

# Caracterização farmacológica das vias de influxo de cálcio envolvidas na produção de óxido nítrico por células endoteliais

Pharmacological characterization of the calcium influx pathways involved in nitric oxide production by endothelial cells

Janyerson Dannys Pereira da Silva<sup>1</sup>, Gustavo Ballejo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

DOI: 10.31744/einstein\_journal/2019AO4600

## RESUMO

**Objetivo:** Caracterizar as vias do influxo de cálcio envolvidas no aumento sustentado da concentração intracelular de cálcio na célula endotelial, essencial para a síntese e a liberação de fatores relaxantes. **Métodos:** Analisamos o efeito de derivados pirazólicos sintetizados recentemente, descritos como inibidores seletivos para canais ORAI (BTP2/Pyr2 e Pyr6) e TRPC3 (Pyr3 e Pyr10), nos relaxamentos dependentes de endotélio e cálcio extracelular, produzidos por acetilcolina e tapsigargina, em anéis pré-contraídos da aorta torácica de rato. **Resultados:** As respostas de acetilcolina e tapsigargina foram completamente revertidas por Pyr2 e Pyr6 (1 a 3 $\mu$ M). Pyr3 (0,3 a 3 $\mu$ M) produziu reversão rápida dos relaxamentos de acetilcolina (6,2 $\pm$ 0,08mg.s<sup>-1</sup>) e tapsigargina (3,9 $\pm$ 0,25mg.s<sup>-1</sup>), enquanto o bloqueador mais seletivo para TRPC3, Pyr10 (1 a 3 $\mu$ M), não apresentou efeito. ML204 (1 a 3 $\mu$ M), bloqueador seletivo de TRPC4, descrito há pouco tempo, reverteu os relaxamentos induzidos por acetilcolina de forma completa, mas afetou minimamente aqueles produzidos por tapsigargina. Os derivados pirazólicos ou ML204 não afetaram os relaxamentos estimulados com GSK1016790A (TRPV4-agonista). Ainda, após pré-incubação com Pyr2 e Pyr6, acetilcolina e tapsigargina provocaram relaxamentos transitórios semelhantes em magnitude e cinética àqueles observados na ausência de cálcio extracelular. Os relaxamentos do nitroprussiato de sódio e as contrações induzidas pela fenilefrina (aorta sem endotélio) não foram afetados pelos compostos pirazólicos (1 a 3 $\mu$ M). **Conclusão:** Essas observações revelaram uma complexidade desconhecida das vias de influxo de cálcio no endotélio da aorta de rato, que resultam na produção e na liberação de óxido nítrico. Vias distinguíveis farmacologicamente medeiam o influxo estimulado por acetilcolina (ORAI TRPC, diferentes de TRPC3 TRPC4) e tapsigargina (TRPC4 não requerido).

**Descritores:** Células endoteliais; Cálcio/metabolismo; Proteína ORAI1; Canais de cátion TRPC; Aorta; Óxido nítrico; Ratos; Relaxamento

## ABSTRACT

**Objective:** To characterize the calcium influx pathways implicated in the sustained elevation of endothelial intracellular calcium concentration, required for the synthesis and release of relaxing factors. **Methods:** We evaluated the effect of the newly synthesized pyrazole derivatives, described as selective inhibitors for ORAI (BTP2/Pyr2 and Pyr6) and TRPC3 (Pyr3 and Pyr10) channels, upon endothelium- and extracellular calcium-dependent relaxations stimulated by acetylcholine and thapsigargin, in pre-constricted rat thoracic aortic rings. **Results:** Acetylcholine and thapsigargin responses were completely reverted by Pyr2 and Pyr6 (1 to 3 $\mu$ M). Pyr3 (0.3 to 3 $\mu$ M) caused a rapid reversal of acetylcholine (6.2 $\pm$ 0.08mg.s<sup>-1</sup>) and thapsigargin (3.9 $\pm$ 0.25mg.s<sup>-1</sup>) relaxations, whereas the more selective TRPC3 blocker Pyr10 (1 to 3 $\mu$ M) had no effect. The recently described TRPC4/5 selective blocker, ML204

### Como citar este artigo:

Silva JD, Ballejo G. Caracterização farmacológica das vias de influxo de cálcio envolvidas na produção de óxido nítrico por células endoteliais. *einstein* (São Paulo). 2019;17(3):eAO4600. [http://dx.doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2019AO4600](http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4600)

### Autor correspondente:

Janyerson Dannys Pereira da Silva  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,  
Universidade de São Paulo  
Departamento de Farmacologia  
Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre  
CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto, SP, Brasil  
Tel.: (16) 3315-3326  
E-mail: janyersondannys@gmail.com

### Data de submissão:

27/5/2018

### Data de aceite:

20/12/2018

### Conflitos de interesse:

não há.

### Copyright 2019



Esta obra está licenciada sob  
uma Licença *Creative Commons*  
Atribuição 4.0 Internacional.

(1 to 3  $\mu$ M), reverted completely acetylcholine relaxations, but minimally thapsigargin induced ones. Noteworthy, relaxations elicited by GSK1016790A (TRPV4 agonist) were unaffected by pyrazole compounds or ML204. After Pyr2 and Pyr6 pre-incubation, acetylcholine and thapsigargin evoked transient relaxations similar in magnitude and kinetics to those observed in the absence of extracellular calcium. Sodium nitroprusside relaxations as well as phenylephrine-induced contractions (denuded aorta) were not affected by any of pyrazole compounds (1 to 3  $\mu$ M). **Conclusion:** These observations revealed a previously unrecognized complexity in rat aorta endothelial calcium influx pathways, which result in production and release of nitric oxide. Pharmacologically distinguishable pathways mediate acetylcholine (ORAI/TRPC other than TRPC3/TRPC4 calcium-permeable channels) and thapsigargin (TRPC4 not required) induced calcium influx.

**Keywords:** Endothelial cells; Calcium/metabolism; ORAI1 protein; TRPC cation channels; Aorta; Nitric oxide; Rats; Relaxation

## INTRODUÇÃO

Evidências acumuladas até o presente indicam que o cálcio extracelular é necessário para a produção contínua de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (CE), sugerindo o envolvimento do influxo de cálcio.<sup>(1-5)</sup> Por exemplo, muitas substâncias endógenas e sintéticas que causam relaxamentos dependentes do endotélio e de NO em artérias isoladas, ou estimulam a produção de NO em culturas de CE, também induzem um rápido aumento na concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), dependente da concentração externa de  $Ca^{2+}$ . De fato, já foi demonstrada correlação entre as alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  endotelial e a produção de NO.<sup>(4,5)</sup> Apesar desses dados indicarem que o influxo de cálcio em CE é essencial para a síntese e a liberação de fatores de relaxamento, ainda não se conhece a identidade dos canais envolvidos nesse influxo, e nem se sabe se os diferentes estímulos das CE que dependem do  $Ca^{2+}$  extracelular envolvem os mesmos canais ou um conjunto diferente.

