

CYRILLO
R 4137026
03/02/02
2011/00

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DOS BLOQUEADORES DOS
CANALIS DE CLORETO ATIVADOS PELO CÁLCIO E PELO
VOLUME CELULAR NA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO
LISO LONGITUDINAL DE FUNDO DE ESTÔMAGO DE RATO**

Henrique Clasen Scarparo

Tese apresentada à Coordenação
do Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia do Departamento de
Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em
Farmacologia.

Orientador:
Prof. Dr. David Neil Criddle

Fortaleza
2001

615.73
5312
2001
ex. 2



S31e Scarparo, Henrique Clasen

Estudos farmacológicos dos bloqueadores dos canais de cloreto ativados pelo cálcio e pelo volume celular na contratilidade do músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato / Henrique Clasen Scarparo – Fortaleza, 2001.

240f.: il.

Orientador: Prof. Dr. David Neil Criddle

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1.Canais de cloreto 2.Canais iônicos 3.Músculo liso-fisiologia
4.Músculo liso-farmacologia 5.5-Hidroxitriptamina 6.Serotonina
7.Estômago 8.Farmacologia I. Criddle, David Neil II. Título

CDD 615.73

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DOS BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO CÁLCIO E PELO VOLUME CELULAR NA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO LONGITUDINAL DE FUNDO DE ESTÔMAGO DE RATO

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Farmacologia, a qual encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade. Parte desta tese está publicada no *British Journal of Pharmacology*, v.130, p. 678-684, 2000 e na revista *Ciências e Tecnologia - Revista da Universidade Estadual do Ceará*, v. 2, n. 1, p. 59-63, 2000.

Henrique Clasen Scarparo

DATA DA DEFESA: 03 / agosto / 2001.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. David Neil Criddle – UFC / UECE
(Orientador)

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
UFC / UECE

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
UFC / UECE

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
UERJ

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
UFC

À minha virtuosa esposa Hilda Maria que buscou forças para poder compreender, superar e compartilhar a aflição de vários anos

e

À minha filha Júlia que, na ingenuidade de uma criança é quase sem ter chances de escolha, suportou durante todos estes anos a minha ausência

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus por eu crer na Sua existência, que nos momentos de desânimo, angústia e aflição deu-me a força para perseverar e continuar. Obrigado por eu sentir saudades e necessidade de Ti

À minha mãe Wanda Clasen pela educação, pelo carinho, pela força e pelas palavras de incentivo, sucesso, justiça e honestidade

Aos meus familiares que jamais deixaram de contribuir com apoio e encorajamento durante as várias etapas de minha vida

Ao Prof. David Neil Criddle, é difícil ter uma palavra que expresse a minha gratidão. Estou certo de que conheci uma pessoa que traz consigo uma grandeza interior cultivada por atos de nobreza, honestidade e justiça. Sua dignidade e competência conquistaram o respeito e admiração. Sua presença foi sempre muito marcante na elaboração deste trabalho. O seu incentivo e saber deram impulso para que eu encontrasse e trilhasse, dignamente, o caminho da ciência. Obrigado pelo seu fiel compromisso de orientação neste trabalho e por ajudar-me a inserir o meu nome na ciência internacional. Com a sua permissão, gostaria de agradecer-lo dizendo mais uma vez obrigado amigo e professor Criddle, a ciência o reconhece pelos seus feitos

Ao Prof. José Henrique Leal Cardoso pelo seu conhecimento, paciência e pela sua disponibilidade em me servir nos momentos que necessitei. Mesmo quando esteve ausente, agradeço e o reconheço como a pessoa principal para o meu ingresso na farmacologia. Jamais me esquecerei dos seus ensinamentos, principalmente, da maneira amiga e calorosa que me recebestes como seu aluno. Suas palavras fortes e bem dosadas me ensinaram multiplicar os talentos por terem sido bem ouvidas. Professor Henrique, muito obrigado pela sua ajuda durante a elaboração deste trabalho

Ao Prof. Pedro Jorge Caldas Magalhães, um amigo a quem presto meu reconhecimento e admiração, com o qual aprendi os primeiros passos para a pesquisa em farmacologia experimental, uma etapa fundamental para que eu pudesse desenvolver os experimentos desta tese

Ao amigo José Clayton Fernandes um especial agradecimento pela sua disponibilidade em me servir com o seu conhecimento técnico-profissional nos serviços de informática

Ao Prof. Rosalvo Tadeu Rochmüller Fogaça pelo caloroso apoio e incentivo para que eu ingressasse no doutoramento em farmacologia

Ao Prof. Roberto Oscar Brasil e à Prof^a. Andrelina Noronha Coelho de Souza pela atenção e ajuda nos momentos em que os procurei durante estes anos

Aos colegas do Departamento de Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará por apoiarem o meu afastamento das atividades do Curso de Odontologia durante todo o tempo que necessitei para a conclusão deste doutoramento

Aos colegas da disciplina de Cirurgia Buco-Dentária do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Prof. Luiz Gomes Nogueira, que supriram a minha ausência durante todos estes anos

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), na pessoa do Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles e do Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, por conceder as instalações do laboratório de eletrofisiologia para elaboração de grande parte experimental deste trabalho

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo como apoio financeiro ao desenvolvimento científico

Ao Geam Carles Mendes dos Santos pela sua importante dedicação e contribuição durante a realização dos experimentos deste trabalho

Ao amigo Giovany Michely Pinto da Cruz pela sua fiel amizade e por compartilharmos vários momentos importantes durante estes anos

Às colegas Roberta Ribeiro Coelho, Crystianne Calado Lima Tomé e Maria Amélia Carneiro Bezerra pela amizade e envolvimento na mesma luta em busca de nossos ideais

Aos demais colegas Alexandre Vasconcelos de Miranda, Ana Vaneska Passos Meireles, Emmanuel Prata de Souza, Juliana Neves da Costa, Liana Barbosa Macêdo, Michelle Rabelo, Pedro Marcos Gomes Soares, Ricardo de Freitas Lima e Socorro Vanesca Frota Madeira pela convivência e companheirismo

Ao Francisco Evanir G. de Lima pelo apoio nas atividades laboratoriais

Às secretárias Silvia Maria Azevedo de Lima e Aura Rhanes Yida pela atenção e pelos seus trabalhos informativos da secretaria

À bibliotecária Eliene Maria Vieira de Moura pela revisão estrutural deste trabalho

A todos a minha gratidão.

Tens que aprender que tu és o teu próprio instrutor. O que necessitas é encontrar a ti mesmo um pouco a cada dia

De Fernão Capelo Gaivota

Richard Bach

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FUNCIONAIS DO ESTÔMAGO	34
1.1.1 Morfologia e histologia do estômago	34
1.1.2 Mecanismos neurogênicos do estômago	36
1.2 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO	40
1.2.1 A molécula de miosina	41
1.2.2 Processo de fosforilação da molécula de miosina e contração do músculo liso	42
1.2.3 Mecanismos alternativos reguladores da contração do músculo liso	44
1.2.4 Formas de acoplamento excitação-contração do músculo liso	47
1.2.4.1 Acoplamento eletromecânico	47
1.2.4.2 Acoplamento farmacomecânico	48
1.3 MECANISMOS IÔNICOS DA FISIOLOGIA DO MÚSCULO LISO ...	49
1.3.1 Canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC)	49
1.3.1.1 Outras vias para o influxo e regulação do cálcio intracelular	51
1.3.2 Canais de potássio	52
1.3.2.1 Superfamília – 1	54

1.3.2.1.1	Canais de potássio dependentes de voltagem (K_V).....	54
1.3.2.1.2	Canais de potássio ativados pelo cálcio intracelular (K_{Ca}).....	55
1.3.2.2	Superfamília – 2.....	56
1.3.2.2.1	Canais retificadores internos de potássio (K_{IR}).....	56
1.3.2.2.2	Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}).....	57
1.3.3	Canais de cloreto.....	58
1.3.3.1	Acúmulo intracelular de cloreto.....	58
1.3.3.1.1	Trocador cloreto-bicarbonato (Cl^-/HCO_3^-).....	60
1.3.3.1.2	Co-transporte de $Na^+/K^+/2Cl^-$	60
1.3.3.1.3	Bomba III.....	61
1.3.3.2	Canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular (Cl_{Ca}).....	63
1.3.3.2.1	Farmacologia e fisiologia dos canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular...	65
1.3.3.2.1	Estruturas dos principais compostos químicos bloqueadores dos canais de cloreto.....	70
1.3.3.3	Canais de cloreto ativados pelo volume celular (Cl_{SWELL}).....	73
1.3.3.4	Família CLC de canais de cloreto e suas implicações genéticas nas doenças.....	75
1.4	EFEITOS INDUZIDOS POR AGONISTAS NO ESTÔMAGO.....	78
1.4.1	Efeitos da 5-hidroxitriptamina (serotonina).....	78
1.4.2	Efeitos da acetilcolina.....	82
1.4.3	Efeitos da prostaglandina- $F_{2\alpha}$	83

1.5	OBJETIVOS.....	87
1.5.1	Objetivos gerais.....	87
1.5.2	Objetivos específicos.....	87
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
2.1	AVALIAÇÕES EM FUNDO DE ESTÔMAGO.....	89
2.1.1	Medidas de contratilidade.....	89
2.1.2	Medidas eletrofisiológicas.....	94
2.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS.....	96
2.3	DROGAS E PREPARO DAS SOLUÇÕES DE USO EXPERIMENTAL.....	97
2.4	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS.....	98
2.4.1	Avaliação dos agentes inibidores da contração.....	98
2.4.2	Experimentos em solução zero-cálcio (0Ca).....	99
2.4.3	Experimentos em solução zero-cloreto (0Cl).....	100
2.4.4	Experimentos em solução hipotônica (SH).....	101
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	102
3	RESULTADOS.....	104
3.1	EFEITOS DOS BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CLORETO SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR AGONISTAS E PELO CLORETO DE POTÁSSIO.....	104
3.1.1	Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio.....	104
3.1.2	Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	106
3.1.3	Efeitos do ácido niflúmico e da levromacalina sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio.....	110

3.1.4	Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela acetilcolina e pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$	112
3.1.5	Efeitos da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$	116
3.1.6	Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e pela prostaglandina- $F'_{2\alpha}$	120
3.1.7	Efeitos do DCDPC sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e pelo cloreto de potássio.....	124
3.1.8	Efeitos do DIDS sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e pelo cloreto de potássio.....	128
3.2	EFEITOS DOS BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CLORETO E DE CÁLCIO SOBRE AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS E ELÉTRICAS INDUZIDAS PELA SOLUÇÃO HIPOTÔNICA	131
3.2.1	Curva de hipotonicidade-resposta	131
3.2.2	Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica	133
3.2.3	Efeitos da nifedipina e da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica	137
3.2.4	Efeitos do ácido niflúmico, DIDS, tamoxifeno e do NPPB sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	140
3.2.5	Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre a despolarização da membrana induzida pela solução hipotônica	147
4	DISCUSSÃO.....	150
4.1	CANais DE CLORETO ATIVADOS PELO CÁLCIO INTRACELULAR.....	151
4.1.1	Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina, prostaglandina $F_{2\alpha}$ e cloreto de potássio	151

4.1.2	Efeitos do DCDPC e do DIDS sobre as respostas induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e cloreto de potássio...	162
4.2	CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO VOLUME CELULAR ...	164
5	CONCLUSÕES.....	171
5.1	SOBRE OS CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO CÁLCIO INTRACELULAR - Cl_{Ca}	171
5.2	SOBRE OS CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO VOLUME CELULAR – Cl_{SWELL}	172
	SUMMARY.....	173
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
7	ANEXOS.....	221
	Anexo A: Tabela demonstrativa da composição química das soluções fisiológicas utilizadas nos experimentos	222
	Anexo B: Cálculo estimativo das alterações do potencial de membrana induzidas pela solução hipotônica	224
	Anexo C: Selective inhibitory effects of niflumic acid on 5-HT-induced contraction of the rat isolated stomach fundus. <i>Br. J. Pharmacol.</i> , v. 130, p. 678-684, 2000.....	227
	Anexo D: Efeitos anti-espasmódicos do 3',5-diclorofenilamina 2-carboxílico em fundo de estômago de rato. <i>Ciências e Tecnologia – Revista da Universidade Estadual do Ceará</i> , v. 2, n.1, p. 59-63, 2000.....	235

LISTA DE ABREVIATURAS

$I_{Cl(Ca)}$	Correntes de cloreto ativadas pelo cálcio intracelular
$C_{l(Ca)}$	Canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular
I_{SWELL}	Correntes de cloreto ativadas pelo volume celular
C_{lSWELL}	Canais de cloreto ativados pelo volume celular
STIC	Correntes espontâneas transitórias para dentro (Spontaneous transient inward currents)
STOC	Correntes espontâneas transitórias para fora (Spontaneous transient outward currents)
VDCC	Canais de cálcio dependentes de voltagem
I_K	Correntes de potássio
K_V	Canais de potássio dependentes de voltagem
BK_{Ca}	Canais de potássio de alta condutância ativados pelo cálcio
SK_{Ca}	Canais de potássio de baixa condutância ativados pelo cálcio
K_A	Canais de potássio tipo A
K_{ATP}	Canais de potássio inibidos pelo ATP
K_{IR}	Canais de potássio retificadores para dentro
K_{Na}	Canais de potássio sensíveis ao sódio
K_{pH}	Canais de potássio sensíveis ao pH
ROCC	Canais de cálcio operados por receptores
NSCC	Canais catiônicos não seletivos
$[Ca]_i$	Concentração de cálcio intracelular no citosol
E_m	Potencial de equilíbrio eletroquímico da membrana celular
E_{Cl}	Potencial de equilíbrio eletroquímico do cloreto
E_K	Potencial de equilíbrio eletroquímico do potássio
E_{Na}	Potencial de equilíbrio eletroquímico do sódio
E_{Ca}	Potencial de equilíbrio eletroquímico do cálcio
SNC	Sistema nervoso central
SNA	Sistema nervoso autônomo

SNE	Sistema nervoso entérico
NANC	Fibras nervosas não adrenérgicas e não colinérgicas
NFA	Ácido niflúmico
MFA	Ácido mefenâmico
FFA	Ácido flufenâmico
TFA	Ácido tolfenâmico
DCDPC	Ácido 3',5-diclorodifenilamina-2-carboxílico
MDPC	Ácido 4'-metildifenilamina-2-carboxílico
DIDS	Ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico
SITS	Ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico
DNDS	Ácido 4,4'-dinitrostilbeno-2,2'-dissulfônico
DADS	Ácido 4,4'-diaminostilbeno-2,2'-dissulfônico
NPPB	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico
TAM	Tamoxifeno
IAA-94	Ácido indaniloxiaético-94
A-9-C	Ácido antraceno-9-carboxílico
AA	Ácido araquidônico
LEV	Levcromacalina
NIF	Nifedipina
TEA	Ácido tetraetilamônio
AP	Apamina
EGTA	Ácido etileno bis (b-aminoetil éter N,N,N',N' tetracético)
5-HT	5-Hidroxitriptamina ou serotonina
ACh	Acetilcolina
CCh	Carbamilcolina
PG	Prostaglandinas
GABA	Ácido gama aminobutírico
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
PHI	Peptídeo histidina-isoleucina
ADPRc	Adenosina difosfato-ribose cíclico

ATP	Trifosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
NO	Óxido nítrico
PKC	Proteína quinase-C
DAG	Diacilglicerol
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
MLCP	Miosina fosfatase de cadeia leve
LC	Cadeia leve da molécula de miosina
HC	Cadeia pesada da molécula de miosina
CaM	Calmodulina
CaMKII	Proteína quinase II dependente de calmodulina
CP	Calponina
CD	Caldesmon
RDV	Diminuição de Volume Regulatório (Regulatory volume decrease)
RVI	Aumento de Volume Regulatório (Regulatory volume increase)
CFTR	Regulador da condutância transmembrana na fibrose cística (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
TN	Solução de Tyrode normal
0CI-GLU	Solução zero-cloreto de gluconato (substituição dos sais de cloreto pelos sais de gluconato)
0CI-AC	Solução zero-cloreto de acetato (substituição dos sais de cloreto pelos sais de acetato)
SH	Solução hipotônica
SH-0CI-GLU	Solução hipotônica zero-cloreto de gluconato
SH-0CI-AC	Solução hipotônica zero-cloreto de acetato
TN-0Ca	Solução de Tyrode normal zero-cálcio
SH-0Ca	Solução hipotônica zero-cálcio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Registros eletrofisiológicos ilustrativos dos efeitos do NFA sobre as correntes de cloreto espontâneas transitórias para dentro (STIC) e evocadas por agonistas em células isoladas de veia porta de coelhos	28
Figura 2	Modelo hipotético para os efeitos inibitórios do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela 5-HT em fundo de estômago de rato	31
Figura 3	Registro eletrofisiológico mostrando os efeitos do tamoxifeno sobre as correntes de cloreto induzidas pela solução hipotônica (I_{SWELL}) em células isoladas de veia porta de coelhos	33
Figura 4	Esquema ilustrativo da estrutura molecular da miosina mostrando o sítio de fosforilação da cadeia leve da miosina....	42
Figura 5	Estruturas moleculares planas dos principais compostos químicos bloqueadores dos canais de cloreto	72
Figura 6	Fotografias ilustrativas da técnica de dissecação, preparação e montagem das tiras de fundo de estômago de rato	93
Figura 7	Esquema representativo dos protocolos eletrofisiológicos utilizados na avaliação das alterações elétricas induzidas pela solução hipotônica sobre a membrana celular.....	96
Figura 8	Esquema representativo dos protocolos realizados para avaliação dos efeitos dos agentes inibidores da contração contra as respostas contráteis induzidas por agonistas e pela solução hipotônica.....	99

Figura 9	Esquema representativo dos protocolos realizados na avaliação das respostas contráteis induzidas por agonistas e pela solução hipotônica em meio isento de cálcio (0Ca).....	100
Figura 10	Esquema representativo dos protocolos realizados na avaliação das respostas contráteis induzidas por agonistas e pela solução hipotônica em meio isento de cloreto (0Cl).....	101
Figura 11	Esquema representativo dos protocolos realizados para avaliação dos efeitos da solução zero-cálcio, zero-cloreto e dos bloqueadores dos canais de cálcio e cloreto contra as respostas contráteis induzidas pela solução hipotônica.....	102
Figura 12	Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio.....	105
Figura 13	Ausência de efeitos inibitórios do DMSO sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	107
Figura 14	Ausência de efeitos inibitórios do DMSO sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio.....	107
Figura 15	Efeitos do ácido niflúmico sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	108
Figura 16	Efeitos do ácido niflúmico isolado ou combinado com a nifedipina sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	109
Figura 17	Efeitos do ácido niflúmico e da levcromacalina sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio.....	111
Figura 18	Efeitos do ácido niflúmico sobre as respostas contráteis induzidas pela acetilcolina.....	113

Figura 19	Efeitos do ácido niflúmico sobre as respostas contráteis induzidas pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$	114
Figura 20	Efeitos da nifedipina sobre as contrações induzidas pela acetilcolina.....	115
Figura 21	Efeitos da nifedipina sobre as contrações induzidas pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$	115
Figura 22	Efeitos da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	117
Figura 23	Efeitos da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela acetilcolina.....	118
Figura 24	Efeitos da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$	119
Figura 25	Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	121
Figura 26	Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela acetilcolina.....	122
Figura 27	Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$	123
Figura 28	Efeitos do DCDPC sobre as respostas contráteis induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	125
Figura 29	Efeitos do DCDPC sobre as respostas contráteis induzidas pela acetilcolina.....	126
Figura 30	Efeitos do DCDPC sobre as respostas contráteis induzidas pelo cloreto de potássio.....	127

Figura 31	Efeitos do DIDS sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina.....	129
Figura 32	Efeitos do DIDS sobre as contrações induzidas pela acetilcolina e pelo cloreto de potássio.....	130
Figura 33	Curva de hipotonicidade-resposta induzida por diferentes graus de hipotonicidade, variando a concentração de cloreto de sódio.....	132
Figura 34	Efeitos da substituição do cloreto pelo gluconato nas contrações induzidas pela solução hipotônica.....	135
Figura 35	Efeitos da substituição do cloreto pelo acetato nas contrações induzidas pela solução hipotônica.....	136
Figura 36	Efeitos da nifedipina sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	138
Figura 37	Efeitos da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	139
Figura 38	Ausência de efeitos inibitórios do DMSO sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	142
Figura 39	Efeitos do ácido niflúmico sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	143
Figura 40	Efeitos do DIDS sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	144
Figura 41	Efeitos do tamoxifeno sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	145
Figura 42	Efeitos do NPPB sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.....	146

Figura 43 Efeitos do ácido niflúmico sobre as alterações elétricas induzidas pela solução hipotônica sobre a membrana celular..... 148

Figura 44 Efeitos da nifedipina sobre as alterações elétricas induzidas pela solução hipotônica sobre a membrana celular..... 148

RESUMO

O presente estudo investigou o envolvimento dos canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular ($Cl_{(Ca)}$) e pelo aumento do volume celular (Cl_{SWELL}) na contratilidade do músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato. Avaliamos os efeitos farmacológicos de vários bloqueadores de canais de cloreto: o ácido niflúmico (NFA), ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico (DIDS), ácido 3',5-diclorodifenilamina-2-carboxílico (DCDPC), ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico (NPPB) e o tamoxifeno (TAM), assim como o envolvimento dos gradientes de cálcio e cloreto transmembrana sobre as respostas contráteis induzidas pelos agonistas 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), acetilcolina (ACh) e prostaglandina- $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), pelo cloreto de potássio (KCl) e pela solução hipotônica (SH) em estômago de rato. Avaliamos também os efeitos eletrofisiológicos do NFA e da nifedipina (NIF) sobre as alterações elétricas induzidas pela SH sobre a membrana celular. O NFA inibiu, seletivamente, as contrações induzidas pela 5-HT, reduziu, em menor proporção, as respostas induzidas pela $PGF_{2\alpha}$ e não alterou os efeitos da ACh. Além disso, não alterou a contração induzida por 60mM e 20mM de KCl, sugerindo não interagir com os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) e nem ativar canais de potássio, respectivamente. Em contraste, os efeitos do DCDPC não foram seletivos, inibindo as contrações induzidas pela 5-HT, ACh e pelo KCl. O DIDS foi menos potente do que o NFA e DCDPC, inibindo as respostas induzidas por 60mM de KCl apenas em alta concentração. As contrações induzidas pela 5-HT foram mais sensíveis aos efeitos do NFA e à remoção do cálcio e cloreto extracelulares do que aquelas induzidas pela ACh e pela $PGF_{2\alpha}$. Esta diferença de sensibilidades entre os agonistas pode indicar o envolvimento de diferentes mecanismos de transdução de sinais intracelulares. A SH produziu contrações sensíveis ao NFA, as quais foram parcialmente dependentes do cloreto e totalmente dependentes do cálcio extracelulares. Adicionalmente, os experimentos

eletrofisiológicos demonstraram que o NFA inibiu a despolarização induzida pela SH enquanto que a NIF, um bloqueador seletivo para os VDCC, não mostrou qualquer efeito, possivelmente, sugerindo o envolvimento dos $Cl_{(Ca)}$ nesse mecanismo. Desde que, nas concentrações empregadas, o NFA não iniba os VDCC e nem ative canais de potássio, nossos dados são condizentes com a nossa hipótese de que “a ativação dos canais de cloreto despolariza o músculo liso, permitindo o influxo de cálcio via VDCC, produzindo contração”. Concluindo, nossos resultados sugerem que os $Cl_{(Ca)}$ possuam importante papel funcional no mecanismo de contração induzido pela 5-HT e que o NFA possa ser uma ferramenta farmacológica adequada para os estudos funcionais desses canais em músculo liso de estômago de rato.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

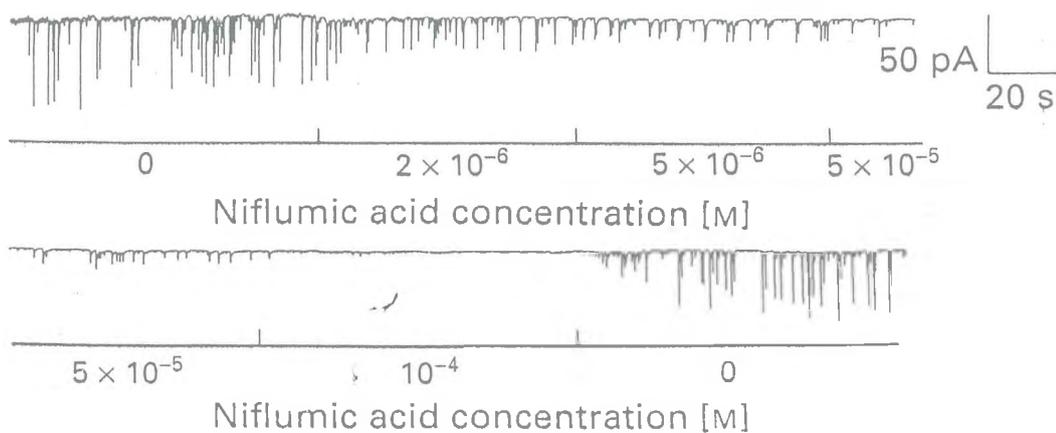
O estado de contração do músculo liso é regulado por muitos fatores, onde os neurotransmissores, liberados do sistema nervoso autônomo, e outras substâncias biologicamente ativas, provenientes da circulação ou liberadas localmente, exercem seus efeitos contráteis ou relaxantes sobre a musculatura lisa. Entretanto, há evidências de que as respostas induzidas por alguns agonistas possam ocorrer dependente ou independentemente de alterações no potencial de membrana (Somlyo & Somlyo, 1968; Bolton, 1979; Bolton & Large, 1986).

Nos últimos dez anos as pesquisas mostram um crescente interesse no possível papel fisiológico das correntes de cloreto ativadas pelo cálcio ($ICl_{(Ca)}$) nas respostas contráteis induzidas pelos neurotransmissores (Large & Wang, 1996; Kitamura & Yamazaki, 2001). Vários trabalhos mostram a existência das $ICl_{(Ca)}$ em células de músculo liso de diferentes tecidos como, por exemplo, em esôfago de coelhos (Akbarali & Giles, 1993), artérias de orelha de coelhos (Amédée *et al.*, 1990), cultura de células vasculares (Holevinsky *et al.*, 1994), miócitos vasculares (Pacaud *et al.*, 1991), músculo liso respiratório (Janssen & Sims, 1992, 1993, 1995), miócitos de artéria coronária de coelhos (Lamb *et al.*, 1994). Estudos funcionais em músculo liso vascular de rato mostram o envolvimento da condutância de cloreto nas contrações induzidas por agonistas (Criddle *et al.*, 1996, 1997; Lamb & Barna, 1998a,b). Compostos como os fenamatos (NFA, MFA, FFA, TFA), DIDS, SITS, A-9-C, DCDPC e NPPB têm sido utilizados como bloqueadores das $ICl_{(Ca)}$ em vários tipos de tecidos como em veia porta de coelho (Hogg *et al.*, 1994a,b; Greenwood & Large, 1995, 1997), veia porta de rato (Kirkup *et al.*, 1996b), miócitos ventriculares de cobaias (Furukawa *et al.*, 1993), miócitos de traquéia (Janssen & Sims, 1992, 1993), oócitos de *Xenopus* (White & Aylwin, 1990; Wu & Hamill, 1992), aorta isolada de rato (Criddle *et al.*, 1996; Lamb & Barna, 1998a,b), leito mesentérico vascular perfundido de rato (Criddle *et al.*, 1997),

traquéia isolada de rato (Teixeira *et al.*, 2000) e artérias cerebrais de rato (Nelson *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria desses compostos, quando utilizados nas concentrações necessárias para inibir as $ICl_{(Ca)}$, afeta a condutância de outros canais iônicos dificultando a dissecação farmacológica, uma condição importante a ser considerada no estudo de correntes iônicas isoladas. Estudos em células isoladas de músculo liso vascular mostram que o ácido niflúmico (NFA), uma droga anti-inflamatória aromática não esteroide do grupo dos fenamatos, inibe as $ICl_{(Ca)}$ em concentrações inferiores às que, geralmente, poderiam influenciar outras condutâncias iônicas ($\geq 50-100\mu M$) (Pacaud *et al.*, 1989a; Janssen & Sims, 1992; Akbarali & Giles, 1993; Hogg *et al.*, 1994b; Lamb *et al.*, 1994), sugerindo maior seletividade do ácido niflúmico em relação aos outros bloqueadores, constituindo, portanto, uma ferramenta farmacológica valiosa para estudos funcionais destas correntes em músculo liso.

Estudos eletrofisiológicos em células isoladas de músculo liso vascular mostram a presença de correntes transitórias ativadas pela liberação espontânea e periódica de cálcio do retículo sarcoplasmático, denominadas de STIC (correntes transitórias espontâneas para dentro) e STOC (correntes transitórias espontâneas para fora). Estas correntes decorrem da abertura dos canais de cloreto e potássio, respectivamente. Para ilustrar as correntes de cloreto espontâneas transitórias e aquelas evocadas por agonistas, tomamos como exemplo o trabalho de Hogg *et al.*, (1994a), onde os registros eletrofisiológicos das correntes de cloreto aparecem como deflexões para baixo, as quais foram inibidas na presença de baixas concentrações de ácido niflúmico (Fig.1).

a)



b)

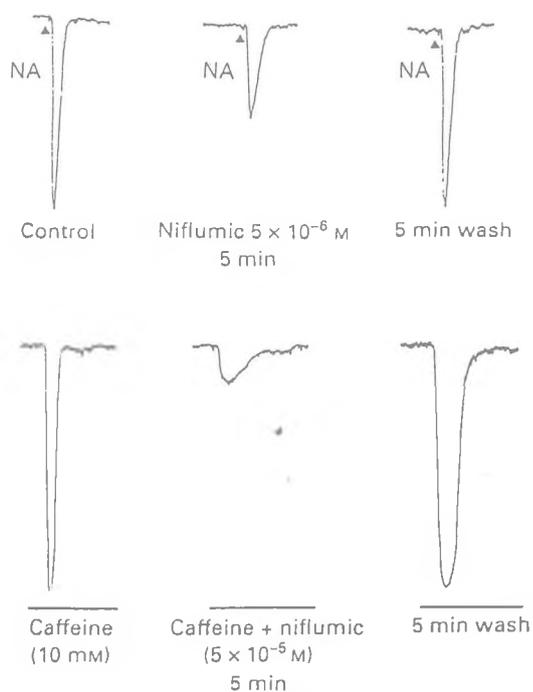


Fig. 1 – a) - Efeitos inibitórios do ácido niflúmico sobre as correntes de cloreto espontâneas transitórias (STIC); **b)** - Efeitos inibitórios do ácido niflúmico sobre as ICl_{Ca} induzidas pela noradrenalina e pela cafeína, em células isoladas de veia porta de coelhos (Hogg *et al.*, 1994a).

Estudos funcionais reportam que o ácido niflúmico produz efeitos inibitórios com maior ou menor potência sobre as respostas contráteis induzidas por diferentes agonistas. Por exemplo, um estudo em aorta de rato mostra que o ácido niflúmico reduz a amplitude da resposta contrátil induzida pela noradrenalina (Criddle *et al.*, 1996). Mas, em leito mesentérico vascular perfundido, a potência inibitória do NFA foi maior sobre as respostas pressoras induzidas pela 5-hidroxitriptamina do que aquelas induzidas pela noradrenalina (Criddle *et al.*, 1997), enquanto a resposta contrátil induzida pela acetilcolina foi completamente insensível em traquéia isolada de rato (Teixeira *et al.*, 2000). Isto sugere que as $ICl_{(Ca)}$ tenham um envolvimento fisiológico mais relevante no mecanismo de ação da 5-HT do que nos mecanismos da noradrenalina e acetilcolina.

As características eletrofisiológicas das $ICl_{(Ca)}$ reportadas em músculo liso sustentam a idéia de sua importância fisiológica por várias razões. Primeiro, a concentração intracelular de cloreto ocorre acima do valor de sua distribuição passiva (Casteels, 1971; Aickin & Vermue, 1983; Aickin & Brading, 1983, 1984; Davis, 1992; Koncz & Daugirdas, 1994; Davis *et al.*, 2000), gerando um forte gradiente eletroquímico para a saída de cloreto da célula. Segundo, como conseqüência de sua distribuição passiva, o potencial de equilíbrio eletroquímico do cloreto se estabelece na faixa de -20 a -30 mV (Aickin & Brading, 1982; Aickin & Vermue, 1983), um valor mais positivo em relação ao potencial de equilíbrio da membrana (-75 a -50 mV) (Hirst & Edwards, 1989; Nelson *et al.*, 1990) e à faixa de ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (-60 a -40 mV) (Nelson *et al.*, 1990). Terceiro, desde que vários agonistas aumentam a concentração de cálcio no citosol pela sua liberação dos estoques intracelulares (Pacaud, *et al.*, 1989a, 1992; Amédée *et al.*, 1990; Klöckner, 1993; Ohta *et al.*, 1993; Liu & Farley, 1996; Janssen, 1996; Guibert *et al.*, 1997; Wang & Kotlikoff, 2000), isto ativa as $ICl_{(Ca)}$ levando à despolarização para a faixa do valor do potencial de membrana capaz de ativar os VDCCs permitindo a entrada de cálcio. Estas

três condições fundamentam, eletrofisiologicamente, que a ativação das $ICl_{(Ca)}$ possa ser um potente mecanismo iônico desencadeante da despolarização da membrana celular, sugerindo que este seja uma possível via que leve ao influxo de cálcio e, conseqüentemente, a contração do músculo liso (Fig. 2). Recentemente, esse mesmo mecanismo foi publicado onde o ácido niflúmico inibiu, seletivamente, as contrações induzidas pela 5-HT em traquéia isolada de rato, sugerindo a diferença no mecanismo de inibição entre o NFA e nifedipina (Teixeira *et al.*, 2000). Além disso, os canais de cloreto estão, fisiologicamente, envolvidos em muitas outras funções celulares, incluindo o transporte iônico epitelial, regulação da excitabilidade celular, estabilização do potencial transmembrana, regulação do volume celular e controle do pH intracelular (Gögelein, 1988; Liedtke, 1989; Hoffmann & Dunham, 1995; Chipperfield & Harper, 2000; Kitamura & Yamazaki, 2001), que os fazem alvos para o possível desenvolvimento de drogas com novas perspectivas terapêuticas.

