o êxito do meu trabalho.

"Se eu soubesse o que eu estava fazendo, não seria chamada pesquisa".

(Albert Einstein)

**RESUMO**

Giachini FRC. Contribuição da via STIM1/Orai1 para as diferenças relacionadas ao sexo na entrada de cálcio em miócitos vasculares durante a hipertensão arterial. [tese (doutorado em Farmacologia]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Os distúrbios na regulação da concentração de cálcio ($Ca^{2+}$) citoplasmático contribuem para a patogênese da hipertensão arterial. Evidências sugerem que as moléculas de interação estromal (STIM) atuam como sensores dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, enquanto as proteínas Orai representam as subunidades que formam os canais de $Ca^{2+}$ ativados pela liberação de $Ca^{2+}$ (CRAC). Neste estudo avaliamos a participação de STIM1/Orai1 na regulação das concentrações de $Ca^{2+}$ citoplasmático e na ativação da contração vascular em aortas de ratos hipertensos. Além disso, estudamos como a ativação diferencial desta via contribui para as diferenças sexuais de reatividade vascular observadas em animais hipertensos, bem como os efeitos dos hormônios sexuais femininos na função de STIM1/Orai1. Durante a realização de nossos experimentos, utilizamos aortas de ratos espontaneamente hipertensos susceptíveis a acidente vascular cerebral (SHRSP), machos e fêmeas, e seus controles Wistar-Kyoto (WKY). Em alguns experimentos, ratas SHRSP e WKY foram ovariectomizadas para avaliarmos o papel dos hormônios sexuais femininos na via de STIM1/Orai1. Nossos resultados demonstram que ratos SHRSP, comparados a ratos WKY, apresentam aumento da ativação e expressão de STIM1 e Orai1, contribuindo diretamente para o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ via canais CRAC, e para o aumento da contração vascular observado em aortas dos ratos hipertensos. Além disso, aortas de ratos SHRSP apresentam aumento das reservas intracelulares de $Ca^{2+}$, Observamos que fêmeas SHRSP apresentam menor ativação da via STIM1/Orai1, quando comparadas a machos SHRSP, resultando em menor influxo de $Ca^{2+}$ e, consequentemente, menor contração vascular. Adicionalmente, os resultados obtidos após a ovariectomia demonstraram que os hormônios sexuais modulam negativamente a expressão de STIM1/Orai1 em aortas de ratas SHRSP. Em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação de STIM1/Orai1 pode representar um novo mecanismo que modula

alterações vasculares nos níveis de $Ca^{2+}$ intracelular na hipertensão arterial e que contribui para as diferenças sexuais de reatividade vascular em animais hipertensos.

**Palavras-chave**: STIM1. Orai1. Disfunção vascular. Hipertensão. Diferenças sexuais. Hormônios sexuais.

## ABSTRACT

Giachini FRC. Activation of STIM1/Orai1 mediates sex-differences in the calcium influx in vascular miocytes from hypertensive rats. [Thesis (Pharmacology Ph.D]. São Paulo (Brazi): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Disturbance in the regulation of cytoplasmic calcium ($Ca^{2+}$) concentration contributes to the pathogenesis of hypertension. Evidences suggest that the stromal interaction molecule (STIM) acts as a sensor of intracellular $Ca^{2+}$ stores, whereas Orai proteins are the subunits that form CRAC channels. In this study, we evaluated the role of STIM1/Orai1 in the regulation of cytoplasmic $Ca^{2+}$ concentrations and in the activation of contraction in aortas from hypertensive rats. We also studied how the differential activation of this pathway contributes to sex differences observed between hypertensive rats, as well as the protective effects of the female sex hormones in the vasculature. During our experiments, we used aortas from female and male spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHRSP) and their controls Wistar-Kyoto (WKY). In some experiments, female SHRSP and WKY were ovariectomized, in order to evaluate the role of female sex hormones in STIM1/Orai1 pathway. Our results demonstrate that male SHRSP, compared to WKY, display increase activation and expression of STIM1 and Orai1, which directly contributes to the increased $Ca^{2+}$ influx, via CRAC channels, contributing to the increased contractile response in aortas from hypertensive rats. Furthermore, aortas from SHRSP displayed increased intracellular $Ca^{2+}$ stores. Additionally, aortas from female SHRSP display smaller activation of STIM1/Orai1, compared to males SHRSP, which leads to smaller $Ca^{2+}$ influx and consequently, smaller vascular contraction. However, no differences were observed in the $Ca^{2+}$ stores, when aortas from male and female were compared. Additionally, the results obtained after ovariectomy demonstrated that female sex hormones negatively modulate the activity of STIM1/Orai1 in aortas from female SHRSP. All together, these results suggest that activation of STIM1/Orai1 may represent a new mechanism that modulates intracellular $Ca^{2+}$ concentration during hypertension and contributes to sex differences in the vascular reactivity of hypertensive animals.


**Key words**: STIM1. Orai1. Vascular dysfunction. Sex differences. Sex hormones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Ativação do sistema STIM1/Orai1, como consequência à depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.....28
**Figura 2** – Hipótese de trabalho.....32
**Figura 3 –** Protocolo para avaliação do influxo de $Ca^{+2}$ e para avaliar a capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS.....38
**Figura 4** – Aortas de SHRSP demonstraram aumento do tônus espontâneo após a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.....46
**Figura 5** – A inibição dos canais CRAC preveniu parcialmente a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ e aboliu as diferenças na contração (tônus espontâneo) entre artérias de ratos SHRSP e WKY.....48
**Figura 6** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 , internalizados com a técnica de chariot, preveniram parcialmente a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$.....50
**Figura 7** – Canais CRAC contribuem para o repreenchimento dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.....52
**Figura 8** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram parcialmente a contração induzida por cafeína.....54
**Figura 9** – Aortas de ratos SHRSP apresentam aumento dos níveis STIM-1 e Orai1 (RNAm e proteína).....55
**Figura 10** – Aortas de ratos SHRSP apresentam aumento dos níveis de STIM1 e Orai1.....56
**Figura 11** – O bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS com tapsigargina aumentou a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos e fêmeas SHRSP e WKY.....59
**Figura 12** – Artérias de machos SHRSP apresentaram resposta contrátil aumentada ao $Ca^{2+}$ quando comparadas a fêmeas SHRSP. O bloqueio de canais CRAC diminuiu a resposta contrátil vascular ao $Ca^{2+}$.....61
**Figura 13** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram parcialmente a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$.....63

**Figura 14** – Não foram observadas diferenças sexuais na capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS.....65
**Figura 15** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram a contração induzida por cafeína.....66
**Figura 16** – Aortas de fêmeas apresentam aumento da expressão vascular de $Ca^{2+}$-ATPase2, comparadas a machos.....67
**Figura 17** – Aortas de fêmeas SHRSP apresentam redução da expressão vascular de STIM1 e Orai1 comparadas a machos SHRSP.....68
**Figura 18** – Aortas de machos SHRSP apresentam aumento dos níveis STIM-1 e Orai1, comparadas a aortas de fêmeas SHRSP.....69
**Figura 19** – O bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS com tapsigargina aumentou a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de fêmeas SHRSP ovariectomizadas.....72
**Figura 20** – O bloqueio de canais CRAC, com $Gd^{3+}$, na presença de tapsigargina, diminuiu a resposta contrátil vascular ao $Ca^{2+}$, abolindo as diferenças encontradas entre aortas de ratas SHRSP OVX e sham.....73
**Figura 21** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, aboliram as diferenças na contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$.....75
**Figura 22** – Ovariectomia não afetou a recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS.....76
**Figura 23** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram a contração induzida por cafeína.....77
**Figura 24** – Ovariectomia aumentou a expressão protéica de Orai1.....78
**Figura 25** – Aortas de ratos SHRSP apresentam aumento da atividade, mas não da expressão protéica, de PKC-α.....81
**Figura 26** – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 não normalizam o aumento da contração em resposta ao PDBu, em aortas de ratos SHRSP.....83
**Figura 27** – Mecanismo prosposto para explicar o aumento da contração em aortas de ratos SHRSP.....88
**Figura 28** – Mecanismo proposto para explicar diferenças relacionadas ao sexo durante o aumento da contração vascular na hipertensão.....92
**Figura 29** – Mecanismo proposto para explicar o papel dos hormônios sexuais na regulação da contração vascular na hipertensão.....94

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Classificação da pressão arterial de acordo com as medidas da pressão sistólica e diastólica, de acordo com a Associação Americana do Coração.....21
**Tabela 2** – Valores de hormônios sexuais no plasma de ratas WKY e SHRSP, sham ou OVX.....71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| **2-APB** | borato de 2-aminoetoxidifenil , |
| **BCA** | *Bicinchoninic Acid Assay*, Thermo Scientific) |
| **$Ca^{2+}$** | cálcio |
| **CEEA** | Comitê de Ética e Experimentação Animal |
| **CMLV** | células do músculo liso vascular |
| **COBEA** | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| **CRAC** | canais de $Ca^{2+}$ ativados pela liberação de $Ca^{2+}$ |
| **DAG** | diacilglicerol |
| **EDTA** | etilenediamino ácido tetracético dihidrato disodium |
| **EGTA** | etileno glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N′,N′-ácido tetracético |
| **$E_{max}$** | máximo efeito produzido pelo agonista |
| **EPM** | padrão médio |
| **$Gd^{3+}$** | gadolíneo |
| **$IP_3$** | trisfosfato de inositol |
| **$La^{3+}$** | lantâneo |
| **NP-40** | *nonyl phenoxylpolyethoxylethanol* |
| **OCT** | *optimal cutting temperature* |
| **OVX** | ovariectomizadas |
| **PBS** | tampão fosfato salina |
| **PBS-T** | tampão fosfato salina contendo triton 0.2% |
| **PBS-T/BSA** | tampão fosfato salina contendo triton 0.2% e albumina de soro bovino 1% |
| **$pD_2$** | logarítimo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima |
| **PE** | fenilefrina |
| **PIB** | produto interno bruto |
| **PKC** | proteína kinase C |
| **PMSF** | fluoreto de fenilmetanosulfonil |
| **RE** | retículo endoplasmático |
| **RS** | retículo sarcolplasmático |
| **SDS-PAGE** | *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel* |
| **sham** | não- ovariectomizadas ou falsa cirurgia |

| | |
|---|---|
| **SHR** | ratos espontaneamente hipertensos |
| **SHRSP** | ratos espontaneamente hipertensos susceptíveis a acidente vascular cerebral |
| **siRNA** | RNA de interferência |
| **SOCE** | entrada de $Ca^{2+}$ operada por estoques |
| **STIM1** | moléculas de interação estromal-1 |
| **TBS-Tween** | *Tris-Buffered Saline Tween-20* |
| **WKY** | wistar-Kyoto |

## LISTAS DE FÓRMULAS

| | |
|---|---|
| **$HCl$** | ácido clorídrico |
| **$Na_4P_2O_7$** | pirofosfato de sódio |
| **$NaF$** | fluoreto de sódio |
| **$Na_3VO_4$** | ortovanadato de sódio |
| **$NaCl$** | cloreto de sódio |
| **$NaHCO_3$** | biocarbonado de sódio |
| **$KCl$** | cloreto de potássio |
| **$KH_2PO_4$** | fosfato de potássio |
| **$MgSO_4 \bullet 7H_2O$** | heptahidrato sulfato de magnésio |
| **$CaCl_2 \bullet 2H_2O$** | dihidrato cloreto de cálcio |

**SUMÁRIO**

1 HIPERTENSÃO ARTERIAL.....20
1.1 Hipertensão arterial: um problema de saúde pública.....22
1.2 Fisiopatologia da hipertensão arterial: foco na vasculatura.....23
1.3 Hipertensão arterial e mecanismos de entrada de $Ca^{2+}$.....24
1.4 Aumento de $Ca^{2+}$ bifásico durante a contração celular.....25
*1.4.1 Participação de STIM1 e Orai1 na ativação de* SOCE.....26
1.5 Diferenças relacionadas ao sexo encontradas na hipertensão e na captação de $Ca^{2+}$ em CMLV.....29
1.6 Papel dos hormônios sexuais nas diferenças relacionadas ao sexo encontradas na hipertensão e na captação de $Ca^{2+}$ em CMLV.....30
1.7 Ativação da PKC pelo aumento de $Ca^{2+}$ intracelular.....31
2 HIPÓTESE DE TRABALHO.....32
3 OBJETIVOS.....33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....34
4.1 Animais.....34
4.2 Grupos experimentais.....34
4.3 Ovariectomia bilateral.....34
4.4 Medida de pressão arterial.....35
4.5 Reatividade vascular.....36
*4.5.1 Avaliação do influxo de $Ca^{+2}$.....37*
*4.5.2 Avaliação da capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS.....37*
*4.5.3 Inibição da cascata de sinalização intracelular utilizando anticorpos em segmentos vasculares isolados.....38*
*4.5.4 Resposta contrátil em resposta à ativação da PKC.....39*
4.6 Extração de RNA, síntese de cDNA e transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real.....40
4.7 Western blotting.....41
4.8 Ensaio de imunofluorescência.....41
4.9 Medida hormonal.....42
4.10 Atividade da PKC.....42
4.11 Análise estatística.....43
5 RESULTADOS.....45

5.1 Resultados referentes ao item 1 dos objetivos.....45
5.2 Resultados referentes ao item 2 dos objetivos.....57
5.3 Resultados referentes ao item 3 dos objetivos.....70
5.4 Resultados referentes ao item 4 dos objetivos.....80
6 DISCUSSÃO.....84
7 CONCLUSÃO.....96
REFERÊNCIAS.....97
ANEXOS.....105
Anexo A – Artigos publicados.....105

# 1 INTRODUÇÃO

O sistema circulatório funciona como um sistema de transporte corporal, sendo responsável pela condução, distribuição e remoção das mais diversas substâncias dos e para os tecidos do corpo. Os vasos sanguíneos transportam e distribuem o sangue, que é bombeado pelo coração, para atender as necessidades corpóreas de oxigênio, nutrientes e sinalizações hormonais, além de remover os metabólitos celulares. Para isso, a pressão arterial é altamente controlada, pois a sua redução irá acarretar diminuição do fluxo sanguíneo[1].

O valor numérico da pressão arterial é o resultado da medida de duas forças pressóricas: a pressão sistólica e a pressão diastólica. A pressão sistólica representa a medida da pressão que o sangue exerce nas artérias, no momento do batimento cardíaco, ou seja, quando o músculo cardíaco se contrai. A pressão diastólica, representa a medida da pressão que o sangue exerce nas artérias entre os batimentos cardíacos, ou seja, quando o músculo cardíaco está em repouso[2].

As características morfo-fisiológicas do sistema arterial, como por exemplo a elasticidade, garantem que o sangue seja distribuído para os tecidos e órgãos, e que o mesmo funcione como um reservatório pressórico para continuar o bombeamento do sangue enquanto o coração está em estado de relaxamento ou sendo repreenchido de sangue. Quanto maior a pressão exercida pelo sangue bombeado, maior é o estiramento arterial, facilitando assim o fluxo sanguíneo[3].

Sendo assim, podemos dizer que a pressão arterial é o resultado do débito cardíaco, que é o produto da frequência cardíaca e do volume sistólico; multiplicado pela resistência vascular periférica, que representa a força que regula a perfusão sanguínea, ou seja:

Pressão arterial = débito cardíaco • resistência vascular periférica

Consequentemente, podemos inferir que o débito cardíaco é inversamente proporcional à resistência vascular periférica para um mesmo nível de pressão arterial[4].

Mecanismos altamente eficientes, que envolvem ações integradas do sistema circulatório e de outros sistemas, controlam a manutenção da pressão arterial, para uma adequada perfusão dos tecidos. Por outro lado, esses mecanismos também controlam o aumento excessivo da pressão arterial, com o intuito de prevenir a fadiga cardíaca e o risco de danos vasculares, como por exemplo o rompimento de

pequenos vasos[5]. Em muitos casos, esses mecanismos podem não estar exercendo apropriadamente o seu papel, sendo incapazes de compensar completamente possíveis aumentos da pressão arterial, condição conhecida como hipertensão arterial[1]. Diversos são os fatores de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial, entre eles a hereditariedade, idade, obesidade, resistência à insulina, doenças renais, entre outros[6].

No caso da hipertensão arterial, a força que o fluxo sanguíneo exerce nas paredes arteriais é maior, e as artérias se estendem além do seu limite[3, 5]. Portanto, nos estados hipertensivos estabelecidos, encontramos o aumento da resistência vascular periférica e a diminuição do débito cardíaco[7].

A tabela seguinte contém a classificação da pressão arterial, segundo Associação Americana do Coração (American Heart Association).

**Tabela 1** – Classificação da pressão arterial de acordo com as medidas da pressão sistólica e diastólica, conforme estabelecido pela Associação Americana do Coração.

| Classificação da pressão arterial | Pressão Sistólica (mmHg) | | Pressão Diastólica (mmHg) |
|---|---|---|---|
| Normal | Menor que 120 | e | Menor que 80 |
| Pré-hipertenso | 120-139 | ou | 80-89 |
| Hipertenso – estágio 1 | 140-159 | ou | 90-99 |
| Hipertenso – estágio 2 | 160 ou acima | ou | 100 ou acima |
| Crise hipertensiva | Acima de 180 | ou | Acima de 110 |

Os danos vasculares ocasionados pelo aumento da pressão arterial podem comprometer o suprimento sanguíneo em órgãos vitais, resultando em uma condição conhecida como lesão em órgãos-alvo[6]. Um exemplo clássico de lesão em órgão-alvo, em consequência à hipertensão arterial, é a insuficiência cardíaca. Quando as artérias perdem sua capacidade elástica, o coração necessita aumentar a sua força contrátil, para que o sangue chegue até as artérias, condição a qual pode contribuir para danos no tecido cardíaco. Com isso, válvulas e o músculo cardíaco são lesionados, resultando em insuficiência cardíaca[8].

O exemplo acima demonstra que a hipertensão arterial contribui para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares[9]. Dentre as doenças cardiovasculares, a doença desenvolvida mais frequentemente, e a mais letal, é a doença coronariana. A seguir, discutiremos o impacto da hipertensão arterial no nosso país.

### 1.1 Hipertensão arterial: um problema de saúde pública

No ano de 2000, cerca de 1 bilhão de adultos em todo o mundo eram portadores de hipertensão arterial. Estudos de projeção estimam que em 2025, este número aumentará para 1,5 bilhão de hipertensos[10]. Se levados em consideração, estes números sugerem que 1 em cada 3 adultos irá desenvolver hipertensão arterial.

As doenças do aparelho circulatório representaram a principal causa de mortalidade no Brasil, tanto na década de 1980 como na década de 1990[11]. Dados mais recentes do Ministério da Saúde indicaram que, em 2005, cerca de 32% de todas as mortes no Brasil ocorreram em consequência das doenças cardiovasculares[12].

Entretanto, observou-se uma redução de 20,5% nas mortes por doenças cardiovasculares na população brasileira, no período entre 1990 a 2006. Estes números refletem os resultados de políticas mais eficientes na prevenção e tratemento dessas doenças[13]. Embora esses números sejam animadores, o custo do tratamento das doenças cardiovasculares ainda representa um grande gasto para os cofres públicos. Cerca de 30,8 milhões de reais foram gastos com o tratamento de doenças cardiovasculares, o que representa aproximadamente 1,74% do produto interno bruto (PIB) nacional. Se considerarmos que somente 3,76% do PIB brasileiro é destinado para o orçamento do Ministério da Saúde, podemos dizer que 46% deste dinheiro está comprometido com o tratamento das doenças cardiovasculares[14-15]. Portanto, políticas de promoção da saúde, visando a prevenção de doenças cardiovasculares são indispensáveis para a melhoria do nosso sistema de saúde.

Contudo, nem mesmo os grandes investimentos direcionados à prevenção e cura das doenças cardiovasculares são suficientes para melhorar os indicadores anteriormente discutidos. No caso da hipertensão arterial, sabe-se que somente 30% dos pacientes hipertensos têm seus níveis pressóricos normalizados através de

terapia farmacológica. Além disso, muitos pacientes, mesmo utilizando tratamentos farmacológicos anti-hipertensivos, não conseguem atingir a normalização dos níveis pressóricos, demonstrando-se refratários a vários tratamentos[16]. Portanto, a descoberta de novos mecanismos que contribuam para o desenvolvimento de hipertensão arterial poderá fornecer alvos para terapias mais eficazes visando o controle da pressão arterial e, consequentemente, contribuindo para a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares.

### 1.2 Fisiopatologia da hipertensão arterial: foco na vasculatura

Conforme anteriormente discutido, a vasculatura contribui diretamente para o controle da pressão arterial através da modulação da resistência vascular periférica. Sendo assim, as células do músculo liso vascular (CMLV) exercem um importante papel no controle da resistência vascular periférica. O estado contrátil tônico das CMLV é o primeiro determinante para o diâmetro do lúmen arterial, o que afeta diretamente o fluxo e a pressão sanguínea. Ajustes fisiológicos do tônus arteriolar dependem do estado contrátil das CMLV, as quais respondem a uma variedade de influências locais e sistêmicas.

Essas células, que se encontram na lâmina média da parede dos vasos sanguíneos, controlam o estado contrátil da vasculatura, mas também exercem importantes funções. Portanto, as CMLV representam células fascinantes, com um notável fenótipo de plasticidade, que contribui para a função vascular tanto em condições fisiológicas como patológicas[17].

O aumento da concentração do cálcio ($Ca^{2+}$) intracelular é um evento crucial para uma variedade de fenômenos celulares, incluindo aqueles que controlam as funções das CMLV. É consenso que o aumento global das concentrações de $Ca^{2+}$ citoplasmático leva à contração das CMLV [18]. Sendo assim, a regulação dos níveis intracelulares de $Ca^{2+}$ é crítica para a manutenção do tônus vascular[19].

O aumento de $Ca^{2+}$ pode ter origem de duas fontes distintas. Primeiro, através da entrada do $Ca^{2+}$ do meio extracelular, via canais presentes na membrana plasmática; e segundo, através da sua liberação de estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, que nas CMLV são representados principalmente pelo retículo sarcoplasmático (RS)[20].

Diversos são os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da disfunção vascular durante a hipertensão arterial: neurotransmissores, onde

incluímos o sistema nervoso simpático e o sistema não-colinérgico-não adrenérgico; sistemas hormonais, onde temos os hormônios do sistema renina-angiotensina, fator natriurético atrial e hormônio arginina vasopressina; fatores derivados do endotélio, como os fatores de contração (prostaglandinas, endotelina-1) e fatores de relaxamento (óxido nítrico, prostaciclina); fatores derivados de células sanguíneas, como serotonina, histamina e citocinas; componentes intrínsecos da célula de músculo liso vascular, onde incluímos receptores, canais iônicos e moléculas de sinalização[21-22].

Portanto, os mecanismos responsáveis pela elevação da resistência vascular periférica na hipertensão arterial são complexos e não totalmente compreendidos. Entretanto, sabe-se que: 1) o equilíbrio na sinalização de mecanismos celulares que promovem contração e relaxamento CMLV encontra-se alterado, favorecendo o estado contrátil; e que 2) o aumento da resistência vascular periférica é causado, em parte, por alterações nas CMLV, que as tornam mais sensíveis aos estímulos de contração [23]. Além disso, evidências indicam que os defeitos na regulação do $Ca^{2+}$ intracelular contribuem tanto para o aumento da contração das CMLV, como para o aumento da resistência vascular periférica[24].

Desta maneira, defeitos na regulação de $Ca^{2+}$ intracelular são considerados marcadores da disfunção vascular associada à hipertensão arterial. Esta condição tem um papel importante no aumento da reatividade vascular aos estímulos de contração, uma característica encontrada tanto na hipertensão arterial clínica quanto experimental[18-19], conforme anteriormente mencionado.

Corroborando esta idéia, dados demonstram que a concentração de $Ca^{2+}$ intracelular encontra-se aumentada em CMLV de hipertensos. Podemos citar como exemplo, o aumento dos níveis de $Ca^{2+}$ em CMLV de ratos hipertensos, que é atribuído ao aumento de $Ca^{2+}$ no RS e que contribui para o aumento do tônus vascular via mecanismos dependentes da liberação de $Ca^{2+}$ do RS[25].

Iremos agora descrever os mecanismos que contribuem para a entrada de $Ca^{+2}$ em CMLV, e como eles podem contribuir para alterações vasculares durante a hipertensão arterial.

### 1.3 Hipertensão arterial e mecanismos de entrada de $Ca^{2+}$

O aumento dos níveis de $Ca^{2+}$ em CMLV de animais hipertensos pode ser atribuído a diversos mecanismos, incluindo o aumento da liberação de $Ca^{2+}$ dos

estoques intracelulares[25]; redução da recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS[26-27]; disfunção de proteínas reguladoras de $Ca^{2+}$ no RS[28-29]; diminuição dos mecanismos da extrusão de $Ca^{2+}$ na membrana sarcoplasmática [19, 24] e aumento do influxo de $Ca^{2+}$ [30-31].

Vários mecanismos contribuem para o aumento da recaptação de $Ca^{2+}$ no RS, incluindo: 1) mecanismos dependentes da $Ca^{2+}$-ATPase do RS[25-27]; 2) alterações em proteínas de estocagem de $Ca^{2+}$ do RS, como por exemplo calreticulina e calsequestrina[28-29]; e 3) alterações na sinalização em condições de depleção do RS, o que leva à ativação de canais de $Ca^{2+}$ na membrana plasmática[32-33].

Este último processo envolve a ativação das moléculas de interação estromal-1 (STIM1), uma proteína que foi recentemente descrita como um sensor de $Ca^{2+}$ no RS, e Orai1, uma proteína que constitui os canais de $Ca^{2+}$ ativados pela liberação de $Ca^{2+}$ (CRAC) intracelular. Em seguida, iremos discutir como STIM1 e Orai1 podem contribuir para o influxo anormal de $Ca^{2+}$ em CMLV.

### 1.4 Aumento de $Ca^{2+}$ bifásico durante a contração celular

Praticamente todos os tipos celulares dependem da sinalização do $Ca^{2+}$ citoplasmático para o desenvolvimento de respostas específicas[34]. A utilização de $Ca^{2+}$ para a sinalização intracelular ocorre sob um fino controle local e global da concentração de $Ca^{2+}$ citoplasmático[35].

Quando as CMLV são estimuladas por um agonista contrátil, como por exemplo fenilefrina (PE, agonista de receptores alfa-adrenérgicos), essas células exibem um aumento bifásico da concentração de $Ca^{2+}$ no citosol, resultando em contração celular. Inicialmente, a interação agonista-receptor resulta na formação de trisfosfato de inositol ($IP_3$) e diacilglicerol (DAG), a partir de fosfolipídeos da membrana plasmática.

O aumento transitório inicial de $Ca^{2+}$ decorre da liberação de $Ca^{2+}$ pelos estoques intracelulares, que no caso de CMLV, corresponde ao $Ca^{2+}$ armazenado no RS. Nesse processo, $IP_3$ se liga ao seu receptor no RS, e estimula a liberação de $Ca^{2+}$ do RS para o citosol[36-37].

O aumento subsequente de $Ca^{2+}$ requer $Ca^{2+}$ extracelular, e corresponde à segunda fase de aumento de $Ca^{2+}$ no citosol. Quando os estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ são depletados, sinais do RS ativam canais de $Ca^{2+}$ presentes na membrana plasmática e resultam no influxo de $Ca^{2+}$ do meio extracelular para o meio

intracelular. Esse mecanismo, no qual o RS atua como um capacitador, é conhecido como entrada de $Ca^{2+}$ operada por estoques (SOCE)[38-39]. SOCE inicia-se com a ativação de canais iônicos altamente seletivos ao $Ca^{2+}$, e que funcionam independentemente de voltagem. Em muitos tipos celulares, SOCE resulta na ativação de uma corrente altamente seletiva ao $Ca^{2+}$, não voltagem-dependente, denominada corrente CRAC, que ocorre através da ativação de canais do tipo CRAC[39-41].

### *1.4.1 Participação de STIM1 e Orai1 na ativação de SOCE*

Por mais de 20 anos, os componentes que ativam o processo de sinalização entre o RS e a ativação de SOCE na membrana plasmática, em condições onde o RS é depletado, permaneceram um mistério. Entretanto, a descoberta de novos componentes que ligam o RS aos canais de $Ca^{2+}$ da membrana plasmática trouxe uma nova percepção referente à homeostasia de $Ca^{2+}$ intracelular.

Recentemente, dois grupos de pesquisas identificaram de forma independente uma proteína que funciona como um sensor de $Ca^{2+}$ intracelular, a qual foi denominada STIM1[32-33]. Inicialmente, foi demonstrado que a supressão da expressão de STIM1 em células S2 de Drosophila, reduzia significativamente a entrada de $Ca^{2+}$, em presença de tapsigargina, um bloqueador de $Ca^{2+}$-ATPase do retículo endoplasmático (RE)[32]. Tapsigargina estimula a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, resultando no influxo contínuo de $Ca^{2+}$, via SOCE. Simultaneamente, Liou e colaboradores (2005) obtiveram resultados similares em linhagens celulares de epitélio humano (HeLa) e de linfócitos T (Jurkat E6)[33].

Além da função de sensor de $Ca^{2+}$, STIM1 participa fisicamente da ativação dos canais de $Ca^{2+}$ da membrana plasmática. Spassova e colaboradores (2006) demonstraram que a hiperexpressão de STIM1 aumenta a atividade dos canais CRAC, resultando em aumento no influxo de $Ca^{2+}$, via canais CRAC[42].

STIM1 é, portanto, um elemento fundamental na ativação dos canais CRAC. A descoberta de STIM1 trouxe a necessidade de se melhor entender como STIM1 interage com outros componentes na membrana plasmática, promovendo o repreenchimento dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados à função de STIM1 surgiu após a descoberta de uma proteína denominada Orai1. Foi demonstrado que pacientes portadores de síndrome de imunodeficiência severa

possuíam uma mutação na proteína Orai1, o que acarretava na diminuição da função dos canais do tipo CRAC[43]. Adicionalmente, estudos utilizando a técnica de "patch-clamp" demonstraram que Orai1 modula a corrente do tipo CRAC, em células S2 de Drosophila[44]. Estes dados, demonstrando que Orai1 afeta diretamente os canais CRAC, originaram a hipótese de que essa proteína poderia estar interagindo diretamente com STIM1.

Subsequentemente, demonstrou-se que a hiperexpressão de STIM1 e Orai1 aumentava significativamente a corrente CRAC[45]. Adicionalmente, observou-se o aumento da interação entre STIM1 e Orai1 em presença de tapsigargina[46]. Além disso, a substituição de uma hélice na porção transmembrânica da proteína Orai1 resultou na diminuição do influxo de $Ca^{2+}$, demonstrando que Orai1 é essencial para a formção do poro dos canais CRAC[47]. A expressão simultânea de STIM1 e Orai1 resultou em grande ganho na função SOCE e demonstrou que juntas essas proteínas eram capazes de mediar SOCE[48-50].

Esses dados foram confirmados em um estudo onde demonstrou-se que, em condições onde os estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ são depletados, STIM1 e Orai1 se movem de forma coordenada, formando um complexo entre o ER e membrana plasmática, criando a unidade fundamental para SOCE[51]. Essa formação onde STIM1 e Orai1 se associam foi denominada "puncta". A figura 1 exemplifica como ocorre a ativação de STIM1 e Orai1 em condições onde o $Ca^{2+}$ do RS é depletado.

A utilização da técnica de transfecção com RNA de interferência (siRNA) para STIM1, em células do músculo liso de vias aéreas, foi capaz de bloquear correntes originadas após a depleção do RS. Além disso, resultados similares foram obtidos com bloqueio farmacológico dos canais CRAC, incluindo a utilização de borato de 2-aminoetoxidifenil (2-APB), gadolínio ($Gd^{3+}$) e lantânio ($La^{3+}$)[52]. Estes estudos ofereceram evidências que confirmam a teroria de que Orai1 representaria a unidade formadora dos poros dos canais CRAC.

Sendo assim, podemos concluir que STIM1 e Orai1 são proteínas que estão associadas diretamente ao controle do $Ca^{2+}$ intracelular. Entretanto, o papel dessas proteínas regulatórias durante a hipertensão arterial ainda é pouco conhecido. Sendo assim, é admissível que o aumento da expressão ou da atividade de STIM1 e Orai1 na vasculatura de animais hipertensos poderia contribuir para o aumento da reatividade vascular, através do desequilíbrio da homeostasia de $Ca^{2+}$ intracelular.

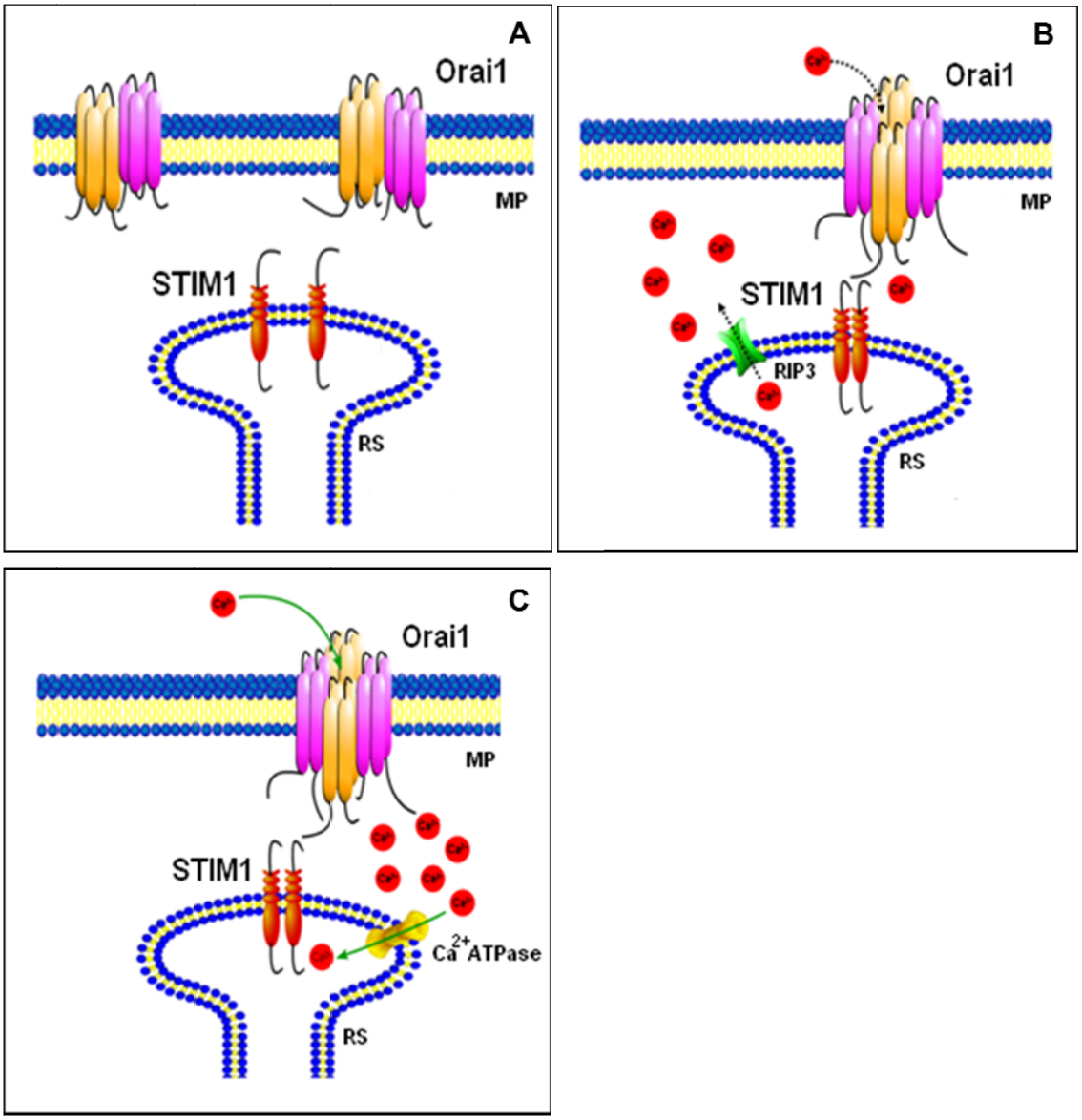



**Figura 1 – A ativação do sistema STIM1/Orai1 como consequência da depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.** A) Em condições basais, Orai1 encontra-se dimerizado na membrana plasmática e STIM1 encontra-se inativado no RS. B) Quando os estoques de $Ca^{2+}$ do RS são depletados o sensor de $Ca^{2+}$ STIM1 é ativado. (C) STIM1 se dimeriza e migra para próximo da membrana plasmática. Dois dímeros de Orai1 se dimerizam entre si, formando o poro funcional do canal CRAC. Juntos, STIM1 e Orai1 interagem entre si, em uma formação denominada "puncta". $Ca^{2+}$ do meio extracelular começa a ser recaptado através dos canais CRAC, culminando no reabastecimento dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, através da recaptação deste cátion via $Ca^{2+}$-ATPase do RS.