Diversas proteínas envolvidas nas vias de entrada de cálcio foram identificadas nas últimas duas décadas.<sup>(6)</sup> Interesse especial têm recebido as proteínas ORAI, recentemente descobertas, bem como alguns membros da família de canais TRP permeáveis a cátions e não seletivos, que medeiam a entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) (capacitativa) ou o influxo não capacitativo de  $Ca^{2+}$  em diferentes tipos de células.<sup>(6,7)</sup> Como os canais ORAI e TRP estão presentes nas CE, essas moléculas surgem agora como possíveis mediadores do influxo de  $Ca^{2+}$  necessário para a produção de NO nessas células.

Sendo assim, investigamos o efeito de derivados pirazólicos recentemente disponibilizados, que provocam um bloqueio seletivo dos canais ORAI (Pyr2 e Pyr6) e TRPC3 (Pyr3 e Pyr10), bem como do bloqueador de

TRPC4, ML204,<sup>(8-11)</sup> sobre os relaxamentos dependentes do endotélio induzidos por acetilcolina ou thapsigargina.

## OBJETIVO

Caracterizar farmacologicamente as vias de influxo de cálcio envolvidas na produção de óxido nítrico pelas células endoteliais em resposta à acetilcolina e tapsigargina.

## MÉTODOS

### Animais

Ratos Wistar machos (200 a 220g) criados no biotério da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, foram usados neste estudo. Os animais foram alojados sob ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada, com acesso livre a alimentos e água. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de pesquisa com animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA, protocolo 024/2011).

Os ratos foram colocados sob anestesia profunda com pentobarbital sódico (50mg/kg, intraperitoneal) e sacrificados por exsanguinação. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta torácica descendente foi cuidadosamente retirada e logo transferida para placas de Petri contendo solução de Krebs modificada (116,0mM de NaCl; 4,5mM de KCl; 1,16mM de  $MgCl_2$ ; 2,5mM de  $CaCl_2$ ; 1,14mM de  $NaH_2PO_4$ ; 25,0mM de  $NaHCO_3$ ; e 11,1mM de glicose). Removeu-se todo e qualquer tecido perivascular das artérias, as quais foram, então, cortadas em pequenos segmentos cilíndricos (anéis, 3,5 a 4mm de comprimento). Tomou-se muito cuidado para preservar o endotélio, mas, em alguns experimentos, a remoção mecânica do endotélio foi realizada intencionalmente, esfregando-se com delicadeza as superfícies do lúmen dos anéis aórticos entre os dedos, por 40 segundos.

Os anéis de aorta torácica (AAT) foram suspensos em um banho para órgão isolado (Letica Scientific Instruments, Espanha), contendo solução de Krebs a 37°C, e borbulhados continuamente com 95%  $O_2$ /5%  $CO_2$  para o registro de contrações isométricas. As variações de força dos anéis aórticos foram monitoradas continuamente com um sistema de aquisição de dados (programa PowerLab, ADInstruments/LabChart v.5.0).

Os AAT foram estirados gradualmente até 2g e, depois, aguardou-se que atingissem o equilíbrio durante 1 a 2 horas (*washout* em intervalos de 20 minutos). A tensão em repouso foi ajustada para 2g, caso ocorres-

sem alterações durante os primeiros 40 minutos. Usou-se fenilefrina (FE, 30-100nM) a cada 60 minutos, para induzir contrações. Para evitar qualquer interferência vasomotora de produtos derivados da ciclo-oxigenase, adicionou-se sempre diclofenaco (10 $\mu$ M) à solução de Krebs. Para os experimentos, selecionou-se concentração de FE que causasse contrações submáximas (60 a 80% da resposta máxima). As substâncias foram testadas assim que as contrações atingiram um platô (cerca de 7 a 8 minutos).

A viabilidade do endotélio foi avaliada pela determinação da resposta de relaxamento mediante ACh (1 $\mu$ M). Os AAT foram considerados com o endotélio intacto (+E,  $\geq$ 80% relaxamento) ou o endotélio removido (-E, sem relaxamento).

### Substâncias químicas

Acetilcolina, FE e GSK1016790A foram comprados da Sigma Aldrich; diclofenaco, tapsigargina, Pyr2 e nitroprusiato de sódio (NPS) foram adquiridos da Calbiochem™; HC-067047 e ML204, da Tocris Bioscience; e L-NNA da Research Biochemicals International-USA. Os compostos pirazólicos (Pyr3, Pyr6 e Pyr10) foram sintetizados conforme descrito por Glasnov et al.,<sup>(12)</sup> e fornecidos por Dr. Klaus Groschner (Instituto de Biofísica-MedUni Graz, Áustria).

### Representação e análise de dados

Os relaxamentos ou contrações foram expressos como alterações na tensão das contrações induzidas por FE, calculadas de acordo com a fórmula a seguir:  $\Delta T(\%) = [(T_{\text{final}} - T_{\text{FE-platô}})/(T_{\text{FE-platô}} - T_{\text{Repouso}})] \times 100$ ; valores negativos correspondem a relaxamentos. A análise dos resultados (curso temporal, área sob a curva – ASC, duração e cinética) foi realizada nos programas GraphPad Prism (v.5.01) e LabChart Pro (v.7.3.8). Todos os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste *t* de Student foi usado para determinar a significância estatística ( $p > 0,05$ : não significativo). O asterisco indica diferenças significativas: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