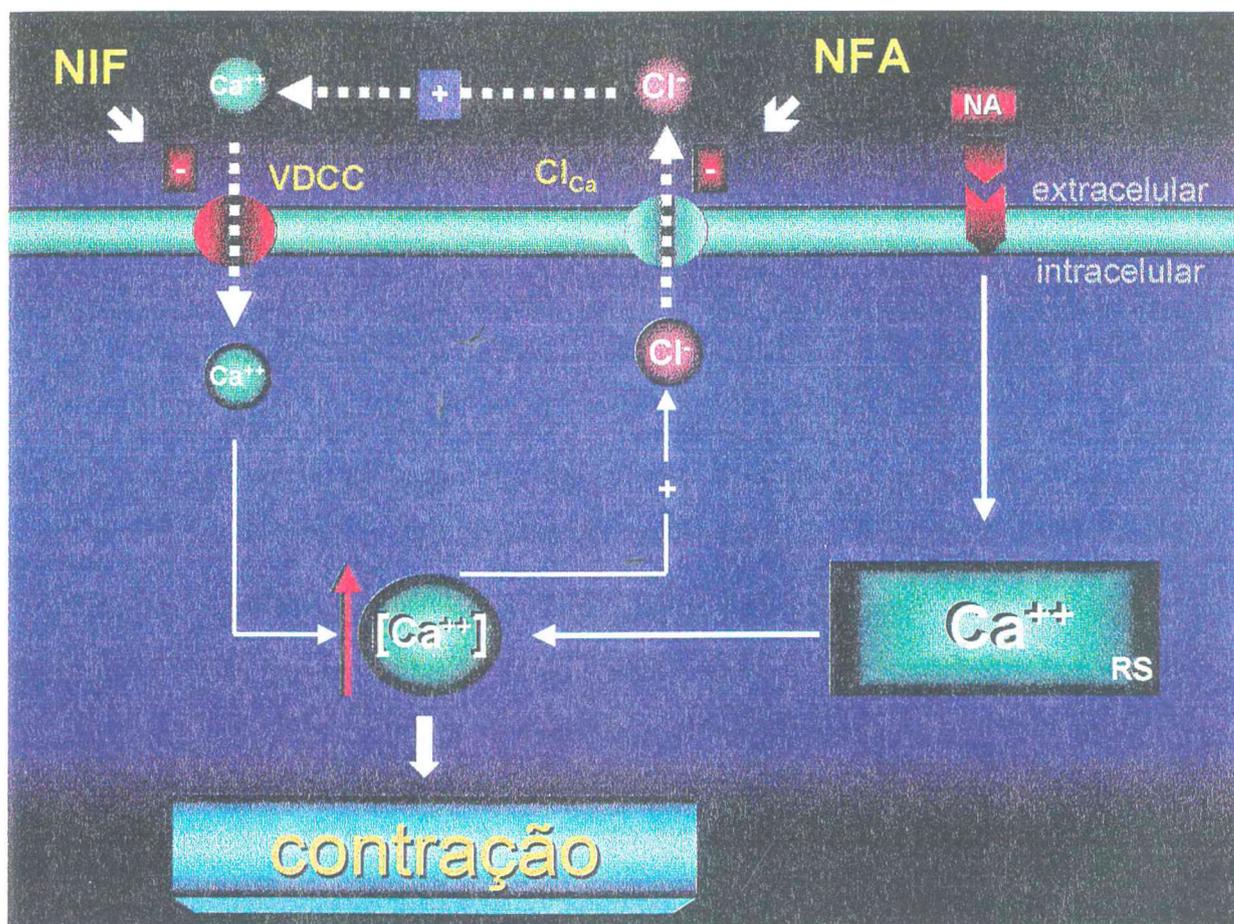


Fig. 2 – Modelo hipotético para os efeitos inibitórios do ácido niflúmico (NFA) e da nifedipina (NIF) sobre as contrações induzidas pela 5-HT. A ativação dos receptores de membrana pela 5-HT estimula à liberação de cálcio intracelular do retículo sarcoplasmático (RS), induzindo a abertura dos Cl_{Ca} . O subsequente fluxo de cloreto para fora da célula despolariza a membrana celular levando à abertura dos VDCC e entrada do cálcio extracelular. O aumento da concentração do cálcio intracelular estimula a contração do músculo liso. Este modelo prevê as equivalentes proporções de efeitos inibitórios do NFA e da NIF, sozinhos ou associados, sobre as respostas induzidas pela 5-HT. Outras vias para a contração do músculo liso estão presentes, independentemente, deste mecanismo.

Nos últimos anos vários estudos reportam a existência de um outro tipo de corrente de cloreto ativada pela hipotonicidade (I_{SWELL}) que está presente em vários tipos de células. Exemplificando, essas correntes podem ser mostradas pelos registros eletrofisiológicos em células isoladas de veia porta de coelhos, obtidos do trabalho de Greenwood & Large (1998), as quais são interpretadas pela linha de deflexão gradativa para baixo e que foram, sensivelmente, inibidas pelo tamoxifeno (Fig. 3). Outros estudos mostram que as I_{SWELL} estão presentes em diversos tecidos como no epidídimo (Chan *et al.*, 1994), células epiteliais de intestino humano (Kubo & Okada, 1992), células do ducto coletor cortical renal (Schwiebert *et al.*, 1994), miócitos cardíacos de coelhos (Hagiwara *et al.*, 1992), células osteoblásticas de rato (Gosling *et al.*, 1995) e osteoclastos de coelhos (Kelly *et al.*, 1994), mas em músculo liso não vascular existe pouca informação sobre a sua importância fisiológica. Entretanto, as propriedades eletrofisiológicas das I_{SWELL} parecem distintas daquelas $ICl_{(\text{Ca})}$ e que contribuem para a manutenção do tônus miogênico em artérias cerebrais de rato (Nelson *et al.*, 1997). Neste estudo, os antagonistas de canais de cloreto, DIDS e IAA-94, dilataram e hiperpolarizaram as células de artérias cerebrais que tiveram a pressão intravascular previamente aumentada. Desde que o ácido niflúmico, o mais seletivo bloqueador das $ICl_{(\text{Ca})}$, não teve efeito dilatador sobre os vasos pressurizados, postulou-se que as $ICl_{(\text{Ca})}$ não eram as responsáveis pela resposta miogênica neste tecido. Estudo subsequente em músculo liso de veia porta de coelhos reforça que a farmacologia das I_{SWELL} seja, realmente, diferente das $ICl_{(\text{Ca})}$ e que possuem algumas similaridades com aquela envolvida na resposta miogênica reportada em artérias cerebrais de ratos (Greenwood & Large, 1998). Neste estudo, a I_{SWELL} foi, potentemente, inibida pelo tamoxifeno (Fig.3), uma droga anti-estrogênica, e pelo DIDS, um derivado stilbeno, mas o ácido niflúmico produziu inibição das I_{SWELL} ($IC_{50} = 100\mu\text{M}$) em concentrações muito acima, daquelas necessárias para inibir as $ICl_{(\text{Ca})}$, no mesmo tipo de tecido (Hogg *et al.*, 1994a; Greenwood & Large, 1995). Em contraste, o ácido niflúmico

(10 μ M) e o DIDS (100 μ M) inibiram as I_{SWELL} em miócitos gástricos de cobaios (Xu *et al.*, 1997), sugerindo que no estômago as $\text{Cl}_{\text{(Ca)}}$ possam ter um papel fisiológico diferente daqueles observados em tecidos vasculares sobre as respostas contráteis induzidas por hipotonicidade. Entretanto, é também possível que os Cl_{SWELL} sejam sensíveis ao NFA em estômago de rato.

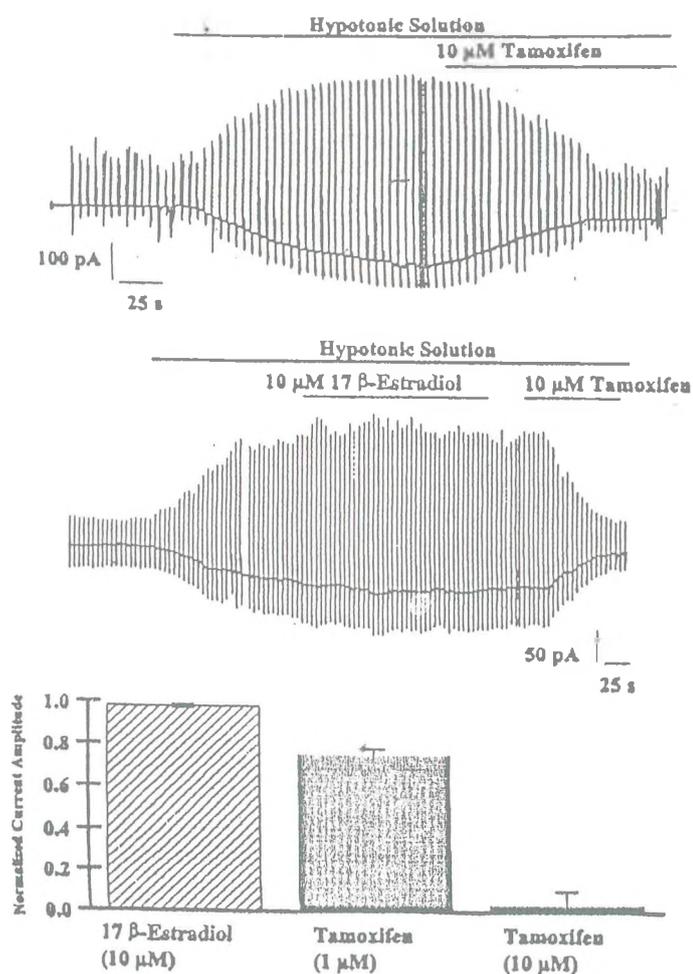


Fig. 3 – Registro eletrofisiológico mostrando os efeitos do tamoxifeno sobre as correntes de cloreto induzidas pela solução hipotônica (I_{SWELL}) em células isoladas de veia porta de coelhos (Greenwood & Large, 1998).

Portanto o presente trabalho busca investigar, basicamente, o envolvimento dos canais de cloreto nas respostas induzidas por agonistas e nas contrações induzidas pela solução hipotônica em músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato.

1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FUNCIONAIS DO ESTÔMAGO

1.1.1 Morfologia e histologia do estômago

O estômago é uma porção dilatada do intestino situado entre o esôfago e o intestino delgado, delimitado superior e inferiormente pelos orifícios cárdia e piloro, respectivamente.

Embora a divisão do estômago em partes seja convencional, classicamente, é descrito como uma estrutura em forma de “J” constituindo, portanto, uma porção vertical e outra horizontal. Possui duas faces, anterior e posterior, duas curvaturas, direita ou curvatura menor e esquerda ou curvatura maior e dois orifícios, cárdia, uma estrutura não valvular sem esfíncter, e piloro gastroduodenal, que possui um esfíncter bem definido denominado de válvula pilórica. A porção vertical do estômago compreende duas regiões: o fundo, esférico que se acomoda à face inferior do diafragma, e o corpo, que apresenta uma forma mais cilíndrica. A porção horizontal, constituída pelo antro e canal pilórico, tem a forma de um cone com o ápice localizado no piloro. A variação nas formas geométrica do estômago, esférica, cilíndrica e cônica permitem ao órgão uma perfeita adaptação morfofuncional (Cunha Melo *et al.*, 1993)

Histologicamente, o estômago está organizado em quatro camadas bem definidas dispostas em superposições e ordenadas de fora para dentro em serosa, muscular, submucosa e mucosa (Gabella, 1979). A serosa é uma dependência do peritônio que está intimamente aderida à camada muscular. A camada muscular é organizada em três planos, superficial, médio e interno, distinguidos pelas direções de suas fibras. O plano superficial é formado por

bras longitudinais, paralelas ao eixo do estômago, correspondendo a uma continuidade do músculo esofágico que, na região da cárdia, se divergem distribuindo-se por toda a extensão do estômago e convergindo para o piloro compondo a musculatura lisa longitudinal intestinal. O plano médio organiza-se em fibras circulares dispostas perpendicularmente ao eixo do estômago. Na cárdia estas fibras mesclam-se com as fibras circulares do esôfago e no intro tornam-se mais numerosas definindo um anel rico em fibras circulares entre o estômago e o duodeno, o esfíncter pilórico. O plano interno constitui uma malha de fibras oblíquas distribuídas irregularmente nas regiões do estômago, mostrando-se com escassez na curvatura menor, na metade direita da curvatura maior e em grande extensão da região pré-pilórica. Entre as camadas musculares longitudinais e circulares encontra-se o plexo gástrico (plexo de Auerbach). A submucosa está intimamente ligada à camada muscular e à mucosa gástrica. Esta camada assume grande importância nos fenômenos de absorção pela sua riqueza em vasos sanguíneos e abriga um importante plexo nervoso, o plexo submucoso (plexo de Meissner). A mucosa gástrica e o forramento interno do estômago, constituem uma das mais importantes barreiras do organismo pelas suas funções, sua estrutura e pelos processos patológicos que nela se instalam. A mucosa, por sua vez, divide-se em duas camadas, uma superficial constituída pelo epitélio e outra profunda denominada de córion ou derme. As células piteliais de revestimento mucoso estão em constante renovação e recobre as fímbrias gástricas, estas correspondem à desembocadura de 3 a 7 glândulas gástricas. O córion, região delimitado pela membrana basal e pela camada muscular da mucosa, é altamente povoada pelas glândulas gástricas que se distribuem desde a cárdia ao piloro. Fibras oriundas da camada muscular da mucosa se dirigem e envolvem as glândulas e, pela sua contração, desempenham papel importante no processo de secreção gástrica (Junha Melo *et al.*, 1993). Esta perfeita arquitetura biológica do estômago possui complexo sistema de controle funcional comandado pela integração do

sistema nervoso central e sistema nervoso entérico, envolvendo várias substâncias, peptídica ou não, de origem endócrina, parácrina e nervosa, como por exemplo, acetilcolina, noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, histamina, prostaglandina, substância-P, colicistoquinina, polipeptídeo intestinal vasoativo, somatostatina, secretina, gastrina, angiotensina, neuropeptídeo-Y, adenosina trifosfato, adenosina, encefalinas e outras (Hokfelt *et al.*, 1989; Elfvín *et al.*, 1993). Estudos com radioimunoensaios, histoquímicos e imunohistoquímicos, mostram que muitas destas substâncias são neurotransmissoras, embora os seus papéis fisiológicos não estejam completamente esclarecidos. Para outras delas, não se sabe se são liberadas por estímulos fisiológicos. Além disso, há dificuldades de serem classificadas como neurotransmissoras por serem também liberadas como secreção endócrina e parácrina (Pandolf, 1990).

1.1.2 Mecanismos neurogênicos do estômago

O trato gastrointestinal, em especial o estômago, possui uma inervação extrínseca, onde os nervos que o alcançam externamente, possuem seus corpos celulares localizados no sistema nervoso central (SNC), nos gânglios simpáticos e nos gânglios sensoriais. A inervação intrínseca possui seus corpos celulares nos gânglios intramurais, portanto no sistema nervoso entérico (SNE). Topograficamente, as fibras nervosas do estômago o alcançam em todas as suas camadas, desde a mucosa até as camadas musculares mais externamente. Isto significa que todas estas camadas recebem sinais de mensageiros neuronais e que os diferentes tipos células secretoras que compõem o epitélio gástrico liberam seus conteúdos endócrinos e parácrinos sob um controle nervoso (Ekblad *et al.*, 2000).

O estômago é uma estrutura repleta de receptores neurais que detectam várias formas de estímulos. O sistema sensorial do estômago é constituído por, aproximadamente, quatro quintos das fibras do vago abdominal, nas quais encontram-se os mecanorreceptores, quimiorreceptores e

osmorreceptores. Os nervos simpáticos transportam informação dos mecanorreceptores e, provavelmente, de nervos que respondem a estímulos dolorosos, conduzindo-as aos gânglios simpáticos e retornando pelas fibras pós-ganglionares ao estômago para produzir os efeitos.

As fibras aferentes viscerais constituem a primeira conexão dos arcos reflexos do sistema nervoso autônomo. Com algumas exceções, como ocorre nos reflexos axônicos locais do SNE, a maioria dos reflexos viscerais é mediada pelo sistema nervoso central. No trato gastrointestinal, grande parte dos estímulos são processados e transmitidos para os tecidos alvos locais sob o controle exclusivo do sistema nervoso entérico. Entretanto, há conexões extrínsecas através das fibras parassimpáticas aferentes do nervo vago de diferentes regiões do sistema gastrointestinal, como por exemplo, as fibras do fundo do estômago e dos gânglios mioentéricos que conduzem os estímulos ao SNC, passando pelo gânglio nodoso, para serem processados e transferidos para as fibras eferentes que levam a informação até ao sistema nervoso entérico ou células glandulares para produzir os efeitos. Para maiores detalhes sobre o sistema aferente do nervo vago em fundo de estômago de rato, sugerimos a leitura do trabalho de Berthoud & Powley (1992).

Os plexos nervosos, mioentérico e submucoso, estão interconectados e recebem do vago fibras parassimpáticas pré-ganglionares, em sua maior parte, excitatórias, apesar de algumas serem inibitórias. Algumas inervam diretamente as glândulas. As fibras parassimpáticas que chegam ao estômago são essencialmente pós-ganglionares e inervam diretamente o músculo liso, vasos sanguíneos e algumas células glandulares, mas possuem terminações nos plexos locais em que inibem a liberação de acetilcolina (Gershon, 1981). Outras fibras nervosas classificadas como não adrenérgicas não colinérgicas (NANC) também estão presentes sistema nervoso entérico, envolvendo a liberação de muitos outros neurotransmissores diferentes da acetilcolina e da noradrenalina, como é o caso da serotonina, óxido nítrico,

GABA, dopamina, adenosina trifosfato e vários peptídeos farmacologicamente ativos (Burnstock, 1972; Daniel, 1978; Pandol, 1990; Lefkowitz *et al.*, 1996).

Os receptores muscarínicos da acetilcolina consistem de pelo cinco tipos distintos. Na periferia esses receptores medeiam os sinais colinérgicos no sistema nervoso autônomo, embora os específicos papéis fisiológicos de cada um dos subtipos ainda estejam poucos elucidados (Matsui *et al.*, 2000). De um modo geral, o sistema colinérgico produz contração da musculatura lisa visceral mediada pela ação da acetilcolina sobre os receptores muscarínicos M_3 (Rang *et al.*, 1997b). Entretanto, há estudos sugerindo a participação dos receptores M_2 na contração do fundo de estômago de rato (Thomas & Ehlert, 1996). O sistema adrenérgico promove o relaxamento do músculo liso de estômago de rato pela ativação de receptores tipo β (Lefebvre *et al.*, 1984; Ma & Xu, 1990). Entretanto, o complexo sistema não adrenérgico não colinérgico (NANC) também produz relaxamento do fundo de estômago de rato pela liberação de vários neurotransmissores como o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico (NO) (Li & Rand, 1990; D'Amato *et al.*, 1992), mas a participação do NO e VIP como mediadores ou neurotransmissores no relaxamento via NANC estejam mais relacionados com a camada circular (Kamata *et al.*, 1993, 1997). Embora VIP e NO tenham sido considerados os principais neurotransmissores envolvidos no relaxamento muscular gástrico pelo sistema NANC, estudos mais recentes mostram que neurônios inibitórios podem liberar outros neurotransmissores como adenosina trifosfato (ATP), peptídeo histidina-isoleucina (PHI) (Curro & Preziosi, 1998). Desde que o relaxamento induzido pelo ATP seja sensível a apamina, sugere-se que o mecanismo relaxante induzido pelo ATP pode envolver a ativação dos canais de potássio ativados pelo cálcio, o que não ocorre com VIP e estimulação NANC (Lefebvre *et al.*, 1991). Assim, fica evidente que o relaxamento induzido pelo sistema NANC é um fenômeno complexo que envolve, além destes, muitos outros neurotransmissores e

substâncias localmente liberadas, cada qual com um papel funcional específico.

Desde 1870 descreveu-se a existência de células endócrina-parácrinas espalhadas pelo epitélio gastrointestinal. Estas células, ao receberem sinais químicos do conteúdo luminal, liberam suas secreções para os espaços intersticiais e sistema circulatório, podendo, portanto, exercer seus efeitos sobre as células do próprio sistema gastrointestinal ou à distância via corrente sanguínea. Como exemplo característico são as células enterocromafins que estocam e secretam 5-HT, uma das principais fontes reservas e biossíntese desta substância. Recentemente, muitas outras classes células endócrinas diferentes das enterocromafins foram identificadas por microscopia eletrônica e estudos imunohistoquímicos. Cada uma estoca e secreta um dos muitos agentes endócrinos, tais como gastrina, colicistoquinina, polipeptídeo inibitório gástrico, secretina, neurotensina, motilina e somatostatina. Geralmente são armazenados em forma de grânulos secretórios localizados na porção basal do citoplasma enquanto a superfície apical contém as microvilosidades luminiais. Com esta organização, as células respondem a estímulos químicos específicos para a liberação de seus grânulos de secreção. Entretanto, o mecanismo pelo qual as células percebem os sinais luminiais permanece desconhecido. Desde que cada classe de células endócrino-parácrina responde a estímulos específicos, isto sugere a existência de receptores específicos para os diferentes estímulos (Pandolf, 1990).

Portanto, a organização e controle funcional harmonioso do trato gastrointestinal demonstra ser um sistema complexo que funciona dentro de um perfeito sincronismo fisiológico entre o sistema nervoso central e sistema nervoso entérico. Neste circuito integrado de sistemas biológicos, há liberação de numerosos neurotransmissores, várias citocinas, secreções parácrinas e endócrinas que ainda se apresentam como desafios para a ciência descobrir os seus verdadeiros papéis fisiológicos. Como se não bastasse, o sistema

nervoso entérico é entendido como um segundo cérebro interativo com controles próprios e que ainda somos incapazes relacionar o seu complexo comportamento, como por exemplo, a perfeita integração de sua motilidade com as secreções gastrointestinais e como estão relacionadas com a atividade individual de seus próprios neurônios (Gershon, 1999).

1.2 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO

Em condições fisiológicas, a concentração basal de cálcio no citosol permite que o músculo se mantenha sob moderado grau de contração, comumente referido como tônus basal, a partir do qual o músculo pode contrair ou relaxar. Este equilíbrio basal é controlado por mecanismos celulares intrínsecos reguladores do cálcio intracelular e modulada por estímulos fisiológicos neuro-hormonais excitatórios ou inibitórios. Desde que músculo liso possa ser induzido a contrair ou relaxar, é importante conhecer os mecanismos bioquímicos, as formas de acoplamento e os mais estudados canais iônicos envolvidos no processo de excitação-contração.

O interesse nos mecanismos bioquímicos envolvidos na contração do músculo liso teve grande progresso a partir da década de 1960. Desde então, concebeu-se a idéia de que o aumento da $[Ca]_i$ seria o principal mecanismo regulador da contração do músculo liso, onde o cálcio livre no citosol, ligando-se à calmodulina, ativaria a enzima miosina quinase de cadeia leve (MLCK) iniciando o processo de fosforilação da molécula de miosina. Mas, somente em 1987, Gerthoffer descreveu pela primeira vez a relação entre a fosforilação e o desenvolvimento de força muscular. De fato, quando uma célula muscular lisa é estimulada, a concentração de cálcio no citosol varia de 140nM para 500-700 nM (Williams & Fay, 1986).

O cálcio intracelular, além interagir diretamente com as proteínas contráteis, pode ativar vários tipos de canais iônicos, como por exemplo, os canais de cloreto ativados pelo cálcio levando à despolarização da membrana

celular (Amédée *et al.*, 1990; Pacaud *et al.*, 1992; Akbarali & Gilies, 1993; Lamb *et al.*, 1994; Greenwood & Large, 1997, 1998). Adicionalmente, estudos mostram que o relaxamento muscular é acompanhado pela redução na $[Ca]_i$ (Tansey *et al.*, 1990; D'Angelo *et al.*, 1992) ou pela ativação de canais de potássio ativados pelo cálcio intracelular, hiperpolarizando a célula (Smith & Jones, 1985; Quayle *et al.*, 1997). Isto mostra que, além dos mecanismos bioquímicos, há o envolvimento de potentes mecanismos eletrofisiológicos que participam diretamente da fisiologia do músculo liso. Entretanto, sabe-se da existência de outros mecanismos, dependentes ou não do cálcio, envolvidos na homeostase do músculo liso, porém a maneira mais imediata e eficiente de poder intervir, farmacologicamente, no processo de contração do músculo liso seria interferir nos mecanismos reguladores da concentração do cálcio intracelular.

1.2.1 A molécula de miosina

A molécula de miosina é composta de duas cadeias pesadas (HC) e dois pares de cadeias leves (LC). As cadeias pesadas, com aproximadamente 230 kDa cada uma, formam uma α -hélice em forma de bastão, constituindo a cauda da molécula. As cadeias leves, com aproximadamente 20 kDa (LC₂₀) e 17 kDa (LC₁₇), constituem cada uma das duas cabeças na mesma extremidade da miosina, sendo que a LC₂₀ contém o sítio de fosforilação da miosina pela enzima MLCK. A miosina pode ser dividida em duas porções de domínios funcionais. Uma, a maior porção da extremidade da cauda, a meromiosina leve (LMM), representa a região de interação com as outras moléculas para formar o filamento de miosina. Outra, composta principalmente pelas cabeças e uma pequena porção intermediária com a cauda, a meromiosina pesada (HMM), que representam as pontes cruzadas. Por sua vez, a HMM pode ser subdividida em segmentos S₁ e S₂. O primeiro, as porções globulares que perfazem as cabeças propriamente ditas, contém

os sítios da hidrólise do ATP e ligação com a actina. O segundo, é a parte fina intermediária entre o corpo e as cabeças (Allen & Walsh, 1994).

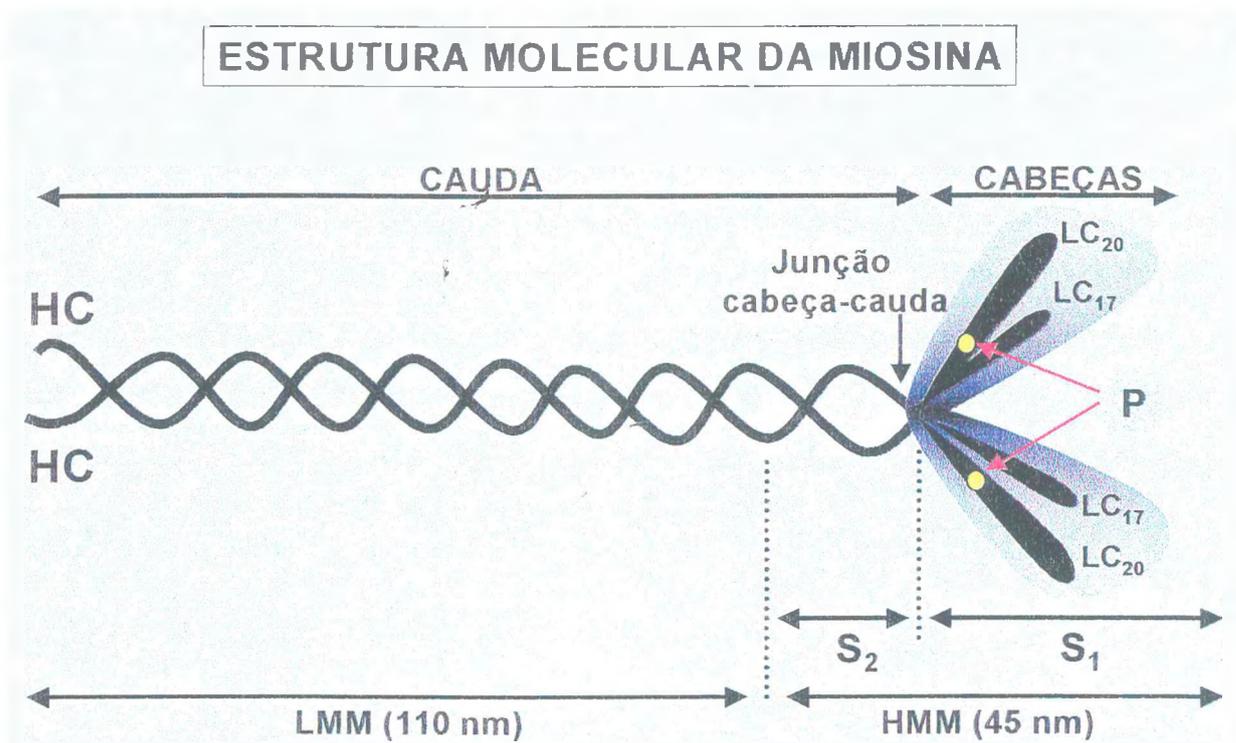


Fig. 4 – Esquema ilustrativo da estrutura molecular da miosina mostrando o sítio de fosforilação da cadeia leve da miosina (Allen & Walsh, 1994)

1.2.2 Processo de fosforilação da molécula de miosina e contração do músculo liso

O processo de fosforilação e desfosforilação da molécula de miosina envolve a atividade de duas enzimas principais, miosina quinase de cadeia leve (MLCK) e miosina fosfatase de cadeia leve (MLCP), respectivamente. É um mecanismo eficiente que está presente em muitos processos fisiológicos como, por exemplo, na agregação plaquetária, na retração das células endoteliais, na exocitose de neurotransmissores, na migração celular, inclusive inicia o processo de contração do músculo liso (Kamm & Stull, 1985; Ikebe, *et al.*, 1987).

Estímulos neuronais ou hormonais elevam os níveis de cálcio no citosol pela entrada do cálcio extracelular via VDCC ou ROCC e pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, principalmente do retículo sarcoplasmático, via canais de cálcio ativados pelo IP_3 e sensíveis a rianodine (Sanders & Publicover, 1994). Como consequência do aumento da $[Ca]_i$, quatro íons cálcio (Ca_4), ligam-se e alteram a conformação da molécula de calmodulina (CaM), um modulador protéico encontrado em todas as células eucarióticas, expondo seus sítios hidrofóbicos para interagir e ativar a miosina quinase de cadeia leve (MLCK). Este complexo ternário, Ca_4 -CaM-MLCK, produz uma forma isomérica ativa da MLCK que catalisa a reação de transferência do grupo fosforil da molécula de MgATP para o resíduo de serina 19 das duas cadeias leves da miosina de 20 kDa (LC_{20}). Concomitantemente a este processo de fosforilação da miosina, ocorre a ativação da enzima MgATPase dependente da actina (Ikebe *et al.*, 1988), disparando o ciclo de pontes cruzadas da miosina ao longo dos filamentos de actina, com o desenvolvimento de força e contração do músculo liso (Barron *et al.*, 1979; Dillon *et al.*, 1981; Kamm & Stull, 1985; Tansey *et al.*, 1990; D'Angelo *et al.*, 1992; Allen & Walsh, 1994; Jiang & Stephens, 1994; Murphy, 1994). À medida que a $[Ca]_i$ diminui, ocorre dissociação do Ca -CaM da molécula de MLCK, esta retornando à sua forma inativa. Com a inativação da MLCK, a LC_{20} é desfosforilada pela ação da miosina fosfatase de cadeia leve (MLCP), revertendo os efeitos funcionais da fosforilação, levando ao relaxamento muscular (Alessi *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 1994). O tônus basal é restaurado, simultaneamente, à normalização dos níveis basais da $[Ca]_i$. Isto ocorre conforme o cálcio do citosol é bombeado para fora da célula pela bomba de cálcio ou pelo trocador sódio-cálcio, como também é bombeado para dentro do retículo sarcoplasmático pela bomba de cálcio, mecanismos estes presentes em suas respectivas membranas (Missiaen *et al.*, 1992).

1.2.3 Mecanismos alternativos reguladores da contração do músculo liso

Está evidente que a $[Ca]_i$ seja o principal mecanismo modulador da contração do músculo liso, regulando os níveis de fosforilação da miosina. Esta é a via mais rápida e eficiente para a geração de força de contração muscular. Entretanto, apenas este mecanismo não é o bastante para explicar todo o processo fisiológico da contração. Existem mecanismos adicionais, dependentes ou independentes do cálcio, que realizam um papel modulador e que complementam a compreensão de suas propriedades contráteis. Existem vários exemplos de diminuição da força muscular mesmo na presença da LC_{20} fosforilada sem diminuir a $[Ca]_i$, como é o caso dos efeitos vasorelaxantes do nitroprussiato e de altas concentrações de magnésio extracelular (D'Angelo *et al.*, 1992; McDaniel *et al.*, 1992; Barany & Barany, 1993). Mas, o grau e a velocidade da força de contração desenvolvida no músculo liso depende de qual via de excitação seja ativada, sugerindo que o aparato contrátil possui um versátil sistema modulador operado por diferentes vias de transdução de sinais e segundos mensageiros.

Por exemplo, as altas $[Ca]_i$ diminuem a sensibilidade da MLCK ao cálcio. O possível mecanismo seria a ativação de uma outra proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII) menos sensível ao cálcio do que a MLCK, mas que seria ativada quando a $[Ca]_i$ atingisse a ordem de $1\mu M$, um valor acima das condições normais de excitação, $140nM$ para $500-700nM$ (Williams & Fay, 1986). Um similar complexo ativado, Ca_4 -CaM-MLCKII, fosforilaria a serina 815 e não a 19 que seria fosforilada pela MLCK, diminuindo a sensibilidade ao cálcio para que ocorresse a fosforilação da LC_{20} (Tansey *et al.*, 1992). Entretanto, dados importantes de pesquisas recentes mostram o possível papel das mitocôndrias na regulação da concentração do cálcio intracelular, sugerindo um papel citoprotetor contra elevadas concentrações de cálcio no citosol, acima dos limites fisiológicos (Günter *et*

al., 1994; Babcock *et al.*, 1997; Thayer & Miller, 1990; Duchen, 1999). Portanto, o possível papel fisiológico da mitocôndria em relação à regulação da concentração do cálcio intracelular, inclusive em músculo liso, desponta como um assunto novo e em grande ascensão nas pesquisas científicas.

Outra via de sinalização que poderia ser ativada, envolve o ácido araquidônico (AA), um segundo mensageiro lipídico liberado da membrana celular pela hidrólise da fosfatidilcolina via ativação da proteína-G e fosfolipase-A₂, o qual produz inibição da MLCP. Desde que esta enzima produza desfosforilação, sua inibição favorece o estado fosforilado da miosina e, portanto, aumento da força de contração do músculo liso sem, necessariamente, ocorrer alteração na concentração do cálcio intracelular (Allen & Walsh, 1994).

Uma outra possibilidade seria a contração lenta induzida pelo éster do forbol, ativador da PKC, onde não envolve alterações na [Ca]_i e nem fosforilação da miosina (Kamm *et al.*, 1989), embora em outras preparações possa ocorrer aumento da [Ca]_i e/ou fosforilação da LC₂₀ (Rembold & Murphy, 1989; Ozaki *et al.*, 1990).

Estudos em células isoladas mostram que agonistas múscarínicos e α -adrenérgicos ativam um mecanismo de contração independente do cálcio, via proteína G, ativação da fosfolipase C ou D, hidrólise da fosfatidilcolina com a produção de diacilglicerol (DG). Este, além da PKC, ativaria a proteína quinase C tipo epsilon (PKC ϵ), uma isoenzima da proteína quinase C, levando a fosforilação de duas outras proteínas ligadas ao filamento de actina, calponina de 34kDa (CP) e caldesmon de 87kDa (CD), disparando o processo contrátil. Os ésteres do forbol, semelhantes ao DG, ativariam diretamente tanto a PKC quanto a PKC ϵ (Nishizuka, 1984; Andrea & Walsh, 1992; Collins *et al.*, 1992; Allen & Walsh, 1994).

O conhecimento da bioquímica do músculo liso também cresceu a partir da descoberta de pelo menos duas outras proteínas envolvidas no processo contrátil, calponina (CP) e caldesmon (CD) (Sobue *et al.*, 1981; Takahashi *et al.*, 1986, respectivamente), ambas ligadas a actina, calmodulina e tropomiosina, capazes de inibir, *in vitro*, a MgATPase ativada pela actina, uma enzima integrante no mecanismo de fosforilação da miosina (Barron *et al.*, 1979). A inibição da MgATPase é revertida pelo Ca-CaM e pela fosforilação, sugerindo que existem no músculo liso mecanismos colaterais moduladores da atividade contrátil envolvendo os filamentos de actina (Marston & Redwood, 1991; Sobue & Sellers, 1991; Winder & Walsh, 1993). Allen & Walsh (1994) sugeriram que a caldesmon e calponina modulam o ciclo das pontes cruzadas actina-miosina, ambas sendo ativadas por vias dependentes ou independentes do cálcio. A calponina, uma proteína específica do músculo liso, enquanto ligada a actina inibiria a formação de pontes cruzadas, mas ao ser fosforilada desligada da actina favoreceria a formação das pontes cruzadas e a contração. Desde que a MLCK, CaM e PKC tenham diferentes sensibilidades ao cálcio e que CD e CP possuam duas ou três vezes menor afinidade do que a MLCK ao Ca-CaM, a célula poderia ativar mecanismos diferentes para controlar a proporção de miosina e calponina fosforilada/desfosforilada, alcançando com mais eficiência e precisão a regulação do estado contrátil do músculo liso (Pritchard & Marston, 1993; Allen & Walsh, 1994). De outra forma, a PKC- ϵ poderia ativar diretamente a CP independentemente do cálcio e de sua fosforilação. Isto também dissociaria a CP da actina permitindo a formação de pontes cruzadas e contração. Este é um mecanismo condizente com a resposta contrátil mais lenta induzida pelo éster do forbol, acima referido, que pode compartilhar um mecanismo comum como aquele que ocorre com as $\text{PGF}_{2\alpha}$ que também ativam a PKC ϵ levando à ativação da CP (Kanashiro & Khalil, 1998), portanto produzindo parte de sua resposta contrátil independente de cálcio.

Portanto, as bases bioquímicas e eletrofisiológicas para as diferentes respostas induzidas no músculo liso não estão plenamente compreendidas. Entretanto, a ativação de mecanismos desencadeantes da contração ou relaxamento do músculo liso pode envolver eventos bioquímicos que poderão estar associados ou não a mecanismos elétricos que modificam o potencial de membrana produzindo despolarização ou hiperpolarização, levando à contração ou relaxamento, respectivamente.

1.2.4 Formas de acoplamento excitação-contração do músculo liso

Há mais de 100 anos notou-se que estímulos elétricos produziam contrações em músculo esquelético de sapo. Desde então, concebeu-se a idéia da existência de um componente elétrico no fenômeno de contração muscular. Posteriormente, estudos em músculo liso vascular, mostraram que a contração induzida por agonistas poderia ocorrer com menor ou maior despolarização da membrana, sugerindo que fenômenos elétricos e mecânicos estariam envolvidos na contração. Esses fenômenos são denominados de acoplamento eletromecânico e farmacomecânico, respectivamente (Somlyo & Somlyo, 1968), entendendo-se por acoplamento excitação-contração aos eventos elétricos e bioquímicos que induzem ao aumento $[Ca]_i$, sem, contudo, considerar os mecanismos bioquímicos da contração propriamente dita (Sperelakiś, 1993).