## 1.5 Diferenças relacionadas ao sexo encontradas na hipertensão e na captação de $Ca^{2+}$ em CMLV

Mecanismos que contribuem para a hipertensão arterial e lesões em órgãos-alvo são diferentemente regulados entre machos e fêmeas. O aumento da pressão arterial ocorre mais precocemente e é maior em homens, quando comparados a mulheres na pré-menopausa[53-58]. Diferenças sexuais na hipertensão arterial também existem em muitos modelos de hipertensão experimental, onde destacamos os ratos espontaneamente hipertensos (SHR)[59-60]. Diferenças associadas ao sexo na hipertensão arterial são amplamente descritas, onde destacam-se diferenças nos mecanismos neurais, renais e vasculares associados ao controle da pressão arterial[61-65].

Sabe-se que diferenças sexuais no tônus vascular ocorrem em uma variedade de leitos vasculares tanto em humanos como em animais . Entretanto, os mecanismos que determinam as diferenças no tônus vascular e, consequentemente, na pressão arterial entre machos e fêmeas ainda não são completamente entendidos. Considerando que já foram identificadas diferenças sexuais nos mecanismos que regulam a entrada e o armazenamento de $Ca^{2+}$ nas CMLV[54, 65-66], parece plausível que essas diferenças possam contribuir para as alterações associadas ao sexo na função vascular durante a hipertensão.

De fato, CMLV de fêmeas apresentam redução no influxo de $Ca^{2+}$ e na despolarização induzida por níveis elevados de $Ca^{2+}$, quando comparadas com CMLV de machos[67]. Além disso, aortas de fêmeas (SHR) apresentam contração diminuída, em resposta ao influxo de $Ca^{2+}$, quando comparadas com aortas de machos SHR[68] .

As diferenças no aumento de $Ca^{2+}$ intracelular em CMLV de machos e fêmeas SHR são abolidas na ausência de $Ca^{2+}$ extracelular[54, 65, 69-70], indicando que o influxo de $Ca^{2+}$ representa um mecanismo que contribui para essa diferença sexual. Considerando que o aumento da função de STIM/Orai1 pode representar um dos mecanismos que contribui para a regulação anormal de $Ca^{2+}$ em CMLV de hipertensos, nós propomos que a proteção vascular observada em fêmeas hipertensas reflete uma menor sinalização de STIM/Orai1, quando comparadas a machos hipertensos.

## 1.6 Papel dos hormônios sexuais nas diferenças relacionadas ao sexo encontradas na hipertensão e na captação de $Ca^{2+}$ em CMLV

As observações clínicas de que a hipertensão arterial é mais comum em homens e em mulheres na pós-menopausa, do que em mulheres pré-menopausa, sugerem que os hormônios sexuais femininos exercem efeitos protetores na vasculatura, incluindo a inibição do tônus vascular[71-72]. Diversos estudos investigaram os efeitos desses hormônios na vasculatura, mas os resultados mais interessantes e promissores são os de estudos onde se avaliaram os efeitos do estrógeno.

Os efeitos benéficos do estrógeno se traduzem em uma variedade de fatores, como a modificação da composição de lipoproteínas circulantes, diminuição na coagulação sanguínea, assim como ação vasodilatadora direta dos vasos sanguíneos[73-74]. Embora sugira-se que o endotélio exerça um importante papel na vasodilatação mediada pelo estrógeno, sabe-se que este hormônio também promove vasodilatação em artérias sem endotélio, sugerindo que o estrógeno promova relaxamento atuando diretamente em CMLV[75-78].

Como discutido anteriormente, é de consenso que o aumento da entrada de $Ca^{2+}$ na CMLV é um dos fatores que contribuem para o aumento da reatividade vascular em animais hipertensos, sendo que esse aumento é ainda mais pronunciado em artérias de machos hipertensos.

Essas observações direcionaram a uma nova hipótese: que os hormônios sexuais femininos contribuem para a proteção do sistema cardiovascular, através da normalização dos níveis de $Ca^{2+}$ intracelular[64, 67, 79].

Corroborando esta idéia, alguns estudos observaram que a ovariectomia induz aumento da entrada de $Ca^{2+}$ em CMLV de fêmeas. Além disso, quando fêmeas ovariectomizadas recebiam implantes intra-dérimicos contendo 17-β-estradiol, os níveis de $Ca^{2+}$ intracelulares eram normalizados[67-68, 72].

Embora os hormônios sexuais exerçam efeitos benéficos no sistema cardiovascular, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais eles atuam. Sabe-se que estas diferenças no aumento do $Ca^{2+}$ intracelular estão diretamente relacionadas a entrada de $Ca^{2+}$. Entretanto, os mecanismos que levam a este aumento ainda não foram elucidados. Sendo assim, o estudo da interação entre os hormônios sexuais e o sistema STIM1/Orai1 surge como uma hipótese interessante

a ser estudada, representando um mecanismo para explicar o aumento do $Ca^{2+}$ intracelular na ausência dos hormônios sexuais.

### 1.7 Ativação da PKC pelo aumento de $Ca^{2+}$ intracelular

O aumento de $Ca^{2+}$ intracelular resulta na ativação de proteínas que participam da processo de contração celular, como por exemplo a proteína kinase C (PKC).

Existem diferentes isoformas de PKC, e elas são classificadas em três grupos: as PKCs convencionais α, βI, βII e γ, que são ativadas por $Ca^{2+}$; as PKCs novas δ, ε, η(L) e θ, que não necessitam de $Ca^{2+}$ para sua ativação; e as PKCs atípicas ζ e λ, que dependem de fosfatidilserina, mas não são ativadas por DAG, forbol-ésteres ou $Ca^{2+}$.

Sabe-se que a ativação de diferentes isoformas da PKC em CMLV de animais hipertensos resulta em maiores contrações vasculares[80-81]. Alguns estudos demonstram que embora artérias de SHR apresentem aumento da contração em resposta à ativação da PKC, não foi observado o aumento da sua atividade ou da afinidade de ligação entre a PKC e seus agonistas (forbol-ésteres)[82-83]. Especulou-se que as alterações na contração das CMLV em animais hipertensos poderiam estar relacionadas a eventos associados ao aumento da mobilização de $Ca^{2+}$ no citosol celular, o que resultaria no aumento da ativação da PKC.

Tendo em vista o importante papel que STIM1 e Orai1 exercem na regulação da entrada de $Ca^{2+}$ nas CMLV, parece plausível que o aumento da atividade dessas proteínas poderiam resultar em aumento dos níveis de $Ca^{2+}$ livre no citosol e, consequentemente, sinalizar a maior ativação da PKC.

## 2 HIPÓTESE DE TRABALHO

A hipótese do presente estudo foi que a vasculatura de machos hipertensos apresenta aumento da resposta contrátil ao $Ca^{2+}$, primariamente devido a diferenças em mecanismos que controlam a captação de $Ca^{+2}$, STIM1 e Orai1.

Além disso, sabemos que fêmeas hipertensas apresentam redução na contração vascular, quando comparadas a machos hipertensos. Propomos que a ativação das proteínas STIM1 e Orai1 encontra-se atenuada em miócitos vasculares de fêmeas hipertensas, quando comparada a aquela em machos hipertensos. Essa menor ativação da via STIM1/Orai1 em artérias de fêmeas hipertensas poderia contribuir para a proteção vascular. Neste sentido, é possível que os hormônios sexuais participem diretamente neste processo.

Finalmente, sugerimos que o aumento na ativação da via STIM1/Orai1 resulte em aumento intracelular de $Ca^{2+}$, possibilitando maior ativação de proteínas ativadas por $Ca^{2+}$ que contribuem para o processo contrátil, como por exemplo, PKC.

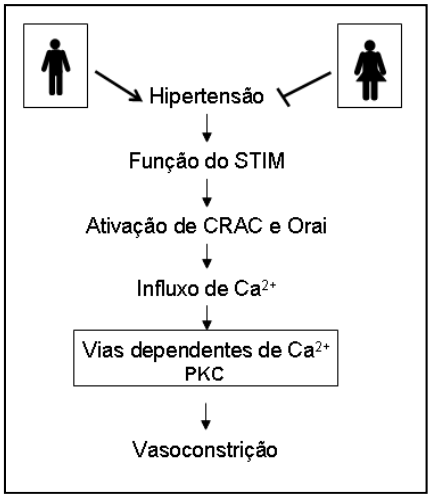



**Figura 2 – Hipótese de trabalho**. A ativação dos canais CRAC/Orai1, através da ativação do sensor de $Ca^{2+}$, STIM1, contribui para o aumento da contração em resposta ao $Ca^{2+}$ na hipertensão arterial. A hiperativação do sistema STIM1/Orai1 é menor na vasculatura de fêmeas hipertensas, quando comparada à de machos hipertensos e, portanto, artérias de fêmeas hipertensas apresentam menor resposta contrátil. Além disso, aumento de $Ca^{2+}$ intracelular resulta em maior ativação de proteínas dependentes de $Ca^{2+}$ e que participam do processo de contração, como por exemplo PKC.

## 3 OBJETIVOS

Avaliar a participação da via STIM1/Orai1 no aumento da contração vascular em consequência ao aumento do influxo de $Ca^{2+}$ em CMLV de ratos hipertensos. Adicionalmente, estudar se esta via contribui para as diferenças sexuais observadas na resposta contrátil, entre machos e fêmeas hipertensos.

Para isso, avaliamos os seguintes pontos:

**1:** a contribuição da via STIM1/Orai1 para a resposta contrátil durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em artérias de machos hipertensos.

**2:** a contribuição da via STIM1/Orai1 para as diferenças sexuais observadas na resposta contrátil durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em artérias de machos e fêmeas hipertensos.

**3:** a contribuição exercida pelos hormônios sexuais femininos na via STIM1/Orai1, em artérias de fêmeas hipertensas ovariectomizadas.

**4:** se o aumento de $Ca^{2+}$, em resposta a maior ativação da via STIM1/Orai1, contribui para a ativação da PKC em artérias de machos hipertensos.

# 4 MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Animais

Machos e fêmeas da linhagem de ratos espontaneamente hipertensos susceptíveis a acidente vascular cerebral (stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP), com 20-22 semanas, provenientes da colônia do Medical College of Georgia, e seus controles Wistar-Kyoto (WKY), com a mesma idade, provenientes dos Laboratórios Harlan (Indianápolis, IN – EUA), foram utilizados nos estudos. Todos os procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEA 007/004). Além disso, os procedimentos realizados neste estudo também seguiram as normas do guia de princípios adotados para a experimentação animal, aprovado pelo comitê de uso de animais para a pesquisa e educação do Medical College of Georgia.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (quatro por caixa), as quais foram acondicionadas em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2ºC) e ciclos claro-escuro de 12h, com livre acesso a água e alimento.

## 4.2 Grupos experimentais

Os seguintes grupos experimentais foram utilizados para testar especificamente cada um dos objetivos:

- Item 1 dos objetivos: machos WKY e SHRSP.
- Item 2 dos objetivos: machos e fêmeas WKY e SHRSP.
- Item 3 dos objetivos: fêmeas WKY e SHRSP, ovariectomizadas (OVX) ou não (sham).
- Item 4 dos objetivos: machos WKY e SHRSP.

## 4.3 Ovariectomia bilateral

Fêmeas SHRSP e WKY foram anestesiadas com isoflurano, administrado em uma mistura com oxigênio ($O_2$) através de um vaporizador de precisão. A indução da anestesia foi realizada com isoflurano 5% (em $O_2$) e a sua manutenção com isoflurano 3% (em $O_2$). Uma incisão única, de aproximadamente 5 centímetros foi realizada na porção centro-inferior do abdômen. O útero e os ovários foram localizados e realizou-se a ligadura dos ovários com fio de sutura. Seguiu-se a

remoção bilateral dos ovários, com o auxílio de uma tesoura. Nos grupos controles (sham), realizou-se apenas a incisão e localização dos ovários, sem remoção ou ligadura dos mesmos. Os tecidos internos (músculo) foram suturados com fio reabsorvível e a incisão na pele foi fechada com grampos cirúrgicos, os quais foram removidos manualmente 10 dias após a cirurgia, com um extrator de grampos.

As fêmeas receberam uma dose única de analgésico após o procedimento cirúrgico (cetorolaco de trometamina - 1mg/kg, intra-muscular). Depois de 12 semanas de ovariectomia (OVX) ou da falsa cirurgia (sham), a pressão arterial foi avaliada e os experimentos de reatividade vascular realizados. Nesta ocasião, tecidos foram coletados para a realização de *western blot*. Além disso, o peso corporal e do útero (seco) foi determinado e o sangue coletado para a verificação dos níveis hormonais, com o intuito de verificar a eficiência da ovariectomia.

### 4.4 Medida de pressão arterial

A pressão arterial caudal foi determinada por método indireto em ratos acordados, através da técnica de pletismografia de cauda. Dois dias antes da primeira medida de pressão arterial caudal, os ratos foram submetidos a um período de adaptação que envolvia o aquecimento dos animais em uma caixa mantida a 31 $^{o}$C por 10 minutos e a contenção em cilindro de acrílico com abertura para o focinho e cauda, por 5 minutos. Este procedimento foi realizado uma vez ao dia durante dois dias.

Após o procedimento de adaptação, os níveis pressóricos dos ratos foram determinados. Para isso os ratos foram aquecidos por 10 minutos a 31 $^{o}$C e colocados no cilindro de contenção. Um oclusor foi ajustado à porção proximal da cauda e acoplado a um transdutor pneumático caudal elétrico PE-399 conectado a um sistema de transdução. O valor final da pressão arterial caudal de cada animal representa a média aritmética de três medidas sequênciais.

### 4.5 Reatividade vascular

Os animais foram sacrificados em câmara de $CO_2$. A aorta torácica foi removida e limpa de tecido adiposo e conjuntivo, em solução de Krebs fria (4 °C) contendo os seguintes sais (mM): NaCl, 130; $NaHCO_3$, 14,9; KCl, 4,7; $KH_2PO_4$, 1,18; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,18; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1,56; EDTA, 0,026; glicose 5,5. Nesta ocasião, tecidos também foram coletados para a realização de protocolos de biologia molecular e de imagem.

Preparação dos segmentos vasculares:

Aortas: segmentos vasculares (de 4mm de comprimento) foram montados como preparações em anéis em cubas metálicas horizontais. O endotélio foi mecanicamente removido com uma haste metálica.

As cubas metálicas horizontais, tanto para aorta como para artérias de resistência, encontram-se acopladas a um miógrafo (Mulvany-Halpern, modelo 610M, Danish MyoTech, Aarhus, Dinamarca) para medida da tensão isométrica. Medidas de contração e relaxamento vascular foram realizadas utilizando um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/SP - ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, Estados Unidos).

A limpeza e a montagem das aortas foram realizadas em solução de Krebs fria. Após a montagem das aortas nos miógrafos, ajustou-se a tensão basal dos anéis de aorta para 30mN. Seguiu-se um período de estabilização de 60 minutos em solução fisiológica, a 37 °C, continuamente aerada com uma mistura de gases contendo $CO_2$ (5%) e $O_2$ (95%). A integridade arterial foi determinada primeiramente, através da estimulação das artérias com solução de alta concentração de potássio (120mM). As artérias foram lavadas com solução fisiológica e submetidas a um novo período de estabilização. A eficácia da remoção do endotélio foi avaliada em um protocolo onde as aortas eram contraídas com fenilefrina (PE, 1μM) e posteriormente estimuladas com acetilcolina (10μM). A completa remoção do endotélio foi caracterizada pela ausência de resposta de relaxamento após a estimulação com acetilcolina, a qual induz vasodillatação dependente do endotélio.

Aortas de todos os grupos experimentais foram submetidos a um protocolo experimental específico, objetivando determinar as respostas contráteis ao $Ca^{2+}$ que ocorrem em resposta à depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.

A seguir, detalharemos o protocolo usado para avaliar a contração em resposta à entrada de $Ca^{2+}$ após a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$

(Figura 3 - indicação 1 da figura) assim como para verificar a capacidade de recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS (Figura 3 – indicação 2 da figura). Além disso, detalharemos o protocolo utilizado para avaliar a ativação da PKC .

### *4.5.1 Avaliação do influxo de $Ca^{+2}$*

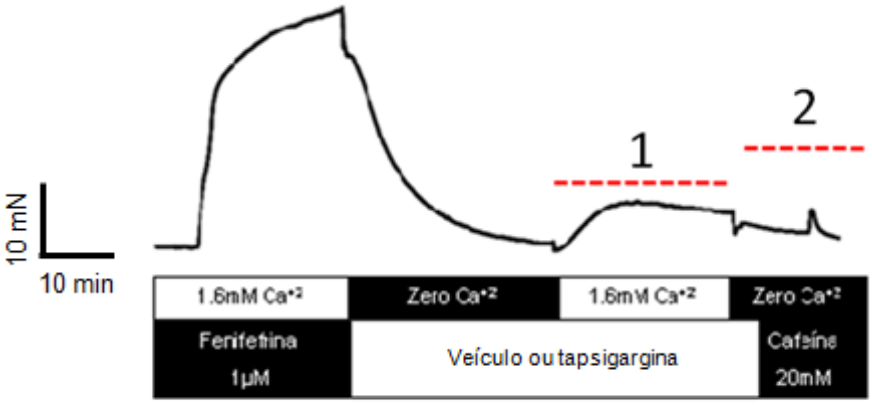
Inicialmente, aortas foram estimuladas com PE (1uM) até que a resposta contrátil atingisse o platô. Os vasos foram então lavados com solução fisiológica livre de $Ca^{2+}$, contendo EGTA (1µM), um quelante utilizado para remover o $Ca^{2+}$ residual. Esta manobra farmacológica proporciona o esvaziamento dos estoques de $Ca^{2+}$ do RS, resultando na estimulação do sensor de $Ca^{2+}$, STIM1[24, 84].

Seguiu-se então a reintrodução de solução fisiológica contendo $Ca^{2+}$ (1,6mM $Ca^{2+}$), o que ocasiona a entrada de $Ca^{2+}$ (período de influxo de $Ca^{2+}$), uma vez que STIM1 encontra-se ativado, e proporciona o repreenchimento dos estoques intracelulares. A entrada de $Ca^{2+}$ gera uma resposta contrátil espontânea, durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ (Figura 3 – parte 1).

É amplamente aceito que a magnitude da contração está diretamente relacionada com a concentração de $Ca^{2+}$ intracelular livre. Esta técnica, onde o influxo de $Ca^{2+}$ em condições de depleção do RS é verificado indiretamente em CMLV, é amplamente validada através de trabalhos de Karaki e colaboradores[84] e por trabalhos previamente publicados por nosso laboratório[24].

### *4.5.2 Avaliação da capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS*

A capacidade funcional do RS em recaptar $Ca^{2+}$ foi avaliada em aortas, ao final do protocolo experimental (parte 2 na figura 3), após o período de influxo de $Ca^{2+}$. Aortas foram acondicionadas em solução fisiológica livre de $Ca^{2+}$ por dois minutos e estimuladas com cafeína (20mM), o que resulta na ativação de receptores de rianodina no RS e rápida liberação de $Ca^{2+}$ do RS, proporcionando uma contração transitória (Figura 3 – parte 2).




1 – Período de influxo de $Ca^{2+}$

2 – Capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS

**Figura 3– Protocolo para avaliação do influxo de $Ca^{+2}$ e para avaliar a capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS**. A medida da contração foi realizada em dois momentos: 1) após a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, com a reintrodução de $Ca^{2+}$ à solução fisiológica, para avaliar o influxo de $Ca^{2+}$ através de canais de $Ca^{2+}$ da membrana plasmática e 2) após a estimulação com cafeína, para avaliação da capacidade de recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS.

Os protocolos descritos em 4.5.1 e 4.5.2 foram realizados na ausência e na presença de tapsigargina (10µM), um inibidor da $Ca^{2+}$-ATPase do RS[85]. Essa droga impede o retorno de $Ca^{2+}$ ao RS. A ausência de $Ca^{2+}$ no RS resulta em contínua estimulação do sensor de $Ca^{2+}$, STIM1, e abertura constante dos canais de $Ca^{2+}$ na membrana plasmática. Essa manobra farmacológica resulta em uma amplificação na resposta contrátil durante o influxo de $Ca^{2+}$ e na redução da contração transitória em resposta à cafeína (20mM).

### *4.5.3 Inibição da cascata de sinalização intracelular utilizando anticorpos em segmentos vasculares isolados*

Inibidores farmacológicos dos canais CRAC, 2-APB (100µM) [86-87] e $Gd^{3+}$ (100µM)[87-88]; assim como anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 transfectados com a técnica de chariot foram utilizados para avaliar a participação de STIM1 e Orai1 na contração induzida pelo influxo de $Ca^{2+}$ ou durante a estimulação do RS.

Em trabalho recente[89], demonstrou-se que anticorpos podem servir como inibidores específicos de componentes da cascata de sinalização em CMLV, em segmentos vasculares isolados.

Anticorpos contra STIM1 e Orai1 foram internalizados através da técnica de Chariot (Chariot™ Protein Delivery Reagent, Active Motif, Carlsbad, CA). Este reagente de transfecção é capaz de internalizar anticorpos nas células, preservando a sua habilidade de localizar os compartimentos celulares e reconhecer antígenos dentro da célula. O chariot também é utilizado para internalizar proteínas no tecido vascular[31] e durante nossos experimentos foi utilizado para inibir diretamente STIM1 e Orai1.

O complexo chariot e anticorpo foi preparado da seguinte forma: inicialmente, o agente chariot foi dissolvido em água (de acordo com as instruções do fabricante - Chariot™ Protein Delivery Reagent (Active Motif, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para cada transfecção, 12µl da solução de Chariot foram dissolvidos em 100 µll de solução de dimetil sulfóxido (40%). O anticorpo (6µg) foi adicionado a 100µl de tampão fosfato-salina. A solução contendo o anticorpo e a solução contendo o chariot foram misturadas e incubadas em temperatura ambiente durante 30 minutos para a formação do complexo chariot-anticorpo.

Os anéis de aorta foram acondicionados em placas de culturas estéreis de 24 poços incubados em uma estufa de cultura a 37ºC contendo $CO_2$ (5%) e $O_2$ (95%), em meio de cultura (EMEM – 400µl) contendo L-glutamina (1%), soro fetal bovino (10%), penicilina (0,5%) e estreptomicina (0,5%). O complexo chariot/anticorpo (200µl) foi adicionado ao meio, por 1 hora. Após esse período, foram adicionados 750µl de meio de cultura, e os vasos foram incubados por mais duas horas a 37 ºC. Depois desse período de incubação, as artérias foram montadas em miógrafos para realização de estudos funcionais, conforme previamente descrito no item 4.5.

### *4.5.4 Resposta contrátil em resposta à ativação da PKC*

Curvas concentração-efeito foram realizadas em aortas, utilizando-se PDBu (phorbol-12,13 dibutyrate, 1nM a 3,5 µM), um agonista da PKC[90]. Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 foram transfectados com a técnica de chariot (descrita acima) e utilizados para avaliar a participação de STIM1 e Orai1 na contração em resposta a ativação da PKC.

### 4.6 Extração de RNA, síntese de cDNA e transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA total foi extraído de aortas sem endotélio, utilizando-se um kit comercial para extração de RNA (RNeasy kit - Qiagen Sciences, MD, USA). A quantidade, integridade e pureza das amostras de RNA foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Um µg de RNA total foi utilizado para a transcrição reversa num volume final de 50µL, usando-se o kit de alta capacidade de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Em seguida, o produto de cDNA foi armazenado em temperatura de -20ºC. Sondas de RNAm para STIM1 (cat# Rn00968446_m1) e Orai1 (cat# Rn 02397170_m1) foram obtidas através da Applied Biosystems. A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada usando-se o sistema de PCR em tempo real rápido 7,500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) num volume total de 20µL seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante e utilizando o reagente TaqMan® para PCR universal rápido (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 0,1 µM de cada sonda. Para verificar a especificidade das sondas, amostras controle negativo contendo água ao invés de cDNA foram utilizadas para todas as sondas. Cada amostra foi normalizada com base no RNA ribossômico 18S. A quantificação de RNA ribossômico 18S foi realizada com o reagente de RNA ribossômico TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante. A expressão gênica relativa foi normalizada por um calibrador escolhido como sendo a condição basal (grupo controle) para cada ponto de tempo. Os resultados foram calculados pelo método ΔΔCT e expressos como vezes de mudança (*X-mudança*) na expressão gênica relativa ao RNA ribossômico 18S e ao calibrador da seguinte forma:

$X\text{-}mudança = 2^{-(\Delta CT \text{ da amostra} - \Delta CT \text{ do calibrador})}$, onde o parâmetro CT (limiar) é definido como o número fracional de ciclos no qual o sinal detector da reação de PCR ultrapassa um limiar fixo. Os valores de ΔCT das amostras e do calibrador foram determinados subtraindo o valor médio de CT do transcrito sob investigação do valor médio de CT do gene 18S rRNA de cada amostra.

### 4.7 *Western blotting*

Aortas foram dissecadas e homogeneizadas em um tampão de lise contendo um coquetel de inibidores de proteases ([4-{2-aminoetil} fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina]; Sigma Aldrich) usando-se um homogeinezador mecânico de tecidos. O ensaio de BCA (*Bicinchoninic Acid Assay*, Thermo Scientific) foi utilizado para medir a concentração de proteína. Um total de 40 µg de proteínas foi carregado em gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel*) 10% e, em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado (5%), as membranas foram incubadas individualmente, com anticorpo primário policlonal anti-Orai1 (ProSci), anti-STIM1 (ProSci), anti-$Ca^{2+}$-ATPase2 (Cell-signaling) ou anti-PKC-alpha (Cell-signaling), na diluição de 1:1000. As incubações foram realizadas por um período de 20 horas a temperatura de 4ºC. Após esta incubação, as membranas foram lavadas por quinze minutos, 3 vezes, com tampão Tris contendo Tween [*Tris-Buffered Saline Tween-20*, TBS-T (100 mL de TBS 10X; 1 mL de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1 L)] e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (GE Healthcare) durante 1 hora, na diluição de 1:2000, sob a agitação e à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T, 3 vezes por quinze minutos cada, e a detecção foi realizada com kit de quimioluminescência (PIERCE). Por fim, as membranas foram expostas a uma chapa de filme fotográfico para verificação da presença de bandas. A intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométrica utilizando o software Un-Scan-It (Silk Scientific, Inc., Orem Utah, Estados Unidos). Correções foram realizadas pela expressão de β-actina (Sigma – 1:1000; anti-β-actina, produzido em camundongo).

### 4.8 Ensaio de imunofluorescência

A expressão protéica de STIM1 e Orai1 em aortas sem endotélio (mecanicamente removido), provenientes de machos e fêmeas SHRSP e WKY, foi determinada por ensaio de imunofluorescência. Aortas foram congeladas em meio para congelamento de tecido para corte histológico OCT (*optimal cutting temperature*), mantidas a -80°C para posterior obtenção de cortes histológicos. Os cortes histológicos foram colocados em lâmina de vidro, circulados com uma caneta hidrofóbica e lavados com tampão fosfato salina (PBS) contendo Triton 0.2% (PBS-

T), por 3 vezes durante 5 minutos cada, em temperatura ambiente e posteriormente fixados em acetona por 5 minutos, a -20°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de PBS contendo albumina de soro bovino 1% (PBS-T/BSA), por 10 minutos em temperatura ambiente. A expressão protéica de STIM1 e Orai1 foi determinada pela incubação simultânea dos cortes com anti-STIM1 (1:100; policlonal, produzido em coelho, ProSCi) e anti-Orai1 (1:100; policlonal, produzido em camundongos, Abcam), a 4ºC, durante 12 horas. Os cortes histológicos foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos, lavados 3 vezes com PBS-T, por 5 minutos e incubados simultaneamente com anticorpos secundários anti-camundongo, produzido em cabra [Flúor 588, (1:1000, fluorescência verde; Invitrogen)] e com anti-coelho, produzido em cabra [Alexa Flúor 568 (1:1000, fluorescência vermelha; Invitrogen)], seguido por nova lavagem com TBS-T 3 vezes por 5 minutos. A adição de anticorpos primários foi omitida em lâminas controle negativo. Imagens foram captadas por microscopia confocal (LSM 510 Meta 3.2, Zeiss) com capacidade de aumento de 10x a 40x.

### 4.9 Medida hormonal

As medidas hormonais de estradiol, progesterona e testosterona foram realizadas no plasma. O sangue foi obtido por punção cardíaca e acondicionado em tubos Falcon® contendo heparina. Em seguida, o sangue foi centrifugado (10000rpm, 10 minutos) e o plasma coletado e armazenado em freezer -80°C, para uso posterior.

As medidas hormonais foram realizadas por kit de radioimunoensaio: estradiol (cat # DSL48000), progesterona (cat # DSL 3400) e testosterona (cat # DSL4100). Todos os kits foram provenientes da Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Texas).

### 4.10 Atividade da PKC

Inicialmente, as aortas foram submetidas a um protocolo de imunoprecipitação. Foram homogeinizadas em tampão de lise (20 mM Tris–HCl, pH 7,4; 5 mM $Na_4P_2O_7$; (difosfato de sódio); 100 mM NaF (fluoreto de sódio); 2 mM $Na_3VO_4$ (ortovanadato de sódio); 1% NP-40 (*nonyl phenoxylpolyethoxylethanol*); e 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil). Esta mistura foi sonicada e restos de tecido e células removidos por centrifugação (12000 rpm, 20 minutos – 4 °C). O

sobrenadante foi coletado e quantificação de proteína foi realizada por método colorimétrico BCA (Thermo Scientific). O volume equivalente a 500µg de proteína (total) foi incubado com 2µg de anticorpo anti-PKCα (Abcam) e 40µl de proteína A/G mais agarose (Santa Cruz Biotechnology) por 12 horas a 4°C em constante rotação. O produto da imunopreciptação foi ressuspenso e homogeinizado em 20 µl de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, 50 mM β-mercaptoetanol, 10 mM EGTA, 10 mM benzamidina, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.5). Somente 12 µl dessa mistura foram utilizados para verificar a atividade da PKCα, através de um kit comercial (ensaio para proteina kinase –Calbiochem, #539484). Este é um kit não radioativo, baseado no método de ELISA para detecção. Um falso substrato (peptídeo) que pode ser fosforilado por PKCs recobre o fundo da placa de ensaio (96 poços). O produto da imunopreciptação (12 µl) foi misturado com o tampão de ensaio e co-fatores em poços individuais da placa de ensaio, conforme especificação do fabricante. A PKCα presente no produto da imunoprecipitação fosforila pelo o substrato. Logo após, um anticorpo monoclonal biotinilado reconhece a forma fosforilada do falso substrado que foi adicionado ao ensaio, proporcionando uma modificação na coloração do líquido presente nas placas. Neste caso, a atividade da PKC é diretamente proporcional à intensidade da cor. A leitura foi feita em 492nm. Os resultados foram expressos como vezes de mudança em relação ao grupo controle (WKY).

### 4.11 Análise estatística

As respostas contráteis foram expressas como o delta de força desenvolvida em relação à linha de base, e são apresentadas como milinewtons (mN), para um número de animais (n=) utilizado em cada experimento. Normalização por PE foi utilizada nos experimentos referentes aos itens 2 e 3 dos objetivos. Neste caso, a contração por PE (1µM), no início do protocolo, foi considerada como 100% da resposta contrátil.

As respostas contráteis para PDBu, referentes ao objetivo 4, foram representadas em uma curva, utilizando-se o programa Prisma (Graph Pad Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A potência do agonista e a resposta máxima foram expressas como $pD_2$ (logarítimo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e $E_{max}$ (máximo efeito produzido pelo

agonista), respectivamente. Curvas sigmoidais foram traçadas para a determinação dos valores de $pD_2$ para PDBu.

Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão médio (EPM). Diferenças estatísticas foram calculadas por ANOVA (Bonferroni foi adotado como pós-teste) ou test t, quando apropriado, utilizando-se o programa Prisma. $P<0,05$ foi considerado como significativo.

## 5 RESULTADOS

Os resultados encontram-se apresentados separamente, de acordo com os objetivos propostos.

### 5.1 Resultados referentes ao item 1 dos objetivos:

No presente estudo, testamos a hipótese de que a vasculatura de ratos hipertensos apresentaria aumento da resposta contrátil ao $Ca^{2+}$, primariamente devido a diferenças em mecanismos que controlariam a captação de $Ca^{+2}$, STIM1 e Orai1.

O desenho experimental utilizado foi similar ao demonstrado na figura 3. Utilizamos machos normotensos (WKY) e hipertensos (SHRSP) para a realização desses experimentos.

a) <u>Efeito da hipertensão arterial sobre o peso corporal e pressão arterial caudal:</u>

O peso corporal dos machos SHRSP foi menor (296±6,1g; n=15 p<0,001), quando comparado ao de machos WKY (345±5,2g; n=15). Os machos SHRSP apresentaram aumento dos níveis de pressão arterial sistólica (mmHg) quando comparados com seus controles normotensos (211±7,6, n=15; vs. 119±1,8, n=15; respectivamente – p<0,001).

b) <u>Protocolo para avaliação do influxo de $Ca^{2+}$ em machos hipertensos:</u>

A figura 4 ilustra os registros típicosdo protocolo para avaliação da contração em resposta ao influxo $Ca^{2+}$ após a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, realizado em aortas de machos WKY (Figura 4A e C) e SHRSP (Figura 4B e D), na ausência (A e B) e na presença (C e D) de tapsigargina.

PE produziu contração na presença de tampão contendo $Ca^{2+}$. Essa contração foi maior em aorta de machos SHRSP do que em aorta de machos WKY (20,8±1,7mN e 15,6±2,7mN, respectivamente; n=12).

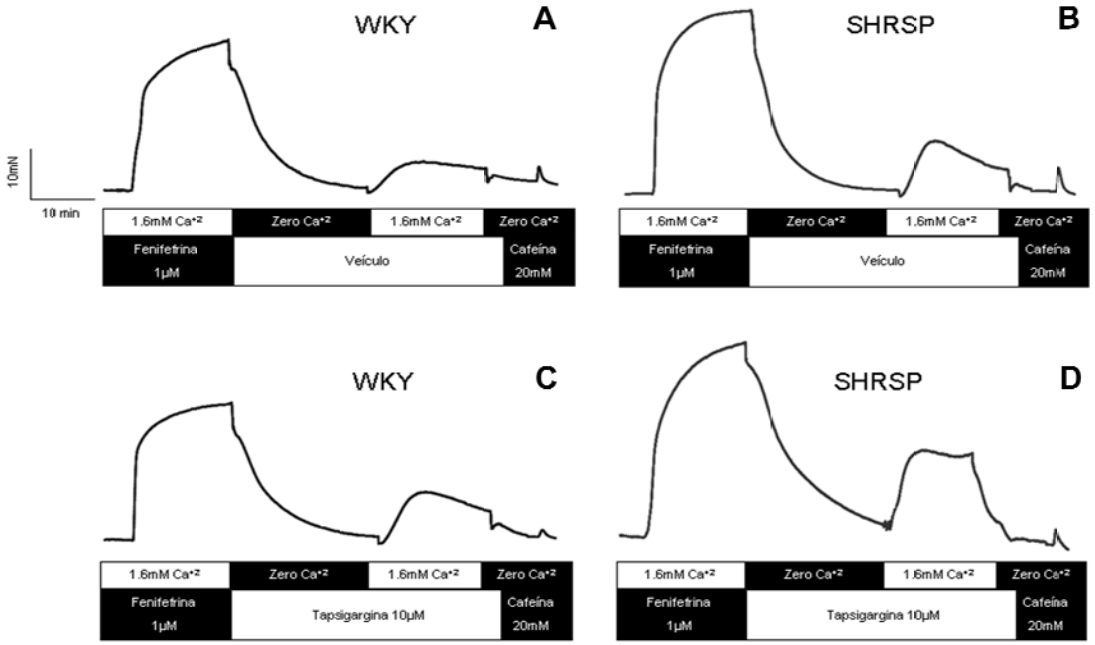



**Figura 4 – Traçados típicos da contração em resposta ao influxo de $Ca^{2+}$.** Os traços ilustram a contração em resposta ao influxo de $Ca^{2+}$ após a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$. Anéis de aorta de machos WKY (A, C) e SHRSP (B, D), sem endotélio, foram estimulados com PE (1µM) por 15 minutos. As aortas foram lavadas e mantidas em uma solução livre de $Ca^{2+}$ com ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid (EGTA), com o objetivo de depletar os estoques intracelulares de $Ca^{2+}$. Durante o período de depleção, as artérias foram incubadas com (A, B) veículo (DMSO) ou (C, D) tapsigargina (10µM). Após a depleção, os estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ foram repreenchidos, através da adição de solução fisiológica com 1,6mM de $Ca^{2+}$ por 15 minutos. A resposta contrátil durante o período de repreenchimento foi utilizada como medida funcional para o influxo de $Ca^{2+}$. A solução fisiológica foi substituída por solução fisiológica livre de $Ca^{2+}$ e, após dois minutos, as aortas foram estimuladas com cafeína (20mM), com o intuito de depletar os estoques de $Ca^{2+}$ do RS, resultando em uma contração rápida e transitória. A magnitude desta resposta final foi utilizada como medida funcional da capacidade do RS em recaptar $Ca^{2+}$.

c) Contração vascular durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de machos hipertensos:

A contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ está aumentada nas aortas de machos SHRSP quando comparada a aquela em artérias de machos WKY (10.0±0.9mN, 4.8±1.0mN, respectivamente; n=6 – p<0,01) – (Figura 5A).