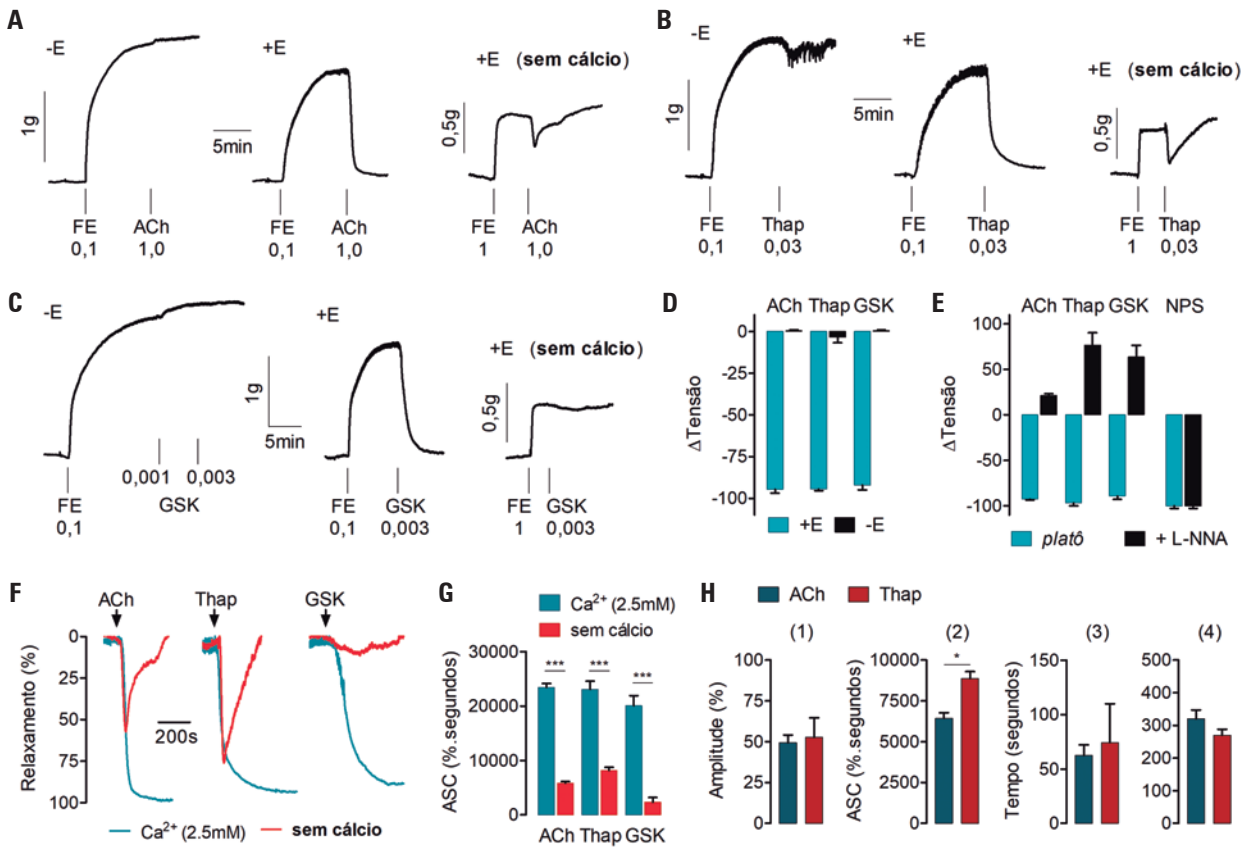
## RESULTADOS

Inicialmente, foram concebidos experimentos para confirmar a necessidade de endotélio, síntese de NO e concentração de cálcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_o$ ) para os relaxamentos de ACh, Thap e GSK101 (ativador de TRPV4). Os três agentes causaram relaxamentos sustentados, estritamente endotélio-dependentes e abolidos pelo

L-NNA (Figuras 1A a 1E); o início dessas respostas foi rápido para ACh/Thap (<3 segundos) e mais lento para GSK101 (>2 minutos), e estes atingiram o estado de equilíbrio em 4 a 6 minutos, persistindo por, no mínimo, 10 minutos. O L-NNA não teve efeito algum sobre o relaxamento independente de endotélio causado pelo NPS. O papel do  $[Ca^{2+}]_o$  foi avaliado por meio da incubação de preparações arteriais (endotélio intacto) em uma solução livre de  $Ca^{2+}$  por 40 minutos (Figuras 1A a 1C, direita). Nessas condições, os relaxamentos endotélio-dependentes provocados por ACh e Thap foram transformados em relaxamentos transitórios, enquanto aqueles provocados por GSK101 foram abolidos. A figura 1F mostra o curso temporal dessas respostas em ambas as condições. Observe o perfil distinto dessas respostas na solução sem  $Ca^{2+}$ . Para quantificar essas diferenças, determinou-se a ASC (%.s) (Figura 1G). Os valores da ASC indicaram que os relaxamentos NO-dependentes na aorta de ratos foram modificados pela ausência de  $[Ca^{2+}]_o$ ; os relaxamentos transitórios com ACh e Thap exibiram amplitudes semelhantes, mas os respectivos valores da ASC foram diferentes. Curiosamente, a cinética inicial dos relaxamentos provocados por ACh e Thap não foi afetada pela ausência de  $[Ca^{2+}]_o$ . Além disso, os relaxamentos transitórios no meio livre de  $Ca^{2+}$  demonstraram tempo até o pico de relaxamento e duração de resposta semelhantes (Figura 1H).

Em seguida, foram examinadas as potenciais vias envolvidas no influxo de cálcio em resposta a ambos os agentes. Inicialmente, o efeito de Pyr2 e Pyr3 foi determinado em AAT pré-contraídos sem endotélio, para detectar os eventuais efeitos desses compostos diretamente sobre o músculo liso. Conforme mostrado nas figuras 2A e 2B, ambos os compostos a 1 a 3 $\mu$ M tiveram efeito inexpressivo nas contrações produzidas por FE, com lenta redução da tensão a 10 $\mu$ M. Em experimentos posteriores, Pyr2 e Pyr3 foram usados em concentrações menores que 10 $\mu$ M. Tanto Pyr2 quanto Pyr3 causaram reversão completa e dependente de concentração dos relaxamentos provocados por ACh e Thap. Já os relaxamentos provocados por GSK101, de magnitude comparável, não foram afetados. Além disso, os efeitos da ACh e Thap não pareceram envolver o influxo de cálcio pelo canal TRPV4, já que o bloqueador seletivo de TRPV4, HC-067047, não conseguiu reverter essas respostas quando usado na mesma concentração em que reverteu totalmente os relaxamentos provocados por GSK101 (Figuras 2C a 2G).

Como a seletividade de Pyr2 e Pyr3 para canais ORAI e TRPC3 foi questionada<sup>(9)</sup> – por exemplo, o Pyr3, que foi previamente sugerido como inibidor seletivo de