1.2.4.1 Acoplamento eletromecânico

Este tipo de acoplamento é assim denominado porque a regulação da força de contração depende das alterações no potencial transmembrana (E_m). Um exemplo típico é a contração induzida pelo potássio (Neild & Kotecha, 1987; Hermsmeyer *et al.*, 1988). Aumentando-se a concentração extracelular, o valor do E_m é deslocado para valores mais positivos, atingindo a faixa de ativação dos VDCC pelos quais haverá influxo de cálcio levando ao aumento na $[Ca]_i$ e contração. Entretanto, existem agonistas capazes de induzir

contração por despolarização em músculo liso, como é o caso da 5-hidroxitriptamina (Neild & Kotecha, 1987), noradrenalina (Neild & Kotecha, 1987; Nelson et al, 1988), acetilcolina (Bolton, 1972), histamina (Droogmans *et al.*, 1977; Keef & Ross, 1986) e endotelina (McPherson & Angus, 1991), mas alguns destes podem depender mais da despolarização do que outros, sugerindo possuir maior dependência do influxo do cálcio extracelular para produzir contração. Recentemente as pesquisas em músculo liso sugerem o envolvimento dos canais de cloreto no mecanismo de contração induzido por agonistas, onde a ativação destes canais produziria despolarização da membrana (Hogg *et al.*, 1994a,b; Amédée *et al.*, 1990; Criddle *et al.*, 1996, 1997). Em contraste, pode haver perda de força de contração quando ocorre hiperpolarização pela saída de potássio. Isto significa que quando os canais de potássio são ativados o valor do E_m desloca para valores mais negativos, diminuindo a probabilidade de abertura de VDCC (Murphy & Brayden, 1995; Quayle *et al.*, 1997).

1.2.4.2 Acoplamento farmacomecânico

Neste caso, a regulação da força de contração envolve a resposta celular diante das variações na $[Ca]_i$ ou as modificações desta resposta ao cálcio, portanto, não depende da despolarização (Somlyo & Somlyo, 1968; Rembold, 1996). Por exemplo, quando a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio estiver alterada, a célula poderá apresentar respostas diferentes diante da mesma variação na $[Ca]_i$ (Allen & Walsh, 1994). Desde que o aumento do cálcio intracelular dependa, basicamente, da sua liberação dos estoques intracelulares ou do influxo do cálcio extracelular, os agonistas contráteis, poderão desenvolver suas respostas utilizando, preferentemente, o cálcio intra ou extracelular. Estudo em músculo liso de fundo de estômago de rato sugere que carbamilcolina utiliza mais do cálcio intracelular enquanto a 5-HT e a $PGF_{2\alpha}$ o extracelular para produzir suas contrações (Secretest *et al.*, 1989). O interessante é que o aumento da $[Ca]_i$ pode ocorrer via ativação

direta dos canais de cálcio operados por receptores (ROCC), hipotetizados por Bolton em 1979, portanto, independente de alterações no E_m . Estes canais poderiam ser os mesmos canais ativados pelo ATP, referidos por Benham & Tsien (1987). Além disso, outra via de acesso do cálcio extracelular seria através canais catiônicos não seletivos (Chen *et al.*, 1993), os quais são ativados independentemente da despolarização da membrana celular.

Outros aspectos sobre o acoplamento farmacomecânico que devem ser considerados e que, certamente, influenciam na regulação da força de contração do músculo liso, são aqueles relacionados com a sensibilidade ao cálcio da LC_{20} da cadeia leve da molécula de miosina, discutidos anteriormente. Portanto, as respostas induzidas por agonistas podem depender de uma ou ambas as formas de acoplamento, embora uma possa ser, individualmente, mais importante do que a outra para diferentes agentes contráteis.

1.3 MECANISMOS IÔNICOS DA FISIOLÓGIA DO MÚSCULO LISO

A membrana celular comporta em sua estrutura lipoprotéica uma enorme diversidade de canais iônicos. A distribuição e propriedades destes canais variam nos diferentes tipos de músculo liso (gastrointestinal, traqueal, vascular) e entre os mesmos tipos de tecidos (artérias, arteríolas e veias). Eles podem responder diretamente às variações do potencial de membrana (dependentes de voltagem), às ações de hormônios e de neurotransmissores (operados por receptores) ou indiretamente por segundos mensageiros gerados por ação de agonistas (Knot *et al.*, 1996).

1.3.1 Canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC)

São classificados em L, T e N, de acordo com a sua cinética de ativação e inativação, condutância, seletividade iônica e sensibilidade a drogas (Spedding & Paoletti, 1992). Os do tipo-L estão presentes em várias

células excitáveis como os neurônios, fibras cardíacas, esqueléticas e em músculo liso dos vasos sanguíneos, das vias aéreas e do trato gastrointestinal, em especial no estômago (Mitra & Morad, 1985; Katzka & Morad, 1989; Vogalis *et al.*, 1992).

No músculo liso, os tipos-L são os mais abundantes e extensivamente estudados por exercerem um papel crucial no processo de excitação-contracção, pois são os responsáveis pelo fluxo de cálcio para dentro da célula (Tsien, 1983; Hess, 1990; Kuriyama *et al.*, 1998), os quais constituem a principal corrente iônica na geração do potencial de ação. São canais ativados por alta voltagem, possuindo condutância entre de 20-28pS, enquanto os do tipo T entre 7-15pS. São altamente seletivos ao cálcio em relação aos outros íons, mas na ausência de todos os cátions bivalentes, podem tornar-se permeáveis a íons monovalentes como o sódio (Tsien *et al.*, 1987). A relação entre a ativação dos VDCC e o potencial de membrana é muito íntima. Por exemplo, despolarização ou hiperpolarização na ordem de 3mV aumenta ou diminui, sensivelmente, a probabilidade de serem ativados, respectivamente (Nelson *et al.*, 1990). Em tecidos vasculares e cardíacos, sua inativação ocorre pela despolarização da membrana e pela concentração intracelular de cálcio (Kuriyama *et al.*, 1998). Sua permeabilidade é bloqueada pelo cobalto, níquel, lantânio e cádmio (Tsien *et al.*, 1987). As três principais classes de antagonistas dos VDCC tipo-L são: dihidropiridinas (nifedipina, nisoldipina e isradipina), fenilalquilaminas (verapamil) e benzotiazepinas (diltiazem).

Geralmente, o potencial de repouso da membrana de células de músculo liso varia de -75 a -50mV (Hirst & Edwards, 1989; Nelson *et al.*, 1990). Desde que o potencial de equilíbrio eletroquímico do cálcio (Ackerman & Clapham, 1997), esteja numa faixa bem mais positiva em relação ao E_m e que sua concentração extracelular seja bem maior em relação ao meio intracelular, isto gera um forte gradiente eletroquímico (força eletroquímica) que tende a conduzir o cálcio para o interior da célula. Como os VDCC são

ativados na faixa de -60 a -40 mV (Nelson *et al.*, 1990) e o E_m está valores mais negativos (-75 a -50 mV), isto mantém os VDCC fechados, portanto, mantendo o cálcio extracelular, permanentemente, na iminência de entrar. Entretanto, sob o efeito de um agente despolarizante, quando o potencial de membrana atinge esta faixa de ativação dos VDCC, ocorre influxo de cálcio do meio extracelular para o intracelular e, conseqüentemente, aumento na $[Ca]_i$ e contração. Este é um mecanismo básico e inerente à musculatura lisa sobre o qual algumas drogas inibidoras dos de canais de cálcio produzem seus efeitos terapêuticos, como é o caso de agentes anti-hipertensivos (nifedipina).

1.3.1.1 Outras vias para o influxo e regulação do cálcio intracelular

Vários agonistas produzem efeitos regulatórios mobilizando o cálcio intracelular e extracelular. Suas respostas podem envolver a ativação canais catiônicos não seletivos operados receptores como é o caso das ações induzidas pela noradrenalina, acetilcolina, serotonina, histamina, prostaglandina (Kobayashi *et al.*, 1988; Chilvers *et al.*, 1989; Secrest *et al.*, 1989; Sims, 1992; Inoue, 1995; Tosun *et al.*, 1997). São canais moduladores acoplados à proteína G (Mori *et al.*, 1999), mediados pela geração de segundos mensageiros, principalmente o trifosfato de inositol (Somlyo *et al.*, 1988) ou, ainda, pela fosforilação do canal pelas proteínas quinases A ou C (Tosun *et al.*, 1998a; Kennelly & Krebs, 1991). Desde que os inibidores dos canais VDCC tipo-L bloqueiem, parcialmente, as respostas induzidas por agonistas como a noradrenalina, isto sugere o envolvimento simultâneo desses canais com os canais de cálcio operados por receptores (ROCC) nas respostas mediadas por receptores (Morel & Godfraind, 1991). Além disso, outros agonistas tiveram suas respostas parcialmente reduzidas por bloqueadores de VDCC tipo-L e/ou bloqueadores de canais catiônicos não seletivos (Zuccarello *et al.*, 1996). Como informação, existem ainda no músculo liso os canais catiônicos não seletivos ativados por hiperpolarização

verificados em estômago de sapo (Hisada *et al.*, 1991). Além do influxo de cálcio através VDCC tipo-L, da ativação dos ROCC e da liberação de cálcio dos estoques intracelulares, recentes evidências sugerem que o influxo do cálcio extracelular pode ocorrer por canais na membrana celular diferentes dos VDCC tipo-L, embora haja evidências de que as oscilações na $[Ca]_i$ induzida pela entrada de cálcio “controlada pelos estoques intracelulares” estejam dissociadas da contração (Tosun *et al.*, 1998a,b).

Atualmente, as mitocôndrias estão sendo reconhecidas como estruturas fascinantes e de grande impacto nos processos fisiológicos, que, ultimamente, desperta grande interesse científico por guardarem muitos segredos biológicos ainda não desvendados (Düchen, 1999). Recentemente, muita atenção está voltada para o seu papel regulador sobre a $[Ca]_i$ e sua relação com as correntes de cálcio liberado dos estoques intracelulares: “calcium release-activated channels”, CRAC (Gilibert & Parekh, 2000), embora estudos anteriores já mostrassem a existências destas correntes em músculo liso vascular (Xuan *et al.*, 1992; Daniel *et al.*, 1995; Skutella & Rüegg, 1997). São correntes presentes também em músculo liso não vascular, como o estômago de rato, onde a depleção dos estoques intracelulares pela tapsigargina induziu a ativação dos CRAC (Smaili *et al.*, 1998).

1.3.2 Canais de potássio

A partir do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível uma classificação dos canais de potássio considerando os seus aspectos estruturais e genéticos. São estruturas tetraméricas contendo em cada uma das quatro subunidades seis regiões (S_1 - S_6) de domínio transmembrana e são classificadas em duas superfamílias. Na primeira, encontram-se os canais de potássio dependentes de voltagem (K_V ou retificadores tardios), os ativados pelo cálcio (BK_{Ca} e SK_{Ca}) e correntes “A” (K_A). Nesta superfamília existe a subdivisão em famílias e subfamílias K_V (Chandy *et al.*, 1990; Chandy, 1991; Grissmer *et al.*, 1994). Na segunda,

estão os canais não dependentes de voltagem sensíveis ao ATP (K_{ATP}), os retificadores de potássio para dentro da célula (K_{IR}), os sensíveis ao sódio (K_{Na}) e aqueles sensíveis ao pH (K_{pH}), este não identificado na musculatura intestinal. Possuem apenas dois domínios transmembrana, faltando S_1 - S_4 . É importante frisar que nesta família não existe uma sensibilidade intrínseca do canal à voltagem, por não possuir na molécula a região sensorial de voltagem (S_4), mas a condutância está associada à voltagem. Suas propriedades retificadoras emergem quando o magnésio está presente no citosol (Kuriyama *et al.*, 1967; Nowak *et al.*, 1984;). Destes canais descreveremos sobre as implicações na fisiologia do músculo liso dos canais K_V e K_{Ca} da superfamília-1, K_{ATP} e K_{IR} da superfamília-2.

De modo geral, o potencial de equilíbrio eletroquímico do potássio encontra-se entre -90 a -80 mV, um valor mais negativo em relação ao potencial de membrana (-75 a -50 mV). Em condições fisiológicas, a concentração intracelular de potássio é bem maior em relação ao meio extracelular. Independente da forma de ativação, estes canais produzem uma corrente de saída de potássio, impulsionada pelos gradientes químico e elétrico, conduzindo o valor do potencial de equilíbrio da membrana para um valor próximo ao potencial de equilíbrio do potássio, portanto uma corrente hiperpolarizante. Entretanto, quando há despolarização eles assumem importante papel na repolarização, especialmente no sistema elétrico do tecido cardíaco. Este mecanismo tem extrema importância fisiológica na regulação do potencial de membrana, na duração do potencial de ação e no controle do tônus da musculatura lisa (Nelson & Quayle, 1995; Standen & Quayle, 1998). Há evidência de que estejam envolvidos em certos estados patológicos, como por exemplo na síndrome do intervalo QT longo, uma condição congênita responsável por arritmias cardíacas, síncope e mortes súbitas (Ackerman & Clapham, 1997).

1.3.2.1 Superfamília - 1

1.3.2.1.1 Canais de potássio dependentes de voltagem (K_V)

Constitui um tipo de corrente de potássio comum a vários tecidos, inclusive o músculo liso vascular e não vascular. Também são conhecidos como retificadores tardios. São canais ativados pela despolarização, não dependem do cálcio e regulam o potencial de membrana em resposta aos estímulos despolarizantes (Nelson & Quayle, 1995). São importantes na repolarização da membrana, tendo um papel fisiológico fundamental no controle da duração do potencial de ação (Walsh & Kass, 1991). As principais drogas bloqueadoras são o ácido tetraetilamônio (TEA), 4-aminopirina (4-AP) e toxinas de cobra e escorpião como a α -dendrotoxina e margatoxina, respectivamente. Mas, dependendo da concentração e do tecido, podem apresentar respostas diferentes (Ohya *et al.*, 1987; Kuriyama *et al.*, 1995). A 4-AP parece ser o mais seletivo inibidor dos K_V em músculo liso vascular, uma importante droga utilizada para separar K_V dos K_{Ca} (Okabe *et al.*, 1987; Robertson & Nelson, 1994). Em meio livre de cálcio, são ativados quando a despolarização da membrana atinge a faixa entre -30 e -20 mV, sendo inativados pelos maiores níveis de despolarização, isto é, operam dentro de uma determinada faixa de voltagem. Como o processo de inativação é mais lento do que o de ativação, as correntes de potássio através de K_V em resposta a um estímulo despolarizante, inicialmente cresce rapidamente até um pico em função da rápida ativação, seguida de um decaimento mais lento pela inativação mais lenta. Em condições fisiológicas, como por exemplo na manutenção do tônus basal, a corrente através destes canais depende do balanço entre ativação e inativação.

Muitas famílias de K_V foram clonadas e várias estão presentes nos diferentes tipos de músculo liso e conservam uma estrutura molecular básica (Jan & Jan, 1992; Pongs, 1992; Roberds *et al.*, 1993; Overturf *et al.*, 1994). Vários estudos investigam a relação da estrutura básica com as propriedades

dos canais (Jan & Jan, 1992). Resumidamente, cada canal é composto por quatro subunidades onde cada uma contém seis regiões de domínios transmembrana, $S_1 - S_6$. Uma destas regiões de cada subunidade, isto é, a região S_4 , parece ser um importante componente do canal que funciona como o sensor de voltagem. Isto os diferencia dos canais não operados por voltagem. Entretanto, diferentes membros da família K_V são conhecidos como “retificadores tardios- (K_V) ” e “correntes transitórias para fora- (K_A) ”, baseando-se na cinética de ativação e inativação desses canais. Desde que alguns canais respondem, diferentemente, às alterações do potencial de membrana, podem ser classificados de baixa ou alta condutância. Esta diversidade na sensibilidade à voltagem é fundamental para o desempenho fisiológico nos diferentes tecidos. Muitas evidências sugerem a existência de mais de um tipo de K_V em músculo liso vascular, considerando as diferenças na dependência de voltagem para a ativação e inativação, diferença na sensibilidade aos inibidores e na condutância (Okabe, *et al.*, 1987; Kirsch *et al.*, 1991; Roberds *et al.*, 1993; Overturf *et al.*, 1994; Robertson & Nelson, 1994).

1.3.2.1.2 Canais de potássio ativados pelo cálcio intracelular (K_{Ca})

A ativação desses canais pelo cálcio intracelular possui importante papel fisiológico na regulação do potencial de membrana e no controle do tônus miogênico em pequenas artérias (Nelson & Quayle, 1995). Entretanto, desde que possuam em sua molécula a região S_4 , são também sensíveis à despolarização da membrana, ou seja, à voltagem (Benham *et al.*, 1986; Langton *et al.*, 1991). São canais que conservam em suas estruturas moleculares outras regiões de domínio transmembrana, S_7-S_{10} , possivelmente envolvidas na sensibilidade ao cálcio. São classificados como canais de potássio de alta e baixa condutância, freqüentemente conhecidos como BK_{Ca} e SK_{Ca} , respectivamente. Os BK_{Ca} são bloqueados pelo TEA, e pelas toxinas de escorpião, caribdotoxiina e iberiotoxina (Brayden & Nelson, 1992; Langton *et al.*, 1991), enquanto os SK_{Ca} são inibidos pela apamina, um peptídeo

presente no veneno de abelha. A ativação dos canais BK_{Ca} , possivelmente, é um mecanismo importante no controle da pressão arterial que está presente no músculo liso de vasos de resistência (Brayden & Nelson, 1992). Portanto, são alvos de muitas drogas vasoconstrictoras ou vasodilatadoras que modulam estes canais.

1.3.2.2 Superfamília - 2

1.3.2.2.1 Canais retificadores internos de potássio (K_{IR})

Estão presentes em vários tecidos excitáveis e não excitáveis, mas os estudos foram realizados, principalmente, em células de músculo liso de artérias cerebrais, mesentéricas e coronárias (Edwards *et al.*, 1988; Edwards & Hirst, 1988; Kuriyama *et al.*, 1995; Quayle, *et al.*, 1996). Em músculo liso não vascular existe pouca informação. Farmacologicamente, são inibidos pelo bário em concentrações micromolares, a ferramenta adequada para as investigações fisiológicas destes canais (Bonev *et al.*, 1994). Estruturalmente, são diferentes dos canais controlados por voltagem por não apresentam em suas moléculas os domínios transmembrana equivalentes às subunidades S_1 e S_4 . Portanto, são canais independentes de voltagem, mas a sua atividade é uma função do potencial de membrana e da concentração extracelular do potássio. Foram assim denominados, pelas observações em estudos com clampeamento de voltagem, onde o que o fluxo de potássio, através destes canais, era mais intenso para o dentro do que para fora da célula. Portanto, são ativados pela hiperpolarização da membrana, contrariamente aos canais K_V e K_{Ca} que são ativados pela despolarização. Estudos em arteríolas cerebrais de rato, reportam que a vasodilatação induzida pelo aumento do potássio extracelular estava relacionada com hiperpolarização da membrana e ativação dos K_{IR} , pois na presença do bário a hiperpolarização foi revertida (Kuschinsky *et al.*, 1972; Edwards & Hirst, 1988; McCarron & Halpern, 1990). Entretanto, em situações fisiológicas em que há despolarização, pode ocorrer o fluxo de potássio, através dos K_{IR} , para fora da célula, isto é, uma corrente

de potássio hiperpolarizante. Isto justifica a denominação destes canais como “retificadores”, pois através deles, passa mais corrente para dentro do que para fora da célula, ou seja, em ambos os sentidos. Portanto, a ativação desses canais pode ser um poderoso mecanismo regulador do potencial de membrana do músculo liso de vasos de resistência, podendo ser o responsável pela vasodilatação induzida pelo potássio extracelular, que, teoricamente, este aumento de potássio extracelular deveria despolarizar a membrana e gerar vasoconstricção (Nelson & Quayle, 1995; Quayle *et al.*, 1997). Mas, se estes canais estão envolvidos em algum mecanismo de relevância fisiológica em músculo liso não vascular ainda não se sabe.

1.3.2.2.2 Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Os canais de potássio inibidos pelo ATP (K_{ATP}), também conhecidos como sensíveis ou dependentes de ATP, foram inicialmente identificados em músculo cardíaco (Noma, 1983). Estudos posteriores mostram que estão presentes em músculo esquelético, células β do pâncreas, neurônios, fígado, rins, adrenais, ovário, baço, glândulas, músculo cardíaco e no músculo liso, inclusive do trato gastrointestinal (Bonev & Nelson, 1993; Inagaki *et al.*, 1995). Possuem propriedades retificadoras similares aos K_{IR} , e sua ativação produz hiperpolarização e supressão da excitabilidade celular. Dependendo do tipo de músculo liso vascular, a condutância dos canais K_{ATP} pode variar desde 15-50pS (veia porta, artéria coronária, artéria mesentérica) até 130pS (artéria mesentérica, artéria de cauda de rato, aorta de cão), mas a relevância fisiológica desta variação permanece desconhecida (Criddle *et al.*, 1994; Nelson & Quayle, 1995). Entretanto, sabe-se que o papel fisiológico principal ATP é manter baixa a probabilidade de abertura dos K_{ATP} , podendo assim ter influência na condutância. Se a concentração de ATP for diminuída, como nos casos de anoxia, esses canais serão abertos levando a hiperpolarização e; conseqüentemente, haverá perda do controle do tônus vascular e encurtamento do potencial de ação, culminando num estado de choque.

Desde que sejam sensíveis ao ATP, respondem às alterações no metabolismo celular e tornando-se alvos para uma variedade de drogas vasodilatadores (hiperpolarizantes) como o pinacidil, minoxidil, levcromacalina e vasoconstrictoras (despolarizantes) como a glibenclamida, uma substância hipoglicemiante, e os derivados sulfonilurea (Nelson & Quayle, 1995; Quayle *et al.*, 1997). Desde algum tempo sabe-se que as drogas vasodilatadoras hiperpolarizam a célula e relaxam o músculo liso (Buckingham, *et al.*, 1989; Wilson, 1989; Anderson, 1992; Kuriyama *et al.*, 1995). Atualmente, registros eletrofisiológicos de correntes isoladas em células isoladas, mostram que estas drogas, clássicos abridores de K_{ATP} , atuam diretamente nos canais. Além disso, a partir das clonagens e conhecimento da estrutura molecular dos canais de K_{ATP} , ficou mais convincente a idéia de que estes canais pudessem, de fato, ser abertos por estas drogas (Ashford *et al.*, 1994; Inagaki *et al.*, 1995). Embora os abridores de K_{ATP} não tenham efeitos inibitórios diretos sobre os VDCC tipo-L, a supressão na geração de potencial de ação e sobre as ondas lentas em músculo liso, deve-se aos efeitos indiretos conseqüentes da hiperpolarização da membrana (Okabe *et al.*, 1990). Entretanto, uma informação de interesse reportada por Helevinsky *et al.* (1994) é que os abridores de K_{ATP} seriam potentes inibidores dos canais de cloreto em músculo liso vascular, hiperpolarizando a membrana. Finalmente, semelhantemente aos outros tipos de canais de potássio, sabe-se que a principal função dos K_{ATP} está na regulação do potencial de membrana, operando numa baixa faixa de probabilidade de serem abertos em presença de concentrações fisiológicas de ATP (Nelson & Quayle, 1995).

1.3.3 Canais de Cloreto

1.3.3.1 Acúmulo intracelular de cloreto

A partir do advento da técnica “double-barrelled Cl-sensitive microeletrodo” (Aickin, 1981; Aickin & Vermue, 1983), tornou-se possível estimar a concentração e a atividade de cloreto intracelular. Diferentemente

de outros tecidos como o nervoso, o esquelético e o cardíaco, a célula de músculo liso acumula íons cloreto em concentrações acima de seu esperado equilíbrio passivo. Por exemplo, em artéria femoral de rato a concentração intracelular de íons cloreto é 43,8 mM, mas no equilíbrio do cloreto esta concentração cai para 15,3 mM (Davis, 1992), indicando que houve saída de cloreto. Isto sugere a existência de mecanismos que sustentam o nível da concentração basal intracelular de cloreto acima do seu valor de equilíbrio com possíveis implicações fisiológicas. O mesmo ocorre com outros tipos de músculo liso como ureter (Aickin & Vermue, 1983), vaso deferente de cobaio (Aickin & Brading, 1982) e em artérias umbilical e placentária de humanos (Davis *et al.*, 2000). Recentemente, um artigo de revisão, sobre o papel funcional dos canais de cloreto, enfoca a importância da concentração intracelular de cloreto, de sua condutância e da influência no potencial de membrana na contratilidade do músculo liso vascular (Kitamura & Yamazaki, 2001). Entretanto, em músculo liso não vascular existe pouca informação. Além disso, estudos com a bumetanida ou furosemida, inibidores do cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ e com DIDS, inibidor do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, mostram que estas drogas causam diminuição na concentração intracelular de cloreto levando a hiperpolarização e relaxamento da célula (Kreye *et al.*, 1981; Davis, 1992, 1996), sugerindo indícios de que o cloreto intracelular esteja envolvido na contratilidade do músculo liso. Embora haja considerável variação nos diferentes tipos de músculo liso, atualmente existem três mecanismos iônicos que operam para o acúmulo de cloreto intracelular em músculo liso (Chipperfield & Harper, 2000), dos quais os dois primeiros são bem conhecidos:

- 1) – Troca cloreto/bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) (Aickin & Brading, 1984);
- 2) – Cotransporte sódio/potássio/cloreto ($\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$) (Russell, 2000);
- 3) – “Pump III”, um novo mecanismo (Davis, 1992; Chipperfield *et al.*, 1993; Chipperfield & Harper, 2000; Davis *et al.*, 2000).

1.3.3.1.1 Trocador de cloreto-bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$)

Há fortes evidências de que o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ participe do acúmulo de cloreto intracelular. Estudos de Aickin & Vermue (1983) e Aickin & Brading (1984) em ureter e vaso deferente de cobaio, respectivamente, utilizando a técnica de “double-barrelled microelectrodes” preconizada por Aickin (1981), avaliaram a recuperação da atividade do cloreto intracelular à medida que a concentração de cloreto extracelular fosse restaurada. Eles observaram que a recuperação da atividade do cloreto intracelular era mais lenta em meio isento de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ e que se tornava ainda mais lenta na presença de DIDS, um inibidor do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ em outros sistemas (Hoffmann & Simonsen, 1989). Removendo-se o cloreto extracelular, a atividade do cloreto intracelular foi inibida e o pH intracelular aumentou, mas diminuiu rapidamente quando o cloreto extracelular foi repostado (Aickin & Brading, 1984). Na presença de DIDS, o pH intracelular não diminuiu para os valores normais após ter sido aumentado pelo meio isento de cloro. Desde que, em meio zero cloreto, haja uma perda de íons cloreto para o meio extracelular, estas informações sugerem uma forte evidência de que o HCO_3^- entra na célula em troca pelo cloreto, um mecanismo que eleva o pH intracelular (Aickin & Brading, 1984). Posteriormente, estudos para a investigação da regulação do pH intracelular, confirmaram que a remoção do cloreto extracelular, na ausência de HCO_3^- ou $100\mu\text{M}$ de DIDS, não teve efeito sobre o pH intracelular (Korbmacher *et al.*, 1988). Estes experimentos mostram a importante característica do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$: reversibilidade, isto é, pode operar dirigindo o cloreto para dentro ou para fora da célula (Aickin & Brading, 1984).

1.3.3.1.2 Cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$

Este tipo de cotransporte foi originalmente descoberto em células de Ehrlich por Geck *et al.* (1980) onde observou que este sistema de transporte iônico era sensível a furosemida, um diurético de alça, e resistente à ouabaína, um inibidor da bomba Na^+/K^+ ATPase. Sob os efeitos inibitórios da

furosemida, houve diminuição na concentração do cloreto intracelular, hiperpolarização e relaxamento (Kreye *et al.*, 1981), dando os primeiros indícios da possível conexão fisiológica deste sistema com o acúmulo de cloreto intracelular, potencial de membrana e contratilidade do músculo liso. Estudos posteriores, mostraram que o mecanismo de inibição pela ouabaína e pela bumetanida, análogo da furosemida, são independentes, mas o mecanismo sensível a bumetanida foi completamente dependente do Na^+ e Cl^- (Owen, 1984). Embora estes estudos não dirigissem a idéia para o acúmulo de cloreto intracelular pelo cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, os estudos de Gerstheimer *et al.* (1987), em aorta de coelhos, mostram claramente que a furosemida reduz a concentração de cloreto intracelular de 32,6 para 13,5 mM, sugerindo o envolvimento deste sistema de transporte e acúmulo intracelular de cloreto, neste tecido. Em contraste, em canal deferente de cobaio, este acúmulo ocorre principalmente pelo trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Aickin & Brading, 1984) e em menor proporção pelo cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Aickin & Brading, 1990). De fato, os estudos mostram efeitos aditivos na utilização simultaneamente DIDS e bumetanida, isto é, o acúmulo de cloreto intracelular é reduzido mais do que cada um dos bloqueadores separadamente, indicando o envolvimento dos dois sistemas iônicos no acúmulo intracelular de cloreto (Davis, 1992).

1.3.3.1.3 “Bomba III”

Desde que, em músculo liso, o acúmulo de cloreto intracelular seja acima de seu equilíbrio e que o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e o cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ tenham participação importante neste processo, mesmo bloqueando estes dois sistemas com, DIDS e bumetanida, a concentração de cloreto ainda permanece acima de seu equilíbrio de distribuição (Davis, 1992). Este foi o primeiro sinal de que haveria um terceiro sistema envolvido no acúmulo intracelular de cloreto, denominado de “bomba III”.

Originalmente, a idéia da existência da “bomba III” surgiu durante os estudos sobre o cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ em artéria femoral de rato (Davis *et al.*, 1993). A demonstração de sua existência veio com o trabalho de Chipperfield *et al.* (1993) em músculo liso arterial de rato. Mesmo bloqueando o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ e o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e, ainda, inibindo a corrente de saída de cloreto com o NPPB, persistiu uma concentração residual de cloreto intracelular acima de seu equilíbrio, que foi completamente abolida por 1mM de acetazolamida, um clássico inibidor da enzima anidrase carbônica. Desde que esta enzima não esteja presente em músculo liso vascular (Gerstheimer *et al.*, 1987), isto sugere a acetazolamida (1mM) exerce seu efeito sobre a “bomba III”, embora não possa ser considerado um efeito específico pela alta concentração utilizada (Davis, 1996; Chipperfield *et al.*, 1997). A “bomba III” não é inibida pela bumetamida, metolazone e DIDS, isto a diferencia dos co-transportes $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ e Na^+Cl^- e do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, respectivamente. Além disso não é afetado pela remoção do Na^+ ou HCO_3^- (Chipperfield & Harper, 2000). Desde que a ‘bomba III’ seja inibida pelo ácido etacrínico e N-etilmaleimida (Davis, 1996), inibidores de ATPases, isto apóia a especulação de que esta bomba seja um processo ativo dependente de ATP (Chipperfield *et al.*, 1993). Como não existem evidências de um mecanismo de transporte de cloreto dependente de ATP na membrana plasmática de músculo liso, a existência da “bomba III”, que tende a ser um processo ativo, deve ser visto com cautela, mas, certamente, um mecanismo ainda não conhecido está presente. Estudos mostram que a “bomba III” está presente em tecidos humanos como artérias umbilical e placentária e células ventriculares cardíacas (Chipperfield *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2000). Nos três casos, o comportamento farmacológico é idêntico ao que se observa em músculo liso arterial de rato. Sua ocorrência em outros tipos de tecidos precisa ser investigada. Enquanto o co-transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ e o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pareçam ser universais, o mesmo não pode ser dito para a “bomba III”, porque os efeitos da acetazolamida dependem do tipo de tecido, como é o

caso de seu baixo efeito em canal deferente de cobaio (Aickin & Brading, 1984).

1.3.3.2 Canais de cloreto ativados pelo cálcio ($ICl_{(Ca)}$)

Várias evidências sugerem que o aumento da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{++}]_i$) seja uma condição primordial para a ativação dos canais de cloreto ativados pelo cálcio ($ICl_{(Ca)}$). Em músculo liso, dependendo da espécie e do tipo de tecido, o nível basal da $[Ca^{++}]_i$ se estabelece entre 40 e 140 nM. Estímulos funcionais, neuronais ou hormonais, elevam a $[Ca^{++}]_i$ de 140 para 500-700 nM (Williams & Fay, 1986). Reduzindo esta concentração para índices inferiores a 10nM a atividade dos canais de cloreto fica completamente abolida, indicando que o limiar da $[Ca]_i$ para a ativação dos $ICl_{(Ca)}$ deve ser superior a 10nM (Klöckner, 1993). Assim, muitas substâncias como a acetilcolina, noradrenalina, serotonina, histamina, cafeína, angiotensina-II e outros que, conhecidamente, aumentam a $[Ca]_i$, no músculo liso induzem $ICl_{(Ca)}$ levando à contração (Pacaud, *et al.*, 1989a,b, 1992; Amédée *et al.*, 1990; Ohta *et al.*, 1993; Klöckner, 1993; Janssen, 1996; Liu & Farley, 1996; Guibert *et al.*, 1997; Wang & Kotlikoff, 2000). Isto sugere que os neurotransmissores liberados do sistema nervoso autônomo (SNA) e outras substâncias biologicamente ativas, provenientes da circulação ou liberadas localmente, possuem em comum a ativação das $ICl_{(Ca)}$ para produzir seus efeitos.

Inicialmente as investigações referentes as $ICl_{(Ca)}$ foram desenvolvidas em bastonetes de retina de salamandra (Bader *et al.*, 1982) e em oocitos de *Xenopus laevis* (Miledi, 1982; Barish, 1983). Posteriormente, estudos mais detalhados em células de glândula lacrimal de rato, caracterizaram claramente as $ICl_{(Ca)}$ mostrando que um mecanismo fisiológico, envolvendo a condutância de cloreto, teria implicação no processo secretório (Marty *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1986; Evans & Marty, 1986).

Em músculo liso, os primeiros registros sobre as $ICl_{(Ca)}$ foram realizados em células isoladas de músculo anococcígeo de rato, um tipo de tecido rico em α -adrenorreceptor. Esses estudos mostraram que a noradrenalina induzia uma corrente despolarizante, onde potencial de reversão desta corrente era sensível ao gradiente de cloreto e próximo ao seu potencial de equilíbrio. Desde que a noradrenalina induza o aumento $[Ca^{++}]_i$ e ative uma condutância de cloreto, nos experimentos realizados com a remoção do cálcio extracelular, a resposta induzida pela noradrenalina foi gradativamente reduzida, provavelmente pelo esgotamento do cálcio intracelular. Analisando esses três eventos conjuntamente, isto é, a sensibilidade ao gradiente de cloreto, o potencial de reversão próximo ao potencial de equilíbrio do cloreto e a redução da resposta frente à variação do cálcio intracelular, levaram à conclusão de que a corrente induzida pela noradrenalina seria de cloreto e ativada pelo cálcio ($ICl_{(Ca)}$). Essas informações deram suporte para a formulação da hipótese de que o cálcio liberado dos estoques intracelulares ativaria os canais de cloreto atuando na superfície interna da membrana (Byrne & Large, 1987a,b), um sítio de ação no canal de cloreto onde, possivelmente, estaria agindo o ácido niflúmico, o mais seletivo bloqueador conhecido das $ICl_{(Ca)}$ (Greenwood & Large, 1995). Entretanto, existe uma suposição de que, entre o cálcio e a ativação dos canais de cloreto, poderia haver uma substância intermediária proveniente do citosol que participasse deste processo de ativação das $ICl_{(Ca)}$. Se isto for verdade, as $ICl_{(Ca)}$ não teriam um mecanismo de ativação estritamente realizado pelo cálcio (Large & Wang, 1996).

