



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA)**



**MECANISMOS DE MODULAÇÃO DO INFLUXO DE Ca^{2+} PELA ATIVAÇÃO
DO RyR EM ARTERÍOLAS MESENTÉRICAS DE HUMANOS E MURINOS**

DANIELA CIBELI GUIMARÃES GARCIA LUSTOSA

**BELO HORIZONTE-MG
2018**

DANIELA CIBELI GUIMARAES GARCIA LUSTOSA

**MECANISMOS DE MODULAÇÃO DO INFLUXO DE Ca^{2+} PELA ATIVAÇÃO
DO RyR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE HUMANOS E MURINOS**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Steyner F. Côrtes.

**BELO HORIZONTE-MG
2018**

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, irmão e esposo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por direcionar minha vida sendo a luz que ilumina meus passos.

Aos meus pais João e Aparecida, por apoiarem minhas decisões.

Ao meu irmão Marcos Alisson, por me incentivar a seguir meus sonhos. Obrigada pela amizade.

Ao meu esposo Flávio, pelo apoio, carinho e palavras de incentivo.

Ao meu orientador prof^o Dr. Steyner F. Côrtes por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação e incentivo.

A prof^a Dr^a Virgínia S. Lemos, muito obrigada pelo acolhimento.

A prof^a Me. Débora Pinheiro Guimarães, por acreditar em mim e incentivar-me nesta escolha. Obrigada pela amizade.

Ao professor Jader dos Santos Cruz pelo incentivo, apoio e ajuda para a realização do doutorado sanduiche.

Ao professor Mark Nelson, Thomas Longden, Fabrice Dabertrand, Daniel Collier e a todos os integrantes do laboratório de Farmacologia da University of Vermont-USA que me auxiliaram e incentivaram durante o meu período no exterior.

Aos colegas dos Laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, pela companhia e amizade.

Aos funcionários da limpeza, por proporcionar um ambiente limpo para o desenvolvimento de nossas atividades.

Aos pacientes, aos familiares dos pacientes e aos camundongos utilizados neste projeto.

Ao CNPq, à CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro, fundamentais para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração do músculo liso vascular (MLV) representam uma interação complexa entre membrana plasmática (MP) e retículo sarcoplasmático (RS). O presente trabalho investigou a interação MP-RS envolvida na contração induzida pela ativação dos receptores de rianodina (RyRs) em artérias mesentéricas de camundongos e humanos, normotensos e hipertensos. Em vasos de camundongos normotensos a contração por cafeína (10 mM) é parcialmente dependente do influxo de Ca^{2+} uma vez que em solução 0 Ca^{2+} e na presença de SKF-96365 (30 μ M), bloqueador de Orai, ocorre redução da contração e dos níveis de fluorescência para o Ca^{2+} . Surpreendentemente, o bloqueio de $Ca_v1.2$ com nifedipina (10 μ M), aumenta a amplitude da contração ao passo que reduz os níveis de fluorescência para o Ca^{2+} . Resultados semelhantes foram observados após o bloqueio dos canais TRPs com vermelho de rutênio (RuR; 10 μ M) e 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB; 10 μ M). O bloqueio de BK_{Ca} com paxilina (1 μ M) promoveu aumento da contração transitória. A cafeína induz hiperpolarização do MLV, que é bloqueada na presença de nifedipina, 2-APB e paxilina. Contudo, em camundongos hipertensos o bloqueio de $Ca_v1.2$ e de BK_{Ca} em camundongos hipertensos não altera a resposta contrátil, indicando uma perda do feedback negativo da contração. É importante ressaltar que os mecanismos descritos em artérias de camundongos normotensos também existem em artérias de humanos. Contudo, na presença da hipertensão arterial, o feedback entre $Ca_v1.2$ - BK_{Ca} também se encontra prejudicado em humanos. O presente trabalho demonstra que o mecanismo de feedback entre $Ca_v1.2$ - BK_{Ca} é fundamental em artérias mesentéricas. Nossos resultados indicam um novo mecanismo para o controle da contração do MLV que poderá ser útil para o tratamento da hipertensão arterial.

ABSTRACT

Mechanisms involved in the excitation-contraction coupling of vascular smooth muscle (VSM) represent a complex interaction between plasma membrane (PM) and sarcoplasmic reticulum (SR). The present work investigated the PM-SR interaction involved in the contraction induced by the activation of ryanodine receptors (RyRs) in mesenteric arteries from mice and humans, normotensive and hypertensive. In vessels from normotensive mice the contraction induced by caffeine (10 mM) is partially dependent on Ca^{2+} -influx, once in Ca^{2+} -free solution and in the presence of SKF-96365 (30 μM), an Orai blocker, occurred reduction of contraction and Ca^{2+} -fluorescence level. Surprisingly, blocking $\text{Ca}_v1.2$ with nifedipine (10 μM), the contraction is increased while the Ca^{2+} -fluorescence level is reduced. Similar results were observed after blocking TRP channels with ruthenium red (RuR; 10 μM) and 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB; 10 μM). Moreover, the blockage of BK_{Ca} with paxillin (1 μM) promotes increased transient contraction. Caffeine promotes hyperpolarization of VSM, which was blocked in the presence of nifedipine, 2-APB, and paxillin. In hypertensive mice the blockage of $\text{Ca}_v1.2$ and BK_{Ca} in hypertensive mice does not alter the contractile response, indicating loss of the negative feedback of the contraction. In the presence of arterial hypertension, the feedback between $\text{Ca}_v1.2$ - BK_{Ca} is also impaired in humans. The present work demonstrates that the feedback between $\text{Ca}_v1.2$ - BK_{Ca} is essential in mesenteric arteries. Our results indicate a new mechanism for the control of VSM contraction that may be useful for the treatment of arterial hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As camadas íntima, média e adventícia compõem as artérias	16
Figura 2: Papel do Ca^{2+} no mecanismo contrátil no MLV.....	21
Figura 3: Mecanismo de inibição da MLCP via RhoA/ROCK e PKC.....	23
Figura 4: Estrutura molecular do $Ca_v1.2$	25
Figura 5: Árvore filogenética da superfamília TRP em camundongos.....	27
Figura 6: Estrutura molecular e domínio funcional dos TRPs	28
Figura 7: Estrutura molecular de Orai1 e STIM1 em uma conformação alongada, ligando o ER à MP	31
Figura 8: Coreografia molecular da ativação de Orai1 por STIM1	32
Figura 9: Estrutura molecular do RyR.	34
Figura 10: Estrutura molecular do BK_{Ca} e diagrama esquemático mostrando os resíduos de aminoácidos envolvidos na modulação do canal BK_{Ca} por mensageiros intracelulares	38
Figura 11: Artéria mesentérica de camundongo e Sistema de reatividade vascular em miógrafo de fios.....	45
Figura 12: Preparação da artéria mesentérica para microscopia de fluorescência.	50
Figura 13: Mensuração do potencial de membrana em artérias de resistência	52
Figura 14: Contrações transitórias induzidas por cafeína e intervalo entre os estímulos. Fases rápida e lenta da contração transitória induzida por cafeína.	54
Figura 15: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína	55
Figura 16: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína em solução 0 Ca^{2+}	56
Figura 17: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína na presença de nifedipina.....	58
Figura 18: Contração transitória para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína na presença de paxilina.....	59
Figura 19: Em na presença de cafeína ou cafeína + nifedipine, paxilina ou 2-APB.....	60
Figura 20: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína na presença de 2-APB.	61

Figura 21: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína na presença de RuR	62
Figura 22: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína na presença de SKF-96365	63
Figura 23: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína na presença de KB-R7943.....	64
Figura 24: Velocidade da onda de Ca^{2+} perto da MP vs profundamente no citosol	65
Figura 25: Gráfico das variações de PAS (pressão arterial sistólica), PAM (pressão arterial média) e PAD (pressão arterial diastólica) obtidas em camundongos SHAM e DOCA-Sal pelo método de pletismografia de cauda. .	66
Figura 26: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} estimuladas por cafeína em anéis de artéria mesentérica de camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal).....	68
Figura 27: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} estimuladas por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) em solução 0 Ca^{2+}	70
Figura 28: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} estimuladas por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de nifedipina	71
Figura 29: Contração transitória estimulada por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de paxilina	73
Figura 30: Contração transitória estimulada por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de 2-APB.....	74
Figura 31: Contração transitória estimulada por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de SKF-96365 .	75
Figura 32: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos.....	79
Figura 33: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos em solução 0 Ca^{2+}	80
Figura 34: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de nifedipina	81
Figura 35: Contração transitória em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de paxilina (1 μ M).....	82
Figura 36: Contração transitória em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de 2-APB.....	83

Figura 37: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de RuR.	84
Figura 38: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de SKF-96365 (30 μ M).....	85
Figura 39: Contração transitória estimuladas por cafeína em arteríolas mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de KB-R7943 (10 μ M)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de canais Ca_v presentes em vertebrados.....	24
Tabela 2: Canais K_{Ca} em vertebrados.....	37
Tabela 3: Fases rápida e lenta da λ da contração e da fluorescência para o Ca^{2+} induzidas por cafeína.....	57
Tabela 4: Dados dos pacientes utilizados neste estudo.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

2-APB, 2-aminoetoxidifenil borato

$[K^+]_e$, concentração de K^+ extracelular

$[Ca^{2+}]_i$, concentração de Ca^{2+} intracelular

AUC, área sob a curva

BK_{Ca} , canal ativado por Ca^{2+} de grande condutância para o K^+

CaM, calmodulina

CaMKII, calmodulina quinase II

$Ca_v1.2$, canal para Ca^{2+} operado por voltagem do tipo L

E_m , potencial de membrana

IK_{Ca} , canal de K^+ sensível ao Ca^{2+} de condutância intermediária

IP_3 , 1,4,5-fosfatidilinositol trifosfato

IP_3R , receptor de IP_3

K_{Ca} , canal para potássio sensível ao Ca^{2+}

LCIC, liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}

MLC, cadeia leve da miosina, *do inglês*, myosin light chain

MLCK, quinase de cadeia leve da miosina, *do inglês*, myosin light chain kinase

MLCP, fosfatase da MLC

MLV, célula do músculo liso vascular

MP, membrana plasmática

MYPT1, subunidade 1 da MLCP

NCX, trocador Na^+/Ca^{2+}

NO, óxido nítrico

OAC, canal ativado osmoticamente

PA, pressão arterial

PKA, proteína quinase A

PMCA, bomba de Ca^{2+} da MP

PP, proteína fosfatase

ROC, canal para Ca^{2+} operado por receptor

ROCK, Rho-quinase

RS, retículo sarcoplasmático
RuR, vermelho de rutênio
RyR, receptor de rianodina
RVP, resistência vascular periférica
SERCA, Ca²⁺-ATPase do RS
SK_{Ca}, canal de K⁺ sensível ao Ca²⁺ de pequena condutância
SAC, canal ativado por estiramento
SOC, canal operado por estoque
SOCE, entrada de Ca²⁺ operada por estoque
STIM, *stromal interaction molecule*
STOC, corrente de saída transitória espontânea
TRP, canal receptor de potencial transiente
TRPA, TRP anquirina
TRPC, TRP canônico
TRPM, TRP melastatina
TRPML, TRP mucolipina
TRPP, TRP policistina
TRPV, TRP vanilóide

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Sistema Cardiovascular	15
1.2 Artérias de Resistência	17
1.3 Contração Vascular.....	19
1.4 Canais para Ca^{2+} operados por voltagem (Ca_v).....	23
1.5 Receptores de potencial transiente (TRPs)	26
1.6 Sistema STIM-Orai.....	30
1.7 Receptores de Rianodina.....	32
1.8 Canal ativado por Ca^{2+} de grande condutância para o K^+ (BK_{Ca}).....	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Delineamento experimental	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Aspectos éticos	41
4.1.1 Humanos	41
4.1.2 Camundongos	42
4.2 Indução da hipertensão arterial – Modelo DOCA-Salt	42
4.3 Aferição da PA	43
4.3 Avaliações realizadas no miógrafo de fios	44
4.3.1 Montagem dos anéis de artérias mesentéricas	44
4.3.2 Teste da funcionalidade do endotélio	45
4.3.3 Avaliação da participação do influxo de Ca^{2+}	46
4.3.4 Avaliação da participação dos canais $Ca_v1.2$, TRPs e NCX.....	46
4.3.5 Avaliação da participação de BK_{Ca}	47
4.4 Avaliação da fluorescência para o Ca^{2+}	47
4.4.1 – Microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert	47
4.4.2 – Microscópio Confocal Yokogawa Spinning Disk	49
4.5 Mensuração do potencial de membrana	50

4.6 Drogas	52
4.7 Análise estatística	52
5 RESULTADOS	54
5.1 PARTE I – O feedback entre TRPs, BK _{Ca} e Ca _v 1.2 previne a contração excessiva em resposta a cafeína em artérias mesentéricas de camundongos	54
5.1.1 A cafeína induz contração transitória dependente do influxo de Ca ²⁺	54
5.1.2 Ativação do RyR induz a interação dos canais Ca _v 1.2 e BK _{Ca}	57
5.1.3 A contração transitória induzida por cafeína induz a ativação de TRPs	60
5.1.4 O modo reverso do NCX colabora para a contração induzida por cafeína	63
5.1.5 Avaliação da velocidade da onda de Ca ²⁺ perto da MP	64
5.2 PARTE II – Alterações induzidas pela hipertensão arterial em artérias mesentéricas de camundongos.	66
5.2.1 – A hipertensão arterial promove a perda do feedback negativo entre TRP-Ca _v -BK _{Ca} channel.	66
5.3 PARTE III – Alterações induzidas pela hipertensão arterial em artérias mesentéricas de humanos.	76
6 DISCUSSÃO	87
7 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXO	110

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Sistema Cardiovascular

O sistema cardiovascular fornece fluxo sanguíneo para os tecidos a fim de atender as necessidades metabólicas dos mesmos (Opie, 2004). Este sistema é constituído pelo coração, por artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias.

As artérias de maior calibre, como por exemplo a aorta, possuem diâmetro de cerca de 2,5 cm e são conhecidas como vasos de condutância. Estas artérias carregam sangue sob altas pressões (120 mmHg na sístole e 60 mmHg na diástole) e desempenham um importante papel na entrega de nutrientes e oxigênio para os tecidos. Neste sentido, a presença de elastina, é essencial nas artérias de condutância, uma vez que garantem maior elasticidade vascular. Contudo, a medida em que as artérias se ramificam e se aproximam dos órgãos para disponibilizar nutrientes, as camadas de músculo liso vascular (MLV) aumentam e de tecido elástico diminuem (Tucker Wd, 2017).

As artérias são constituídas basicamente por três camadas: íntima, média e adventícia (**FIGURA 1**). A íntima é formada por uma fina camada de células endoteliais que são voltadas para o lúmen vascular. As células endoteliais se encontram tipicamente alongadas na direção do fluxo sanguíneo e agem como uma membrana semipermeável, por meio da qual ocorre a troca de nutrientes e sinais químicos, tais como: serotonina, bradicinina, íons, dentre outros. Estas células possuem um papel chave na regulação da resposta ativa dos vasos

mediante liberação de substâncias vasoativas para o controle do tônus vascular (Ignarro *et al.*, 1987; Neto, 2004; Cipolla *et al.*, 2009; Couto, 2012; Fortier *et al.*, 2014)

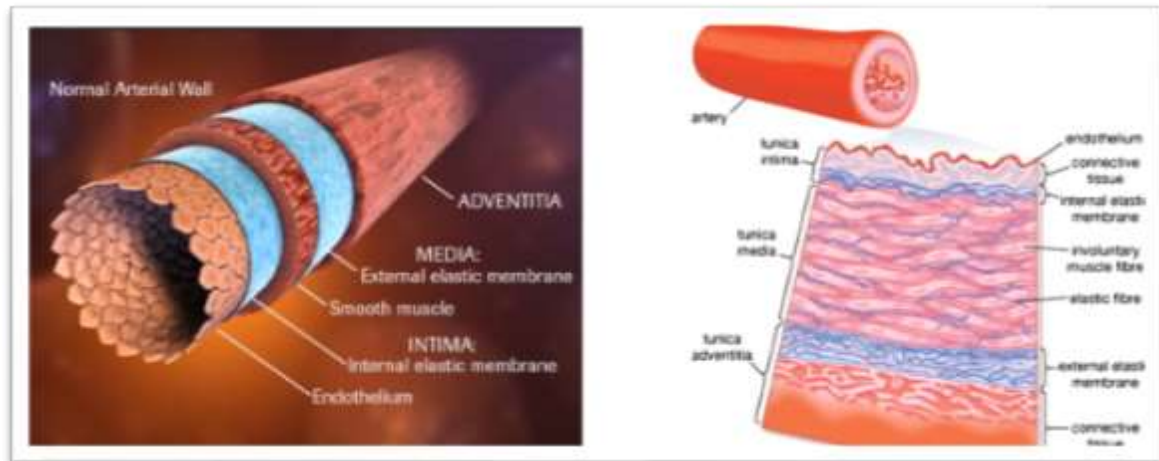


Figura 1: As camadas íntima, média e adventícia compõem as artérias. Fonte: Fortier *et al.*, 2014.

Próximo ao endotélio está a lâmina elástica interna, formada por elastina, conectando o endotélio ao músculo liso e permitindo maior flexibilidade vascular (Fortier *et al.*, 2014).

A camada média é formada principalmente por células do MLV que estão entre a lâmina elástica interna e a lâmina elástica externa. O controle do tônus do MLV, que constitui esta camada, aumenta ou diminui o fluxo sanguíneo para os tecidos modulando a pressão arterial (PA). A adventícia, por outro lado, é a camada mais externa das artérias e é formada principalmente por colágeno com fibroblastos, elastina e inervação perivascular (Fortier *et al.*, 2014).

1.2 Artérias de Resistência

As artérias e arteríolas de resistência, são assim denominadas devido a sua capacidade de resistir ao fluxo sanguíneo, sendo dotadas de 1 a 6 camadas de células do MLV e de uma camada de tecido elástico. Quando comparadas as artérias de condutância, as artérias e arteríolas de resistência carregam sangue sob baixa pressão, realizando um controle direto do fluxo sanguíneo para o leito capilar (Neto, 2004; Couto, 2012). Estes vasos são muito mais sensíveis a ação de substâncias modulatórias do que as artérias de condutância. A sensibilidade da arteríola mesentérica à serotonina (uma amina vasoativa), por exemplo, é cerca de 17 vezes maior do que a sensibilidade da artéria aorta a mesma substância (Adegunloye e Sofola, 1997; Pohl *et al.*, 2000).

O tônus miogênico das artérias de resistência determina a resistência vascular periférica (RVP), contribuindo para a regulação da PA e do fluxo sanguíneo para os tecidos e órgãos. O tônus miogênico é um dos mecanismos básicos de contração da musculatura lisa frente a estímulos fisiológicos. Os canais iônicos na membrana plasmática (MP) e no retículo sarcoplasmático (RS) do MLV contribuem para a regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), fator determinante para a atividade vascular contrátil (Tykocki *et al.*, 2017). Este mecanismo pode ser modulado por diversos fatores, tais como o MLV, por meio da sinalização de Ca^{2+} e regulação do efluxo de K^+ (Tykocki *et al.*, 2017). Todavia, o endotélio também pode modular o tônus miogênico principalmente via liberação do óxido nítrico (NO) (Cipolla *et al.*, 2009; Villalba *et*

al., 2014) ou via ativação de canais para K⁺ ativados por Ca²⁺_i, tais como: IK_{Ca} e SK_{Ca} (Cipolla *et al.*, 2009; Guéguinou *et al.*, 2014).

A regulação do diâmetro vascular frente a estímulos fisiológicos é extremamente importante para o controle da PA e do fluxo sanguíneo para os tecidos, evitando dano tecidual. O fluxo sanguíneo é definido pelo volume de sangue por unidade de tempo (ml/s) que passa pelos vasos sanguíneos e pode ser estimado pela Lei de Poiseuille, proposta pelo físico francês Jean Leonard Marie Poiseuille entre 1840-1841 e 1847 (Pfitzner, 1976; S P Sutura e Skalak, 1993).

De acordo com a lei de Poiseuille o fluxo sanguíneo é diretamente proporcional ao raio do vaso elevado a quarta potência (**Equação 1**). Isto significa que o raio é o fator determinante para o fluxo sanguíneo, sendo o tônus miogênico um importante regulador deste processo. Neste sentido, quanto menor o diâmetro do vaso, menor o fluxo sanguíneo (Pfitzner, 1976; Slaaf *et al.*, 1988). Entretanto, algumas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial, podem alterar a capacidade das artérias resistirem à pressão sanguínea e modificar o raio, por meio do remodelamento vascular, com consequentes danos teciduais (Wright e Angus, 1999).

Equação 1:
$$Q = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot r^4}{8l\eta}$$

Onde:

Q = velocidade do fluxo (ml/s)

ΔP = diferença de pressão ao longo do vaso (mmHg)

r = raio do vaso (metros)

l = comprimento vascular (metros)

η = viscosidade sanguínea (pascal . segundos (Pa . s)).

π = constante matemática (aproximadamente 3,1416)

1.3 Contração Vascular

O íon Ca^{2+} regula quase todos os processos do corpo, incluindo: contração, quimiotaxia, secreção, transmissão sináptica, fertilização, proliferação, aprendizado, memória e apoptose (Berridge *et al.*, 2003). O processo de excitação-contração do músculo liso é fortemente controlado pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$, especialmente pelas interações entre os canais para Ca^{2+} operados por voltagem (Ca_v) na membrana plasmática (MP) ou suas invaginações (cavéolas), e a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (Poburko *et al.*, 2004).

Na célula em repouso, a $[Ca^{2+}]_i$ é mantida extremamente baixa (30 a 200 nM) por meio da ação da bomba de Ca^{2+} da MP (PMCA) e do trocador Na^+Ca^{2+} (NCX) (Sedova e Blatter, 1999; Fameli *et al.*, 2007) ou ainda pela recaptação de Ca^{2+} do citosol para o RS, via Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA) (Lytton *et al.*, 1991; Lambolley *et al.*, 2014). Para o músculo liso, a contribuição relativa para a depuração de Ca^{2+} é dependente das condições e do tipo de músculo liso, mas

em geral, NCX contribui 60%, enquanto PMCA e SERCA contribuem de 20 a 30 % cada (Oloizia e Paul, 2008).

A contração do MLV é ativada pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ entre 100 a 400 μM (House *et al.*, 2008). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ promove a mudança conformacional da proteína citoplasmática calmodulina (CaM) (Gerthoffer e Pohl, 1994). Posteriormente, Ca^{2+} -CaM se liga a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK, *do inglês*, myosin light-chain kinase), formando o complexo ativo $4Ca^{2+}$ -CaM-MLCK que fosforila uma região específica da cadeia leve da miosina (MLC₂₀, *do inglês*, myosin light-chain 20). Em associação com actina, miosina converte energia química (ATP) em movimento da cabeça (que está ligada a actina). Este processo induz a formação da ponte cruzada actina-miosina, levando a contração do MLV. Por outro lado, a fosfatase da MLC (MLCP) é responsável por desfosforilar a MLC₂₀, levando ao relaxamento vascular (Katsuyama *et al.*, 1992) – **(FIGURA 2)**.

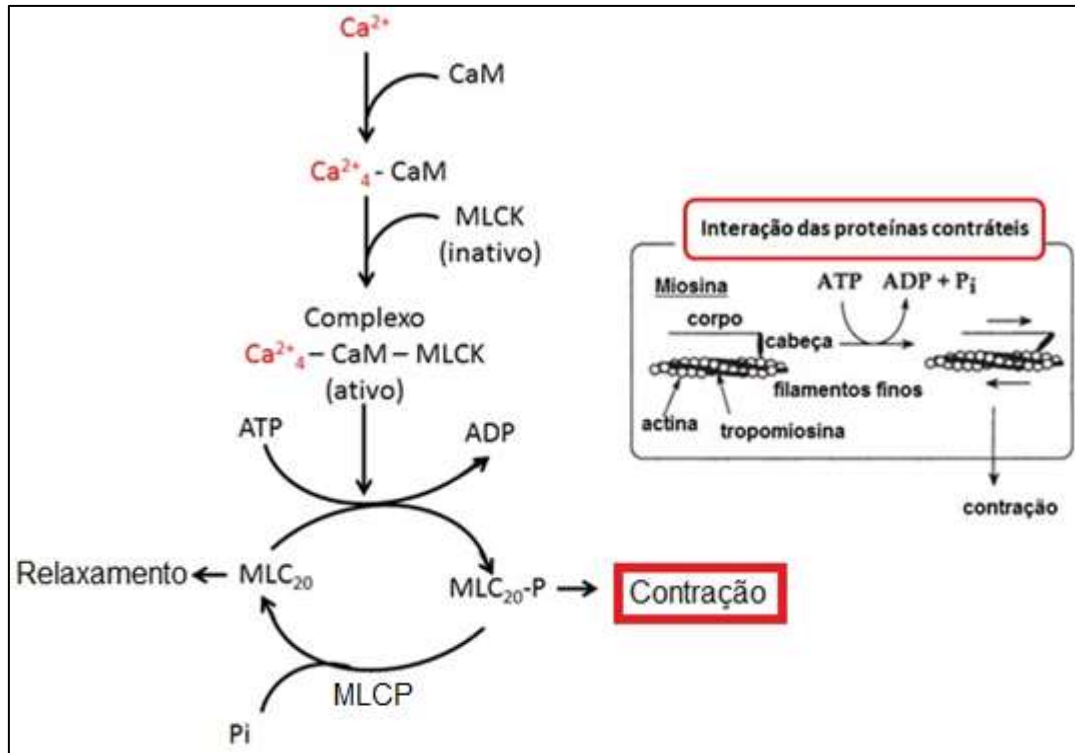


Figura 2: Papel do Ca^{2+} no mecanismo contrátil no MLV. Modificado de Akata, (2007).

Existem duas fases distintas de contração do MLV: a contração fásica, principalmente dependente da ativação da MLCK por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, como descrito anteriormente; e a contração tônica, principalmente dependente de processos de fosforilação e desfosforilação (Somlyo e Somlyo, 2003).

A despolarização da MP é um mecanismo chave para a ativação da contração do MLV, sendo comumente atingida em anéis arteriais em banho de órgãos isolados por intermédio do aumento da concentração de K^+ extracelular ($[\text{K}^+]_e$) (mediante substituição de Na^+ por K^+). A despolarização leva a resposta fásica da contração, devido a ativação dos canais Ca_v com conseqüente influxo de Ca^{2+} e ligação a CaM (Mills *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2016; Rattan, 2017).

A fase tônica envolve a inibição da MLCP, mantendo assim altos níveis de MLC₂₀ fosforilada. Entretanto, o balanço entre a formação do complexo Ca²⁺-CaM-MLCK e a desfosforilação da MLC₂₀ pela MLCP é que determinam a natureza da contração como fásica ou tônica, ou fásica e tônica. A fosforilação da MLCP (com consequente inibição) pode ser mediada pela via de sinalização da RhoA/ROCK e pela via da proteína quinase C (PKC). RhoA/ROCK inibe a MLCP via fosforilação da subunidade 1 da MLCP (MYPT1, *do inglês*, myosin phosphatase target subunit 1) e via fosforilação da CPI-17 (um inibidor endógeno da MLCP), levando a sustentação da fosforilação de MLC₂₀ e manutenção do tônus vascular. A PKC também promove fosforilação da CPI-17, com consequente inibição da MLCP (**FIGURA 3**) (Eto *et al.*, 1997; Somlyo e Somlyo, 2003; Ito *et al.*, 2004; Rattan, 2017).