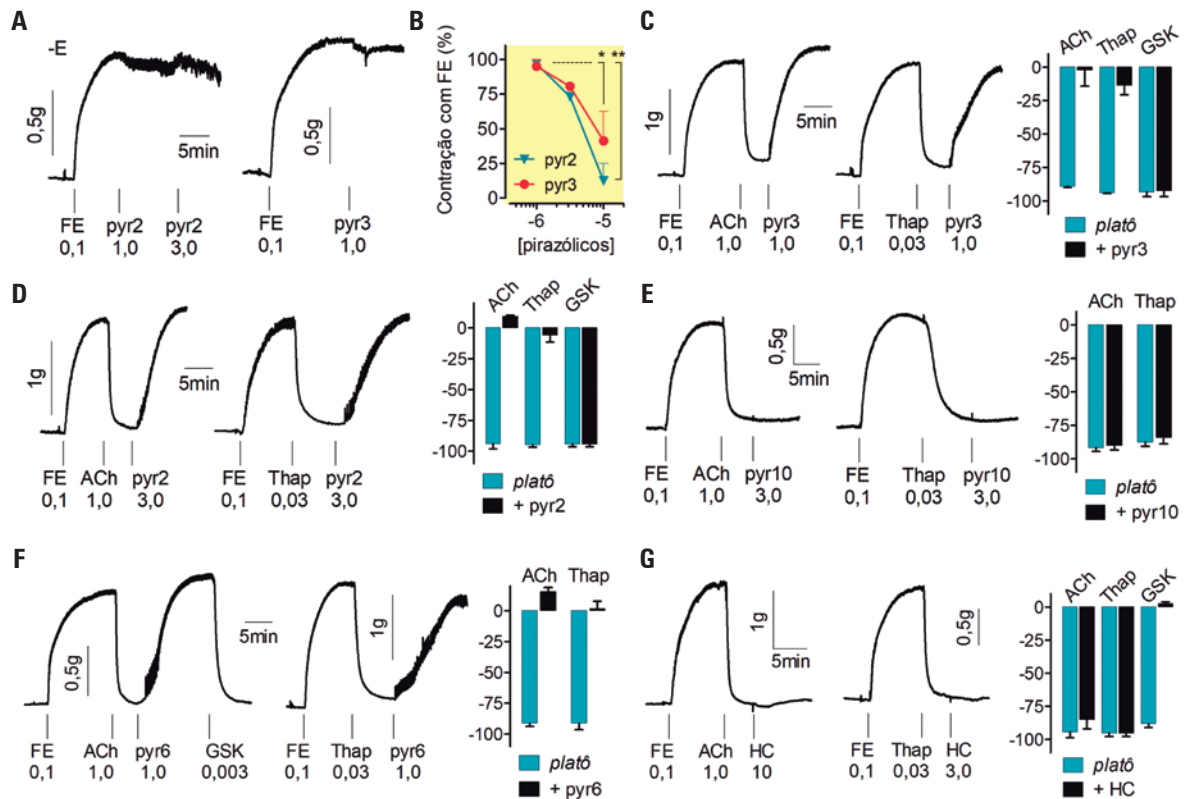


**Figura 1.** Os relaxamentos endotélio-dependentes sustentados produzidos por ACh e Thap necessitam de cálcio extracelular. Registros originais mostrando o efeito da ACh (A), Thap (B) e GSK101 (C) em anéis de aorta torácica pré-contraídos com fenilefrina (FE). Os efeitos foram analisados em anéis de aorta torácica com endotélio intacto (+E), endotélio removido (-E), ou quando os anéis de aorta torácica de ratos com endotélio foram incubados em solução nominalmente sem cálcio (sem  $Ca^{2+}$ , preparada sem  $CaCl_2$ ) durante 40 minutos. Os números embaixo das abreviações indicam a concentração do fármaco em  $\mu M$ . As barras de escala indicam as variações de tempo em minutos (horizontal) e de tensão em g (vertical). (D) e (E) Variação da tensão ( $\Delta$ ) em porcentagem da contração induzida por FE produzida por ACh, Thap e GSK101 em anéis de aorta torácica +E ou -E. (E) Efeitos da adição de L-NNA ( $100\mu M$ ) no platô de relaxamentos causados por ACh, Thap e GSK101, ou nitroprussiato de sódio (NPS;  $100nM$ ). (F) Curso temporal representativo dos relaxamentos produzidos por ACh ( $1\mu M$ ), Thap ( $30nM$ ) ou GSK101 ( $3nM$ ) na presença (traços azuis) ou ausência (traços vermelhos) de cálcio extracelular. As respostas foram normalizadas para redução (%) na contração induzida por FE em cada uma das condições. (G) Área sob a curva (ASC) das respostas de ACh, Thap e GSK101 obtidas em meios contendo ou não cálcio. (H) Parâmetros dos relaxamentos transitórios produzidos por ACh e Thap: (1) pico, (2) área sob a curva, (3) tempo até o pico e (4) tempo de retorno ao valor basal (N=3-6 experimentos)

TRPC3, poderia também inibir a entrada de  $Ca^{2+}$  mediada por ORAI1 e TRPC3 -, testamos o efeito de dois novos compostos pirazólicos, Pyr6 e Pyr10, que demonstraram seletividade superior. Pyr6 e Pyr10 conseguem distinguir entre a entrada de  $Ca^{2+}$  mediada por TRPC e ORAI, e poderiam ser ferramentas úteis na análise de funções celulares desses canais de  $Ca^{2+}$ .<sup>(9)</sup> Pyr6 reverteu rápida e completamente os relaxamentos provocados por ACh, enquanto Pyr10 ( $1$  a  $3\mu M$ ), um bloqueador mais seletivo de TRPC3, não afetou de nenhuma forma esses relaxamentos (Figuras 2E e 2F). Curiosamente, Pyr6 também reverteu as respostas de Thap, mas com cinética mais lenta do que aquela observada para os relaxamentos induzidos por ACh.

Considerando que Pyr10 não conseguiu reverter os relaxamentos provocados por ACh/Thap, e que já foi

demonstrado que os canais TRPC4 medeiam o influxo de cálcio nas CE de aortas de ratos em resposta ao ATP, surgiu o interesse em se determinar se o antagonista seletivo de TRPC4, ML204, teria algum efeito sobre os relaxamentos endotélio-dependentes. O ML204 reverteu totalmente e com rapidez os relaxamentos induzidos por ACh, mas afetou minimamente aqueles provocados pela Thap (Figuras 3A a 3B). Em anéis +E incubados com ML204, ACh ( $1$  a  $3\mu M$ ) e Thap ( $30nM$ ) ainda conseguiram produzir relaxamentos sustentados. A fase rápida inicial desses relaxamentos, conforme mostrado na análise de curso temporal, não foi afetada, mas a magnitude do efeito da ACh foi significativamente reduzida (Figuras 3C a 3E). Curiosamente, a pré-incubação com ML204 aumentou a magnitude das contrações por FE (Figura 3F).



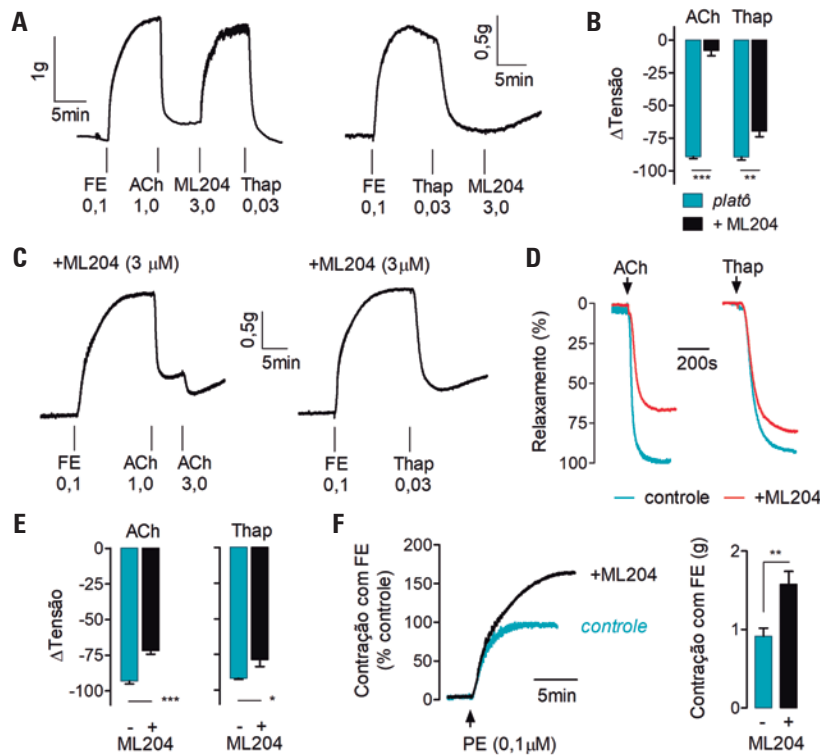
**Figura 2.** Efeito dos inibidores seletivos de canais ORAI, TRPC e TRPV4 nos relaxamentos endotélio-dependentes provocados por ACh, Thap e GSK101 na aorta torácica de ratos. (A) Registros originais mostrando o efeito de Pyr2 e Pyr3 (1 a 3  $\mu$ M) na contração induzida por fenilefrina (FE) em anéis sem endotélio (-E). (B) Curva concentração-resposta do efeito inibitório de compostos pirazólicos (1 a 10  $\mu$ M) na contração induzida por FE. (C a G) Registros originais mostrando o efeito da adição de Pyr3 (1  $\mu$ M), Pyr2 (3  $\mu$ M), Pyr10 (3  $\mu$ M), Pyr6 (1  $\mu$ M) ou HC-067047 (3 ou 10  $\mu$ M) no platô dos relaxamentos provocados por ACh ou Thap. Gráficos de barras resumindo o efeito da adição de compostos pirazólicos e HC-067047, respectivamente, no platô dos relaxamentos provocados por ACh (1  $\mu$ M), Thap (30 nM) ou GSK (3 nM). Os resultados são apresentados como variações da tensão ( $\Delta$ ) em porcentagem da contração evocada por FE nos anéis aórticos de ratos (N=3-6 experimentos)