Como pode ser visto na figura 5B, a incubação com tapsigargina aumentou as contrações durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ nas aortas de ambos os grupos. Entretanto, as contrações continuaram maiores em aortas de machos SHRSP (16,5±0,9 SHRSP vs. 10,7±1,0mN WKY, n=6 – p<0,001).

Considerando que a contração observada neste protocolo está diretamente associada as concentrações intracelulares de $Ca^{2+}$, esses dados demonstram que o influxo de $Ca^{2+}$, em condições onde o RS está vazio, encontra-se aumentado em aortas de machos SHRSP, comparados a WKY.

d) Efeito do bloqueio dos canais CRAC com 2-APB e $Gd^{3+}$ sobre a contração vascular durante o período de influxo de $Ca^{2+}$:

A inibição dos canais CRAC com 2-APB (100μM) e $Gd^{3+}$ (100μM) diminuiu significativamente as contrações induzidas pelo influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos SHRSP, mas não em aortas de WKY (Figura 5A). O bloqueio dos canais CRAC aboliu as diferenças na resposta de contração entre os grupos.

A inibição dos canais CRAC com 2-APB e $Gd^{3+}$ simultaneamente ao bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS pela tapsigargina (10μM), diminuiu significativamente as contrações durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ tanto em WKY como em SHRSP, abolindo as diferenças entre os grupos (Figura 5B).

Coletivamente, esses resultados sugerem que a ativação dos canais CRAC está aumentada em aortas de machos hipertensos, contribuindo para o aumento de influxo de $Ca^{2+}$.

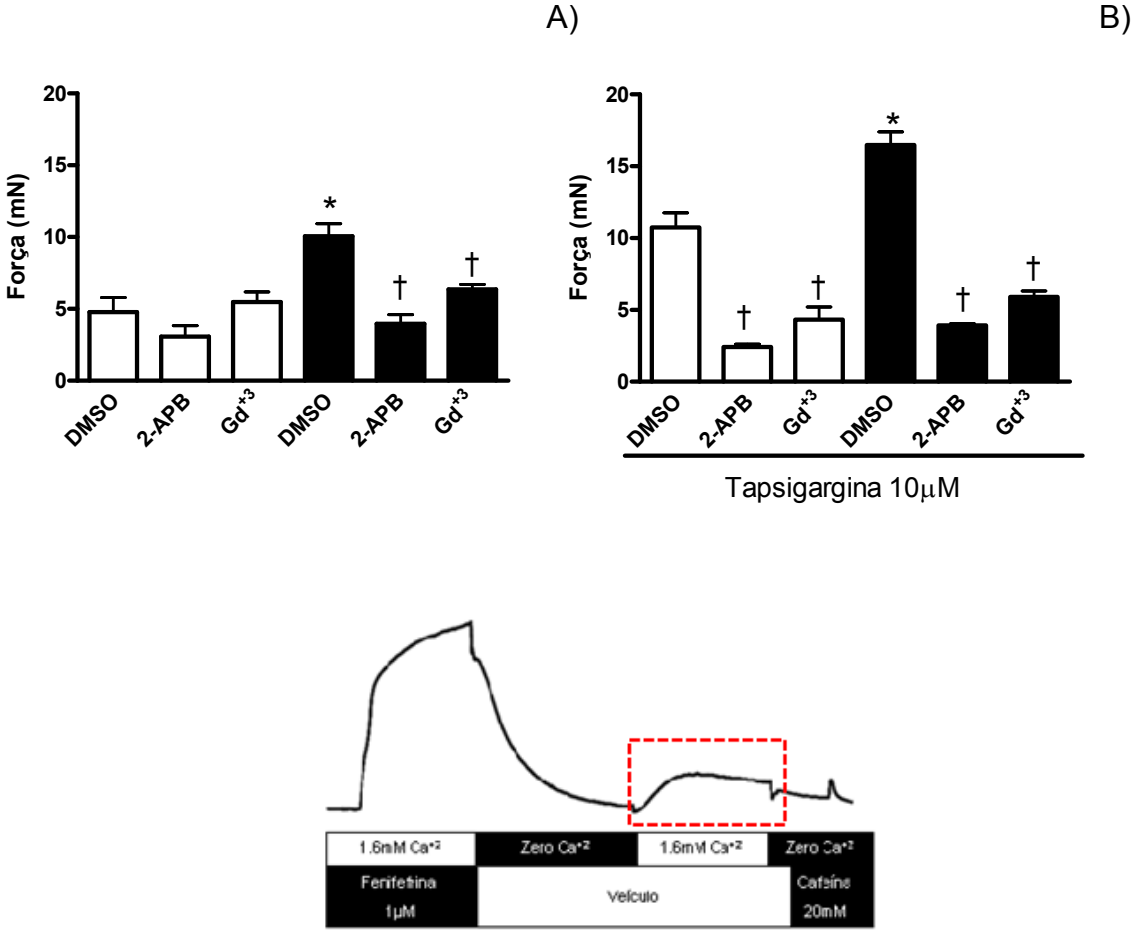



**Figura 5 – A inibição dos canais CRAC preveniu parcialmente a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ e aboliu as diferenças na contração (tônus espontâneo) entre artérias de machos SHRSP e WKY.** A) A contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, que é maior em aortas de SHRSP (barras pretas, n=6) comparada àquela em WKY (barras brancas, n=6), foi significativamente inibida depois do bloqueio com 2-APB e $Gd^{3+}$. B) O tratamento com tapsigargina resultou em aumento da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ nos grupos experimentais. O bloqueio com 2-APB e $Gd^{3+}$ diminuiu as contrações e aboliu as diferenças entre os grupos. Valores são expressos como média±EPM. * P< 0,05 vs. WKY. † P< 0,05 vs. DMSO.

e) Efeito dos anticorpos neutralizantes contra STIM1 e Orai1 sobre a resposta contrátil durante o influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de machos hipertensos e normotensos:

A internalização dos anticorpos anti-Orai1 e anti-STIM1 resultou na diminuição da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em ambos os grupos, indicando que a ativação de STIM1 e Orai1 contribui para a entrada de $Ca^{2+}$, via CRAC/SOCE, mesmo em condições fisiológicas (Figura 6A). Após a neutralização de STIM1 e Orai1, a resposta contrátil durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de SHRSP foi similar a aquela do grupo controle (Figura 6A).

Resultados similares foram observados quando anticorpos neutralizantes anti-Orai1 e anti-STIM1 foram utilizados juntamente com tapsigargina (10μM). Nestas condições, observou-se a diminuição da resposta contrátil frente ao influxo de $Ca^{2+}$ (Figura 6B). A única exceção foi observada em aortas de machos WKY, incubados com anticorpo anti-Orai1 e tapsigargina, onde a diminuição da contração não foi significativa.

Vasos incubados com chariot vazios (vasos incubados com todos os reagentes usados no protocolo do chariot com exceção do anticorpo), assim como a adição de um anticorpo inespecífico (anti-IgG de camundongo) ao chariot, foram utilizados como controles adicionais e não produziram qualquer efeito sobre a contração durante o influxo de $Ca^{2+}$, sendo que essa contração foi semelhante a aquelas observadas em aortas incubadas com DMSO (quando comparado a seus respectivos grupos), demonstrando que o bloqueio proporcionado pelos anticorpos neutralizantes era específico.

Esses dados reforçam a idéia de que o sistema STIM1/Orai1 encontra-se mais ativado, resultando em aumento do influxo de $Ca^{2+}$, o que é traduzido em aumento da resposta contátil em aorta de machos SHRSP.

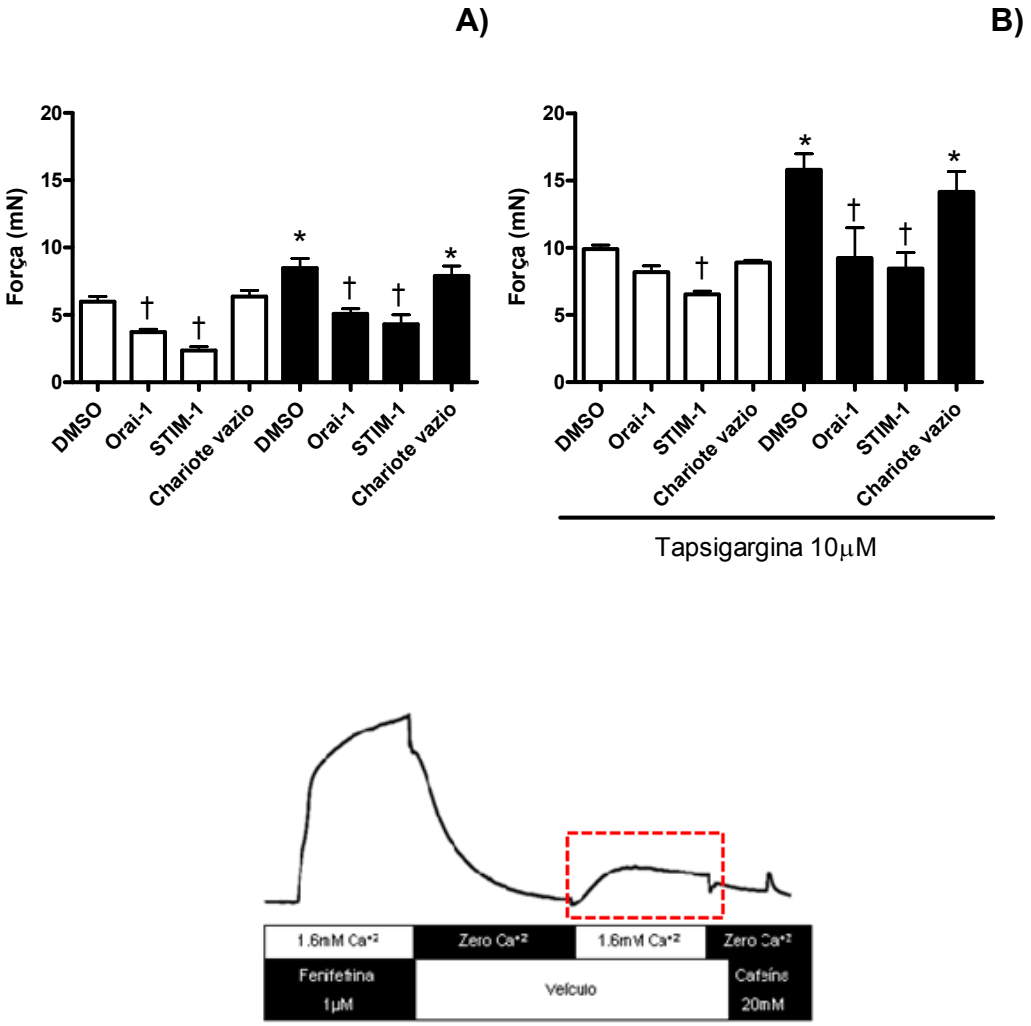



**Figura 6 – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 , internalizados com a técnica de chariot, preveniram parcialmente a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$.** Anéis de aorta de machos WKY (barras brancas, n=5) e SHRSP (barras pretas, n=5), transfectados com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1, demonstraram redução da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, tanto na (A) presença de veículo ou (B) após tratamento com tapsigargina. Valores são expressos como média±EPM. * P< 0,05 vs. WKY. † P< 0,05 vs. DMSO.

f) Capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS:

A capacidade funcional do RS em recaptar $Ca^{2+}$ foi avaliada em aortas de machos WKY e SHRSP (parte 2 do protocolo demonstrado na Figura 3).

Aortas de machos SHRSP demonstraram aumento da contração estimulada por cafeína (20mM), quando comparadas a aortas de WKY. O bloqueio dos canais CRAC com 2-APB (100μM) e $Gd^{3+}$ (100μM), resultou em uma diminuição da contração induzida por cafeína (20mM) tanto em machos WKY quanto em SHRSP (Figura 7A).

O bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS com tapsigargina (10μM) resultou em diminuição da contração induzida por cafeína (20mM), tanto em aortas de machos WKY como SHRSP (Figura 6B). Entretanto, as contrações induzidas por cafeína (20mM) na presença de tapsigargina ainda foram maiores em aortas de machos SHRSP, quando comparadas aquelas em aortas de WKY (Figura 7B).

O bloqueio dos canais CRAC com 2-APB (100μM) e $Gd^{3+}$ (100μM), simultaneamente com a inibição da $Ca^{2+}$-ATPase (tapsigargina, 10μM), praticamente aboliu as contrações induzidas por cafeína (20mM) em ambos os grupos (Figura 7B).

Esses resultados demonstram que o RS de aorta de machos SHRSP apresenta maior capacidade de armazenamento de $Ca^{2+}$ do que WKY e que a ativação dos canais CRAC contribuem para a reposição dos estoques de $Ca^{2+}$ do RS.

**A)** **B)**

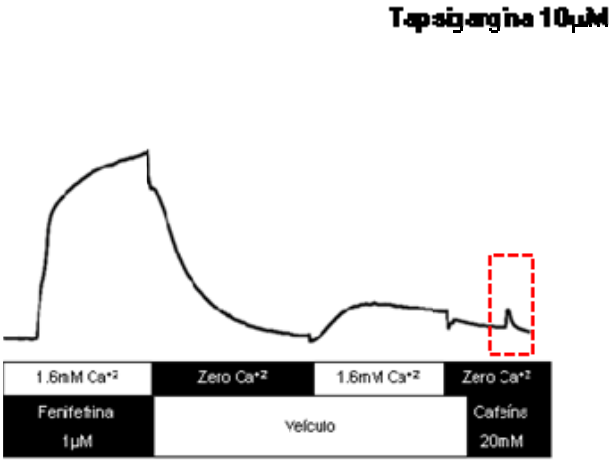



**Figura 7 – Canais CRAC contribuem para o repreenchimento dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$.** Contrações induzidas por cafeína, após o período de influxo de $Ca^{2+}$, são inibidas pelo bloqueio dos canais CRAC, tanto em aortas de WKY como SHRSP. Anéis de aorta de machos WKY (barras brancas, n=6) e SHRSP (barras pretas, n=6) apresentaram contração em resposta à cafeína (20mM), na (A) ausência ou (B) presença de tapsigargina (10μM), após a depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ e ciclo de reposição, como descrito na figura 3. Valores são expressos como média±EPM. * P< 0,05 vs. WKY. † P< 0,05 vs. DMSO.

g) Efeitos dos anticorpos neutralizantes na capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS:

As aortas transfectadas com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 apresentaram contrações menores, em resposta à cafeína (20mM). As diferenças na contração induzida por cafeína (20mM) entre aortas de WKY e SHRSP foram abolidas após a transfecção com os anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 (Figura 8A).

A presença de tapsigargina promoveu redução das contrações induzidas por cafeína (20mM), tanto em vasos de SHRSP como WKY, e aboliu as diferenças encontradas entre os grupos (Figura 8B). Nessas condições, a transfecção de anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 não resultou em efeitos inibitórios adicionais.

Em conjunto, esses resultados demonstram que o RS de aorta de machos hipertensos apresenta maior capacidade de recaptação de $Ca^{2+}$. É possível que esse fenômeno ocorra através de mecanismos que dependam do aumento do influxo de $Ca^{2+}$, via maior ativação de STIM1 e Orai.

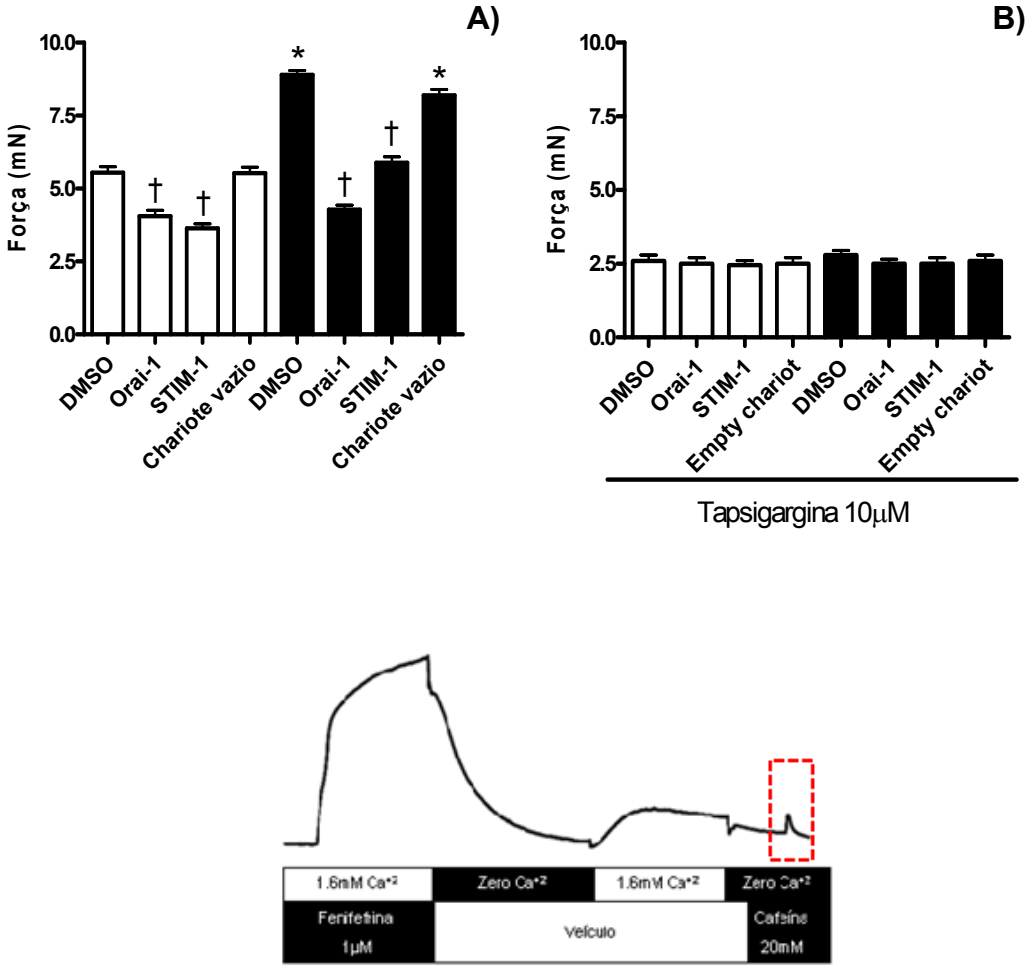



**Figura 8 – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram parcialmente a contração induzida por cafeína.** Anéis de aorta de machos WKY (barras brancas, n=5) e SHRSP (barras pretas, n=5), transfectados com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1, demonstraram redução da contração induzida por cafeína, tanto na (A) presença de veículo ou (B) depois do tratamento com tapsigargina. Valores são expressos como média±EPM. * P< 0,05 vs. WKY. † P< 0,05 vs. DMSO.

h) <u>Expressão protéica e gênica e localização de STIM1 e Orai1 em aortas de machos SHRSP:</u>

A expressão gênica e protéica, tanto de STIM1 como Orai1, encontra-se aumentada em aorta de machos SHRSP, quando comparada a aquela nos seus respectivos controles WKY (Figura 9).

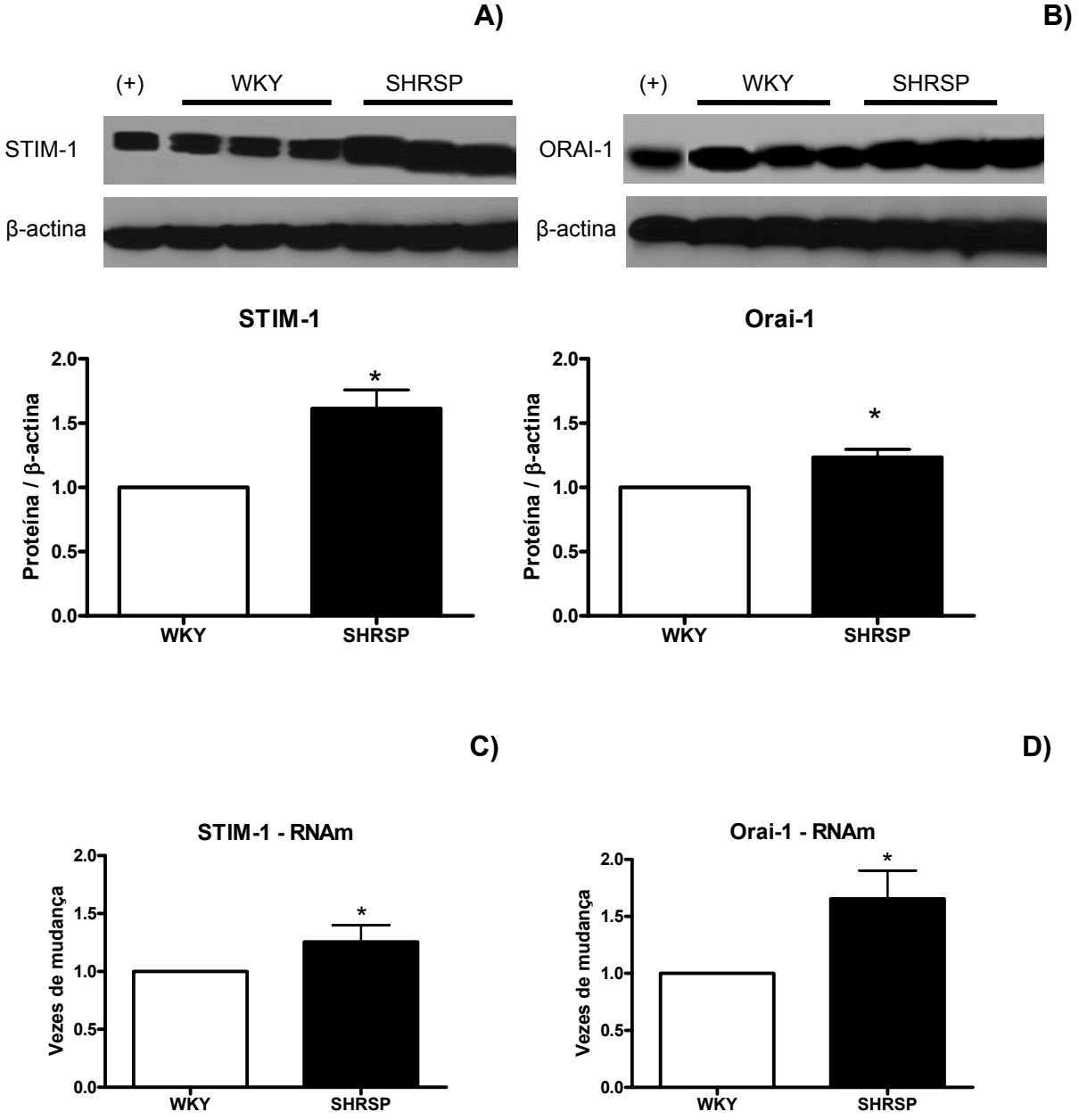



**Figura 9 – Aortas de machos SHRSP apresentam aumento dos níveis STIM-1 e Orai1 (RNAm e proteína).** Gráficos de barras demonstrando que a expressão vascular de proteína (A, B) e RNAm (C, D) de STIM1 e Orai1 está aumentada em aortas de hipertensos, quando comparada aquelas em aortas de machos normotensos (n=6). * p<0,05 vs. WKY.

O ensaio de imunofluorescência demonstrou a expressão de STIM1 e Orai1 em CMLV em aortas de WKY e SHRSP (Figura 10). Observou-se o aumento da expressão e da co-localização dessas proteínas em CMLV de machos SHRSP.

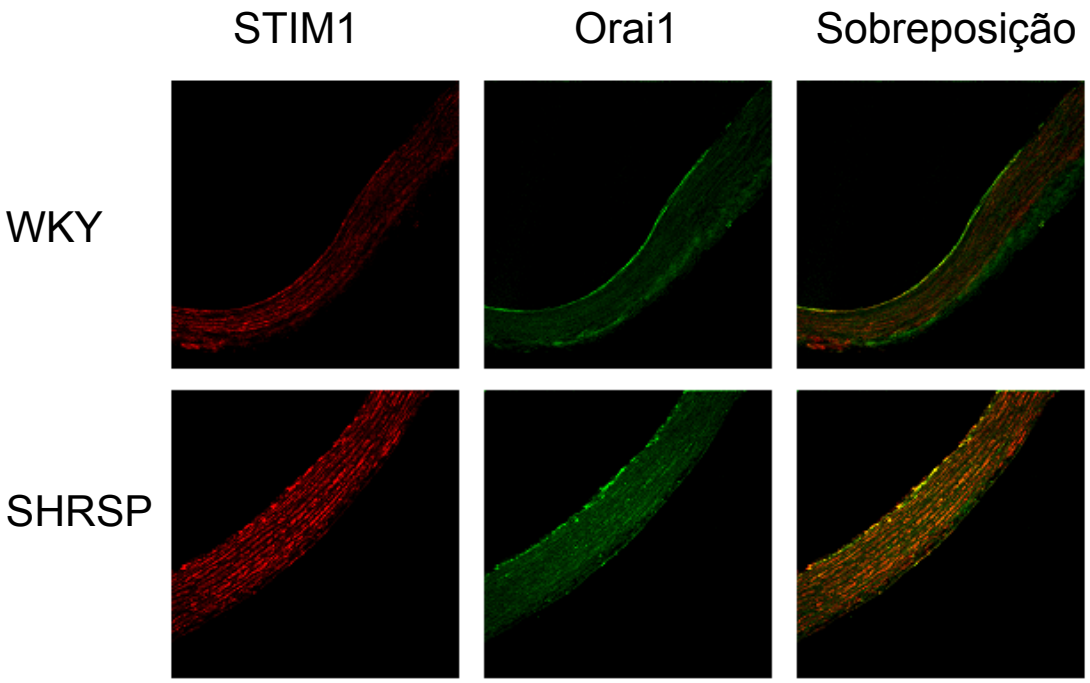



**Figura 10 – Aortas de machos SHRSP apresentam aumento dos níveis de STIM1 e Orai1.** Ensaio de imunofluorescência realizado em aortas de machos. Os segmentos vasculares foram incubados com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 e contra-marcados com anticorpo secundário (n=4).

Nossos resultados referentes ao item 1 dos objetivos demonstram que o aumento da ativação de CRAC/Orai1 em artérias de machos hipertensos, assim como o aumento da ativação de STIM1, contribuem para o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ e para o aumento da recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS, resultando no aumento da resposta contrátil e maiores estoques de $Ca^{2+}$ intracelular, respectivamente.

**5.2 Resultados referentes ao item 2 dos objetivos:**

A segunda hipótese testada no presente estudo foi que a proteção vascular conferida à fêmeas hipertensas resultaria em parte da ativação diferencial das proteínas STIM1 e Orai1, culminando em menor influxo de $Ca^{2+}$ e menor resposta contrátil em fêmeas.

O desenho experimental utilizado foi similar ao demonstrado na figura 3. Utilizamos machos e fêmeas normotensos (WKY) e hipertensos (SHRSP), para a realização desses experimentos.

a) Diferenças sexuais na pressão arterial sistólica:

Machos SHRSP apresentaram aumento dos níveis de pressão arterial sistólica (mmHg) quando comparados com seus controles normotensos WKY (233,5±10; n=8 vs 115,7±2.4; n=8; respectivamente; p<0,001). Em fêmeas SHRSP, a pressão arterial sistólica também encontrava-se aumentada (168,4±4.3; n=8 – p<0,001) quando comparada a aquela em fêmeas normotensas (115,7±2.4; n=8). Entretanto, fêmeas hipertensas apresentaram pressão arterial sistólica significativamente menor, quando comparadas aos machos hipertensos (p<0,001). Não foram observadas diferenças na pressão arterial sistólica entre machos e fêmeas WKY.

b) Resposta contrátil durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos e fêmeas hipertensos.

O desenho experimental utilizado para os experimentos referentes ao objetivo específico 2 foi similar ao demonstrado na figura 3 (parte 1). Entretanto, utilizamos machos e fêmeas normotensos (WKY) e hipertensos (SHRSP) para a realização desses experimentos.

A contração induzida por PE foi maior em machos SHRSP comparados a machos WKY (24,4±1,2mN e 21,2±.0,9mN; respectivamente, n=6) ou fêmeas SHRSP e WKY (18,5±2,3mN e 16,95±1,8mN; respectivamente n=6).

Aortas de machos SHRSP demonstraram maior contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, quando comparadas a de machos WKY. Não foram observadas diferenças na contração entre fêmeas SHRSP e WKY. Aortas de fêmeas SHRSP apresentaram menor contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, quando comparadas a aortas de machos SHRSP. Não foram observadas diferenças na

contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ entre aortas de machos e fêmeas WKY (Figura 11).

A incubação das aortas com tapsigargina (10μM) aumentou as contrações durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em todos os grupos experimentais. A diferença na força de contração entre aortas de machos SHRSP e WKY persistiu após incubação com tapsigargina, assim como as diferenças entre machos e fêmeas SHRSP (Figura 11).

Esses dados demonstram que fêmeas SHRSP possuem proteção vascular, no que se refere a contração em resposta ao aumento do influxo de $Ca^{2+}$, observado em aorta de machos SHRSP em condições de depleção dos estoques de $Ca^{2+}$ do RS.

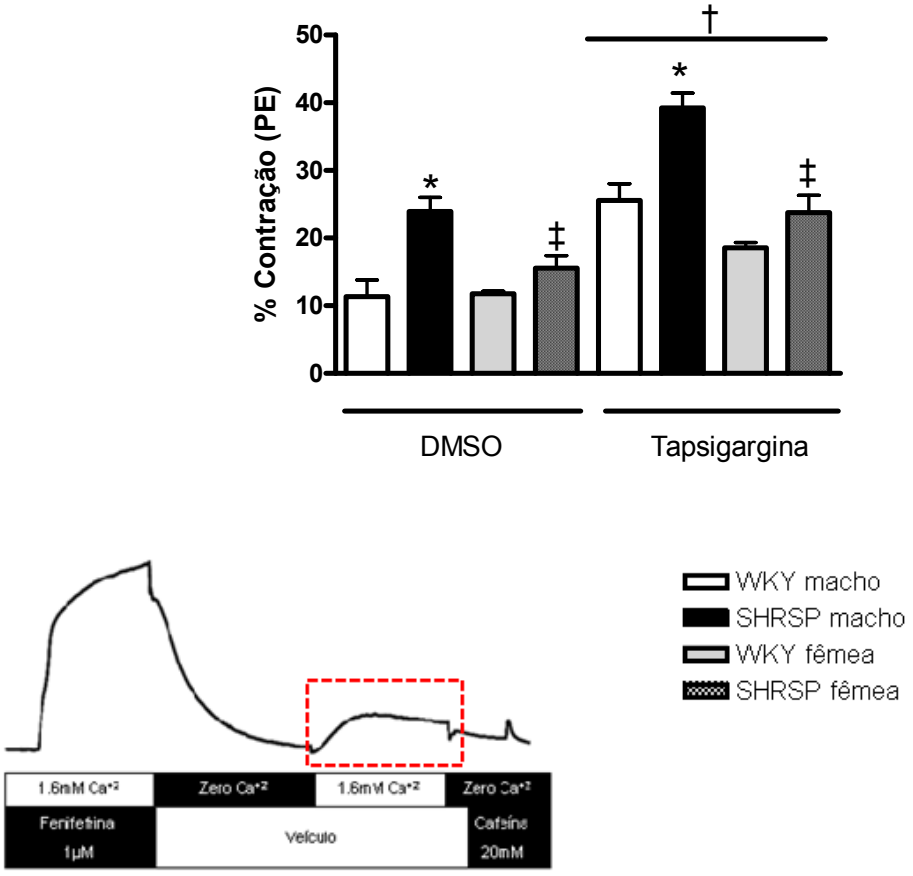



**Figura 11 – O bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS com tapsigargina aumentou a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos e fêmeas SHRSP e WKY.** A contração durante o período de preenchimento de $Ca^{2+}$ é menor em aortas de fêmeas SHRSP comparada a aquela em aortas de machos SHRSP. Valores estão expressos como média±EPM; n=6 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY. † P< 0,05 vs. respectivo DMSO. ‡ P<0,05 vs. respectivo macho.

c) Efeito do bloqueio dos canais CRAC sobre as diferenças sexuais na contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$:

A inibição dos canais CRAC com 2-APB (100μM - figura 12A) e $Gd^{3+}$ (100μM - figura 12B) diminuiu a contração em resposta ao influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos SHRSP, mas não em machos WKY. Em fêmeas, foi observada a diminuição da resposta de contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, tanto em fêmeas SHRSP como WKY. As diferenças sexuais na contração persistiram mesmo após o bloqueio de canais CRAC.

Quando a inibição dos canais CRAC com 2-APB (100μM) e $Gd^{3+}$ (100μM) foi realizada simultaneamente com tapsigargina, observou-se uma diminuição siginificativa na contração durante o influxo de $Ca^{2+}$ nas aortas de todos os grupos experimentais (Figura 12C e D). Nestas condições, as diferenças sexuais observadas na contração em resposta ao influxo de $Ca^{2+}$ foram abolidas.

Esses resultados demonstram que a ativação dos canais CRAC contribui para as diferenças sexuais na resposta contrátil durante o influxo de $Ca^{2+}$.

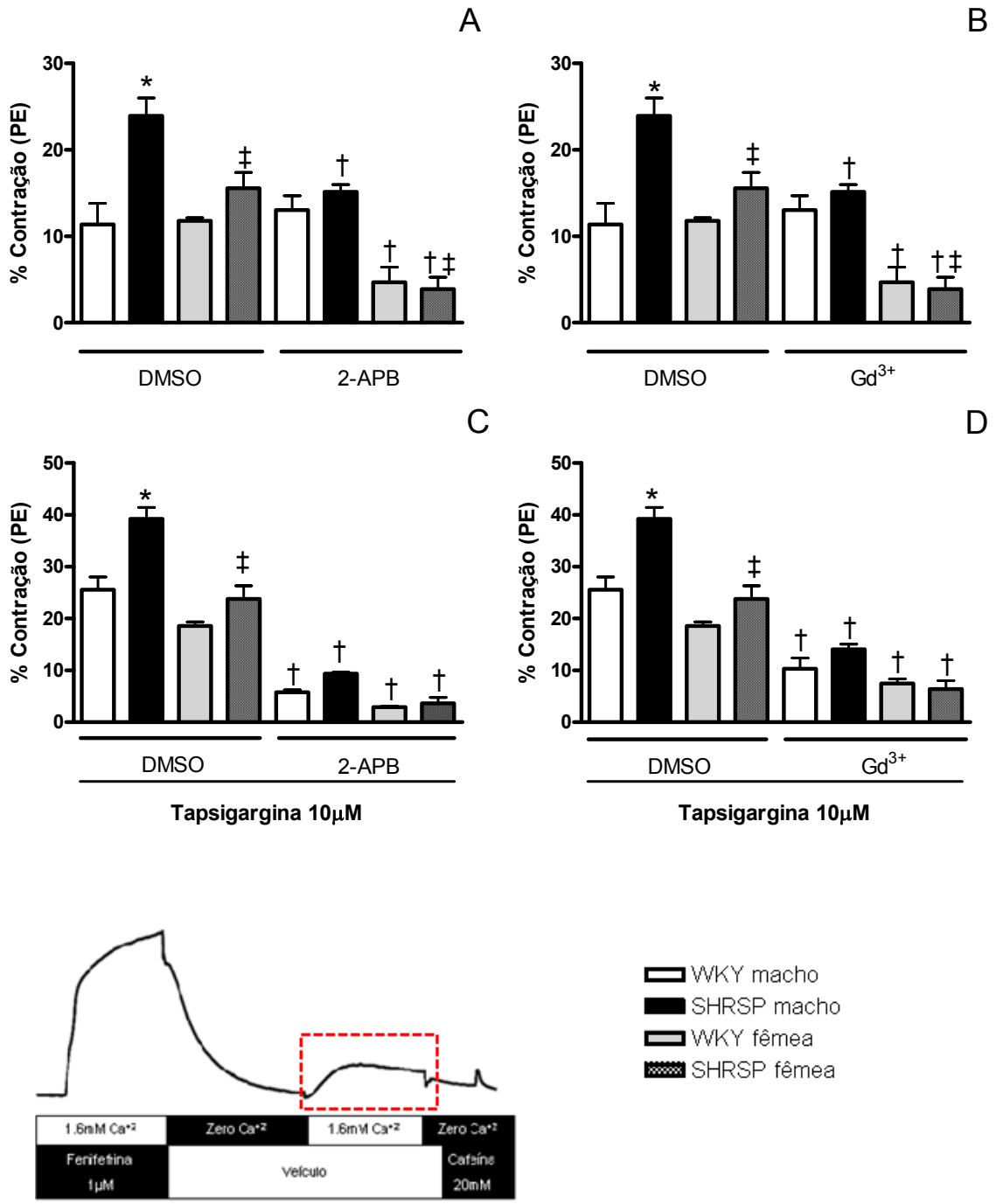



**Figura 12 – Artérias de machos SHRSP apresentaram resposta contrátil aumentada ao $Ca^{2+}$ quando comparadas a fêmeas SHRSP.** O bloqueio de canais CRAC diminuiu a resposta contrátil vascular ao $Ca^{2+}$. Respostas contráteis durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, que são menores em aorta de fêmeas do que machos SHRSP, são atenuadas pela inibição farmacológica dos canais CRAC, com 2-APB (100µM) ou $Gd^{3+}$ (100µM). Experimentos realizados na (A-B) ausência ou (C-D) presença de tapsigargina (10µM). Valores são expressos como média±EPM; n=6 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY. † P< 0,05 vs. respectivo DMSO. ‡ P<0,05 vs. respectivo macho.

d) Efeito dos anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 sobre as diferenças sexuais durante o período de influxo de $Ca^{2+}$:

Quando a técnica de chariot foi utilizada para internalizar anticorpos neutralizantes contra STIM1 e Orai1, observamos que o bloqueio de Orai1 e STIM1 foi capaz de reduzir as contrações durante o influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos SHRSP e WKY, asim como em aortas de fêmeas SHRSP (Figura 13A-B). A transfecção de anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 aboliu as diferenças sexuais na contração durante o influxo de $Ca^{2+}$ entre os grupos experimentais. Não foram observadas diferenças na contração em aortas de fêmeas WKY.