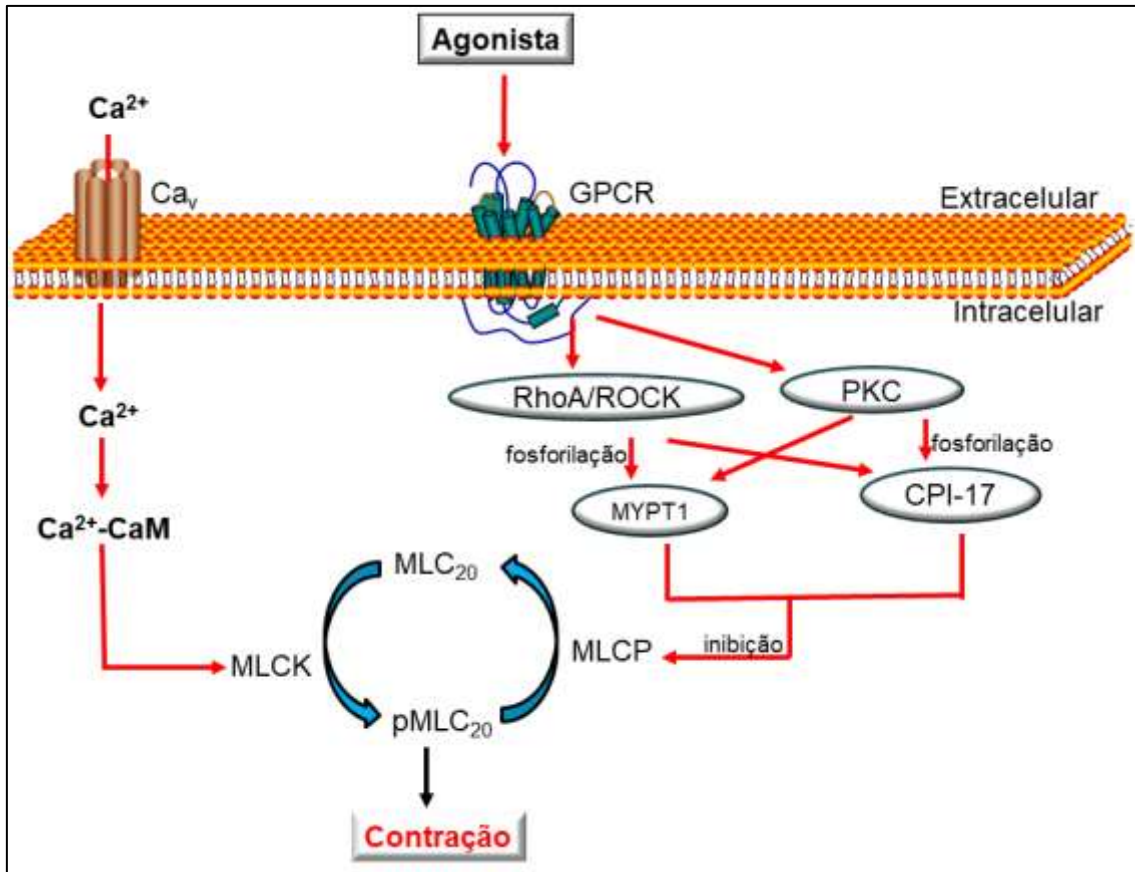


Figura 3: Mecanismo de inibição da MLCP via RhoA/ROCK e PKC.

1.4 Canais para Ca^{2+} operados por voltagem (Ca_v)

Os Ca_v foram identificados por Paul Fatt e Bernard Katz em músculo de crustáceo. No experimento realizado, Fatt e Katz observaram que o músculo ainda gerava potenciais de ação mesmo na ausência de Na^+ extracelular (Fatt e Katz, 1952; 1953).

Os Ca_v promovem o influxo de Ca^{2+} em resposta a despolarização da membrana (Catterall, 2011), sendo essenciais para acoplar sinais elétricos a eventos fisiológicos. Estes canais possuem isoformas que vão do Ca_v1 ao Ca_v3 ,

sendo o Cav1.2 predominante no músculo liso arterial (Koch *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2007) e são canais ativados por alta voltagem (HVA, do inglês, high-voltage-activated). A **tabela 1** demonstra os principais tipos de Cav em vertebrados.

Tabela 1: Tipos de canais Cav presentes em vertebrados. Adaptado de Hille, 2001.

	Lento, persistente	Rápido, inativação	
	HVA	HVA	LVA
Tipo	L	P/Q, N, R	T
Nomenclatura	Cav1.1, 1.2, 1.3, 1.4	Cav2.1, 2.2, 2.3	Cav3.1, 3.2, 3.3
Faixa de ativação	Positiva para -30 mV	Positiva para -20 mV	Positiva para -70 Mv
Faixa de inativação	-60 a -10 mV	-120 a -30 mV	-100 a -60 Mv
Inativação	Muito lenta ($\tau > 500$ ms)	Parcial ($\tau \sim 50-80$ ms)	Completa ($\tau > 20-50$ ms)
Faixa de desativação	Rápida	Lenta	Rápida
Condutância unitária do canal	25 Ps	13 pS	8 Ps
Sensibilidade a dihidropiridina	Sensível	Resistente	Resistente

Os Cav1.2, também conhecidos como canais para Ca²⁺ do tipo L, são compostos pelas subunidades α_1 , α_2 , β , γ e δ (**Figura 4**) (Takahashi *et al.*, 1987; Catterall, 1995; 2011). A subunidade α_1 possui massa molecular de cerca de 190 a 250 kDa e forma o poro do canal, o sensor de voltagem e o aparato de ativação, além de ser o sítio de regulação por segundos mensageiros, drogas e toxinas mais conhecidos. Estes canais são amplamente distribuídos ao longo do MLV, sendo bloqueados pelas dihidropiridinas. Além disso, também podem se

organizar formando *clusters* e/ou desempenhando o influxo de Ca^{2+} em regiões específicas da célula, como por exemplo, nas nanojunções existentes entre a membrana plasmática e retículo sarcoplasmático (junções MP-RS) (Navedo *et al.*, 2005; Amberg *et al.*, 2007; Navedo *et al.*, 2007).

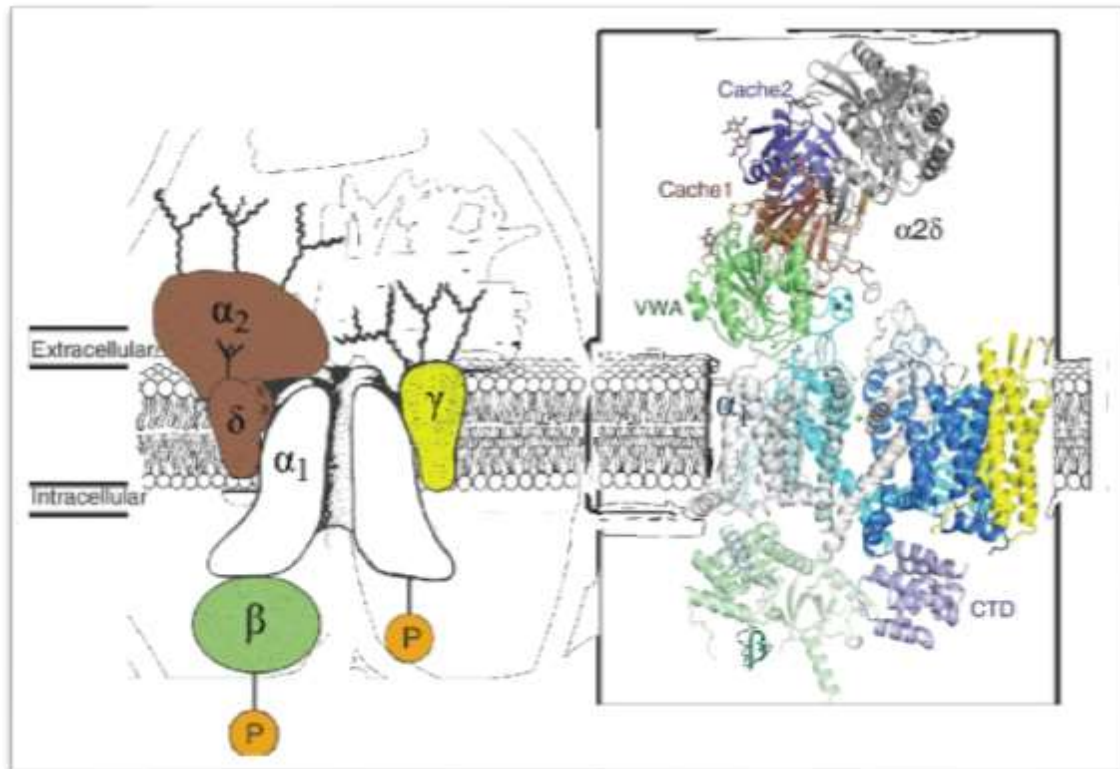


Figura 4: Estrutura molecular do Cav1.2. Catterall *et al.*, 2017.

Os Cav1.2 também possuem um papel metabotrópico, uma vez que não somente promovem o influxo de Ca^{2+} mas também ativam a contração regulando a liberação de Ca^{2+} do RS via 1,4,5-fosfatidilinositol trifosfato (IP_3) e a ativação de RhoA para sensibilizar a maquinaria contrátil (Fernández-Tenorio *et al.*, 2011; Ureña *et al.*, 2013).

Os canais Ca_v2 são relativamente insensíveis a dihidropiridina, entretanto estes canais são especificamente bloqueados com alta afinidade por toxinas peptídicas de aranhas e caracol marinhos. Estas toxinas peptídicas são potentes bloqueadores da transmissão sináptica devido aos seus efeitos específicos nos Ca_v2 (Olivera *et al.*, 1994). Por outro lado, os canais Ca_v3 são insensíveis as dihidropiridinas que bloqueiam os canais Ca_v1 e também as toxinas peptídicas que bloqueiam os canais Ca_v2 (Perez-Reyes, 2003). Recentemente, vários agentes farmacológicos foram desenvolvidos para bloquear seletivamente o canal Ca_v3 , sendo extremamente úteis quando utilizados em modelos de dor neuropática, epilepsia e comorbidades psiquiátricas, são eles: TTA-A2, TTA-P2 e Z944 (Perez-Reyes, 2003; Choe *et al.*, 2011).

1.5 Receptores de potencial transiente (TRPs)

Os receptores de potencial transiente (TRPs) são canais catiônicos não seletivos envolvidos na transdução de sinais em células excitáveis e não excitáveis. Os genomas de mamíferos codificam diferentes subunidades de TRPs que, em conjunto, compõem a superfamília TRP, os quais contribuem significativamente para a regulação da $[Ca^{2+}]_i$ (Flockerzi e Nilius, 2014; Nilius e Flockerzi, 2014). Estes canais são agrupados em seis subfamílias baseadas na sequência de aminoácidos, sendo assim designados como: canônicos ou clássicos (TRPCs), vanilóides (TRPVs), melastatinas (TRPMs), anquirinas (TRPAs), mucolipinas (TRPMLs) ou policistinas (TRPPs) (Clapham *et al.*, 2003;

Venkatachalam e Montell, 2007; Earley e Brayden, 2015; Tykocki *et al.*, 2017)
(Figura 5).

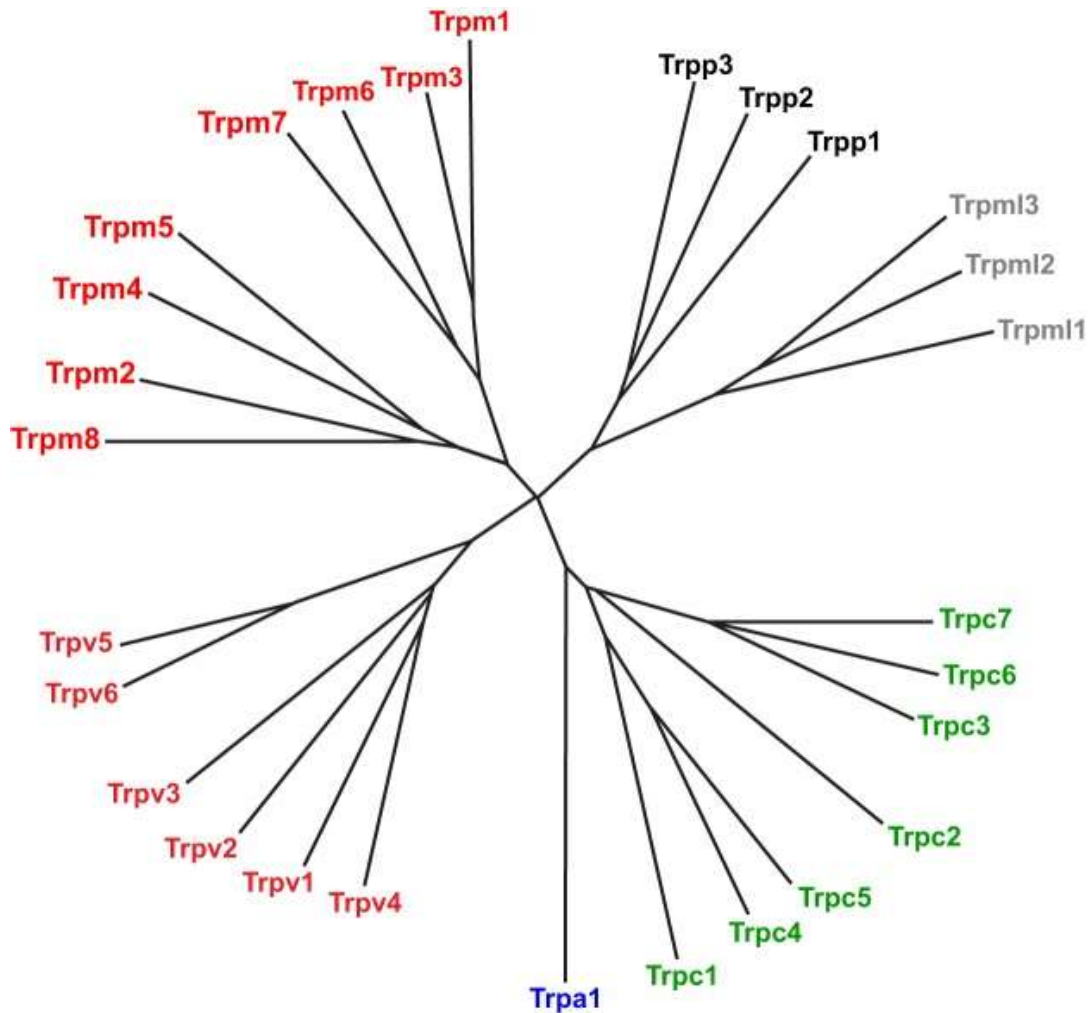


Figura 5: Árvore filogenética da superfamília TRP em camundongos. Fonte: Earley e Brayden (2015).

Os TRPs expressam seis segmentos transmembrana (S1-S6), dois domínios intracelulares, um NH₂ e outro COOH (**Figura 6**) (Beech *et al.*, 2004; Earley e Brayden, 2015).

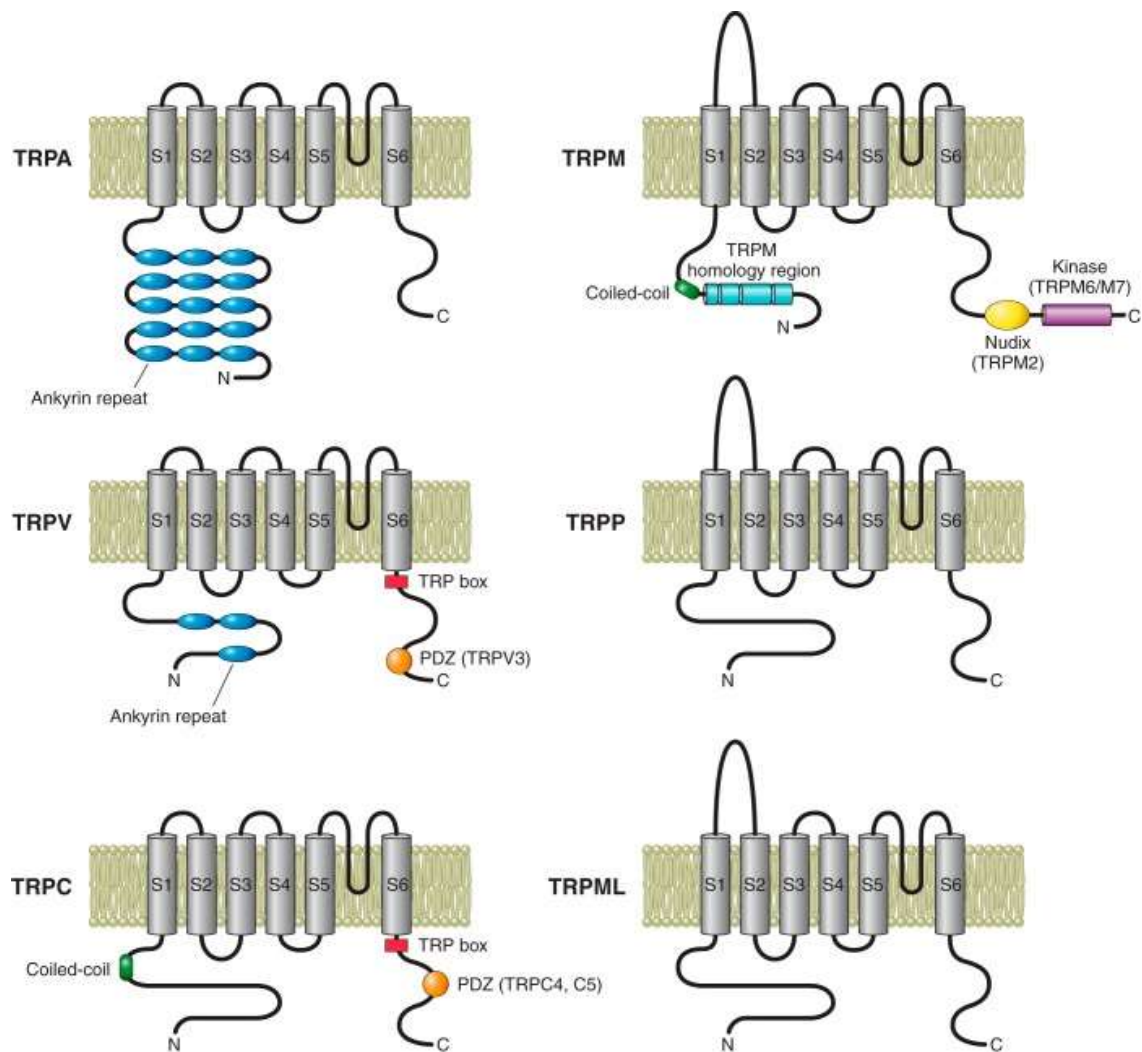


Figura 6: Estrutura molecular e domínio funcional dos TRPs. Fonte: Ealey e Brayden (2015).

Os TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPV2 e TRPM4 são os principais TRPs expressos no músculo liso da artéria mesentérica (Inoue *et al.*, 2006; Álvarez-Miguel *et al.*, 2017).

O TRPC1 é um canal operado por estoque (SOC; *do inglês*, store-operated cation channel) (Brueggemann *et al.*, 2006) que forma um complexo com STIM1 (*do inglês*, stromal interaction molecule 1), uma proteína sensível ao

Ca²⁺ do RS. O complexo TRPC1-STIM pode promover a formação de IP₃ e diacilglicerol (DAG), com consequente fosforilação da proteína quinase C (PKC) (Beech, 2005; Brayden *et al.*, 2008; Tykocki *et al.*, 2017).

O TRPC3 está envolvido no controle da contratilidade vascular em artérias mesentéricas, sendo descrito como um canal operado por receptor (ROC; *do inglês*, receptor-operated cation channel) e SOC (Hofmann *et al.*, 1999; Reading *et al.*, 2005; Birnbaumer, 2009; Yeon *et al.*, 2014).

O TRPC6 possui múltiplas funções e pode agir como SOC, ROC, canal ativado por estiramento (SAC; *do inglês*, stretch-activated cation channel) e como canal ativado osmoticamente (OAC; *do inglês*, osmotically-activated cation channel) (Vriens *et al.*, 2004).

O TRPV2 tem participação na mecanotransdução (Corey *et al.*, 2004) e pode ser considerado um OAC (Muraki *et al.*, 2003; Beech *et al.*, 2004). O TRPM4 é ativado por altas concentrações de Ca²⁺_i (pEC₅₀ 3.9 – 6.3 [-100.0 – 100.0 mV]) (Nilius *et al.*, 2004; Nilius *et al.*, 2005; Nilius *et al.*, 2006), podendo amplificar o sinal de Ca²⁺ através do influxo de Ca²⁺ por este canal.

Alguns TRPs possuem domínios de anquirina, ou proteínas âncoras (família de proteínas que auxiliam na fixação de outras proteínas na membrana celular) na região NH₂ terminal que facilitam a interação entre os TRPs, proporcionando múltiplas funções de acordo com o complexo formado, podendo agir com SOC, ROC, SMOC, OAC e/ou SAC (Clapham, 2003; Clapham *et al.*, 2003).

1.6 Sistema STIM-Orai

Orai1 é um membro de uma nova classe de canais para Ca^{2+} que não estão estruturalmente relacionados com os outros canais para Ca^{2+} previamente citados. Orai1 se localiza na MP e age como um canal que promove a entrada de Ca^{2+} ativada pela depleção de estoque (SOCE, *do inglês*, store-operated Ca^{2+} -entry). Orai1 é composto por 4 domínios transmembranas e dois domínios citoplasmáticos, um NH_2 e outro COOH terminal (**Figura 7A**). O canal Orai1 funcional é formado por um tetrâmero de 4 monômeros Orai1 que, quando ativado por STIM1, promove o influxo de Ca^{2+} com consequente preenchimento do RS (Feske *et al.*, 2006; Prakriya *et al.*, 2006; Gwack *et al.*, 2007; Bergmeier *et al.*, 2009; Kawasaki *et al.*, 2010).

STIM1 é uma proteína ancorada na membrana do RS que age como um sensor da concentração de Ca^{2+} luminal ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) e controla o influxo de Ca^{2+} por intermédio de um acoplamento direto com Orai1 (Hogan, 2015). STIM1 possui um domínio NH_2 terminal no lumen do RS, um único segmento transmembrana ancorado na membrana do RS e um domínio citoplasmático COOH terminal. No domínio citoplasmático existem subregiões chaves, tais como: CC1, SOAR/CAD e um seguimento polibásico (**FIGURA 7B**). O fragmento SOAR/CAD tem sido descrito como o fragmento mínimo capaz de ativar Orai1 (Kawasaki *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009).

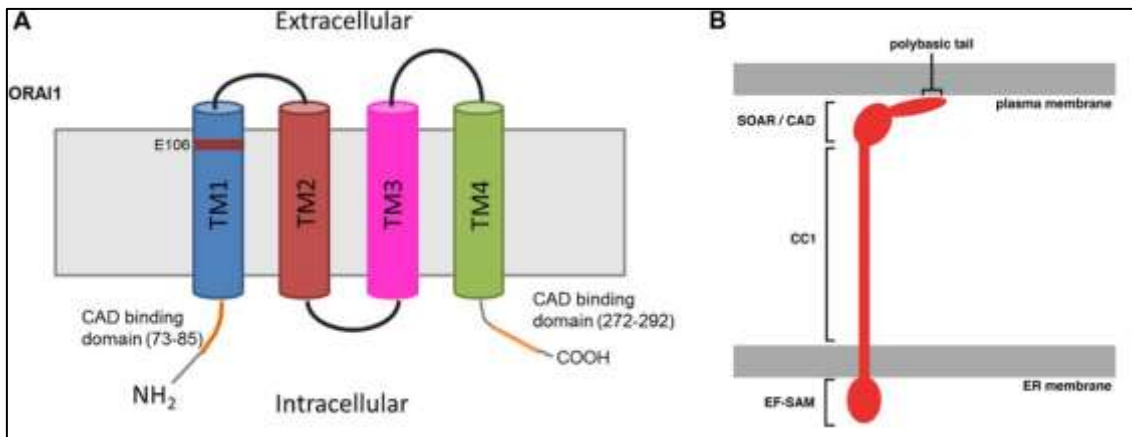


Figura 7: A - Estrutura molecular de Orai1. Fonte: Moccia *et al.* (2015). **B** - STIM1 em uma conformação alongada, ligando o ER à MP. Fonte: Hogan (2015)

A mudança conformacional de STIM1 ocorre quando há diminuição da $[Ca^{2+}]_{RS}$, levando a dissociação do Ca^{2+} ligado a porção EF-SAM com consequente dimerização de STIM1. Neste sentido, após depleção de Ca^{2+} do RS, STIM1 se movimenta dentro do RS para a região da junção MP-RS e recruta o canal Orai1, onde as duas proteínas interagem (Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Navarro-Borelly *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Feske *et al.*, 2012). A dimerização de STIM1 promove a liberação de sua calda polibásica para interagir com os lipídeos da MP, liberando o domínio SOAR/CAD para interagir com o canal Orai1. Após a ativação de Orai1, ocorre influxo de Ca^{2+} e consequente preenchimento do RS (**FIGURA 8**). O sistema STIM-Orai promove o influxo de Ca^{2+} apenas nas regiões em que o RS está próximo da MP (junção MP-RS), demarcando um microdomínio de sinalização de Ca^{2+} (Feske *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013).

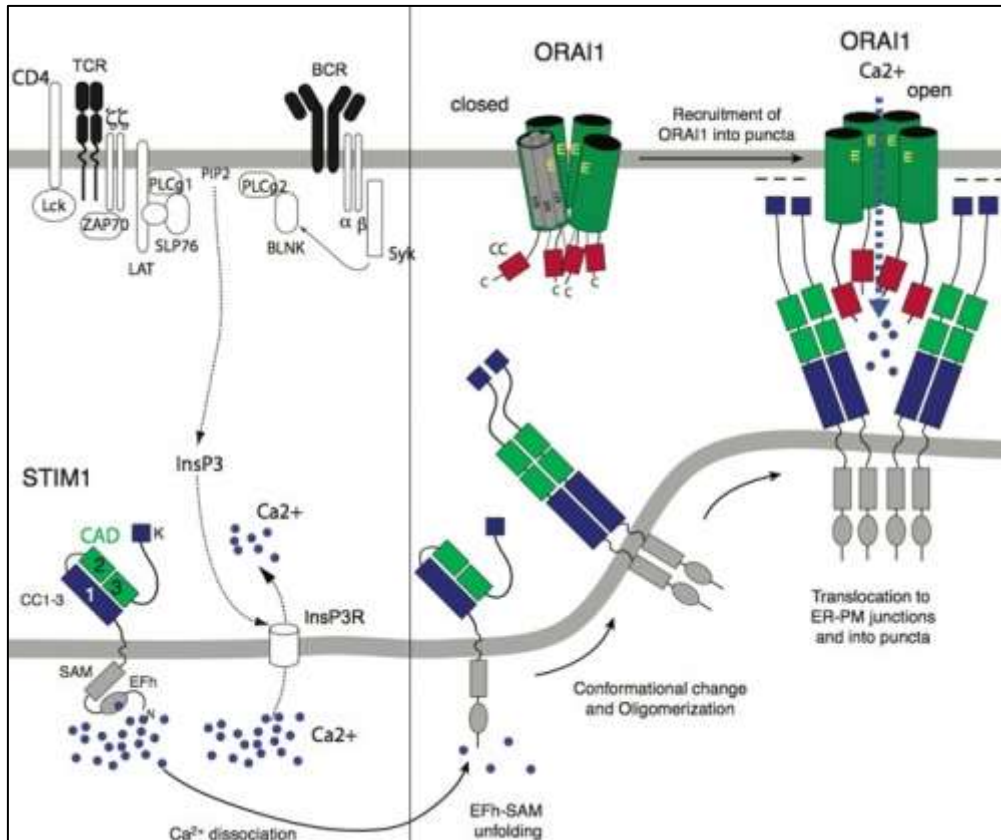


Figura 8: Coreografia molecular da ativação de Orai1 por STIM1. Fonte: Feske et al. 2012.

1.7 Receptores de Rianodina

Os receptores de rianodina (RyRs, *do inglês*, ryanodine receptors) são canais para liberação de Ca^{2+} localizados na membrana do RS. Estes receptores receberam este nome após a rianodina, um alcalóide natural, ser identificada como um agonista por se ligar com alta afinidade e especificidade neste receptor, desempenhando interações preferenciais com o estado aberto do canal (Inui *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1988; Chu *et al.*, 1990).