Embora muitas pesquisas em células isoladas mostrassem uma íntima relação entre o aumento da $[Ca^{++}]_i$ induzido por agonistas e a ativação das $ICl_{(Ca)}$, as medidas de cálcio intracelular tomaram-se viáveis com o trabalho de Ridgeway & Ashley (1967). Eles injetaram em fibras musculares uma proteína fluorescente marcadora do cálcio, aequorin. A partir dos anos 80 foram produzidos vários outros indicadores químicos fluorescentes para estimar o

Em músculo liso, os primeiros registros sobre as $ICl_{(Ca)}$ foram realizados em células isoladas de músculo anococcígeo de rato, um tipo de tecido rico em α -adrenorreceptor. Esses estudos mostraram que a noradrenalina induzia uma corrente despolarizante, onde potencial de reversão desta corrente era sensível ao gradiente de cloreto e próximo ao seu potencial de equilíbrio. Desde que a noradrenalina induza o aumento $[Ca^{++}]_i$ e ative uma condutância de cloreto, nos experimentos realizados com a remoção do cálcio extracelular, a resposta induzida pela noradrenalina foi gradativamente reduzida, provavelmente pelo esgotamento do cálcio intracelular. Analisando esses três eventos conjuntamente, isto é, a sensibilidade ao gradiente de cloreto, o potencial de reversão próximo ao potencial de equilíbrio do cloreto e a redução da resposta frente à variação do cálcio intracelular, levaram à conclusão de que a corrente induzida pela noradrenalina seria de cloreto e ativada pelo cálcio ($ICl_{(Ca)}$). Essas informações deram suporte para a formulação da hipótese de que o cálcio liberado dos estoques intracelulares ativaria os canais de cloreto atuando na superfície interna da membrana (Byrne & Large, 1987a,b), um sítio de ação no canal de cloreto onde, possivelmente, estaria agindo o ácido niflúmico, o mais seletivo bloqueador conhecido das $ICl_{(Ca)}$ (Greenwood & Large, 1995). Entretanto, existe uma suposição de que, entre o cálcio e a ativação dos canais de cloreto, poderia haver uma substância intermediária proveniente do citosol que participasse deste processo de ativação das $ICl_{(Ca)}$. Se isto for verdade, as $ICl_{(Ca)}$ não teriam um mecanismo de ativação estritamente realizado pelo cálcio (Large & Wang, 1996).

Embora muitas pesquisas em células isoladas mostrassem uma íntima relação entre o aumento da $[Ca^{++}]_i$ induzido por agonistas e a ativação das $ICl_{(Ca)}$, as medidas de cálcio intracelular tomaram-se viáveis com o trabalho de Ridgeway & Ashley (1967). Eles injetaram em fibras musculares uma proteína fluorescente marcadora do cálcio, aequorin. A partir dos anos 80 foram produzidos vários outros indicadores químicos fluorescentes para estimar o

teor de cálcio intracelular. Inclusive, houve também o advento do método *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) que permite a análise temporal e espacial das flutuações da $[Ca^{++}]_i$ a níveis sub-celulares (Tsien, 1980, 1981; Tsien *et al.*, 1982; Grynkiewicz *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1985; Minta *et al.*, 1989). Mais recentemente, esta técnica evoluiu da microscopia monofocal para a multifocal (Berridge, 1997). Quase que contemporaneamente, a poderosa técnica de *patch-clamp* foi introduzida por Neher & Sakmann (1976) e Hamill *et al.* (1981), permitindo o estudo isolado de correntes iônicas transmembrana, recurso este que deu condições para Benham & Bolton (1986), utilizando esta técnica, publicar os primeiros registros elétricos em músculo liso visceral e vascular. Conseqüentemente, a hipótese original sobre a ativação da condutância de cloreto pelo cálcio intracelular ficou mais clara e convincente pelo uso conjunto dessas poderosas técnicas. Entretanto, se existe ou não o envolvimento de alguma substância mediadora entre o cálcio e a ativação dos canais de cloreto permanece desconhecido, isto ainda é mera especulação.

Portanto, uma busca fundamental das pesquisas em músculo liso é a elucidação do papel fisiológico das $ICl_{(Ca)}$ nos mecanismos ativados pela estimulação farmacológica de receptores, e, principalmente, descobrir outros alvos para o desenvolvimento de novas drogas, terapeuticamente, mais eficientes.

1.3.3.2.1 Farmacologia e fisiologia dos canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular ($ICl_{(Ca)}$)

Embora exista uma distribuição, intra e extracelular, moderadamente uniforme para os íons K^+ , Na^+ e Ca^{++} em células de tecidos excitáveis, os íons cloreto apresentam grande variação nas concentrações intracelulares em diferentes tipos de células com importantes implicações fisiológicas. Por exemplo, no tecido nervoso cerebral e espinhal, a ativação dos canais de cloreto operados por ligantes como o GABA e glicina, respectivamente,

produzem uma resposta inibitória. A explicação para isto é que nos neurônios a $[Cl]_i$ sendo mais baixa do que aquela esperada de sua distribuição passiva, a abertura dos canais leva a entrada de cloreto para o meio intracelular. Assim, desde que o E_{Cl} esteja próximo ou mais negativo em relação ao E_m , duas conseqüências imediatas ocorrem pela entrada do cloreto. Primeiro, se o E_{Cl} tiver um valor semelhante ao E_m a entrada do cloreto levará a estabilização da membrana do neurônio. Segundo, se o E_{Cl} for mais negativo do que o E_m levará a hiperpolarização da membrana. Isto significa que, no tecido neuronal, ambas as situações operam contrariamente á excitabilidade, isto é, inibe a despolarização produzindo efeitos inibitórios no SNC.

No músculo liso a distribuição de cloreto é completamente diferente, onde vários mecanismos operam para o acúmulo intracelular de cloreto acima dos níveis de distribuição passiva (Chipperfield & Harper, 2000). Experimentos mostram que a $[Cl]_i$ varia de 39 a 107mM (Casteels, 1971; Aickin & Brading, 1983, 1984; Koncz & Daugirdas, 1994) e que, em condições fisiológicas, o E_{Cl} se estabelece entre -20 a -30 mV (Aickin & Brading, 1982; Aickin & Vermue, 1983), podendo chegar a -6 mV, um valor bem mais positivo do que o potencial de repouso da membrana (-75 A -50mV) (Hirst & Edwards, 1989; Nelson *et al.*, 1990). Portanto, contrário ao influxo de cloreto que ocorre nos neurônios, a abertura dos canais de cloreto produz uma corrente de cloreto para fora da célula, induzindo a despolarização da membrana celular. Este mecanismo parece estar, fisiologicamente, envolvido nas respostas induzidas por vários neurotransmissores e outras substâncias biologicamente ativas, como por exemplo, na contração induzida pela noradrenalina em leito mesentérico vascular (Van Helden, 1988), em canal deferente (Aickin & Brading, 1982) de cobaios e em aorta e leito mesentérico de rato (Criddle *et al.*, 1996, 1997). Um recente e valioso estudo enfoca, detalhadamente, as propriedades e o papel fisiológico das $ICl_{(Ca)}$ em músculo liso vascular (Large & Wang, 1996), entretanto em músculo liso não vascular existem poucas informações quanto ao seu possível papel fisiológico, mas

alguns trabalhos já mostram que o ácido niflúmico, um potente bloqueador das $ICl_{(Ca)}$ inibe as contrações induzidas pela 5-HT em traquéia isolada de rato (Teixeira *et al.*, 2000) e inibiu tanto a despolarização quanto a contração induzidas por agonistas de receptores NK_1 da taquicinina em músculo longitudinal de cólon proximal de coelho (Patacchini *et al.*, 1996), sugerindo um possível papel fisiológico em tecidos não vasculares.

Considerando as inúmeras correntes iônicas presentes na membrana celular e que algumas delas sejam inibidas seletivamente por agentes farmacológicos, a utilização de bloqueadores de canais iônicos é uma ferramenta valiosa na identificação de uma individual condutância e ajuda na investigação de suas possíveis implicações fisiopatológicas. Dentre os vários bloqueadores de canais de cloreto, podemos citar os mais conhecidos e, no tópico seguinte, apresentamos as respectivas estruturas químicas dos compostos mais comumente utilizados .

Fenamatos: NFA (ácido niflúmico); MFA (ácido mefenâmico); FFA (ácido flufenâmico); TFA (ácido tolfenâmico) e derivados DPC (difenilamina-2-carboxilato): DCDPC (ácido 3',5-diclorodifenilamina-2-carboxílico); MDPC (ácido 4'-metildifenilamina-2-carboxílico).

Derivados stilbenos dissulfonados: DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico); SITS (ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico); DNDS (ácido 4,4'-dinitrostilbeno-2,2'-dissulfônico); DADS (ácido 4,4'-diaminostilbeno-2,2'-dissulfônico).

Outros compostos: NPPB (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico); Antiestrogênicos: tamoxifeno (TAM); diuréticos de alça: furosemide, bumetanida; IAA-94 (ácido indaniloiaético-94); A-9-C (ácido antraceno-9-carboxílico).

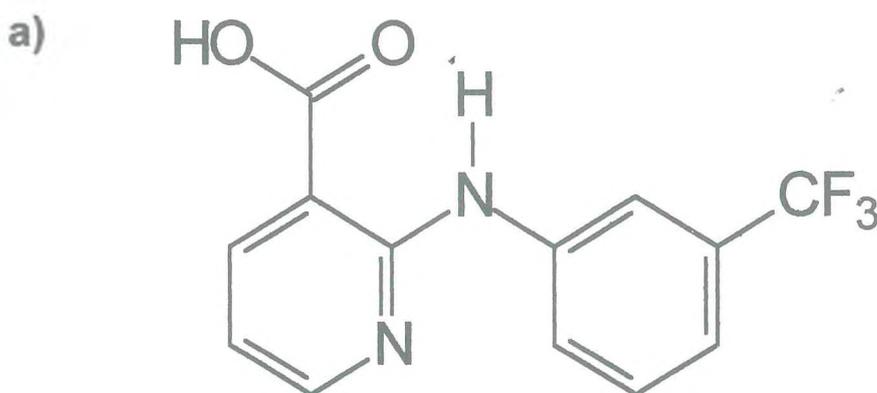
Muitas drogas ativadoras ou inibidoras de correntes iônicas possuem grande seletividade, mas uma característica comum para muitos dos inibidores de canais de cloreto é o baixo grau de seletividade. Os derivados stilbenos como o DIDS e o SITS são potentes inibidores irreversíveis tanto de sistemas de transporte aniônicos (Knauf & Rothstein, 1971) quanto de canais aniônicos (Inoue, 1985) e que podem interagir covalentemente modificando a condutância dos canais de potássio (Inoue, 1986). Além de inibir as $ICl_{(Ca)}$, o DIDS inibe o trocador catiônico Na^+/Ca^{++} (Trafford *et al.*, 1998). Estudo comparando os efeitos de bloqueadores como DIDS, SITS e A-9-C mostra os seus efeitos inibitórios sobre as correntes espontâneas de cloreto e potássio ativadas pelo cálcio, STICs e STOCs, respectivamente (Hogg *et al.*, 1994b). Mais recente, estudo envolvendo vários derivados stilbenos (DIDS, SITS, DADS e DNDS) mostra atividades inibitórias sobre as correntes de potássio (I_K) inibidas pelo ATP em miócitos ventriculares de cobaias, destes os efeitos do DIDS e SITS foram irreversíveis (Fukurawa *et al.*, 1993), isto contribui para aumentar a excitabilidade celular. Em contraste, o DIDS, também utilizado como inibidor do trocador Cl^-/HCO_3^- (Hoffmann & Simonsen, 1989), e os fenamatos (NFA, MFA e FFA) regulam positivamente as correntes de potássio em *Xenopus oocytes* (Busch *et al.*, 1994). Estudo comparativo mostra que DCDPC e o ácido tolfenâmico (TFA) inibiram as $ICl_{(Ca)}$ com potências similares ao ácido niflúmico, mas ativaram correntes de potássio em concentrações inferiores ao NFA, sugerindo serem menos seletivos do ácido niflúmico para $ICl_{(Ca)}$ (Greenwood & Large, 1997). Vários trabalhos mostram que os fenamatos (NFA, MFA e FFA) inibem as $ICl_{(Ca)}$ e ativam $BK_{(Ca)}$ em células isoladas de veia porta de coelhos (Greenwood & Large, 1995) e potencializam tanto as I_K em células isoladas de musculatura circular de íleo de cães (Farrugia *et al.*, 1993) quanto as $BK_{(Ca)}$ em músculo liso vascular de artéria coronária (Ottolia & Toro, 1994). Como consequência de tantos efeitos indesejados das atuais drogas bloqueadoras de canais de cloreto, os estudos funcionais das $ICl_{(Ca)}$ precisam de controles adequados para excluir estes

possíveis efeitos sobre os canais de potássio. Além desses efeitos, as correntes catiônicas não seletivas também são inibidas pelos FFA, DCDPC e NPPB em vasos cerebrais de ratos (Popp *et al.*, 1993), pelos DCDPC e FFA em íleo de cobaias (Chen *et al.*, 1993) e pelos fenamatos (NFA, MFA e FFA) em células de pâncreas de rato (Gögelein *et al.*, 1990). O NPPB, um dos mais novos bloqueadores das $ICl_{(Ca)}$, mostra efeitos inibitórios em músculo liso longitudinal gastrointestinal (Kollbel *et al.*, 1998) e em oócitos de *Xenopus laevis* (Wu & Hamill, 1992). Entretanto, estudo em células isoladas de veia porta de rato mostra que o NPPB além de inibir as $ICl_{(Ca)}$ induzidas por agonistas, inibiu as $IBK_{(Ca)}$, STOCs, VDCC e ativou I_K sensível a glibenclamida, sugerindo que os efeitos do NPPB ocorrem pela inibição sobre os estoques intracelulares de cálcio (Kirkup *et al.*, 1996a). Estudos apóiam os efeitos intracelulares do NPPB e IAA-94, os quais inibem a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático que pode repercutir nos seus efeitos adversos sobre várias condutâncias envolvendo o cálcio. Este efeito não foi observado com o ácido niflúmico e DNDS em músculo liso de estômago de coelhos. Entretanto, nesta mesma pesquisa, os efeitos inibitórios do IAA-94 e NPPB não ocorreram em células de tecido cardíaco (Pollock *et al.*, 1998), sugerindo o envolvimento de diferentes condutâncias de cloreto entre as células musculares lisas e cardíacas. O A-9-C parece ser um potente bloqueador de canais de cloreto em músculo esquelético (Palade & Barchi, 1977), mas possui baixa afinidade para as $ICl_{(Ca)}$. Isto sugere que o A-9-C não deva ser uma droga de escolha para as investigações envolvendo as $ICl_{(Ca)}$ em músculo liso.

Estudo em veia porta de coelhos mostra que muitos dos clássicos inibidores de canais de cloreto como DIDS, SITS e A-9-C, precisam de concentrações acima de $10^{-4}M$ para inibir as $ICl_{(Ca)}$ (Hogg *et al.*, 1994b), concentrações que, geralmente, são suficientes influenciar outras condutâncias. Entretanto, uma droga antiinflamatória não esteroideal do grupo dos fenamatos, o ácido niflúmico, reduz a amplitude das $ICl_{(Ca)}$ em

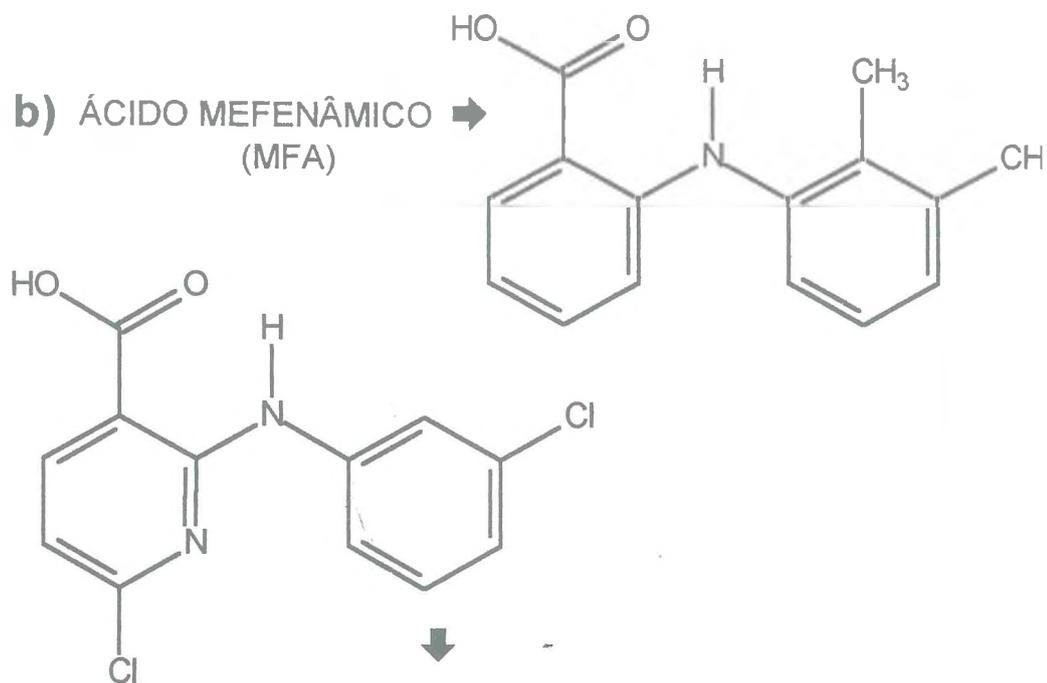
concentrações micromolares (Pacaud *et al.*, 1989a; White & Aylwin, 1990; Jamssen & Sims, 1992; Akbarali & Giles, 1993; Hogg *et al.*, 1994a; Lamb *et al.*, 1994). Investigações eletrofisiológicas mostram que o NFA inibe as $ICl_{(Ca)}$ em concentrações ($IC_{50} = 5\mu M$) bem inferiores àquelas necessárias para inibir correntes de potássio ($\geq 200\mu M$) em músculo liso de veia porta de coelhos (Hoog *et al.*, 1994b; Greenwood & Large, 1995) e o NFA foi o menos potente dos fenamatos (NFA, MFA e FFA) em inibir correntes catiônicas em células de pâncreas de rato (Gögelein *et al.*, 1990). Além disso, o NFA não inibe a recaptação do cálcio pelos estoques intracelulares (Pollock *et al.*, 1998) e não inibiu as contrações induzidas por 60mM e 25mM de KCl, em aorta de rato, sugerindo não ter efeitos sobre os VDCC e nem sobre canais de potássio, respectivamente (Criddele *et al.*, 1996). Portanto, o ácido niflúmico, em baixas concentrações, apresenta grande seletividade em inibir as $ICl_{(Ca)}$, o que o diferencia dos demais bloqueadores de canais de cloreto, justificando ser a principal ferramenta farmacológica para o estudo funcional das $ICl_{(Ca)}$.

1.3.3.2.2 Estruturas dos principais compostos químicos bloqueadores dos canais de cloreto

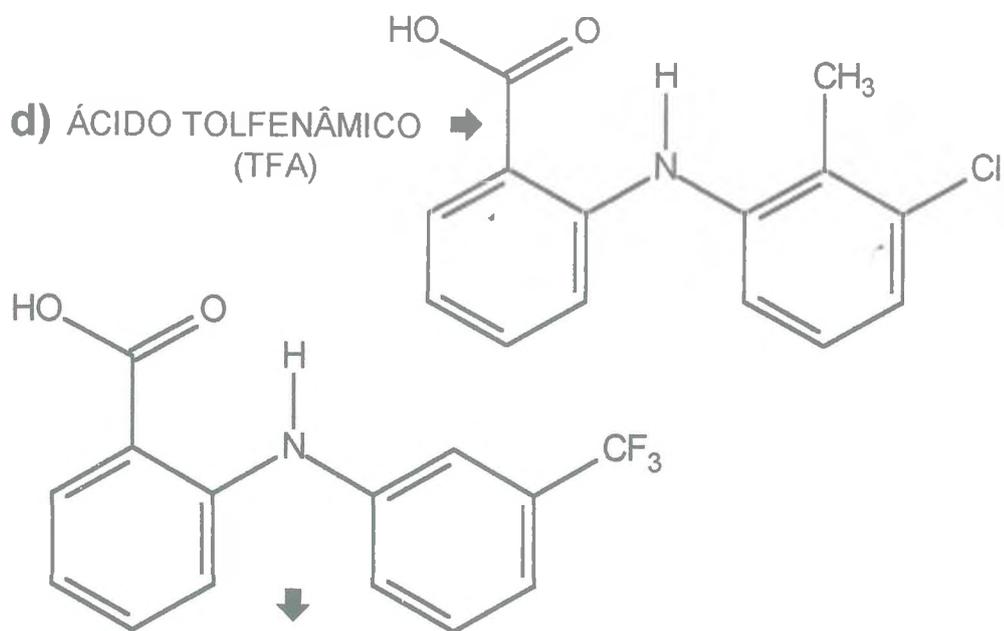


ÁCIDO NIFLÚMICO (NFA)
(ácido 2-[3-(trifluorometil)-anilino]nicotínico)

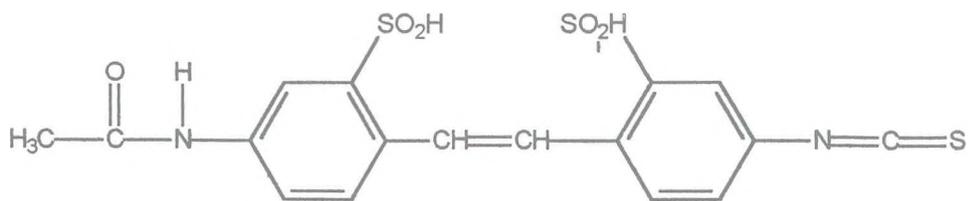
b) ÁCIDO MEFENÂMICO (MFA) →



c) (ÁCIDO 3',5-DICLORODIFENILAMINA-2-CARBOXÍLICO)

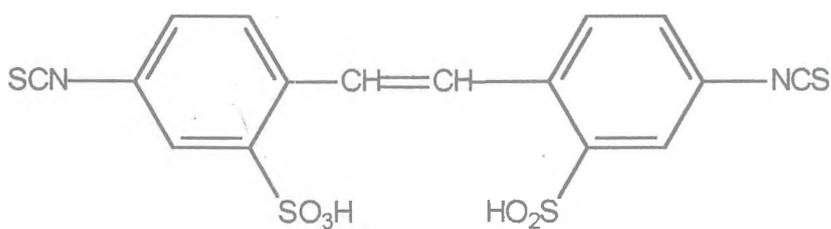


e) ÁCIDO FLUFENÂMICO (FFA)



SITS

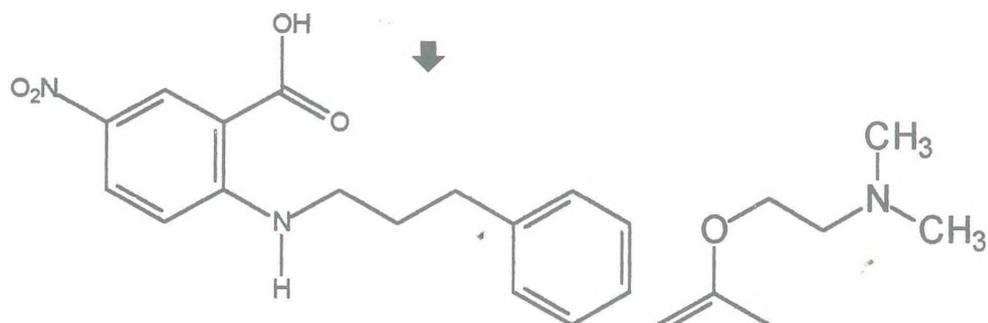
f) (ÁCIDO STILBENO 4-ACETAMIDO-4'-ISOTIOCIANO-2,2'-DISULFÔNICO)



DIDS

g) (ÁCIDO 4,4'-DIISOTIOCIANOSTILBENE-2,2'-DISSULFÔNICO)

h) (ÁCIDO 5-NITRO-2-(3-FENILPROPILAMINO) BENZÓICO)



i) TAMOXIFENO (TAM) →

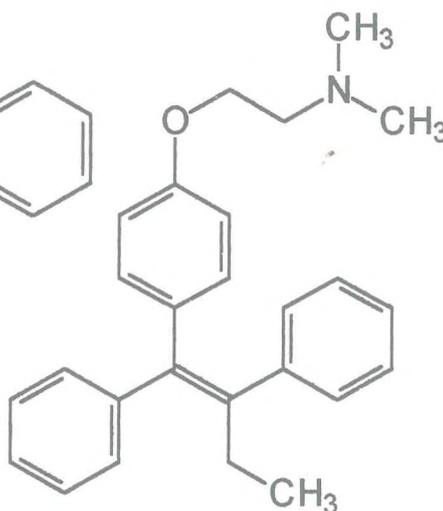


Fig. 5_(a-i) – Fórmulas estruturais planas dos principais compostos químicos bloqueadores dos canais de cloreto

1.3.3.3 Canais de cloreto ativados pelo volume celular (Cl_{SWELL})

O volume celular é freqüentemente desafiado pelas alterações na osmolalidade intra ou extracelular. Para manter o volume constante, a célula desenvolveu vários mecanismos reguladores que dissipam o gradiente osmótico fazendo com que a água fique efetivamente em equilíbrio termodinâmico através da membrana celular. Com algumas exceções, como é o caso das células da medula renal (Lise & Rouffinac, 1985), o transporte iônico transmembrana é o meio mais rápido e eficiente para a célula alcançar e manter o equilíbrio osmótico, isto é, manter constante osmolalidade intra e extracelular. Desde que a membrana celular seja altamente permeável a água, qualquer alteração neste equilíbrio osmótico induz rapidamente o fluxo de água para o meio mais concentrado e o equilíbrio é restaurado. Como a membrana é altamente complacente, o fluxo passivo de água aumenta ou reduz o seu volume. As alterações no volume ativam mecanismos metabólicos e de transporte transmembrana que resultam na perda ou ganho de osmolitos pela célula. Conseqüentemente, água fluirá passivamente para restaurar o seu volume celular original. Quando a célula perde soluto para induzir a saída de água e redução no seu volume, denomina-se de “Diminuição de Volume Regulatório” (Regulatory Volume Decrease - RVD) caso contrário de “Aumento de Volume Regulatório” (Regulatory Volume Increase - RVI).

Nos últimos 20 anos, principalmente a partir dos anos 90, a regulação do volume celular tem sido um assunto extensivamente pesquisado (McCarty & O'Neil, 1992; Lang *et al.*, 1993; Lambert & Hoffmann, 1993; Hoffmann & Dunham, 1995; Nilius *et al.*, 1996; Strange *et al.*, 1996). Estes trabalhos mostram o envolvimento de múltiplos processos fisiológicos no controle do volume celular, mas a contribuição individual de cada um ainda não está completamente esclarecida. Fortes evidências sugerem que a ativação de canais iônicos seria o primeiro evento durante a RVD. Após um súbito

aumento do volume celular, haveria uma co-ativação de canais de K^+ e Cl^- levando ao efluxo de KCl e conseqüente redução do volume celular pela perda osmolitos e saída de água (Banderali & Roy, 1992; Christensen & Hoffmann, 1992; Nilius *et al.*, 1995).

Até recentemente, eram escassas as informações sobre outras condutâncias de cloreto além das $ICl_{(Ca)}$, mas um estudo funcional em artérias cerebrais de rato sugere a presença de uma outra condutância de cloreto diferente das $ICl_{(Ca)}$ que contribui para o tônus miogênico (Nelson *et al.*, 1997). Estudos subseqüentes, em artérias pulmonar e renal de cães, identificaram uma corrente de cloreto modulada pelo volume celular (Yamazaki *et al.*, 1998), postulando-se que a atividade desta corrente pudesse ser responsável pela resposta miogênica. Contemporaneamente, um estudo em células isoladas de músculo liso de veia porta de rato descreveu as características eletrofisiológicas das correntes de cloreto ativadas pelo volume celular, denominadas por I_{SWELL} , demonstrando possuir propriedades farmacológicas próprias (Greenwood & Large, 1998) e diferentes das já conhecidas e bem caracterizadas $ICl_{(Ca)}$ presentes em músculo liso (Large & Wang, 1996). Recentemente, um trabalho funcional e molecular realizado em cultura de células endoteliais de cérebros de ratos, mostra que a corrente de cloreto ativada pela hipotonicidade foi inibida por baixa concentração de tamoxifeno ($10\mu M$) e por $100\mu M$ de DIDS e NPPB. Além disso, as propriedades biofísicas e farmacológicas desses canais mostram forte similaridade com os clones de canais de cloreto tipo CLC-3 (Von Weikersthal *et al.*, 1999), como também foram descritos em outros tecidos (Kawasaki *et al.*, 1994; Duan *et al.*, 1997).

As evidências sugerem que as I_{SWELL} tenham um perfil farmacológico distinto das $ICl_{(Ca)}$. O ácido niflúmico, um clássico inibidor das $ICl_{(Ca)}$ em músculo liso, com $IC_{50} = 2-5\mu M$ (Hogg *et al.*, 1994a), não inibiu as I_{SWELL} em concentrações inferiores a $100\mu M$, mas foram inibidas por DIDS e tamoxifeno em concentrações bem inferiores, em tecido vascular de veia porta de rato

(Greenwood & Large, 1998). Desde que o 17β -estradiol não interferiu na resposta inibitória do tamoxifeno, um potente inibidor das I_{SWELL} em vários tipos de células (Okada, 1997), isto sugere que o seu efeito inibitório sobre as I_{SWELL} foi por um mecanismo independente de seu efeito agonista parcial sobre os receptores estrogênicos (Greenwood & Large, 1998). Outros estudos mostram a falta de efeito inibitório do ácido niflúmico sobre o tônus miogênico em artérias cerebrais pressurizadas de rato, mas que foram sensíveis ao DIDS e IAA-94 (ácido indaniloxalacético 94) (Nelson *et al.*, 1997). Entretanto, em miócitos gástricos de cobaias parece que o ácido niflúmico é mais potente do que o DIDS em inibir as correntes de cloreto sensíveis ao volume (Xu *et al.*, 1997). Estes dados experimentais sugerem que as I_{SWELL} possuem um perfil farmacológico bem distinto das $ICl_{(Ca)}$, sugerindo que a sua modulação farmacológica precisa ser esclarecida. Há poucos estudos investigando a presença desta condutância em músculo liso e sua possível importância funcional na regulação da contratilidade.

1.3.3.4 A família CLC de canais de cloreto e suas implicações genéticas nas doenças

A família CLC é composta de no mínimo nove diferentes tipos de canais de cloreto em mamíferos CLC-1, CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-5, CLC-6, CLC-7, CLC-Ka e CLC-Kb, os quais são codificados pelos genes CLCN1-7, CLCNKa e CLCNKb, respectivamente. Esses genes também estão presente em outros animais, plantas levedura e bactérias. Os CLC-2 e CLC-3 parecem envolvidos na regulação do volume celular (Strange *et al.*, 1996; Jentsch & Günther, 1997; Jentsch *et al.*, 1999;) e os CLC-K e CLC-5 em processos fisiopatológicos renais (Uchida, 2000; Waldegger & Jentsch, 2000b). Em tecido renal de ratos os CLC-Ka e CLC-Kb são classificados como CLC-K1 e CLC-K2 (Kiefele *et al.*, 1994).

Com base nos estudos envolvendo o gene CLCN-2, os ensaios biomeleculares sugerem um modelo estrutural e funcional onde haveria a

presença de 10 a 12 (D1-D12) domínios transmembranas juntamente com mais dois domínios citoplasmáticos próximos ao terminal carboxílico. Ligadas na extremidade amino-terminal existiriam duas regiões, uma essencial do canal e outra sensível ao volume (Jentsch *et al.*, 1990; Gründer *et al.*, 1992).

Estes genes constituem a única família conhecida que codificam os canais de cloreto dependentes de voltagem, com diferente distribuição tecidual e funcional na membrana plasmática e nas organelas intracelulares. Nos últimos anos houve grandes avanços no conhecimento de suas estruturas e funções, mas algumas características permanecem obscuras, como é o caso da localização do poro do canal. São estruturalmente distintos dos canais operados por ligantes (GABA⁻, glicina) no sistema nervoso central, daqueles ativados pelo CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) que estão presentes, inclusive, no epitélio pulmonar, assim como diferem dos canais ativados pelo AMPc que contribuem para a repolarização do miocárdio, estes podem estar envolvidos nas taquicardias induzidas por catecolaminas (Ehara & Ishihara, 1990). A importância médico-terapêutica de compreender a estrutura e função fisiológica desses canais é pelo envolvimento em algumas doenças humanas como a “miotonia congênita”, “síndrome de Bartter” e “doença de Dent”, causadas por mutações nos genes CLC-1, CLC-Kb e CLC-5, respectivamente (Jentsch *et al.*, 1999; Waldegger & Jentsch, 2000a).

A “miotonia congênita autossômica dominante”, doença de Thomsen, ou a “miotonia generalizada autossômica recessiva”, doença de Becker, (Steinmeyer *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 1992; Koty *et al.*, 1996), é decorrente de uma mutação no gene CLCN-1 caracterizada pela redução da força associada à rigidez muscular sempre que iniciam um determinado movimento. No músculo esquelético normal, 70 a 80% da condutância da membrana em repouso se deve aos canais de cloreto e a permeabilidade do cloreto é cerca de 10 vezes maior do que a do potássio. Por esta razão, durante o potencial

de ação, ocorre grande influxo de cloreto para repolarização da membrana. Com a redução da condutância do cloreto, o potencial de ação fica mais prolongado e membrana das células musculares ficam mais excitáveis com prolongado tempo de despolarização e contração do músculo.

A síndrome de Bartter (Simon *et al.*, 1997; Thakker, 2000a) é uma doença hereditária que acomete os canais de cloreto tipo CLC-Kb produzindo alterações no transporte trans-epitelial de cloreto, com a perda severa de sal pelos rins, principalmente, no segmento espesso ascendente da alça de Henle e na porção distal do túbulo. Em camundongos nocauteados, a falta do gene *CLCN-K1*, correspondente ao gene *CLCN-Ka* em humanos, leva a diabetes insípido nefrogênico (Matsumura *et al.*, 1999).

A doença de Dent (Lloyd *et al.*, 1996; Norden *et al.*, 2000; Thakker, 2000a,b; Yamamoto *et al.*, 2000) é decorrente de mutações no gene *CLCN-5*. É uma desordem ligada ao cromossomo-X produzindo proteinúria e hipercalciúria. A hipercalciúria leva ao aparecimento de sintomas secundários, como a formação de nefrolitíase, nefrocalcinose podendo chegar à falência renal.

Embora não seja uma alteração nos genes da família de canais de cloreto CLC, a fibrose cística (Kunzelmann, 1999; Larson *et al.*, 2000; Skach, 2000) é uma doença autossômica recessiva decorrente de mutações no cromossomo-7 que compromete o epitélio das vias aéreas, pancreáticas e os ductos das glândulas sudoríparas. A membrana das células epiteliais não é capaz de transportar, eficientemente, os íons cloreto e, conseqüentemente, dificulta o transporte de água para a luz dos tubos levando ao espessamento do muco. Em algumas situações poderá haver obstrução e comprometimento funcional respiratório, podendo ser fatal. Entretanto, estudo em epitélio traqueal de camundongo indica a presença do gene *CLC-A1*, o codificador da proteína constitutiva dos canais de cloreto ativados pelo cálcio. Isto sugere um

caminho para as investigações de seu possível envolvimento na patogênese da cistite fibrosa (Gandhi *et al.*, 1998).

Recentemente, o conceito de “Canalopatias” passou a fazer parte do vocabulário científico, designando, de forma geral, as desordens congênitas causadas por mutações que ocorrem nos genes codificadores das proteínas constituintes dos canais iônicos (Hoffman, 1995; Felix, 2000; Moxley, 2000; Celesia, 2001). Com o advento das técnicas de estudos biomoleculares, vários canais iônicos foram clonados e relacionados a estados patológicos, como é o caso de algumas doenças ligadas aos canais de cloreto descritas acima. Além destas, recentes investigações mostram que outras patologias como as neurológicas e cardiovasculares estão associadas a canais de potássio, sódio e cálcio (Sanguinetti & Spector, 1997; Bond, 2000; Lawson, 2000; Nattel, 2001; Schofield, 2001). Entretanto, apesar das recentes pesquisas refletirem fortemente um possível envolvimento fisiológico dos canais de cloreto ativados pelo cálcio em músculo liso, parece que estes canais ainda não foram clonados neste tipo de tecido, permanecendo como um campo a ser explorado pelas pesquisas científicas quanto ao seu envolvimento ou não em estados patológicos.

1.4 EFEITOS INDUZIDOS POR AGONISTAS NO ESTÔMAGO

1.4.1 Efeitos da 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina)

A 5-HT foi originalmente descoberta em 1948 quando se procurava identificar uma substância vasoconstrictora liberada quando o sangue coagulava. Hoje, sabe-se que as principais fontes de 5-HT são as células enterocromafins das paredes do trato gastrointestinal, as plaquetas e o sistema nervoso e que funciona como neurotransmissor no sistema nervoso entérico.