Resultados similares foram encontrados quando a transfecção de anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 foi realizada simultaneamente com o bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS (tapsigargina - figura 13C-D). Nesta condição, os anticorpos neutralizantes inibiram o influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de fêmeas WKY.

Coletivamente, esses resultados demonstram que o aumento da ativação de Orai1/STIM1 contribui para o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de machos SHRSP, sendo assim um possível mecanismo que contribui para as diferenças sexuais na contração em resposta ao $Ca^{2+}$.

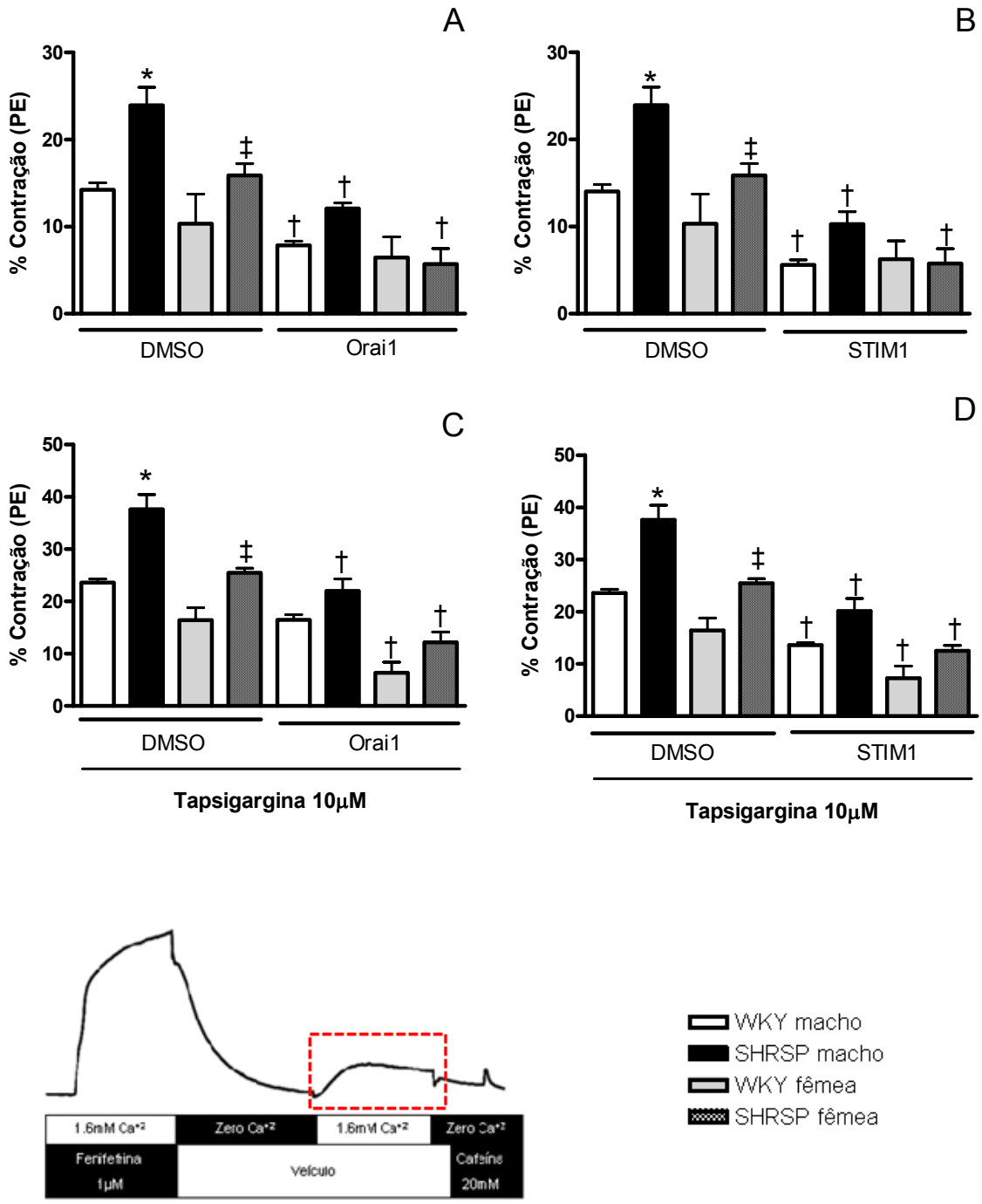



**Figura 13 - Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram parcialmente a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$.** Anéis de aorta de machos e fêmeas WKY e SHRSP, transfectados com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1, demonstraram redução da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$. Experimentos realizados na ausência (A-B) ou presença (C-D) de tapsigargina (10μM). Valores estão expressos com média±EPM; n=6 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY. † P< 0,05 vs. respectivo DMSO. ‡ P<0,05 vs. respectivo macho.

e) Diferenças sexuais na capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS:

A capacidade funcional do RS em recaptar $Ca^{2+}$ foi avaliada em aortas sem endotélio de machos e fêmeas WKY e SHRSP (como demonstrado na parte 2 do protocolo descrito na figura 3).

Aortas de machos SHRSP apresentaram aumento da contração estimulada por cafeína, quando comparadas a aortas de machos WKY. Resultados similares foram encontrados em fêmeas SHRSP (Figura 14). Não observamos diferenças na liberação de $Ca^{2+}$ em resposta a cafeína entre machos e fêmeas SHRSP.

A presença de tapsigargina promoveu redução das contrações induzidas por cafeína (20mM), tanto em vasos de machos quanto de fêmeas SHRSP e WKY.

Esses dados mostram que aortas de animais hipertensos apresentam aumento na recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS, independentemente do sexo, embora diferenças sexuais sejam observadas durante a contração no período de influxo de $Ca^{2+}$.

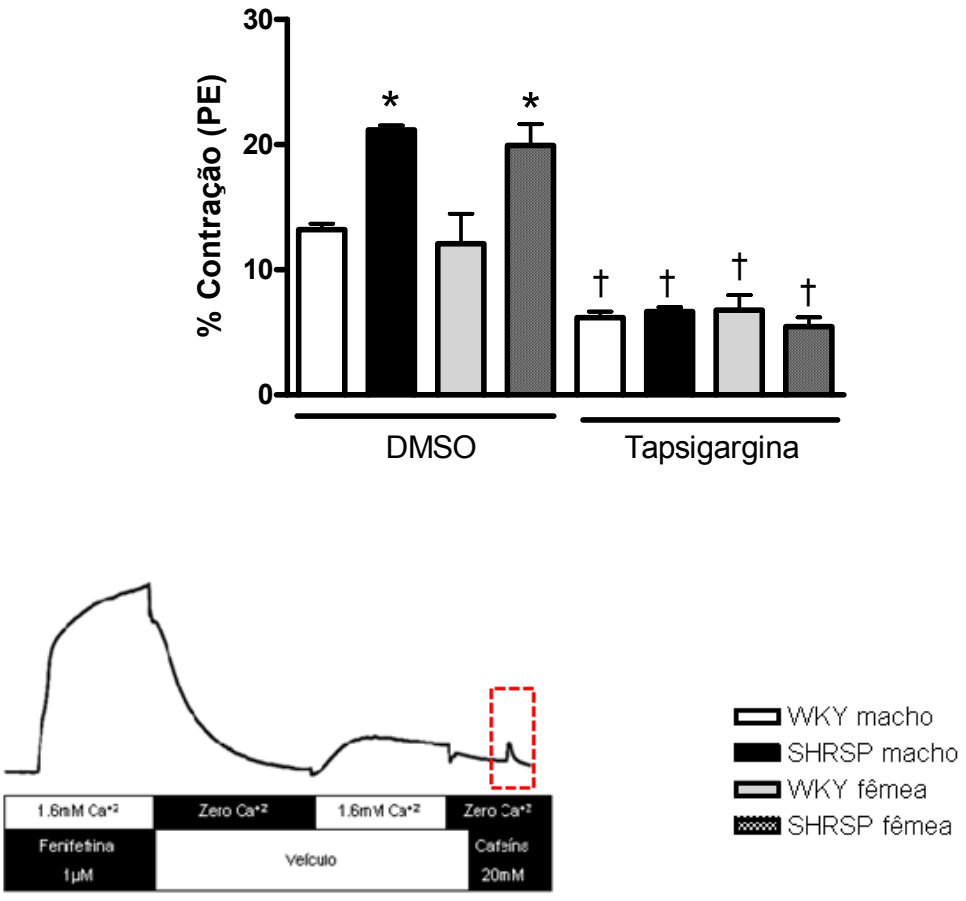



**Figura 14 – Não foram observadas diferenças sexuais na capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS.** Anéis de aorta de machos e fêmeas SHRSP apresentaram aumento da contração induzida por cafeína. Valores estão expressos como média±EPM; n=6 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY. † P< 0,05 vs. respectivo DMSO.

f) <u>Efeito dos anticorpos neutralizantes sobre as diferenças sexuais na capacidade de recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS:</u>

A transfecção de anticorpos anti-Orai1 reduziu a contração à cafeína, em aortas de machos SHRSP. Resultados similares foram encontrados em aortas de fêmeas SHRSP, mas não em fêmeaas WKY (Figura 15A-B).

Esses resultados demonstram que Orai1/STIM1 contribuem para o aumento da recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS em aorta de animais hipertensos (fêmeas ou machos), embora não existam diferenças sexuais neste evento.

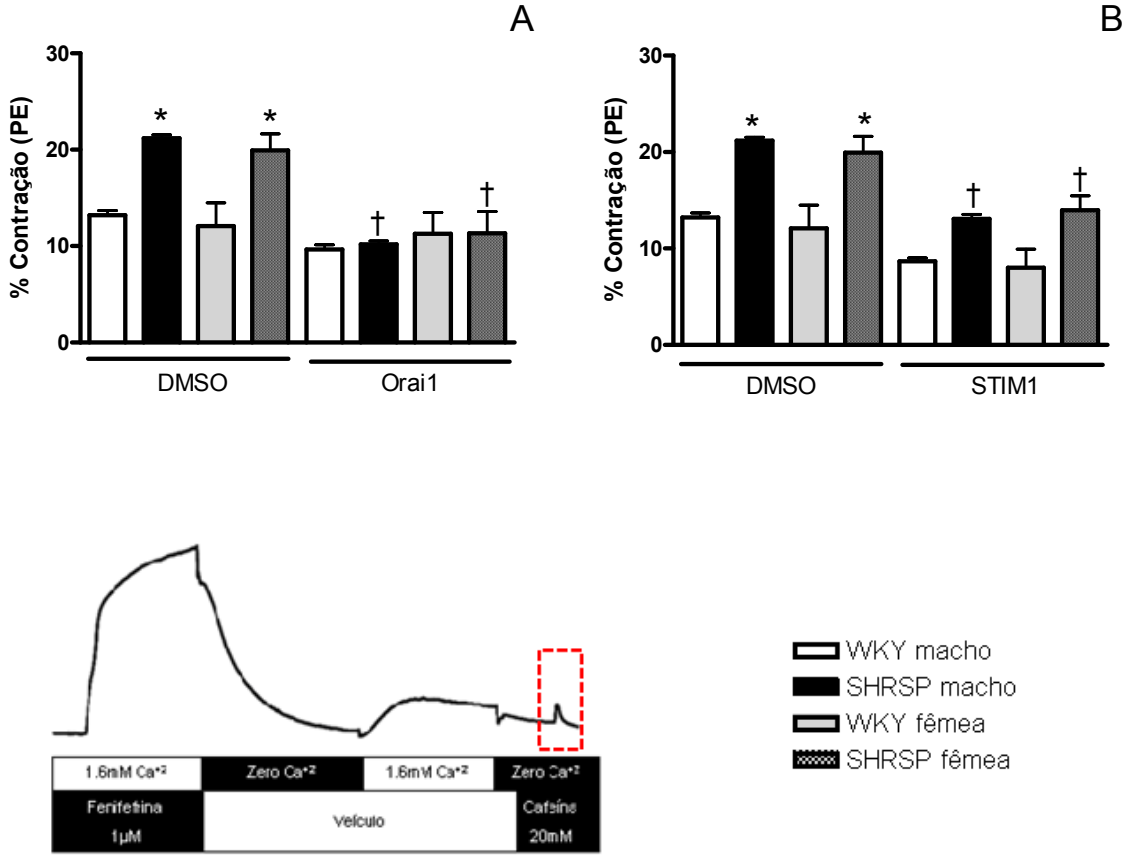



**Figura 15 – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram a contração induzida por cafeína.** Anéis de aorta de machos e fêmeas WKY e SHRSP, transfectados com anticorpos (A) anti-STIM1 e (B) anti-Orai1, demonstraram redução da contração induzida por cafeína, Valores estão expressos como média±EPM; n=6 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY. † P< 0,05 vs. respectivo DMSO.

g) <u>Diferenças sexuais na expressão de $Ca^{2+}$-ATPase no RS:</u>

Observamos que a expressão da $Ca^{2+}$-ATPase 2 encontra-se reduzida em aortas de machos SHRSP, quando comparada a aquela em aortas de machos WKY. Resultados similares foram encontrados em aortas de fêmeas SHRSP, quando comparadas a fêmeas WKY. Entretanto, $Ca^{2+}$-ATPase 2 está mais expressa em aortas de fêmeas SHRSP, quando comparadas a machos SHRSP ($p<0,05$) (Figura 16).

Esses dados demonstram que a expressão de $Ca^{2+}$-ATPase é inversamente proporcional ao influxo de $Ca^{2+}$, possivelmente através de mecanismos compensatórios.

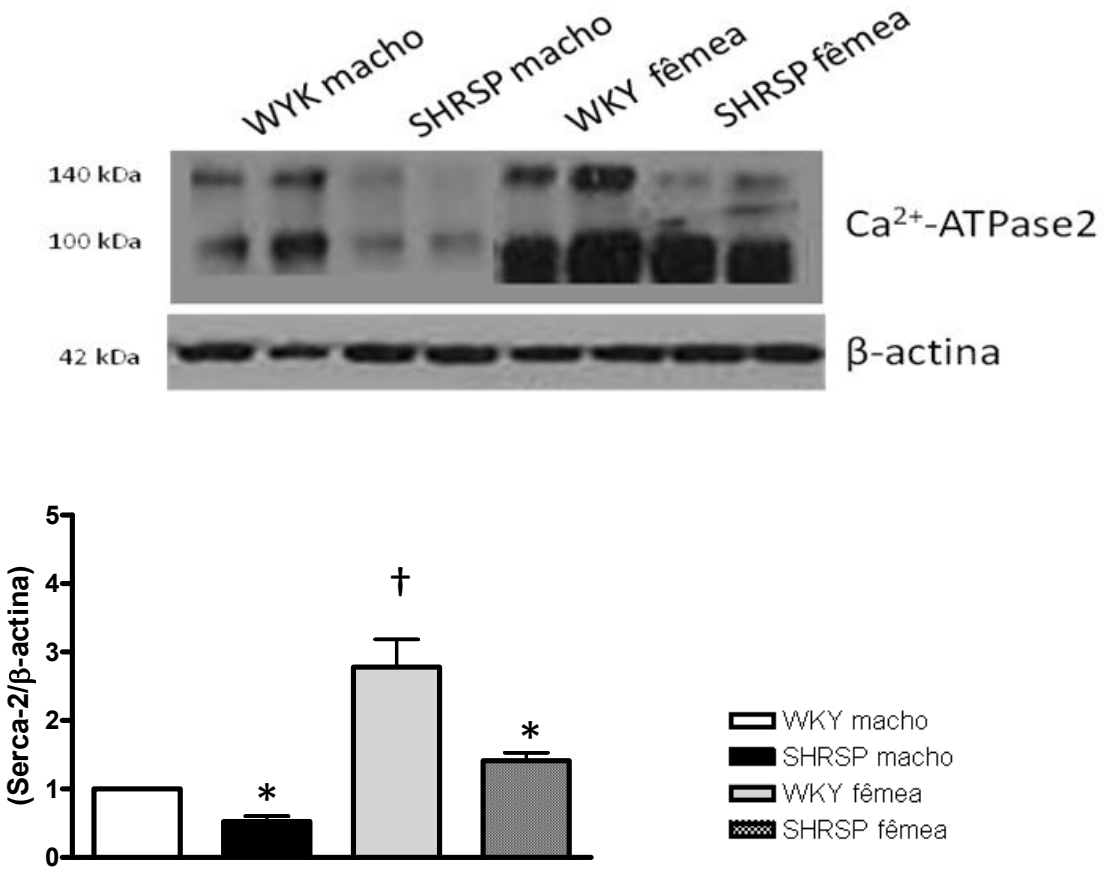



**Figura 16** – Aortas de fêmeas apresentam aumento da expressão vascular de $Ca^{2+}$-ATPase2, comparadas a machos. Acima, imagens representativas de western blot e abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular de $Ca^{2+}$-ATPase2. Valores normalizados pela expressão de β-actina, n=6 para cada experimento. * $P< 0,05$ vs. respective WKY. † $P< 0,05$ vs. respectivo macho (macho WKY ou macho SHRSP).

h) Expressão protéica e localiação de STIM1 em aortas:

A expressão protéica, tanto de STIM1 quanto de Orai1, encontra-se aumentada em aortas de machos SHRSP, comparados com WKY. A expressão de STIM1, mas não de Orai1, foi maior em fêmeas SHRSP do que em fêmeas WKY. O aumento da expressão vascular de STIM1 e Orai1 também foi observado em machos SHRSP, quando comparados com fêmeas SHRSP (Figura 17).

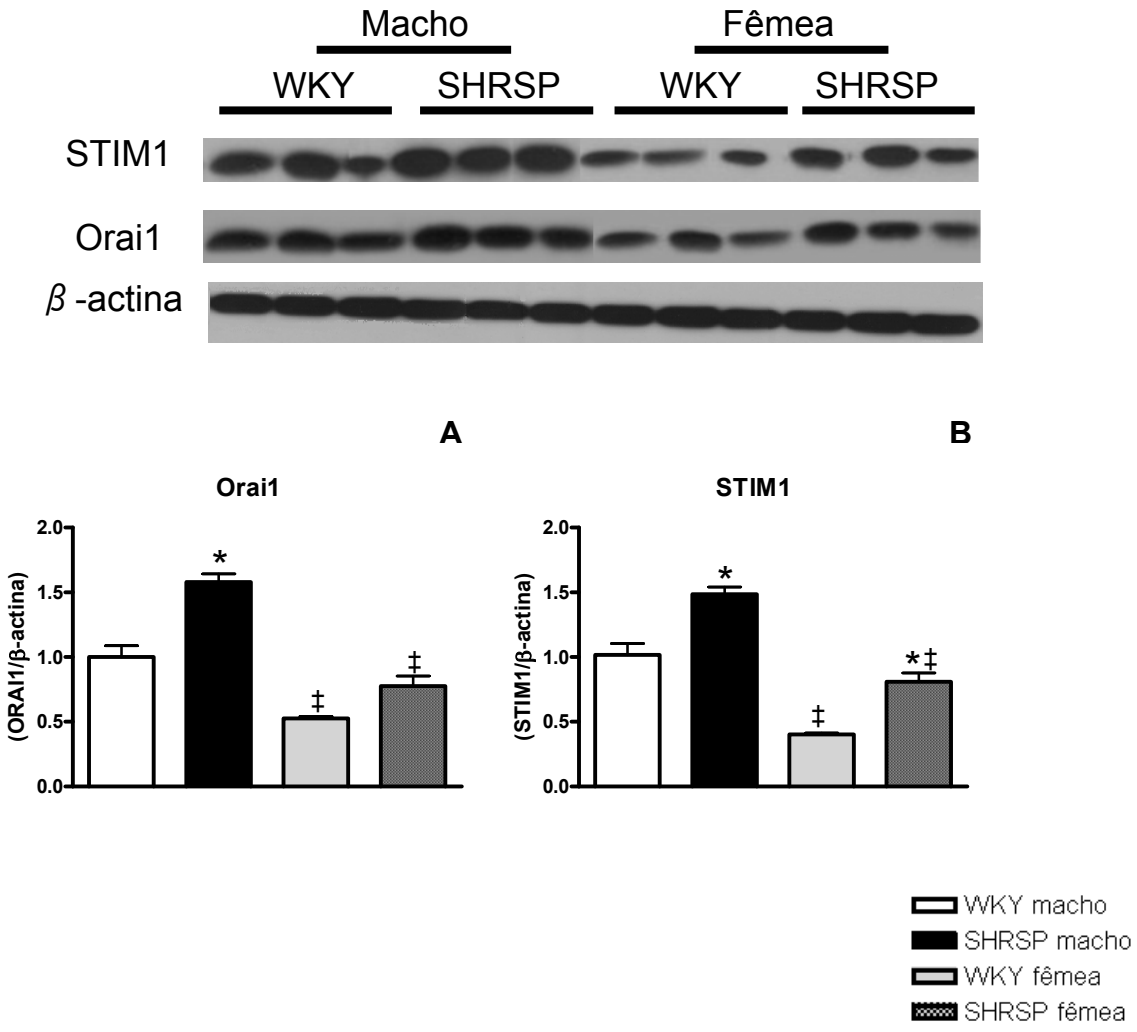



**Figura 17 – Aortas de fêmeas SHRSP apresentam redução da expressão vascular de STIM1 e Orai1 comparadas a machos SHRSP.** Acima, imagens representativas de western blot e abaixo, gráficos de barras demonstrando que a expressão vascular de STIM1 e Orai1 é menor em fêmeas SHRSP, quando comparada a machos SHRSP. Valores normalizados pela expressão de B-actina, n=6 para cada experimento. * $p<0,05$ vs. respectivo grupo controle, ‡ $p<0,05$ vs. respectivo grupo de machos.

O ensaio de imunofluorescência confirmou a localização de STIM1 e Orai1 em CMLV, além de confirmar o aumento de STIM1 e Orai1, em aortas de SHRSP, comparadas com aortas de WKY, tanto em machos quanto em fêmeas. Entretanto, a expressão de STIM1 e Orai1 foi significativamente menor em fêmeas do que em machos hipertensos (Figura 18).

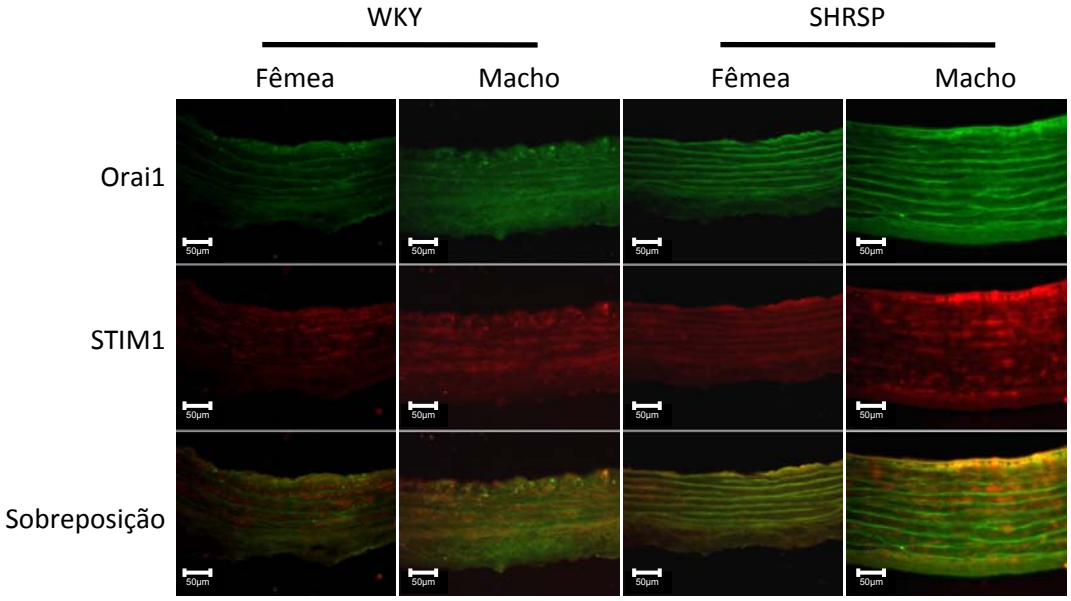



**Figura 18 – Aortas de machos SHRSP apresentam aumento dos níveis STIM-1 e Orai1, comparadas a aortas de fêmeas SHRSP.** Imunohistoquimica realizada em aortas de machos e fêmeas, hipertensos e normotensos. Os segmentos vasculares foram incubados com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 e contra marcados com anticorpo secundário (n=4).

Coletivamente, estes resultados do item 2 dos objetivos reforçam a nossa hipótese da ativação diferencial de STIM1/Orai1 em aortas de machos e fêmeas hipertensos. Essas diferenças sexuais se traduzem em aumento do influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de machos SHRSP, assim como no aumento da contração vascular, embora não influenciem a capacidade do RS em recaptar $Ca^{2+}$.

### 5.3 Resultados referentes ao item 3 dos objetivos

Neste item, testamos a hipótese de que os hormônios sexuais conferem proteção à vasculatura de fêmeas, através de mecanismos modulatórios da via STIM1/Orai1.

O desenho experimental utilizado foi similar ao demonstrado na figura 3. Utilizamos fêmeas normotensas (WKY) e hipertensas (SHRSP), ovariectomizadas bilateralmente (OVX) ou não (sham) para a realização desses experimentos.

a) Efeito da ovariectomia sobre o peso corporal e peso seco do ovário, em fêmeas WKY e SHRSP:

Fêmeas WKY e SHRSP submetidas à ovariectomia apresentaram aumento do peso corporal quando comparadas aos seus respectivos controles (256±3,6g WKY OVX vs. 214±1,5g WKY sham; – $p<0,001$) e (238±5,3g SHRSP OVX vs. 218±4,9g SHRSP sham; – $p<0,05$). Observou-se que fêmeas SHRSP OVX ganharam menos peso (20±5g, $p<0,001$) do que fêmeas WKY OVX (42±2g). Entretanto, não foram observadas diferenças de peso entre fêmeas WKY e SHRSP sham.

O peso seco do ovário encontrava-se reduzido nas fêmeas submetidas à ovariectomia, tanto no grupo das fêmeas normotensas (40±0,5mg WKY OVX vs. 87 ±0,3mg WKY sham; $p<0,01$), quanto no grupo de fêmeas hipertensas (53±0,9mg SHRSP OVX vs. 118±0,9mg SHRSP sham – $p<0,001$). Não foram observadas diferenças no peso seco do ovário em fêmeas WKY comparadas com fêmeas SHRSP (sham ou OVX).

b) Eficiência da ovariectomia bilateral:

Observamos diminuição dos níveis de estradiol ($p<0.01$) e aumento dos níveis de progesterona ($p<0.01$) em fêmeas SHRSP sham, quando comparadas a WKY sham. Não foram detectadas diferenças nos níveis de testosterona nessas condições. Quando as fêmeas dos dois grupos experimentais foram submetidas à ovariectomia, observou-se redução de todos os hormônios medidos. Além disso, a ovariectomia aboliu a diferença nos níveis de estradiol e progesterona entre WKY e SHRSP (Tabela 2).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a ovariectomia foi eficiente, no que se refere à diminuição dos níveis hormonais.

**Tabela 2 – Valores de hormônios sexuais no plasma de fêmeas WKY e SHRSP, sham ou OVX.** Valores (pmol) estão expressos como média±EPM; n=3-4 para cada experimento. *P< 0,05 vs.respectivo WKY. † P< 0,05 vs. respectivo Sham.

| | WKY sham | SHRSP sham | WKY OVX | SHRSP OVX |
|---|---|---|---|---|
| **Estradiol** | 16,06±1,4 | 9,97±0,2* | 5,66±0,7† | 4,86±1,2† |
| **Progesterona** | 27,17±2,3 | 35,21±7,3* | 16,4±0,78† | 10,89±3,72† |
| **Testosterona** | 0,16±0,03 | 0,22±0,02 | 0,02±0,01† | 0,02±0,001† |

c) Efeitos da ovariectomia no controle da pressão arterial sistólica:

Após 12 semanas, observou-se aumento da pressão arterial sistólica nos grupos submetidos à ovariectomia, quando comparados aos seus respectivos controles (127,8±3,34 WKY OVX vs. 113±3,05 WKY sham; p<0,05) e (205,8±1,65 SHRSP OVX vs. 184±3,9 SHRSP sham - p<0,001). Fêmeas SHRSP sham apresentam níveis elevados da pressão arterial sistólica em comparação com fêmeas WKY sham (p<0,001). As diferenças observadas na pressão arterial sistólica, entre as fêmeas SHRSP e WKY persistiram após a ovariectomia (p<0,001).

Nossos dados demonstram que os hormônios sexuais contribuem para o controle da pressão arterial, uma vez que a ovariectomia aumentou a pressão sistólica nos dois grupos experimentais.

d) Modulação do influxo de $Ca^{2+}$ pela ovariectomia:

Inicialmente, aortas foram estimuladas com PE (1uM) até que a contração atingisse o platô (19,1±1,8mN em SHRSP sham; 17,2±.0,4mN em WKY sham; 21,7±1,6mN em SHRSP OVX; e 18,7±2,8mN em WKY OVX; n=6).

A ovariectomia não afetou a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em nenhum dos grupos experimentais (Figura 19A). Entretanto, na presença de tapsigargina (10μM), observou-se que fêmeas SHRSP OVX demonstraram aumento da contração no período de influxo de $Ca^{2+}$, quando comparadas a WKY OVX (Figura 19B). Nestas condições, não foram observadas diferenças na contração entre os demais grupos experimentais.

Esses resultados demonstram que os hormônios sexuais contribuem para a regulação do influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de fêmeas hipertensas, em condições onde os estoques de $Ca^{2+}$ do RS encontram-se vazios.

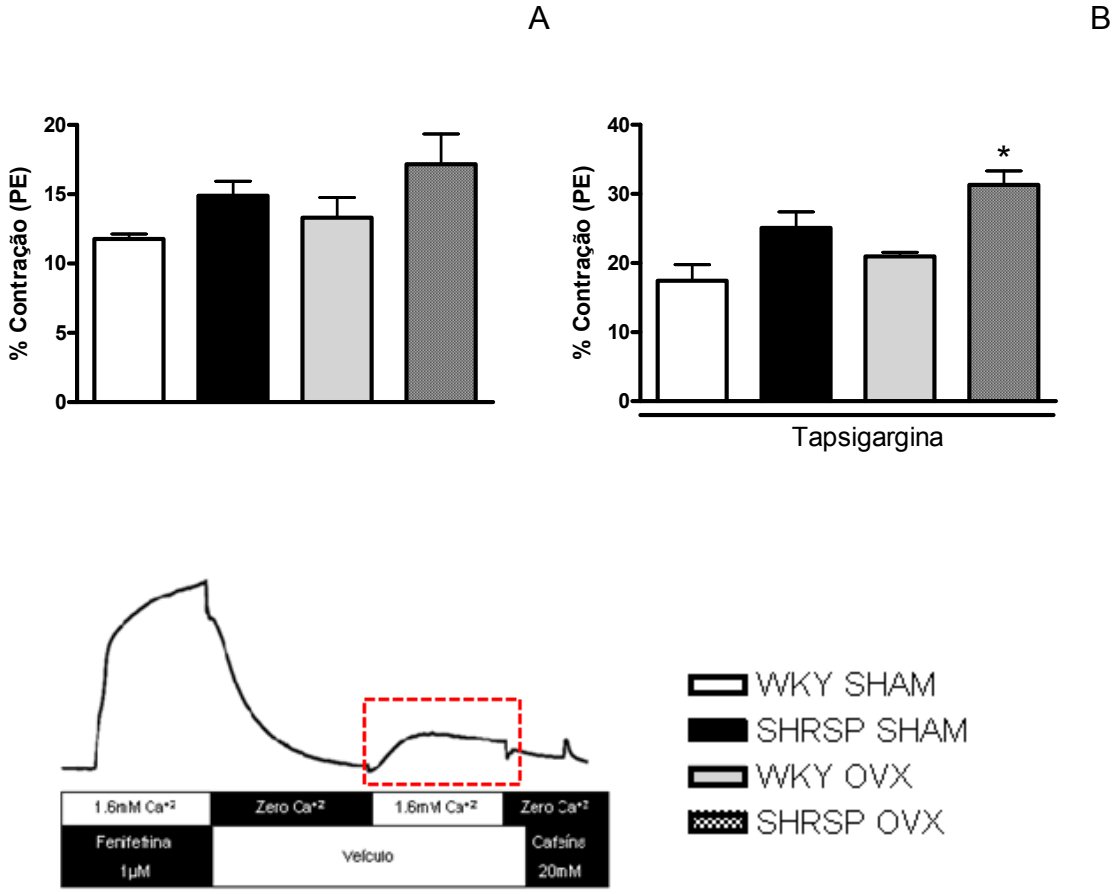



**Figura 19 – O bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS com tapsigargina aumentou a contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de fêmeas SHRSP ovariectomizadas.** A) a contração durante o período de preenchimento de $Ca^{2+}$ não é diferente entre os grupos. Entretanto, após a incubação com tapsigargina (1µM), a contração foi maior em aortas de fêmeas SHRSP OVX, comparada a aquela em fêmeas SHRSP sham. Valores estão expressos como média±EPM; n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY (WKY OVX).

e) <u>Efeitos da ovariectomia na modulação dos canais CRAC durante o período de influxo de $Ca^{2+}$:</u>

A inibição dos canais CRAC com $Gd^{3+}$ (100µM - figura 20), na presença de tapsigargina (1µM), diminuiu a resposta de contração da aorta durante o período de influxo de $Ca^{2+}$ em todos os grupos experimentais. Além disso, $Gd^{3+}$ foi capaz de abolir as diferenças na força de contração encontradas entre as fêmeas SHRSP OVX e WKY OVX (figura 20).

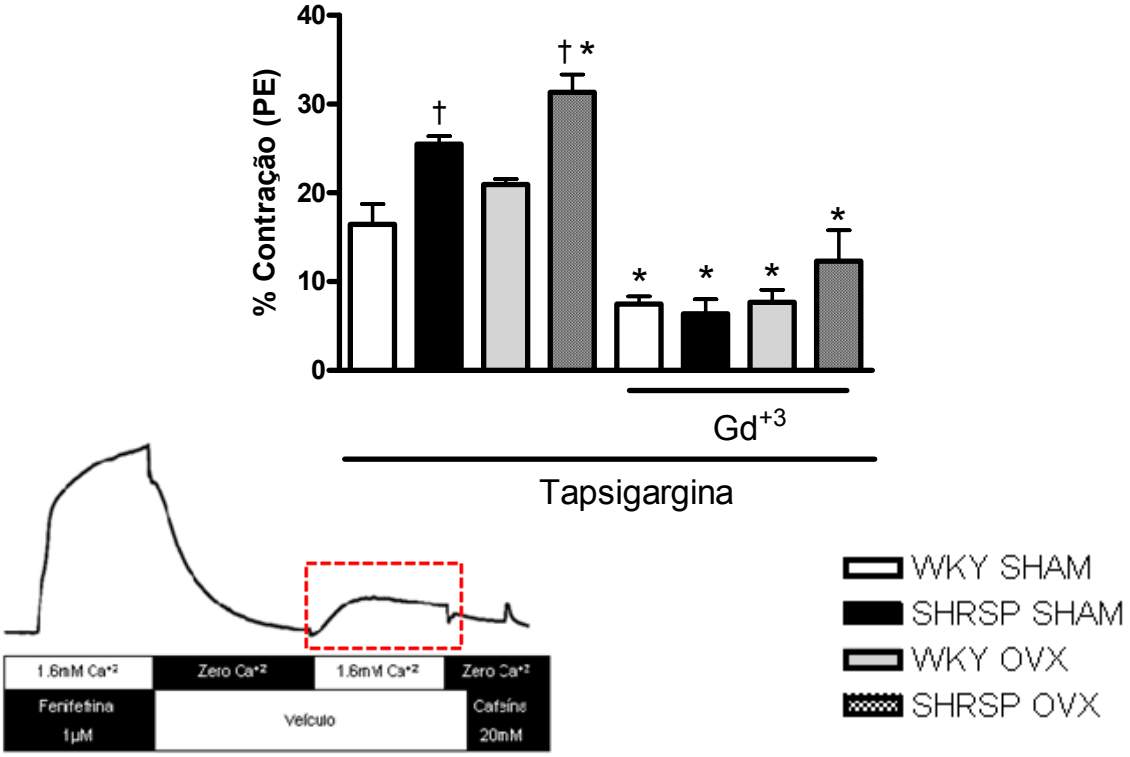



**Figura 20 - O bloqueio de canais CRAC, com $Gd^{3+}$, na presença de tapsigargina, diminuiu a resposta contrátil vascular ao $Ca^{2+}$, abolindo as diferenças encontradas entre aortas de fêmeas SHRSP OVX e sham.** Anéis de aorta de fêmeas WKY e SHRSP, OVX ou sham, incubadas na presença de $Gd^{3+}$ (100µ) e tapsigargina (10µM) demonstraram redução da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$. Valores estão expressos com média±EPM; n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY (WKY OVX). † P< 0,05 vs. respectivo veículo.

f) Efeito dos anticorpos neutrazilantes sobre o influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de fêmeas ovariectomizadas:

Quando a técnica de chariot foi utilizada para internalizar anticorpos neutralizantes contra STIM1 e Orai1, observamos que o bloqueio de Orai1 e STIM1 foi capaz de reduzir as contrações durante o influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de todos os grupos experimentais (figura 21A-B).