O RyR está presente na forma de homotetrâmero, em que cada monômero contém aproximadamente 5.000 aminoácidos e possui massa

molecular de 565 kDa (Takeshima *et al.*, 1989). O grupamento N-terminal, compreende cerca de 90% da cadeia polipeptídica do RyR e forma um volumoso domínio citoplasmático para modulação da função do canal (Marks *et al.*, 2002). Os outros 10% correspondem a região C-terminal (Zorzato *et al.*, 1990; Du *et al.*, 2002).

Existem três isoformas do RyR em mamíferos:

- **RyR tipo 1 (RyR1):** é predominantemente expresso no músculo esquelético e, em baixos níveis, no músculos cardíaco e liso (Takeshima *et al.*, 1989; Zorzato *et al.*, 1990). Em humanos, o gene que codifica o RyR1 está localizado no cromossomo 19q13.2 e possui 104 éxons (Mattei *et al.*, 1994).
- **RyR tipo 2 (RyR2):** é predominantemente expresso no coração (Nakai *et al.*, 1998), mas também é encontrado no encéfalo (Lai *et al.*, 1992) e, em baixos níveis no estômago, pulmões, timo, glândula adrenal e ovários (Kuwajima *et al.*, 1992; Giannini *et al.*, 1995). O gene que codifica o RyR2 está localizado no cromossoma 1q43 e contém 102 éxons (Mattei *et al.*, 1994).
- **RyR tipo 3 (RyR3):** é amplamente distribuído, sendo expresso no cérebro, músculo esquelético, músculo liso, diafragma e muitos outros

órgãos (Lai *et al.*, 1992; Giannini *et al.*, 1995). O gene que codifica o RyR3 está localizado no cromossoma 15q13.3-14 e contém 103 éxons (Mattei *et al.*, 1994).

A atividade do RyR pode ser modulada por diversas proteínas. Algumas proteínas se ligam a região citoplasmática do RyR modulando este canal como, por exemplo: a CaM, a FKBP12.6 (também conhecida como calestabina-2), a proteína quinase A (PKA) e as proteínas fosfatases (PP) 1 e 2A (Marx *et al.*, 2001; Marks *et al.*, 2002) (**Figura 9**).

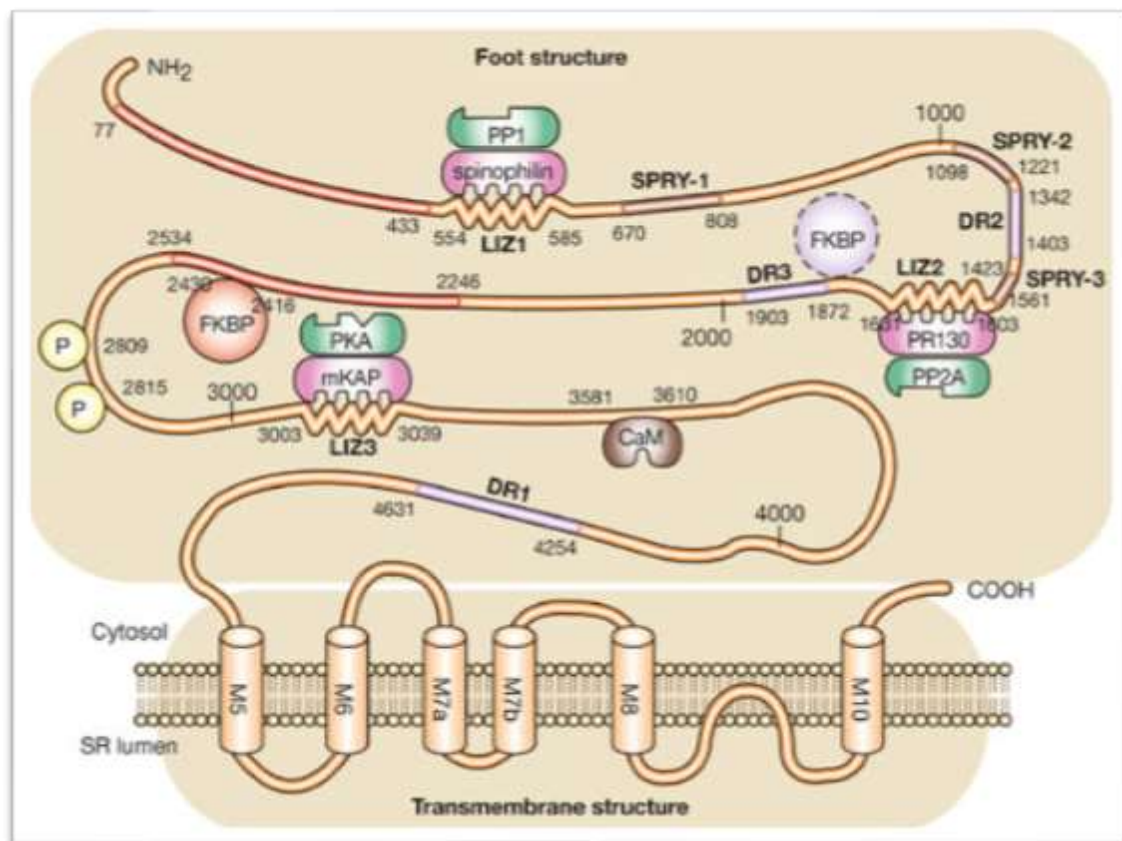


Figura 9: Estrutura molecular do RyR. Fonte: Yano *et al.*, (2006).

Todavia o RyR também pode ser modulado por outras estruturas ou íons como descrito a seguir:

- **Ca_v1.2 (tipo L):** No músculo esquelético ocorre interação física entre o RyR1 e o Ca_v1.2, o que promove a liberação de Ca²⁺ do RS para colaborar com o acoplamento excitação-contração. No músculo cardíaco o influxo de Ca²⁺ via Ca_v1.2 ativa o RyR2 devido a proximidade entre estes canais, levando a liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ (LCIC) (Nakai *et al.*, 1998).
- **Ca²⁺ e Mg²⁺:** o Ca²⁺ modula o RyR tanto no lado citoplasmático quanto no lado luminal, possuindo um efeito direto no RyR via CaM e CaM quinase II (CaMKII; do inglês, calmodulin kinase II). O Mg²⁺ é um potente inibidor do RyR. (Meissner *et al.*, 1986; Meissner, 1994; Meissner *et al.*, 1997).
- **Rianodina:** Em concentrações na faixa de nanomolar a rianodina abre o RyR. Já em altas concentrações (>100 µM) a rianodina inibe o canal (Meissner *et al.*, 1986).
- **Cafeína:** A cafeína é uma metilxantina, agonista do RyR em altas concentrações (mM)(Echeverri *et al.*, 2010). No nível celular e tecidual, baixas concentrações de cafeína (<500 µM) tem uma ação transitória

complexa de liberação de Ca^{2+} na forma de “sparks” (Domeier *et al.*, 2009).

As elevações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ são denominadas sparks de Ca^{2+} e são causados pela liberação de Ca^{2+} do RS via RyR. No músculo estriado cardíaco e esquelético, estes eventos são fundamentais para o acoplamento excitação-contração (Bers e Stiffel, 1993). Todavia, no músculo liso, os sparks de Ca^{2+} são responsáveis por se opor a contração vascular via ativação de canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} na MP, colaborando para o relaxamento vascular (Nelson *et al.*, 1995; Krishnamoorthy *et al.*, 2014).

1.8 Canal ativado por Ca^{2+} de grande condutância para o K^+ (BK_{Ca})

Existem três tipos de canais para K^+ ativados por Ca^{2+} , são eles: o de pequena condutância (SK_{Ca}), os de condutância intermediária (IK_{Ca}) e os de grande condutância (BK_{Ca}) para o K^+ . Estes canais possuem diferentes propriedades. A **tabela 2** sumariza as características funcionais utilizadas para definir os canais BK_{Ca} , IK_{Ca} e SK_{Ca} em vertebrados (Gardos, 1958; Blatz e Magleby, 1987). Os três tipos de canais diferem em sua dependência de voltagem, sensibilidade ao Ca^{2+} , farmacologia e condutância.

Tabela 2: Canais K_{Ca} em vertebrados. Adaptado de Vergara *et al.* (1998)

Propriedade	Tipo de Canal		
	BK, maxi K, ou IC	IK ou AHP	SK ou slow AHP
[Ca²⁺]_i necessária para ativação	1-10 μ M (a -50 mV)	50-900 nM	50-900 nM
Dependência de voltagem	e-fold/9 a 15 mV	Nenhuma	Nenhuma
Condutância unitária do canal	100-250 pS	20-80 pS	4-20 pS
Bloqueadores	Caribdotoxina (nM), Iberiotoxina (nM), TEA (< 1mM), paxilina (μ M).	A-KTx (nM), Clotrimazol (nM)	Apamina (nM), Cetiloxina (nM), Curare (μ M)
Clones de mamíferos	Slo1 [slo2, 3]	IK1/SK4	SK1, 2, 3

Os canais BK_{Ca} , também conhecidos como slo ou maxiK, possuem sua probabilidade de abertura determinada pelo potencial de membrana (E_m), pela $[Ca^{2+}]_i$ e pela $[Mg^{2+}]_i$ (Shi e Cui, 2001; Zhang *et al.*, 2001). BK_{Ca} é formado pela interação de duas proteínas, a subunidade α e a subunidade β . Estruturalmente, os canais BK_{Ca} são compostos por 4 subunidades α , cada uma com 7 segmentos transmembrana (S0-S6) e um largo domínio citoplasmático COOH terminal. S1-S4 formam o domínio sensor de voltagem. S5, P e S6 formam, juntos, o principal domínio que permite a passagem de íons. Estes canais também possuem subunidades auxiliares β (**Figura 10**). Funcionalmente, a presença de subunidades β altera as características farmacológicas e de ativação do BK_{Ca} (Salkoff *et al.*, 2006). Além disso, este canal pode ser modulado no seu domínio

citoplasmático por diversos mensageiros intracelulares, incluindo ROS, H⁺, CO, PIP₂ e heme/hemin (Hou *et al.*, 2009), como mostra a figura a seguir.

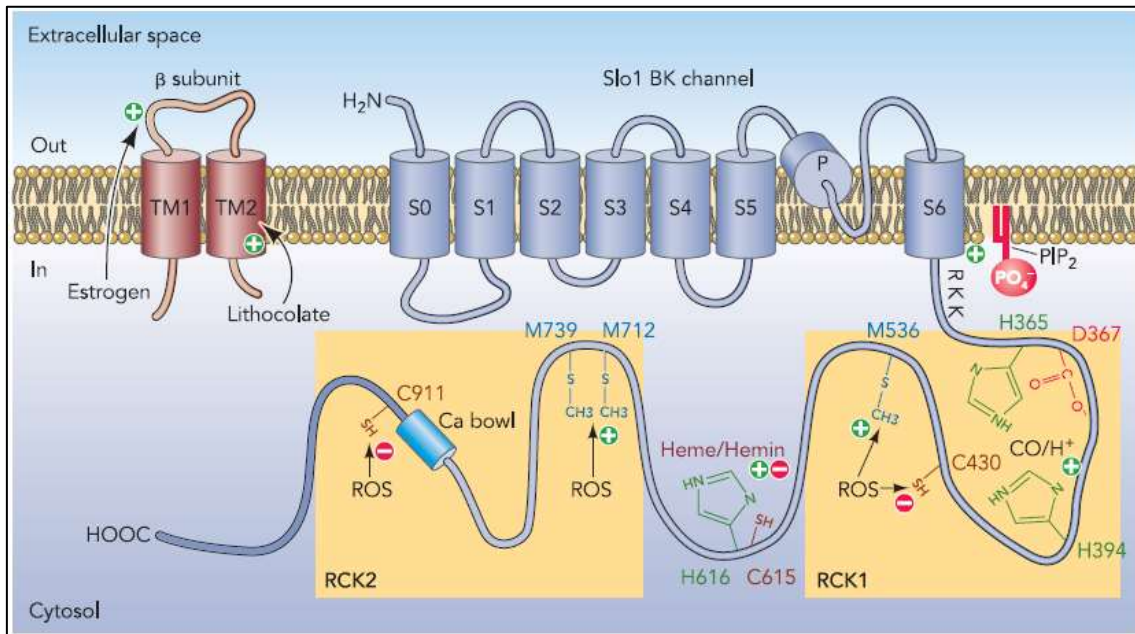


Figura 10: Estrutura molecular do BK_{Ca} e diagrama esquemático mostrando os resíduos de aminoácidos envolvidos na modulação do canal BK_{Ca} por mensageiros intracelulares. Fonte: Hou *et al.* (2009).

2 JUSTIFICATIVA

A sinalização de Ca^{2+} é essencial no processo de excitação-contração do MLV. Os canais para Ca^{2+} presentes na MP desempenham um papel crucial nesse processo e podem modular a liberação de Ca^{2+} do RS (van Breemen et al., 2013).

Em experimentos prévios realizados no nosso grupo demonstraram que quando anéis arteriais de mesentérica são estimulados com cafeína na presença de nifedipina, a contração é aumentada, sugerindo um feedback negativo da contração por $\text{Ca}_v1.2$. Estes resultados demonstram ser extremamente relevantes, uma vez que o influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ geralmente contribui para a contração. Neste sentido, se torna fundamental o estudo da modulação da contração através do crosstalk entre os canais presentes na MP e no RS, a fim de se investigar a participação de cada canal na contração transitória induzida pela liberação de Ca^{2+} do retículo.

As vias de sinalização de Ca^{2+} envolvendo os canais na MP e o RyR devem ser investigadas a níveis fisiológicos e patológicos, tendo em vista que podem estar alteradas na presença da hipertensão arterial ou outras doenças cardiovasculares. Neste sentido, possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da hipertensão arterial podem ser descobertos a partir do estudo da modulação da contração transitória via ativação dos RyRs pelos canais para Ca^{2+} da MP.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos de modulação da contração induzida pela ativação dos RyRs por cafeína em artérias mesentéricas de camundongos e humanos.

3.2 Delineamento experimental

1. Investigar a participação dos Cav1.2 na contração induzida pela liberação de Ca²⁺ do RS via RyR em artérias mesentéricas.
2. Investigar a participação dos TRPs na contração induzida pela liberação de Ca²⁺ do RS via RyR em artérias mesentéricas.
3. Investigar o envolvimento de BK_{Ca} na modulação da contração induzida pela ativação do RyR em artérias mesentéricas.
4. Investigar a participação do NCX na modulação da contração induzida pela ativação do RyR em artérias mesentéricas
5. Investigar a participação do sistema STIM-Orai na modulação da contração induzida pela ativação do RyR em artérias mesentéricas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

4.1.1 Humanos

No presente trabalho foram utilizadas artérias humanas derivadas de material de descarte provenientes da região do omento (artérias do leito mesentérico), de pacientes submetidos a cirurgias para retirada de tumores intestinais, no Hospital Alberto Cavalcanti. Após o procedimento cirúrgico, os vasos foram mantidos em solução salina fisiológica (PSS - *do inglês*, physiological salt solution; mM): NaCl 119,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,4; NaHCO₃ 1,17; MgSO₄ 14,9; CaCl₂.2H₂O 2,5 e glicose 5,5, e rapidamente transportados ao laboratório em uma caixa de isopor com gelo.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à análise do comitê de ética – (certificado de apresentação para apreciação ética – CAAE) nº 03885312.0.0000.5149. Os dados dos pacientes como idade, gênero, doenças associadas, uso de medicamentos pré e pós-operatórios, foram obtidos, mantendo-se a ética e o sigilo. A coleta do material proveniente das cirurgias intestinais só foi realizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 1**) pelo paciente ou responsável.

Subdivisão dos grupos para estudo: Foram avaliados vasos de pacientes do sexo masculino e feminino. Os pacientes foram divididos entre:

1) Pacientes normotensos – aqueles que exibiam PA <140x80 mmHg e não faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos;

2) Pacientes hipertensos - aqueles que faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos e haviam sido diagnosticados como hipertensos.

4.1.2 Camundongos

Neste trabalho foram utilizadas artérias mesentéricas de camundongos swiss machos (8 a 12 semanas). Todos protocolos experimentais foram submetidos a apreciação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) – UFMG protocolo nº 86/2015. Também foram utilizados camundongos C57BL/6J de 8 a 12 semanas (protocolo número 16.010 – IACUC – American Association for Laboratory Animal Science). Foram mantidos 5 animais por caixa em sala com temperatura constante (23 °C) e 12 horas de ciclo claro/escuro. Os camundongos receberam água filtrada e ração padrão.

4.2 Indução da hipertensão arterial – Modelo DOCA-Salt

A hipertensão arterial foi induzida em camundongos swiss machos (6 semanas de idade) que foram unilateralmente nefrectomizados sob anestesia com ketamina 85 mg/kg e xilazina 15 mg/kg, administrada por via intraperitoneal. Para isto, foi realizada uma incisão de cerca de 1,5 cm no lado esquerdo do abdômen. O rim esquerdo foi externalizado e removido após ligação da artéria e veia renais com um fio de sutura 4-0 (Ethicon, Inc, Somerville, NJ, USA). O

músculo e as camadas dérmicas foram suturados. Uma pequena área (1 cm) na região dorsal foi utilizada para a implantação do “pellet” de silicone contendo o mineralocorticóide acetato de deoxicorticosterona (DOCA, *do inglês*, deoxycorticosterone acetate; 75 mg/kg). Posteriormente, os camundongos receberam salina (água filtrada + 0.9 % NaCl + 0.2 % KCl) para beber. Os camundongos normotensos, denominados SHAM, foram submetidos a incisão unilateral, entretanto, não tiveram o rim removido. Além disso, receberam o implante dorsal do pellet de silicone sem mineralocorticóide. Posteriormente os camundongos SHAM receberam água filtrada para beber. Todos os animais receberam ração padrão e foram sacrificados 4 semanas após a cirurgia.

4.3 Aferição da PA

A pressão sistólica dos animais foi determinada através do método de pletismografia de cauda (Silva *et al.*, 2013), utilizando o sistema de PA da série XBP 1000 (Kent Scientific Torrington, EUA). Os camundongos conscientes foram acondicionados em contensores em uma câmara de aquecimento controlada a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, um manguito de sensor integrado foi colocado na cauda para a aferição da PA. As medições foram realizadas a cada 5 minutos e registradas utilizando um sistema de aquisição de dados DI-194RS (Dataq, Akron, EUA). As aferições da PA foram realizadas em triplicata em cada animal, sendo considerados hipertensos aqueles que apresentavam pressão sistólica > ou igual a 140 mmHg.

4.3 Avaliações realizadas no miógrafo de fios

4.3.1 Montagem dos anéis de artérias mesentéricas

As artérias mesentéricas derivadas da região do omento de vasos humanos e as artérias mesentéricas de segunda ordem de camundongos swiss machos foram dissecadas, removendo-se o tecido adiposo. As artérias foram segmentadas em anéis (de cerca de 1,6 e 2,0 mm de comprimento) que foram montados em miógrafo de fios (Mulvany e Halpern, 1977). Para isto, foram utilizados fios de aço de 40 μm de diâmetro que transpassaram o lúmen dos vasos. Os fios de aço foram fixados sobre os grampos miográficos, mergulhados em um banho de solução salina fisiológica (mM): NaCl 119,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,4; NaHCO_3 14,9; MgSO_4 1,17; CaCl_2 2,5 e glicose 5,5 - aerados por mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantidos a 37 °C (**FIGURA 11**). O registro da contração e relaxamento vascular foram adquiridos com o auxílio de transdutores de força isométricos acoplados a uma das bases do miógrafo. Os vasos foram mantidos a uma tensão aproximada de 2 mN, que equivale a cerca de 90% da tensão naturalmente exercida pela PA fisiológica. Estes permaneceram em estabilização durante 60 minutos. Durante o tempo de estabilização a solução fisiológica foi trocada a cada 15 minutos.

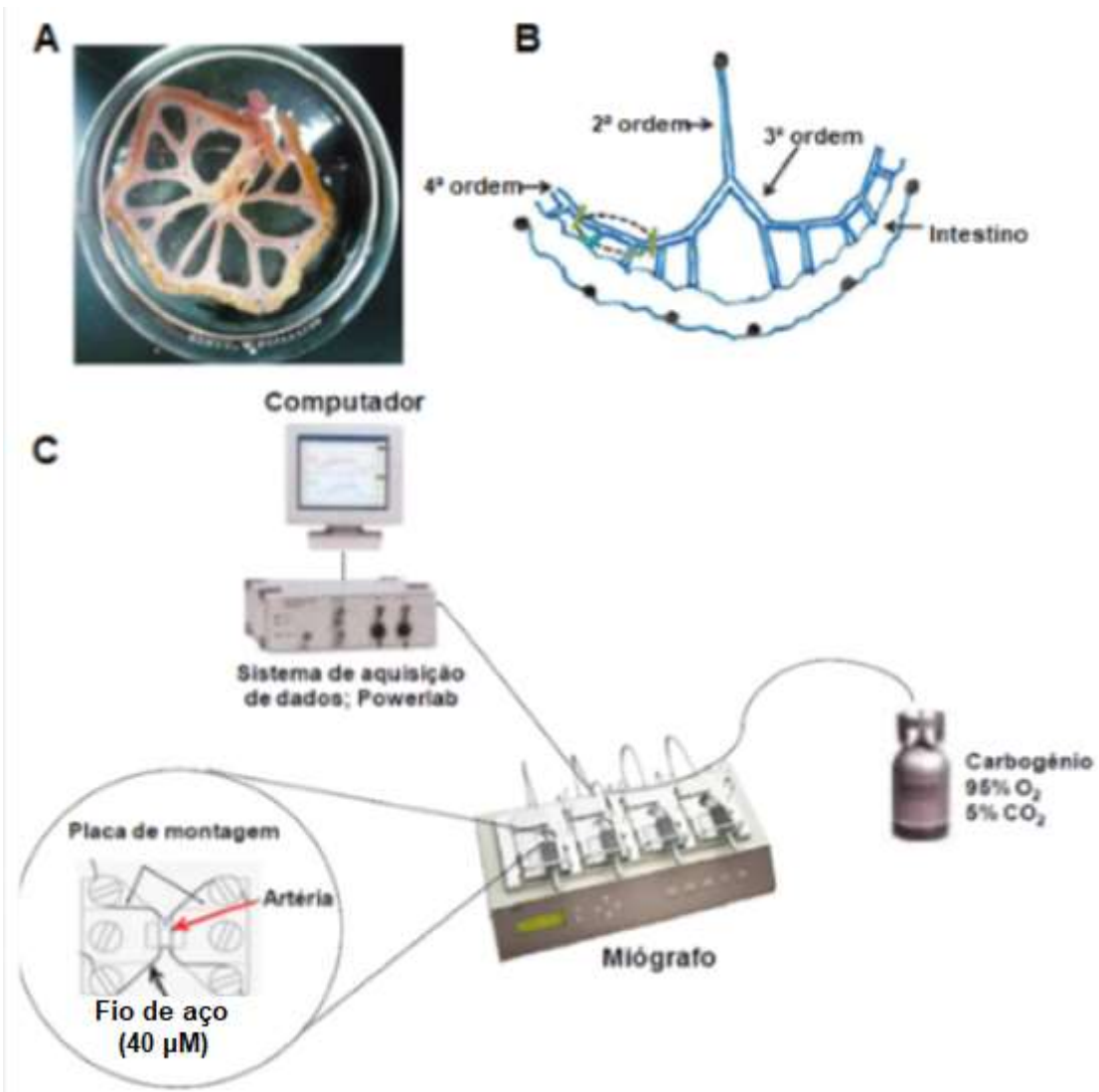


Figura 11: A e B - Artéria mesentérica de camundongo. Adaptado de (Jadeja et al., 2015); C - Sistema de reatividade vascular em miógrafo de fios.

4.3.2 Teste da funcionalidade do endotélio

O teste da funcionalidade do endotélio foi realizado após pré-contração das artérias com fenilefrina (3 μM) para mesentéricas de camundongos e noradrenalina (10 μM) para mesentéricas de humanos. Em seguida, ocorreu a adição de acetilcolina (ACh; 10 μM) a fim de se avaliar a resposta vasorelaxante.

A ausência de endotélio funcional foi confirmada por vasodilatação inferior a 10%. A retirada do endotélio foi realizada através de leves fricções do fio de aço no lúmen vascular durante a passagem do primeiro fio. Todos os protocolos foram realizados em vasos desprovidos de endotélio funcional.

4.3.3 Avaliação da participação do influxo de Ca^{2+}

Este protocolo objetivou avaliar a participação do influxo de Ca^{2+} após a ativação do RyR. Cafeína 10 mM (Mcguire *et al.*, 2002), responsável por liberar Ca^{2+} via RyR, foi utilizada como agente contrátil. Após rápida contração com cafeína em vasos desprovidos de endotélio funcional, a solução fisiológica foi trocada três vezes e, 30 minutos depois da primeira contração, a solução fisiológica foi trocada por solução 0 Ca^{2+} (NaCl 119,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,4; $NaHCO_3$ 14,9; $MgSO_4$ 1,17, glicose 5,5 e EGTA 1 mM), sendo imediatamente realizado um estímulo contrátil com cafeína (10 mM).

4.3.4 Avaliação da participação dos canais $Ca_v1.2$, TRPs e NCX

Diferentes agentes farmacológicos foram utilizados a fim de se investigar o envolvimento do influxo de Ca^{2+} por meio dos principais canais para Ca^{2+} da MP, tais como: $Ca_v1.2$, TRPs e NCX. Após contrair as artérias mesentéricas com cafeína (10 mM) em vasos desprovidos de endotélio funcional, a solução fisiológica foi trocada três vezes. Em seguida, aguardou-se 15 minutos para o preenchimento do RS com Ca^{2+} . Posteriormente, o anel vascular foi incubado

por 30 minutos com agentes farmacológicos direcionados aos alvos de interesse. Neste sentido, foram utilizados: nifedipina (10 μ M), bloqueador de $Ca_v1.2$; 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB; 10 μ M), bloqueador de TRPCs; vermelho de rutênio (RuR, *do inglês*, ruthenium red; 10 μ M), bloqueador de TRPV; SKF-96365 (30 μ M), bloqueador de Orai; ou KB-R7943 (10 μ M), bloqueador do modo reverso de NCX. Após o período de incubação, os vasos foram novamente contraídos com cafeína (10 mM), sendo registrada a área sob a curva (AUC) da contração e o pico de tensão.

4.3.5 Avaliação da participação de BK_{Ca}

Este protocolo objetivou avaliar a participação de BK_{Ca} na contração induzida por cafeína. Após rápida contração com cafeína (10 mM), em vasos sem endotélio funcional, a solução fisiológica foi trocada três vezes. Em seguida, o anel vascular foi incubado por 30 minutos com paxilina (1 μ M), bloqueador de BK_{Ca} . Após este período, os vasos foram contraídos novamente com cafeína (10 mM), sendo registrada a AUC e o pico de tensão.

4.4 Avaliação da fluorescência para o Ca^{2+}

4.4.1 – Microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert

A fim de se verificar o papel dos diferentes canais para Ca^{2+} da MP na $[Ca^{2+}]_c$, as artérias mesentéricas de camundongos foram isoladas e colocadas

em solução PSS-HEPES (mM): NaCl 130, HEPES 10, glicose 6, KCl 4, NaHCO₃ 4, CaCl₂ 1,8; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,18 e EDTA 0,03, em pH 7,4 conforme trabalhos anteriores (Syyong *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2016). Após as artérias serem divididas em anéis de cerca de 1,6 a 2 mm de comprimento, estas foram transpassadas por um fio de aço de 40 µm de diâmetro. Estes anéis foram colocados em uma cuba, protegida da luminosidade, contendo Fluo-4AM (comprimentos de onda 494/506 nm) 5 µM com 5 µM de ácido plurônico, diluído em PSS-HEPES durante 45 minutos. Após a incubação, o anel arteriolar foi retirado da cuba e montado em uma placa de montagem. O excesso de sonda foi removido trocando a solução PSS-HEPES duas vezes de 15 em 15 minutos durante 30 minutos. Posteriormente os vasos foram estimulados com cafeína, sendo realizado um registro de 2 minutos após o estímulo.