O interesse em se ter uma norma de classificação para os receptores da 5-HT pode ser sustentado, não só por motivos acadêmicos, mas por pelo menos duas razões fundamentais. Uma, conhecendo as características

biomoleculares e os mecanismos funcionais de cada receptor, reluz o potencial para o desenvolvimento de drogas mais seletivas. Outra, desde que questionemos o porquê da existência de vários tipos de receptores para uma única droga, isto releva a importância fisiológica da distribuição dos receptores ocorrer diferentemente nos tecidos e nas espécies. Assim, um raciocínio lógico, sensato e intuitivo nos leva a pensar que uma mesma substância endógena poderia ativar mecanismos fisiológicos distintos dependendo do tipo de receptor presente em determinado tecido. Portanto, seria possível desenvolver drogas mais seletivas para intervir, farmacologicamente, ativando ou inibindo os mecanismos fisiológicos controlados pelos diferentes tipos de receptores.

Originalmente, os receptores da 5-HT foram agrupados nos subtipos M e D, sugerindo que os tipos M se localizavam nas terminações nervosas parassimpáticas controlando a liberação de acetilcolina e os tipos D se localizavam no músculo liso (Gaddum & Picarelli, 1957), os quais são, atualmente, classificados como 5-HT_{2A} e 5-HT₃, respectivamente (Humphrey *et al.*, 1993). Embora os resultados de estudos subsequentes na periferia e em cérebros de rato fossem compatíveis com a noção de subtipos de receptores para a 5-HT, os estudos com radioligantes forneceram as primeiras provas definitivas para dois locais distintos de reconhecimento da 5-HT, classificando-os como 5-HT₁ e 5-HT₂ (Peroutka & Snyder, 1979).

Esta classificação tornou-se mais abrangente em 1979 quando foram identificados, em cérebros de rato, dois sítios distintos de ligação da 5-HT (Peroutka & Snyder, 1979). Estudos posteriores demonstraram que esses receptores eram subtipos da classificação proposta por Bradley *et al.* (1986), a qual foi constituída por três principais famílias 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃, perdurando até 1993. Ao longo dos sete anos seguintes, estudos biomoleculares mostraram novas identidades de receptores serotoninérgicos que não se enquadravam na classificação de Bradley, como também havia

alguns conflitos de nomenclatura como, por exemplo, o receptor 5-HT_{1C} agora classificado como 5-HT_{2C} (Humphrey *et al.*, 1993), e o 5-HT₂ como 5-HT_{2A} e, particularmente, um tipo de receptor presente no fundo de estômago de rato sem classificação definida, atualmente, classificado como 5-HT_{2B}. A partir de 1994 passou a vigorar a classificação dos receptores da 5-HT proposta por Humphrey *et al.* (1993), os quais continuaram subdivididos em famílias e subtipos com as devidos ajustes na corrente classificação. Esta considera os aspectos operacionais clássicos de Bradley, que era embasado apenas no reconhecimento de receptores por radioligantes sintéticos, e acrescenta conceitos modernos da biologia molecular que determina a seqüência de aminoácidos e os mecanismos de transdução de sinais envolvidos na ativação de cada tipo de receptor, desde interação droga-receptor até a geração de segundos mensageiros (Hoyer *et al.*, 1994). Esses três princípios permitiram classificar, em detalhes, todos os receptores atualmente conhecidos da 5-HT, principalmente aqueles com dificuldade na classificação pela forma clássica operacional de Bradley, como é o caso dos subtipos das superfamílias 5-HT₁ e 5-HT₂.

Há quase 50 anos Vane (1957) publicou que a 5-HT era um potente efector da musculatura lisa longitudinal de estômago de rato. Originalmente, descreveu que a 5-HT promovia contração pela ativação de um receptor atípico, assim chamado por ser resistente a uma classificação. É um tipo de receptor similar ao 5-HT_{1C}, mas não idêntico (Baez *et al.*, 1990). Ao ser, originalmente, clonado e seqüenciado em fundo de estômago de rato, mostrou grande homologia com os receptores 5-HT_{1C} e 5-HT₂, sendo denominado de SRL (serotonin receptor-like) por Foguet *et al.*, (1992) e de 5-HT_{2F} por Kursar *et al.*, (1992). Finalmente, foram reconhecidos pertencer à família 5-HT₂ como subtipo 5-HT_{2B} (Hoyer *et al.*, 1994).

Embora as clonagens em humanos mostrassem grande homologia com os receptores 5-HT_{2B} de ratos (Choi *et al.*, 1994; Kursar *et al.*, 1994; Schmuck

et al., 1994; Bonhaus *et al.*, 1995), suas propriedades farmacológicas foram bem caracterizadas mostrando algumas particularidades entre ratos e humanos (Wainscott *et al.*, 1996). Entretanto, a diferença estrutural molecular entre os receptores 5-HT_{2B} nas espécies pode ajudar a dissecar, farmacologicamente, os domínios trans-membrana de ligantes em humanos, possibilitando a síntese de drogas com maior seletividade e possíveis usos terapêuticos.

Considerando os aspectos funcionais, os receptores 5-HT_{1(ABDEF)} inibem a formação de AMPc, 5-HT_{2(AC)} estimulam a hidrólise do fosfatidilinositol gerando IP₃ e diacilglicerol, 5-HT₃ são ligados a canais catiônicos e, curiosamente, possuem grande homologia com os receptores nicotínicos da ACh, 5-HT₄ e 5-HT₆ estimulam a formação de AMPc (Hoyer *et al.*, 1994; Ullmer *et al.*, 1996). Entretanto, as informações sobre as contrações induzidas por 5-HT_{2B} em fundo de estômago de rato, em alguns aspectos, são contraditórias. Por exemplo, alguns autores reportam que o 5-HT_{2B} seja um tipo de receptor acoplado a fosfolipase-C e hidrólise do fosfatidilinositol com geração de IP₃ (Foguet *et al.*, 1992; Kursar *et al.*, 1992; Hoyer *et al.*, 1994) outros mostram que não (Secretst *et al.*, 1989; Ullmer *et al.*, 1996). Mesmo diante de algumas divergências, há consenso de que o mecanismo de sinalização e contração via 5-HT_{2B} seja dependente, principalmente, do influxo de cálcio via VDCC, em menor parcela, da liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a rianodine e da ativação da PKC. Todos esses mecanismos são, aparentemente, independentes da hidrólise de fosfatidilinositol (Cox & Cohen, 1995a, 1996; Ullmer *et al.*, 1996), da liberação de ACh (Vane, 1957), de metabólitos de ácido aracdônico, de AMPc e GMPc (Cohen *et al.*, 1990). Desde que o óxido nítrico esteja envolvido na contração de certos músculos gastrointestinais, o seu envolvimento nas contrações induzidas pela 5-HT_{2B} em fundo de estômago de rato parece não ocorrer (Cox & Cohen, 1995b). A natureza do acoplamento do receptor 5-HT_{2B} com cada um destes mecanismos ainda não está completamente esclarecida, havendo

apenas especulações de que os receptores 5-HT_{2B} estejam direta ou indiretamente ligados aos VDCC e à via de uma proteína-G_{αz} específica, respectivamente (Wang et. al., 1993). Postulou-se que a liberação do cálcio intracelular envolvesse a ativação de adenosina difosfato-ribose cíclico (ADPRc) como segundo mensageiro solúvel (Galione, 1992), mas, recentemente, um estudo mostrou que a infusão de ADPRc não simulou a resposta da 5-HT, descartando esta possibilidade (Ullmer et. al., 1996). Também o mecanismo de ativação da PKC independente da geração de IP₃, permanece obscuro, mas, um possível mecanismo envolvido seria a geração de diacilglicerol pela hidrólise da fosfaditilcolina via ativação da fosfolipase-D (Foguet et. al., 1992). Portanto, o mecanismo de sinalização via receptores 5-HT_{2B} em fundo de estômago possui características farmacológicas distintas dos demais membros da família 5-HT₂, enquadrando-se em um mecanismo de sinalização intracelular totalmente desconhecido, que parece não envolver quaisquer daqueles classicamente bem determinados.

1.4.2 Efeitos da acetilcolina

Os efeitos da acetilcolina (ACh) na periferia resultam da ativação de receptores muscarínicos e nicotínicos. No sistema nervoso central, os receptores muscarínicos parecem envolvidos no controle motor, regulação da temperatura, da atividade cardíaca e da memória, mas, quanto aos nicotínicos, as evidências são limitadas para o papel fisiológico dos receptores nicotínicos na transmissão sináptica cerebral (Role & Berg, 1996). Desde os experimentos de Dale em 1914 distinguindo as ações muscarínicas e nicotínicas da acetilcolina (Rang et. al., 1997b) e dos primeiros relatos históricos da existência dos subtipos de receptores muscarínicos (Riker & Wescoe, 1951), sabe-se que, dentre outros efeitos periféricos, os receptores muscarínicos medeiam as contrações em músculo liso, secreções glandulares e modulação cardíaca. Atualmente, a mais recente classificação dos receptores muscarínicos fundamenta-se em clonagens, investigações

farmacológicas, estudos dos mecanismos de transdução de sinais e nas respostas funcionais, que definem cinco tipos de receptores, M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , e M_5 (Caulfield & Birdsall, 1998). Os receptores M_1 são encontrados nos gânglios e várias glândulas secretoras; os M_2 predominam no miocárdio reduzindo a força e a frequência cardíaca, mas aparecem também no músculo liso; os M_3 e M_4 estão presentes no músculo liso. Quanto aos receptores M_5 , apesar das evidências de que a proteína M_5 e o respectivo RNAm estejam presentes no cérebro e na periferia (Reever *et. al.*, 1997; Weiner *et. al.*, 1990), não há estudos conclusivos de quais os tecidos que os expressam e respondem a ativação destes receptores. Entretanto, há evidências de que músculo liso de esôfago humano expresse todos os tipos de receptores, inclusive o M_5 . (Wang *et. al.*, 2000).

Os receptores M_1 , M_3 e M_5 , em particular os M_3 , por serem os responsáveis pela contração colinérgica sobre a musculatura lisa do sistema gastrointestinal, interagem com a proteína- $G_{q/11}$ estimulando a fofolipase-C com a produção de IP_3 e DAG. O IP_3 induz a liberação de cálcio dos estoques intracelulares enquanto o DAG ativa a PKC. Ambos os mecanismos operam como moduladores funcionais na contratilidade do músculo liso, particularmente, no trato gastrointestinal (Nishizuka, 1992; Berridge, 1993; Tanaka & Nishizuka, 1994). Os receptores M_2 e M_4 interagem com um grupo diferente de proteína-G (G_i e G_o) inibindo a adenilil ciclase com diminuição da concentração de AMP_c . Além disso, ativam canais de potássio operado por receptor, suprimindo a atividade dos VDCC. Esses efeitos podem explicar os efeitos inotrópicos e cronotrópicos da acetilcolina no miocárdio. Todos os receptores muscarínicos são bloqueados pela atropina.

1.4.3 Efeitos da prostaglandina- $F_{2\alpha}$

Historicamente, o interesse pelos eicosanóides surgiu em 1930 quando dois ginecologistas americanos, Kurzrok e Lieb, relataram que havia no sêmen uma substância capaz de contrair o músculo liso uterino. Mais tarde,

Goldblatt, na Inglaterra, e von Euler, na Suécia, descreveram, independentemente, as atividades contráteis da musculatura lisa e vasodilatadora presentes no líquido seminal e glândulas reprodutoras acessórias. Em 1973, Von Euler, supondo que era produzida na próstata, denominou esta substância de prostaglandina que, na verdade, era produzida na vesícula seminal, mas esta denominação, embora inadequada, perdura até hoje. Após um período de mais de 20 anos, demonstrou-se que a prostaglandina não era apenas uma única substância, mas constituíam uma verdadeira família de compostos. Na década de 60, Bergstrom & Samuelsson, determinaram a estrutura das duas primeiras prostaglandinas e as denominou de E e F (PGE e PGF_{2α}). Posteriormente, verificou-se que várias outras prostaglandinas eram produzidas nos tecidos a partir do metabolismo do ácido araquidônico, inclusive nas camadas musculares do estômago onde há produção de PGE₁, PGE₂ e PGF_{2α} (Sanders & Northrup, 1983). Hoje, as prostaglandinas e outros derivados do ácido araquidônico são, reconhecidamente, compostos essenciais em muitos processos reguladores de funções celulares e seus papéis fisiológicos não estão completamente esclarecidos. Entretanto, sabe-se que as PGF_{2α} possuem importante papel fisiológico no ciclo menstrual onde, não havendo fertilização, ocorre elevação da síntese de PGF_{2α} no corpo lúteo, vasoconstrição local, hipoxia, morte tecidual com conseqüente declínio na produção hormonal. Como conseqüência, o revestimento endometrial uterino regride e é eliminado pelos efeitos contráteis das PGF_{2α} sobre miométrio (Wilson & Adaikan, 1999). A partir dos anos 80, as PGF_{2α} passaram a ser utilizadas clinicamente, principalmente, na indução dos trabalhos de parto (Lubianca, 1998).

Estudo em fundo de estômago de rato mostra evidências de que as prostaglandinas estão envolvidas na regulação da atividade do músculo liso, potencializando os efeitos relaxantes induzidos pela noradrenalina (Radomirov & Venkova, 1986) e parecem exercer papel modulador sobre a motilidade mediada por nervos colinérgicos em músculo gástrico de cobaio

(Milenov & Rakovska, 1983). A inibição de seus efeitos poderá implicar em alterações de respostas fisiológicas e, portanto, pode ser uma via para intervir, farmacologicamente, em processos patológicos.

De acordo com a potência dos cinco prostanóides naturais sobre diversos tipos de preparações, os receptores das prostaglandinas PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , tromboxano- A_2 e PGE_2 foram designados de DP, FP, IP, TP e EP, respectivamente. Os análogos sintéticos dos prostanóides naturais apóiam e ampliam esta classificação, que foi adicionalmente confirmada quando se passou a dispor de alguns antagonistas. Os dados obtidos com os compostos sintéticos levaram à proposta de que há três subgrupos de receptores para a PGE_2 : EP_1 , EP_2 e EP_3 (Rang *et. al.*, 1997a). Entretanto, a literatura parece carecer de uma norma de classificação para os diversos tipos e subtipos de prostanóides e seus respectivos receptores, talvez pela falta de ferramentas farmacológicas adequadas para as investigações nesta área.

Considerando os efeitos das principais prostaglandinas sobre o trato gastrointestinal, de modo geral a camada muscular do estômago de rato é contraída pelas PGA_2 , PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ e PGI_2 , enquanto a camada circular, geralmente, é relaxada pela PGE_2 (Goldenberg & Subers, 1983; Milenov & Golenhofen, 1982). Em humanos, há evidências de que, ao longo do trato gastrointestinal, as camadas musculares mostram diferentes sensibilidades aos prostanóides, onde o estômago foi mais sensível do que as porções distais do íleo e cólon sigmóide (Bennett *et. al.*, 1981). Entretanto, os efeitos podem variar de acordo com o receptor ativado. Por exemplo, ativação pela PGE_2 dos receptores da EP_1 e EP_3 induzem contração enquanto EP_2 relaxamento do músculo liso gastrointestinal (Rang *et. al.*, 1997a). Estudos em estômago de cobaio mostram que existe uma interação mecânica e elétrica entre as duas camadas musculares. Quando a camada longitudinal foi removida, as contrações tônicas induzidas pela PGE_1 na camada circular

desapareceram, sugerindo uma relação funcional entre as duas camadas (Sakamoto & Nasu, 1987). As PGI_2 causam contração gastrointestinal, porém são menos ativas do que as PGE e $PGF_{2\alpha}$ (Campbell & Halushka, 1996). Entretanto, em músculo liso longitudinal de fundo de estômago de cobaio as contrações induzidas pela PGI_2 foram mais potentes do que aqueles produzidos pela $PGF_{2\alpha}$ e acetilcolina (Milenov *et. al.*, 1983).

Desde que as $PGF_{2\alpha}$ possuam, reconhecidamente, aplicações clínicas e pelos seus potentes efeitos espasmódicos em músculo liso e que, em especial, as células do músculo liso longitudinal do estômago produzam grandes quantidades de PGE_1 , PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ (Sanders & Northrup, 1983) e que as PGE_2 exerçam efeitos fisiológicos opostos na nas diferentes camadas musculares do estômago (Goldenberg & Subers, 1983) e da possível interação fisiológica entre as camadas longitudinal e circular (Sakamoto & Nasu, 1987), decidimos utilizar a $PGF_{2\alpha}$ em nossos experimentos pelos seus efeitos estritamente contráteis. Seus efeitos são mediados pela ativação das proteínas quinaes C_α e C_ϵ (PKC_α e PKC_ϵ) as quais são dependentes e independentes de cálcio, respectivamente (Heaslip & Sickels, 1989; Kanashiro & Khalil, 1998).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivos Gerais

- ◆ Avaliar o possível envolvimento dos canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular ($Cl_{(Ca)}$) na contração induzida por agonistas.
- ◆ Avaliar o possível envolvimento dos canais de cloreto ativados pelo aumento do volume celular (Cl_{SWELL}) induzido pela solução hipotônica.

1.5.2 Objetivos específicos

- ◆ Avaliar os efeitos dos bloqueadores dos canais de cloreto (NFA, DCDPC, DIDS) sobre as contrações induzidas por agonistas (5-HT, ACh, $PGF_{2\alpha}$) e pelo cloreto de potássio (KCl).
- ◆ Avaliar possíveis efeitos do NFA sobre os canais de potássio e de cálcio dependentes de voltagem.
- ◆ Avaliar a dependência de cálcio e de cloreto das respostas induzidas por agonistas (5-HT, ACh, $PGF_{2\alpha}$) e pela solução hipotônica.
- ◆ Avaliar os efeitos dos bloqueadores dos canais de cloreto (NFA, DIDS, TAM, NPPB) sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.
- ◆ Avaliar, eletrofisiologicamente, os efeitos do NFA e da NIF sobre a despolarização da membrana celular induzida pela solução hipotônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

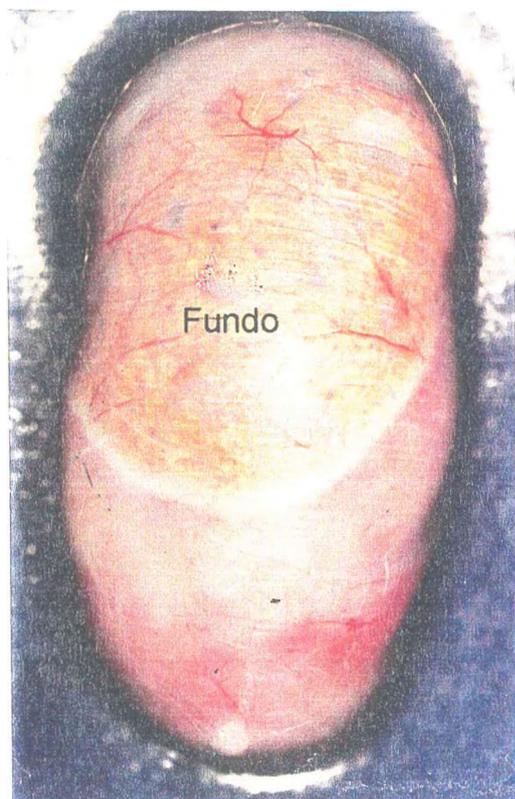
2.1 AVALIAÇÕES EM FUNDO DE ESTÔMAGO

2.1.1 Medidas de Contratilidade

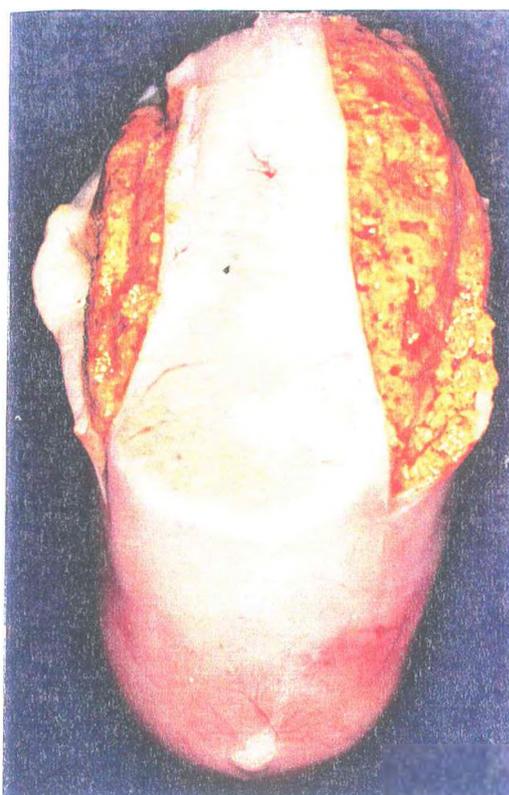
Ratos machos sadios Wistar com peso entre 250-350 gramas, provenientes do Biotério Central da UFC, foram sacrificados por concussão cerebral e descolamento cervical no dia da realização dos experimentos. O estômago foi, cuidadosamente, dissecado e removido através de uma incisão abdominal e imediatamente imerso em solução fisiológica de Tyrode normal (TN). Retiramos a porção correspondente ao fundo do estômago e a mantivemos por 15-20 minutos em TN para que a mesma relaxasse espontaneamente, pois o trauma decorrente dos cortes durante a sua remoção estimula a contração do tecido. Tiras de, aproximadamente, 1-2cm de comprimento foram cortadas, paralelamente, no sentido longitudinal do estômago e montadas verticalmente em câmara de perfusão com capacidade para 10 ml de solução fisiológica a 37°C, pH 7,4 e constante borbulhamento de ar, onde uma extremidade foi conectada a uma base fixa e a outra a um transdutor de força (Fig. 6). Inicialmente, aplicamos tensão de 2-3 gramas e aguardamos o relaxamento espontâneo da preparação. Se houvesse o relaxamento até um valor abaixo da tensão equivalente a um grama, aplicávamos nova tensão até que a preparação estabilizasse sob tensão aproximada de um grama. Caso contrário, se o relaxamento ficasse acima de um grama, aliviávamos a tensão para um grama, aproximadamente. Estudo funcional em fundo de estômago de rato, mostra que a tensão inicial ótima deve ser em torno de 4g (Secrest et al., 1989, 1991) que, de fato, esta observação foi condizente com os nossos experimentos. Após uma hora para o equilíbrio da preparação sob tensão estável de um grama, iniciamos os experimentos com a adição direta das drogas no banho. A preparação era conectada, diretamente, a um transdutor de força isométrico (T) (Grass

Modelo FTO.3, Quincy, MA, U.S.A. – Fig. 6d), que transforma da força muscular mecânica em sinal elétrico, o qual, na seqüência, era ligado a um amplificador de sinal (Modelo PM-1000, USA – Fig. 6g). Os dados foram gravados por um microcomputador e posteriormente analisados utilizando o programa WINDAQ versão 1.65 (DATAQ Instruments, Inc., USA). Esta fase inicial de montagem da preparação foi, criteriosamente, obedecida para todos os protocolos de contratilidade e a preparação foi, de praxe, estimulada com KCl (60mM) para observar a sua responsividade antes dar início às aplicações das drogas testes. Todos os protocolos experimentais do presente trabalho foram realizados, separadamente, em grupos diferentes de animais.

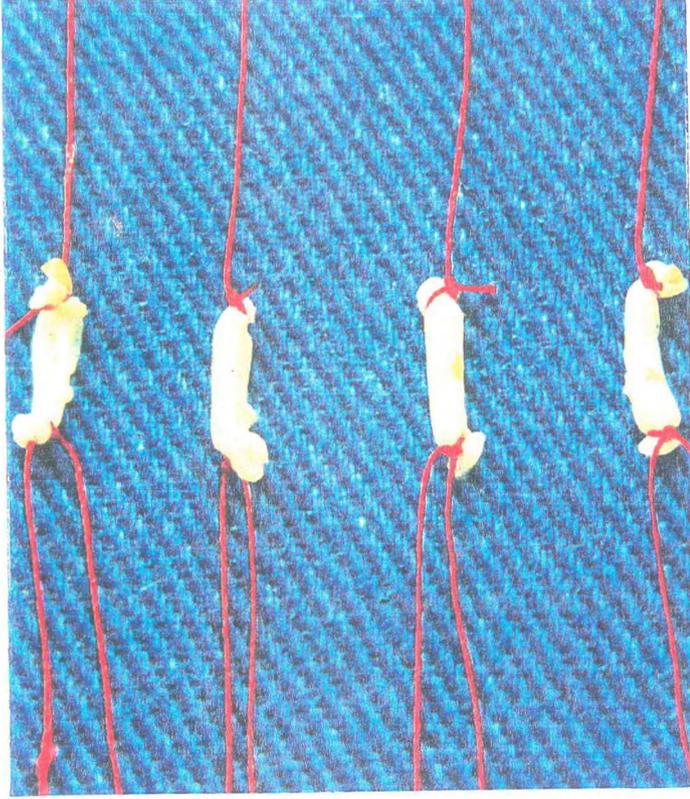
a)



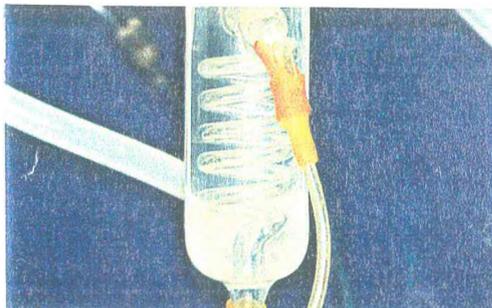
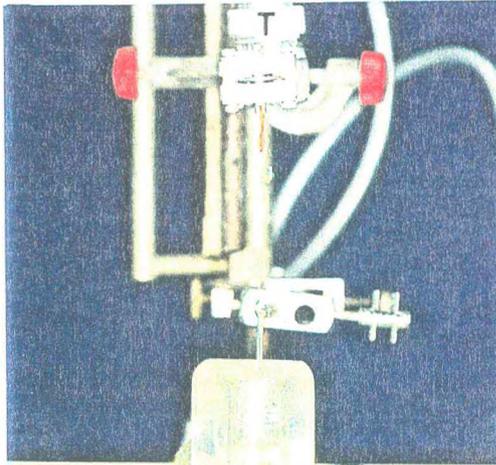
b)



c)



d)



e)

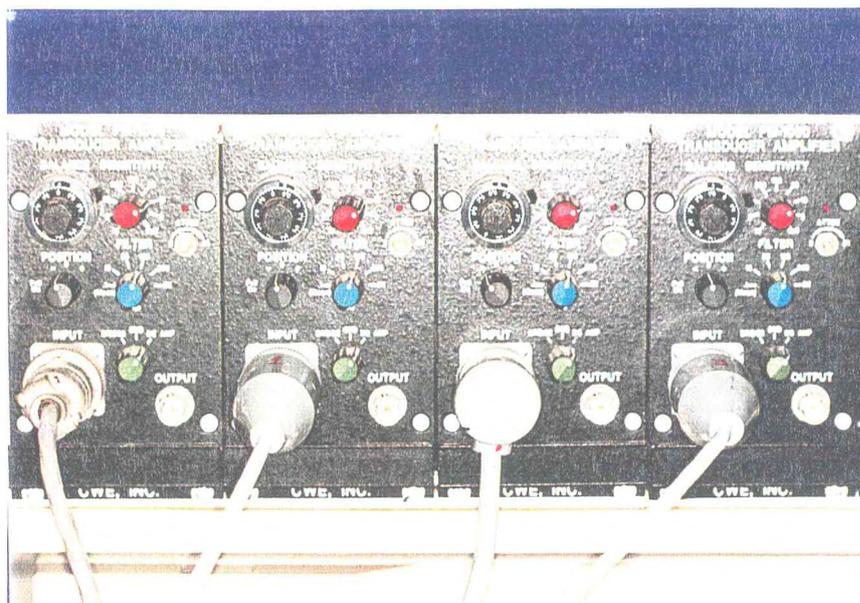


Fig. 6(a-g) – Fotografias ilustrativas da técnica de dissecação, remoção e montagem da preparação de músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato. **a)** – Vista da região correspondente ao fundo do estômago; **b)** – Remoção da parte central do fundo do estômago para uso experimental; **c)** – Obtenção de 4 segmentos de, aproximadamente, 1-2cm, cortados, paralelamente, no sentido longitudinal do estômago; **d)** – Montagem do segmento em câmara de perfusão onde a extremidade inferior é fixa e a superior conectada a um transdutor de força (T) com fio de algodão inelástico; **e)** – Amplificador de sinal elétrico que recebe o cabo de ligação com o transdutor de força.

7

2.1.2 Medidas eletrofisiológicas

Segmento (2mm x 3mm) de fundo de estômago de rato foi fixado no fundo de uma câmara de perfusão confeccionada de acrílico transparente, contendo na base uma camada de silgar para imobilização da preparação sob moderado estiramento, aproximadamente 2-3 vezes o tamanho em repouso, à temperatura ambiente (20-25°C), fluxo de solução fisiológica constante de 25-30 gotas/minutos (~1,5ml/min) e oxigenação por borbulhamento de ar. Após a montagem, aguardou-se 40-60 minutos para a estabilização da preparação.

Os valores dos potenciais transmembrana foram registrados através de microeletrodo intracelular, confeccionados a partir de capilares de vidro borossilicato (GC 150T-7.5 – Clark Electromedical, UK) por um puxador de eletrodo (Modelo P-97, Sutter instrument, Inc., USA), com resistência final variando de 40-80 M Ω após ser preenchido com solução salina de KCl (3M) com 5% de citrato de potássio. O microeletrodo era conectado a um pré-amplificador por meio de um fio de prata (eletrômetro Modelo M4-A, New Haven, CT). Com o auxílio de um microscópio, aproximávamos o microeletrodo até que sua ponta tocasse na solução de banho. Na seqüência, continuávamos os avanços do microeletrodo com um manipulador manual até que atingíssemos o meio intracelular, isto é, o empalamento célula. Este processo era, constantemente, monitorado por um osciloscópio (Tektronic 5111A, USA), o qual acusava o momento da penetração na célula por uma deflexão aguda a partir da linha basal (0mV). O ponto mais baixo da deflexão mostrava o valor do potencial transmembrana. Se no recuo brusco do eletrodo, isto é, o desempalamento da célula, o sinal do osciloscópio retornasse imediatamente ao nível basal (0mV), indicava que o eletrodo estava, de fato, dentro da célula, assegurando que o registro do valor do potencial transmembrana era verdadeiro.

Desde que as contrações espontâneas, que são características fisiológicas inerente da musculatura lisa do trato gastrointestinal, expulsavam

o microeletrodo da célula após alguns segundos de seu empalamento, optamos em realizar os nossos experimentos pela obtenção de registros seriados, isto é, realizamos os empalamentos e leitura dos respectivos valores dos potenciais de membrana durante um período de controle e de exposição às drogas.

Inicialmente, obtínhamos os potenciais de membrana para os controles durante um período de 10-20 minutos em solução de Tyrode normal (TN) no qual empalávamos o maior número de células possível. Em seguida, o mesmo procedimento era realizado na presença de solução hipotônica (SH), mas utilizando um período mais prolongado de 15-30 minutos, isto para que os efeitos da SH se instalassem. Na seqüência, recuperávamos os valores de potenciais controles por um período de, aproximadamente, 20 minutos para prosseguir com aplicações das drogas testes. Os experimentos que não seguiram esta etapa preliminar foram abortados. Os efeitos do ácido niflúmico ($30\mu\text{M}$) e da nifedipina ($1\mu\text{M}$) foram avaliados por um período de 15-30 minutos na presença de TN e SH, onde os empalamentos realizados nos primeiros 10-15 minutos foram desprezados. Portanto, para efeitos de cálculos e análise estatística trabalhamos com os dados obtidos numa faixa de tempo que nos assegurasse, com base nos dados controles, que os efeitos das soluções e das drogas já havia produzido seus efeitos sobre a atividade elétrica da membrana. Após um período de 20 minutos de lavagem com TN para eliminação das drogas, rotineiramente, observávamos a recuperação da preparação pelas medidas de potenciais de membrana equivalentes ao controle (Fig. 7).

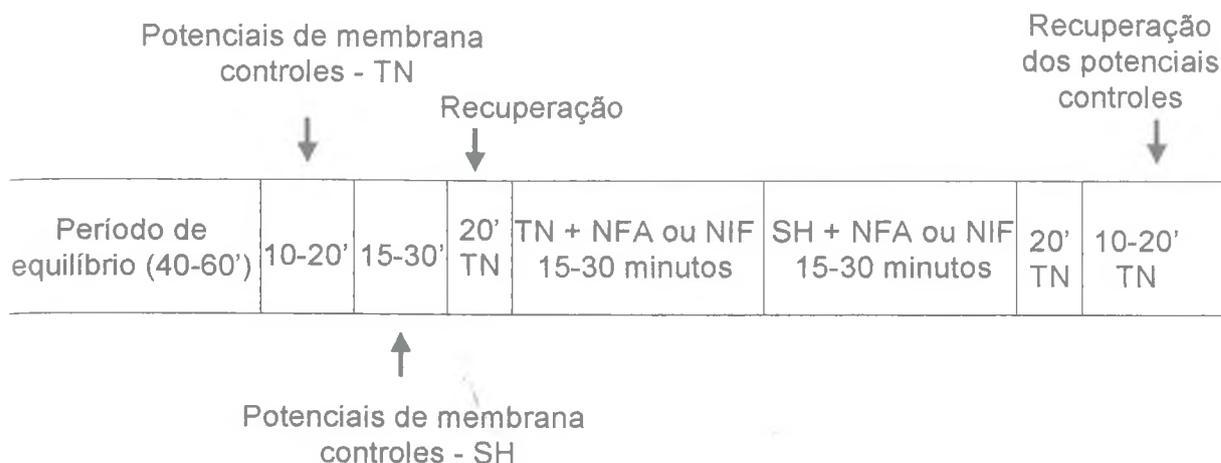


Fig. 7 - Esquema representativo dos protocolos eletrofisiológicos realizados para avaliação das alterações elétricas induzidas pela solução hipotônica sobre a membrana celular.

2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Os sais utilizados no preparo das soluções foram obtidos das companhias Sigma Chemical Company (St. Luis, MO, USA), Merck Sharp Dohme (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A solução fisiológica nutritiva de Tyrode (TN), utilizada como banho da preparação, foi preparada com água deionizada contendo a seguinte composição química em concentração milimolar - [mM]: NaCl 136, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 0,98, NaH₂PO₄ 0,36, NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5. As demais soluções salinas utilizadas foram derivadas desta composição básica, como mostra o anexo - A.

A solução salina com alta concentração de potássio [60mM] foi obtida pela substituição iônica equimolar do NaCl (81mM) por KCl. A solução zero-cloreto gluconato e a zero-cloreto acetato (0Cl-GLU e 0Cl-AC) foram preparadas pela substituição equimolar dos sais de cloreto pelos respectivos sais de gluconato e acetato. A solução hipotônica foi preparada pela redução

da concentração de NaCl de 136 para 68 mM (50%) da quantidade presente na solução de Tyrode normal (TN). Para a solução hipotônica zero-cloreto gluconato e a zero-cloreto acetado (SH-0Cl-GLU e SH-0Cl-AC) reduzimos para 50% os sais de gluconato e acetato de sódio, respectivamente. No preparo da solução de Tyrode normal-zero-cálcio (TN-0Ca) e da hipotônica-zero-cálcio (SH-0Ca), deixamos apenas de incluir o CaCl_2 e o gluconato de cálcio, respectivamente, acrescentando-se 2mM de EGTA para quelação do possível cálcio residual (Anexo – A). Para o ajuste do pH utilizou-se hidróxido de sódio [1M] e/ou ácido clorídrico [1N], mas, para as soluções zero-cloreto, o ácido clorídrico foi substituído pelo ácido acético glacial [1M] para evitar a introdução de íons cloreto na solução

2.3 DROGAS E PREPARO DAS SOLUÇÕES DE USO EXPERIMENTAL

As seguintes drogas foram utilizadas nos experimentos: 5-hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina (ACh), nifedipina (NIF), prostaglandina- $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), levcromacalina (LEV), ácido niflúmico (NFA) (2-[3-(trifluorometil)anilino]nicotínico), ácido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2-2'-dissulfônico (DIDS), 3,5-diclorofenilamina 2-carboxílico (DCDPC), ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzóico (NPPB), tamoxifeno (TAM), foram adquiridas da Sigma Chemical Company.