Resultados similares foram encontrados quando a transfecção de anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 foi realizada simultaneamente com o bloqueio da $Ca^{2+}$-ATPase do RS (tapsigargina, 10μM). Neste caso, a transfecção de anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1 aboliu as diferenças encontradas na contração durante o influxo de $Ca^{2+}$ entre as fêmeas SHRSP OVX comparados a WKY OVX (figura 21C-D).

Os hormônios sexuais parecem estar regulando negativamente o influxo de $Ca^{2+}$ via STIM1/Orai1, em aorta de fêmeas hipertensas, uma vez que a ovariectomia resulta no aumento da resposta de contração, em condições onde o RS encontra-se depletado.

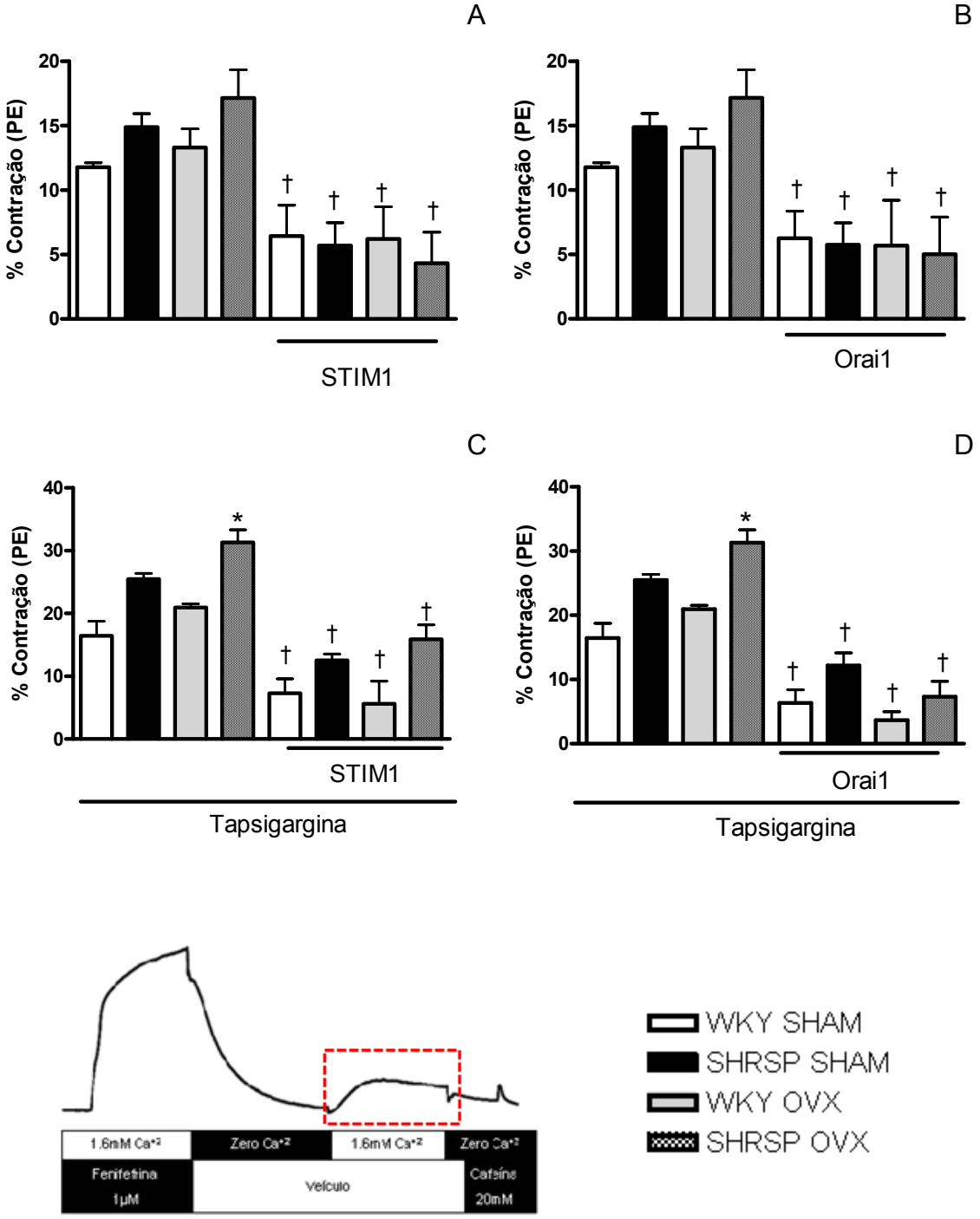



**Figura 21 - Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, aboliram as diferenças na contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$.** Anéis de aorta de fêmeas WKY e SHRSP, OVX ou sham, transfectados com anticorpos anti-STIM1 e anti-Orai1, demonstraram redução da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$. Experimentos realizados na ausência (A-B) ou presença (C-D) de tapsigargina (10µM). Valores estão expressos com média±EPM; n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY (WKY OVX). † P< 0,05 vs. respectivo veículo.

g) Efeito da ovariectomia na recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS:

Aortas de fêmeas SHRSP (sham ou OVX) apresentaram aumento na contração em resposta à cafeína, quando comparados com fêmeas WKY (sham e OVX, respectivamente). Não foram observadas diferenças na resposta contrátil após a estimulação com cafeína, quando comparados os grupos OVX (SHRSP ou WKY) e sham (SHRSP ou WKY) - (Figura 22).

Esses dados demonstram que os hormonios sexuais não influenciam, diretamente, a capacidade de recaptura de $Ca^{2+}$ pelo RS.

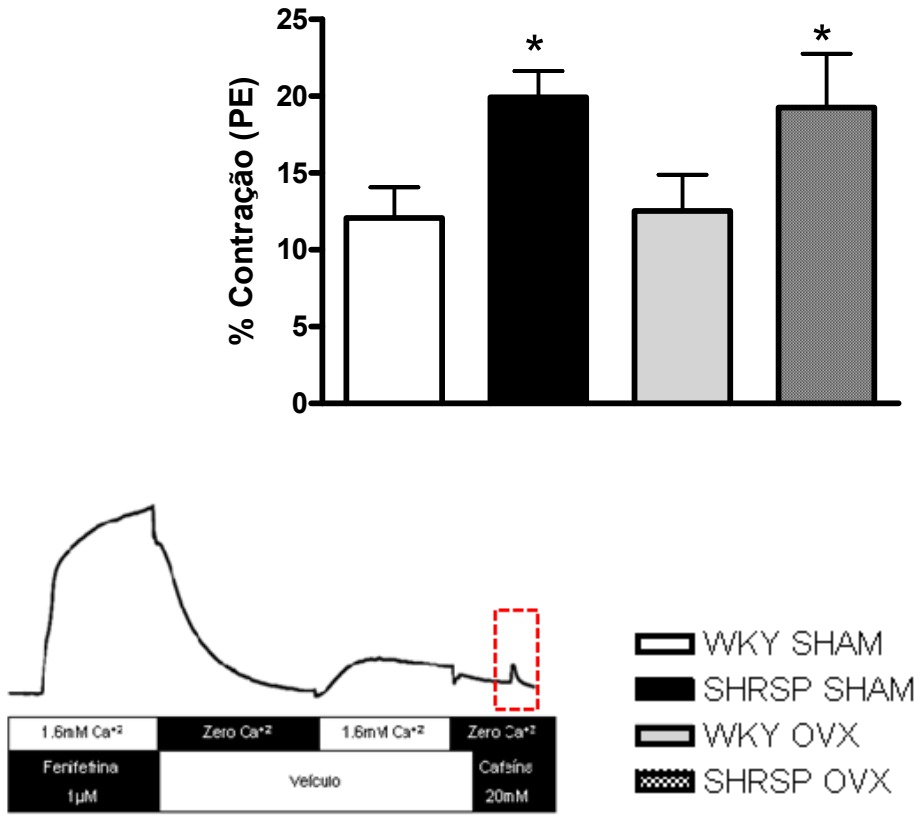



**Figura 22 – Ovariectomia não afetou a recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS.** Anéis de aorta de fêmeas WKY e SHRSP, OVX ou sham, foram estímulados com cafeína para a avaliação da recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS. Valores estão expressos como média±EPM; n=5 para cada experimento. *P< 0,05 vs.respectivo sham.

h) <u>Efeitos de anticorpos neutralizantes na recaptação de $Ca^{+2}$ pelo RS em aorta de fêmeas ovariectomizadas:</u>

A capacidade de recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS também foi avaliada em condições onde as aortas foram transfectadas com anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1. A transfecção de anticorpos anti-STIM1 reduziu a contração induzida por cafeína nas aortas de todos os grupos experimentais. No caso da transfecção com anti-Orai1, o bloqueio dos canais CRAC reduziu o influxo de $Ca^{2+}$ somente nos grupos SHRSP OVX e sham (Figura 23A-B).

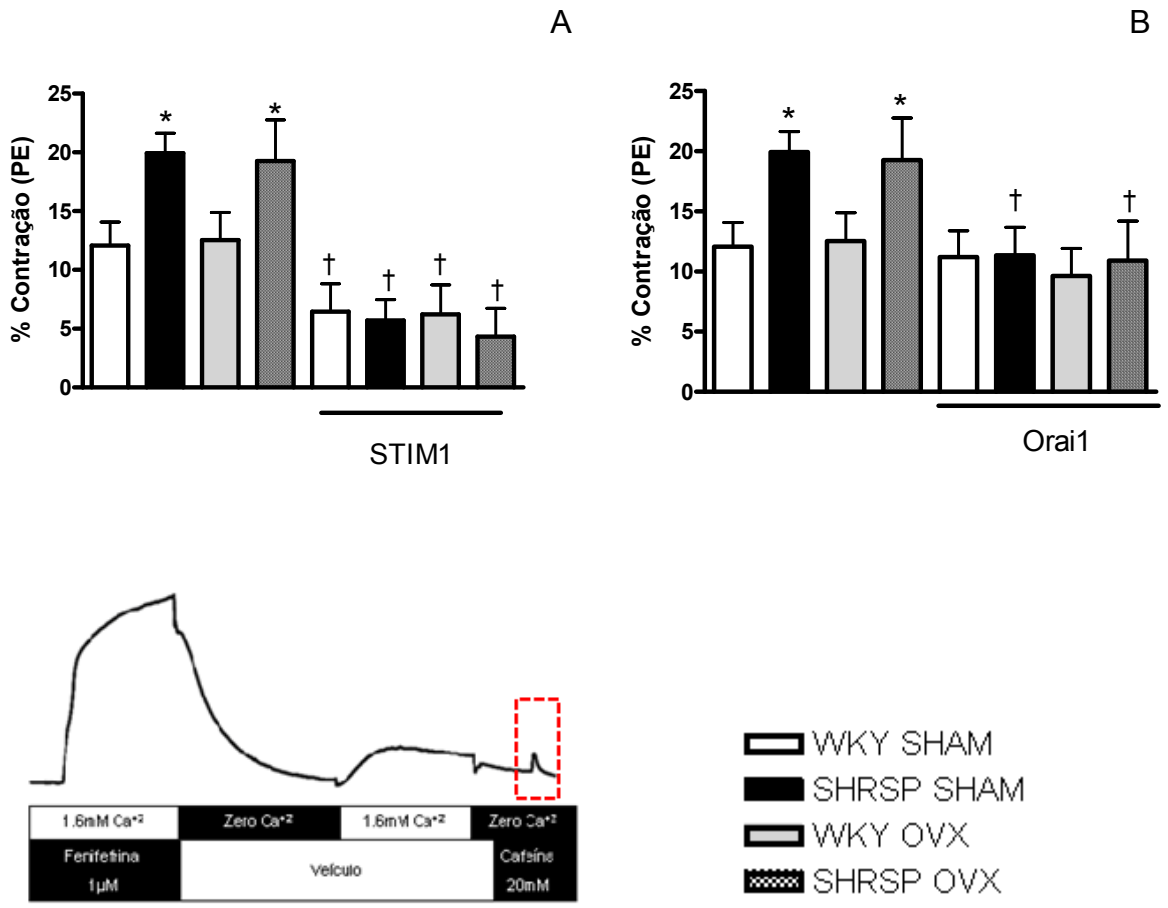



**Figura 23 – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1, internalizados com a técnica de chariot, preveniram a contração induzida por cafeína**. Anéis de aorta de fêmeas WKY e SHRSP, OVX ou sham, foram estímulados com cafeína para a avaliação da recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS, na presença de anticorpos neutralizantes A) anti-STIM1 e B) anti-Orai1. Valores estão expressos como média±EPM; n=5 para cada experimento. *P< 0,05 vs.respectivo sham. † P< 0,05 vs. respectivo veículo.

i) Expressão protéica de STIM1 e Orai1 em aorta de fêmeas OVX:

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de Orai1 em aorta de fêmeas SHRSP e WKY. Após a ovariectomia, observou-se aumento da expressão de Orai1 em aorta de fêmeas SHRSP, mas não em WKY (Figura 24A).

A expressão de STIM1 está aumentada em aorta de fêmeas SHRSP, quando comparada a aquela em fêmeas WKY, tanto em fêmeas sham como OVX. Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão de STIM1, quando comparadas aortas de fêmeas WKY antes ou após ovariectomia (Figura 24B).

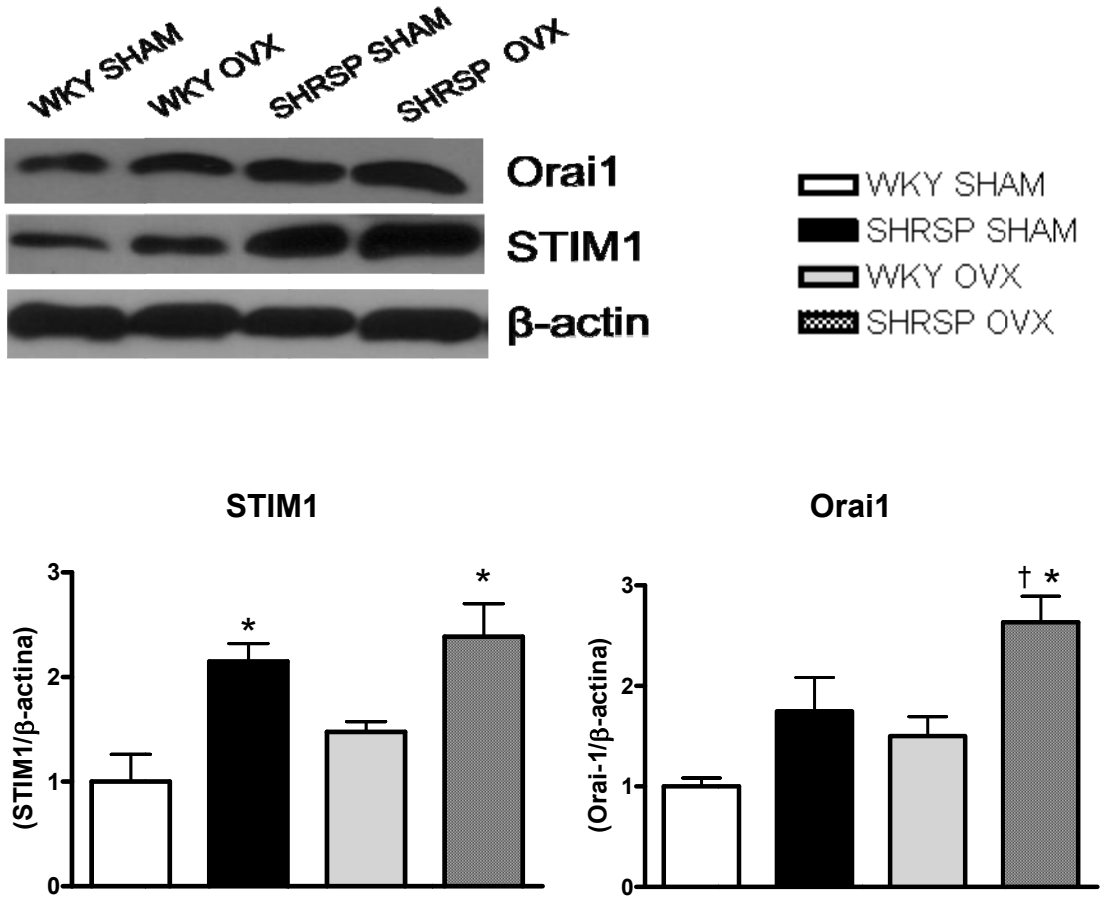



**Figura 24 – Ovariectomia aumentou a expressão protéica de Orai1.** Acima, imagens representativas de western blot e abaixo, gráficos de barras demonstrando que a expressão vascular de A) Orai1 e B) STIM1. Valores normalizados pela expressão de β-actina, n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. respectivo WKY (WKY sham ou WKY OVX). † P< 0,05 vs.respectivo sham (SHRSP sham).

Coletivamente, os resultados do item 3 dos objetivos sugerem que os hormônios sexuais regulam o influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de fêmeas SHRSP, via canais CRAC, em condições onde o RS está vazio. É possível que os hormônios sexuais exerçam um papel modulatório na expressão de Orai1. Podemos dizer que parte das ações protetoras que os hormônios sexuais exercem na vasculatura de fêmeas estão relacionados com a modulação da entrada de $Ca^{2+}$ via canais CRAC/Orai1.

## 5.4 Resultados referentes ao item 4 dos objetivos

Durante a realização dos estudos referentes ao item 4 dos objetivos, trabalhamos com a hipótese de que o aumento intracelular de $Ca^{2+}$ observado em aorta de machos SHRSP, em decorrência da maior ativação da via STIM1/Orai1, resultaria na maior ativação de PKC, uma proteína ativada por $Ca^{2+}$ e que contribui para o processo contrátil.

Para a realização desses experimentos, dois grupos foram utilizados: machos WKY e SHRSP.

a) Expressão e atividade da PKC-α em aortas de machos SHRSP.

A expressão protéica da PKC-α foi avaliada em aortas de machos WKY e SHRSP. Observou-se diminuição da expressão desta subunidade da PKC, em aortas de machos SHRSP, quando comparadas a WKY (Figura 25A). Contudo, observou-se que a atividade da PKC-α encontra-se aumentada em aortas de machos SHRSP, quando comparadas a WKY (Figura 25B).

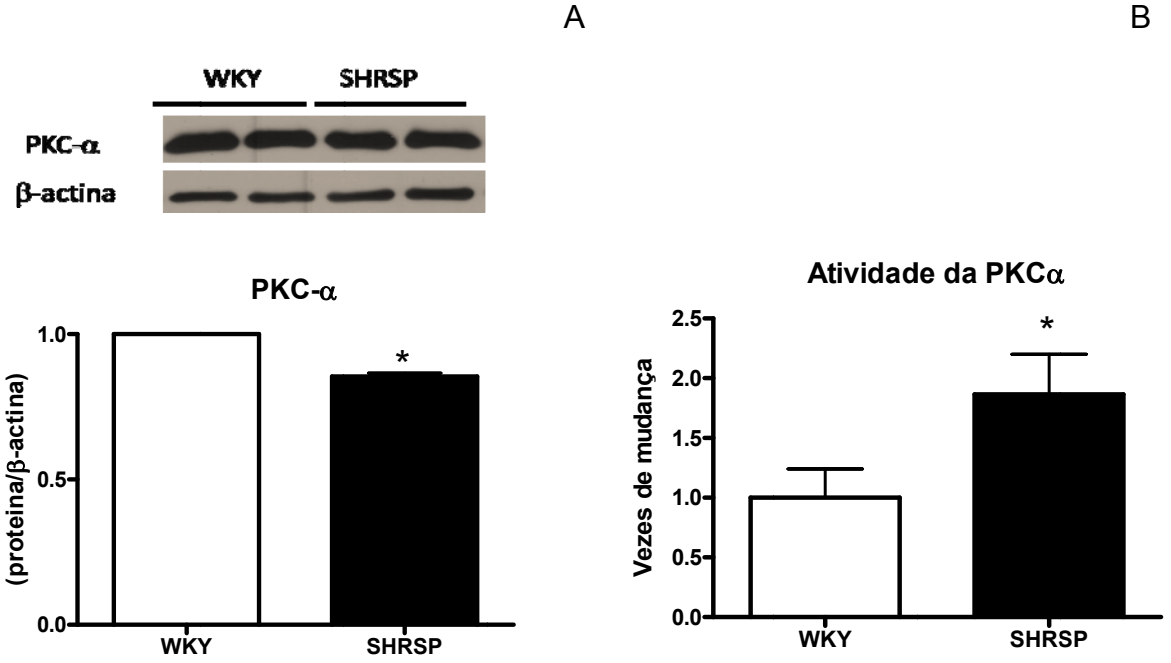



**Figura 25 – Aortas de machos SHRSP apresentam aumento da atividade, mas não da expressão protéica, de PKC-α**. Gel representativo e gráficos de barras demonstrando a A) expressão protéica e B) atividade da PKC-α estão alteradas em aortas de hipertensos, quando comparadas a aquelas em aortas de machos normotensos (n=6). * $p<0,05$ vs. WKY.

b) Efeito de anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 na contração em resposta a ativação da PKC:

Observamos que aortas de machos SHRSP apresentam maior contração em reposta ao PDBu, quando comparadas a WKY (59,8±2,2mN vs. 48,7±1,8mN; respectivamente; p=0,0046). Entretanto, não foram observadas diferenças nos valores de $pD_2$ [(7,65±0,1 SHRSP vs. 7,37±0,09 WKY) – Figura 26A].

A transfecção de aortas com anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 não modificou as respostas de contração em resposta ao PDBu, tanto em aorta de WKY como em SHRSP (Figura 26B-C). Além disso, as diferenças na contração em resposta ao PDBu observadas entre os grupos, não foram abolidas com o uso de anticorpos neutralizantes.

Os dados referentes ao item 4 dos objetivos indicam que o influxo de $Ca^{2+}$, proveniente da ativação de STIM1/Orai1, não participa diretamente da ativação da PKC em aorta de machos WKY ou SHRSP.

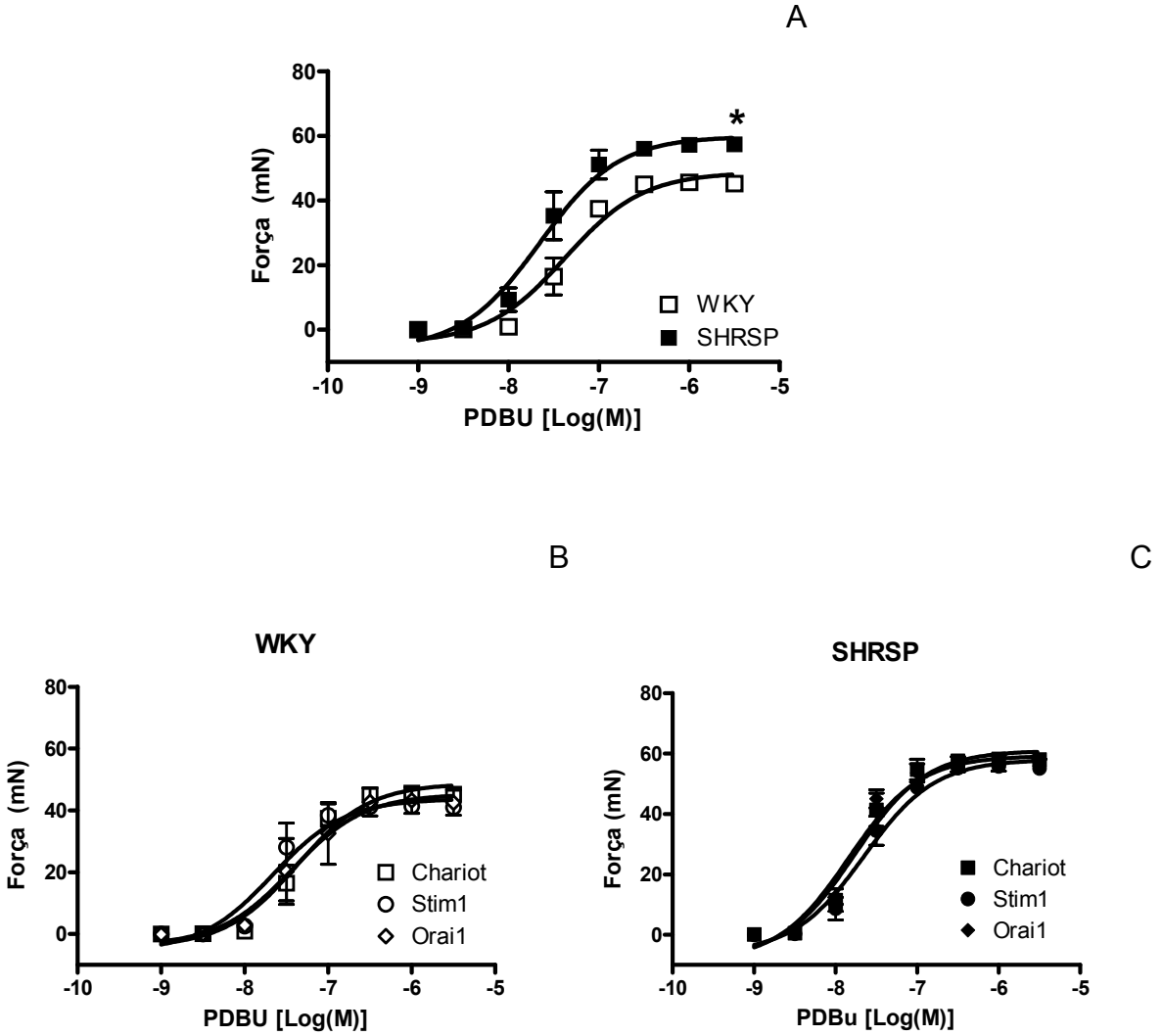



**Figura 26 – Anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 não normalizam o aumento da contração em resposta ao PDBu, em aortas de machos SHRSP.** Curvas concentração-efeito foram realizadas em aortas de machos SHRSP, transfectadas pela técnica de chariot, na presença ou ausência de anticorpos neutralizantes anti-STIM1 e anti-Orai1 Valores estão expressos como média±EPM; n=5 para cada experimento . *P< 0,05 vs. WKY.

## 6 DISCUSSÃO

Em CMLV, a ativação de SOCE/CRAC funciona como chave reguladora da homeostasia de $Ca^{2+}$ [38-39, 41]. Os defeitos na regulação da concentração de $Ca^{2+}$ citoplasmático têm sido relacionados com a patogênese da hipertensão arterial, contribuindo para o aumento da reatividade vascular observado nesta doença. Estudos recentes demonstraram que STIM1, o sensor das concentrações de estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, juntamente com Orai1, a subunidade formadora dos canais CRAC, exercem um papel importante na regulação do $Ca^{2+}$ intracelular.

Inicialmente, este projeto avaliou a participação de STIM1/Orai1 na entrada de $Ca^{2+}$ em CMLV de machos hipertensos, e a contribuição desta via para o aumento da resposta contrátil observada nas aortas de machos SHRSP. Posteriormente, avaliamos se alterações na via STIM1/Orai1 contribuem para as diferenças de resposta contrátil, observadas entre machos e fêmeas SHRSP.

Considerando que 1) defeitos no influxo de $Ca^{2+}$ em CMLV são possíveis candidatos que contribuem para a patogênese da hipertensão arterial, 2) STIM1 e Orai1 representam componentes importantes na regulação de $Ca^{2+}$ intracelular e 3) a ativação de STIM1 e Orai1 em CMLV de animais hipertensos ainda foi pouco estudada, nós propomos que o aumento da ativação de canais CRAC/Orai1, através do sensor de $Ca^{2+}$ STIM1, exerceria um papel importante no aumento da reatividade vascular em animais hipertensos.

Nossos resultados evidenciam que aortas de machos SHRSP apresentam aumento da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, indicando que o influxo de $Ca^{2+}$ está aumentado em aortas de machos SHRSP. Este resultado está de acordo com outro estudo, onde demonstrou-se que aortas de SHRSP apresentaram aumento da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, em condições onde os estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ foram depletados[91].

Observamos que a inibição farmacológica de CRAC, com a utilização de 2-APB e $Gd^{3+}$ [87], resultou na diminuição da contração durante o influxo de $Ca^{2+}$, além de abolir as diferenças na contração entre aortas de machos SHRSP e WKY. Esses dados demonstram que a ativação de canais CRAC contribui para o influxo de $Ca^{2+}$ em CMLV. Outro ponto importante é que a ativação de CRAC é maior em aorta de machos SHRSP, uma vez que o bloqueio farmacológico aboliu as diferenças na contração entre os grupos. A maior ativação dos canais CRAC em aorta de SHRSP

contribui, portanto, para o aumento da contração observada em aorta de animais hipertensos.

Resultados similares foram encontrados quando esses experimentos foram realizados na presença de anticorpos neutralizantes anti-Orai1. Mutações em Orai1 resultaram em mudanças significativas nas propriedades eletrofisiológicas da corrente CRAC, resultando em correntes menos seletivas ao $Ca^{2+}$ [44]. Em CMLV de vias aéreas, o influxo de $Ca^{2+}$ foi inibido após o bloqueio de CRAC, por 2-APB, $Gd^{3+}$, e $La^{3+}$ [52]. Peel e colaboradores (2008) demonstraram que o silenciamento do RNA de Orai1 em CML de vias aéreas bloqueia as correntes iniciadas pela depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ [52]. Estudos como estes disponibilizaram evidências e reforçaram a teoria de que Orai1 é a subunidade formadora do poro dos canais CRAC, preenchendo todos os critérios necessários para ser reconhecido como o canal gerador de SOCE/CRAC[44-45, 48-50, 92-93].

Sabe-se que a ativação de SOCE/CRAC em CMLV é um evento modulado pela ativação de STIM1. O processo de ativação de STIM1 foi bastante estudado em mastócitos e linfócitos, mas sabe-se que em CMLV, STIM-1 também é ativado[30, 94-95]. Em condições onde o RS é depletado, STIM1 sofre modificações conformacionais, o que determina uma profunda redistribuição intracelular de STIM1 na membrana do RS[32-33, 42, 50]. Nestas condições, STIM1 se liga diretamente com Orai1, e, consequentemente, sinaliza o influxo de $Ca^{2+}$ através da abertura de CRAC[96].

Nossos dados demonstram que a depleção dos estoques de $Ca^{2+}$ do RS induz uma maior ativação de SOCE/CRAC em miócitos vasculares de machos SHRSP, quando comparados aos seus controles normotensos WKY e este evento está diretamente associado ao aumento de contratilidade vascular em resposta ao $Ca^{2+}$. Além disso, nossos resultados evidenciam que este evento pode ser bloqueado molecularmente, com a utilização de anticorpos anti-STIM1. A inibição de STIM1 aboliu as diferenças na contração entre aortas de machos SHRSP e WKY, demonstrando que o sensor de $Ca^{2+}$ STIM1 participa diretamente do controle do influxo de $Ca^{2+}$ e contribui para as diferenças na resposta contrátil observadas entre machos normotensos e hipertensos.

Conforme anteriormente discutido, experimentos utilizando RNA de interferência foram utilizados para identificar STIM1 como o sensor de $Ca^{2+}$ no RS[32-33]. É consenso que a supressão da expressão de STIM1 previne a ativação de

SOCE e a ativação de canais CRAC[32-33, 42]. Mutações da porção N-terminal de STIM1 reduzem a afinidade e seletividade dos canais CRAC, tornando-os ativos, sem que ocorram modificações nos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ [42]. Contudo, experimentos onde combinou-se a expressão de STIM1 e Orai1 resultaram em imenso ganho na função de SOCE[48-50, 92], demonstrando que a ativação de Orai1, juntamente com STIM1, sinaliza diretamente o influxo de $Ca^{2+}$, em condições onde o RS está vazio.

Foi demonstrado recentemente que um peptídeo contendo 106 amino-ácidos na terminação C de STIM1 é suficiente para ativar SOCE na ausência da depleção dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$ [96]. Os nossos resultados demonstraram que o bloqueio de STIM1 com anticorpos neutralizantes foi capaz de reduzir a contração induzida pelo influxo de $Ca^{2+}$, indicando que essa proteína é um importante componente para a ativação de SOCE/CRAC.

Além disso, ML-9, um inibidor de kinase, foi recentemente usado para reverter a ativação de STIM1, independentemente de modificaçoes dos estoques de $Ca^{2+}$ [97]. Essas observações levaram a especular-se que a ativação de STIM1 é dependente da sua fosforilação, através da ativação de proteínas kinases. Estas informações são de grande importância, no sentido de proporcionar ferramentas para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que não existem inibidores e agonistas seletivos que proporcionem o bloqueio ou a ativação de STIM1, respectivamente.

Possíveis mecanismos associados com a ativação aumentada do sensor de $Ca^{2+}$ STIM1 e canais CRAC/Orai1 incluem aumento da expressão e atividade dessas proteínas, ativação defeituosa de STIM1, aumento da ativação ou diminuição da inativação de canais CRAC.

Nossos dados funcionais demonstraram o aumento da atividade de STIM1 e canais CRAC/Orai1 em aorta de SHRSP, uma vez que o bloqueio farmacológico e molecular dessas proteínas, aboliu as diferenças na resposta contrátil entre aortas de SHRSP e WKY. Além disso, observamos que a expressão vascular de STIM1 e Orai1 também encontra-se aumentada na vasculatura de machos SHRSP, quando comparados a WKY. Em conjunto, nossos dados demonstram que o aumento da expressão, assim como o aumento da atividade de STIM/Orai1, representa um mecanismo que contribui para o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ e para a concentração de $Ca^{2+}$ intracelular, resultando em diferenças na contração vascular observadas na hipertensão arterial (figura 27).

Uma vez estabelecida as diferenças no influxo de $Ca^{2+}$ e a importância de STIM1 e Orai1 para este fenômeno, decidimos investigar se esta via exercia função moduladora na recaptação de $Ca^{2+}$, em aorta de machos SHRSP.

Sabe-se que os estoques de $Ca^{2+}$ do RS estão aumentados em aortas de SHR e SHRSP[24, 27, 91, 98]. Este fenômeno é associado ao aumento do influxo de $Ca^{2+}$ através do RS, embora outros fatores como a desregulação da reciclagem de $Ca^{2+}$ pela $Ca^{2+}$-ATPase do RS possam contribuir para o maior influxo[52]. Os nossos resultados reforçam esta idéia, uma vez que observamos o aumento dos estoques de $Ca^{2+}$ no RS, evidenciados pelo aumento da contração induzida por cafeína, em aorta de machos SHRSP. A expressão reduzida da $Ca^{2+}$-ATPase2 associada ao aumento da recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS em aorta de machos SHRSP indica um potencial aumento na ativação desta enzima, o que resultaria em maiores estoques intracelualres de $Ca^{2+}$.

O aumento dos níveis de $Ca^{2+}$ intracelular em CMLV de animais espontaneamente hipertensos está associado ao aumento do tônus vascular[25]. Sabe-se que o armazenamento de $Ca^{2+}$ no RS é maior em CMLV de ratos hipertensos, comparado a aquele em CMLV de ratos normotensos, sendo que vários fatores podem contribuir para isso.

Sendo assim, alterações no sensor de $Ca^{2+}$ do RS, STIM1, poderiam exercer efeito regulador direto na recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS, uma vez que a modulação exercida por STIM1 ocorre através das modificações nas concentrações de $Ca^{2+}$ dos estoques intracelulares. Conforme anteriormente mencionado, STIM1 e Orai1 foram recentemente identificados como proteínas reguladoras da homeostasia de $Ca^{2+}$ que possuem um papel fundamental na ativação de CRAC/SOCE em inúmeras células. Nossos resultados demonstram que este terceiro mecanismo proposto, encontra-se de fato alterado em CMLV de machos SHRSP.