Para explorar de maneira mais aprofundada o efeito inibitório dos compostos pirazólicos e do ML204 nos relaxamentos dependentes de endotélio, examinamos o curso temporal do efeito desses agentes após adicioná-los ao platô de respostas da ACh/Thap (Figura 4). Interessante observar que os compostos separaram-se em dois padrões: um padrão rápido, que incluiu o pyr3/ML204, e um padrão mais lento, que incluiu o Pyr2/Pyr6, conforme revelado pela latência para iniciar a reversão e pela análise da primeira derivada ( $dT/dt$ ,  $mg.s^{-1}$ ). Chama a atenção o fato de Pyr2 e Pyr3 exibirem uma cinética mais rápida contra ACh ( $5.6 \pm 0.44 mg.s^{-1}$  e  $6.1 \pm 0.08 mg.s^{-1}$ , respectivamente) do que contra a Thap ( $3.6 \pm 0.39 mg.s^{-1}$  e  $3.9 \pm 0.25 mg.s^{-1}$ ), ao passo que Pyr6 exibiu valores de latência e  $dT/dt$  semelhantes ao reverterem os efeitos da ACh e Thap.

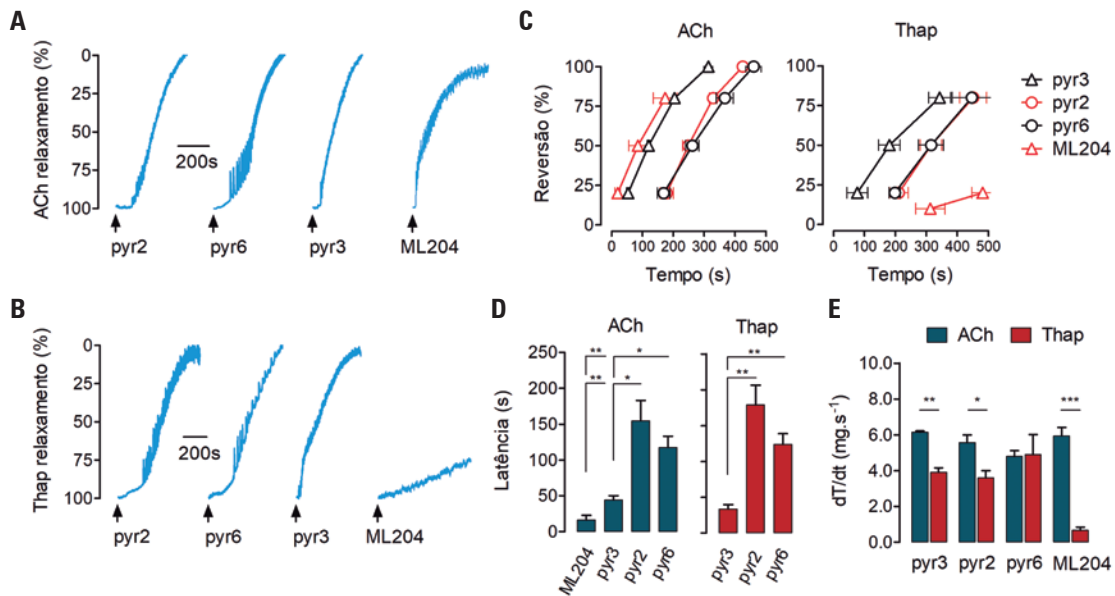
Finalmente, avaliamos as respostas de ACh/Thap em AAT pré-tratados com diferentes bloqueadores de influxo de cálcio. A pré-incubação com pyr2 ou pyr6 transformou as respostas endotélio-dependentes sus-

tentadas da ACh e da Thap em relaxamentos transitórios. Ainda mais interessante foi o fato de que as respostas ao GSK101 (3 a 10 nM) continuaram não sendo afetadas nesses experimentos (Figuras 5A a 5C). O curso temporal representativo dos relaxamentos induzidos por ACh ou Thap na presença dos compostos pirazólicos, ML204 e HC-067047 é mostrado nas figuras 5D a 5E. Pyr3 e Pyr10, bem como HC-067047, não tiveram efeito algum sobre os relaxamentos com ACh ou Thap. A amplitude de efeito da Thap foi um pouco mais afetada pelo Pyr2/Pyr6 do que a da ACh. Não houve diferenças significativas entre os relaxamentos induzidos por ACh ou Thap em termos de ASC e duração (Figura 5F). Além disso, os relaxamentos transitórios obtidos após pré-tratamento com Pyr6/Pyr2 foram comparáveis aos relaxamentos provocados por ACh e Thap na ausência de  $[Ca^{2+}]_o$  (comparar as Figuras 5F e 1F).