Em seguida, a solução PSS-HEPES foi trocada a fim de se investigar a participação dos diferentes canais na membrana, sendo utilizado solução PSS-HEPES-0 Ca²⁺ (mM): NaCl 130, HEPES 10, glicose 6, KCl 4, NaHCO₃ 4, MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,18 e EGTA 1 mM, em pH 7,4 ou diferentes bloqueadores, tais como: nifedipina 10 µM, 2-APB 10 µM, RuR 10 µM, SKF-96365 30 µM ou NCX 10 µM. Em seguida os anéis arteriais foram novamente estimulados com cafeína (10 mM) a fim de se avaliar a participação das diferentes estruturas da membrana no influxo de Ca²⁺.

F₀ foi utilizado como fluorescência basal antes do estímulo e F como fluorescência máxima após o estímulo com cafeína (10 mM), obtendo-se (F/F₀).

As imagens da fluorescência para o Ca^{2+} no MLV foram adquiridas com auxílio do microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert objetiva de 40x.

4.4.2 – Microscópio Confocal Yokogawa Spinning Disk

A fim de se investigar a velocidade e amplitude da onda de cálcio, a segunda ramificação das artérias mesentéricas de camundongos C57BL/6J foram dissecadas conforme previamente descrito. Em seguida as artérias foram divididas em anéis de cerca de 2 mm de comprimento e cortadas longitudinalmente com o auxílio de uma micro tesoura. Posteriormente, os anéis foram fixados em uma micro placa de petri, com o auxílio de micro pinos (**Figura 12**). Os vasos foram carregados com Fluo4-AM (5 μM) e ácido plurônico (5 μM) diluído em solução PSS-HEPES por 45 minutos. Após este período, o excesso de sonda foi removido trocando a solução PSS-HEPES duas vezes de 15 em 15 minutos durante 30 minutos. F_0 foi utilizado como fluorescência basal antes do estímulo e F como fluorescência máxima após o estímulo com cafeína (10 mM), obtendo-se (F/F_0) . As imagens foram adquiridas com auxílio do microscópio confocal vertical Yokogawa Spinning Disk, com o auxílio da objetiva de 40x. Por se tratar de um microscópio vertical, o Yokogawa foi essencial para melhor resolução da imagem adquirida, a fim de se distinguir os eventos de Ca^{2+} . As imagens foram analisadas com o auxílio do programa SparkAn, versão 5.5.0.0.e, de Adrian D. Bonev & Mark T. Nelson.

Estes protocolos foram obtidos durante o doutorado sanduíche no exterior no laboratório do professor Mark T. Nelson, no Departamento de Farmacologia da University of Vermont.

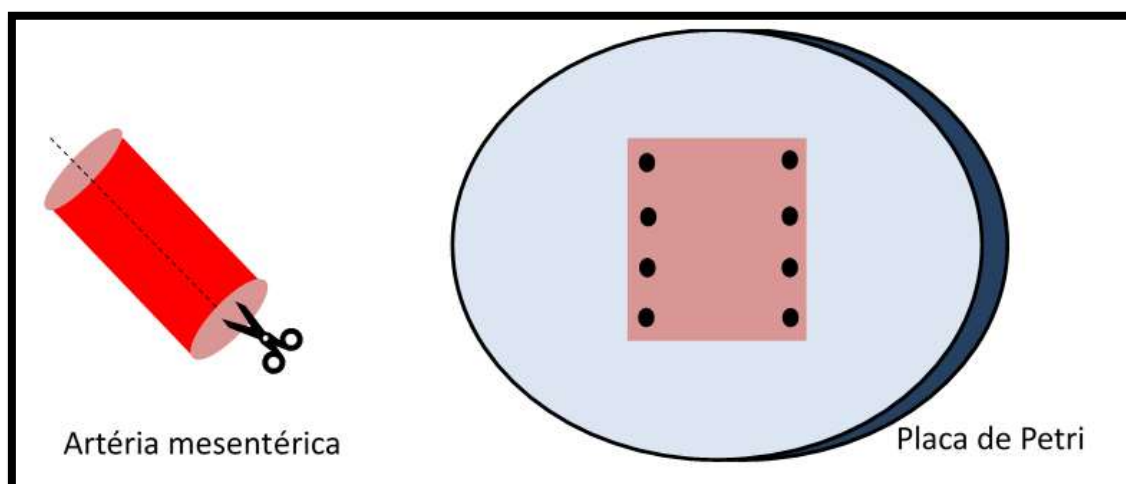


Figura 12: Preparação da artéria mesentérica para microscopia de fluorescência.

4.5 Mensuração do potencial de membrana

A fim de se verificar o potencial de membrana (E_m) das artérias mesentéricas estimuladas com cafeína, estas foram montadas em placa de montagem e mantidas em solução PSS-HEPES, como descrito anteriormente (Garcia *et al.*, 2016). Após divisão das artérias em anéis de cerca de 1,6 a 2 mm de comprimento, estas foram transpassadas por um fio de aço de 40 μM de diâmetro. O endotélio foi gentilmente removido com uma leve fricção do fio de aço no lúmen do vaso. O E_m foi gravado com um microeletrodo de vidro preenchido com KCl 3 M (resistência de 30-50 $\text{M}\Omega$). O microeletrodo foi montado em um micromanipulador (Leitz, Switzerland) e o E_m foi registrado utilizando o

amplificador GeneClamp 500B e digitalizado com o Digidata 1200 (Axon Instruments, U.S.A) (**Figura 13**). O sinal foi monitorado e adquirido no modo de extensão do pClamp6 software. O empalamento foi considerado aceito quando uma repentina mudança no potencial negativo foi mantida constante durante pelo menos 1 min no ponto em que o *Em* ficou estável, e retornou instantaneamente para o nível de voltagem anterior após a retirada do microeletrodo. Os empalamentos foram realizados do lado da adventícia para os experimentos em vasos incubados com *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; 300 μM).

Após o empalamento da célula do MLV, os vasos foram estimulados com cafeína (10 mM), em seguida, a solução PSS-HEPES foi trocada e o vaso foi incubado por 15 minutos com nifedipina 10 μM, 2-APB 10 μM ou paxilina 1 μM. Em seguida os vasos foram novamente estimulados com cafeína a fim de se investigar o envolvimento de Ca_v1.2, TRPCs e BK_{Ca} no *Em* das células do MLV.

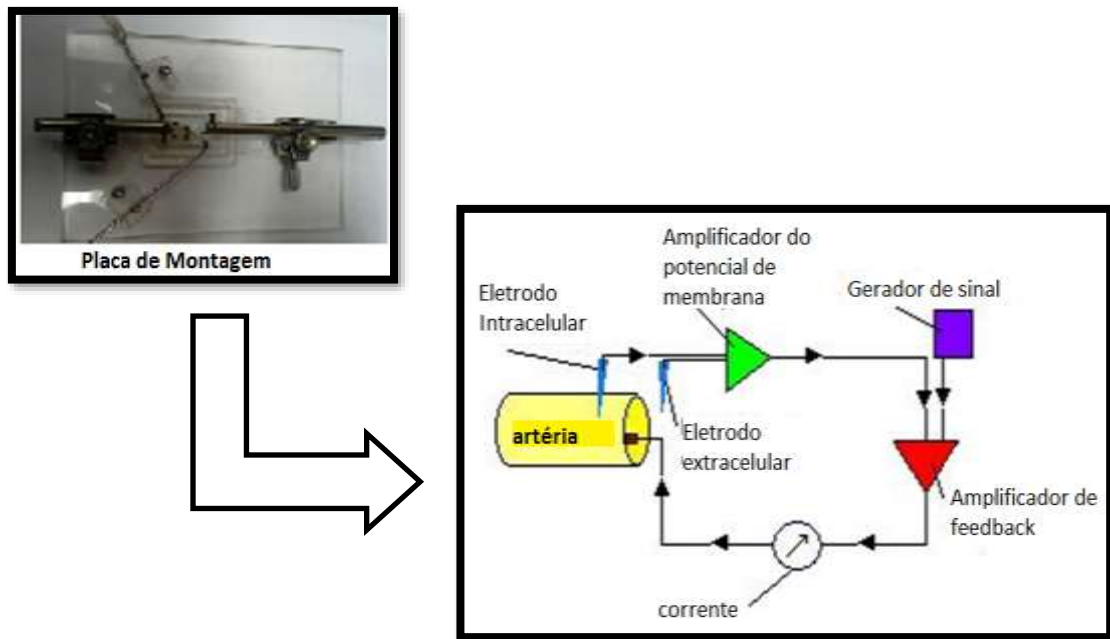


Figura 13: Mensuração do *Em* em artérias de resistência.

4.6 Drogas

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas: 2-APB, acetilcolina, ácido plurônico, cafeína, DOCA, fenilefrina, nifedipina, noradrenalina, paxilina, RuR, SKF-96365, xilazina, KB-R7943 e ketamina foram adquiridas da Sigma-Aldrich. O Fluo4-AM foi adquirido da Thermo Fisher Scientific.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do GraphPad Prism 7, sendo expressos como a média \pm erro padrão da média de 5 experimentos de reatividade vascular e \sim 10 células de 3 animais em experimentos com microscopia de fluorescência. As diferenças foram consideradas significativas

quando $P < 0,05$. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área. Os resultados foram comparados pelo teste-t de Student ou pelo método ANOVA de uma via.

5 RESULTADOS



5.1 PARTE I – O feedback entre TRPs, BK_{Ca} e Ca_v1.2 previne a contração excessiva em resposta a cafeína em artérias mesentéricas de camundongos

5.1.1 A cafeína induz contração transitória dependente do influxo de Ca²⁺.

A fim de se obter um controle de cada vaso, estes foram contraídos duas vezes com cafeína, com intervalo de 30 minutos entre a primeira e a segunda contração (**Figura 14A**).

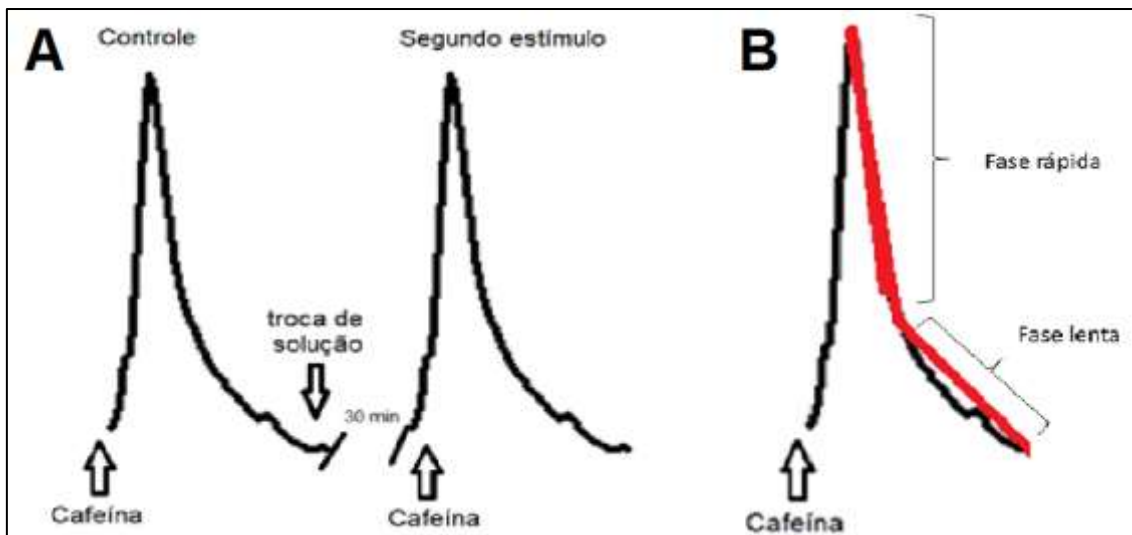


Figura 14: **A.** Contrações transitórias induzidas por cafeína (10 mM) e intervalo entre os estímulos. **B.** Fases rápida e lenta da contração transitória induzida por cafeína.

Cafeína (10 mM) induz contração transitória e aumento da fluorescência para o Ca²⁺ em artérias mesentéricas de camundongos. Neste sentido, os resultados obtidos demonstram que o segundo estímulo contrátil e fluorescente

foi similar ao primeiro (**Figura 15**), demonstrando que não há dessensibilização da maquinaria contrátil após o primeiro estímulo contrátil.

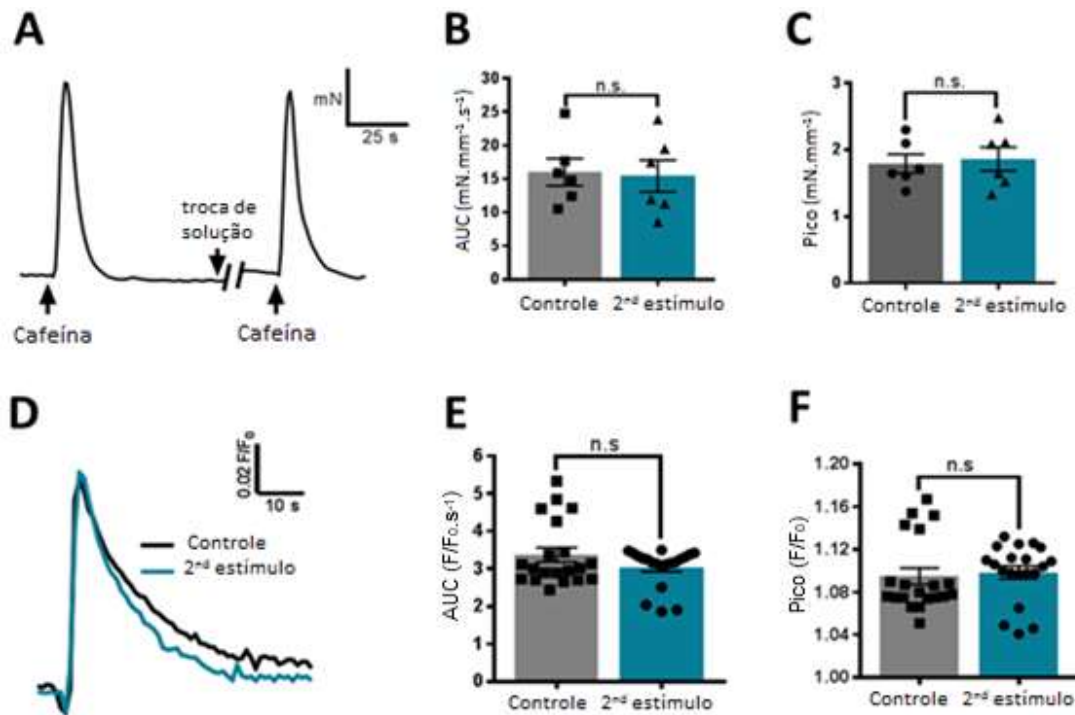


Figura 15: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 6 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico da fluorescência, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 3 camundongos. N.S. – não significativo. Teste-t pareado.

O influxo de Ca^{2+} é fundamental para a contração. O aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzida por fenilefrina, por exemplo, é dependente do influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ e TRPs (Syyong *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2016). A fim de se investigar a participação do influxo de Ca^{2+} na contração transitória das artérias mesentéricas, estas foram estimuladas com cafeína em solução 0 Ca^{2+} . Os resultados obtidos com este protocolo demonstram diminuição da contração e

da fluorescência para o Ca^{2+} (**Figura 16**), constatando a importância do Ca^{2+} e na contração transitória.

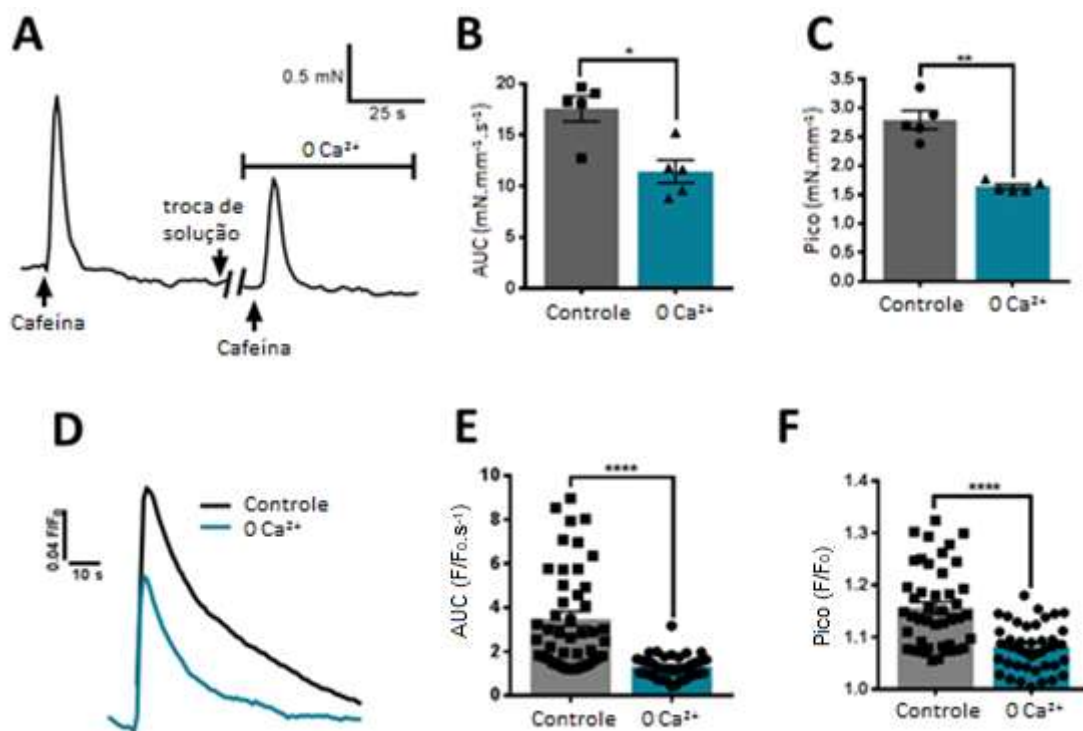


Figura 16: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) em solução 0 Ca^{2+} . A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 5 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico de fluorescência, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 3 camundongos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs controle. Teste-t pareado.

A constante de decaimento (λ) da contração transitória e da fluorescência para o Ca^{2+} induzidas por cafeína, possui uma fase rápida e outra lenta (**Figura 14B**). Análise da λ da fluorescência revela aumento das fases rápida e lenta em

solução 0 Ca²⁺ (**Tabela 3**), indicando redução do tempo de meia vida (t_{1/2}), uma vez que este é inversamente proporcional a λ .

Tabela 3: Fases rápida e lenta da λ da contração e da fluorescência para o Ca²⁺ induzidas por cafeína (10 mM).

CONSTANTE DE DECAIMENTO (λ ; s)					
		Contração		Ca ²⁺ fluorescência	
		Rápida	Lenta	Rápida	Lenta
A	Controle	2.12 ± 0.19	2.35 ± 0.41	2.86 ± 0.43	5.06 ± 0.41
	2ª contração	1.88 ± 0.32	2.5 ± 0.85	2.47 ± 0.42	4.31 ± 0.56
B	Controle	3.23 ± 0.49	3.11 ± 0.57	1.14 ± 0.39	0.78 ± 0.24
	0 Ca ²⁺	3.17 ± 0.70	4.21 ± 0.88	2.99 ± 0.24 ****	1.47 ± 0.12 **
C	Controle	2.49 ± 0.98	2.52 ± 0.99	1.57 ± 0.22	1.67 ± 0.2
	Nifedipina	5.94 ± 1.59	4.95 ± 1.49	2.04 ± 0.39	1.49 ± 0.36
D	Controle	0.49 ± 0.36	5.64 ± 1.08	2.33 ± 1.23	3.49 ± 1.24
	2-APB	1.42 ± 0.16 *	1.64 ± 0.46 **	1.21 ± 0.82	1.54 ± 0.07
E	Controle	0.18 ± 0.01	3.03 ± 1.48	0.44 ± 0.14	2.77 ± 0.65
	RuR	2.93 ± 0.9 *	2.16 ± 0.31	1.86 ± 0.59 **	2.09 ± 0.56
F	Controle	1.83 ± 0.98	3.84 ± 1.37		
	Paxilina	5.99 ± 1.06 *	6.09 ± 0.75		

Regressão não-linear – decaimento exponencial de duas fases seguido de teste-t não pareado.
*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 versus respectivo controle.

5.1.2 Ativação do RyR induz a interação dos canais Ca_v1.2 e BK_{Ca}

A entrada de Ca²⁺ no MLV ocorre principalmente via Ca_v1.2 e canais não operados por voltagem que promovem consequente vasoconstrição (Davis e Hill, 1999). Ao se investigar a participação dos Ca_v1.2, foi possível verificar que seu bloqueio diminui a fluorescência para o Ca²⁺ mas aumenta a contração transitória induzida por cafeína (**Figura 17**).

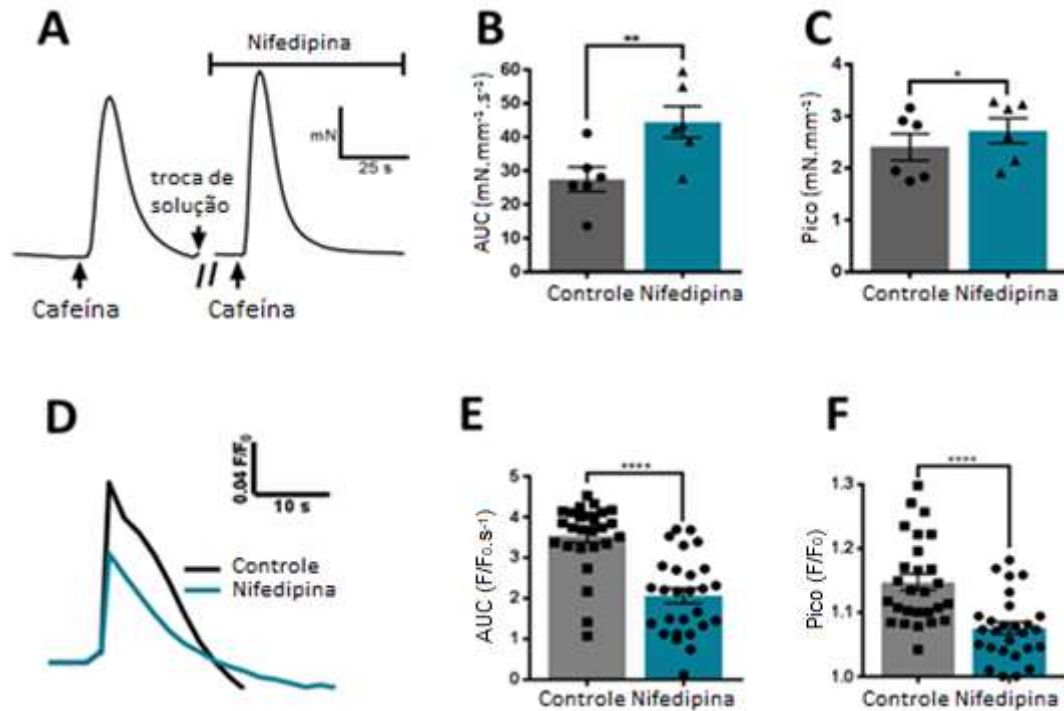


Figura 17: Contração transitória e fluorescência para o Ca²⁺ em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) na presença de nifedipina (10 μM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 6 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico de fluorescência. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 3 camundongos. *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 vs controle. Teste-t pareado.

A ativação de canais K_{Ca} é essencial para a manutenção do potencial de membrana (*E_m*), que é mantido entre -35 e -50 mV no MLV devido à abertura de canais para K⁺ e ação da bomba de Na⁺/K⁺ (Madden e Rusch, 2001). A fim de se verificar a participação de BK_{Ca} em um possível mecanismo de feedback com Cav1.2, os vasos foram incubados com paxilina (1 μM), bloqueador de BK_{Ca}. Na presença de paxilina observa-se o aumento da AUC da contração (**Figura 18**), bem como o ocorrido na presença de nifedipina (bloqueador de Cav1.2).

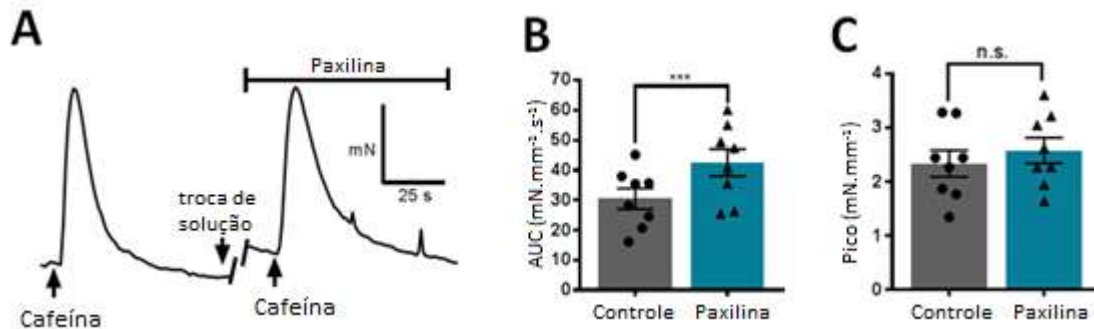


Figura 18: Contração transitória para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) na presença de paxilina (1 μM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 8 camundongos. *** $P < 0.001$ vs controle. N.S – não significativo. Teste-t pareado.

Por meio da técnica de empalamento de célula para mensuração do E_m , foi possível verificar que a hiperpolarização induzida pela liberação de Ca^{2+} via RyR é abolida na presença de nifedipina ou paxilina (**Figura 19A e B**), indicando a participação dos canais $\text{Ca}_v1.2$ e BK_{Ca} em um mecanismo de crosstalk para um feedback negativo da contração.

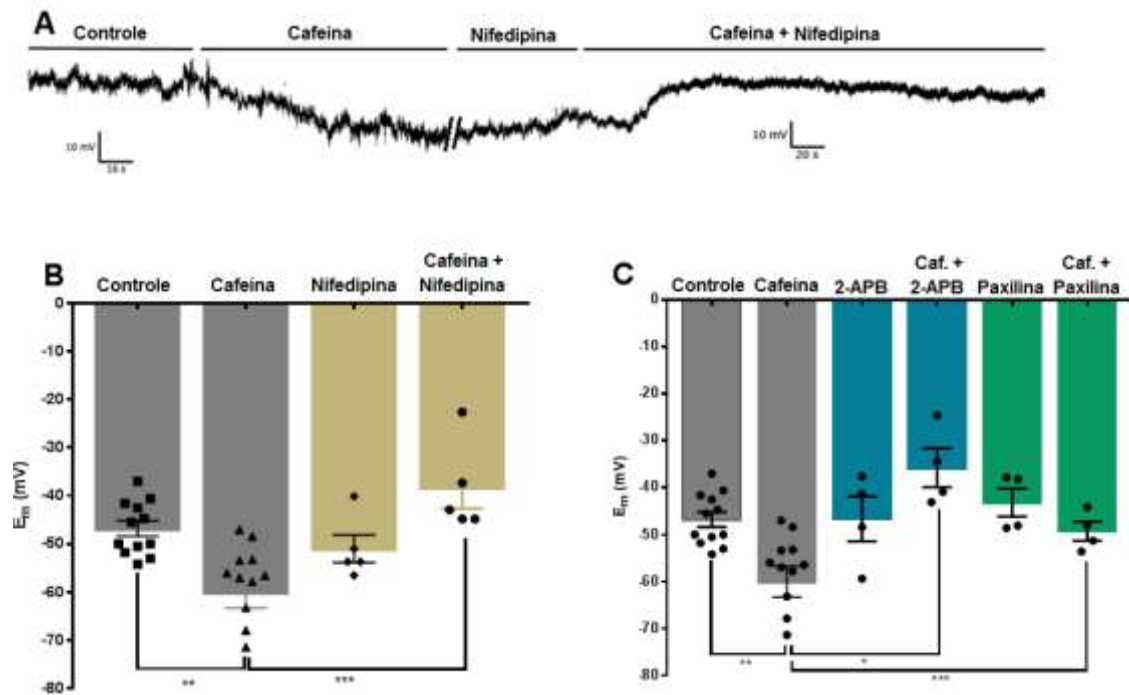


Figura 19: *Em* na presença de cafeína ou cafeína + nifedipine, paxilina ou 2-APB. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ANOVA de uma via. Os resultados representam a média \pm SEM de 4 animais.