Neste sentido, demonstramos que a inibição dos canais CRAC com 2-APB e $Gd^{3+}$, bem como o bloqueio de STIM1 e Orai por anticorpos neutralizantes, preveniram a contração induzida por cafeína. Esses dados indicam que o bloqueio dos canais CRAC/Orai1 e a inibição do sensor de $Ca^{2+}$ STIM1, influenciam diretamente a reposição de $Ca^{2+}$ no RS. Possivelmente, esse evento seja reflexo direto de modificações no influxo de $Ca^{2+}$, via CRAC/Orai1. Além disso, é possível que a maior ativação de STIM1 observada em aortas de machos SHRSP ative

diretamente os canais CRAC/Orai1, favorecendo assim um maior influxo de $Ca^{2+}$ e, consequentemente, a maior recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS (figura 27).

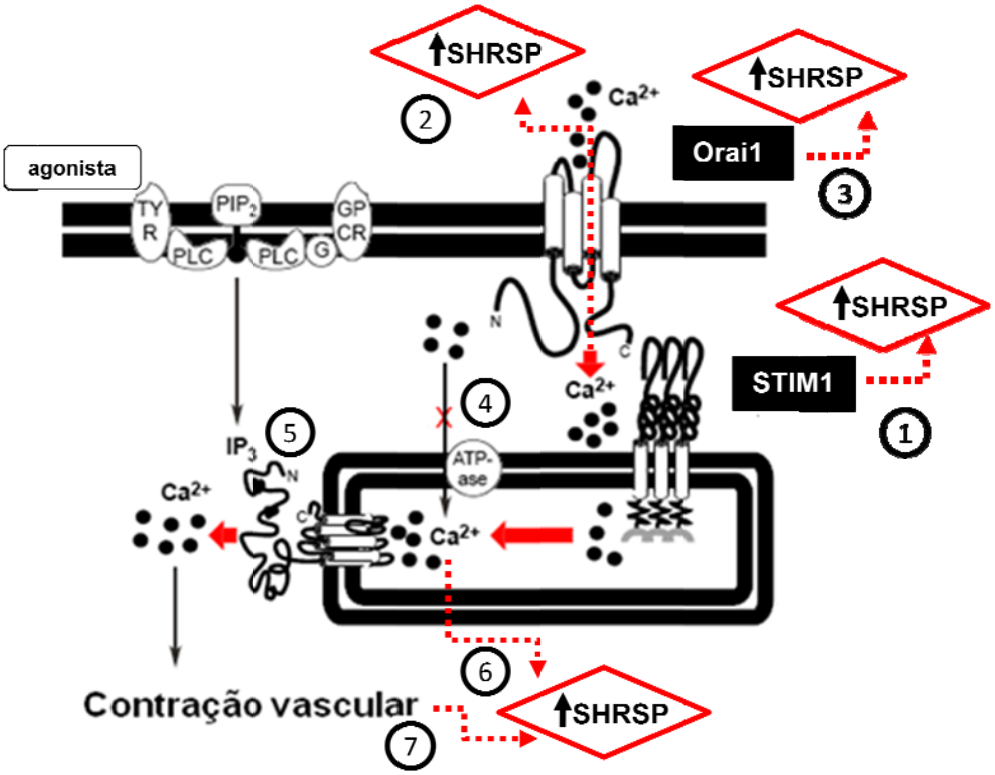



**Figura 27 – Mecanismo prosposto para explicar o aumento da contração em aortas de machos SHRSP.** O esvaziamento do RS leva à 1) ativação do sensor de $Ca^{2+}$ do RS, STIM1, que por sua vez sinaliza o 2) influxo de $Ca^{2+}$, 3) via canais CRAC/Orai1. Parte deste $Ca^{2+}$ é 4) recaptado pelo RS, através da ativação da $Ca^{2+}$-ATPase. A inibição da $Ca^{2+}$-ATPase com tapsigargina leva ao estímulo constante de STIM1, resultando em maior influxo de $Ca^{2+}$ via CRAC/Orai1. Após a estimulação com um agonista constrictor, 5) o $Ca^{2+}$ do RS é liberado e utilizado para a o processo contrátil. A capacidade de recaptação do RS pode ser determinada pela estimulação de receptores de rianodina com cafeína, acarretando a 6) liberação do $Ca^{2+}$ armazenado no RS, gerando uma contração transitória. Em aortas de machos SHRSP, observamos que o influxo de $Ca^{2+}$, assim como a recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS estão aumentados, através de mecanismos dependentes da maior ativação de STIM1/Orai1, o que resulta em maiores contrações em aortas de machos hipertensos.

*Influência da ativação diferencial de Orai1 e STIM1 na proteção vascular em fêmeas hipertensas:*

Diferenças sexuais na hipertensão arterial têm sido repetidamente observadas em estudos epidemiológicos. Essas diferenças são traduzidas em proteção vascular em fêmeas com idade pré-menopausal [53, 55-56, 58]. Entretanto, os mecanismos que conferem a proteção vascular a fêmeas ainda não foram totalmente elucidados.

Sabe-se que o influxo de $Ca^{2+}$ é regulado de forma diferente em CMLV de machos e fêmeas[54, 65-66]. Adicionalmente, o influxo de $Ca^{2+}$ contribui diretamente para a contração vascular, conforme previamente discutido. Portanto, as diferenças nos mecanismos de influxo de $Ca^{2+}$ têm sido propostas para explicar alterações na função vascular entre machos e fêmeas hipertensos[54].

Diversos estudos confirmam esta hipótese. Foi demonstrado que, em condições fisiológicas, a entrada de $Ca^{2+}$ em CMLV encontra-se reduzida em fêmeas, quando comparada a aquela em CMLV de machos[67, 79]. Um outro estudo mostrou que aortas de machos WKY e fêmeas SHR apresentaram menor influxo de $Ca^{2+}$ em resposta a um estímulo contrátil, em comparação com machos SHR [27, 68]. Além disso, as diferenças sexuais referentes ao influxo de $Ca^{2+}$ observadas em CMLV de machos e fêmeas SHRSP são abolidas na ausência de $Ca^{2+}$ extracelular[54, 69-70], demonstrando assim que o influxo de $Ca^{2+}$ contribui diretamente para as diferenças observadas. Nossos resultados estão de acordo com estes estudos, uma vez que demonstramos que aortas de machos SHRSP apresentam aumento da contração em resposta ao influxo de $Ca^{2+}$, quando comparadas a aquelas de fêmeas SHRSP ou machos WKY.

Levando em consideração nossos dados referentes ao item 1 dos objetivos, onde observamos que artérias de machos hipertensos apresentam aumento da entrada de $Ca^{2+}$, um fenômeno dependente da maior ativação do sistema STIM1 e Orai1, decidimos investigar a ativação deste sistema em aorta de fêmeas hipertensas.

Observamos que a inibição dos canais CRAC, com 2-APB e $Gd^{3+}$, resultou na diminuição da contração durante o período de influxo de $Ca^{2+}$, abolindo as diferenças sexuais observadas. Resultados similares foram observados em condições onde STIM1 e Orai1 foram inibidos através de anticorpos neutralizantes.

Nossos dados demonstram que o aumento da ativação de STIM1/Orai1 contribui para o aumento influxo de $Ca^{2+}$ em CMLV de machos hipertensos, em comparação a fêmeas hipertensas, contribuindo assim para as diferenças sexuais observadas. Além disso, a expressão protéica de STIM1 e Orai1 encontra-se diminuída em aortas de fêmeas SHRSP, comparadas a machos. Esses dados, aliados aos dados funcionais, demonstram que alterações na via de STIM1/Orai1 contribuem para as diferenças sexuais na entrada de $Ca^{2+}$/concentração de $Ca^{2+}$ intracelular, contribuindo para o aumento da contração na aorta de machos hipertensos.

Embora as diferenças sexuais no influxo de $Ca^{2+}$ sejam amplamente descritas, poucos são os mecanismos propostos para explicar essas diferenças. Nossos resultados demonstram que as alterações na via de STIM1/Orai1 podem representar um importante mecanismo do controle diferencial do influxo de $Ca^{2+}$ em machos e fêmeas hipertensos (Figura 28).

Considerando o papel regulatório que STIM1 e Orai1 exercem na recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS em aorta de machos SHRSP, decidimos testar se a regulação diferencial desse sistema entre machos e fêmeas, iria de alguma forma influenciar as reservas intracelulares de $Ca^{2+}$. Nossos dados demonstram que a contração transitória induzida por cafeína, a qual reflete a capacidade do RS em recaptar $Ca^{2+}$, foi igual entre machos e fêmeas hipertensos, sugerindo que a recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS não está alterada entre os sexos. Nossos resultados estão de acordo com estudos preliminares, onde demonstrou-se que a liberação de $Ca^{2+}$ induzida por cafeína, na presença de solução livre de $Ca^{2+}$, é semelhante entre machos e fêmeas hipertensos[68, 79]

Esses resultados sugerem que a capacidade da $Ca^{2+}$-ATPase em bombear $Ca^{2+}$ para o RS em CMLV encontra-se modificada entre machos e fêmeas SHRSP, uma vez que o influxo de $Ca^{2+}$ é maior em aorta de machos SHRSP e que os estoques de $Ca^{2+}$ do RS são semelhantes em CMLV de machos e fêmeas SHRSP. Demonstramos que a expressão da $Ca^{2+}$-ATPase2, isoforma expressa em RS de CMLV, encontra-se reduzida em aortas de machos SHRSP, quando comparada a aortas de machos WKY ou fêmeas SHRSP.

Embora a expressão da $Ca^{2+}$-ATPase2 em CMLV de animais hipertensos esteja diminuída, alguns estudos demonstram que sua atividade encontra-se aumentada em aorta de ratos SHR, comparada a aquela em ratos WKY. O resultado

disso é que maior quantidade de $Ca^{2+}$ é recaptada pelo RS de CMLV de ratos hipertensos[26].

Nossos dados demonstram que a expressão de $Ca^{2+}$-ATPase é inversamente proporcional ao influxo de $Ca^{2+}$, embora diferenças na atividade possam compensar a menor expressão desta enzima. Além disso, estudos no futuro poderão nos mostrar se o sistema Orai1/STIM1 apresenta alguma atividade regulatória na ativação e expressão da $Ca^{2+}$-ATPase.

Em conjunto, esses dados sugerem que a estimulação vascular com um agonista constritor, que dependa da liberação de $Ca^{2+}$ intracelular, ocasionará respostas contráteis aumentadas em artérias de machos SHRSP, considerando que a $Ca^{2+}$-ATPase é menos eficaz em remover $Ca^{2+}$ do citosol após um estímulo. Nossos resultados referentes ao objetivo específico 4 reforçam esta idéia e serão melhor discutidos adiante (Figura 28).

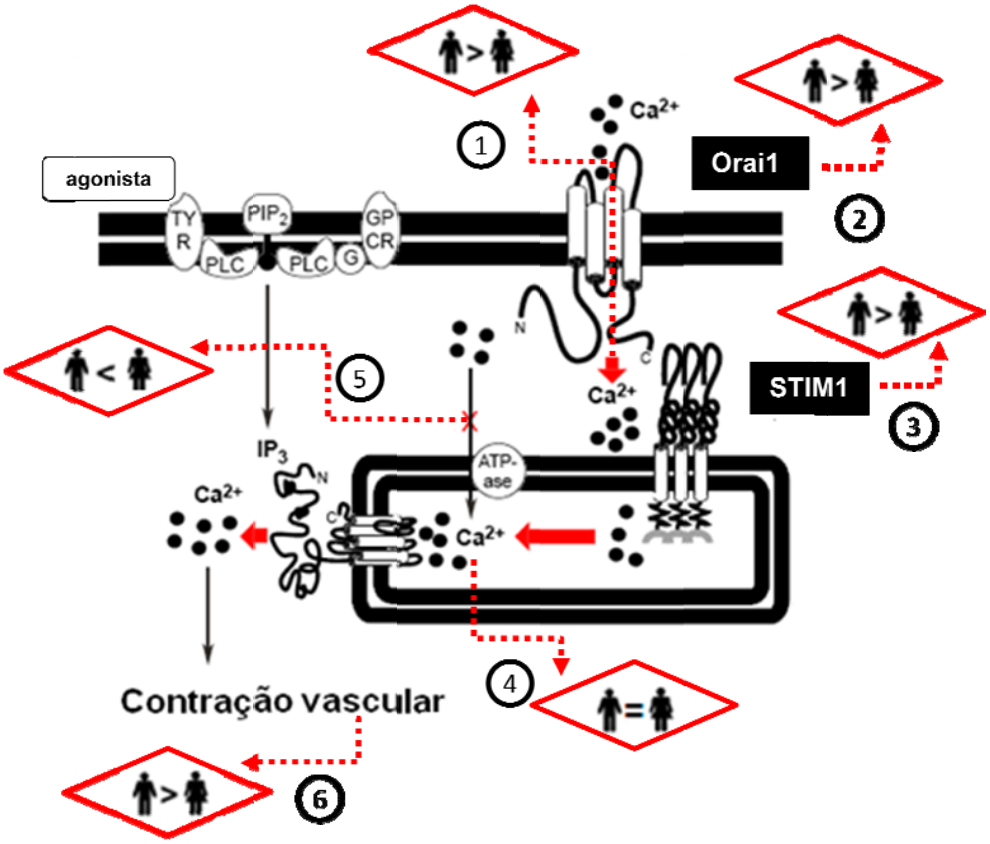



**Figura 28 – Mecanismo proposto para explicar diferenças relacionadas ao sexo durante o aumento da contração vascular na hipertensão.** O menor 1) influxo de $Ca^{2+}$ e a menor ativação de 2) Orai1 e 3) STIM1 observados em aortas de fêmeas SHRSP, resultam em contrações menores, do que observadas em machos SHRSP. Entretanto, a capacidade de 4) recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS é igual entre machos e fêmeas SHRSP, possivelmente devido a diferente expressão e atividade da 5) $Ca^{2+}$-ATPase do RS, o que é maior em fêmeas SHRSP. Como resultado final, observamos menor influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de fêmeas SHRSP, via mecanismos dependentes da ativação de STIM1/Orai1, o que contribui diretamente para as 6) diferenças sexuais observadas na resposta contrátil.

*Influência dos hormônios sexuais na ativação diferencial de Orai1 e STIM1 e na proteção vascular em fêmeas hipertensas:*

As observações clínicas de que a hipertensão é mais comum em homens e em mulheres na pós-menopausa sugerem que os hormônios sexuais femininos possuem efeitos protetores no sistema vascular[77, 99].

Aortas de fêmeas SHRSP OVX demonstraram aumento da contração no período de influxo de $Ca^{2+}$, na presença de tapsigargina. Esse dado demonstra que os hormônios sexuais modulam o influxo de $Ca^{2+}$, em condições onde o RS está vazio. Outros estudos demonstraram resultados similares. Observou-se que CMLV de fêmeas Sprague-Dawley apresentaram menor influxo de $Ca^{2+}$ quando estimuladas com fenilefrina, do que CMLV de machos Sprague-Dawley. Além disso, a ovariectomia de fêmeas Sprague-Dawley aboliu essas diferenças[79]. O mesmo grupo demonstrou em outros trabalhos que a ovariectomia aumentava o influxo de $Ca^{2+}$ em aortas e CMLV de fêmeas SHR, mas não em fêmeas WKY. Além disso, o tratamento de fêmeas SHR OVX com implantes de 17-β-estradiol restabeleceu o influxo de $Ca^{2+}$ nessas fêmeas. Quando experimentos similares foram feitos em machos SHR castrados, não foram observadas diferenças no influxo de $Ca^{2+}$ quando comparados a machos SHR intactos[67-68].

Em conjunto, esses resultados demonstram que os hormônios sexuais femininos conferem proteção vascular a fêmeas hipertensas, servindo como moduladores do influxo de $Ca^{2+}$.

Nossos resultados demonstraram que a inibição de STIM1 e Orai1 com anticorpos neutralizantes aboliu as diferenças na contração entre fêmeas SHRSP OVX e os demais grupos. Considerando que os hormônios sexuais, estrógeno e progesterona, apresentam efeitos protetores no sistema cardiovascular, parece possível que esses hormônios possam modular a atividade e expressão do sistema STIM1/Orai1(Figura 29).

A identificação de mecanismos que contribuam para as diferenças sexuais na vasculatura de hipertensos pode desvendar elementos regulatórios que possam ser usados para conferir proteção cardiovascular.

A ovariectomia não afetou a contração em resposta à cafeína. Nossos resultados estão em acordo com outros, onde demonstrou-se que a ovariectomia não modifica a capacidade do RS recaptar $Ca^{2+}$, tanto em fêmeas WKY como em fêmeas SHR[67-68]. Em conjunto, esses dados sugerem que embora os hormônios

sexuais modulem a contração induzida pelo influxo de $Ca^{2+}$, eles não regulam a recaptação de $Ca^{2+}$ no RS (Figura 29). Além disso, esses dados estão de acordo com os apresentados no item 2 dos objetivos, uma vez que não existem diferenças na recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS entre aorta de machos e fêmeas.

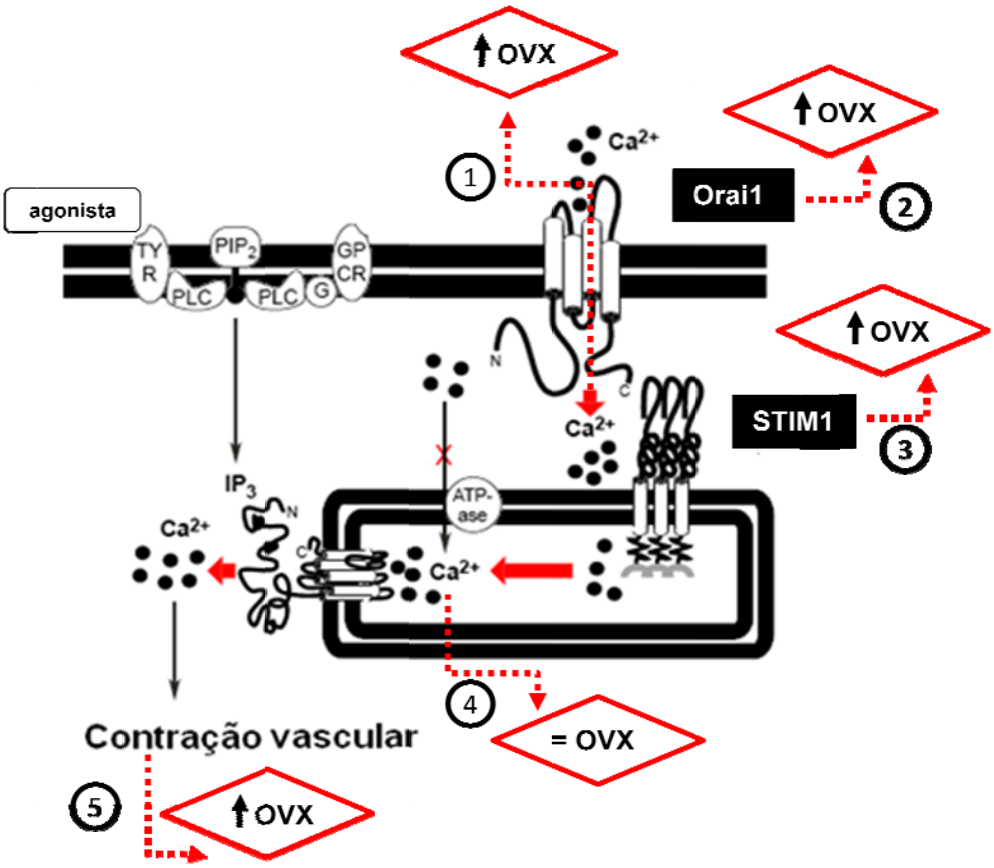



**Figura 29 – Mecanismo proposto para explicar o papel dos hormônios sexuais na regulação da contração vascular na hipertensão.** A ausência de hormônios sexuais sinalizou o maior 1) influxo de $Ca^{2+}$ e a maior ativação de 2) Orai1 e 3) STIM1 em aortas de fêmeas SHRSP, resultando em maiores contrações, quando comparadas a fêmeas SHRSP sham. Entretanto, a capacidade de 4) recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS é igual entre fêmeas SHRSP OVX e sham. Como resultado final, observamos que os hormônios sexuais regulam o influxo de $Ca^{2+}$ em aortas de fêmeas SHRSP, via mecanismos dependentes da ativação de STIM1/Orai1, contribuindo diretamente para a modulação da 5) contração vascular.

*Aumento da ativação da PKC em artérias de machos SHRSP*

Os vasoconstritores ativam receptores na superfície celular para iniciar cascatas de sinalização envolvendo o aumento das concentrações de $Ca^{2+}$ intracelular no citosol e recrutamento da PKC, levando a contração celular. Conforme sugerido anteriormente, o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de machos SHRSP, poderia resultar em maiores respostas contráteis, após estimulação com agonista vasoconstrictor.

Observamos que a resposta contrátil a um ativador da PKC foi maior em aortas de machos SHRSP do que em machos WKY. Resultados similares foram encontrados em outros estudos[80, 82]. Além disso, observamos que a atividade, mas não a expressão, da PKC-α estava aumentada em aorta de machos SHRSP.

Testamos a hipótese de que o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ observado em aorta de machos SHRSP, em decorrência da maior ativação da via STIM1/Orai1, resultaria na maior ativação de PKC, contribuindo para o aumento da contração. A inibição de STIM1 e Orai1 com anticorpos neutralizantes não resultou em inibição da resposta contrátil de aortas em resposta a estimulação com PDBu.

Esses dados não comprovaram que o aumento do influxo de $Ca^{2+}$, proveniente da maior ativação de STIM1 e Ora1, participa da regulação de PKC em aorta de machos SHRSP. Entretanto, é possível que outras proteínas relacionadas à contração possam ser influenciadas pelo aumento do influxo de $Ca^{2+}$ em CMLV de machos hipertensos. Portanto, estudos adicionais irão esclarecer se STIM1/Orai1 podem representar um mecanismo adicional que controle a ativação de outras proteínas dependentes de $Ca^{2+}$ na vasculatura de animais hipertensos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem concluir que o aumento da ativação dos canais CRAC/Orai1, assim como a maior ativação do sensor dos estoques intracelulares de $Ca^{2+}$, STIM1, resulta em aumento do influxo de $Ca^{2+}$, contribuindo para o aumento da resposta contrátil em aortas de machos SHRSP. Além disso, a ativação diferencial de STIM1 e Orai1 contribui para as diferenças sexuais observadas na resposta contrátil entre aortas de machos e fêmeas SHRSP.

Além disso, nossos dados sugerem que:

1 - O aumento da ativação de STIM1/ Orai1 em artérias de machos hipertensos contribui para o aumento do influxo de $Ca^{2+}$ e para a maior recaptação de $Ca^{2+}$ pelo RS, resultando no aumento da resposta contrátil e maiores estoques de $Ca^{2+}$ intracelular, respectivamente.

2 – As diferenças sexuais observadas na ativação de STIM1/Orai1 entre aortas de animais hipertensos são traduzidas em aumento do influxo de $Ca^{2+}$ em aorta de machos SHRSP, assim como no aumento da contração vascular. Entretanto, a ativação diferencial de STIM/Orai entre machos e fêmeas SHRSP não influenciou a capacidade do RS em recaptar $Ca^{2+}$.

3 – Os hormônios sexuais femininos exercem efeitos de proteção vascular, através da regulação do influxo de $Ca^{2+}$, via ativação de canais CRAC/Orai1, em aorta de fêmeas SHRSP.

4 – O aumento do influxo de $Ca^{2+}$, proveniente da ativação de STIM1/Orai1, não contribui para as diferenças da resposta contrátil ao PDBu, em aortas de machos SHRSP.

## REFERÊNCIAS*


1. Safar ME, Boudier HS. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. Hypertension. 2005;46:205-9.

2. Alexis O. Providing best practice in manual blood pressure measurement. Br J Nurs. 2009;18:410-5.

3. Martyn CN, Greenwald SE. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. Lancet. 1997;350:953-5.

4. Magalhães LBNC. Anti-hipertensivos. In: Farmacologia - Penildon Silva, ed 6 - Guanabara koogan 2002;701-12.

5. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. Circulation. 2003;107:2864-9.

6. Nesbitt SD. Lessons in hypertension from new clinical trials. Postgrad Med. 2009;121:34-43.

7. Smith TL, Hutchins PM. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. Hypertension. 1979;1:508-17.

8. Manickavasagam S, Merla R, Koerner MM, Fujise K, Kunapuli S, Rosanio S, *et al.* Management of hypertension in chronic heart failure. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2009;7:423-33.

9. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., *et al.* Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003;42:1206-52.

10. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet. 2005;365:217-23.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portalsaudegovbr/portal/arquivos/pdf/capitulo3_sbpdf. Acesso em 12/01/ 2009.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Epidemiologia e Serviços de Saúde 2006;15:35-45.

13. Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portalsaudegovbr/portal/aplicacoes/noticias/defaultcfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10817. Ace[1]sso em 12/01/2009.


*De acordo com: International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

14. Barbosa JB, Silva AA, Santos AM, Monteiro Junior FC, Barbosa MM, Figueiredo Neto JA*, et al.* Prevalence of arterial hypertension and associated factors in adults in Sao Luis, state of Maranhao. Arq Bras Cardiol. 2008;91:236-42, 60-6.

15. Azambuja MI, Foppa M, Maranhao MF, Achutti AC. Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data. Arq Bras Cardiol. 2008;91:148-55, 63-71.

16. Ong KL, Cheung BM, Man YB, Lau CP, Lam KS. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among United States adults 1999-2004. Hypertension. 2007;49:69-75.

17. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:517-29.

18. Rembold CM, Murphy RA. Myoplasmic calcium, myosin phosphorylation, and regulation of the crossbridge cycle in swine arterial smooth muscle. Circ Res. 1986;58:803-15.

19. Himpens B, Missiaen L, Casteels R. Ca2+ homeostasis in vascular smooth muscle. J Vasc Res. 1995;32:207-19.

20. Wray S, Burdyga T, Noble K. Calcium signalling in smooth muscle. Cell Calcium. 2005;38:397-407.

21. Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. Circ Res. 2006;98:868-78.

22. House SJ, Potier M, Bisaillon J, Singer HA, Trebak M. The non-excitable smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. Pflugers Arch. 2008;456:769-85.

23. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. Adv Physiol Educ. 2003;27:201-6.

24. Tostes RC, Wilde DW, Bendhack LM, Webb RC. Calcium handling by vascular myocytes in hypertension. Braz J Med Biol Res. 1997;30:315-23.

25. Lompre AM. Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999;26:553-7.

26. Levitsky DO, Clergue M, Lambert F, Souponitskaya MV, Le Jemtel TH, Lecarpentier Y*, et al.* Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca(2+)-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. J Biol Chem. 1993;268:8325-31.

27. Cortes SF, Lemos VS, Stoclet JC. Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 1997;29:1322-8.

28. Niki I, Yokokura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H. Ca2+ signaling and intracellular Ca2+ binding proteins. J Biochem. 1996;120:685-98.

29. Gu VY, Wong MH, Stevenson JL, Crawford KE, Brennecke SP, Gude NM. Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia. Mol Hum Reprod. 2008;14:309-15.

30. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O*, et al.* Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. Pflugers Arch. 2007;455:465-77.

31. Giachini FR, Chiao CW, Carneiro FS, Lima VV, Carneiro ZN, Dorrance AM*, et al.* Increased Activation of Stromal Interaction Molecule-1/Orai-1 in Aorta From Hypertensive Rats. A Novel Insight Into Vascular Dysfunction. Hypertension. 2009; 53:409-16.

32. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S*, et al.* STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. J Cell Biol. 2005;169:435-45.

33. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr.*, et al.* STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. Curr Biol. 2005;15:1235-41.

34. Putney JW, Jr., McKay RR. Capacitative calcium entry channels. Bioessays. 1999;21:38-46.

35. Hogan PG, Rao A. Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. Trends Biochem Sci. 2007;32:235-45.

36. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature. 1983;306:67-9.

37. Akhtar RA, Abdel-Latif AA. Requirement for calcium ions in acetylcholine-stimulated phosphodiesteratic cleavage of phosphatidyl-myo-inositol 4,5-bisphosphate in rabbit iris smooth muscle. Biochem J. 1980;192:783-91.

38. Putney JW, Jr. Pharmacology of capacitative calcium entry. Mol Interv. 2001;1:84-94.

39. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. Physiol Rev. 1997;77:901-30.

40. Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. Physiol Rev. 2005;85:757-810.

41. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. Nat Cell Biol. 2002;4:E263-72.

42. Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:4040-5.

43. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B*, et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature. 2006;441:179-85.

44. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M*, et al.* CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca2+ entry. Science. 2006;312:1220-3.

45. Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. Nature. 2006;443:226-9.

46. Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I, Huang Y. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. Br J Pharmacol. 2008;153:846-57.

47. Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. Nature. 2006;443:230-3.

48. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH*, et al.* STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane. Nature. 2005;437:902-5.

49. Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M*, et al.* Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). Nat Cell Biol. 2006;8:771-3.

50. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. J Biol Chem. 2006;281:20661-5.

51. Luik RM, Wu MM, Buchanan J, Lewis RS. The elementary unit of store-operated Ca2+ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. J Cell Biol. 2006;174:815-25.

52. Peel SE, Liu B, Hall IP. ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;38:744-9.

53. Taler SJ. Hypertension in women. Curr Hypertens Rep. 2009;11:23-8.

54. Devynck MA. Gender and vascular smooth muscle cells: a direct influence on Ca2+ handling? J Hypertens. 2002;20:2139-40.

55. Hajjar I, Kotchen JM, Kotchen TA. Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control. Annu Rev Public Health. 2006;27:465-90.

56. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. Circulation. 1997;96:2468-82.

57. Messerli FH, Garavaglia GE, Schmieder RE, Sundgaard-Riise K, Nunez BD, Amodeo C. Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. Ann Intern Med. 1987;107:158-61.

58. Safar ME, Smulyan H. Hypertension in women. Am J Hypertens. 2004;17:82-7.

59. Maris ME, Melchert RB, Joseph J, Kennedy RH. Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005;32:35-9.

60. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. Hypertension. 2000;35:480-3.

61. Pechere-Bertschi A, Burnier M. Gonadal steroids, salt-sensitivity and renal function. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2007;16:16-21.

62. Fortepiani LA, Yanes L, Zhang H, Racusen LC, Reckelhoff JF. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. Hypertension. 2003;42:952-5.

63. Reckelhoff JF, Fortepiani LA. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. Hypertension. 2004;43:918-23.

64. Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. Hypertension. 2005;46:249-54.

65. Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. Braz J Med Biol Res. 2003;36:1143-58.

66. Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC*, et al.* Endothelin, sex and hypertension. Clin Sci (Lond). 2008;114:85-97.

67. Murphy JG, Khalil RA. Gender-specific reduction in contractility and [Ca(2+)](i) in vascular smooth muscle cells of female rat. Am J Physiol Cell Physiol. 2000;278:C834-44.

68. Crews JK, Murphy JG, Khalil RA. Gender differences in Ca(2+) entry mechanisms of vasoconstriction in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 1999;34:931-6.

69. Loukotova J, Kunes J, Zicha J. Cytosolic free calcium response to angiotensin II in aortic VSMC isolated from male and female SHR. Physiol Res. 1998;47:507-10.

70. Loukotova J, Kunes J, Zicha J. Gender-dependent difference in cell calcium handling in VSMC isolated from SHR: the effect of angiotensin II. J Hypertens. 2002;20:2213-9.

71. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N Engl J Med. 1999;340:1801-11.

72. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286:R233-49.

73. Gerhard M, Ganz P. How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. Circulation. 1995;92:5-8.

74. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P*, et al.* Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. Circ Res. 2002;90:1087-92.

75. Bing RJ, Conforto A. Reversal of acetylcholine effect on atherosclerotic coronary arteries by estrogen: pharmacologic phenomenon of clinical importance? J Am Coll Cardiol. 1992;20:458-9.

76. Harder DR, Coulson PB. Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. J Cell Physiol. 1979;100:375-82.

77. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. FASEB J. 1996;10:615-24.

78. Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca2+ uptake. Circ Res. 1997;81:242-8.

79. Crews JK, Khalil RA. Gender-specific inhibition of Ca2+ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999;26:707-15.

80. Turla MB, Webb RC. Enhanced vascular reactivity to protein kinase C activators in genetically hypertensive rats. Hypertension. 1987;9:III150-4.

81. Turla MB, Park SM, Webb RC. Vascular responsiveness to phorbol esters in coarctation-hypertensive rats. J Hypertens. 1990;8:191-6.

82. Silver PJ, Cumiskey WR, Harris AL. Vascular protein kinase C in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol. 1992;212:143-9.

83. Bazan E, Campbell AK, Rapoport RM. Protein kinase C activity in blood vessels from normotensive and spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol. 1992;227:343-8.

84. Karaki H, Kubota H, Urakawa N. Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. Eur J Pharmacol. 1979;56:237-45.

85. Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. J Biol Chem. 1991;266:17067-71.

86. Liu DY, Thilo F, Scholze A, Wittstock A, Zhao ZG, Harteneck C*, et al.* Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. J Hypertens. 2007;25:799-808.

87. Fellner SK, Arendshorst WJ. Store-operated Ca2+ entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR. Kidney Int. 2002;61:2132-41.

88. Nishimaru K, Fujiki S, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenobu K. Endocardial endothelium-dependent positive inotropy by Ca2+ pump inhibitors: possible involvement of store-operated Ca2+ entry. Pharmacology. 2007;80:200-6.

89. Clarke CJ, Forman S, Pritchett J, Ohanian V, Ohanian J. Phospholipase C-delta1 modulates sustained contraction of rat mesenteric small arteries in response to noradrenaline, but not endothelin-1. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;295:H826-34.

90. Gilmore T, Martin GS. Phorbol ester and diacylglycerol induce protein phosphorylation at tyrosine. Nature. 1983;306:487-90.

91. Kanagy NL, Ansari MN, Ghosh S, Webb RC. Recycling and buffering of intracellular calcium in vascular smooth muscle from genetically hypertensive rats. J Hypertens. 1994;12:1365-72.

92. Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS*, et al.* Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. J Biol Chem. 2006;281:24979-90.

93. Wang Y, Deng X, Hewavitharana T, Soboloff J, Gill DL. Stim, orai and trpc channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008;35:1127-33.

94. Peel SE, Liu B, Hall IP. A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle. Respir Res. 2006;7:119.

95. Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ono K, Munehisa Y, Koyama T*, et al.* Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;361:934-40.

96. Kawasaki T, Lange I, Feske S. A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. Biochem Biophys Res Commun. 2009;385:49-54.

97. Smyth JT, Petranka JG, Boyles RR, DeHaven WI, Fukushima M, Johnson KL, *et al.* Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. Nat Cell Biol. 2009;11:1465-72.

98. Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 1990;8:369-75.

99. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. Circulation. 1997;95:252-64.

# ANEXOS

## Anexo A – Artigos publicados

1 - Giachini FR, Chiao, CW, Carneiro FR. Lima VV. Caneiro ZN. Dorrance AM., *et al.* Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats. A Novel Insight Into Vascular Dysfunction. Hypertension. 2009; 53:409-16.

2 – Giachini FR, Webb RC, Tostes RC. STIM and Orai proteins: players in sexual differences in hypertension-associated vascular dysfunction? Clin Sci. 2009;118:391-6.