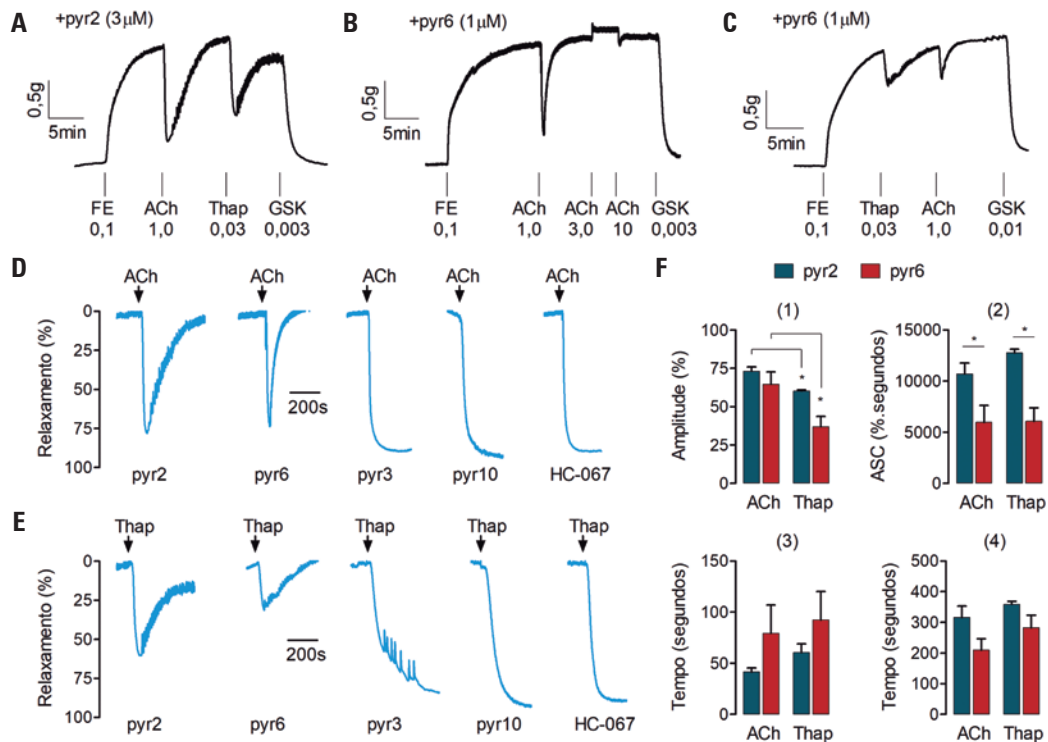
Esses resultados sugerem que o influxo contínuo de cálcio requeriam pelo menos duas vias farmacologicamente distinguíveis. Para determinar se a via sensível



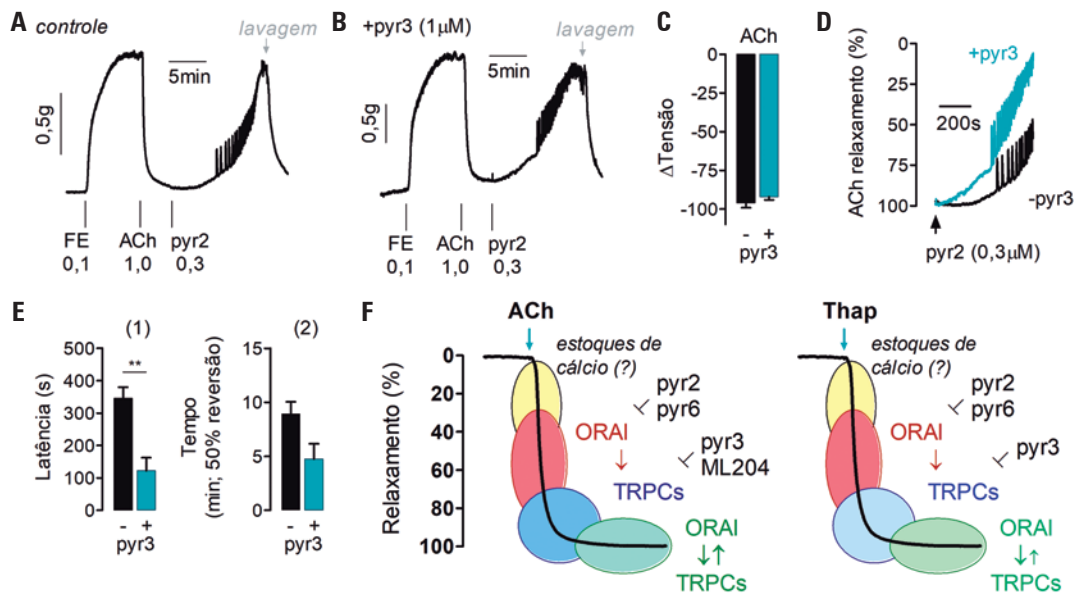
**Figura 3.** Efeitos do inibidor seletivo de TRPC4 na aorta torácica de ratos. (A) Registros representativos do efeito do ML204 (3μM) adicionado sobre o platô de relaxamentos produzido por ACh (esquerda) ou Thap (direita) em anéis de aorta torácica de ratos pré-contraídos com fenilefrina (FE). (B) Efeito do ML204 apresentado na forma de tensão (%) — \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001, Teste t de Student (pareado, bicaudal). (C) Registros originais mostrando as respostas de relaxamento com ACh (1 a 3μM) ou Thap (30nM) observadas em anéis de aorta torácica de ratos pré-incubados com ML204 (+ML204, 3μM, por 5 minutos). (D) Curso temporal representativo dos relaxamentos com ACh e Thap antes (controle, traços azuis) e depois (traços vermelhos) da pré-incubação dos anéis arteriais com ML204. (E) Variações da tensão (Δ) em percentagem da contração evocada por FE produzida pela ACh ou Thap na ausência (-) e presença (+) de ML204. (F) À esquerda: curso temporal da contração com FE em anéis de endotélio intacto (relaxamento com ACh > 95%) antes (controle) e depois da pré-incubação com ML204. À direita: contração com FE em gramas (g) para os mesmos anéis — \*\*p<0,01, Teste t de Student (pareado, bicaudal) (N=5-11 experimentos)



**Figura 4.** Cinética da reversão produzida pelos inibidores de canais ORAI e TRPC. (A e B) Curso temporal representativo para o efeito de reversão dos compostos pirazólicos e ML204 sobre as respostas de ACh (1μM, A) e Thap (30nM, B). O platô dos relaxamentos com ACh ou Thap foi considerado a 100%. Concentrações testadas: Pyr2 (3μM), Pyr6 (1μM), Pyr3 (1μM) e ML204 (3μM). (C) Plotagem X-Y comparando o tempo necessário para os inibidores de canais ORAI e TRPC produzirem uma reversão de 20%, 50%, 80% e 100% dos relaxamentos com ACh ou Thap. (D) Latências para iniciar a reversão das respostas de ACh (1μM) e Thap (30nM). A inibição foi considerada iniciada após reversão de 10%. (E) Velocidade (dT/dt, mg.s<sup>-1</sup>) da reversão produzida por cada um dos compostos nos relaxamentos endotélio-dependentes indicados (ACh, Thap) (N=3-6 experimentos)



**Figura 5.** Efeitos da pré-incubação com bloqueadores de canais ORAI, TRPC e TRPV4 sobre os relaxamentos endotélio-dependentes. (A a C) Registros originais em anéis de aorta torácica de ratos com endotélio intacto (relaxamento com ACh >95%) mostrando o efeito da pré-incubação (5 minutos) com Pyr2 (3µM, A) e Pyr6 (1µM, B e C) sobre os relaxamentos endotélio-dependentes provocados por ACh, Thap ou GSK101. (D e E) Curso temporal representativo dos relaxamentos induzidos por ACh (1µM, D) ou Thap (30nM, e) na presença de Pyr2 (3µM), Pyr6 (1µM), Pyr3 (1µM), Pyr10 e HC-067047 (ambos a 3µM). As setas indicam o momento da aplicação da ACh ou Thap. As respostas foram normalizadas para redução (%) da contração por fenilefrina (FE) em cada uma das preparações. (F) Parâmetros dos relaxamentos transitórios produzidos por ACh e Thap na presença de Pyr2 ou Pyr6: (1) pico, (2) área sob a curva (ASC), (3) tempo até o pico e (4) tempo de retorno ao valor basal (N=3-5 experimentos)