5.1.3 A contração transitória induzida por cafeína induz a ativação de TRPs

Os TRPs estão presentes nas células como canais catiônicos não-seletivos e desempenham importante papel na regulação da contração do MLV. O bloqueador de TRP, 2-APB (10 μ M), reduz a fluorescência para o Ca^{2+} e aumenta a contração transitória induzida por cafeína (**Figura 20**). Análises do *Em* demonstram que na presença de 2-APB, a hiperpolarização dependente de cafeína é bloqueada em artérias de camundongo (**Figura 19C**). Da mesma forma, RuR (10 μ M), outro bloqueador de TRPs, reduz a fluorescência para o Ca^{2+} enquanto aumenta a AUC da contração (**Figura 21**).

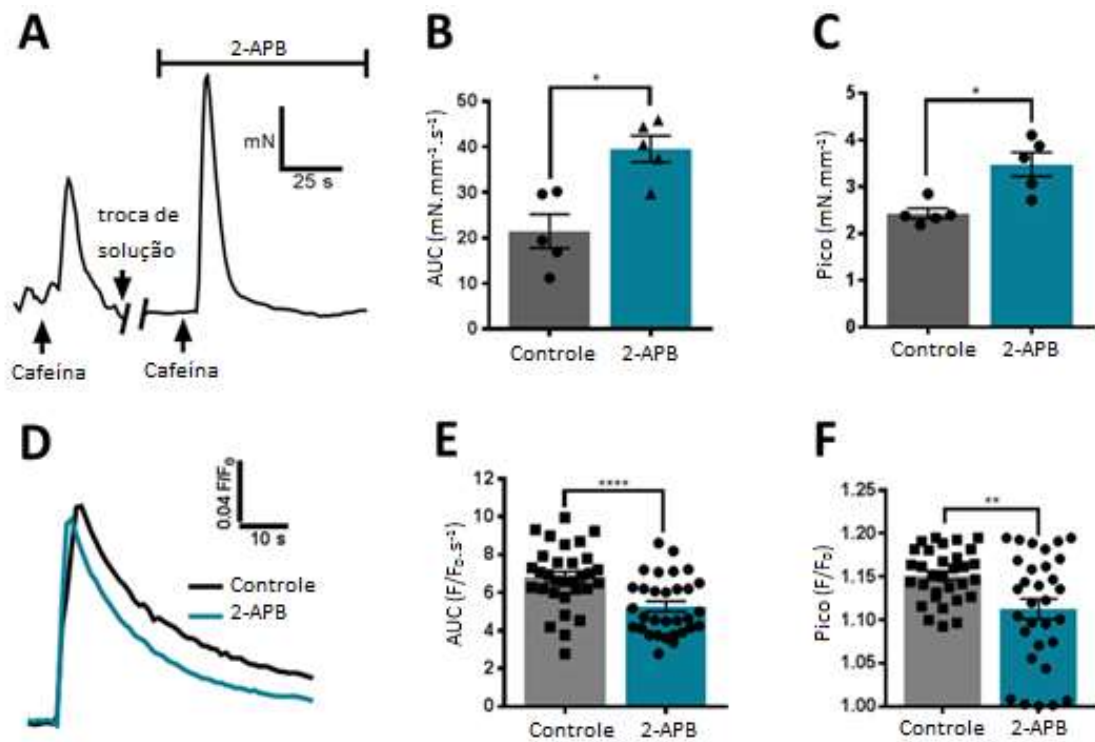


Figura 20: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) na presença de 2-APB (10 μM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 5 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico de fluorescência. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 3 camundongos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs controle. Teste-t pareado.

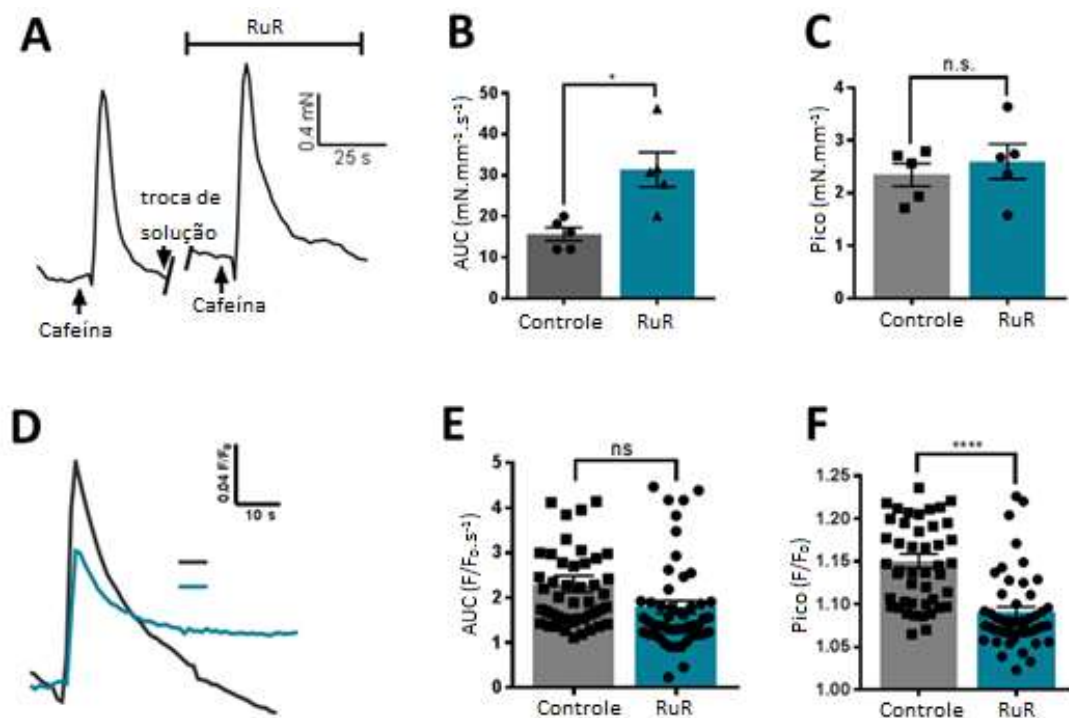


Figura 21: Contração transitória e fluorescência para o Ca²⁺ em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) na presença de RuR (10 μM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 5 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico de fluorescência. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 3 camundongos. *P<0.05, ****P<0.0001 *versus* controle. N.S. – não significativo. Teste-t pareado.

O sistema STIM-Orai é de fundamental importância para o preenchimento do RS. Neste sentido, SKF-96365, bloqueador de Orai, foi utilizado para investigar a participação deste canal. SKF-96365 (30 μM), abole a contração e reduz a fluorescência para o Ca²⁺ em estímulo a cafeína em artérias mesentéricas de camundongos (**Figura 22**).

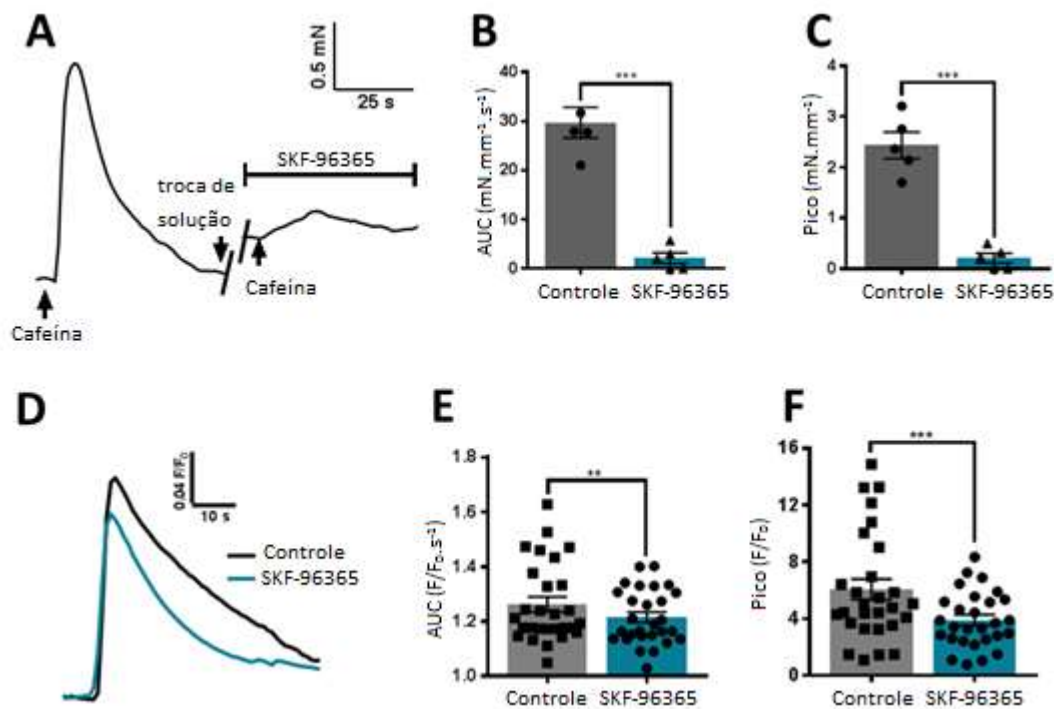


Figura 22: Contração transitória e fluorescência para o Ca²⁺ em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) na presença de SKF-96365 (30 μM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 5 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico de fluorescência. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 3 camundongos. **P<0.01, ***P<0.001 versus controle. Teste-t pareado.

5.1.4 O modo reverso do NCX colabora para a contração induzida por cafeína

O influxo de Na⁺ via TRPs colabora para que NCX inverta o seu modo de operação (entrada de Ca²⁺ e saída de Na⁺) e contribua para o preenchimento do RS (Poburko *et al.*, 2008). Na presença de KB-R7943 (10 μM), bloqueador do modo reverso de NCX, ocorreu redução da contração e da fluorescência para o

Ca²⁺ (**Figura 23**). Estes resultados sugerem a ativação do modo reverso de NCX na contração transitória estimulada por cafeína.

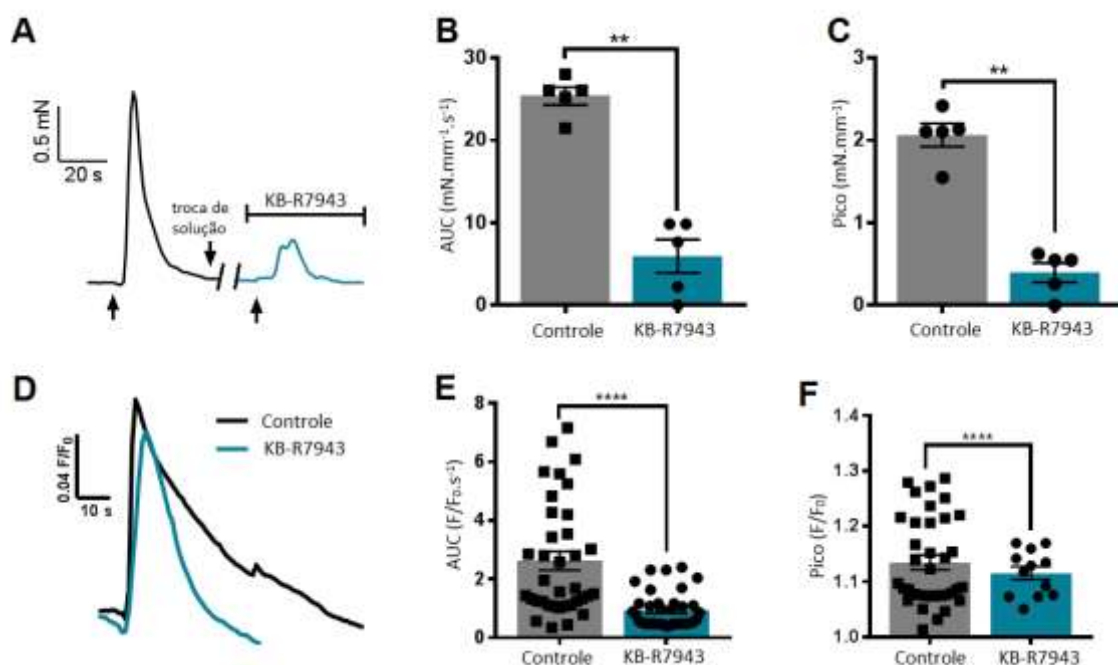


Figura 23: Contração transitória e fluorescência para o Ca²⁺ em artérias mesentéricas de camundongos estimuladas com cafeína (10 mM) na presença de KB-R7943 (10 μM). A-C mostram o traçado, AUC e pico de tensão da contração, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 5 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico de fluorescência. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de 3 camundongos. **P<0.01, **** P<0.0001 *versus* controle. Teste-t pareado.

5.1.5 Avaliação da velocidade da onda de Ca²⁺ perto da MP

Com o auxílio do microscópio confocal vertical, foi possível diferenciar os eventos de Ca²⁺ localizados próximo da MP plasmática ou no citosol (**Figura**

24). Os resultados obtidos demonstram que a velocidade da onda de Ca^{2+} e o pico da fluorescência é maior perto da MP.

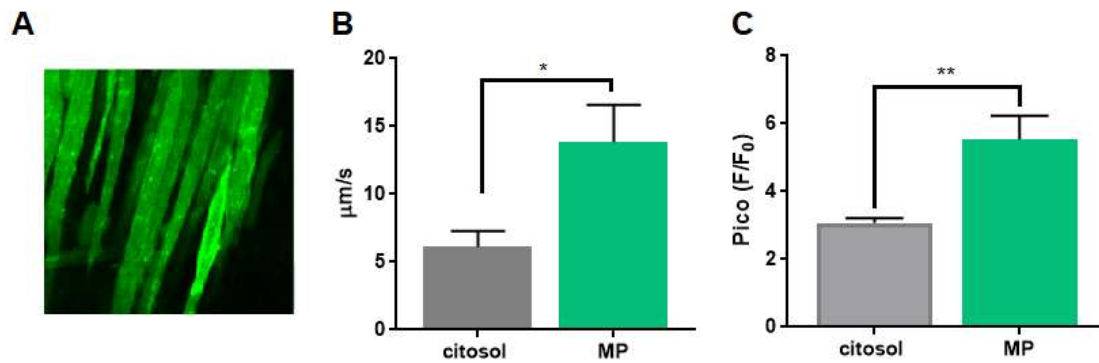


Figura 24: Velocidade da onda de Ca^{2+} perto da MP vs profundamente no citosol. A- figura representativa de célula estimulada em que se pode diferenciar o Ca^{2+} perto da MP. B – velocidade da onda de Ca^{2+} e C- pico de fluorescência em célula estimulada com cafeína. * $p < 0,05$ e ** $P < 0,01$ versus Ca^{2+} no citosol.

5.2 PARTE II – Alterações induzidas pela hipertensão arterial em artérias mesentéricas de camundongos.



5.2.1 – A hipertensão arterial promove a perda do feedback negativo entre TRP-Cav-BK_{Ca} channel.

As artérias mesentéricas de camundongos hipertensos (DOCA-Salt) e normotensos (SHAM) foram submetidas a protocolos similares aos citados anteriormente. A **figura 25** mostra os dados da PA do grupo SHAM e DOCA-Sal.

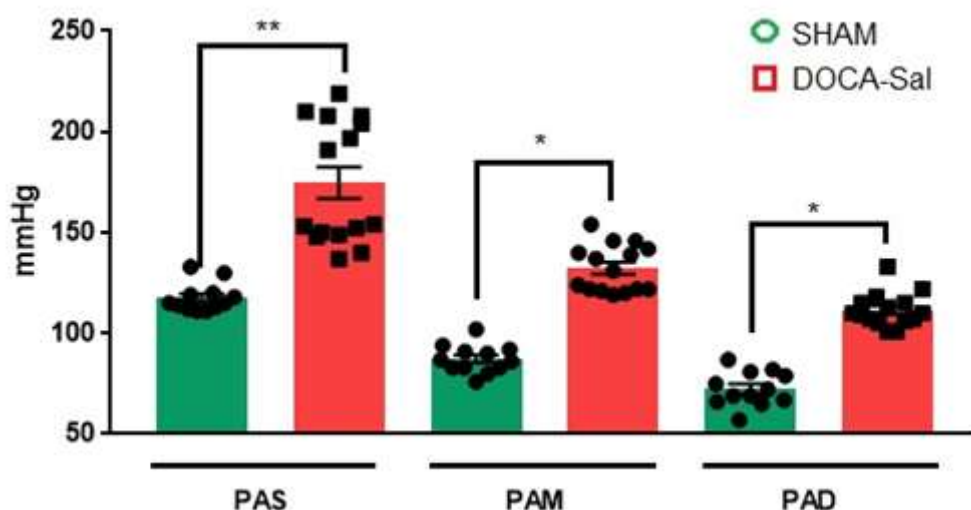


Figura 25: Gráfico das variações de PAS (pressão arterial sistólica), PAM (pressão arterial média) e PAD (pressão arterial diastólica) obtidas em camundongos SHAM e DOCA-Sal pelo método de pletismografia de cauda.

O segundo estímulo contrátil induzido por cafeína (10 mM) foi semelhante ao primeiro em ambos os grupos. Entretanto, ocorreu redução do pico de fluorescência após o segundo estímulo (**Figura 26**), indicando

dessensibilização da resposta ao Ca^{2+} em hipertensos. Todavia, o Ca^{2+} liberado no segundo estímulo induzido por cafeína foi suficiente para que a contração fosse similar a primeira.

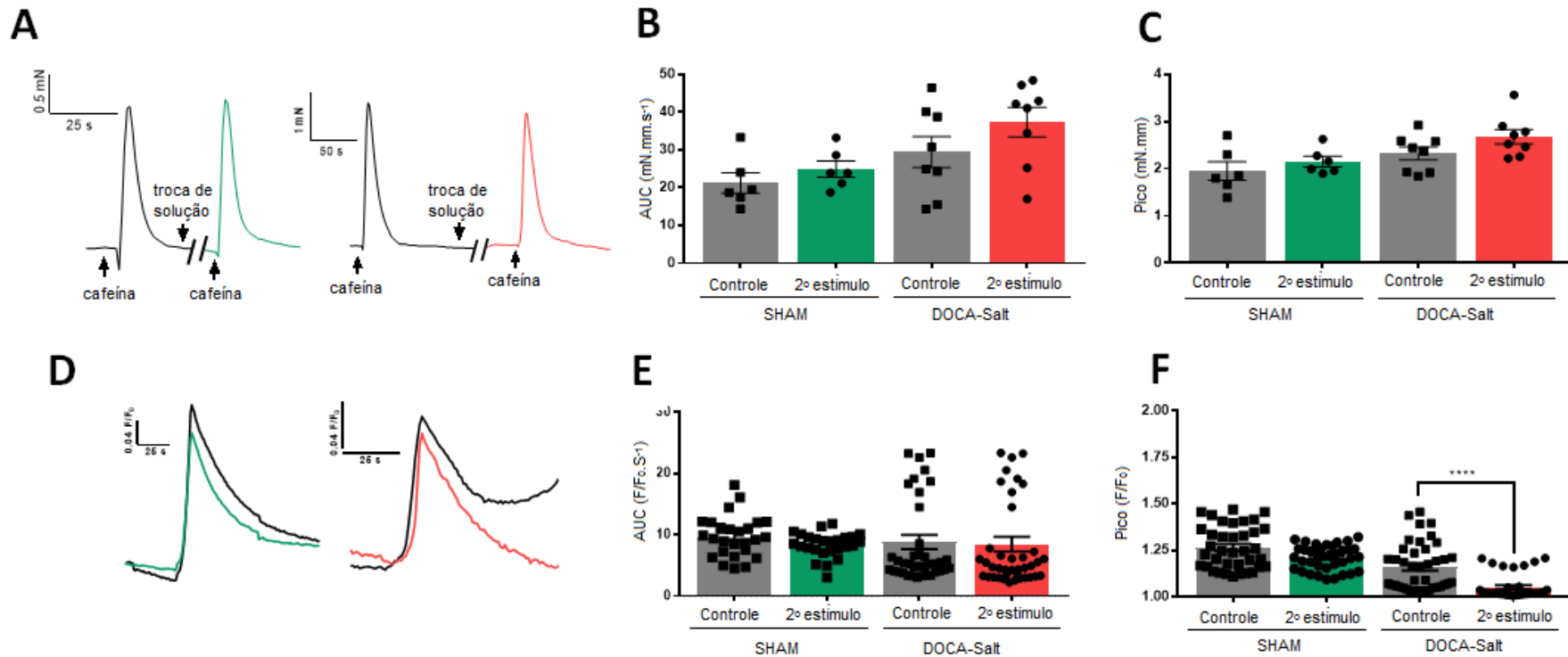


Figura 26: Contração transitória e fluorescência para o Ca^{2+} estimuladas por cafeína em anéis de artéria mesentérica de camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal). A-C mostram o traçado representativo, AUC e pico de contração, respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de pelo menos 6 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico da fluorescência para o Ca^{2+} . Dados são representados pela média \pm erro padrão da média de 3 camundongos. **** $P < 0.0001$ versus controle. ANOVA de uma via.

Para avaliar a participação do Ca^{2+}_e na contração de artérias mesentéricas de camundongos hipertensos, a solução fisiológica foi trocada antes do segundo estímulo contrátil. Em solução 0 Ca^{2+} a contração transitória e a fluorescência são reduzidas em ambos os grupos (**Figura 27**), indicando participação do influxo do Ca^{2+} em artérias de normotensos e hipertensos.

Neste sentido, a fim de se verificar a participação do influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ em artérias mesentéricas de camundongos hipertensos, os vasos foram incubados com nifedipina (10 μM). Contudo, o bloqueio de $\text{Ca}_v1.2$ não induz aumento da contração transitória, apesar de haver diminuição da fluorescência para o Ca^{2+} (**Figura 28**). Estes resultados indicam ausência do envolvimento funcional dos canais $\text{Ca}_v1.2$ no mecanismo fino de regulação das artérias mesentéricas de camundongos hipertensos. Sugerindo perda do mecanismo de crosstalk entre $\text{Ca}_v1.2$ - BK_{Ca} em hipertensos.

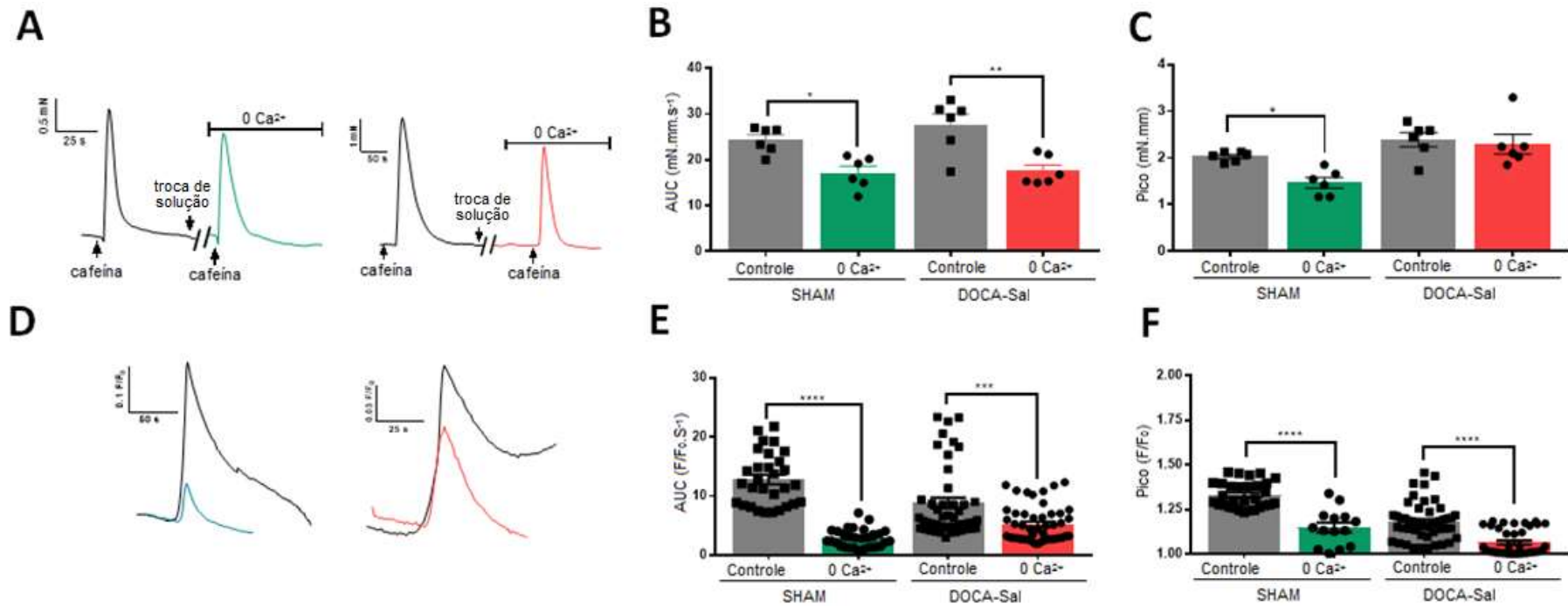


Figura 27: Contração transitória e fluorescência para o Ca²⁺ estimuladas por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) em solução 0 Ca²⁺. A-C mostram o traçado representativo, AUC e pico de contração, respectivamente. Os resultados são representados pela média ± erro padrão da média de 6 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico da fluorescência para o Ca²⁺. Dados são representados pela média ± erro padrão da média de 3 camundongos. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001 *versus* controle. ANOVA de uma via.

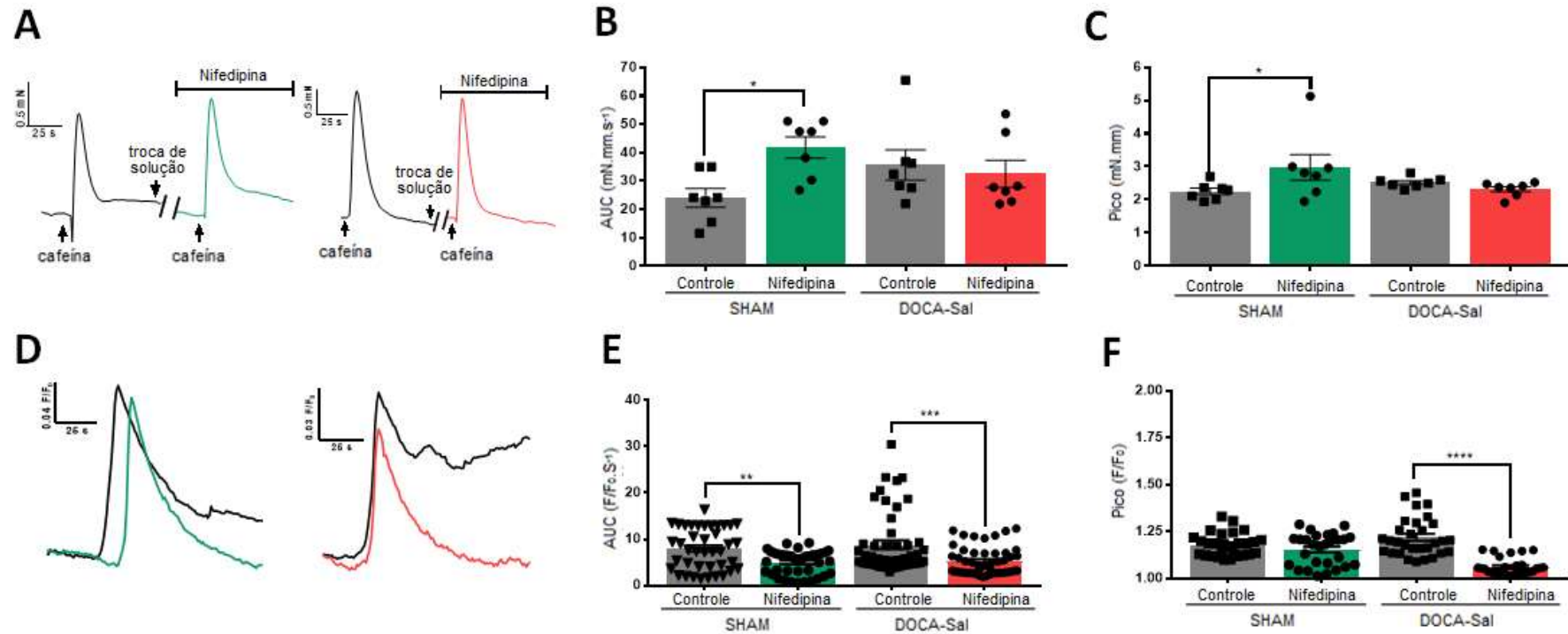


Figura 28: Contração transitória e fluorescência para o Ca²⁺ estimuladas por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de nifedipina (10 μM). A-C mostram o traçado representativo, AUC e pico de contração, respectivamente. Os resultados são representados pela média ± erro padrão da média de 7 camundongos. D-F mostram o traçado, AUC e pico da fluorescência para o Ca²⁺. Dados são representados pela média ± erro padrão da média de 3 camundongos. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001 versus controle. ANOVA de uma via.