Hypertension
Journal of the American Heart Association

American Heart Association®
Learn and Live℠

**Increased Activation of Stromal Interaction Molecule-1/Orai-1 in Aorta From Hypertensive Rats: A Novel Insight Into Vascular Dysfunction**

Fernanda R.C. Giachini, Chin-Wei Chiao, Fernando S. Carneiro, Victor V. Lima, Zidonia N. Carneiro, Anne M. Dorrance, Rita C. Tostes and R. Clinton Webb

*Hypertension* 2009;53;409-416; originally published online Dec 15, 2008;
DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.124404
Hypertension is published by the American Heart Association. 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 72514
Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/53/2_Part_2/409

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
http://www.lww.com/reprints

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

# Increased Activation of Stromal Interaction Molecule-1/Orai-1 in Aorta From Hypertensive Rats

## A Novel Insight Into Vascular Dysfunction

Fernanda R.C. Giachini, Chin-Wei Chiao, Fernando S. Carneiro, Victor V. Lima, Zidonia N. Carneiro, Anne M. Dorrance, Rita C. Tostes, R. Clinton Webb

***Abstract***—Disturbances in the regulation of cytosolic calcium ($Ca^{2+}$) concentration play a key role in the vascular dysfunction associated with arterial hypertension. Stromal interaction molecules (STIMs) and Orai proteins represent a novel mechanism to control store-operated $Ca^{2+}$ entry. Although STIMs act as $Ca^{2+}$ sensors for the intracellular $Ca^{2+}$ stores, Orai is the putative pore-forming component of $Ca^{2+}$ release–activated $Ca^{2+}$ channels at the plasma membrane. We hypothesized that augmented activation of $Ca^{2+}$ release–activated $Ca^{2+}$/Orai-1, through enhanced activity of STIM-1, plays a role in increased basal tonus and vascular reactivity in hypertensive animals. Endothelium-denuded aortic rings from Wistar-Kyoto and stroke-prone spontaneously hypertensive rats were used to evaluate contractions because of $Ca^{2+}$ influx. Depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores, which induces $Ca^{2+}$ release–activated $Ca^{2+}$ activation, was performed by placing arteries in $Ca^{2+}$ free-EGTA buffer. The addition of the $Ca^{2+}$ regular buffer produced greater contractions in aortas from stroke-prone spontaneously hypertensive rats versus Wistar-Kyoto rats. Thapsigargin (10 $\mu$mol/L), an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ ATPase, further increased these contractions, especially in stroke-prone spontaneously hypertensive rat aorta. Addition of the $Ca^{2+}$ release–activated $Ca^{2+}$ channel inhibitors 2-aminoethoxydiphenyl borate (100 $\mu$mol/L) or gadolinium (100 $\mu$mol/L), as well as neutralizing antibodies to STIM-1 or Orai-1, abolished thapsigargin-increased contraction and the differences in spontaneous tone between the groups. Expression of Orai-1 and STIM-1 proteins was increased in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats when compared with Wistar-Kyoto rats. These results support the hypothesis that both Orai-1 and STIM-1 contribute to abnormal vascular function in hypertension. Augmented activation of STIM-1/Orai-1 may represent the mechanism that leads to impaired control of intracellular $Ca^{2+}$ levels in hypertension. **(*Hypertension*. 2009;53[part 2]:409-416.)**

**Key Words:** $Ca^{2+}$ regulation ■ STIM-1 ■ Orai-1 ■ SOC ■ CRAC channel ■ hypertension ■ vascular smooth muscle cell

On stimulation, most excitable cells display a biphasic increase in cytosolic calcium ($Ca^{2+}$) concentrations. The initial transient increase is attributed to inositol triphosphate–mediated release of endoplasmic reticulum (ER) $Ca^{2+}$.[1,2] The subsequent prolonged increase requires extracellular $Ca^{2+}$ influx through various pathways. In smooth muscle cells (SMCs), $Ca^{2+}$ entry mechanisms responsible for sustained cellular activation are normally mediated by either voltage-operated or receptor-operated $Ca^{2+}$ channels.[3–5]

Depletion of ER $Ca^{2+}$ stores is able to gate the entry of extracellular $Ca^{2+}$.[6,7] This mechanism, by which the ER acts as a capacitor, leads to the term "store-operated $Ca^{2+}$ (SOC) entry."[6,7] Recently, the discoveries of the stromal interacting molecules (STIMs)[8,9] and Orai proteins[10,11] have provided important information into the possible mechanisms by which this process is regulated.

STIMs are a family of single-transmembrane domain proteins found both in the plasma membrane and the ER, and their involvement with $Ca^{2+}$ entry regulation has been described recently. It has been proposed that one of its isoforms, STIM-1, functions as a sensor for the ER $Ca^{2+}$. The suppression of STIM-1 expression prevents SOC entry and eliminates the store-dependent activation of $Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$ (CRAC) channels. Furthermore, $Ca^{2+}$ depletion from ER results in a profound intracellular redistribution of STIM-1, from a uniform ER pattern to spatially discrete areas close to the plasma membrane.[12,13]

Another protein family, Orai, which presently has 3 members, seems to be an essential component of CRAC channels, and Orai-1 has been suggested to be the pore-forming component of CRAC channels.[10] In addition, STIM-1 and

Received October 3, 2008; first decision October 12, 2008; revision accepted November 15, 2008.

From the Department of Physiology (F.R.C.G., C.-W.C., F.S.C., V.V.L., Z.N.C., R.C.T., R.C.W.), Medical College of Georgia, Augusta; Department of Pharmacology (F.R.C.G., F.S.C., R.C.T.), University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; and the Department of Pharmacology and Toxicology (A.M.D.), Michigan State University, East Lansing.

Correspondence to Fernanda R.C. Giachini, Medical College of Georgia, Department of Physiology, 1120 15th St, CA-3141, Augusta, GA 30912-3000. E-mail fgiachini@mcg.edu

© 2009 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at http://hyper.ahajournals.org DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.124404



Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

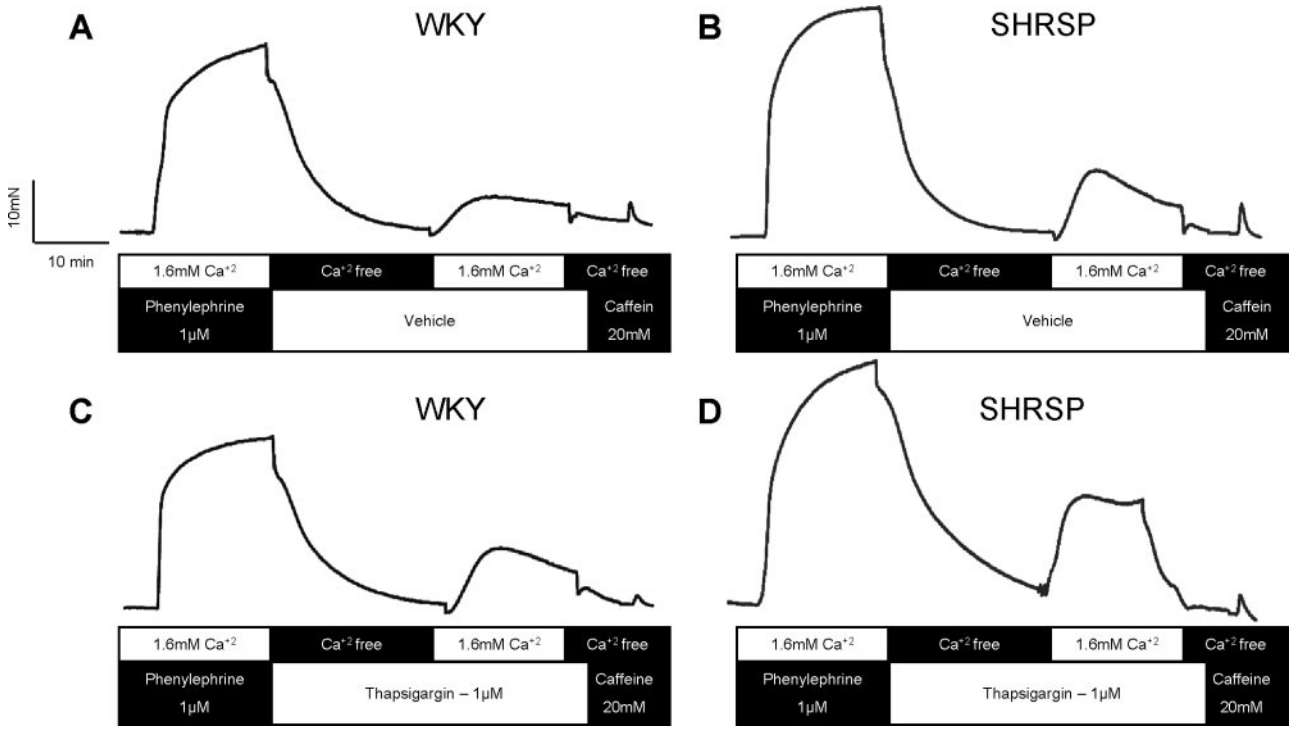



**Figure 1.** Aortas from SHRSPs display augmented spontaneous tone after depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores. The tracings illustrate the protocol used to evaluate force in response to $Ca^{2+}$ influx after depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores (loading period). Briefly, aortic rings from WKY rats (A and C) and SHRSPs (B and D) were stimulated with PE (1 $\mu$mol/L) for 15 minutes. Aortas were washed in $Ca^{2+}$-free EGTA buffer, to deplete intracellular $Ca^{2+}$ stores (depletion period), for 20 minutes. During the depletion period, arteries were incubated with vehicle (A and B) or 1 $\mu$mol/L of thapsigargin (C and D). After $Ca^{2+}$ depletion, intracellular $Ca^{2+}$ stores were loaded (loading period) by placing the aortas in 1.6 mmol/L of $Ca^{2+}$ buffer for 15 minutes. Contractile responses during the loading period, taken as a functional measure of $Ca^{2+}$ influx, were determined. The bathing medium was then replaced with $Ca^{2+}$-free buffer, and after 2 minutes, aortas were stimulated with caffeine (20 mmol/L), to deplete intracellular $Ca^{2+}$ stores, which resulted in a transient contraction. The magnitude of this last response was taken as a measure of the functional capacity of the SR to release $Ca^{2+}$.

Orai-1 are sufficient for the generation of functional CRAC channels.[12,14]

$Ca^{2+}$ is elevated in various cells from patients with hypertension and from spontaneously hypertensive rats. Because $Ca^{2+}$ is a central component in the control of vascular contraction, abnormal handling of this cation by vascular myocytes has been suggested to account for the increased responses of vascular SMCs (VSMCs) to constrictor stimuli and augmented myogenic tone,[15–19] key markers of arterial hypertension.

The magnitude of contraction is associated with the concentration of free $Ca^{+2}$. So, we used the contractile responses to reflect vascular $Ca^{+2}$ influx or mobilization. This technique has been validated by Karaki et al[20] and previous work from our laboratory.[21,22] In addition, the development of active tone in stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) aortas is brought by changes in $Ca^{+2}$ influx, and changes in tone and intracellular $Ca^{2+}$ levels are positively correlated.[23]

Therefore, considering that hypertension is associated with an imbalance in $Ca^{2+}$ homeostasis, and STIM and Orai proteins seem to be fundamental to intracellular $Ca^{2+}$ regulation, we hypothesized that increased activation of CRAC/Orai-1, through the $Ca^{2+}$ sensor STIM-1, plays a role in augmented reactivity in aortas from hypertensive animals.

## Methods

### Animals

Five- to 6-month-old male SHRSPs were obtained from the breeding colony at the Medical College of Georgia. Age-matched male Wistar-Kyoto (WKY) rats were purchased from Harlan (Indianapolis Ind). Rats were maintained on a 12-hour light:dark cycle, housed 2 per cage, and allowed access to normal chow and water ad libitum. Systolic blood pressure was measured in nonanesthetized animals by tail cuff using a RTBP1001 blood pressure system (Kent Scientific Corporation). All of the procedures were performed in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the Medical College of Georgia Committee on the Use of Animals in Research and Education.

### Vascular Functional Studies

After euthanasia, thoracic aortas were rapidly excised and placed in ice-chilled (≈4°C) physiological salt solution. Segments of thoracic aorta were carefully dissected, and the endothelium was removed by gently rubbing the lumen side of the vessels with a metallic pin. Aortic rings (4 mm in length) were mounted on 2 stainless-steel wires in standard organ chambers (model 610 mol/L, Danish MyoTech) for isometric tension recording, as described previously.[21,22] After stabilization, arterial integrity was assessed first by stimulation of vessels with 120 mmol/L of KCl and, after washing and a new stabilization period, by contracting the segments with phenylephrine (PE; 1 $\mu$mol/L). Endothelium denudation was assessed by the absence of a relaxation response to acetylcholine (1 $\mu$mol/L) during PE-induced contraction.

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

## Experimental Protocols

Force development in response to a specific experimental protocol was evaluated in aortas from both rat groups, as described in Figure 1. Briefly, aortic rings were contracted with PE (1 $\mu$mol/L). When the contraction reached a plateau, aortas were washed in $Ca^{2+}$ free-EGTA buffer, to deplete intracellular $Ca^{2+}$ stores (depletion period), for 20 minutes. During the depletion period, aortas were incubated with vehicle or thapsigargin (1 $\mu$mol/L, a putative selective $Ca^{2+}$-ATPase inhibitor), and some rings were treated with nonselective CRAC channel blockers, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 100 $\mu$mol/L) or gadolinium ($Gd^{3+}$; 100 $\mu$mol/L). After $Ca^{2+}$ depletion, intracellular $Ca^{2+}$ stores were loaded (loading period) by placing the aortas in 1.6 mmol/L of $Ca^{2+}$ buffer for 15 minutes. Contraction responses during the loading period were determined. The bathing medium was then replaced with $Ca^{2+}$-free buffer, and after 2 minutes, the aortic segments were stimulated with caffeine (20 mmol/L) to deplete intracellular $Ca^{2+}$ stores, which resulted in a transient contraction.[20,21]

## Antibody Delivery by the Chariot Technique

Antibodies against STIM-1 and Orai-1 (ProSci) were intracellularly delivered by the Chariot technique (Chariot Protein Delivery Reagent, Active Motif). This transfection reagent is able to deliver antibodies into cells while preserving their ability to localize to the proper cellular compartment and to recognize antigens within the cell[24–26] and in our experiments was used to directly inhibit STIM-1 and Orai-1 proteins. Chariot/antibody complexes were prepared and used according to the manufacturer's instructions. Briefly, aortic rings were incubated in Eagle's minimum essential medium containing L-glutamine (1.0%), FBS (10.0%), and penicillin and streptomycin (0.5%) for 30 minutes at 37°C. For each transfection, 12 $\mu$L of Chariot in 100 $\mu$L of 40% dimethyl sulfoxide were mixed with 6 $\mu$g of antibody in 100 $\mu$L of PBS and incubated at room temperature for 30 minutes to allow the complex to form. The aortas were transferred to a sterile 24-well cell culture plate, overlaid with 200 $\mu$L of Chariot/antibody complex, and mixed gently. Eagle's minimum essential medium (400 $\mu$L) was added, and the tissues were incubated for 1 hour at 37°C. Then, Eagle's minimum essential medium (750 $\mu$L) was added, and tissues were further incubated for 2 hours at 37°C. After this period, rings were mounted in the myograph, and functional studies were performed.

## Western Blotting

Aortas from hypertensive and control rats were isolated, cleaned from fat, dissected, and frozen in liquid nitrogen. Extracted proteins (40 $\mu$g) were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline solution with Tween (0.1%) for 1 hour at 24°C. Membranes were then incubated with antibodies overnight at 4°C. Antibodies were as follows: anti–STIM-1 and anti–Orai-1 (1:1000, ProSci), as well as $\beta$-actin (1:1000, Sigma-Aldrich). Human ovary and mouse thymus tissue lysate (ProSci) were used as positive controls for STIM-1 and Orai-1, respectively. After incubation with secondary antibodies, signals were revealed with chemiluminescence, visualized by autoradiography, and quantified densitometrically. Results were normalized by $\beta$-actin expression and expressed as units of change from the control.

## RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA was extracted from aorta using the RNeasy kit (Qiagen Sciences). The quantity, purity, and integrity of all of the RNA samples were determined by NanoDrop spectrophotometry (NanoDrop Technologies). One microgram of total RNA was reverse transcribed in a final volume of 50 $\mu$L using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems), and single-strand cDNA was stored at −20°C. Primers for STIM-1 (catalog No. Rn00968446_m1) and Orai-1 (catalog No. Rn02397170_m1) mRNA were obtained from Applied Biosystems. Real-time RT-PCR (quantitative PCR) reactions were performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in a total volume of 20 $\mu$L of reaction mixture following the manufacturer's protocol, using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×; Applied Biosystems), and 0.1 $\mu$mol/L of each primer. Negative controls contained water instead of first-strand cDNA. Each sample was normalized on the basis of its 18S ribosomal RNA content. The 18S quantification was performed using a TaqMan Ribosomal RNA Reagent kit (Applied Biosystems), following the manufacturer's protocol. Relative gene expression for STIM-1 and Orai-1 mRNA was normalized to a calibrator that was chosen to be the basal condition (untreated sample) for each time point. Results were calculated with the ΔΔCt method and expressed as *n*-fold differences in preproET-1 gene expression relative to 18S rRNA and to the calibrator and were determined as follows: $n\text{-}fold = 2^{-(\Delta Ct\ sample - \Delta Ct\ calibrator)}$, where the parameter *Ct* (threshold cycle) is defined as the fractional cycle number at which the PCR reporter signal passes a fixed threshold. ΔCt values of the sample and the calibrator were determined by subtracting the average Ct value of the transcript under investigation from the average Ct value of the 18S rRNA gene for each sample.

## Immunofluorescence Microscopy Analysis

STIM-1 and Orai-1 expression in endothelium-denuded aortas from SHRSPs and WKY rats was determined by immunofluorescence staining technique. Aortas were frozen in optimal cutting temperature, and sections were obtained. Briefly, aorta sections were washed with PBS with 0.2% Triton X (PBS-T) for 15 minutes at room temperature and fixed in acetone for 5 minutes at −20°C, and nonspecific binding sites were blocked with PBS-T plus 1% BSA for 10 minutes at room temperature and with 10% goat serum in PBS-T/BSA for 30 minutes at room temperature. Subsequently, STIM-1 and Orai-1 expression was determined by incubating the vascular sections with anti–STIM-1 (1:100, rabbit polyclonal, ProSCi) and anti–Orai-1 (1:100, mouse polyclonal, Abcon), respectively, overnight at 4°C. Aortic sections were then placed at room temperature, rinsed with PBS-T for 15 minutes, probed with goat antimouse Alexa Fluor 588, (1:1000, green fluorescence, Invitrogen) and probed with goat antirabbit Alexa Fluor 568 (1:1000, red fluorescence, Invitrogen), which was followed by another rinse with TBS-T. Images were acquired with the use of the confocal microscope (LSM 510 Meta 3.2, Zeiss). Magnification power was set at ×10.

## Drugs and Solutions

Physiological salt solution of the following composition was used: 130 mmol/L NaCl, 14.9 mmol/L $NaHCO_3$, 4.7 mmol/L KCl, 1.18 mmol/L $KH_2PO_4$, 1.17 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 5.5 mmol/L glucose, 1.56 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, and 0.026 mmol/L EDTA. PE and acetylcholine were purchased from Sigma Chemical Co. All of the reagents were of analytic grade. Stock solutions were prepared in deionized water. Control solutions containing vehicle (DMSO) were also used through the experimental protocols.

## Data Analysis

Results are presented as means±SEMs. Contractions were recorded as changes in the displacement (mN) from baseline and are represented as mN per number of experiments. Statistically significant differences were calculated by ANOVA (Newman-Keuls posthoc test) or by Student's *t* test where appropriate. $P<0.05$ was considered significant.

# Results

## Systolic Blood Pressure and Body Weight of the Rats

At 24 weeks, SHRSPs displayed higher systolic blood pressure (mm Hg), in comparison with WKY rats (211.0±7.6, n=15, versus 119.0±1.8, n=15, respectively). Body weight

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

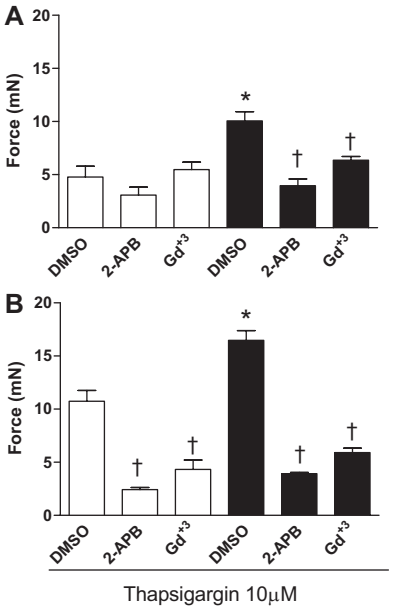



**Figure 2.** CRAC channel blockade partially prevents contraction during $Ca^{2+}$ loading and abolishes differences in spontaneous tone between arteries from WKY rats and SHRSPs. A, Contraction during $Ca^{2+}$ loading period, which is greater in SHRSPs (■; n=6) vs WKY rats (□; n=6), was significantly inhibited after CRAC channel blockade with 2-APB and $Gd^{3+}$. B, After thapsigargin treatment, aortic rings from WKY rats (□) and SHRSPs (■) displayed greater contractions during the $Ca^{2+}$ loading period. CRAC channel blockade with 2-APB and $Gd^{3+}$ decreased contractions and abolished differences between the groups. Values are expressed as means±SEMs, n=6. *$P<0.05$ vs WKY rats. †$P<0.05$ vs DMSO.

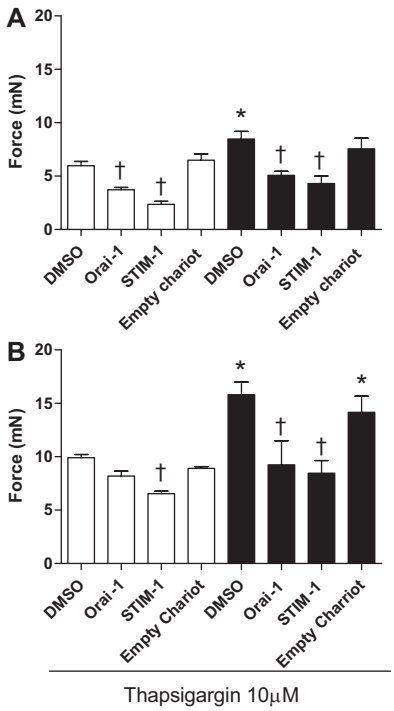



**Figure 3.** Neutralizing antibodies against STIM-1 and Orai-1, delivered with the Chariot technique, partially prevent contraction during the $Ca^{2+}$ loading period. Aortic rings from WKY rats (□; n=5) and SHRSPs (■; n=5), transfected with antibodies anti–STIM-1 or anti–Orai-1, displayed reduced contraction during the $Ca^{2+}$ loading period either in the presence of vehicle (A) or after thapsigargin treatment (B). Values are expressed as means±SEMs. *$P<0.05$ vs WKY rats. †$P<0.05$ vs DMSO.

of SHRSPs was significantly lower (296.0±6.1 g; n=15) when compared with WKY rats (345.0±5.2 g; n=15).

## Force Development During the $Ca^{2+}$ Loading Period

Figure 1 illustrates the protocol used to evaluate force development in response to $Ca^{2+}$ influx after depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores (loading period) and after caffeine stimulation to measure the functional capacity of the sarcoplasmic reticulum (SR) to release $Ca^{2+}$. After an initial response to 120 mmol/L of KCl (SHRSP, 14.1±3.2 mN versus WKY, 22.7±5.3 mN; n=10) and a new stabilization period, aortas were stimulated with PE (1 μmol/L), and the contraction was allowed to reach a plateau. PE-induced contractions were similar in aortas from SHRSPs (20.8±1.7 mN; n=12) compared with WKY rats (15.6±2.7 mN; n=12). After PE contraction, aortas were washed in $Ca^{2+}$ free-EGTA buffer either in the absence (Figure 1A and 1B, vehicle) or presence (Figure 1C and 1D) of thapsigargin (1 μmol/L).

Figure 2A shows that, during the $Ca^{2+}$-loading period, force development was augmented in aortas from SHRSPs (10.0±0.9 mN; n=6) compared with WKY rats (4.8±1.0 mN; n=6). CRAC channel blockade with 2-APB and $Gd^{3+}$ significantly inhibited contraction in SHRSP aortas during the $Ca^{2+}$ loading period (3.9±0.6 and 6.3±0.4 mN, respectively) but had no significant effects in WKY aortas.

Thapsigargin was used to inhibit the SR $Ca^{2+}$-ATPase and to promote the depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores. Accordingly, this would result in continuous stimulation of the SR $Ca^{2+}$ sensor, STIM-1, and, consequently, activation of SOC entry through CRAC channels. As shown in Figure 2B, thapsigargin incubation augmented contractions during the $Ca^{2+}$ loading period in aortic rings from both groups. However, contractions were greater in SHRSP aortas (16.5±0.9 mN versus WKY, 10.7±1.0 mN; n=6). During thapsigargin incubation, simultaneous inhibition of CRAC channels by 2-APB and $Gd^{3+}$ significantly decreased $Ca^{2+}$ loading–induced contractions both in WKY rats (2.4±0.2 and 4.3±0.9 mN, respectively) and SHRSPs (3.9±0.1 and 5.9±0.4 mN, respectively), abolishing the differences between the groups. Collectively, these results suggest that CRAC channel activation is increased in aortas from the hypertensive animals, contributing to augmented extracellular $Ca^{2+}$ influx.

As an alternative approach to the pharmacological inhibition with 2-APB and $Gd^{+3}$, neutralizing antibodies against STIM-1 and Orai-1 were intracellularly delivered by the Chariot technique. Figure 3A shows that transfection with Orai-1 or STIM-1 antibodies resulted in decreased contraction during the $Ca^{2+}$ loading period in both groups, indicating that activations of STIM-1 and Orai-1 are required for SOC entry, even in physiological conditions. After transfection, contractile responses in SHRSP aortas were similar to those in the control group, reinforcing the notion that these proteins play a role in augmented tone development in vessels from SHRSPs. On thapsigargin inhibition, anti–Orai-1 and anti–

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

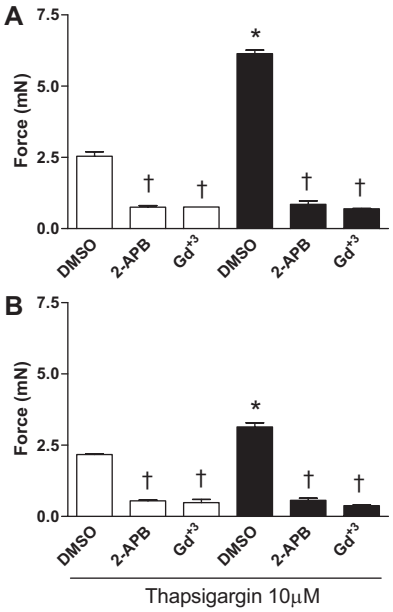



**Figure 4.** CRAC channels contribute to the SR $Ca^{2+}$ loading. Caffeine-induced contractions after loading of intracellular $Ca^{2+}$ stores are prevented by CRAC channel blockade, both in aortas from WKY rats and SHRSPs. Aortic rings from WKY (□; n=6) and SHRSPs (■; n=6) were made to contract in response to caffeine in the absence (A) or presence (B) of thapsigargin (10 μmol/L), after a depletion and reloading cycle, as described in Figure 1. Values are expressed as means±SEM. *$P<0.05$ vs WKY rats. † $P<0.05$ vs DMSO.

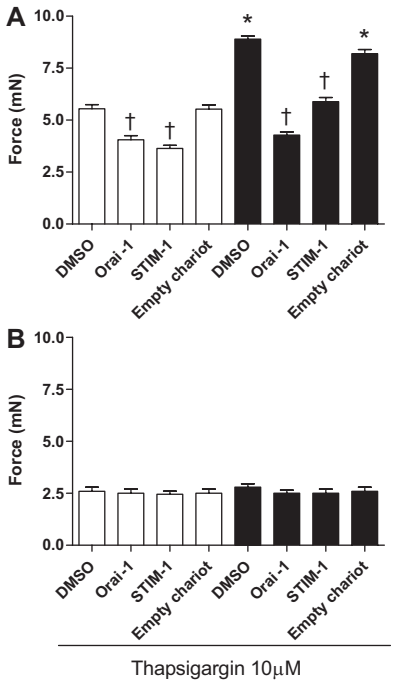



**Figure 5.** STIM-1 and Orai-1 contribute to the SR $Ca^{2+}$ loading. Neutralizing antibodies against STIM-1 and Orai-1, delivered with the Chariot technique, partially prevent contraction in response to caffeine after loading of intracellular $Ca^{2+}$ stores. In the presence of vehicle (A) or after thapsigargin treatment (B), aortic rings from WKY rats (□; n=5) and SHRSPs (■; n=5) submitted to anti–STIM-1 or anti-Orai-1 transfection, displayed reduced contractions to caffeine after a depletion and reloading cycle, as described in Figure 1. Differences between SHRSPs and WKY rats were abolished after antibody transfection. Values are expressed as means±SEMs. *$P<0.05$ vs WKY. †$P<0.05$ vs DMSO.

STIM-1 antibody transfection decreased contractile responses during the $Ca^{2+}$ loading period in SHRSP aortas, whereas only a small reduction was observed in vessels from WKY rats (Figure 3B). Empty Chariot or incubation of vessels with all of the reagents used in the Chariot protocol except antibodies, as well as the addition of a nonspecific antibody (antimouse IgG) to the empty Chariot, were used as additional controls and did not produce any significant effects. We speculate that increased CRAC channel activation in aortas from hypertensive rats, through mechanisms dependent on STIM-1 and Orai-1 activation, results in exacerbated extracellular $Ca^{2+}$ influx and augmented spontaneous tone on the depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores.

## Intracellular $Ca^{2+}$ Stores Depletion

The functional capacity of the SR to release $Ca^{2+}$ was evaluated by placing the aortas in $Ca^{2+}$-free buffer for 2 minutes and by stimulation with caffeine (20 mmol/L). As observed in Figure 4A, SHRSP aortas displayed increased caffeine-induced contractions compared with WKY rats. CRAC channel blockade with 2-APB and $Gd^{3+}$ during the $Ca^{2+}$-loading period reduced contractions induced by caffeine, both in WKY rats and SHRSPs. On thapsigargin incubation, caffeine-induced contractions were already reduced compared with those in vehicle-treated vessels, but still greater in SHRSP aortas, confirming that inhibition of the SR $Ca^{2+}$-ATPase activity decreases intracellular $Ca^{2+}$ storage. Caffeine-induced contractions were further reduced in aortas from both groups on CRAC channel blockade. Treatment with 2-APB and $Gd^{3+}$ practically abolished contractions in both groups (Figure 4B). These results confirm that CRAC channel activation contributes to SR $Ca^{2+}$ loading.

Figure 5A shows that transfection of Orai-1 or STIM-1 antibodies decreased the SR $Ca^{2+}$ loading capacity, resulting in smaller transient contractions to caffeine in both groups. Furthermore, differences in caffeine-induced contractions between aortas from WKY rats and SHRSPs were abolished after transfection of Orai-1 or STIM-1 antibodies. On thapsigargin incubation, caffeine-induced contractions were decreased in vessels from SHRSPs and WKY rats, and no differences were found among the groups (Figure 5B). In this condition, transfection of Orai-1 or STIM-1 antibodies had no further effects. These data reinforce the suggestion that STIM-1 and Orai-1 activation is important during the SR $Ca^{2+}$ reloading period and indicate that aortas from hypertensive rats display increased activation of STIM-1 and Orai-1–related pathways.

## STIM-1 and Orai-1 Expression

Aortas from SHRSPs exhibited increased protein levels of STIM-1 (1.61±0.14) and Orai-1 (1.23±0.06) compared with WKY rats (Figure 6A-B). In addition, STIM-1 and Orai-1 mRNA levels were augmented in aortas from SHRSPs (1.25±0.1 and 1.69±0.3, respectively) compared with WKY rats (Figure 6C and 6D). Immunohistochemistry analysis

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

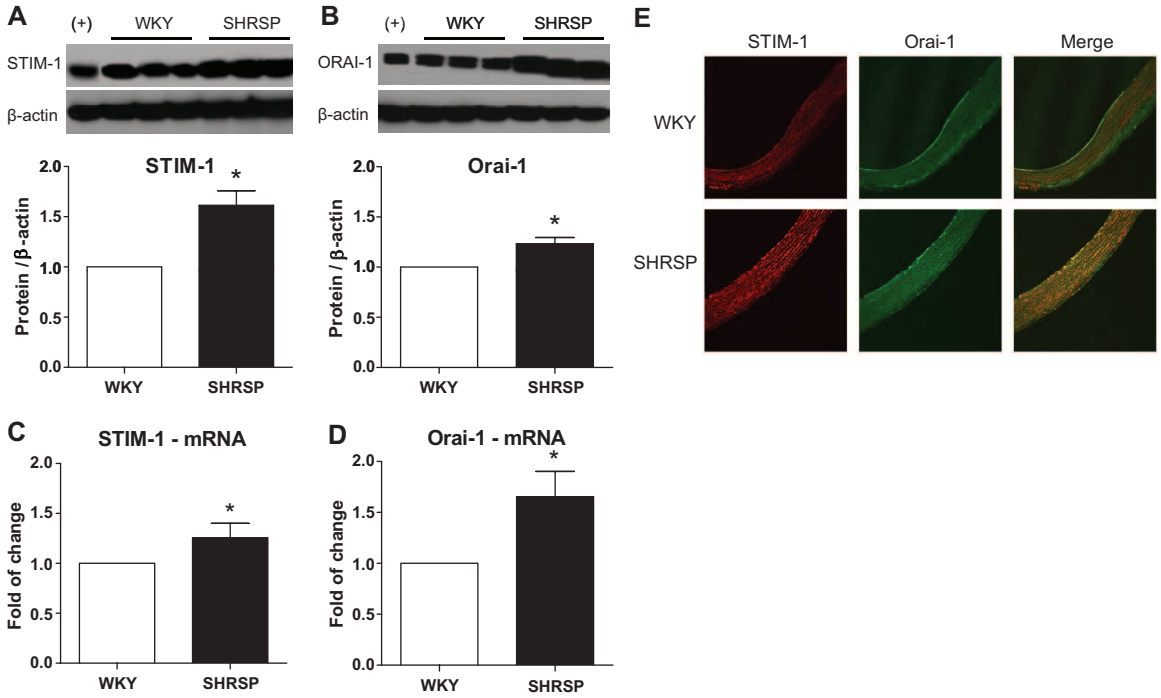



**Figure 6.** SHRSPs display increased vascular Orai-1 and STIM-1 protein and mRNA levels. Top, representative Western blot images, and, bottom, corresponding bar graphs demonstrating that (A) STIM-1 and (B) Orai-1 protein and (C) STIM-1 and (D) Orai-1 mRNA levels are augmented in SHRSP aortas (■; n=6) vs WKY rats (□; n=6). Densitometric analyses were performed, and values were normalized to $\beta$-actin protein expression. *$P<0.05$ vs WKY rats. E, Immunohistochemistry analysis using confocal microscopy confirmed increased expression of STIM-1 (red) and Orai-1 (green) in aortas from SHRSPs (n=3) vs WKY rats (n=3).

confirmed increased expression of STIM-1, but not Orai-1, in aortas from SHRSPs in comparison with WKY rats (Figure 6E).

## Discussion

In smooth muscle, the activation of SOC entry is key to mediating long-term cytosolic $Ca^{2+}$ signals and replenishing intracellular $Ca^{2+}$ stores.[6,27,28] In many cell types, SOC entry carries a highly $Ca^{2+}$-selective, nonvoltage-gated, inwardly rectifying current termed the "CRAC current."[7,27,28] A defect in the regulation of $Ca^{2+}$ plays a role in the increased vascular reactivity in hypertension. The cellular mechanisms involved in abnormal $Ca^{2+}$ handling in VSMCs are numerous and include increased $Ca^{2+}$ entry, increased $Ca^{2+}$ storage in the SR, or decreased $Ca^{2+}$ extrusion. In this article, we focused on the possibility that increased $Ca^{2+}$ influx mediated by a defective signal from intracellular $Ca^{2+}$ stores contributes to abnormal vascular reactivity in hypertension. Increased activation of CRAC/Orai-1, through the $Ca^{2+}$ sensor STIM-1, plays a role in augmented reactivity in aortas from hypertensive animals.

Augmented $Ca^{2+}$ levels in SMCs from spontaneously hypertensive rats[29] can be attributed to an increase in the amount of $Ca^{2+}$ in the SR, which may contribute to enhanced vascular tone through $Ca^{2+}$-release mechanisms. Differences in SR $Ca^{2+}$ levels in arteries from hypertensive and normotensive rats include various possibilities. First, it is possible that augmented $Ca^{2+}$ uptake through the SR $Ca^{2+}$-ATPase–dependent mechanisms contributes to an increased $Ca^{2+}$ store. Accordingly, Levitsky et al[30] showed higher expression of the SR $Ca^{2+}$-ATPase 2a and 2b isoforms in VSMCs from SHRs, which may account for the increased responses to thapsigargin and enhanced $Ca^{2+}$ stores in vascular myocytes from these animals. Furthermore, Cortes et al[19] have shown that, in $Ca^{2+}$-free medium, $Ca^{2+}$ release induced by thapsigargin, which represents $Ca^{2+}$ release from SR/ER, was 2 times higher in rat aortic SMCs from SHRs than in those from WKY rats.[29] These data show that the thapsigargin-sensitive pool is greater in SHRs than in WKY rats. Second, alterations in $Ca^{2+}$ storage proteins, such as calsequestrin and calreticulin, may also contribute to increased SR $Ca^{2+}$ levels. $Ca^{2+}$ storage proteins, characterized by high $Ca^{2+}$-binding capacity, keep high concentrations of $Ca^{2+}$ inside the SR/ER. On inositol triphosphate stimulus, eg, $Ca^{2+}$ is unbound from $Ca^{2+}$ storage proteins and released to the cytoplasm.[31] Furthermore, calreticulin is elevated in peripheral maternal blood during preeclampsia in humans,[32] and cardiac hypertrophy causes alterations in the SR $Ca^{2+}$-storing proteins, a mechanism that may contribute to the contractile dysfunction of hypertrophied cardiac myocytes.[33] A correlation between increased levels of calreticulin/calsequestrin and increased risk of adult heart disease has also been established.[34] A third mechanism is represented by alterations in the $Ca^{2+}$ ER sensor, STIM-1, which modulates/activates $Ca^{2+}$ entry. SOC entry in SMCs involves functional STIM-1 proteins, which, on activation, translocate to plasma membrane domains and activate $Ca^{2+}$ entry, similarly to what has been described in other tissues.[35–37]

Recent literature has identified STIM and Orai proteins as key signaling players in the activation of SOC in a number of inflammatory cell types. Orai-1 protein fulfills all of the

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

criteria of being the SOC moiety itself.[11,13,14,38–41] In addition, combined expression of STIM-1 and Orai-1 resulted in a huge gain of SOC function and indicates that the 2 proteins are likely sufficient to mediate the operation of SOCs.[13,14,38,39] Peel et al[42] showed that Orai-1 small interfering RNA transfection on whole airway SMCs blocks inward currents initiated by $Ca^{2+}$ store depletion. They found a similar result by using inhibitors of SOC $Ca^{2+}$ influx, including 2-APB, $Gd^{3+}$, and lanthanum. In addition, mutations in Orai-1 also result in significant changes to the electrophysiology properties of CRAC current, rendering the current less $Ca^{2+}$ selective with outward rectification.[11] Such studies have provided evidence for the theory that Orai-1 forms the pore-forming subunits of the CRAC channel. Orai-1 and STIM-1 may also contribute to the function of other SOC channels.[43] In this sense, Orai-1 has been reported to interact with the TRPC1 channel and forms a ternary complex along with STIM-1 in the plasma membrane.[44,45] Nailing down the identity of both the sensor and the channel itself has created new possibilities in the $Ca^{2+}$ signaling field.