**Figura 6.** A pré-incubação dos anéis aórticos de ratos com Pyr3 facilitou a reversão por Pyr2 dos relaxamentos induzidos por ACh. (A a B) Registros originais mostrando a reversão com Pyr2 (0,3µM) dos relaxamentos induzidos por ACh em anéis aórticos de ratos pré-contraídos com FE. Em (B), os anéis aórticos foram pré-incubados com pyr3 (1µM, 5min). (C) Alterações na tensão (Δ) da contração por fenilefrina (FE) produzida pela ACh antes (-) e depois (+) da pré-incubação de anéis de aorta torácica de ratos com Pyr3. (D) Curso temporal representativo, comparando a reversão produzida por Pyr2 (0,3µM, seta) na ausência (-) e presença (+) de Pyr3 (1µM). O platô dos relaxamentos com ACh foi considerado a 100%. (E) Parâmetros da reversão com Pyr2, medida na ausência (-) e presença (+) de Pyr3: (E1) latência em segundos até o início (definido como o intervalo entre a adição de Pyr2 e a produção de 10% de reversão) (E2) tempo (em minutos) necessário para produzir 50% de reversão da resposta à ACh (N=4 experimentos). (F) Representação esquemática mostrando o envolvimento dos canais ORAI e TRPC nas diferentes fases dos relaxamentos endotélio-dependentes produzidos por ACh ou Thap. O esquema foi sugerido considerando as propriedades cinéticas da reversão causada pelos compostos pirazólicos e o efeito de sua pré-incubação sobre o relaxamento provocado pela ACh/Thap

ao Pyr3 interagiu com a via sensível ao Pyr2, testamos uma combinação de Pyr2/Pyr3 frente ao efeito da ACh. A pré-incubação com Pyr3 facilitou a reversão produzida por  $0,3\mu\text{M}$  de Pyr2 (Figura 6). Esses achados indicam que os canais ORAI e TRPC operavam em diferentes fases dos relaxamentos endotélio-dependentes, conforme resumido no esquema da figura 6F. A fase rápida inicial exigiria a ativação dos canais ORAI, enquanto o influxo de cálcio pelos canais TRPC seria responsável pela fase sustentada.

## DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo revelaram uma complexidade previamente desconhecida nas vias de influxo de cálcio CE da aorta de ratos, ativadas por ACh e Thap. Além disso, esses achados confirmam que, em AAT, a produção e a liberação de NO são inteiramente responsáveis pelos relaxamentos endotélio-dependentes provocados por ACh/Thap; demonstram também que, indiscutivelmente, o influxo de  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  é essencial para a produção contínua de NO em resposta a esses agentes. A ausência de efeito dos bloqueadores seletivos de influxo de cálcio nas contrações por FE em anéis sem endotélio indica que as CE são o principal sítio de ação desses inibidores, para a reversão ou a prevenção dos relaxamentos endotélio-dependentes. É importante destacar que, como os compostos pirazólicos e o ML204 não afetaram os relaxamentos provocados pelo doador de NO, NPS, isso permite interpretar esses achados em função da principal ação farmacológica dessas substâncias, ou seja, o bloqueio do influxo de cálcio. Além disso, a seletividade desses compostos foi confirmada em nossos experimentos pela ausência de efeito dos compostos pirazólicos e do ML204 nas respostas ao GSK101, que promove o influxo de cálcio nas CE por meio da ativação dos canais TRPV4. A interpretação mais simples desses achados consiste em propor que (1) canais farmacologicamente distinguíveis parecem ter participação na iniciação e na manutenção do influxo de cálcio; e (2) canais farmacologicamente distinguíveis mantêm a entrada de cálcio durante a estimulação com ACh ou Thap (conforme ilustrado na figura 6F).

A observação de que a pré-incubação com Pyr2 ou Pyr6 (mas não Pyr3/ML204) resultou em relaxamento transitório em resposta à ACh/Thap, bastante semelhante ao produzido na ausência de  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ , é totalmente compatível com a interpretação de que o influxo de cálcio é necessário para a produção e a liberação sustentada de NO. Os relaxamentos transitórios provocados por esses agentes poderiam ser atribuídos à liberação de cálcio dos estoques existentes nos retículos endo-

plasmáticos (RE). Demonstrou-se que a ACh interage com os receptores muscarínicos da membrana celular, os quais estimulam a fosfolipase C e a subsequente geração de  $\text{IP}_3$ , que, por sua vez, ativa o  $\text{IP}_3\text{R}$  localizado no RE, levando à liberação de cálcio.<sup>(6)</sup> O efeito da Thap é atribuído a uma ação inibitória do SERCA, levando à difusão do cálcio em direção ao citosol e à consequente depleção dos estoques de cálcio do RE; essa depleção é detectada pelas proteínas STIM, que interagem com os canais ORAI, promovendo seu agrupamento e levando ao influxo de cálcio;<sup>(6,13)</sup> essa sequência de eventos foi denominada “entrada de cálcio operada por estoque”.<sup>(13)</sup> Nossos achados indicam que, em CE de aortas de ratos, tanto a ACh quanto a Thap promovem a entrada de cálcio por uma via inicial sensível a Pyr2/Pyr6, levando à conclusão de que a interação STIM/canais ORAI medeia a entrada de cálcio após a depleção dos estoques de cálcio no RE. No entanto, é importante lembrar que a ativação da entrada de cálcio por agonistas de receptores da membrana celular não é necessariamente precedida pela depleção dos estoques de cálcio.<sup>(13)</sup> Como Pyr3 foi capaz de reverter no platô o relaxamento provocado por ACh/Thap, mas não evitou o relaxamento quando pré-incubado, é provável que o alvo do Pyr3 seja recrutado na via de influxo de cálcio após a ativação dessa via pelos alvos de Pyr2/Pyr6 (STIM/ORAI). O fato de Pyr2 e Pyr6 também terem sido capazes de reverter os relaxamentos indica que os canais ORAI continuam necessários para o influxo de cálcio sustentado, o que implicaria no envolvimento de um complexo multicomponente de canais STIM/ORAI/TRPC na mediação do influxo de cálcio, durante a fase sustentada da síntese e da liberação de NO, após a estimulação com ACh e Thap. De fato, já foi proposto que um complexo de canais TRPC: ORAI seria responsável por mediar a entrada de cálcio operada por estoque e por receptores em células HEK-293 com expressão heteróloga dessas proteínas.<sup>(14)</sup> Além disso, os canais STIM também interagem com diversos canais TRPC, promovendo a função desses últimos como canais de SOCE.<sup>(15)</sup>

Embora Pyr3 tenha sido inicialmente descrito como um inibidor seletivo de TRPC3, os relaxamentos provocados por ACh/Thap não foram afetados por um bloqueador seletivo de TRPC3 recentemente descrito, o Pyr10,<sup>(9)</sup> o que indica que o TRPC3 talvez não seja o canal envolvido na fase sustentada do influxo de cálcio ativado nas CE da aorta de ratos. Essa interpretação é condizente com constatações anteriores de que os relaxamentos endotélio-dependentes observados em experimentos de perfusão de membros posteriores ou produção endotélio-dependente de NO em AAT não foram alterados em camundongos *knockout* para TRPC3.<sup>(16)</sup>