O preparo das soluções estoques de 5-HT, ACh, $\text{PGF}_{2\alpha}$, LEV, DIDS e TAM, dissolveu-se estas drogas em água deionizada, enquanto o NFA, DCDPC e o NPPB, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a nifedipina (NIF) em álcool etílico, esta foi mantida, constantemente, protegida contra luminosidade durante todo o período experimental. O ácido etileno bis (b-aminoetil éter N,N,N',N' tetracético) (EGTA) [2mM] foi empregado apenas nas soluções em meio zero-cálcio. Quando não em uso, as soluções estoques, foram mantidas em temperatura abaixo de 0°C. As demais diluições para uso experimental foram feitas no dia do experimento em Tyrode normal (TN) ou, no caso dos protocolos com zero-cálcio, em água deionizada. Desde que o

DMSO (dimetilsulfóxido) fora utilizado como solvente para algumas drogas, seus efeitos foram avaliados em grupos controles pareados nas concentrações equivalentes àquelas utilizadas como solventes das drogas.

2.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS

2.4.1 Avaliação dos agentes inibidores da contração

A figura-8 esquematiza os passos seqüenciais seguidos nos protocolos desenvolvidos na avaliação da contratilidade em condições normais de cálcio extracelular. Após um período de 1 hora de estabilização, a responsividade da preparação foi, rotineiramente, testada com a aplicação de 60 mM de KCl. Avaliamos os efeitos dos agentes inibidores da contração muscular: NFA [1-30 μ M], NIF [1 μ M], LEV [3 μ M], DIDS [1-300 μ M], e DCDPC [1-100 μ M] contra os agentes indutores de contração muscular: KCl [60mM], 5-HT [10 μ M], ACh [10 μ M], PGF_{2 α} [10 μ M] e SH [68mM]. Decidimos utilizar a concentração de 10 μ M para a 5-HT, PGF_{2 α} e ACh de acordo com um recente estudo comparativo entre estes três agonistas em fundo de estômago de rato (Secrest et al, 1989). Inicialmente, obtivemos duas contrações de amplitudes semelhantes para serem tratadas como controles. Após a preparação retornar à linha basal, aplicamos o agente inibidor da contração por um período de 5-10 minutos, e subseqüentemente, o agente contraturante por 1-3 minutos. Após este período, aplicávamos lavagens sucessivas e periódicas com solução de TN para a eliminação da droga até que a preparação voltasse à linha de base. Esse procedimento foi repetido para todos os valores de concentração utilizados para os agentes inibidores. Após 40-60 minutos de lavagens periódicas com TN testávamos a recuperação da resposta inicial da preparação.

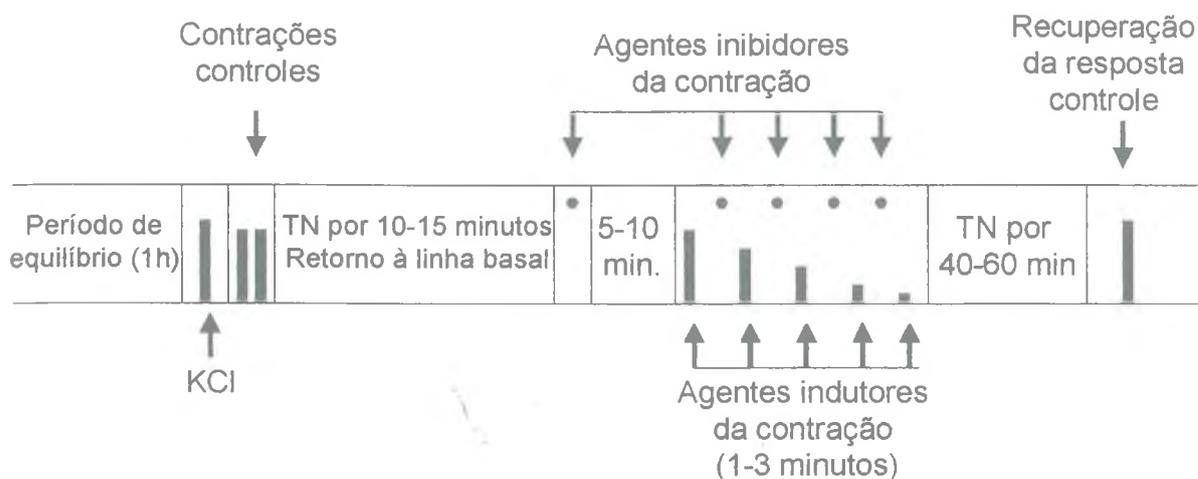


Fig. 8 - Esquema representativo dos protocolos realizados na avaliação dos efeitos dos agentes inibidores da contração contra as respostas contráteis induzidas por agonistas e pela solução hipotônica (agentes indutores da contração).

2.4.2 Experimentos em solução isenta de cálcio (0Ca)

Para avaliarmos o envolvimento do cálcio sobre os efeitos produzidos 5-HT [10 μ M], ACh [10 μ M] e PGF_{2 α} [10 μ M], realizamos experimentos eliminando o cálcio extracelular. Como mostra a figura-9, inicialmente, em condições normais de cálcio, avaliávamos a responsividade da preparação aplicando 60mM de KCl. Em seguida, obtínhamos duas contrações consecutivas de amplitudes similares induzidas pelos agonistas para serem tratadas como controles. Após a preparação estabilizar-se na linha basal, aplicamos a solução de Tyrode zero-cálcio (TN-0Ca) (Anexo - 1) contendo EGTA [2mM] por 5-10 minutos, seguindo-se as aplicações de KCl [60mM]. Este procedimento foi repetido até que a resposta ao KCl fosse completamente abolida, indicando o completo esgotamento do cálcio extracelular. Nestas condições, após 5-10 minutos, avaliamos a amplitude das respostas induzidas

pelos agonistas por 1-3 minutos. A recuperação da resposta foi realizada após 40-60 minutos em condições normais de cálcio.

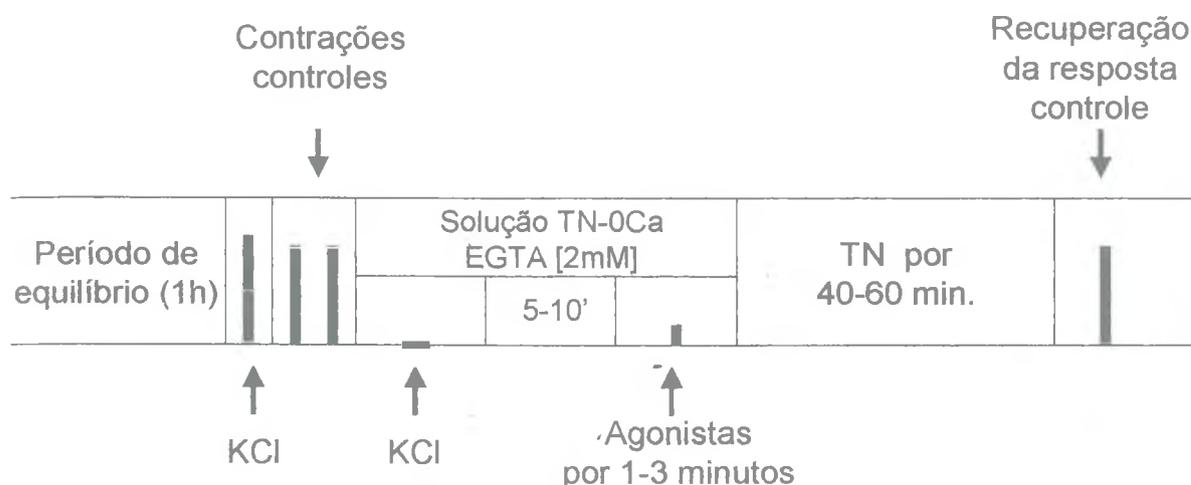


Fig. 9 - Esquema representativo dos protocolos realizados na avaliação das respostas contráteis induzidas por agonistas em meio zero-cálcio (0Ca).

2.4.3 Experimentos em solução isenta de cloreto (0Cl)

Desde que seja possível o envolvimento do cloreto nas contrações induzidas por agonistas em músculo liso, investigamos os efeitos produzidos pela eliminação do cloreto do meio extracelular sobre as contrações induzidas pela 5-HT [10 μ M], ACh [10 μ M] e PGF_{2 α} [10 μ M]. Os sais cloreto foram substituídos, isotonicamente na solução fisiológica, pelos correspondentes sais de gluconato (GLU) e acetato (AC), como mostra o anexo – A. A figura-10 mostra que, similarmente aos experimentos em meio 0Ca, obtivemos duas contrações controles em condições normais de cloreto, seguindo-se dos registros das contrações induzidas pelos agonistas em meio zero cloreto (0Cl-

GLU ou OCl-AC). Após 40-60 minutos, recuperamos as respostas em condições normais de cloreto.

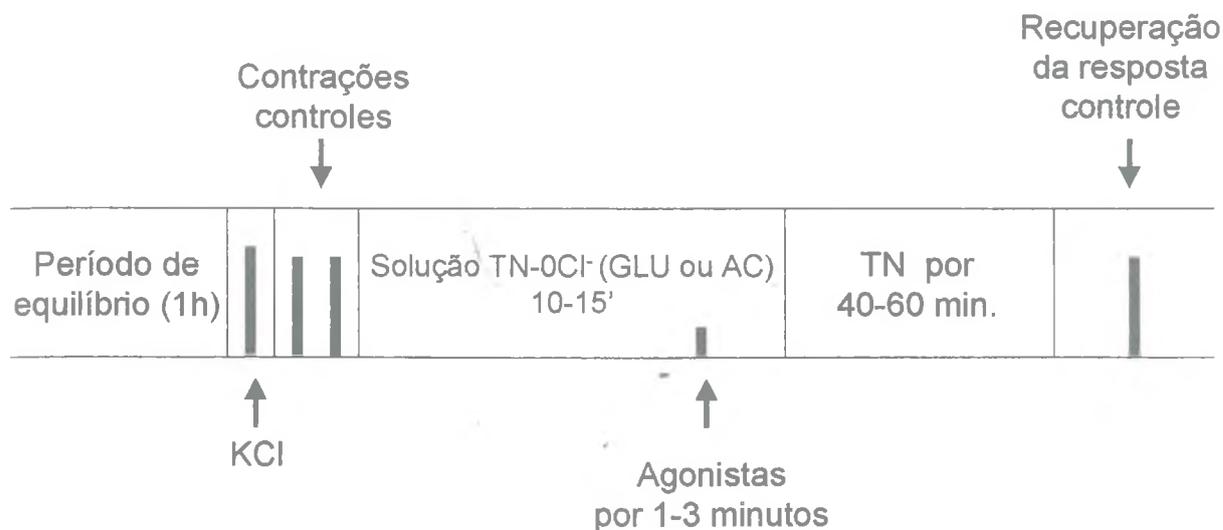


Fig. 10 - Esquema representativo dos protocolos realizados na avaliação das respostas contráteis induzidas por agonistas em meio zero-cloreto (0Cl).

2.4.4 Experimentos em solução hipotônica (SH)

Desde que os canais de cloreto participem em muitos mecanismos reguladores do volume celular e que a solução hipotônica (SH) induz ao fluxo de água para o meio intracelular, decidimos avaliar o possível envolvimento do cloreto no mecanismo de contração induzido pela SH (Anexo - A). A figura-11 mostra que, semelhantemente aos experimentos aos protocolos anteriores, aqui, as contrações controles são aquelas induzidas pela SH. Em seguida, testamos os efeitos da remoção do cloreto (SH-0Cl-GLU e SH-0Cl-AC) e do cálcio (SH-0Ca + EGTA [2mM]), da NIF [10^{-8} – 10^{-6} M] e dos bloqueadores de canais de cloreto, o NFA [1-100 μ M], DIDS [1-100 μ M], TAM [1-100 μ M] e o NPPB [0,1-100 μ M] sobre as contrações induzidas pela SH. Recuperamos a

resposta após 15-30 minutos (Fig. 11). Todos os protocolos foram realizados em grupos de animais diferentes.

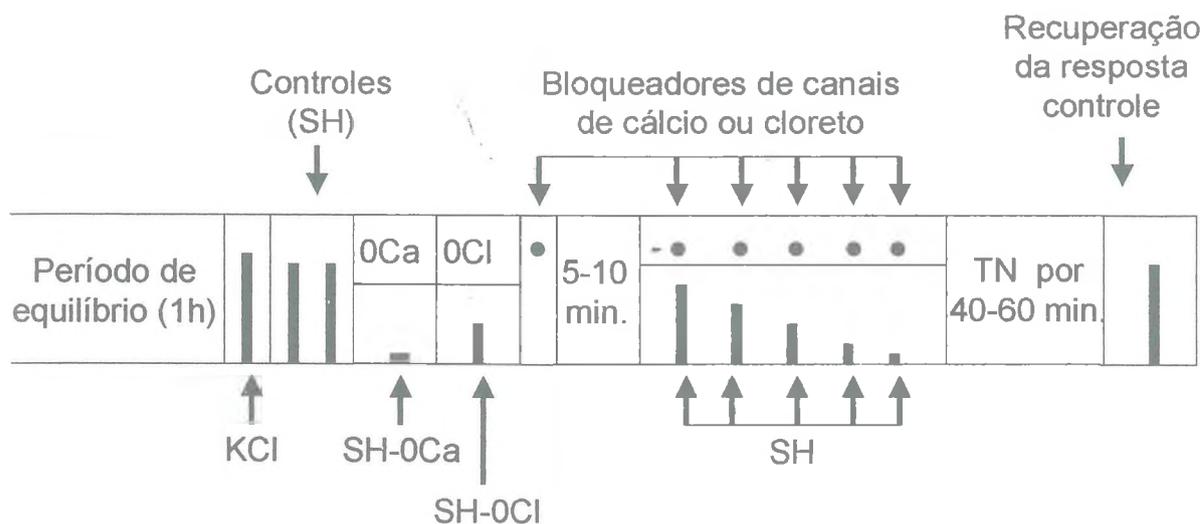


Fig. 11 - Esquema representativo dos protocolos utilizados para avaliação dos efeitos da solução zero-cálcio (0Ca), zero-cloreto (0Cl-GLU ou 0Cl-ACl) e dos bloqueadores de canais de cloreto e cálcio contra as respostas contráteis induzidas pela solução hipotônica (SH).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações apresentadas nos gráficos são médias de "n" observações \pm erro padrão da média. Os efeitos inibitórios estão expressos como percentuais da resposta máxima controle. Para a análise estatística utilizamos o teste t-Student não pareados, onde os valores foram considerados estatisticamente diferentes do controle quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade fosse menor do que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 EFEITOS DOS BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CLORETO SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR AGONISTAS E PELO CLORETO DE POTÁSSIO

3.1.1 Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio

Considerando que, em suficientes concentrações, o NFA exerça outros efeitos além do bloqueio dos $ICl_{(Ca)}$, como por exemplo a indução de correntes de potássio e bloqueio de canais de cálcio (Hogg *et al.*, 1994a; Greenwood & Large 1995), inicialmente avaliamos a seletividade do NFA (1-100 μ M) investigando os seus efeitos sobre as contrações induzidas por 60mM de KCl. Em concentrações até 30 μ M, o NFA não apresentou efeitos inibitórios sobre a contração induzida pelo KCl (Fig. 12b, n=6), contrastando com 1 μ M de nifedipina que aboliu quase que completamente esta resposta (Fig. 12b, n=7). Entretanto, a partir de 100 μ M começou a produzir efeitos inibitórios sobre esta contração, indicando, possivelmente, efeitos não específicos desta droga (Fig. 12a). Portanto, para a maioria dos os experimentos presentes neste trabalho utilizamos concentrações máximas de 30 μ M de NFA para a avaliação dos seus efeitos sobre as $ICl_{(Ca)}$.

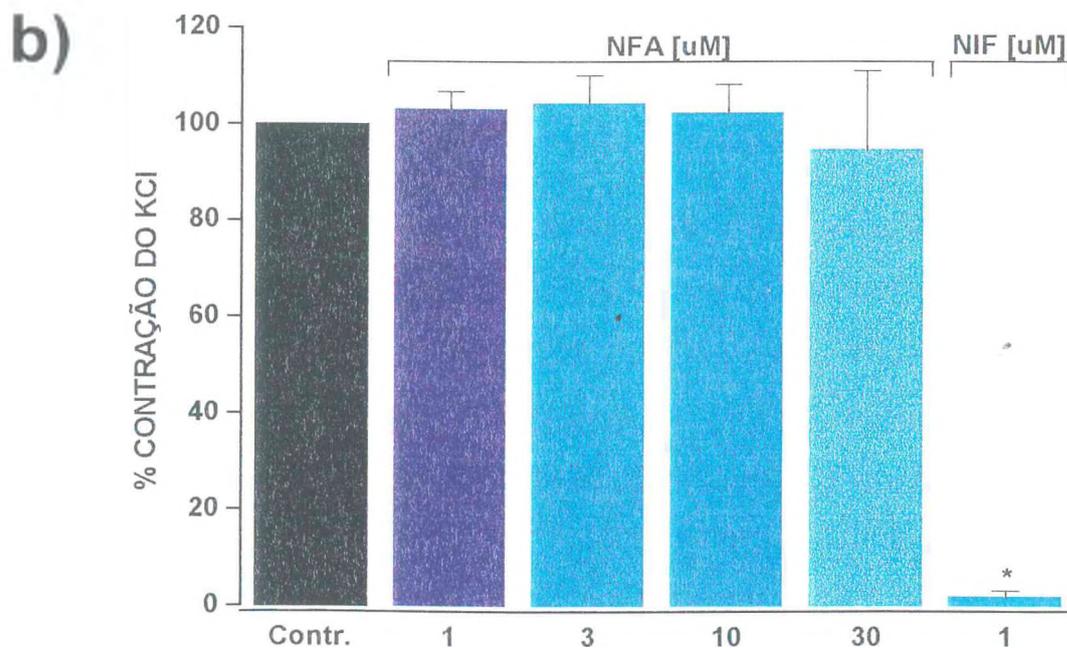
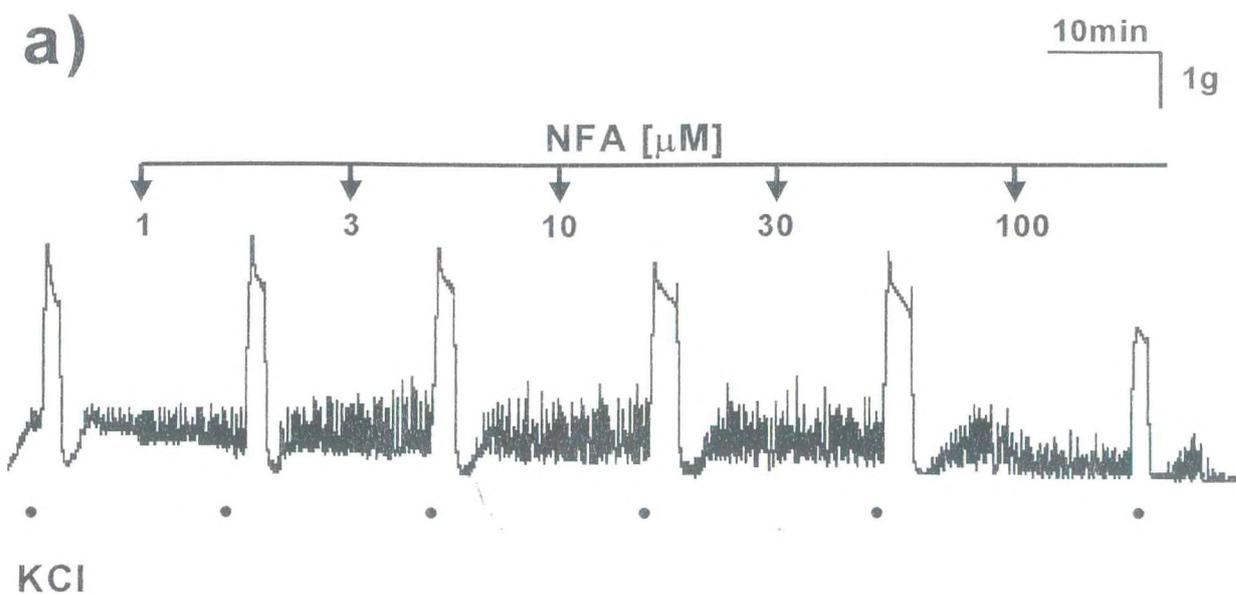


Fig. 12 - a) - Registro da ausência de efeitos inibitórios do NFA (1-30 μM) sobre as contrações induzidas pelo KCl (60mM). **b)** - Efeitos comparativos do NFA (1-30 μM , n=7) e NIF (1 μM , n=7) sobre as contrações induzidas por KCl (60mM) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de *n* experimentos e os resultados considerados significativamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*).

3.1.2 Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina

Aplicação de 5-HT ($10\mu\text{M}$) em fundo de estômago de rato induziu contrações tônicas equivalentes a $1,52 \pm 0,40\text{g}$ ($n=8$), exibindo no platô da contração um componente oscilatório. Na presença de NFA ($1\text{-}30\mu\text{M}$), as contrações foram inibidas de maneira dependente de concentração com uma redução máxima para $15,5 \pm 6,0\%$ do valor controle, na maior concentração de NFA ($30\mu\text{M}$) utilizada (Fig. 15b, $n=8$). O efeito inibitório do NFA foi completamente reversível após a eliminação da droga do tecido pela lavagem com solução fisiológica de Tyrode normal, como mostrado no final do registro representativo (Fig. 15a). Desde que utilizamos o DMSO como solvente do NFA, controles pareados animal foram expostos ao DMSO em concentrações equivalentes às aquelas utilizadas com o NFA, mostrando que as respostas induzidas pela 5-HT e pelo KCl não foram inibidas ao longo do período experimental (Figs. 13, 14, $n=6$), respectivamente. Interessantemente, apesar do NFA mostrar efeito inibitório, o componente oscilatório apresentado pela resposta a 5-HT permaneceu completamente inalterado (Fig. 15a).

Em experimentos à parte, $1\mu\text{M}$ de nifedipina foi capaz de abolir quase que completamente a resposta induzida por 60mM de KCl, reduzindo a resposta para $1,87 \pm 1,21\%$ do valor controle ($n=7$), mas inibiu, em menor proporção, a contração induzida pela 5-HT ($10\mu\text{M}$), reduzindo para $15,2 \pm 4,9\%$ do valor controle (Fig. 16b, $n=8$). Em contraste aos efeitos do NFA, a nifedipina inibiu completamente o componente oscilatório da resposta induzida pela 5-HT (Fig. 16a). Quando aplicamos o NFA ($30\mu\text{M}$) e nifedipina ($1\mu\text{M}$) simultaneamente, os seus efeitos não foram aditivos, reduzindo a resposta induzida pela 5-HT para $10,4 \pm 4,7\%$ do controle, uma redução estatisticamente não significativa ($P<0,05$) em relação à redução produzida apenas pela nifedipina (Fig.16a, b).

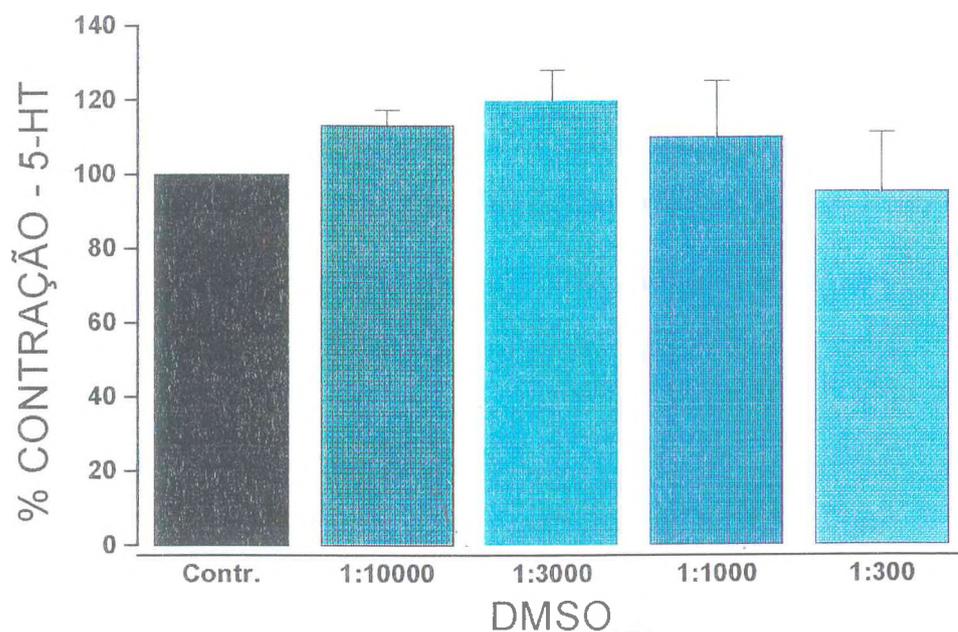


Fig. 13 - Ausência de efeitos inibitórios do DMSO sobre as contrações induzidas pela 5-HT ($10\mu\text{M}$) em fundo de estômago de rato ($n=6$), nas diluições equivalentes àsquelas utilizadas com o NFA. Os valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados significativamente diferentes do controle para $p<0,05$ (*).

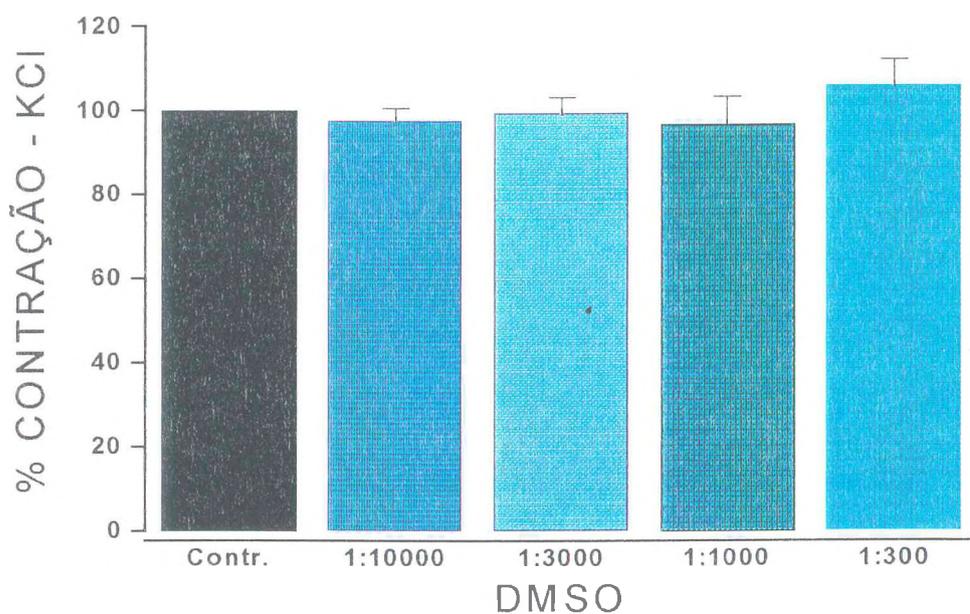
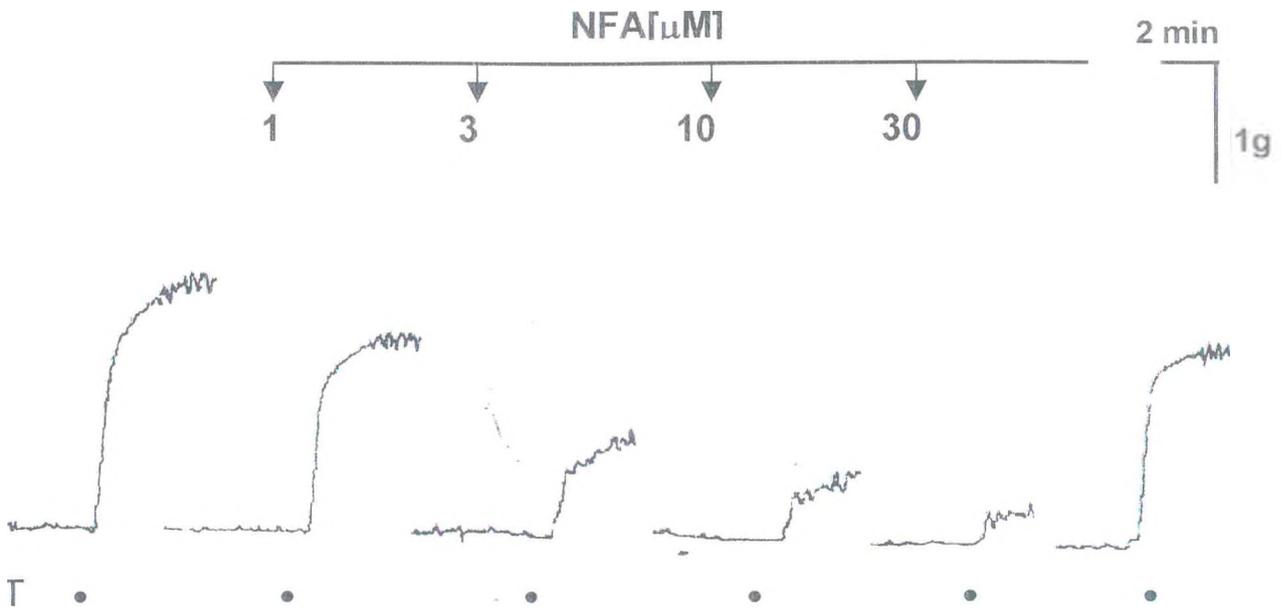


Fig. 14 - Ausência de efeitos inibitórios do DMSO sobre as contrações induzidas pelo Cl (60mM) em fundo de estômago de rato ($n=6$), nas diluições equivalentes àsquelas utilizadas com o NFA. Os valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados significativamente diferentes do controle para $p<0,05$ (*).

a)



b)

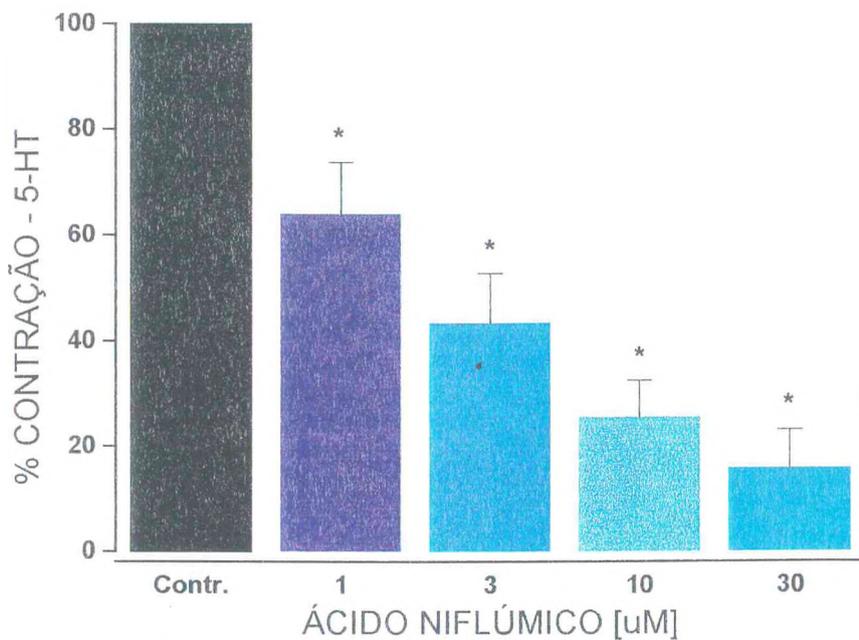
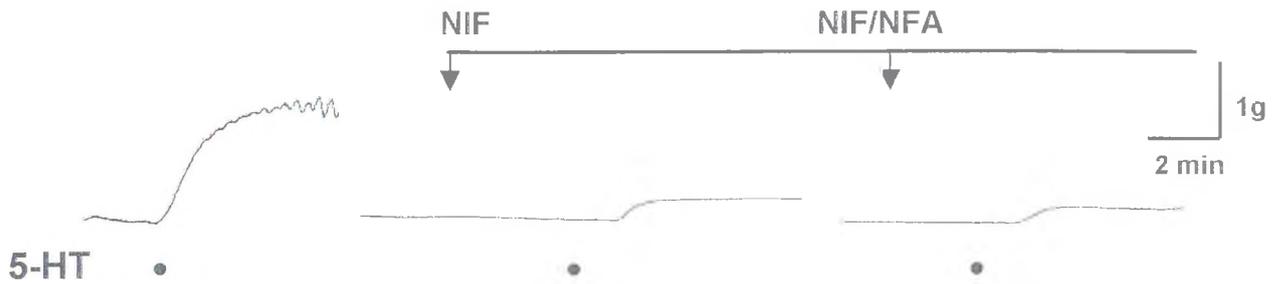


Fig. 15 - a) - Registro representativo **b)** - Efeitos inibitórios do NFA (1-30 μM) sobre as contrações induzidas pela 5-HT (10 μM , $n=8$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão médio (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*). A recuperação da resposta à 5-HT, 1 hora depois da exposição ao NFA, é mostrada no final do registro representativo.

a)



b)

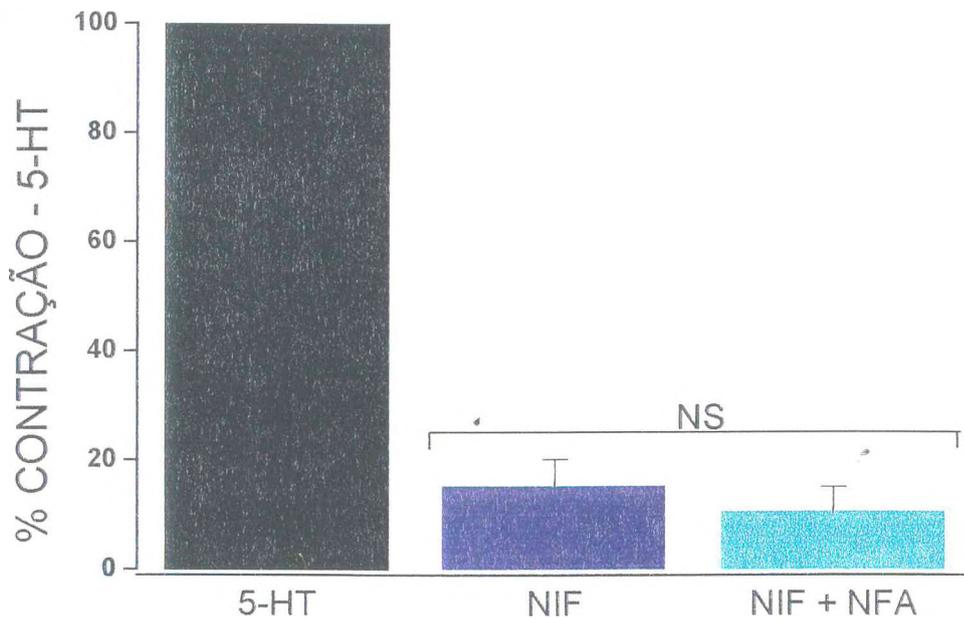
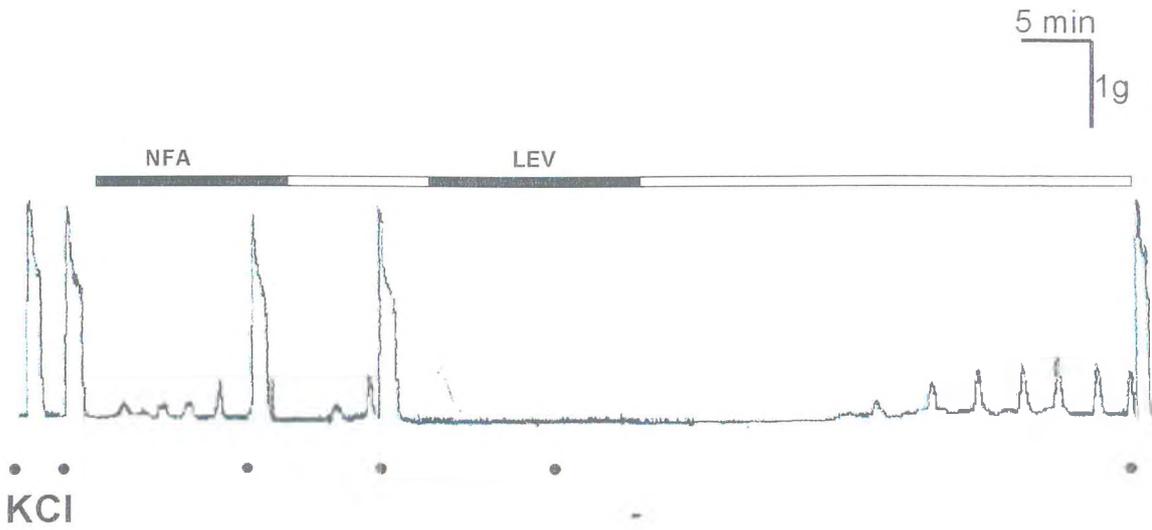


Fig. 16 - a) - Registro típico representativo. **b)** - Mostra a falta de efeitos inibitórios cumulativos do ácido nifúmico (NFA, $30\mu\text{M}$) e nifedipina (NIF, $1\mu\text{M}$) quando aplicadas simultaneamente ou aplicação isolada de nifedipina (NIF, $1\mu\text{M}$), sobre as contrações induzidas pela 5-HT ($10\mu\text{M}$) em fundo isolado de estômato de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de oito experimentos ($n=8$). A diferença entre a aplicação de NIF isolada ou combinada com NFA não foi estatisticamente significativa (NS).