Considering that defects in $Ca^{2+}$ handling in VSMCs are among the candidate cellular mechanisms for the pathogenesis of hypertension, STIM-1/Orai-1 represent important components to the intracellular $Ca^{2+}$ regulation, and STIM-1/Orai activation in VSMCs from hypertensive animals has not been addressed, we hypothesized that increased activation of CRAC/Orai-1, through the $Ca^{2+}$ sensor STIM-1, plays a role in augmented reactivity in aortas from hypertensive animals. As evidenced by our results, CRAC channel activation is increased in aortas from SHRSPs by mechanisms dependent on STIM-1 and Orai-1 activation, resulting in augmented extracellular $Ca^{2+}$ influx, inferred from spontaneous enhancement in contractile function.

We described previously that aortas from SHRSPs displayed increased force development during the $Ca^{2+}$-loading period on the depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores.[22] The SR $Ca^{2+}$ store is larger in aortas from SHRSPs because of an enhanced influx of $Ca^{2+}$ across the sarcolemma rather than an impaired recycling of the cation by the SR $Ca^{2+}$-ATPase.[42] This study shows that prevention of STIM-1 activation by neutralizing antibodies prevents contractions induced by $Ca^{2+}$ influx during the $Ca^{2+}$ loading period. Neutralization of Orai-1 also decreased $Ca^{2+}$ influx, as indicated by our functional experiments. Furthermore, thapsigargin-mediated vascular $Ca^{2+}$ influx was greatly reduced by transfection of STIM-1 and Orai-1 antibodies compared with that in negative transfected aortas.

2-APB, a nonselective blocker, and $Gd^{3+}$, a selective and irreversible blocker of CRAC channels, were used to inhibit SOC entry.[46] 2-APB and $Gd^{3+}$ inhibited $Ca^{2+}$ entry, as evidenced by inhibition of contractile responses, in aortas from WKY rats and SHRSPs. The differences in spontaneous tone development during the $Ca^{2+}$-loading period between the groups were abolished after CRAC channel blockade. These results demonstrate that CRAC channels represent an important pathway for $Ca^{2+}$ entry and that CRAC activation is enhanced in aortas from SHRSPs compared with that in WKY rats.

Possible mechanisms associated with an abnormal function of the $Ca^{2+}$ sensor STIM-1 and CRAC channels include increased expression or activity of these proteins, defective activation of the sensor by $Ca^{2+}$, or augmented activation/decreased inactivation of CRAC channels. In this study, we have observed that aortas from SHRSPs display increased expression of both STIM-1 and Orai-1. Although it is possible that increased protein levels may account for the increased functional contractile responses observed after intracellular $Ca^{2+}$ depletion, other mechanisms may need to be taken into consideration.

## Perspectives

Most of the work related to the characterization of STIM-1 and Orai-1 was performed in lymphocytes and T cells. A mutation in Orai-1 was observed in patients with severe combined immune deficiency, resulting in abrogated CRAC channel function.[10] The effect of the mutation in the Orai-1 was not reverted by overexpression of Orai-2 or Orai-3. This important article showed that alterations in Orai-1 are related to pathophysiological conditions and called the attention of pharmaceutical companies that have begun to investigate CRAC channel blockers as an option to reduce the toxicity of immunosuppressant drugs, such as cyclosporine A.[40,47] Here we show for the first time that STIM-1 and Orai-1 proteins are upregulated in vessels from hypertensive animals. Functional upregulation of SOC in vessels from SHRSPs was confirmed both by pharmacological and molecular approaches. CRAC channel inhibitors may represent a new therapeutic approach to treat vascular dysfunction or to prevent end-organ damage associated with arterial hypertension.

## Sources of Funding

This study was supported by grants from the National Institutes of Health (HL-71138 and HL-74167). F.R.C.G. and F.S.C. are supported by a doctoral fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo, Brazil).

## Disclosures

None.

## References

1. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 1983;306:67–69.
2. Akhtar RA, Abdel-Latif AA. Requirement for calcium ions in acetylcholine-stimulated phosphodiesteratic cleavage of phosphatidyl-myo-inositol 4,5-bisphosphate in rabbit iris smooth muscle. *Biochem J*. 1980;192:783–791.
3. Putney JW Jr, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*. 1999;21:38–46.
4. Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I, Huang Y. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 2008;153:846–857.
5. Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 1992;355:353–356.
6. Putney JW Jr. Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv*. 2001;1:84–94.
7. Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. 2005;85:757–810.
8. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Veliçelebi G, Stauderman KA. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. *J Cell Biol*. 2005;169:435–445.

Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

9. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T. STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr Biol*. 2005;15:1235–1241.
10. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006;441:179–185.
11. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca2+ entry. *Science*. 2006;312:1220–1223.
12. Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:4040–4045.
13. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane. *Nature*. 2005;437:902–905.
14. Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol*. 2006;8:771–773.
15. Bohr DF, Webb RC. Vascular smooth muscle membrane in hypertension. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1988;28:389–409.
16. Noon JP, Rice PJ, Baldessarini RJ. Calcium leakage as a cause of the high resting tension in vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:1605–1607.
17. Bendhack LM, Sharma RV, Bhalla RC. Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;19:142–148.
18. Orlov S, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR. Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension*. 1993;21:195–203.
19. Cortes SF, Lemos VS, Stoclet JC. Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:1322–1328.
20. Karaki H, Kubota H, Urakawa N. Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol*. 1979;56:237–245.
21. Perry PA, Webb RC. Agonist-sensitive calcium stores in arteries from steroid hypertensive rats. *Hypertension*. 1991;17:603–611.
22. Kanagy NL, Ansari MN, Ghosh S, Webb RC. Recycling and buffering of intracellular calcium in vascular smooth muscle from genetically hypertensive rats. *J Hypertens*. 1994;12:1365–1372.
23. Sasaki F, Osugi S, Shimamura K, Sunano S. Relationship between blood pressure and smooth muscle tone in aortae of hypertensive rats: roles of [Ca2+]. *J Smooth Muscle Res*. 1993;29:69–79.
24. Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19:1173–1176.
25. Keller M, Lidington D, Vogel L, Peter BF, Sohn HY, Pagano PJ, Pitson S, Spiegel S, Pohl U, Bolz SS. Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries. *FASEB J*. 2006;20:702–704.
26. Clarke CJ, Forman S, Pritchett J, Ohanian V, Ohanian J. Phospholipase C-delta1 modulates sustained contraction of rat mesenteric small arteries in response to noradrenaline, but not endothelin-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:826–834.
27. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*. 1997;77:901–930.
28. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*. 2002;4:263–272.
29. Lompre AM. Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26:553–557.
30. Levitsky DO, Clergue M, Lambert F, Souponitskaya MV, Le Jemtel TH, Lecarpentier Y, Lompre AM. Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca(2+)-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem*. 1993;268:8325–8331.
31. Niki I, Yokokura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H. Ca2+ signaling and intracellular Ca2+ binding proteins. *J Biochem*. 1996;120:685–698.
32. Gu VY, Wong MH, Stevenson JL, Crawford KE, Brennecke SP, Gude NM. Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2008;14:309–315.
33. Tsutsui H, Ishibashi Y, Imanaka-Yoshida K, Yamamoto S, Yoshida T, Sugimachi M, Urabe Y, Takeshita A. Alterations in sarcoplasmic reticulum calcium-storing proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997;272:168–175.
34. Langdown ML, Holness MJ, Sugden MC. Effects of prenatal glucocorticoid exposure on cardiac calreticulin and calsequestrin protein expression during early development and in adulthood. *Biochem J*. 2003;371:61–69.
35. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Gill DL, Ambudkar IS, Dubrovska G, Essin K, Gollashc M, Birnbaumer L, Gudermann T. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch*. 2007;455:465–477.
36. Peel SE, Liu B, Hall IP. A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle. *Respir Res*. 2006;7:119.
37. Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ono K, Munehisa Y, Koyama T, Nobori K, Iijima T, Ito H. Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361:934–940.
38. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem*. 2006;281:20661–20665.
39. Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem*. 2006;281:24979–24990.
40. Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*. 2006;443:226–229.
41. Wang Y, Deng X, Hewavitharana T, Soboloff J, Gill DL. Stim, orai and trpc channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:1127–1133.
42. Peel SE, Liu B, Hall IP. ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38:744–749.
43. Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay BC, Cheng KT. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium*. 2007;2:213–223.
44. Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Singh BB, Gill DL, Ambudkar IS. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem*. 2007;282:9105–9116.
45. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:4682–4687.
46. Fellner SK, Arendshorst WJ. Store-operated Ca2+ entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR. *Kidney Int*. 2002;61:2132–2141.
47. Katsnelson A. By calcium signaling out of the gate: uncovering the molecular identity of a strange cellular channel triggers a rush of discoveries in calcium regulation. *Scientist*. 2008;22:59–61.


Downloaded from hyper.ahajournals.org at Medical College of Georgia Greenblatt Library on December 22, 2009

Clinical SCIENCE

www.clinsci.org

Clinical Science (2010) **118**, 391–396 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/CS20090449



HYPOTHESIS

# STIM and Orai proteins: players in sexual differences in hypertension-associated vascular dysfunction?

**Fernanda R.C. GIACHINI*†, R. Clinton WEBB* and Rita C. TOSTES*†**

*Department of Physiology, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912-3000, U.S.A., and †Department of Pharmacology, University of Sao Paulo, Sao Paulo SP 05508-900, Brazil

## ABSTRACT

Sex-associated differences in hypertension have been observed repeatedly in epidemiological studies; however, the mechanisms conferring vascular protection to females are not totally elucidated. Sex-related differences in intracellular $Ca^{2+}$ handling or, more specifically, in mechanisms that regulate $Ca^{2+}$ entry into vascular smooth muscle cells have been identified as players in sex-related differences in hypertension-associated vascular dysfunction. Recently, new signalling components that regulate $Ca^{2+}$ influx, in conditions of intracellular store depletion, were identified: STIM1 (stromal interaction molecule 1), which works as an intracellular $Ca^{2+}$ sensor; and Orai1, which is a component of the CRAC ($Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$) channels. Together, these proteins reconstitute store-operated $Ca^{2+}$ channel function. Disturbances in STIM1/Orai1 signalling have been implicated in pathophysiological conditions, including hypertension. In the present article, we analyse evidence for sex-related differences in $Ca^{2+}$ handling and propose a new hypothesis where sex-related differences in STIM/Orai signalling may contribute to hypertension-associated vascular differences between male and female subjects.

## INTRODUCTION

Defective regulation of intracellular $Ca^{2+}$ is a hallmark of hypertension-associated vascular dysfunction and plays a key role in the augmented vascular reactivity, characteristic of clinical and experimental hypertension. The recent identification of new signalling components linking intracellular $Ca^{2+}$ stores to plasma membrane $Ca^{2+}$ entry has brought a new insight into the understanding of $Ca^{2+}$ homoeostasis. STIM1 (stromal interaction molecule 1) is the $Ca^{2+}$ sensor protein that triggers $Ca^{2+}$ influx in response to $Ca^{2+}$ store depletion, whereas Orai is an essential component of CRAC ($Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$) channels. Although research on STIM1/Orai signalling is entering an exponential phase of growth, the role of these proteins in vascular dysfunction is unknown.

Mechanisms contributing to hypertension and its associated end-organ dysfunction are differentially regulated in males and females. Critical sex differences are observed in the intrinsic vascular mechanisms that regulate total peripheral resistance, namely that gonadally intact females display less vascular dysfunction associated with experimental hypertension [1–6], compared with gonadally intact males. Although the existence of sex differences in vascular $Ca^{2+}$ handling is well established [7–10], no studies have addressed differences in vascular STIM1/Orai signalling in male and female hypertensive animals.

**Key words:** hypertension, Orai, sex difference, stromal interaction molecule (STIM).

**Abbreviations:** CRAC, $Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$; ER, endoplasmic reticulum; $I_{CRAC}$, CRAC current; SHR, spontaneously hypertensive rats; SHRSP, stroke-prone SHR; SOCE, store-operated $Ca^{2+}$ entry; SR, sarcoplasmic reticulum; STIM, stromal interaction molecule; VSMC, vascular smooth muscle cell; WKY, Wistar–Kyoto.

**Correspondence:** Dr Fernanda R.C. Giachini (email: fgiachini@mcg.edu).

© The Authors Journal compilation © 2010 Biochemical Society

Clinical Science

Given the importance of STIM1/Orai signalling in intracellular $Ca^{2+}$ homoeostasis, it seems plausible that increased activation of STIM1/Orai contributes to increased vascular contraction in the vasculature of hypertensive animals.

In the present article, we will review evidence supporting these hypotheses. First, we will address the participation of STIM1 and Orai1 on $Ca^{2+}$-handling mechanisms during physiological conditions, as well as in hypertension. Then, we will focus on how alteration of STIM1/Orai signalling contributes to differences in $Ca^{2+}$ handling, and how this impairment may contribute to sex-related differences in vascular function in hypertension.

## STIM1/ORAI1 PATHWAY REPRESENTS A KEY $Ca^{2+}$-HANDLING MECHANISM

Nearly all cell types depend on cytoplasmic $Ca^{2+}$ signals to trigger specific responses [11]. Upon stimulation, most excitable cells display a biphasic increase in cytosolic $Ca^{2+}$ concentrations. The initial transient increase is due to $Ca^{2+}$ release from intracellular stores, e.g. Ins(1,4,5)$P_3$-mediated release of ER (endoplasmic reticulum) $Ca^{2+}$, whereas the subsequent prolonged increase requires extracellular $Ca^{2+}$ influx through various pathways. Upon depletion of $Ca^{2+}$ from the ER, $Ca^{2+}$ channels are activated in the plasma membrane to refill internal $Ca^{2+}$ stores. This mechanism, by which the ER acts as a capacitor, leads to the term SOCE (store-operated $Ca^{2+}$ entry) [12,13]. SOCE carries a highly $Ca^{2+}$-selective, non-voltage-gated, inwardly rectifying current termed the CRAC current or $I_{CRAC}$ [13,14].

The discovery of new signalling components linking intracellular $Ca^{2+}$ stores to plasma-membrane $Ca^{2+}$ entry brought a new insight into the understanding of $Ca^{2+}$ homoeostasis. STIM1 was identified as a $Ca^{2+}$ sensor essential for $Ca^{2+}$-store-depletion-triggered $Ca^{2+}$ influx [15,16]. Roos et al. [15] showed that knockdown of STIM in *Drosophila* S2 cells significantly reduced thapsigargin-dependent $Ca^{2+}$ entry and completely suppressed $I_{CRAC}$. In addition to being an ER $Ca^{2+}$ sensor, STIM1 functions within the plasma membrane to control the operation of the $Ca^{2+}$ entry channel itself [17], and STIM1 migrates from the $Ca^{2+}$ store to the plasma membrane in conditions of store depletion [18].

It was later demonstrated that Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel [19]. Accordingly, upon depletion of ER $Ca^{2+}$ stores, STIM1 and Orai move in a co-ordinated fashion to form closely apposed clusters in the ER and plasma membrane [20], creating the elementary unit of SOCE [21]. In addition, the interaction between STIM1 and Orai1 is greatly enhanced after thapsigargin treatment, which acts as selective inhibitor of the ER $Ca^{2+}$-ATPase, resulting in depletion of ER $Ca^{2+}$ stores [22].

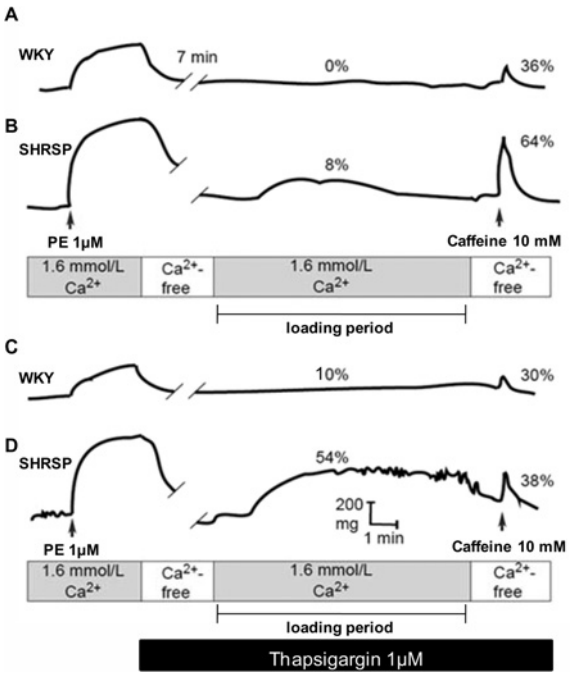



**Figure 1 Aortas from SHRSP have augmented spontaneous tone after depletion of $Ca^{2+}$ stores**

The tracings illustrate the protocol used to evaluate force in response to $Ca^{2+}$ influx after depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores (loading period). Briefly, aortic rings from WKY rats (A and C) and SHRSP (B and D) were stimulated with 1 $\mu$mol/l PE (phenylephrine) for 15 min. Aortas were washed in $Ca^{2+}$-free EGTA buffer, in order to deplete intracellular $Ca^{2+}$ stores, for 20 min. During the depletion period, arteries were incubated with vehicle (A and B) or 1 $\mu$mol/l thapsigargin (C and D). After $Ca^{2+}$ depletion, intracellular $Ca^{2+}$ stores were loaded (loading period) by placing the aortas in 1.6 mmol/l $Ca^{2+}$ buffer for 15 min. Contractile responses during the loading period, taken as a functional measure of $Ca^{2+}$ influx, were determined. The bathing medium was then replaced with $Ca^{2+}$-free buffer and, after 2 min, aortas were stimulated with caffeine (10 mmol/l), in order to deplete intracellular $Ca^{2+}$ stores, which resulted in a transient contraction. The magnitude of this last response was taken as a measure of the functional capacity of the SR to release $Ca^{2+}$.

### STIM1/Orai1 pathway alterations and hypertension

Since a rise in $[Ca^{2+}]_i$ (intracellular free $Ca^{2+}$ concentration) is the principal process that initiates contraction of VSMCs (vascular smooth muscle cells) [23], the maintenance of the steady-state $Ca^{2+}$ is critically important to maintain vascular tone and, consequently, total peripheral resistance [24]. Defective regulation of intracellular $Ca^{2+}$ plays a major role in the augmented vascular reactivity [25]. Augmented $Ca^{2+}$ levels in VSMCs from hypertensive animals can be attributed to various mechanisms, including increased $Ca^{2+}$ release

© The Authors Journal compilation © 2010 Biochemical Society

from intracellular stores [26], reduced $Ca^{2+}$ uptake by the SR (sarcoplasmic reticulum) [27], impaired function of $Ca^{2+}$-binding proteins [28], decreased $Ca^{2+}$ extrusion mechanisms in the plasma membrane [26], and increased $Ca^{2+}$ influx [29,30].

In the present article, we will focus on how increased $Ca^{2+}$ influx through the STIM1/Orai1 pathway may contribute to augmented vascular reactivity in hypertension. We have demonstrated that aortas from SHRSP [stroke-prone SHR (spontaneously hypertensive rats)] had increased force development during $Ca^{2+}$ loading, upon depletion of intracellular $Ca^{2+}$ stores [31]. The SR $Ca^{2+}$ store is larger in aortas from SHRSP due to an enhanced influx of $Ca^{2+}$ across the sarcolemma, rather than an impaired recycling of the cation by the SR $Ca^{2+}$-ATPase [32].

It has been shown that depletion of ER $Ca^{2+}$ stores induces greater SOCE activation in vascular myocytes from SHRSP compared with that in control WKY (Wistar–Kyoto) rats (Figure 1) [30]. This is associated with augmented vascular contractile responses to $Ca^{2+}$, which is blocked by molecular (neutralizing antibodies against STIM1 and Orai1) and pharmacological (2-APB and $Gd^{3+}$) inhibition of STIM1/Orai signalling. In addition, vascular expression of STIM1 (Figure 2) and Orai proteins is increased in SHRSP compared with WKY rats. Thus augmented STIM1/Orai signalling may represent a mechanism leading to impaired control of intracellular $Ca^{2+}$ in hypertension.

The microvasculature network plays an important role in blood pressure control. During hypertension, the microvasculature displays both functional and structural changes that have been implicated in the augmented peripheral resistance. Additionally, the microvasculature displays myogenic activity in response to increases in blood pressure. It seems likely that increased activation of the STIM1/Orai1 pathway can be a contributor of vascular dysfunction during hypertension. Therefore studies addressing the STIM1/Orai1 pathway in the microvasculature represent an exciting topic that should be carefully evaluated.

## SEX DIFFERENCES IN HYPERTENSION

Blood pressure is higher in men than in age-matched women, and there is a lower incidence of hypertension in pre-menopausal women than men [33–36]. Although sex-associated differences during hypertension have been repeatedly observed in epidemiological studies, the mechanisms for sex differences in blood pressure control are not totally elucidated.

Additionally, because $Ca^{2+}$ triggers VSMC function and its regulation is highly controlled, differences in $Ca^{2+}$-handling mechanisms have been proposed to explain sex-related differences in vascular function during hypertension [37], as will be discussed.

### Sex differences in hypertension and $Ca^{2+}$ handling by vascular myocytes

Although sex-associated differences in hypertension are well established, with important differences in the neural, renal and vascular mechanisms associated with blood pressure homoeostasis, the mechanisms that determine differences in blood pressure control in males and females are not totally elucidated. Considering that sex-related differences in mechanisms that regulate $Ca^{2+}$ entry and storage in VSMCs have been identified, differential $Ca^{2+}$ handling in VSMCs from males and females may explain sex-related differences in vascular function in hypertension [37]. Accordingly, in aorta from both normotensive and female SHR, $Ca^{2+}$ influx upon contractile stimuli is decreased compared with that in male SHR [10]. In addition, VSMCs from female rats have reduced $Ca^{2+}$ entry and decreased depolarization-induced $Ca^{2+}$ levels compared with those in males [8]. Differences in intracellular $Ca^{2+}$ increases in VSMCs from male and female SHR are abolished in the absence of extracellular $Ca^{2+}$ [37–39].

Since augmented STIM1/Orai function may represent one mechanism that contributes to abnormal $Ca^{2+}$ in VSMCs, we hypothesize that vascular protection in hypertensive females reflects an attenuated signalling through STIM1/Orai in vascular myocytes from hypertensive females (Figure 3).

In agreement with this hypothesis, we have shown that, upon store depletion, force development during $Ca^{2+}$ loading period is augmented in aortas from male SHRSP compared with female SHRSP [40]. Interestingly, pharmacological blockade of the CRAC channel is able to abolish sex differences in spontaneous contractions during the $Ca^{2+}$ loading period [40]. Additionally, after store depletion, neutralizing antibodies against STIM1 and Orai1 abolish sex-related differences in spontaneous contractions.

Considering that the female sex hormones oestrogen and progesterone have protective effects in the cardiovascular system [41,42], it will be interesting to determine whether sex steroids modulate STIM1/Orai1 activity/expression. In addition, studies showing whether the effects of sex steroids on this pathway are genomic or non-genomic will help to provide a better understanding of the mechanisms associated with female vascular protection. It is possible that augmented STIM1/Orai signalling represents a mechanism for the increased activation of $Ca^{2+}$-dependent signalling pathways in arteries from hypertensive animals. Identification of the mechanisms leading to sex differences in hypertension may uncover a regulatory mechanism that may be used to confer cardiovascular protection.

© The Authors Journal compilation © 2010 Biochemical Society

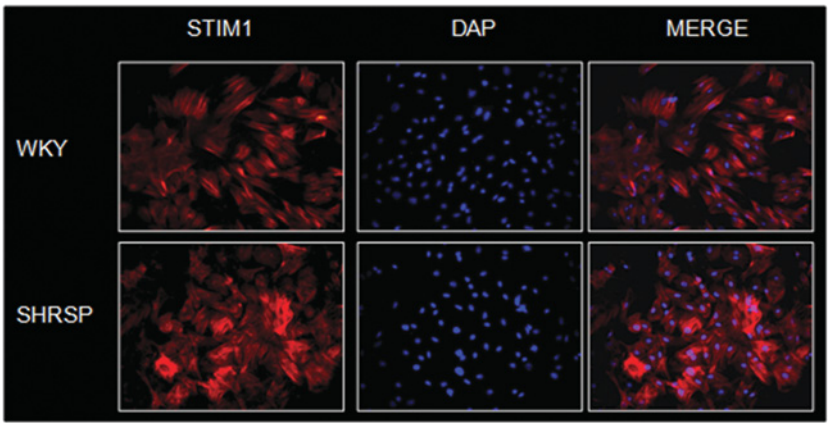



**Figure 2 SHRSP have increased vascular expression of STIM-1**

Immunocytochemistry for STIM1 was performed in cultured rat aorta VSMCs plated on glass coverslips (5000 cells/cm$^2$). After 24 h in serum-free medium, cells were washed, fixed in 4 % paraformaldehyde for 10 min, permeabilized (0.1 % Nonidet P40) and incubated in blocking buffer [1 % (w/v) BSA in PBS] for 30 min at room temperature (25 °C). Cells were incubated with the primary antibodies rabbit anti-STIM (1:100 dilution; ProSci) for 1 h at 37 °C and counterstained with a FITC-conjugated anti-(rabbit IgG) secondary antibody (1:500 dilution; Jackson Immunochemistry) at 4 °C overnight. Cells were then incubated with 5 $\mu$l/ml 4′,6-diamidino-2-phenyindole (DAP; Sigma) for 20 min to detect nuclei. Coverslips were mounted, and labelled cells were examined using a Zeiss microscope and software.

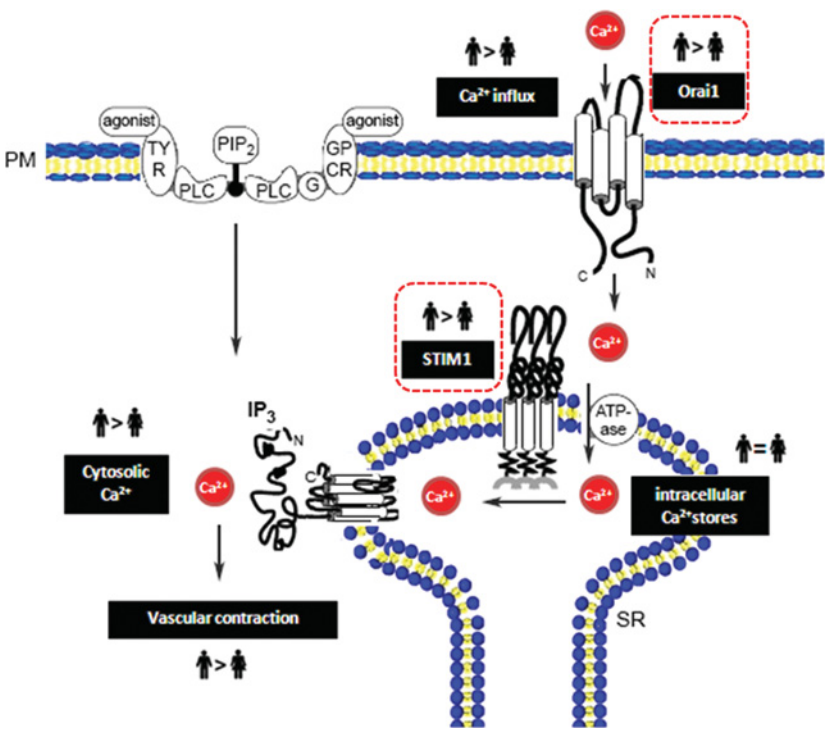



**Figure 3 Putative mechanism by which augmented STIM-1/Orai1 signalling contributes to abnormal $Ca^{2+}$ homoeostasis in vascular myocytes**

We hypothesized that, compared with females, arteries from male subjects have increased activation of STIM1/Orai1 (highlighted in the circles). In conditions of depletion or decrease of intracellular $Ca^{2+}$ stores, STIM1 is activated, resulting in the dimerization of Orai1 and the formation of CRAC channels. $Ca^{2+}$ influx, which is increased in VSMCs from hypertensive males compared with hypertensive females, is stimulated via STIM1 and CRAC channels (Orai1). Therefore arteries from hypertensive male subjects have increased $Ca^{2+}$ influx. SR $Ca^{2+}$-ATPase is activated and the intracellular $Ca^{2+}$ stores are refilled. However, the SR in VSMCs of female and male hypertensive subjects have similar buffering capacity. Consequently, arteries from hypertensive male subjects have increased free cytosolic $Ca^{2+}$, which can lead to increased vascular contraction. G, G-protein; GPCR, G-protein-coupled receptor; $IP_3$, Ins(1,4,5)$P_3$; $PIP_2$, PtdIns(4,5)$P_2$; PLC, phospholipase C; PM, plasma membrane; TYR, receptor tyrosine kinase.

© The Authors Journal compilation © 2010 Biochemical Society

## FUNDING

This work was supported by the American Heart Association [grant number 2250383].

## REFERENCES

1 Kahonen, M., Tolvanen, J. P., Sallinen, K., Wu, X. and Porsti, I. (1998) Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. Am. J. Physiol. **275**, H15–H22
2 Sullivan, J. C. (2008) Sex and the renin–angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **294**, R1220–R1226
3 Tostes, R. C., David, F. L., Carvalho, M. H., Nigro, D., Scivoletto, R. and Fortes, Z. B. (2000) Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1 in deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. J. Cardiovasc. Pharmacol. **36**, S99–S101
4 Tostes, R. C., Nigro, D., Fortes, Z. B. and Carvalho, M. H. (2003) Effects of estrogen on the vascular system. Braz. J. Med. Biol. Res. **36**, 1143–1158
5 Chappell, M. C., Westwood, B. M. and Yamaleyeva, L. M. (2008) Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2.Lewis rats: a model of estrogen and salt-sensitive hypertension. Gend. Med. **5** (Suppl. A), S65–S75
6 Mcintyre, M., Hamilton, C. A., Rees, D. D., Reid, J. L. and Dominiczak, A. F. (1997) Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. Hypertension **30**, 1517–1524
7 Khalil, R. A. (2005) Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. Hypertension **46**, 249–254
8 Murphy, J. G. and Khalil, R. A. (2000) Gender-specific reduction in contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells of female rat. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **278**, C834–C844
9 Crews, J. K. and Khalil, R. A. (1999) Gender-specific inhibition of $Ca^{2+}$ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **26**, 707–715
10 Crews, J. K., Murphy, J. G. and Khalil, R. A. (1999) Gender differences in $Ca^{2+}$ entry mechanisms of vasoconstriction in Wistar–Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Hypertension **34**, 931–936
11 Putney, Jr, J. W. and Mckay, R. R. (1999) Capacitative calcium entry channels. BioEssays **21**, 38–46
12 Putney, Jr, J. W. (2001) Pharmacology of capacitative calcium entry. Mol. Interv. **1**, 84–94
13 Parekh, A. B. and Putney, Jr, J. W. (2005) Store-operated calcium channels. Physiol. Rev. **85**, 757–810
14 Venkatachalam, K., Van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Ma, H. T. and Gill, D. L. (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. Nat. Cell Biol. **4**, E263–E272
15 Roos, J., Digregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D. et al. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated $Ca^{2+}$ channel function. J. Cell Biol. **169**, 435–445
16 Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, Jr, J. E. and Meyer, T. (2005) STIM is a $Ca^{2+}$ sensor essential for $Ca^{2+}$-store-depletion-triggered $Ca^{2+}$ influx. Curr. Biol. **15**, 1235–1241
17 Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Xu, W., Dziadek, M. A. and Gill, D. L. (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated $Ca^{2+}$ channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 4040–4045
18 Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2005) STIM1 is a $Ca^{2+}$ sensor that activates CRAC channels and migrates from the $Ca^{2+}$ store to the plasma membrane. Nature **437**, 902–905
19 Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. and Hogan, P. G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. Nature **443**, 230–233
20 Wu, M. M., Luik, R. M. and Lewis, R. S. (2007) Some assembly required: constructing the elementary units of store-operated $Ca^{2+}$ entry. Cell Calcium **42**, 163–172
21 Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J. and Lewis, R. S. (2006) The elementary unit of store-operated $Ca^{2+}$ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. J. Cell Biol. **174**, 815–825
22 Leung, F. P., Yung, L. M., Yao, X., Laher, I. and Huang, Y. (2008) Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. Br. J. Pharmacol. **153**, 846–857
23 Rembold, C. M. and Murphy, R. A. (1986) Myoplasmic calcium, myosin phosphorylation, and regulation of the crossbridge cycle in swine arterial smooth muscle. Circ. Res. **58**, 803–815
24 Himpens, B., Missiaen, L. and Casteels, R. (1995) $Ca^{2+}$ homeostasis in vascular smooth muscle. J. Vasc. Res. **32**, 207–219
25 Tostes, R. C., Wilde, D. W., Bendhack, L. M. and Webb, R. C. (1997) Calcium handling by vascular myocytes in hypertension. Braz. J. Med. Biol. Res. **30**, 315–323
26 Lompre, A. M. (1999) Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **26**, 553–557
27 Levitsky, D. O., Clergue, M., Lambert, F., Souponitskaya, M. V., Le Jemtel, T. H., Lecarpentier, Y. and Lompre, A. M. (1993) Sarcoplasmic reticulum calcium transport and $Ca^{2+}$-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. J. Biol. Chem. **268**, 8325–8331
28 Niki, I., Yokokura, H., Sudo, T., Kato, M. and Hidaka, H. (1996) $Ca^{2+}$ signaling and intracellular $Ca^{2+}$ binding proteins. J. Biochem. (Tokyo) **120**, 685–698
29 Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos, Y., Schnitzler, M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovska, G., Essin, K., Gollasch, M. et al. (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. Pflugers Arch. **455**, 465–477
30 Giachini, F. R., Chiao, C. W., Carneiro, F. S., Lima, V. V., Carneiro, Z. N., Dorrance, A. M., Tostes, R. C. and Webb, R. C. (2009) Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: a novel insight into vascular dysfunction. Hypertension **53**, 409–416
31 Kanagy, N. L., Ansari, M. N., Ghosh, S. and Webb, R. C. (1994) Recycling and buffering of intracellular calcium in vascular smooth muscle from genetically hypertensive rats. J. Hypertens. **12**, 1365–1372
32 Peel, S. E., Liu, B. and Hall, I. P. (2008) ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **38**, 744–749
33 Hajjar, I., Kotchen, J. M. and Kotchen, T. A. (2006) Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control. Annu. Rev. Public Health **27**, 465–490
34 Mosca, L., Manson, J. E., Sutherland, S. E., Langer, R. D., Manolio, T. and Barrett-Connor, E. (1997) Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association Writing Group. Circulation **96**, 2468–2482
35 Safar, M. E. and Smulyan, H. (2004) Hypertension in women. Am. J. Hypertens. **17**, 82–87
36 Taler, S. J. (2009) Hypertension in women. Curr. Hypertens. Rep. **11**, 23–28
37 Devynck, M. A. (2002) Gender and vascular smooth muscle cells: a direct influence on $Ca^{2+}$ handling? J. Hypertens. **20**, 2139–2140
38 Loukotova, J., Kunes, J. and Zicha, J. (2002) Gender-dependent difference in cell calcium handling in VSMC isolated from SHR: the effect of angiotensin II. J. Hypertens. **20**, 2213–2219
39 Loukotova, J., Kunes, J. and Zicha, J. (1998) Cytosolic free calcium response to angiotensin II in aortic VSMC isolated from male and female SHR. Physiol. Res. **47**, 507–510

© The Authors Journal compilation © 2010 Biochemical Society

40 Giachini, F., Carneiro, F. S., Lima, V. V., Carneiro, Z. N., Dorrance, A., Tostes, R. C. and Webb, R. C. (2009) Sex differences in vascular expression and activation of STIM-1/Orai-1 during hypertension: focus on calcium regulation. FASEB J. **23**, 781.15

41 Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N. Engl. J. Med. **340**, 1801–1811

42 Orshal, J. M. and Khalil, R. A. (2004) Gender, sex hormones, and vascular tone. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **286**, R233–R249

Received 1 September 2009/9 October 2009; accepted 20 October 2009
Published on the Internet 15 December 2009, doi:10.1042/CS20090449

© The Authors Journal compilation © 2010 Biochemical Society