O fato de as respostas à Thap terem sido completamente revertidas pelo Pyr3, mas inexpressivas pelo ML204, poderia indicar que as vias de influxo de cálcio envolvidas na manutenção do influxo de cálcio ativado por ACh e Thap são farmacologicamente distinguíveis. Como o ML204 não reverteu o relaxamento provocado por Thap, os canais TRPC4 parecem exercer um papel menos importante na fase sustentada do influxo de cálcio desencadeada por Thap. O efeito observado do ML204 no relaxamento com ACh é totalmente condizente com o relato de que AAT de camundongos *knockout* para TRPC4 apresentam redução, mas não ausência, de relaxamentos induzidos por ACh.<sup>(17)</sup> Finalmente, embora já se tenha demonstrado que os canais TRPC4 interagem essencialmente com os canais ORAI,<sup>(18)</sup> o fato de os canais TRPC4 contribuírem com o influxo de cálcio apenas em células estimuladas com ACh indica que esses canais não são ativados pela simples depleção dos estoques de cálcio do RE. Como os canais TRPC4 são insensíveis ou inibidos pelo DAG, um produto da hidrólise do PIP<sub>2</sub> mediada pela PLC, é provável que sua ativação decorra da depleção pelo PIP<sub>2</sub>, que, sabidamente, inibe a atividade dos canais TRPC4.<sup>(19)</sup>

Embora os achados atuais apontem para uma contribuição dos canais sensíveis aos derivados pirazólicos na mediação da entrada de Ca<sup>2+</sup> nas CE (necessária para a produção e liberação de NO), medições diretas da concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> em CE ainda seriam necessárias para confirmar nossas interpretações/resultados obtidos *in vitro*. Além disso, considerando que analisamos o efeito de relaxamento exercido pelo NO liberado pelas CE da aorta de ratos (mediante estimulação por ACh/Thap), experimentos adicionais, medindo simultaneamente a concentração endotelial de Ca<sup>2+</sup> e o relaxamento do músculo liso, poderiam ser úteis para a compreensão e a elucidação dos mecanismos reais. No entanto, em ensaios destinados a determinar a concentração de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e sua mobilização, usando indicadores fluorescentes e microscopia confocal, os achados iniciais indicam que as respostas de mobilização de cálcio mediante a presença de acetilcolina são reduzidas e/ou ausentes em culturas de CE primárias preparadas a partir de aortas de ratos.

## CONCLUSÃO

Os canais STIM/ORAI/TRPC são componentes integrais da via de influxo de cálcio ativada por ACh e Thap, resultando na liberação de óxido nítrico na aorta torácica de ratos. Além disso, nossos achados são as primeiras evidências indicando que a composição das vias de influxo de cálcio depende do estímulo, ou seja,

TRPC4 contribui com a entrada de cálcio operada por estoque provocada por ACh, mas não por Thap. Essas observações podem ser clinicamente relevantes, já que a identificação dos canais de cálcio envolvidos na produção sustentada de óxido nítrico pelas células endoteliais poderia permitir o desenvolvimento de fármacos específicos para bloquear esses canais em caso de produção excessiva de óxido nítrico (choque circulatório), ou ativá-los para promover a vasodilatação em casos de redução da irrigação sanguínea (isquemia).

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Klaus Groschner, por propiciar os compostos pirazólicos utilizados neste estudo; à Dr. Rita de C. A. Tostes, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, orientadora da tese de J.D.P.S., por toda sua ajuda e apoio. J.D.P.S. recebeu bolsa de estudos de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil).

## INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Silva JD: <http://orcid.org/0000-0002-5600-1219>

Ballejo G: <http://orcid.org/0000-0002-6178-5003>

## REFERÊNCIAS

1. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res.* 1983;53(5):557-73. Review.
2. Graier WF, Sturek M, Kukovetz WR. Ca<sup>2+</sup>-Regulation and Endothelial Vascular Function. *Endothelium.* 1994;1(4):223-36.
3. Iouzalén L, Lantoiné F, Pernollet MG, Millanvoye-Van Brussel E, Devynck MA, David-Dufilho M. SK&F96365 inhibits intracellular Ca<sup>2+</sup> pumps and raises cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration without production of nitric oxide and von Willebrand factor. *Cell Calcium.* 1996;20(6):501-8.
4. Korenaga R, Ando J, Ohtsuka A, Sakuma I, Yang W, Toyo-oka T, et al. Close correlation between cytoplasmic Ca<sup>++</sup> levels and release of an endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. *Cell Struct Funct.* 1993;18(2):95-104.
5. Wang Y, Shin WS, Kawaguchi H, Inukai M, Kato M, Sakamoto A, et al. Contribution of sustained Ca<sup>2+</sup> elevation for nitric oxide production in endothelial cells and subsequent modulation of Ca<sup>2+</sup> transient in vascular smooth muscle cells in coculture. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5647-55.
6. Prakriya M, Lewis RS. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2015; 95(4):1383-436. Review.
7. Ong HL, de Souza LB, Ambudkar IS. Role of TRPC channels in store-operated calcium entry. *Adv Exp Med Biol.* 2016;898:87-109. Review.
8. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, et al. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(13):5400-5.
9. Schleifer H, Doleschal B, Lichtenegger M, Oppenrieder R, Derler I, Frischauf I, et al. Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca<sup>(2+)</sup> entry pathways. *Br J Pharmacol.* 2012;167(8):1712-22.

10. He LP, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL. A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis (trifluoromethyl) pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem.* 2005;280(12):10997-1006.
11. Miller M, Shi J, Zhu Y, Kustov M, Tian JB, Stevens A, et al. Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *J Biol Chem.* 2011;286(38):33436-46.
12. Glasnov TN, Groschner K, Kappe CO. High-speed microwave-assisted synthesis of the trifluoromethylpyrazol-derived canonical transient receptor potential (TRPC) channel inhibitor Pyr3. *Chem Med Chem.* 2009;4(11):1816-8.
13. Putney JW. Forms and functions of store-operated calcium entry mediators, STIM and Orai. *Adv Biol Regul.* 2018;68:88-96. Review.
14. Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L. A role for Orai in TRPC-mediated Ca<sup>2+</sup> entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3202-6.
15. Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):636-45.
16. Loga F, Domes K, Freichel M, Flockerzi V, Dietrich A, Birnbaumer L, et al. The role of cGMP/cGKI signalling and Trpc channels in regulation of vascular tone. *Cardiovasc Res.* 2013;100(2):280-7.
17. Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, et al. Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol.* 2001;3(2):121-7.
18. Cioffi DL, Wu S, Chen H, Alexeyev M, St Croix CM, Pitt BR, et al. Orai1 determines calcium selectivity of an endogenous TRPC heterotetramer channel. *Circ Res.* 2012;110(11):1435-44.
19. Otsuguro K, Tang J, Tang Y, Xiao R, Freichel M, Tsvilovskyy V, et al. Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 2008;283(15):10026-36.