Tendo em vista que os resultados obtidos com o bloqueio de $Ca_v1.2$ em camundongos hipertensos sugerem a perda do crosstalk com BK_{Ca} , os vasos foram incubados com paxilina (1 μM). Neste sentido, é possível observar que paxilina não altera a contração transitória induzida por cafeína (**Figura 29**). Estes resultados demonstram ausência do crosstalk entre $Ca_v1.2$ e BK_{Ca} para prevenir a contração excessiva em hipertensos. Além disso, na presença do bloqueador de TRPC, 2-APB, também não se observa alteração da contração em artérias de camundongos hipertensos (**Figura 30**).

A sinalização aumentada de STIM1/Orai representa um mecanismo para o aumento da ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} em artérias de animais hipertensos. Neste sentido, artérias mesentéricas de camundongos hipertensos e normotensos foram incubadas com SKF-96365 (30 μM). Os resultados obtidos demonstram a redução da contração em artérias de normotensos e hipertensos estimulados com cafeína (**Figura 31**).

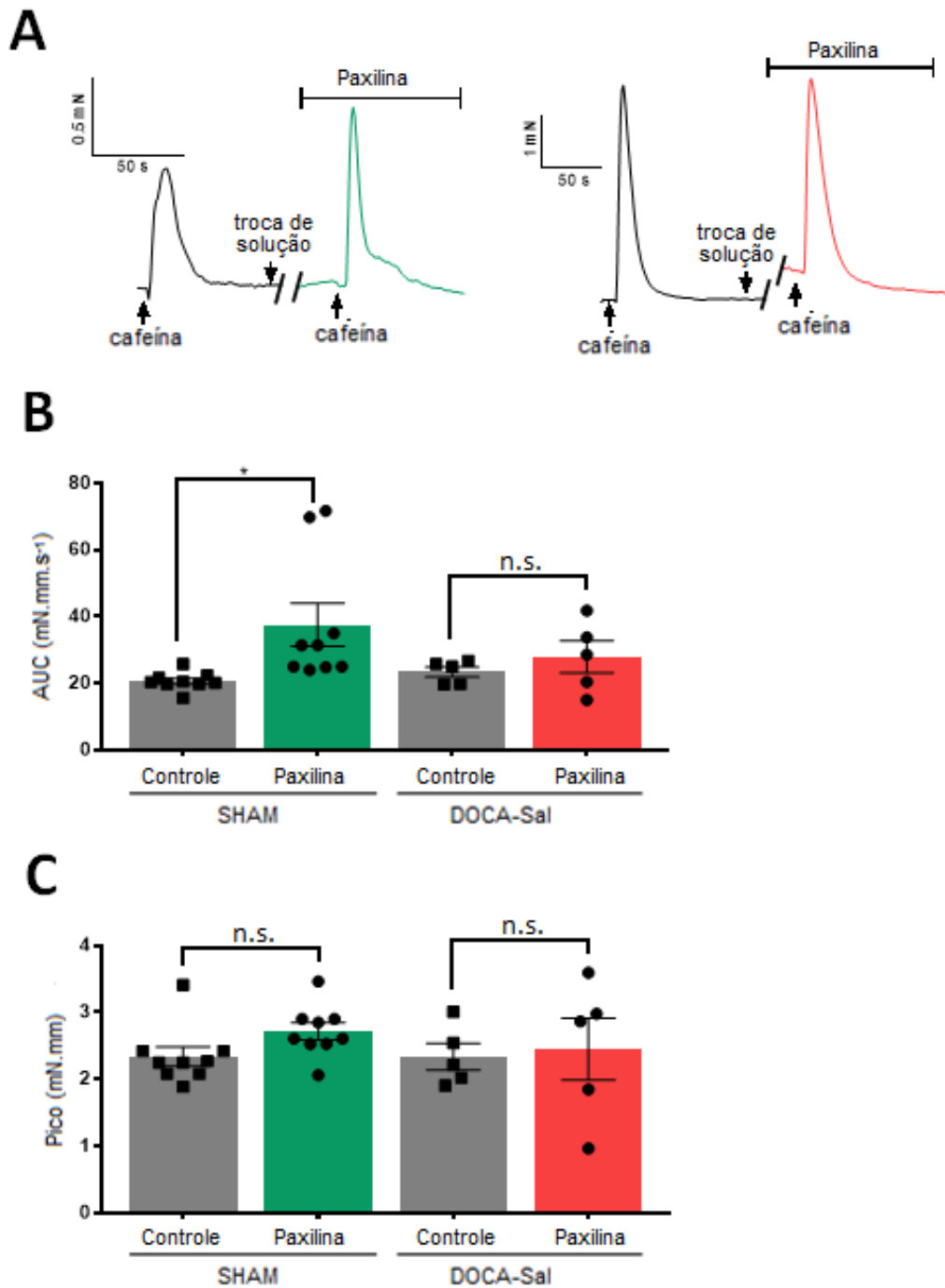


Figura 29: Contração transitória estimulada por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de paxilina. A-C mostram o traçado representativo, AUC e pico de contração, respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 9 camundongos SHAM e 5 DOCA-Sal. * $P < 0.05$ versus controle. ANOVA de uma via.

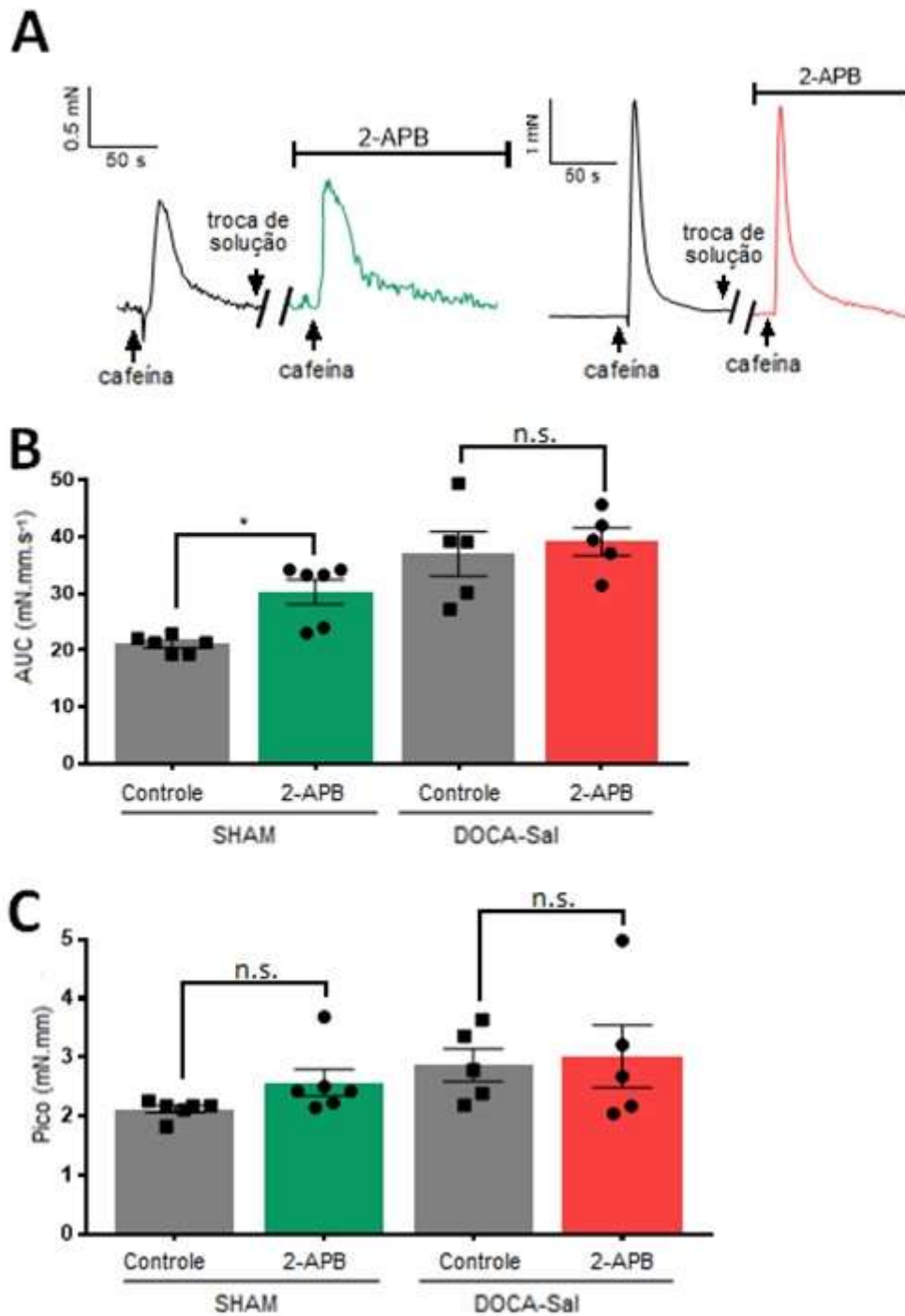


Figura 30: Contração transitória estimulada por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de 2-APB. A-C mostram o traçado representativo, AUC e pico de contração, respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de pelo menos 5 camundongos. * $P < 0.05$ versus controle. ANOVA de uma via.

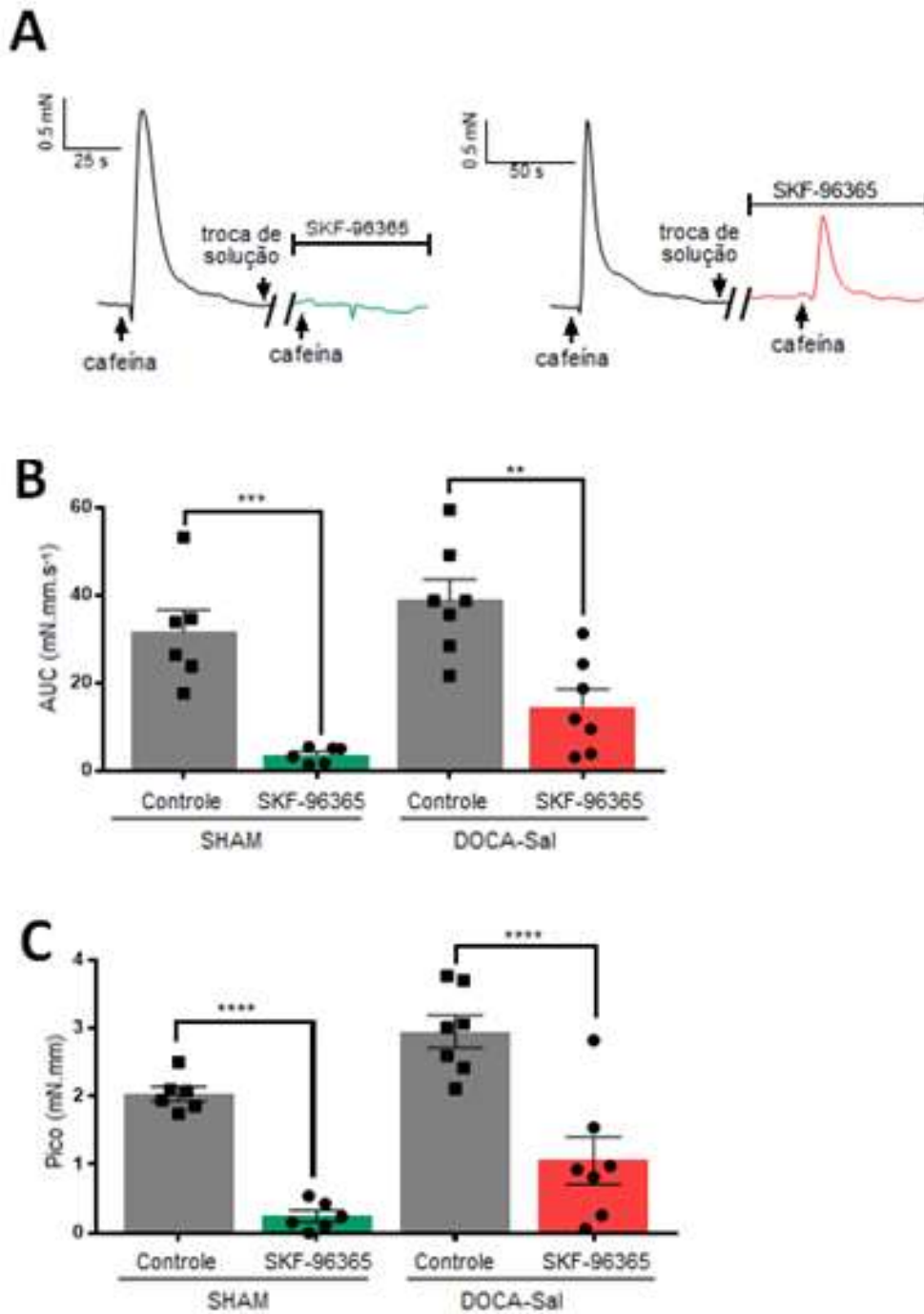


Figura 31: Contração transitória estimulada por cafeína em camundongos normotensos (sham) e hipertensos (DOCA-Sal) na presença de SKF-96365. A-C mostram o traçado representativo, AUC e pico de contração, respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 6 camundongos SHAM e 7 DOCA-Sal. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ versus controle. ANOVA de uma via.

5.3 PARTE III – ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA HIPERTENSÃO ARTERIAL EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE HUMANOS.



Como descrito anteriormente, o mecanismo de crosstalk entre TRPs-Cav1.2-BK_{Ca} encontrado em camundongos é essencial no feedback negativo da contração induzida por cafeína. Contudo, este mecanismo está prejudicado em camundongos hipertensos. Neste sentido, a fim de se verificar a transposição dos resultados para artérias de humanos, protocolos semelhantes aos realizados em camundongos foram aplicados nas artérias mesentéricas de humanos hipertensos e normotensos. A **tabela 4** mostra os dados dos pacientes utilizados neste trabalho.

Tabela 4: Dados dos pacientes utilizados neste estudo.

	Normotensos	Hipertensos	Valores de referência
Nº de pacientes	22	22	–
Masculino	12	10	–
Feminino	10	12	–
Idade	53,05 ± 3,17	65,09 ± 2,23	–
Pressão Sistólica	114,7 ± 1,42	134,1 ± 4,47	120 mmHg
Pressão Diastólica	74,27 ± 1,47	83,86 ± 2,41	80 mmHg
Creatinina	0,74 ± 0,055	1,18 ± 0,17	0.5-1.2 mg/dl
Ureia	25,31 ± 2,21	50,45 ± 7,41	15-43 mg/dl
Sódio	138,4 ± 2,12	141,7 ± 0,67	137-145mg/dl
Potássio	4,047 ± 0,13	4,345 ± 0,18	3.5 - 5.1 mg/dl
IMC	25,4 ± 1,19	26,07 ± 1,24	<18,5 e > 25,0
Frequência Cardíaca	81,19 ± 1,836	80,82 ± 1,891	60- 80 bpm
Glicose	112,9 ± 12,21	112,1 ± 6,02	69-99 mg/dl
Dislipidemia	1	7	–
Tabagismo	7	5	–
Etilismo	4	4	–
MEDICAMENTOS			
Inibidores da ECA	–	7	–
Diuréticos	–	11	–
Bloqueadores de Canais para Ca²⁺	–	2	–
β-Bloqueador	–	5	–
Antagonista do AT1R	–	7	–
Simpatomimético de Ação Central	–	3	–

O segundo estímulo contrátil induzido por cafeína (10 mM) é semelhante ao primeiro em ambos os grupos, normotensos e hipertensos (**Figura 32**). Em solução 0 Ca²⁺, a contração transitória é reduzida (**Figura 33**). Ao se avaliar a participação de Cav1.2, é possível observar que o seu bloqueio induz o aumento da contração em normotensos, mas não altera a contração das artérias mesentéricas de humanos hipertensos (**Figura 34**). Além disso, as artérias mesentéricas de humanos hipertensos demonstram ter perda do mecanismo de

feedback negativo da contração existente em normotensos, uma vez que não há aumento da contração transitória na presença de paxilina em artérias de humanos hipertensos (**Figura 35**).

Ao se investigar a participação dos TRPs na contração induzida pela liberação de Ca^{2+} via RyR, observa-se que 2-APB e RuR, não alteram a contração induzida pela liberação de Ca^{2+} dos estoques (**Figuras 36 e 37**), ao contrário do que ocorre em murinos. Estes resultados sugerem a ausência do envolvimento funcional dos TRPs no mecanismo de feedback negativo com BK_{Ca} em artérias de humanos normotensos e hipertensos.

Ao se avaliar o envolvimento dos canais Orai nas artérias mesentéricas, é possível verificar que a contração transitória induzida por cafeína é reduzida em ambos os grupos na presença de SKF-96365 (**Figura 38**). Por outro lado, o bloqueio do modo reverso de NCX com KB-R7943 não reduziu a contração em anéis arteriais de mesentéricas humanas. Contudo, ocorreu aumento do pico de tensão da contração em humanos hipertensos (**Figura 39**).

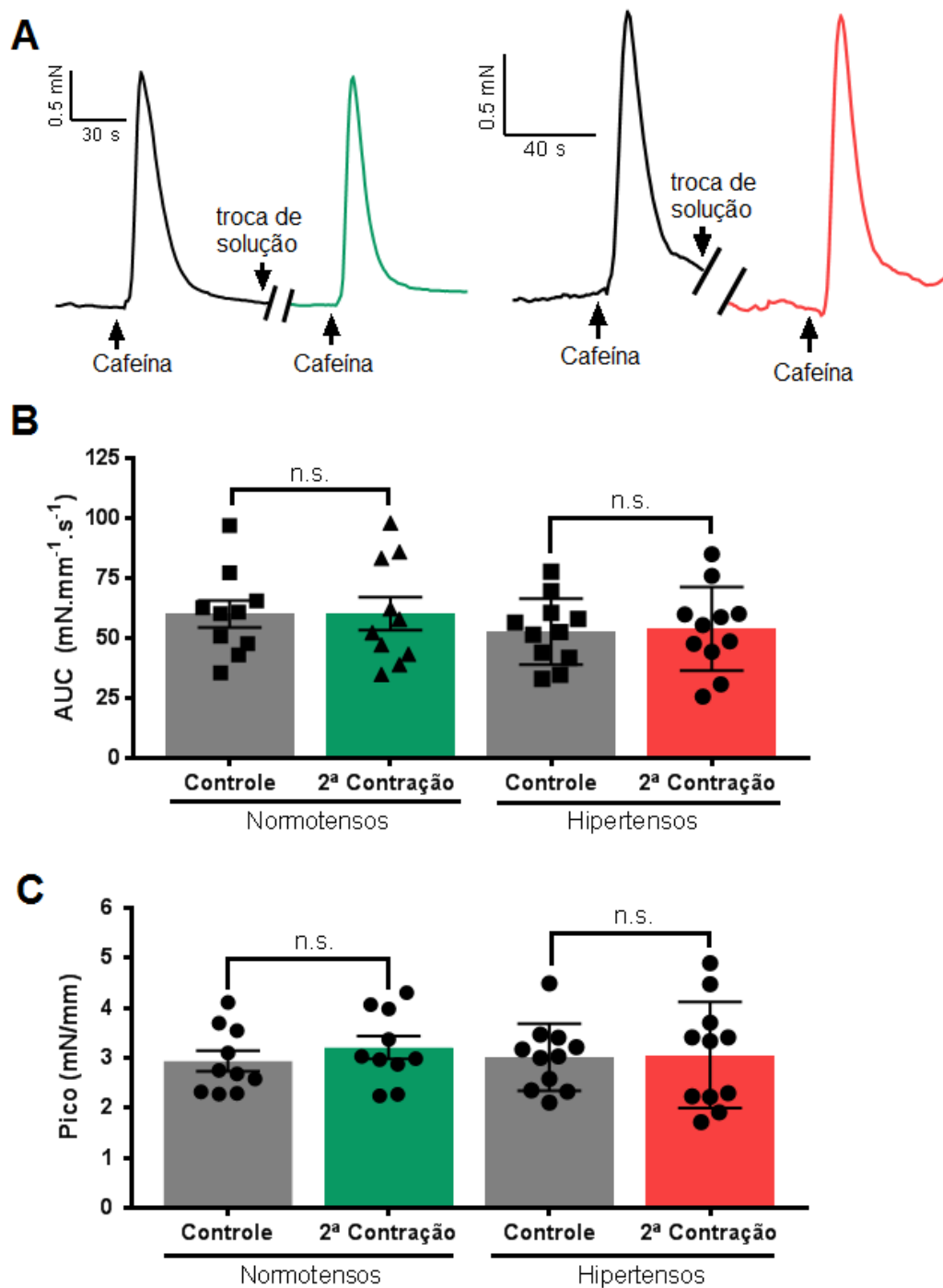


Figura 32: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos. Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 10 pacientes normotensos 11 hipertensos. N.S. – Não significativo. ANOVA de uma via.

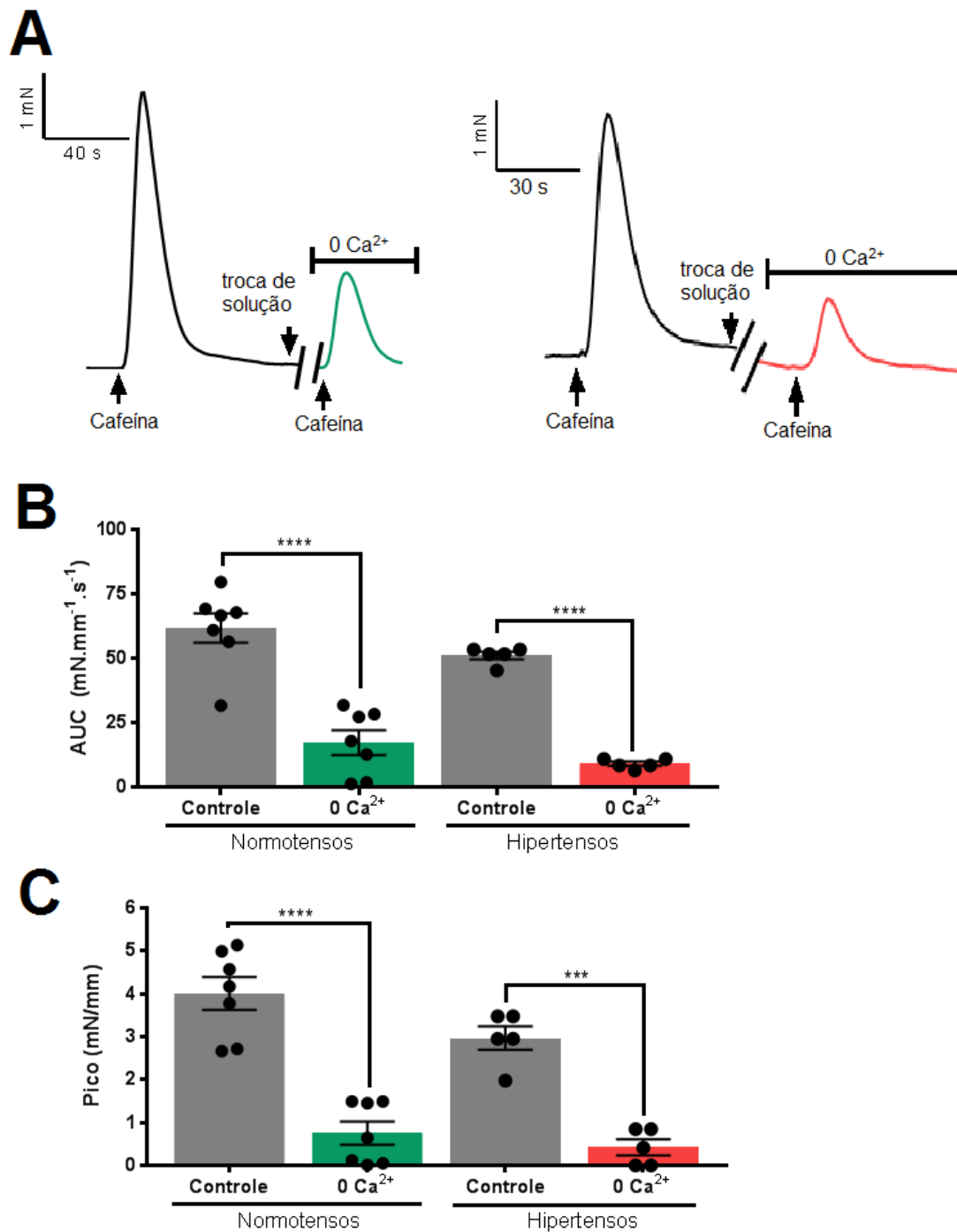


Figura 33: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos em solução 0 Ca²⁺. Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média ± erro padrão de 7 pacientes normotensos e 5 pacientes hipertensos. ***P<0.001, ****P<0.0001 versus controle. ANOVA de uma via.