3.1.3 Efeitos do ácido niflúmico e da levcromacalina sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio

Aplicação de 20mM de KCl induziu contrações reproduzíveis com amplitude média de $3,11 \pm 0,37g$ (n=6). O NFA ($30\mu M$) não inibiu esta resposta, onde as contrações mantiveram uma amplitude média de $111,6 \pm 11,2\%$ do valor controle. Em contraste, na presença de levcromacalina ($3\mu M$), um ativador de canais de potássio dependente de ATP, aboliu completamente esta resposta (Fig. 17a, b).

a)



b)

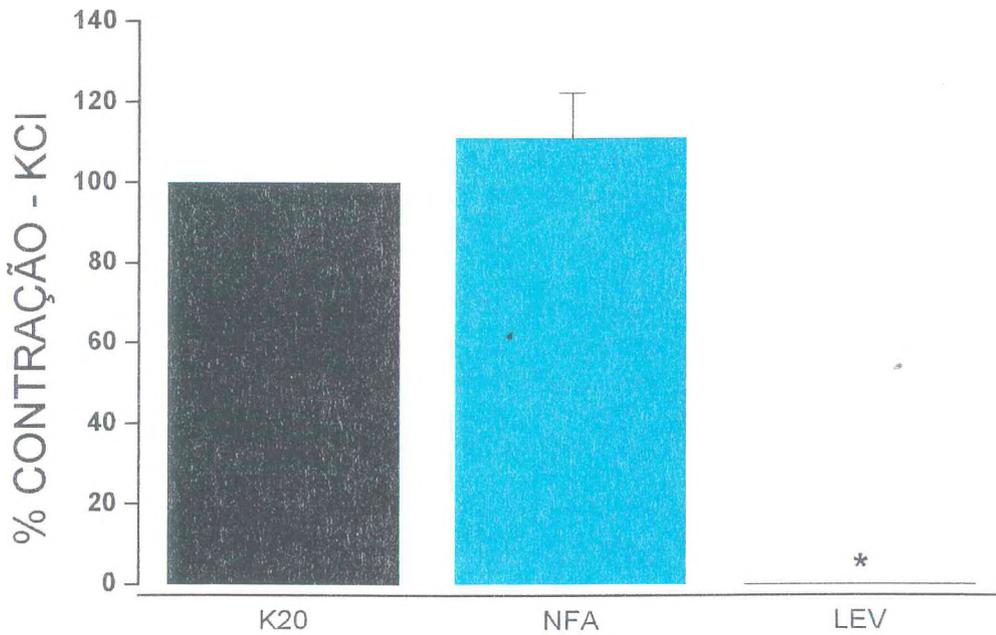


Fig. 17 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos do NFA (30 μ M) e da LEV (3 μ M) sobre as contrações induzidas por 20mM de KCl (•). Os valores são médias \pm erro padrão da média de 5 experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*). A recuperação da resposta ao KCl (20mM), após um período de 1 hora da exposição à LEV, está incluída no final do registro representativo(•).

3.1.4 Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela acetilcolina e pela prostaglandina- $F_{2\alpha}$

A ACh ($10\mu\text{M}$) e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($10\mu\text{M}$) induziram contrações estáveis com amplitudes médias equivalentes a $3,11 \pm 0,44\text{g}$ ($n=8$) e $1,34 \pm 0,25\text{g}$ ($n=8$), respectivamente. Em contraste aos efeitos inibitórios sobre as contrações induzidas pela 5-HT, o NFA ($10\text{-}100\mu\text{M}$) não inibiu as contrações induzidas pela ACh ($10\mu\text{M}$) (Fig. 18b, $n=8$) e reduziu as contrações induzidas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ para $41,86 \pm 5,31\%$ do valor controle na maior concentração (Fig. 19b, $n=8$). Em experimentos à parte, $1\mu\text{M}$ de nifedipina reduziu a resposta induzida pela ACh ($10\mu\text{M}$) para $67,57 \pm 11,84\%$ (Fig. 20, $n=4$) e pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($10\mu\text{M}$) para $35,40 \pm 6,86\%$ (Fig. 21, $n=5$), dos respectivos valores controles.

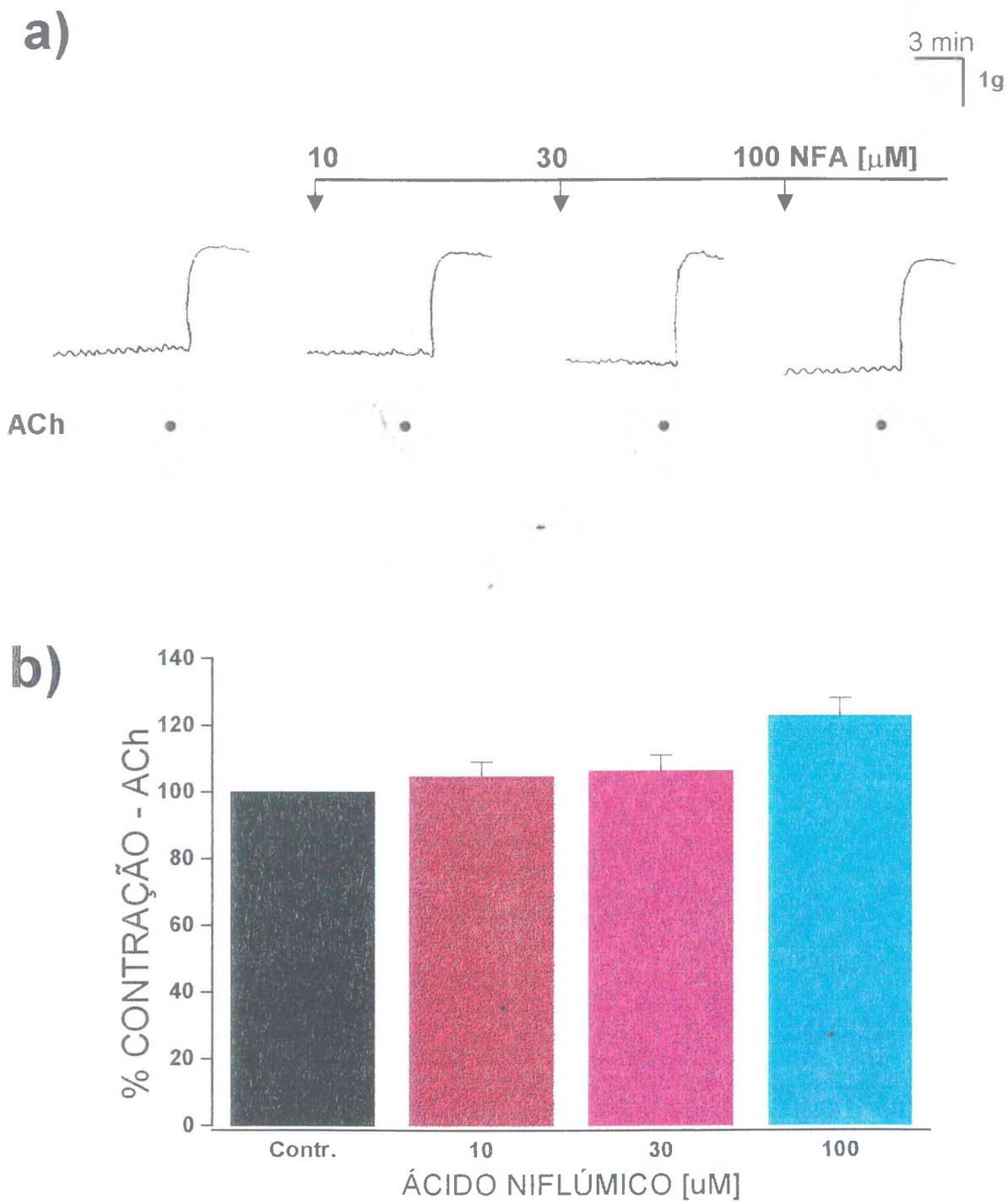


Fig. 18 - a) - Registro típico representativo **b)** - Mostra a falta de efeito inibitório do ácido niflúmico (NFA, 10-100 μ M) sobre as contrações induzidas pela ACh (10 μ M) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de oito experimentos (n=8) e os resultados foram considerados significativamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*).

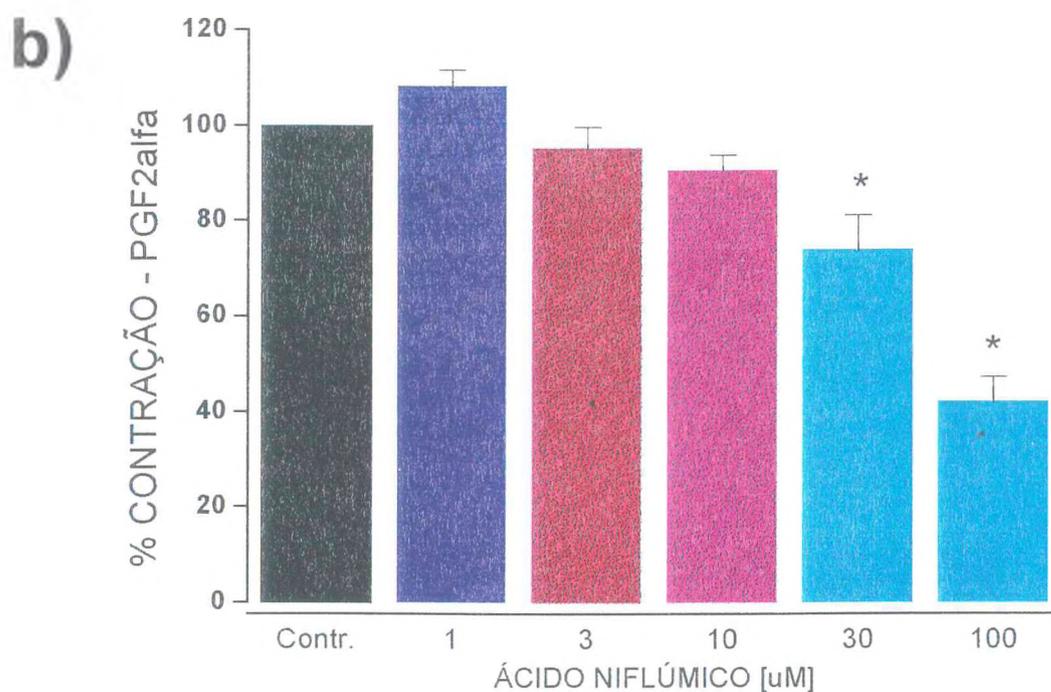
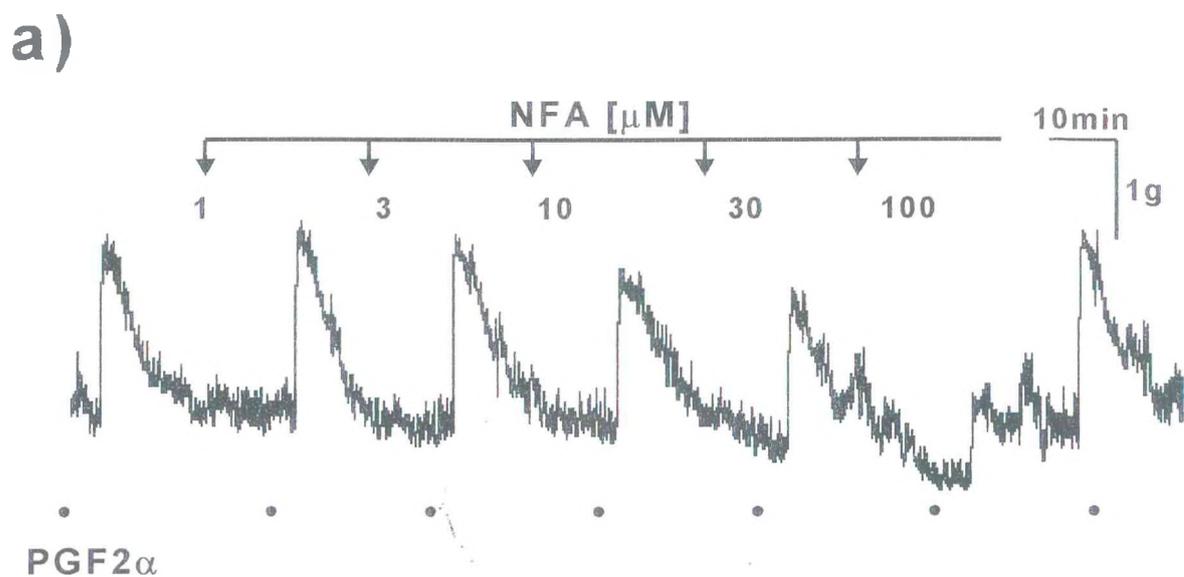


Fig. 19 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios do NFA (1-100 μM) sobre as contrações induzidas pela PGF2 α (10 μM) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de 8 experimentos (n=8) e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

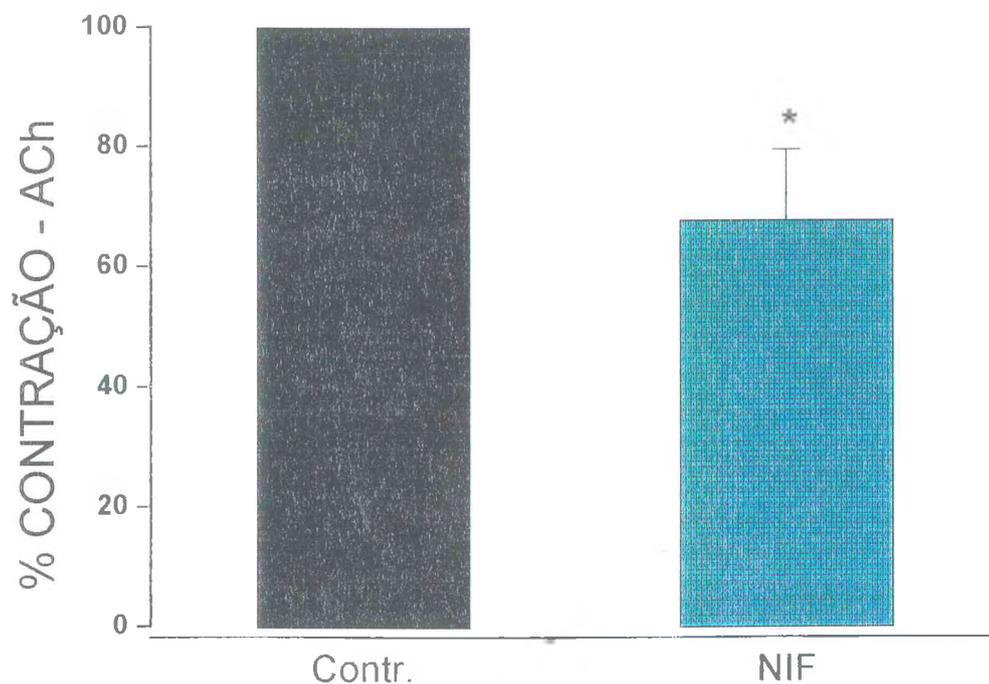


Fig. 20 - Efeitos inibitórios da nifedipina ($1\mu\text{M}$) sobre as contrações induzidas pela ACh ($10\mu\text{M}$, $n=4$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p<0,05$ (*).

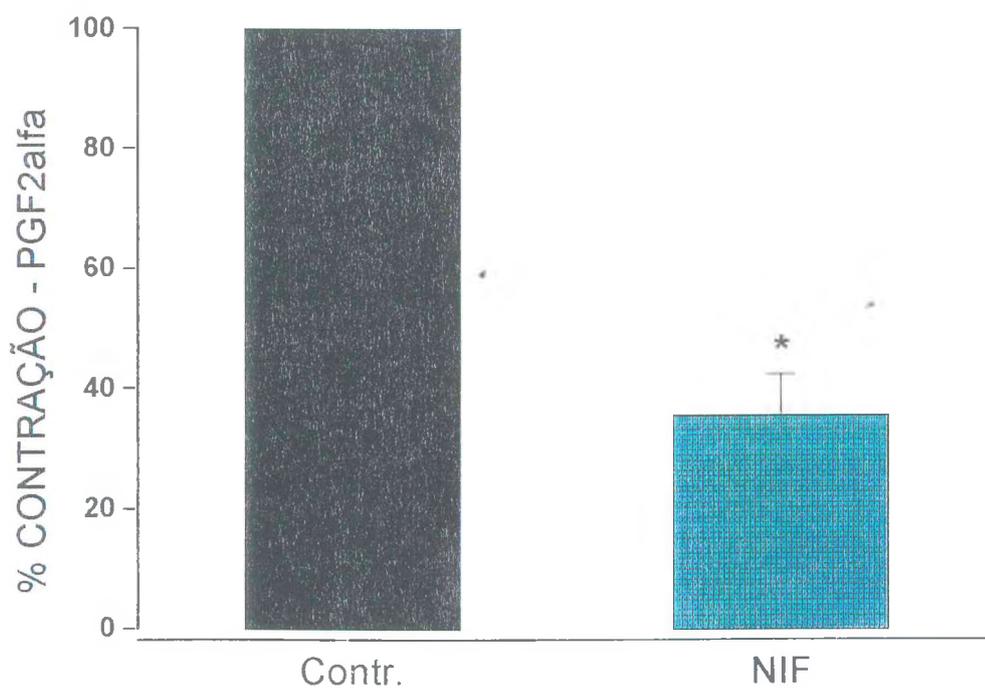


Fig. 21 - Efeitos inibitórios da nifedipina ($1\mu\text{M}$) sobre as contrações induzidas pela $\text{PGF}2\alpha$ ($10\mu\text{M}$, $n=5$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p<0,05$ (*).

3.1.5 Efeitos da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela 5-didroxitriptamina, acetilcolina e prostaglandina- $F_{2\alpha}$

Em condições fisiológicas normais de cálcio extracelular, a 5-HT ($10\mu\text{M}$), ACh ($10\mu\text{M}$) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($10\mu\text{M}$) induziram contrações estáveis com amplitudes médias equivalentes a $3,54 \pm 0,71\text{g}$ ($n=8$), $2,37 \pm 0,17\text{g}$ ($n=6$) e $2,3 \pm 0,78\text{g}$ ($n=9$), respectivamente.

A aplicação de solução isenta de cálcio (0Ca, anexo A) contendo EGTA (2mM), aboliu completamente as contrações espontâneas e relaxou o tônus basal da preparação. A ausência de resposta contrátil induzida pelo KCl (60mM) indica a total eliminação de cálcio extracelular (Figs. 22a, 23a, 24a). Sob estas condições, as respostas induzidas por $10\mu\text{M}$ de 5-HT, ACh e $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram reduzidas para $4,12 \pm 1,63\%$ (Fig. 22b, $n=8$), $13,90 \pm 2,44\%$ (Fig. 23b, $n=6$) e $20,94 \pm 7,39\%$ (Fig. 24b, $n=9$), respectivamente. No final de cada registro típico representativo é mostrada a recuperação da resposta controles do agonista, retorno da atividade espontânea e a recuperação do tônus basal da preparação, após um período de 15-30 minutos da reposição normal de cálcio extracelular (Figs. 22a, 23a, 24a).

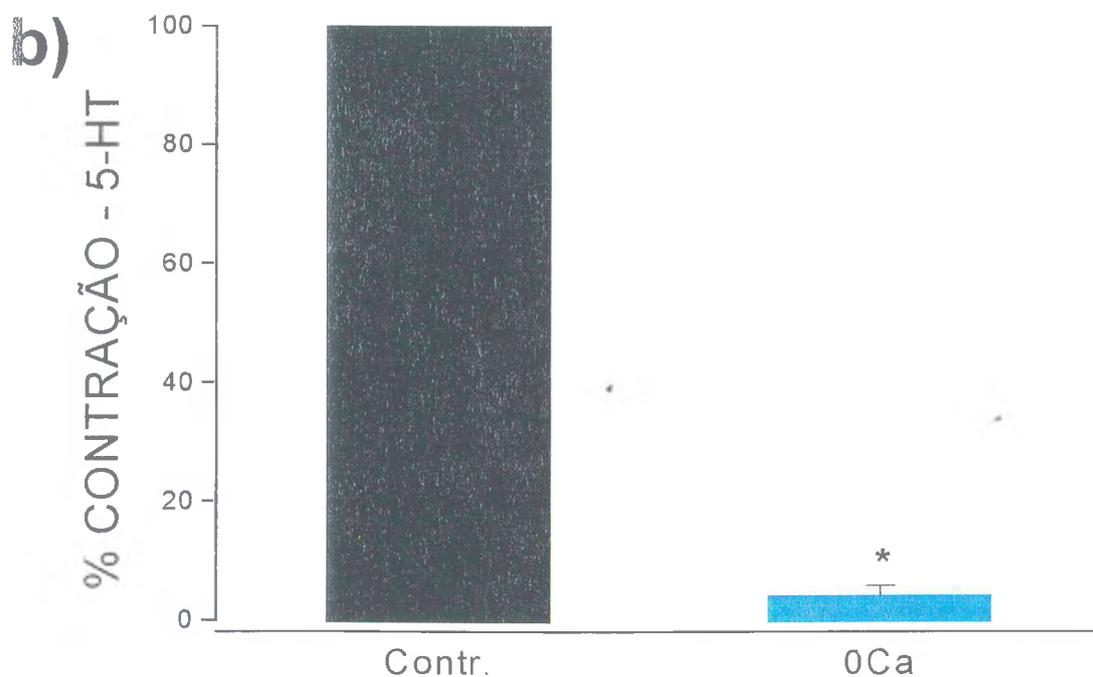
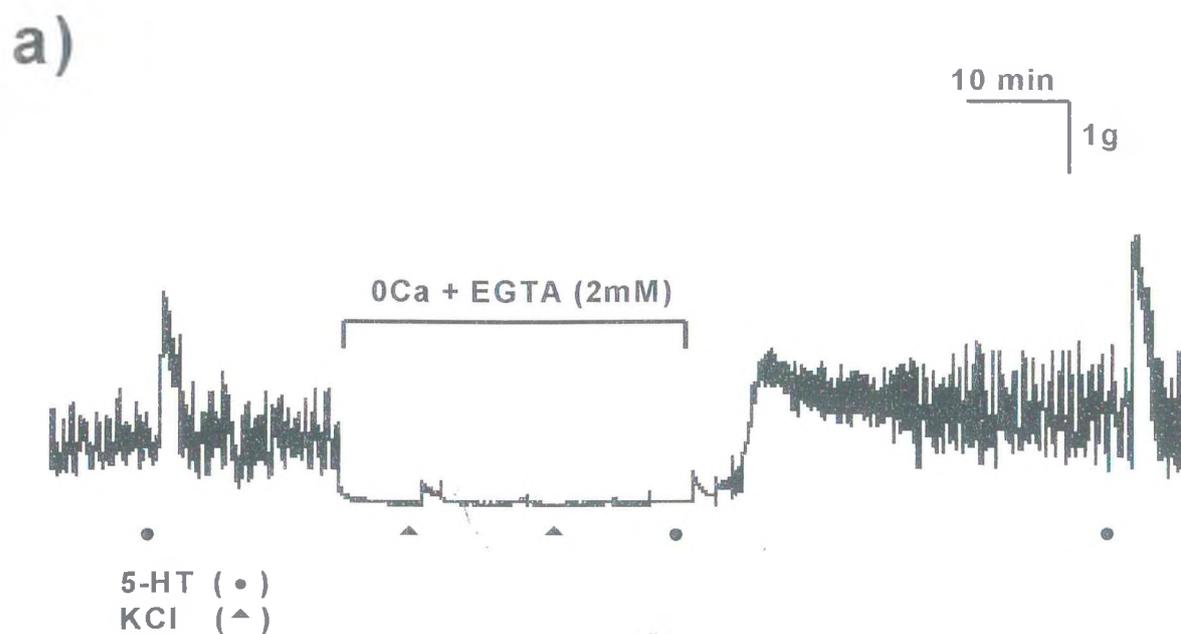


Fig. 22 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos da solução 0Ca sobre as contrações induzidas pela 5-HT ($10\mu\text{M}$, $n=8$). Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p<0,05$ (*).

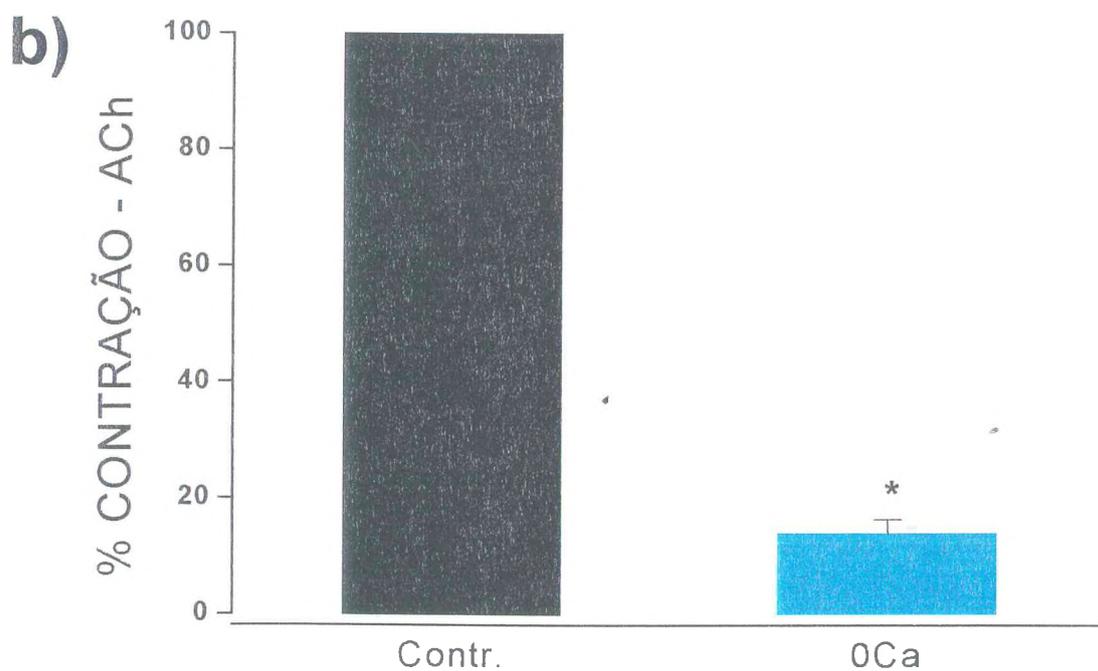
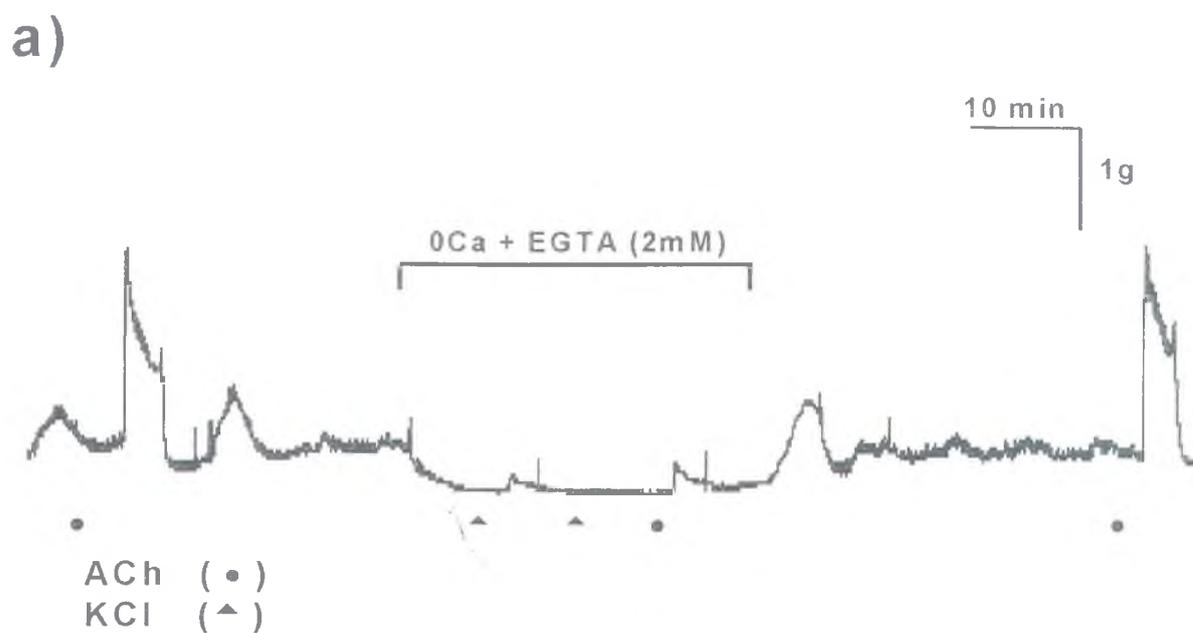


Fig. 23 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos da solução 0Ca sobre as contrações induzidas pela ACh ($10\mu\text{M}$, $n=6$). Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

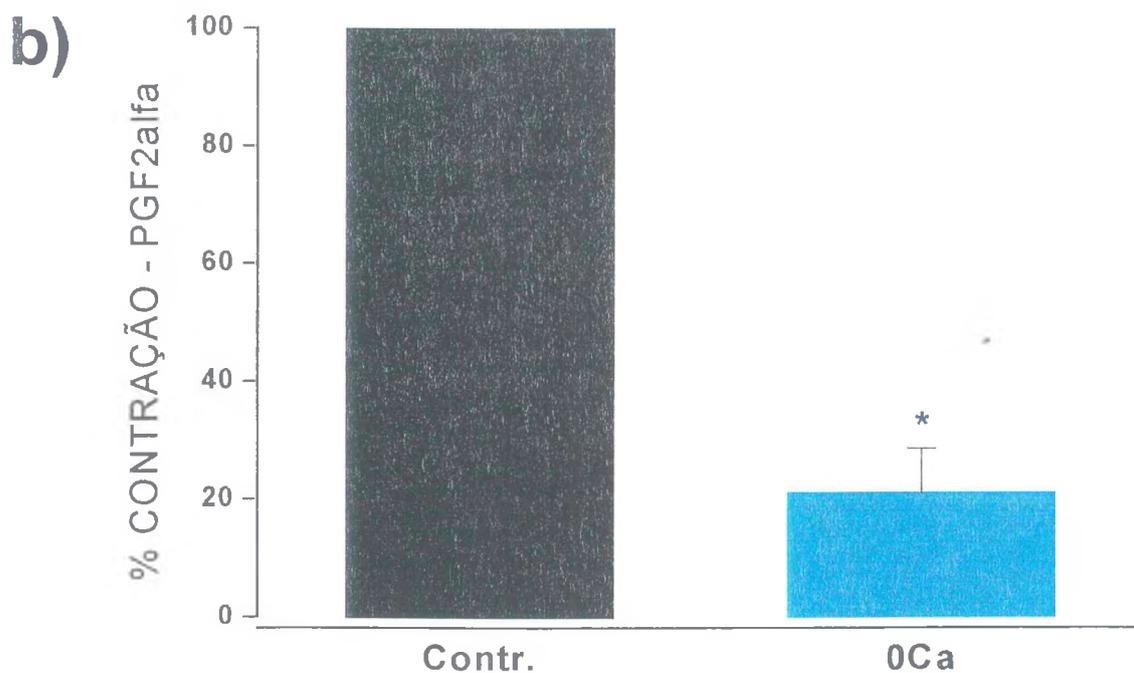
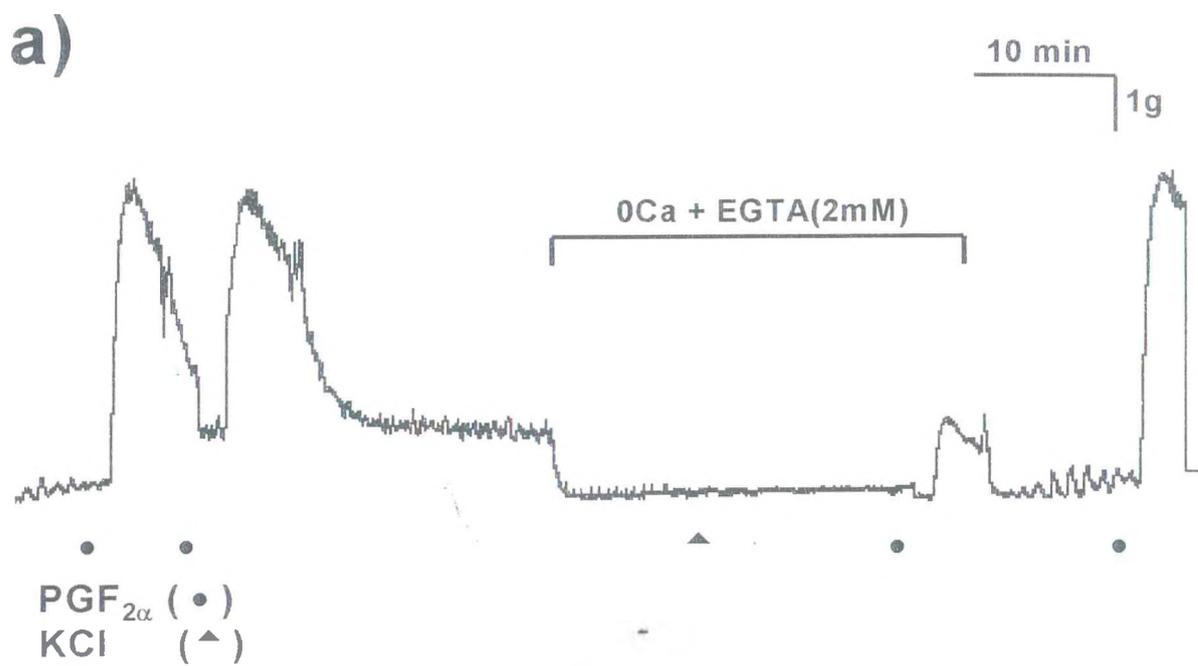


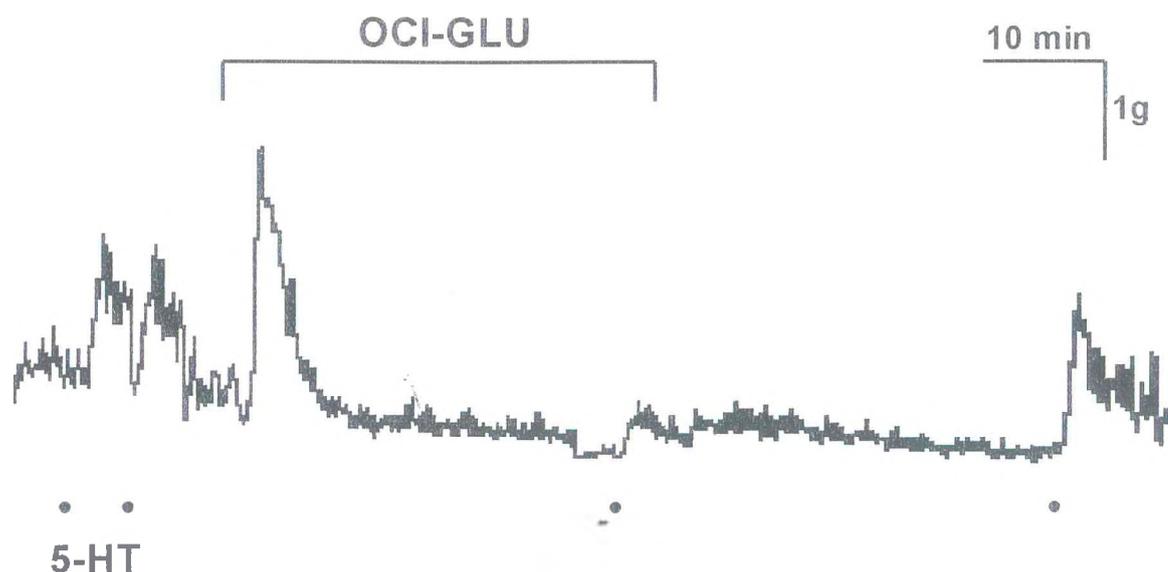
Fig. 24 - a) – Registro representativo b) – Efeitos da solução 0Ca sobre as contrações induzidas pela PGF_{2α} (10μM, n=9). Os valores apresentados são médias ± erro padrão da média (barras verticais) de *n* experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para *p*<0,05(*).