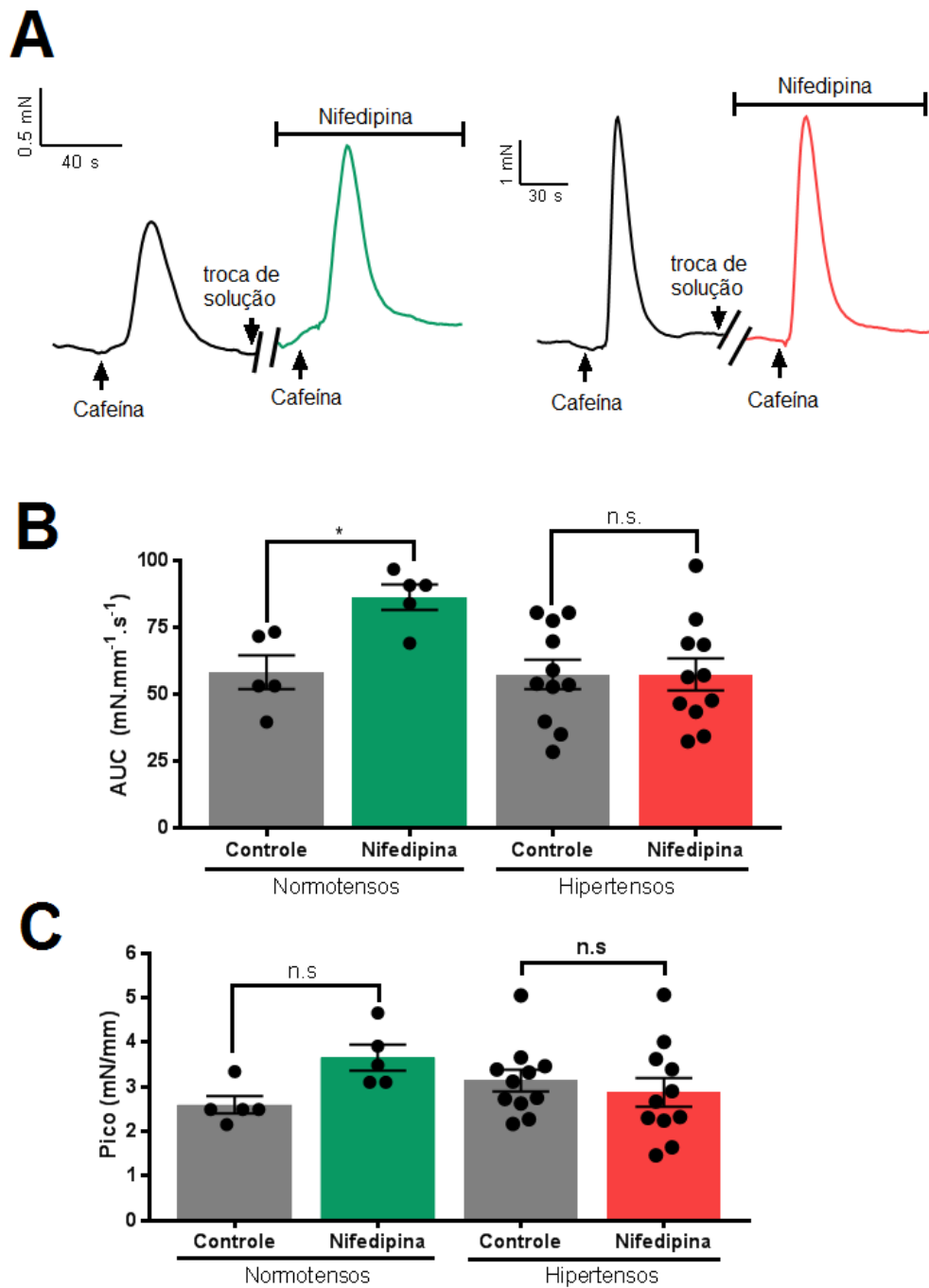


Figura 34: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de nifedipina. Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 5 pacientes normotensos e 11 pacientes hipertensos. * $P < 0.05$ versus controle. N.S. – Não significativo. ANOVA de uma via.

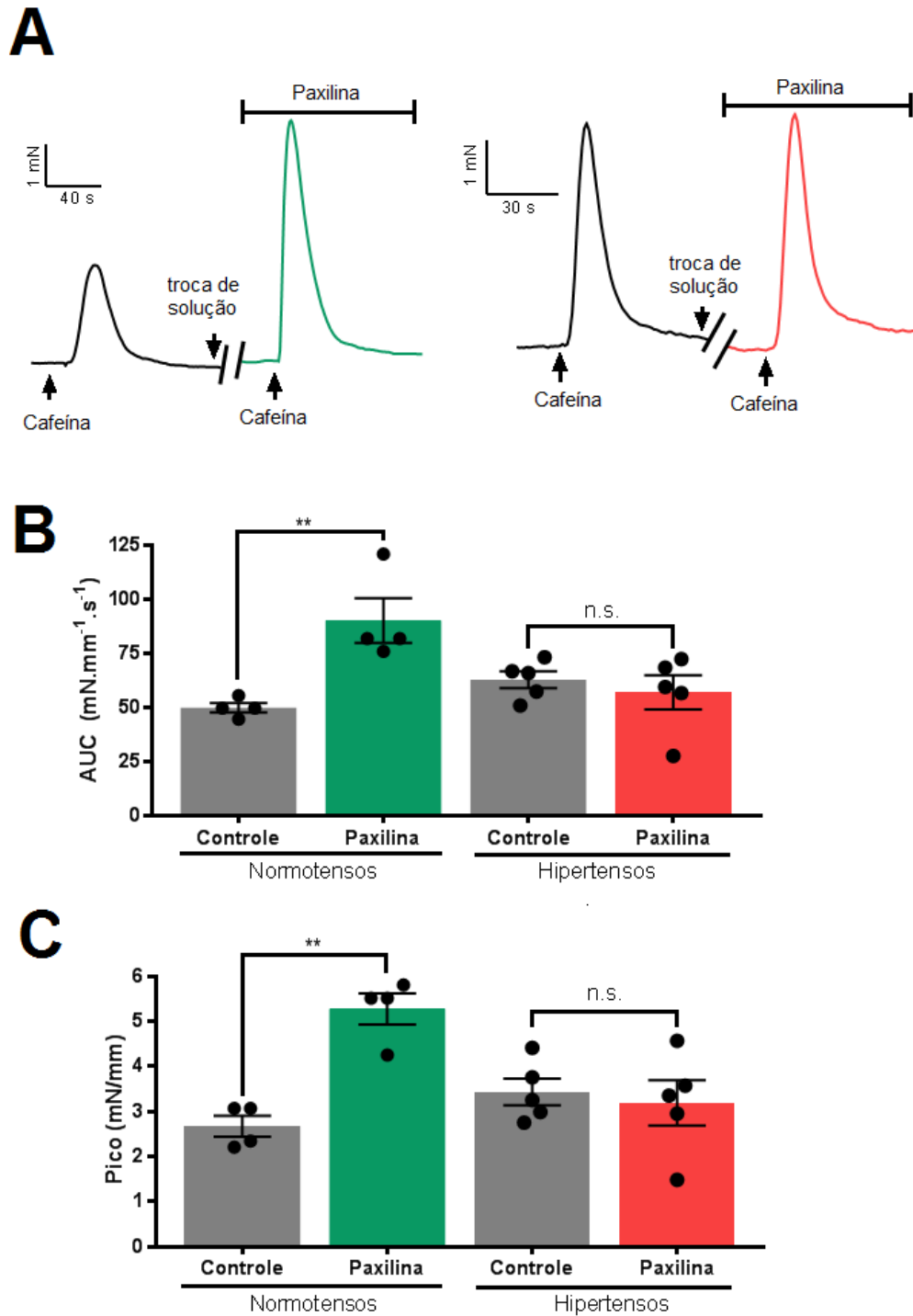


Figura 35: Contração transitória em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de paxilina (1 μ M). Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 4 pacientes normotensos e 5 pacientes hipertensos. ** $P < 0.01$ versus controle. N.S.- Não significativo. ANOVA de uma via.

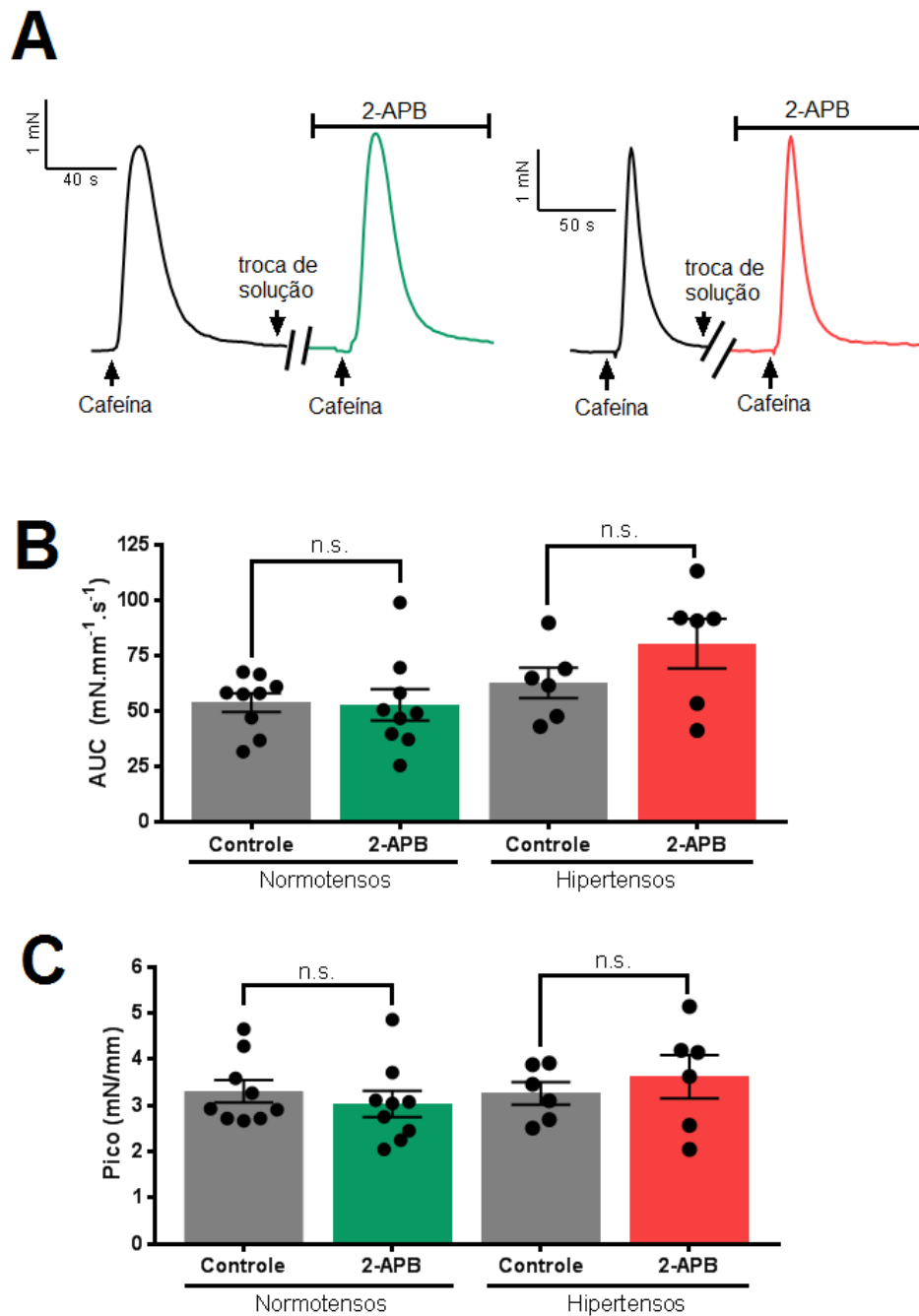


Figura 36: Contração transitória em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de 2-APB. Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 9 pacientes normotensos e 6 hipertensos. N.S.- Não significativo. ANOVA de uma via.

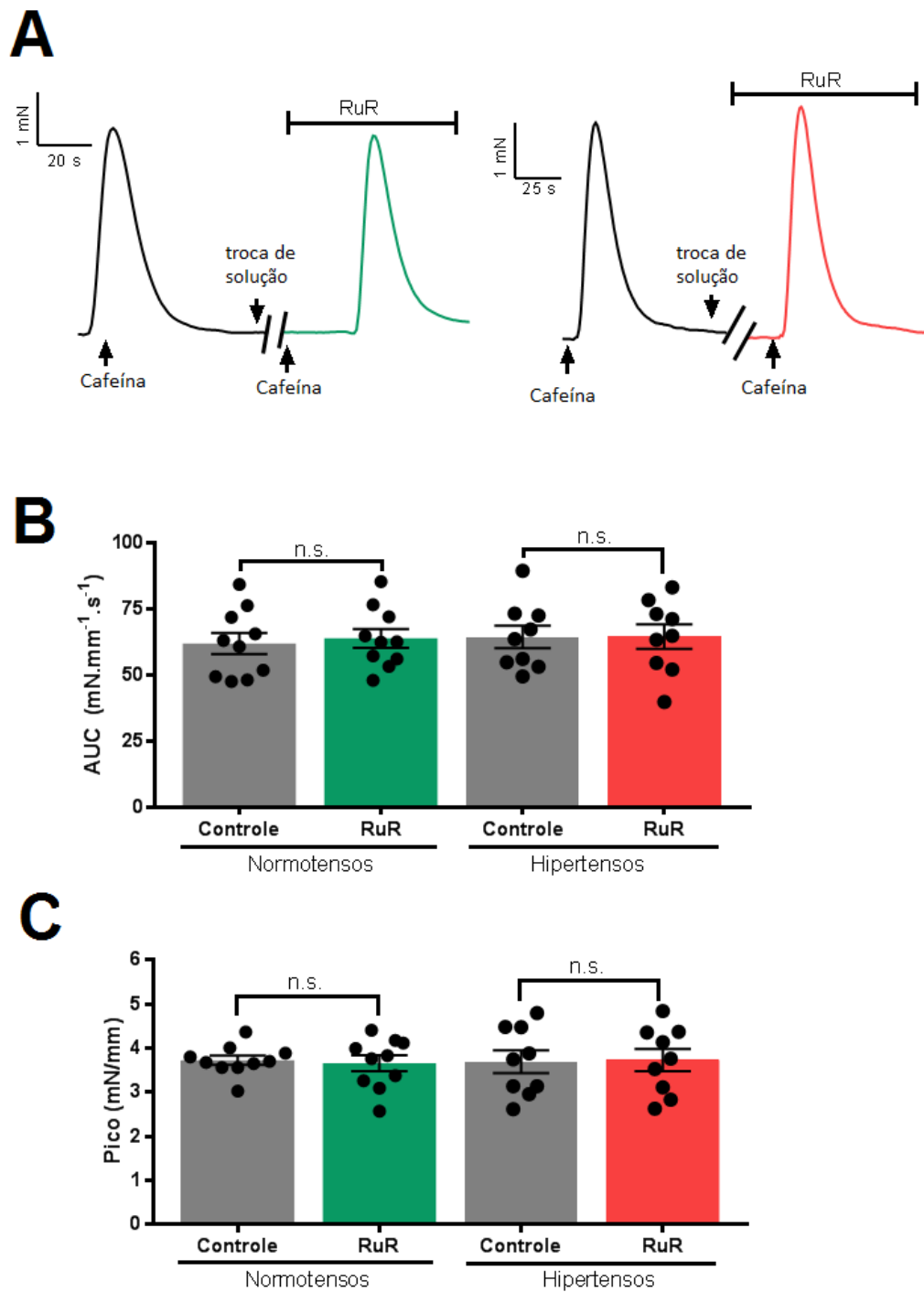


Figura 37: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de RuR. Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 10 pacientes normotensos e 9 pacientes hipertensos. N.S.-Não significativo. ANOVA de uma via.

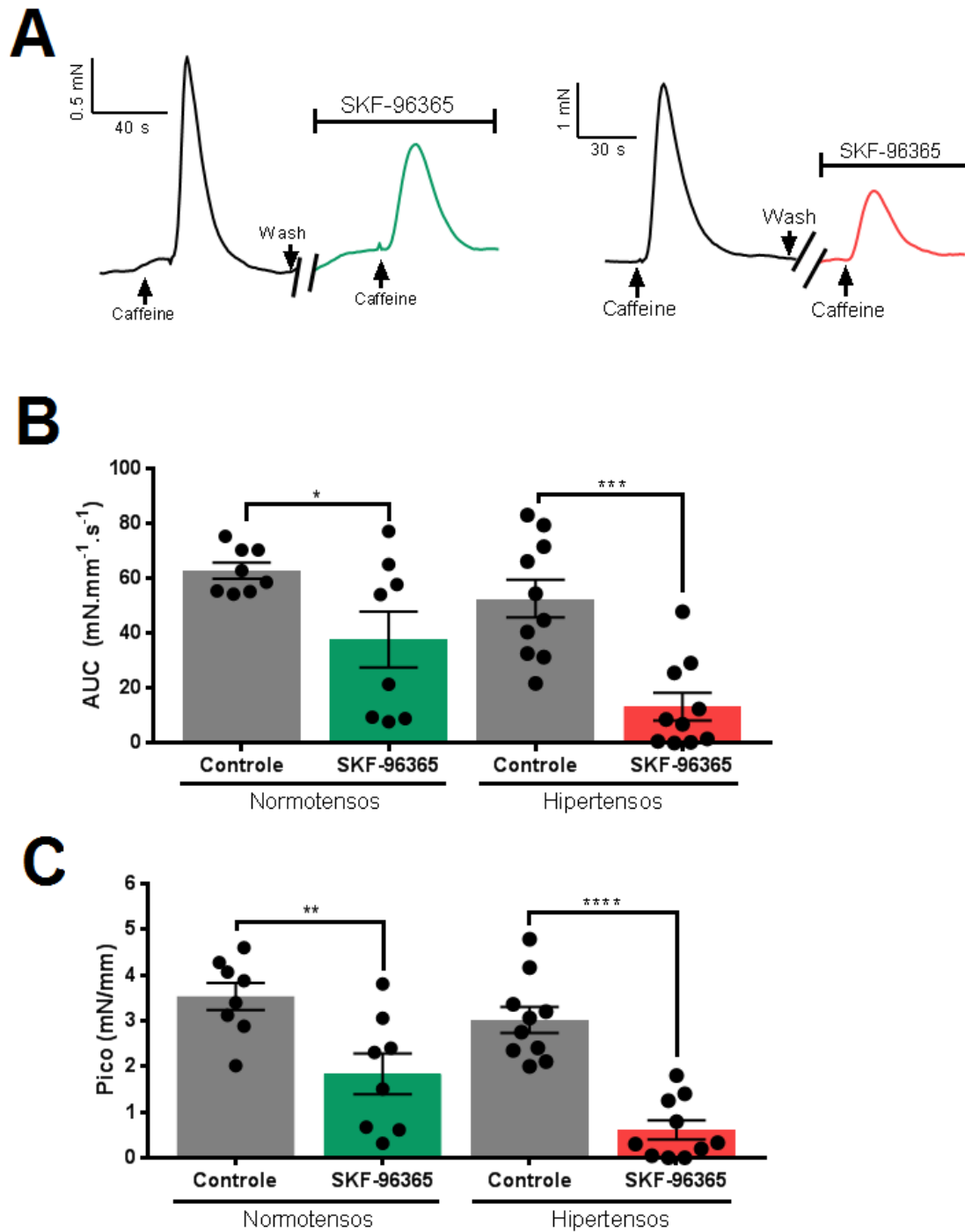


Figura 38: Contração transitória estimuladas por cafeína em artérias mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de SKF-96365 (30 μ M). Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 8 pacientes normotensos e 10 hipertensos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ versus controle. ANOVA de uma via.

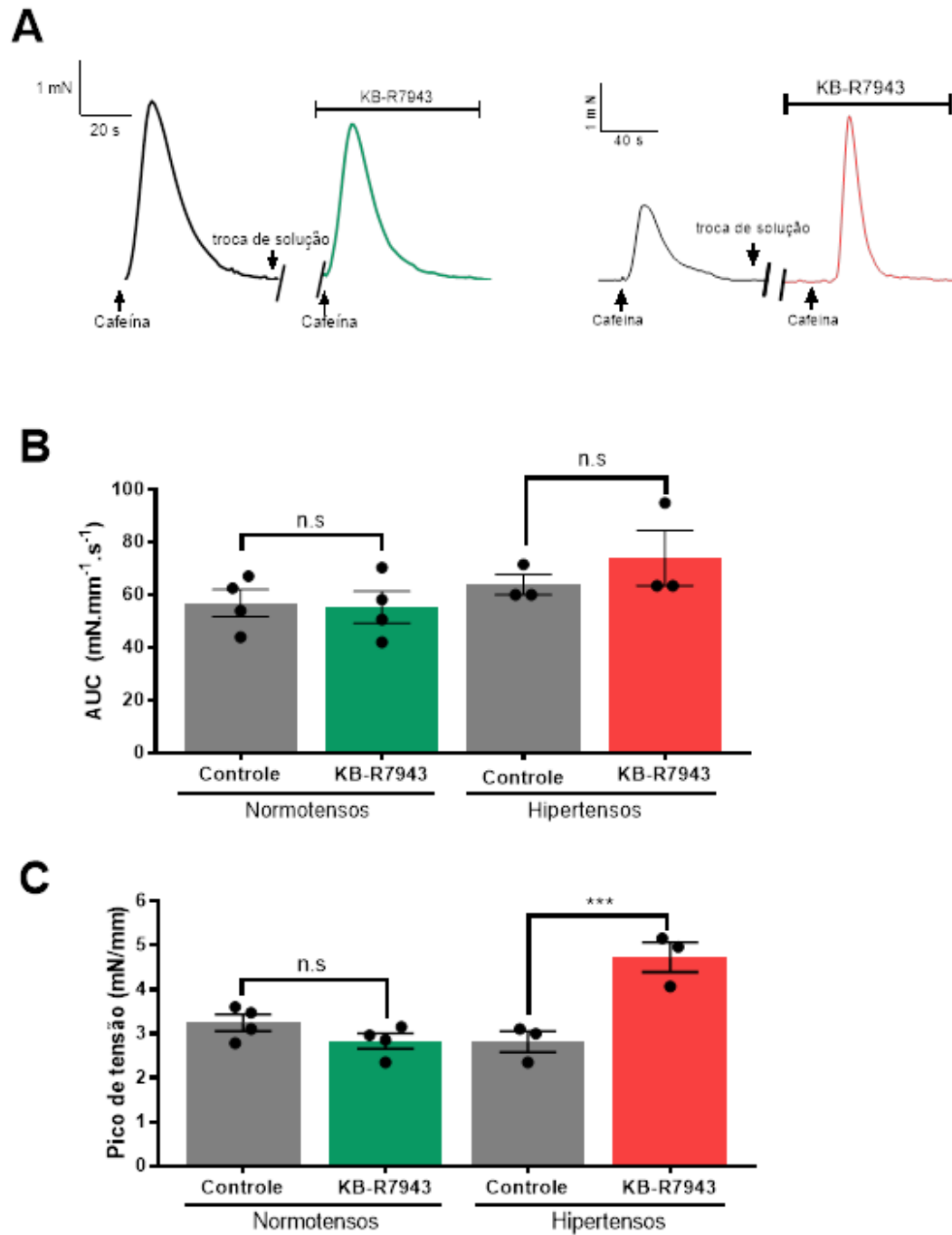


Figura 39: Contração transitória estimuladas por cafeína em arteríolas mesentéricas de pacientes normotensos e hipertensos na presença de KB-R7943 (10 μ M). Traçado representativo (A), AUC (B) e pico de contração (C), respectivamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média de 4 pacientes normotensos e 3 hipertensos. *** $P < 0.01$ versus controle. N.S. - não significativo. ANOVA de uma via.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho é dividido em três partes, a primeira delas trata de elucidar os mecanismos de regulação da contração transitória induzida por cafeína em artérias de resistência de camundongos. Em seguida, investiga-se a participação do influxo de Ca^{2+} e o envolvimento dos canais para Ca^{2+} da MP no mecanismo contrátil. A segunda parte, relata as disfunções da sinalização de Ca^{2+} na hipertensão arterial. Contudo, ainda mais importante são os resultados encontrados em vasos humanos (terceira parte), confirmando os mecanismos de feedback negativo da contração em um crosstalk entre os canais $\text{Ca}_v1.2$ e BK_{Ca} em normotensos. Este trabalho também demonstra que o mecanismo de crosstalk entre $\text{Ca}_v1.2$ e BK_{Ca} está prejudicado em artérias mesentéricas de camundongos e humanos hipertensos.

O efeito da cafeína no MLV ocorre através da ativação dos RyR no RS (Karakı e Weiss, 1988) promovendo liberação de Ca^{2+} com consequente contração transitória e aumento da fluorescência para o Ca^{2+} (Garcia *et al.*, 2016). Ito *et al.* (1989), demonstraram que a contração transitória induzida por cafeína promove uma resposta fásica em solução 0 Ca^{2+} que é aproximadamente 50% da resposta contrátil em solução com Ca^{2+} em artéria ilíaca de coelho. Nossos resultados demonstram que em solução 0 Ca^{2+} a ativação do RyR requer mecanismos de influxo fazendo com que o Ca^{2+} seja essencial para que a contração máxima seja obtida.

O Influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ é fundamental para a contração e tónus miogênico. Trabalhos na literatura têm demonstrado que o tónus miogênico é

marcadamente reduzido na presença de bloqueadores de $Ca_v1.2$ (Davis e Hill, 1999), incluindo dihidropiridinas, tais como nifedipina. Por outro lado, Tajada e colaboradores (2013) demonstraram que células de camundongos hipertensos têm cerca de 30 a 40% menos $Ca_v1.2$ expressos do que células de camundongos normotensos. Entretanto, na presença da hipertensão, estes canais formam clusters possibilitando maior entrada de Ca^{2+} , ou maiores sparklets, apesar de estarem com expressão reduzida. Nossos resultados demonstram que o bloqueio de $Ca_v1.2$ por nifedipina não reduz a contração transitória em estímulo a cafeína mas, ao contrário, a aumenta. Neste caso, seria esperado a redução da contração ou ausência de alteração da mesma. Contudo, nossos resultados sugerem que o influxo de Ca^{2+} via $Ca_v1.2$ limita a contração induzida por cafeína a partir de um mecanismo de feedback negativo.

As junções MP-RS são essenciais para a sinalização de Ca^{2+} , promovendo um fino mecanismo de regulação pela interação entre RyRs, canais para K^+ e canais para Ca^{2+} (Van Breemen *et al.*, 2013). Suzuki *et al.* (2013), demonstraram que BK_{Ca} e $Ca_v1.2$ podem interagir para a formação de clusters. Neste sentido, nossos resultados demonstram o envolvimento de BK_{Ca} na contração transitória induzida por cafeína, uma vez que ocorreu aumento da AUC da contração em artérias mesentéricas de camundongos, fato semelhante ao observado com o bloqueador de $Ca_v1.2$. Os resultados obtidos também demonstram bloqueio da hiperpolarização na presença dos bloqueadores de BK_{Ca} ou $Ca_v1.2$ em artérias de camundongos. Este trabalho mostra que o influxo de Ca^{2+} via $Ca_v1.2$ ativa BK_{Ca} e hiperpolariza a célula,

provavelmente por um mecanismo de regulação fina que ocorre na junção MP-RS através de microdomínios em vasos de resistência.

Estudos indicam que a idade ou doenças vasculares podem diminuir a quantidade de junções MP-RS em vasos humanos (Dai *et al.*, 2010), o que prejudica o mecanismo fino de regulação do Ca^{2+} . Alguns trabalhos, com murinos e humanos, demonstraram que na presença da hipertensão arterial ocorre diminuição da corrente de saída transitória espontânea (STOC) e da sensibilidade de BK_{Ca} ao Ca^{2+} . Além disso, a diminuição da STOC é resultado da redução da expressão da subunidade β -1 do BK_{Ca} em células do MLV (Tajada *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Pode-se notar que as artérias mesentéricas de humanos hipertensos não apresentaram aumento da contração na presença do bloqueador de BK_{Ca} , bem como na presença de nifedipina. Estes resultados sugerem a hipertensão induz a perda do mecanismo de feedback negativo entre $Ca_v1.2$ e BK_{Ca} .

Os TRPCs são uma família bem identificada que regula a depleção dos estoques. TRPC1, TRPC4 e TRPC5, por exemplo, agem como SOCs (Ambudkar *et al.*, 2006; Ambudkar e Ong, 2007). Kwan *et al.* (2009) sugerem que TRPC1 e BK_{Ca} se colocam nas células do MLV e que o influxo de Ca^{2+} via TRPC1 ativa BK_{Ca} para induzir hiperpolarização. Portanto, nossos resultados demonstram aumento da contração e a diminuição da fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos, além da inibição da hiperpolarização induzida por cafeína na presença de 2-APB.

Os canais TRPVs são importantes sensores de estímulos bioquímicos e fisiológicos (Clapham, 2003). O trabalho de Earley *et al.* (2005), demonstrou que

TRPV4 forma um complexo de sinalização de Ca^{2+} com o RyR e BK_{Ca} promovendo a hiperpolarização do músculo liso e vasodilatação via LCIC. Logo, o presente trabalho demonstra que o bloqueio de TRPVs induziu o aumento da AUC da contração enquanto reduziu a fluorescência para o Ca^{2+} em artérias de camundongos. Contudo, em artérias mesentéricas de humanos normotensos ou hipertensos, não ocorreu alteração da contração na presença de RuR. Estes resultados sugerem o envolvimento do influxo de Ca^{2+} via TRPVs na prevenção da contração excessiva e participando do mecanismo de feedback negativo em artérias mesentéricas de camundongos, o que não acontece em humanos.

É importante ressaltar que a sequência dos eventos que desencadeiam a ativação dos canais para K^+ não está bem esclarecida. No entanto, nossos resultados deixam claro que tanto TRPs e $\text{Ca}_v1.2$ participam deste processo.

Krishnamoorthy *et al.* (2014), demonstraram que BK_{Ca} e RyRs possuem papéis opostos no músculo liso. Enquanto a liberação de Ca^{2+} na forma de sparks via RyRs ativa BK_{Ca} , este se opõe a contração através do efluxo de K^+ provendo hiperpolarização celular. Todavia, nossos resultados demonstram que quando $\text{Ca}_v1.2$ ou TRPCs de artérias mesentéricas de camundongos são bloqueados, não existe hiperpolarização residual. Logo, a liberação de Ca^{2+} via RyRs não está ativando diretamente BK_{Ca} quando os vasos são estimulados por cafeína. Este fato pode ser explicado pela colocalização dos microdomínios de Ca^{2+} intracelulares em que a proximidade e sensibilidade ao Ca^{2+} de elementos individuais levam a regulação extramamente restrita do influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ e a mudanças no Ca^{2+} global (Tykocki e Nelson, 2015). Além disso, nossos resultados demonstram que a intensidade da fluorescência e a

velocidade da onda de Ca^{2+} é maior perto da MP do que mais profundamente no citosol. Estes dados reforçam a participação dos canais da membrana, contribuindo para que o influxo ative BK_{Ca} mais rapidamente.

O NCX é um trocador para mudanças localizadas na $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na MP, além de ser uma importante via para a entrada de Ca^{2+} para o RS do músculo liso. Entretanto, a direção da atividade do NCX é determinada pelo gradiente transmembrana de Na^+ e Ca^{2+} e pelo E_m (Blaustein e Lederer, 1999). Quando o MLV é estimulado com cafeína, o NCX age no seu modo reverso (Danaceau e Lucero, 2000), entrada de Ca^{2+} e extrusão de Na^+ , que requer altas $[\text{Na}^+]_i$ proveniente dos TRPs (Poburko *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram que na presença de KB-R7943, um bloqueador de NCX no seu modo reverso, ocorreu diminuição da contração e fluorescência para o Ca^{2+} em artérias mesentéricas de camundongos, colaborando com os resultados obtidos em solução 0 Ca^{2+} . Isto sugere que, a entrada de Ca^{2+} via NCX colabora para a contração e preenchimento do RS. Entretanto, surpreendentemente, quando NCX foi bloqueado, não há alteração da contração nas artérias mesentéricas de humanos normotensos e há aumento da contração em artérias de hipertensos. Estes resultados demonstram que NCX é extremamente importante para que a contração por cafeína ocorra em artérias mesentéricas de camundongos, mas não em mesentéricas de humanos. Além disso, pode-se sugerir que a expressão ou o modo de atividade de NCX estão alterados na presença da hipertensão arterial em artérias mesentéricas de humanos.

Orai é o suposto componente formador de poros dos canais Ca (2+) ativados por liberação de Ca (2+) na membrana plasmática. Ratos hipertensos possuem aumento da ativação da LCIC via Orai-1, com conseqüente aumento do tônus basal e reatividade vascular. Nossos dados demonstram que o bloqueio de Orai reduziu a contração em camundongos e humanos normotensos e hipertensos (Giachini *et al.*, 2009). Contudo, em humanos hipertensos a redução da contração foi maior do que em normotensos. Estes resultados suportam a hipótese de que STIM-1/Orai-1 contribuem para a função vascular anormal na hipertensão. O aumento da ativação de STIM-1/Orai-1 pode representar mecanismos que levam a níveis elevados de Ca²⁺ intracelular na hipertensão arterial.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que a ativação do RyR por cafeína promove o influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ em artérias mesentéricas de camundongos. O influxo de Ca^{2+} está envolvido em um mecanismo de feedback negativo do processo contrátil através da ativação de BK_{Ca} . Portanto, este trabalho abre um novo campo para pesquisas mostrando que o influxo de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$ participa não apenas colaborando com a contração, como usualmente tem sido associado. Também foi demonstrado que TRPCs e TRPVs estão envolvidos na ativação de BK_{Ca} e na prevenção da contração excessiva em artérias de camundongos, mas não participam da contração induzida por cafeína em humanos, normotensos ou hipertensos.

REFERÊNCIAS

ADEGUNLOYE, B.; SOFOLA, O. Rat aorta and mesenteric artery respond differently to serotonin. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 255-67, 1997. ISSN 0792-6855. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651798> >.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **J Anesth**, v. 21, n. 2, p. 232-42, 2007. ISSN 0913-8668. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17458653> >.

AMBERG, G. C. et al. Calcium sparklets regulate local and global calcium in murine arterial smooth muscle. **J Physiol**, v. 579, n. Pt 1, p. 187-201, Feb 2007. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158168> >.

AMBUDKAR, I. S. et al. Functional organization of TRPC-Ca²⁺ channels and regulation of calcium microdomains. **Cell Calcium**, v. 40, n. 5-6, p. 495-504, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0143-4160. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030060> >.

AMBUDKAR, I. S.; ONG, H. L. Organization and function of TRPC channelosomes. **Pflugers Arch**, v. 455, n. 2, p. 187-200, Nov 2007. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486362> >.

BEECH, D. J. Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 8, p. 597-603, Aug 2005. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120184> >.

BEECH, D. J.; MURAKI, K.; FLEMMING, R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. **J Physiol**, v. 559, n. Pt 3, p. 685-706, Sep 2004. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15272031> >.

BERGMEIER, W. et al. R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets. **Blood**, v. 113, n. 3, p. 675-8, Jan 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952890> >.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 517-29, Jul 2003. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838335> >.

BERS, D. M.; STIFFEL, V. M. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. **Am J Physiol**, v. 264, n. 6 Pt 1, p. C1587-93, Jun 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8333507> >.

BIRNBAUMER, L. The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 395-426, 2009. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281310> >.

BLATZ, A. L.; MAGLEBY, K. L. Calcium-activated potassium channels. **Trends in Neurosciences**, v. 10, n. 11, p. 463-467, 1987/11/01/ 1987. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166223687901019> >.

BLAUSTEIN, M. P.; LEDERER, W. J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. **Physiol Rev**, v. 79, n. 3, p. 763-854, Jul 1999. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390518> >.

BRAYDEN, J. E. et al. Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, n. 9, p. 1116-20, Sep 2008. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215190> >.

BRUEGGEMANN, L. I. et al. Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative Ca(2+) entry in vascular smooth muscle cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 317, n. 2, p. 488-99, May 2006. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415091> >.

CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 493-531, 1995. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574491> >.

_____. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 8, p. a003947, Aug 2011. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21746798> >.

CHOE, W. et al. TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. **Mol Pharmacol**, v. 80, n. 5, p. 900-10, Nov 2011. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821734> >.

CHU, A. et al. Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. **Mol Pharmacol**, v. 37, n. 5, p. 735-41, May 1990. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692609> >.

CIPOLLA, M. J. et al. SKCa and IKCa Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. **Stroke**, v. 40, n. 4, p. 1451-7, Apr 2009. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246694> >.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, n. 6966, p. 517-24, Dec 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654832> >.

CLAPHAM, D. E. et al. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 4, p. 591-6, Dec 2003. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657417> >.

COREY, D. P. et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 723-30, Dec 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15483558> >.

COUTO, G. K. **Estudo da Função em Artérias de Resistência de Ratos Pós-infarto do Miocárdio**. 2012. (Doutorado). Fisiologia Humana, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DANACEAU, J. P.; LUCERO, M. T. Electrogenic Na(+)/Ca(2+) exchange. A novel amplification step in squid olfactory transduction. **J Gen Physiol**, v. 115, n. 6, p. 759-68, Jun 2000. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828249> >.

DAVIS, M. J.; HILL, M. A. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. **Physiol Rev**, v. 79, n. 2, p. 387-423, Apr 1999. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221985> >.

DOMEI, T. L.; BLATTER, L. A.; ZIMA, A. V. Alteration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release termination by ryanodine receptor sensitization and in heart failure. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 21, p. 5197-209, Nov 2009. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736296> >.

DU, G. G. et al. Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 26, p. 16725-30, Dec 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486242> >.

EARLEY, S.; BRAYDEN, J. E. Transient receptor potential channels in the vasculature. **Physiol Rev**, v. 95, n. 2, p. 645-90, Apr 2015. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834234> >.

EARLEY, S. et al. TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. **Circ Res**, v. 97, n. 12, p. 1270-9, Dec 2005. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269659> >.

ECHEVERRI, D. et al. Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. **Int J Vasc Med**, v. 2010, p. 834060, 2010. ISSN 2090-2832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188209> >.

ETO, M. et al. Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. **FEBS Lett**, v. 410, n. 2-3, p. 356-60, Jun 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237662> >.

FAMELI, N.; VAN BREEMEN, C.; KUO, K. H. A quantitative model for linking Na⁺/Ca²⁺ exchanger to SERCA during refilling of the sarcoplasmic reticulum to sustain [Ca²⁺] oscillations in vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 42, n. 6, p. 565-75, Dec 2007. ISSN 0143-4160. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418403> >.

FATT, P.; KATZ, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. **J Physiol**, v. 117, n. 1, p. 109-28, May 1952. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14946732> >.

_____. The electrical properties of crustacean muscle fibres. **J Physiol**, v. 120, n. 1-2, p. 171-204, Apr 1953. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13062231> >.

FERNÁNDEZ-TENORIO, M. et al. Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. **Circ Res**, v. 108, n. 11, p. 1348-57, May 2011. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493898> >.

FESKE, S. et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 179-85, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582901> >.

FESKE, S.; SKOLNIK, E. Y.; PRAKRIYA, M. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 7, p. 532-47, Jun 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699833> >.

FLOCKERZI, V.; NILIUS, B. TRPs: truly remarkable proteins. **Handb Exp Pharmacol**, v. 222, p. 1-12, 2014. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24756700> >.

FORTIER, A.; GULLAPALLI, V.; MIRSHAMS, R. A. Review of biomechanical studies of arteries and their effect on stent performance. **IJC Heart & Vessels**, v. 4, p. 12-18, 2014/09/01/ 2014. ISSN 2214-7632. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214763214000261> >.

GARCIA, D. C. et al. Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vascul Pharmacol**, v. 82, p. 60-5, Jul 2016. ISSN 1879-3649. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173831> >.

GARDOS, G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 30, n. 3, p. 653-4, Dec 1958. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13618284> >.

GERTHOFFER, W. T.; POHL, J. Caldesmon and calponin phosphorylation in regulation of smooth muscle contraction. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 72, n. 11, p. 1410-4, Nov 1994. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7767886> >.

GIACHINI, F. R. et al. Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: a novel insight into vascular dysfunction.

Hypertension, v. 53, n. 2, p. 409-16, Feb 2009. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075091> >.

GIANNINI, G. et al. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. **J Cell Biol**, v. 128, n. 5, p. 893-904, Mar 1995. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876312> >.

GUÉGUINOU, M. et al. KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 10, p. 2322-33, Oct 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24613282> >.

GWACK, Y. et al. Biochemical and functional characterization of Orai proteins. **J Biol Chem**, v. 282, n. 22, p. 16232-43, Jun 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293345> >.

HOFMANN, T. et al. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 259-63, Jan 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9930701> >.

HOGAN, P. G. The STIM1-ORAI1 microdomain. **Cell Calcium**, v. 58, n. 4, p. 357-67, Oct 2015. ISSN 1532-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215475> >.

HOU, S.; HEINEMANN, S. H.; HOSHI, T. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 26-35, Feb 2009. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196649> >.

HOUSE, S. J. et al. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. **Pflugers Arch**, v. 456, n. 5, p. 769-85, Aug 2008. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18365243> >.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9, Dec 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2827174> >.

INOUE, R. et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circ Res**, v. 99, n. 2, p. 119-31, Jul 2006. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857972> >.

INUI, M.; SAITO, A.; FLEISCHER, S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 262, n. 4, p. 1740-7, Feb 1987. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3805051> >.

ITO, M. et al. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. **Mol Cell Biochem**, v. 259, n. 1-2, p. 197-209, Apr 2004. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15124925> >.

_____. Bay K 8644-induced potentiation of the contractile response of rabbit iliac artery to caffeine in a Ca²⁺-free medium. **Gen Pharmacol**, v. 20, n. 1, p. 95-8, 1989. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2468553> >.

KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sci**, v. 42, n. 2, p. 111-22, 1988. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2447464> >.

KATSUYAMA, H.; WANG, C. L.; MORGAN, K. G. Regulation of vascular smooth muscle tone by caldesmon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 21, p. 14555-14558, 1992. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/267/21/14555.abstract> >.

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**, v. 385, n. 1, p. 49-54, Jul 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433061> >.

KAWASAKI, T. et al. Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. **J Biol Chem**, v. 285, n. 33, p. 25720-30, Aug 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534587> >.

KOCH, W. J.; ELLINOR, P. T.; SCHWARTZ, A. cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. Evidence for the existence of alternatively spliced forms. **J Biol Chem**, v. 265, n. 29, p. 17786-91,

Oct 1990. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170396> >.

KRISHNAMOORTHY, G. et al. Opposing roles of smooth muscle BK channels and ryanodine receptors in the regulation of nerve-evoked constriction of mesenteric resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 7, p. H981-8, Apr 2014. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508642> >.

KUWAJIMA, G. et al. Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. **Neuron**, v. 9, n. 6, p. 1133-42, Dec 1992. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334420> >.

KWAN, H. Y. et al. TRPC1 associates with BK(Ca) channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 104, n. 5, p. 670-8, Mar 2009. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168436> >.

LAI, F. A. et al. Expression of a cardiac Ca(2+)-release channel isoform in mammalian brain. **Biochem J**, v. 288 (Pt 2), p. 553-64, Dec 1992. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334409> >.

_____. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. **Nature**, v. 331, n. 6154, p. 315-9, Jan 1988. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2448641> >.

LAMBOLEY, C. R. et al. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 592, n. 6, p. 1381-95, Mar 2014. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24469076> >.

LIOU, J. et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. **Curr Biol**, v. 15, n. 13, p. 1235-41, Jul 2005. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16005298> >.

LYTTON, J.; WESTLIN, M.; HANLEY, M. R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. **J Biol Chem**, v. 266, n. 26, p. 17067-71, Sep 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1832668> >.

MADDEN, J. A.; RUSCH, N. J. CHAPTER 11 - Electrophysiology of Vascular Smooth Muscle A2 - SPERELAKIS, NICHOLAS. In: KURACHI, Y.; TERZIC, A., *et al* (Ed.). **Heart Physiology and Pathophysiology (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2001. p.213-227. ISBN 978-0-12-656975-9.

MARKS, A. R.; MARX, S. O.; REIKEN, S. Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers. **Trends Cardiovasc Med**, v. 12, n. 4, p. 166-70, May 2002. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069756> >.

MARX, S. O. et al. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. **J Cell Biol**, v. 153, n. 4, p. 699-708, May 2001. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352932> >.

MATTEI, M. G. et al. Chromosomal localization of murine ryanodine receptor genes RYR1, RYR2, and RYR3 by in situ hybridization. **Genomics**, v. 22, n. 1, p. 202-4, Jul 1994. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7959768> >.

MCGUIRE, J. J. et al. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2): vascular effects of a PAR2-derived activating peptide via a receptor different than PAR2. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, n. 3, p. 985-92, Dec 2002. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438518> >.

MEISSNER, G. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. **Annu Rev Physiol**, v. 56, p. 485-508, 1994. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516645> >.

MEISSNER, G.; DARLING, E.; EVELETH, J. Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides. **Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 236-44, Jan 1986. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3754147> >.

MEISSNER, G. et al. Regulation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺ and monovalent cations and anions. **J Biol Chem**, v. 272, n. 3, p. 1628-38, Jan 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8999838> >.

MILLS, R. D.; MITA, M.; WALSH, M. P. A role for the Ca(2+)-dependent tyrosine kinase Pyk2 in tonic depolarization-induced vascular smooth muscle contraction.

J Muscle Res Cell Motil, v. 36, n. 6, p. 479-89, Dec 2015. ISSN 1573-2657. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26150074> >.

MOCCIA, F. et al. Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 153, 2015. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25964739> >.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19-26, July 1, 1977 1977. Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org/content/41/1/19.short> >.

MURAKI, K. et al. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. **Circ Res**, v. 93, n. 9, p. 829-38, Oct 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512441> >.

NAKAI, J. et al. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca²⁺ channels. **J Biol Chem**, v. 273, n. 22, p. 13403-6, May 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593671> >.

NAVARRO-BORELLY, L. et al. STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy. **J Physiol**, v. 586, n. 22, p. 5383-401, Nov 2008. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832420> >.

NAVEDO, M. F. et al. Constitutively active L-type Ca²⁺ channels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 31, p. 11112-7, Aug 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040810> >.

_____. Ca(v)1.3 channels produce persistent calcium sparklets, but Ca(v)1.2 channels are responsible for sparklets in mouse arterial smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 3, p. H1359-70, Sep 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526649> >.

NELSON, M. T. et al. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. **Science**, v. 270, n. 5236, p. 633-7, Oct 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570021> >.

NETO, A. R. **Fisiologia Cardiovascular. Monitorização em UTI**. Rio de Janeiro: 35-45 p. 2004.

NILIUS, B.; FLOCKERZI, V. What do we really know and what do we need to know: some controversies, perspectives, and surprises. **Handb Exp Pharmacol**, v. 223, p. 1239-80, 2014. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961986> >.

NILIUS, B. et al. The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **EMBO J**, v. 25, n. 3, p. 467-78, Feb 2006. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424899> >.

_____. Decavanadate modulates gating of TRPM4 cation channels. **J Physiol**, v. 560, n. Pt 3, p. 753-65, Nov 2004. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331675> >.

_____. Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. **J Biol Chem**, v. 280, n. 8, p. 6423-33, Feb 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590641> >.

OLIVERA, B. M. et al. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 63, p. 823-67, 1994. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979255> >.

OLOIZIA, B.; PAUL, R. J. Ca²⁺ clearance and contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-altered murine models. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, n. 3, p. 347-62, Sep 2008. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598701> >.

OPIE, L. H. Control of circulation. In: Heart Physiology: From Cell to Circulation. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 16-41. 2004.

PARK, C. Y. et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 876-90, Mar 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249086> >.

PEREZ-REYES, E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. **Physiol Rev**, v. 83, n. 1, p. 117-61, Jan 2003. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506128> >.

PFITZNER, J. Poiseuille and his law. **Anaesthesia**, v. 31, n. 2, p. 273-5, Mar 1976. ISSN 0003-2409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/779509> >.

POBURKO, D. et al. Ca²⁺ signaling in smooth muscle: TRPC6, NCX and LNats in nanodomains. **Channels (Austin)**, v. 2, n. 1, p. 10-2, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1933-6969. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690050> >.

_____. Organellar junctions promote targeted Ca²⁺ signaling in smooth muscle: why two membranes are better than one. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 1, p. 8-15, Jan 2004. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14723973> >.

POHL, U.; DE WIT, C.; GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. **Acta Physiol Scand**, v. 168, n. 4, p. 505-10, Apr 2000. ISSN 0001-6772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759587> >.

PRAKRIYA, M. et al. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 230-3, Sep 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921383> >.

RATTAN, S. Ca²⁺/calmodulin/MLCK pathway initiates, and RhoA/ROCK maintains, the internal anal sphincter smooth muscle tone. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 312, n. 1, p. G63-G66, 01 2017. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27932502> >.

READING, S. A. et al. TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 5, p. H2055-61, May 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604128> >.

S P SUTERA, A.; SKALAK, R. The History of Poiseuille's Law. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 25, n. 1, p. 1-20, 1993. Disponível em: < <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.fl.25.010193.000245> >.

SALKOFF, L. et al. High-conductance potassium channels of the SLO family. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 12, p. 921-31, Dec 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115074> >.

SEDOVA, M.; BLATTER, L. A. Dynamic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and Na^+/Ca^{2+} exchange during capacitative Ca^{2+} entry in bovine vascular endothelial cells. **Cell Calcium**, v. 25, n. 5, p. 333-43, May 1999. ISSN 0143-4160. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463097> >.

SHI, J.; CUI, J. Intracellular Mg^{2+} enhances the function of BK-type Ca^{2+} -activated K^+ channels. **J Gen Physiol**, v. 118, n. 5, p. 589-606, Nov 2001. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696614> >.

SILVA, G. C. et al. Mechanism of the antihypertensive and vasorelaxant effects of the flavonoid tiliroside in resistance arteries. **Planta Med**, v. 79, n. 12, p. 1003-8, Aug 2013. ISSN 1439-0221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877918> >.

SLAAF, D. W. et al. Effective diameter as a determinant of local vascular resistance in presence of vasomotion. **Am J Physiol**, v. 255, n. 5 Pt 2, p. H1240-3, Nov 1988. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3189582> >.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol Rev**, v. 83, n. 4, p. 1325-58, Oct 2003. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506307> >.

SUZUKI, Y. et al. Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BKCa) and Cav1.2 Ca^{2+} channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes. **J Biol Chem**, v. 288, n. 51, p. 36750-61, Dec 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202214> >.

SY Yong, H. T.; Chung, A. W.; Van Breemen, C. Marfan syndrome decreases Ca^{2+} wave frequency and vasoconstriction in murine mesenteric resistance arteries without changing underlying mechanisms. **J Vasc Res**, v. 48, n. 2, p. 150-62, 2011. ISSN 1423-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926894> >.

TAJADA, S. et al. Down-regulation of $CaV1.2$ channels during hypertension: how fewer $CaV1.2$ channels allow more Ca^{2+} into hypertensive arterial smooth muscle. **J Physiol**, v. 591, n. 24, p. 6175-91, Dec 2013. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167226> >.

TAKAHASHI, M. et al. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5478-82, Aug 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440051> >.

TAKESHIMA, H. et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. **Nature**, v. 339, n. 6224, p. 439-45, Jun 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2725677> >.

TUCKER WD, B. S. **Anatomy, Blood Vessels**. Florida: StatPearls Publishing LLC. 2017.

TYKOCKI, N. R.; BOERMAN, E. M.; JACKSON, W. F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. **Compr Physiol**, v. 7, n. 2, p. 485-581, Mar 2017. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28333380> >.

TYKOCKI, N. R.; NELSON, M. T. Location, Location, Location: Juxtaposed calcium-signaling microdomains as a novel model of the vascular smooth muscle myogenic response. **J Gen Physiol**, v. 146, n. 2, p. 129-32, Aug 2015. ISSN 1540-7748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216858> >.

UREÑA, J. et al. A new metabotropic role for L-type Ca(2+) channels in vascular smooth muscle contraction. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 11, n. 4, p. 490-6, Jul 2013. ISSN 1875-6212. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23905643> >.

VAN BREEMEN, C.; FAMELI, N.; EVANS, A. M. Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: nanospace Ca²⁺ transport for site- and function-specific Ca²⁺ signalling. **J Physiol**, v. 591, n. Pt 8, p. 2043-54, Apr 2013. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339179> >.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP channels. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 387-417, 2007. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579562> >.

VERGARA, C. et al. Calcium-activated potassium channels. **Curr Opin Neurobiol**, v. 8, n. 3, p. 321-9, Jun 1998. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687354> >.

VILLALBA, N. et al. Traumatic brain injury disrupts cerebrovascular tone through endothelial inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide gain of function. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 6, p. e001474, Dec 2014. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25527626> >.

VRIENS, J. et al. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 1, p. 396-401, Jan 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691263> >.

WRIGHT, C. E.; ANGUS, J. A. Enhanced total peripheral vascular responsiveness in hypertension accords with the amplifier hypothesis. **J Hypertens**, v. 17, n. 12 Pt 1, p. 1687-96, Dec 1999. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658934> >.

WU, M. M. et al. Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. **J Cell Biol**, v. 174, n. 6, p. 803-13, Sep 2006. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966422> >.

YANG, Y. et al. Function of BKCa channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from Han Chinese patients with hypertension. **Hypertension**, v. 61, n. 2, p. 519-25, Feb 2013. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23232643> >.

YANO, M. et al. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 3, n. 1, p. 43-52, Jan 2006. ISSN 1743-4297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391617> >.

YEON, S. I. et al. Transient receptor potential canonical type 3 channels control the vascular contractility of mouse mesenteric arteries. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110413, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310225> >.

YUAN, J. P. et al. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 337-43, Mar 2009. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182790> >.

ZHANG, J. et al. Role of Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels in vascular tone: effects of nifedipine and Mg²⁺. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 1, p. H415-

25, Jan 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980345> >.

ZHANG, S. L. et al. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. **Nature**, v. 437, n. 7060, p. 902-5, Oct 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16208375> >.

ZHANG, X.; SOLARO, C. R.; LINGLE, C. J. Allosteric regulation of BK channel gating by Ca(2+) and Mg(2+) through a nonselective, low affinity divalent cation site. **J Gen Physiol**, v. 118, n. 5, p. 607-36, Nov 2001. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696615> >.

ZHOU, Y. et al. Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 8, p. 973-81, Aug 2013. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851458> >.

ZORZATO, F. et al. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **J Biol Chem**, v. 265, n. 4, p. 2244-56, Feb 1990. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2298749> >.

ÁLVAREZ-MIGUEL, I. et al. Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric vascular smooth muscle cells in essential hypertension. **J Physiol**, v. 595, n. 5, p. 1497-1513, Mar 2017. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27861908> >.

ANEXO

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido

I INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa tem o objetivo de estudar a função de vasos humanos e correlacionar os resultados obtidos com análises laboratoriais e bioquímicas. Os resultados obtidos nos permitirá dar uma noção de que maneira podemos interferir no relaxamento ou contração dos vasos, além de avaliar a possível presença de determinadas substancias na circulação sanguínea. Estas substancias são importantes porque podem facilitar o diagnóstico de possíveis eventos cardíacos além de nos esclarecer condições fisiopatológicas já instauradas (hiperlipidemia diabetes...). Para coletar estes vasos precisamos utilizar as sobras da cirurgia que você irá se submeter. Necessitamos também que seja coletado uma amostra de 5 a 10ml sangue. Deixamos claro que o material que utilizaremos é de descarte, ou seja, a porção do intestino que será removido pelo cirurgião. Desta forma você irá contribuir para este estudo concordando em doar este material para que a pesquisa seja feita.

II SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará inúmeros benefícios importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O conhecimento do funcionamento dos vasos retirados de material de descarte da cirurgia poderá ajudar no desenvolvimento de medicamentos utilizados no combate a hipertensão arterial, infarto ou acidentes vasculares cerebrais. As dosagens laboratoriais realizadas com o sangue coletado evidenciará a presença de substancias relacionadas a possíveis patologias, nos permitindo um diagnóstico mais preciso, o início precoce do tratamento adequado e o acompanhamento da evolução do paciente.

IV RISCOS

Uma vez que serão utilizados somente material de descarte, ou seja, as sobras do intestino removido nas cirurgias, a coleta deste material nao oferecera riscos ao paciente. Durante a coleta de sangue um pequeno hematoma pode surgir na região onde o sangue foi removido. No entanto será aproveitado o mesmo acesso para a administração de medicamentos, assim nao haverá a necessidade de nenhuma perfuração adicional para a coleta de sangue.

V RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está previsto qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos através de incentivos a pesquisas provenientes de instituições de fomento.

VI DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. Nesta pesquisa utilizaremos somente material de descarte, ou seja, as sobras do intestino removido na cirurgia, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

VII TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ voluntariamente, concordo com os propósitos de coletar uma amostra do meu sangue e que o descarte do material biológico proveniente da minha cirurgia tumoral seja utilizado para fins de pesquisa científica. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde. Declaro também que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste estudo.

Belo Horizonte,.....de.....de.....
..

Assinatura do voluntário:

Telefones e endereço para contato:

Profa Virgínia Lemos: Tel 3409-2950, celular: 87826096 e-mail para contato: vslemos@icb.ufmg.br

Bruno Almeida de Rezende Tel: 33838409, celular: 8019692 e-mail: brunorezende01@yahoo.com.br

COEP (Comitê de Ética em Pesquisa): Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG - Brasil 31270-901 Telefone: 3409-4592