3.1.6 Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e prostaglandina- $F_{2\alpha}$

Em condições fisiológicas normais de cloreto, a 5-HT ($10\mu\text{M}$), ACh ($10\mu\text{M}$) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($10\mu\text{M}$) induziram contrações estáveis com amplitudes médias equivalentes a $1,83 \pm 0,31$ g ($n=10$), $1,82 \pm 0,37$ g ($n=6$) e $3,41 \pm 0,43$ g ($n=8$), respectivamente.

A aplicação de solução salina 0Cl^- (substituição dos sais cloreto pelos respectivos sais de gluconato – GLU – anexo A) produziu uma contração transitória que retornou aos níveis basais em poucos minutos que foi menos evidente nos experimentos com $\text{PGF}_{2\alpha}$. Na ausência contínua de cloreto, as contrações espontâneas da preparação foram reduzidas com aparente diminuição do tônus basal, semelhantemente, à retirada do cálcio extracelular (Figs. 25a, 25a, 27a). Nestas condições, as respostas contráteis induzidas pela 5-HT ($10\mu\text{M}$), ACh ($10\mu\text{M}$) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($10\mu\text{M}$) foram reduzidas para $32,17 \pm 7,6\%$ (Fig. 25b, $n=10$), $68,21 \pm 10,96\%$ (Fig. 26b, $n=6$) e $55,56 \pm 8,37\%$ (Fig. 27b, $n=8$) de seus respectivos valores controles. Após decorrer um período de 40-60 minutos da reposição normal de cloreto na solução de banho, mostramos no final dos registros representativos a total recuperação das respostas controles induzidas pelos agonistas com pleno retorno das contrações espontâneas ao tônus basal (Figs. 25a, 26a, 27a).

a)



b)

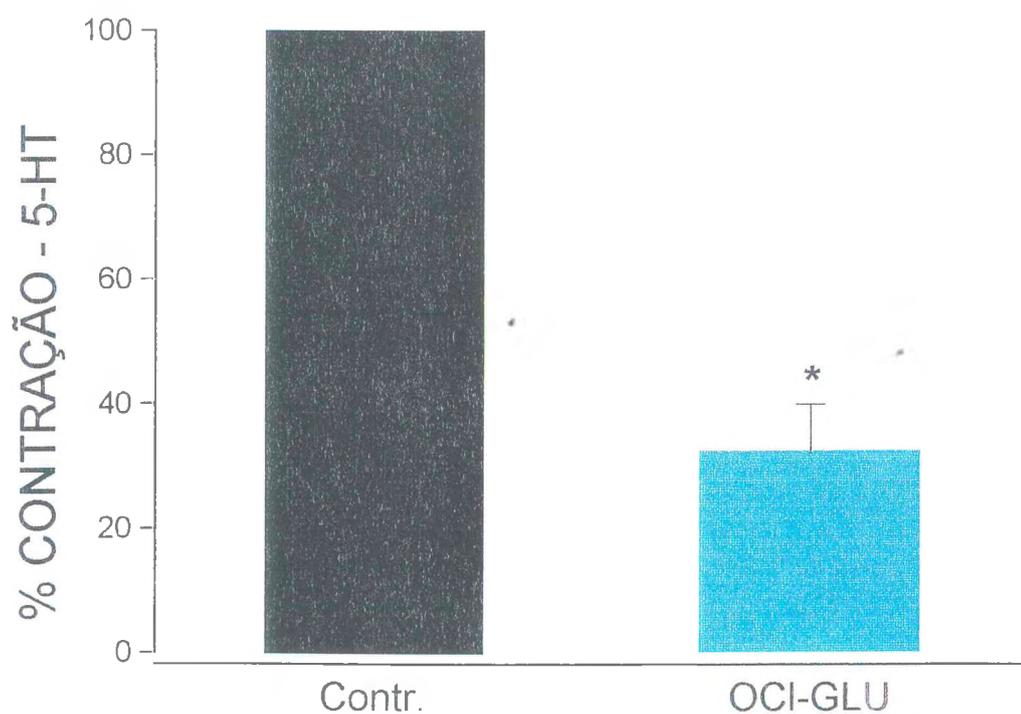


Fig. 25 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios da substituição do cloreto pelo gluconato na solução fisiológica (OCI-GLU) sobre as contrações induzidas pela 5-HT ($10\mu\text{M}$, $n=10$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p<0,05$ (*).

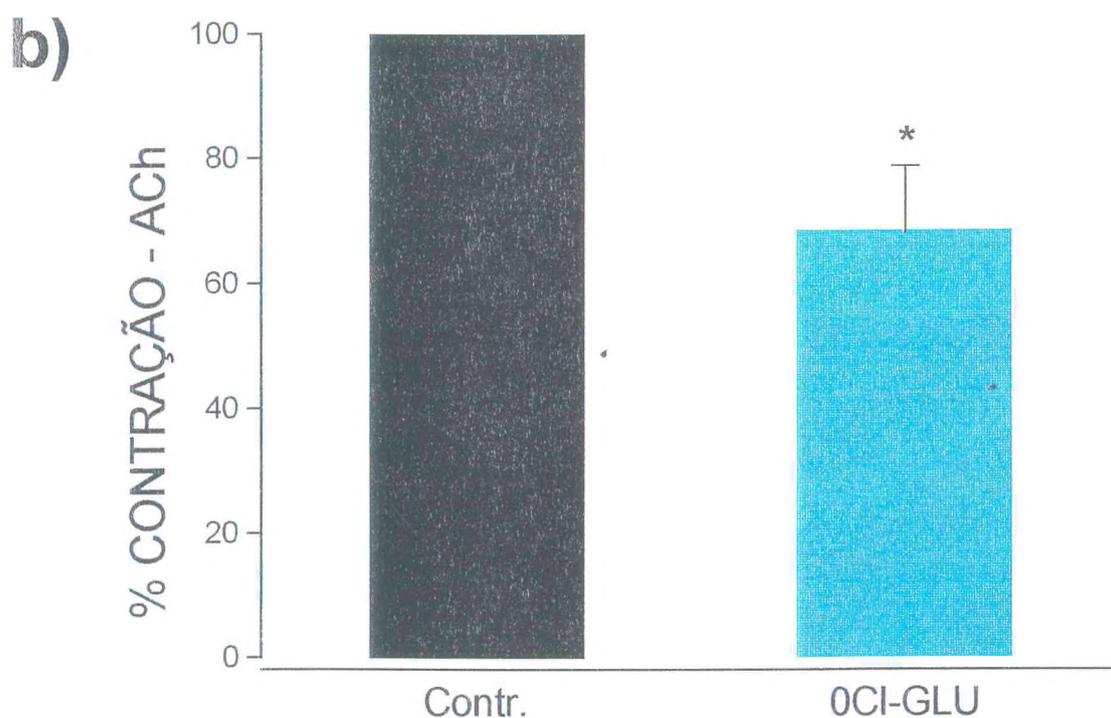
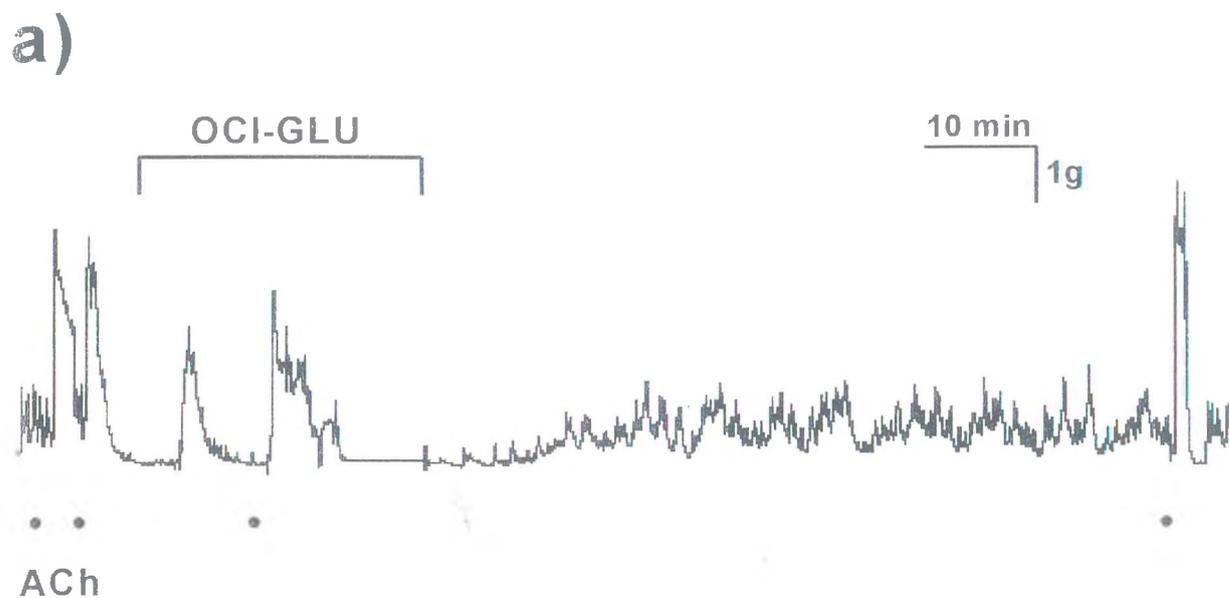


Fig. 26 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios da substituição do cloreto pelo gluconato na solução fisiológica (OCI-GLU) sobre as contrações induzidas pela ACh ($10\mu\text{M}$, $n=6$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

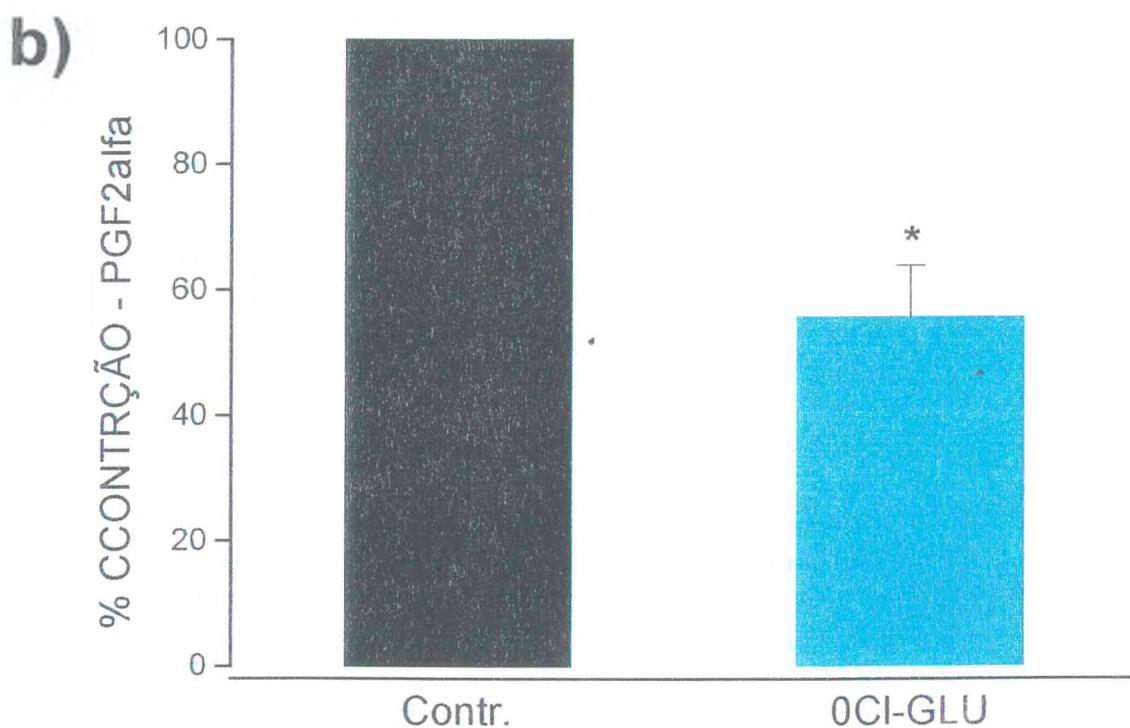
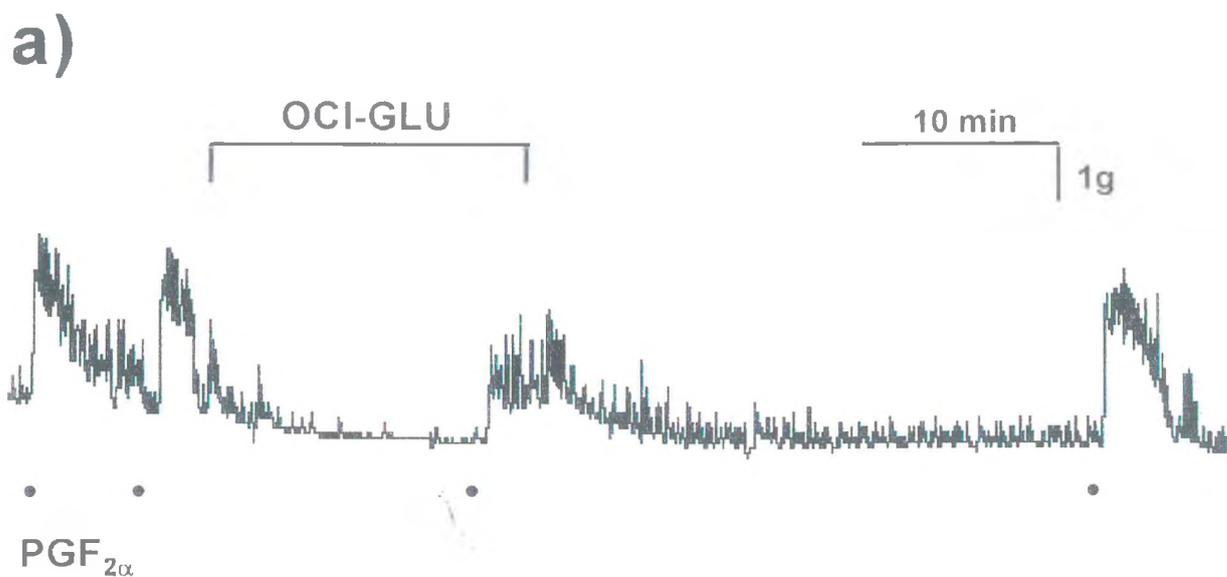


Fig. 27 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios da substituição do cloreto pelo gluconato na solução fisiológica (OCI-GLU) sobre as contrações induzidas pela PGF_{2α} (10μM, n=8) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias ± erro padrão da média de *n* experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*).

3.1.7 Efeitos do DCDPC sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e cloreto de potássio

Em experimentos à parte avaliamos os efeitos do DCDPC (1-100 μ M), um análogo estrutural do ácido niflumico, sobre as respostas induzidas pela 5-HT (10 μ M), ACh (10 μ M) e KCl (60mM). Esses três agentes contraturantes induziram contrações médias estáveis e reproduzíveis equivalentes a $2,43 \pm 0,34\%$ (n=9), $2,38 \pm 0,30\%$ (n=6) e $2,02 \pm 0,22\%$ (n=6), respectivamente. O DCDPC (1-100 μ M) inibiu de maneira dependente de concentração os efeitos contráteis da 5-HT (10 μ M), ACh (10 μ M) e KCl (60mM), com redução das contrações para $13,93 \pm 9,32\%$ (Fig. 28b, n=9), $19,62 \pm 7,90\%$ (Fig. 29b, n=6) e $20,87 \pm 5,38\%$ (Fig. 30b, n=6) das respectivas respostas controles, na maior concentração.

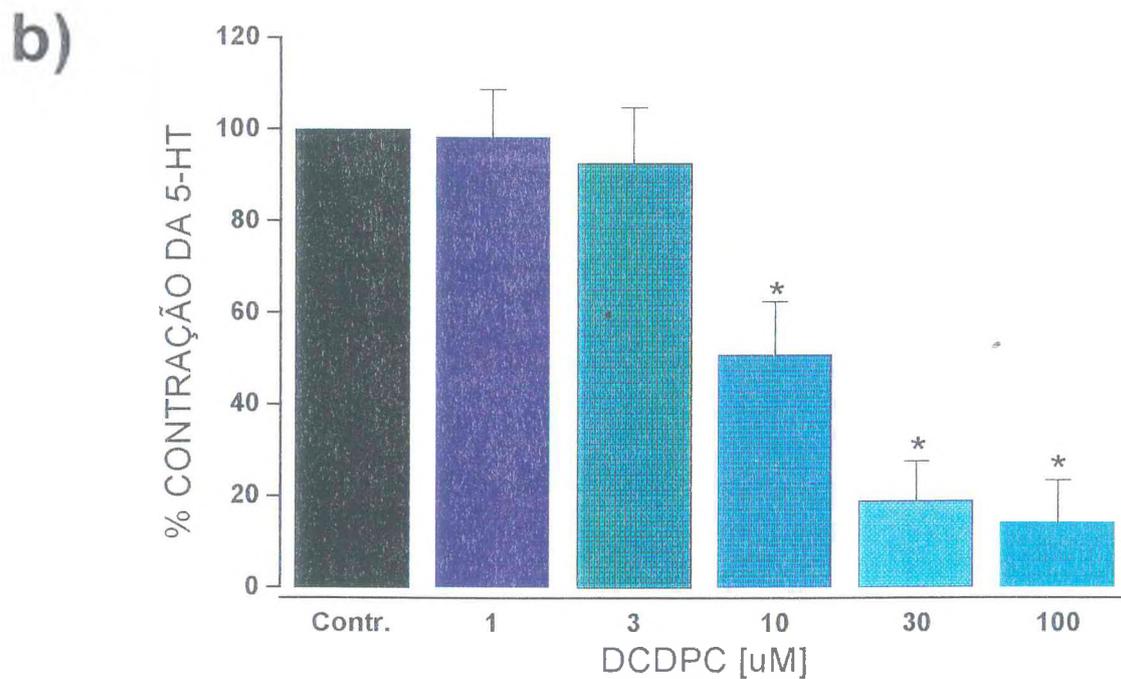
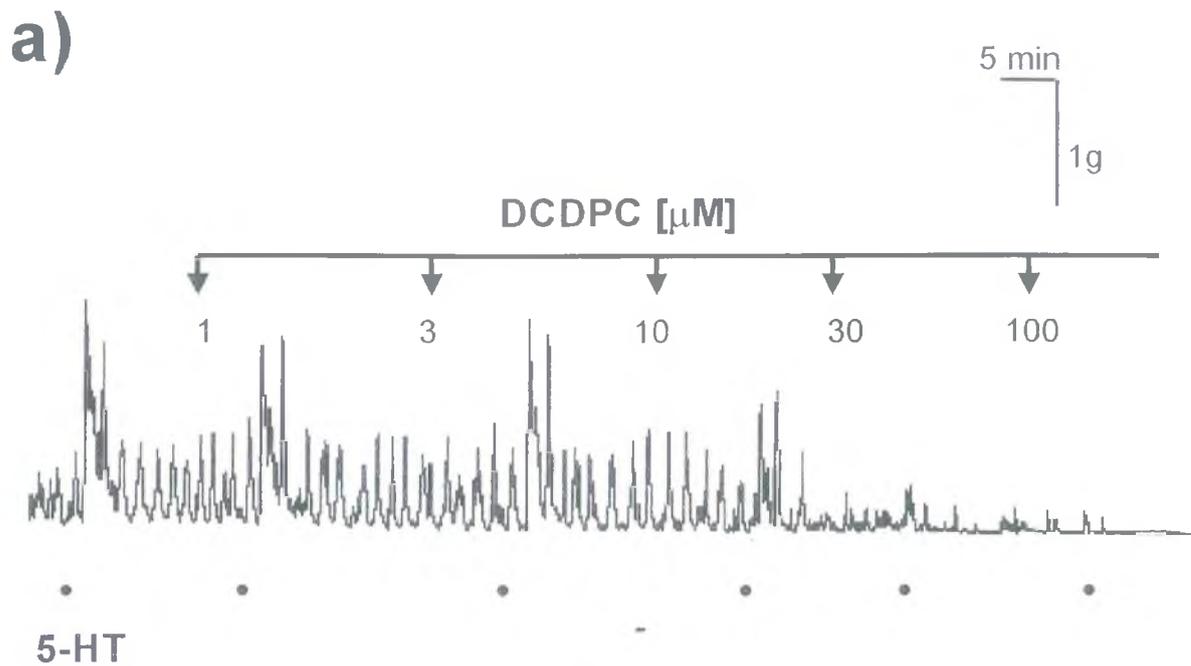


Fig. 28 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios do DCDPC (1-100 μM) sobre as contrações induzidas pela 5-HT (10 μM , $n=9$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

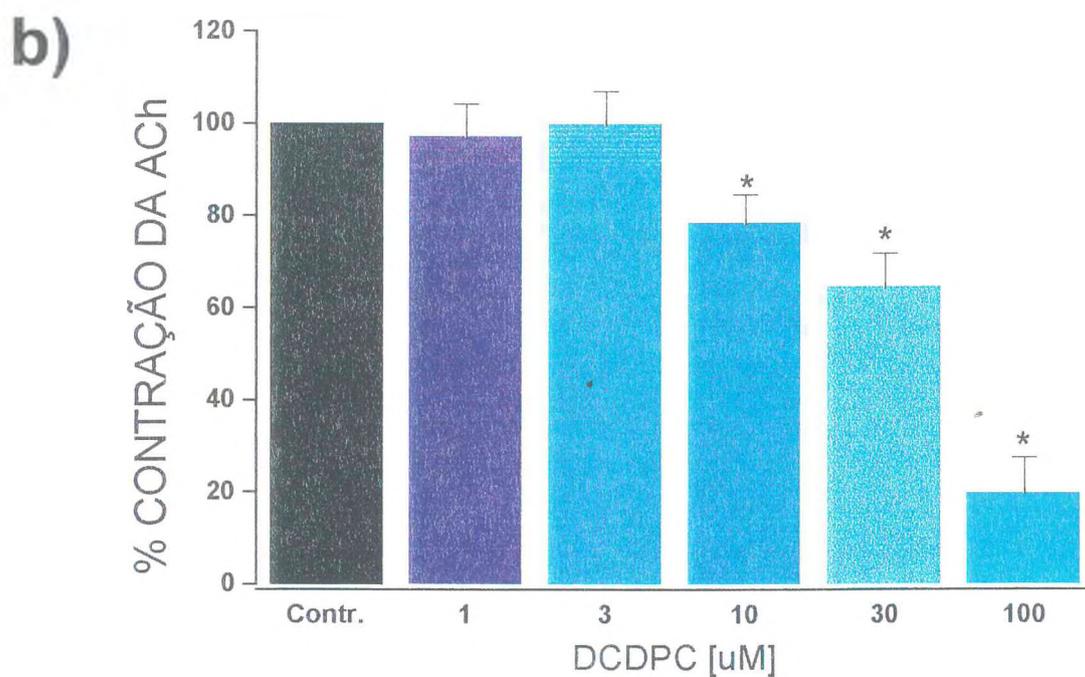
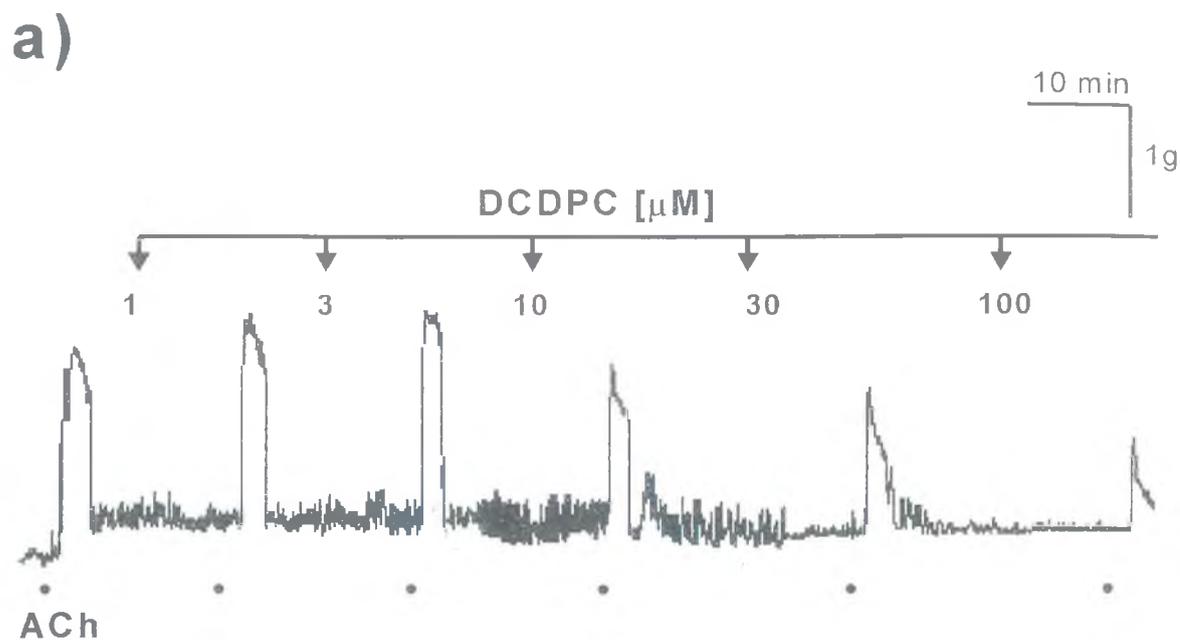


Fig. 29 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios do DCDPC (1-100 μM) sobre as contrações induzidas pela ACh (10 μM , n=6) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de \bar{n} experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

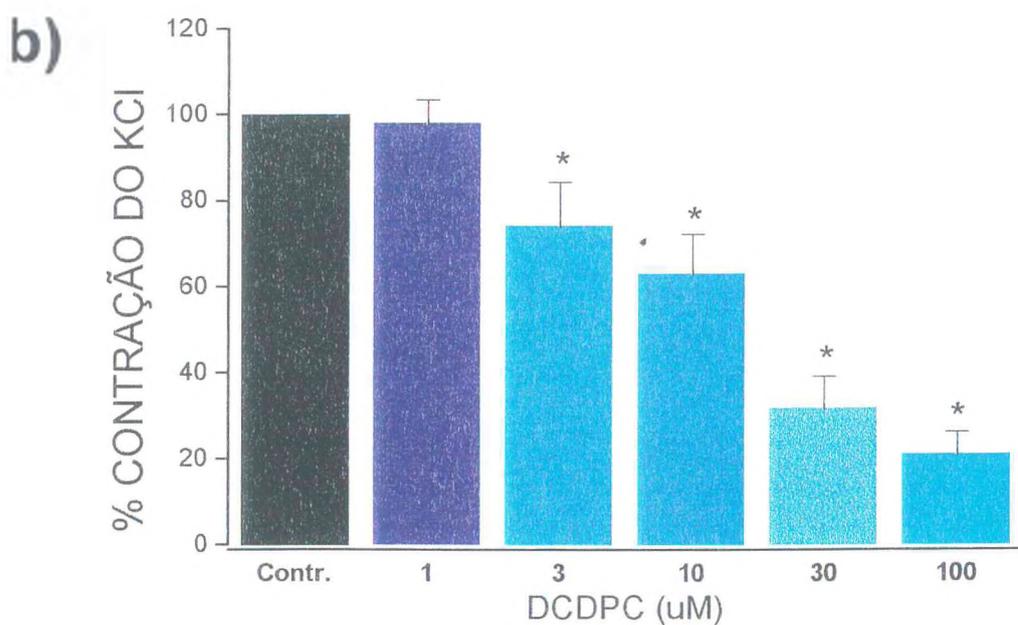
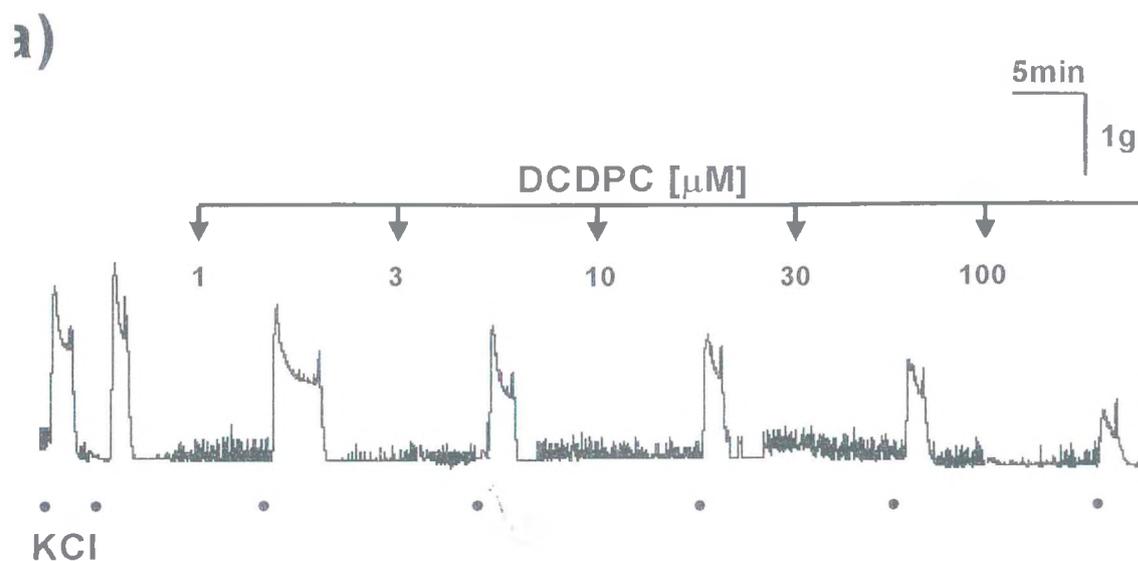


Fig. 30 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios do DCDPC (1-100 μM) sobre as contrações induzidas pelo KCl (60mM, n=6) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

3.1.8 Efeitos do DIDS sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e cloreto de potássio

Em grupos de animais experimentais à parte, avaliamos os efeitos do DIDS, um derivado stilbeno, classicamente conhecido como inibidor de canais de cloreto, sobre as contrações induzidas pela 5-HT ($10\mu\text{M}$), ACh ($10\mu\text{M}$) e KCl (60mM). Inicialmente, os três agentes induziram contrações reproduzíveis com amplitude média equivalentes a $2,47 \pm 0,54\%$ ($n=6$), $4,44 \pm 0,55\%$ ($n=8$) e $4,96 \pm 0,56\%$ ($n=6$), respectivamente.

Em contraste aos efeitos inibitórios inespecíficos do DCDPC, o DIDS ($1-300\mu\text{M}$) não teve efeito sobre as contrações induzidas pela ACh ($10\mu\text{M}$) (Fig. 32b, $n=8$), enquanto a resposta induzida pela 5-HT ($10\mu\text{M}$) foi apenas, levemente, inibida na maior concentração utilizada ($300\mu\text{M}$), reduzindo para $69,95 \pm 6,57\%$ do valor controle (Fig. 31b, $n=6$). Entretanto, as contrações induzidas por 60mM de KCl foram mais sensíveis aos efeitos do DIDS, sendo inibidas em concentrações acima de $30\mu\text{M}$, com redução máxima para $55,46 \pm 15,70\%$ do valor controle na maior concentração (Fig. 32b, $n=6$).

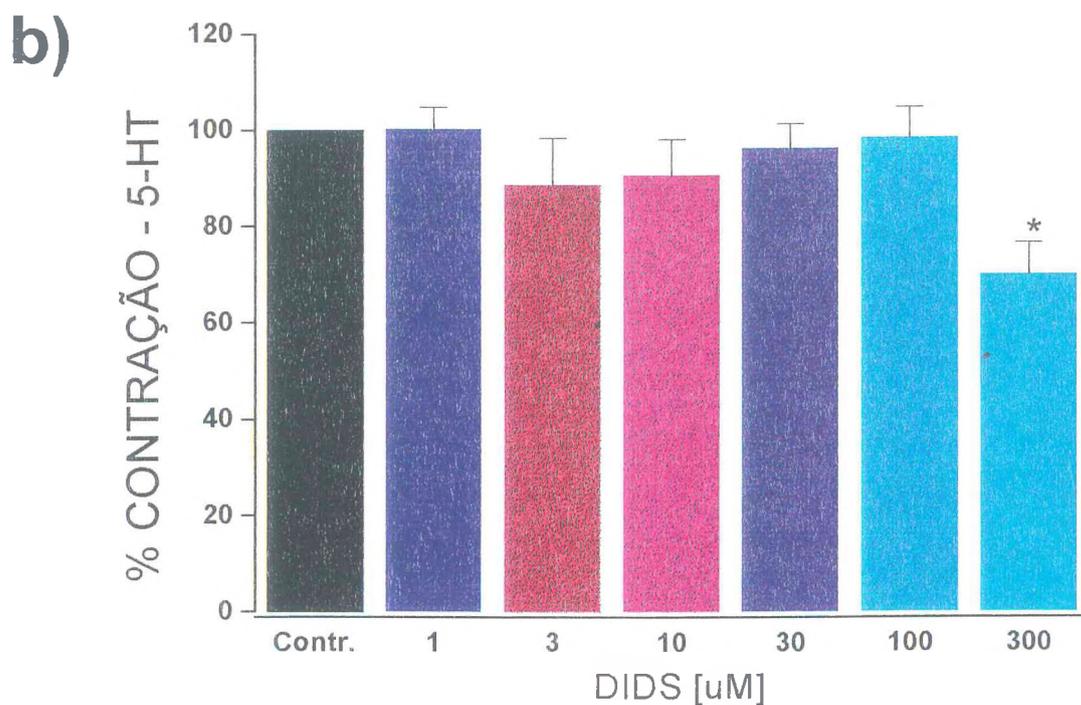
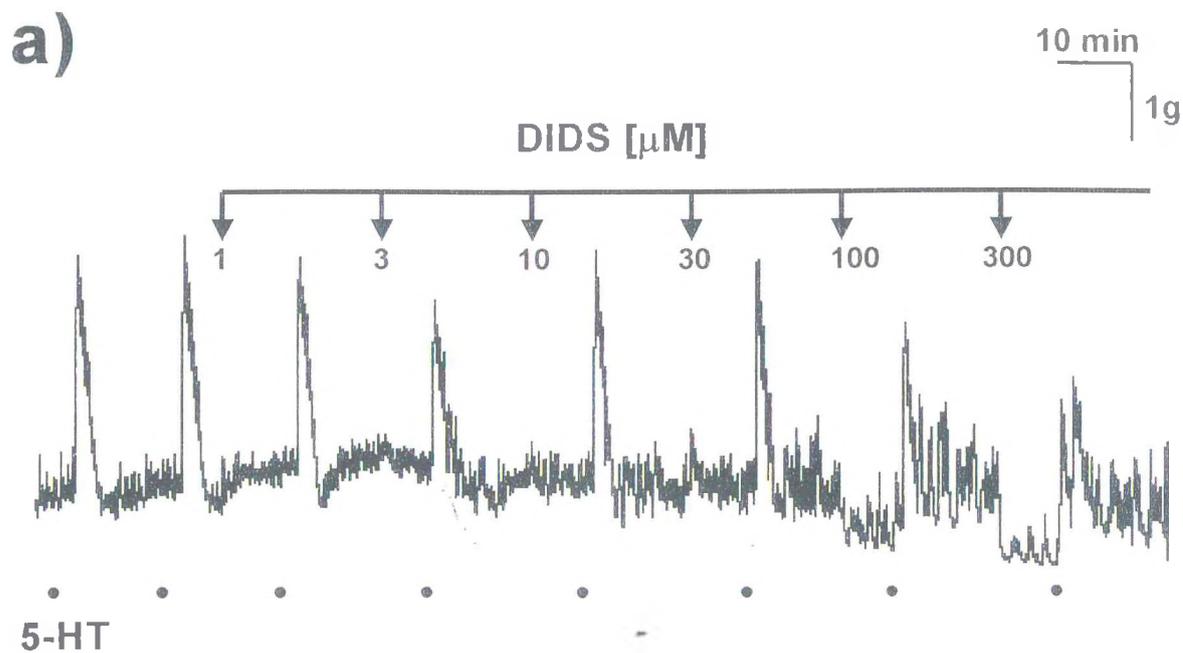


Fig. 31 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos do DIDS (1-300 μM) sobre as contrações induzidas pela 5-HT (10 μM , $n=6$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

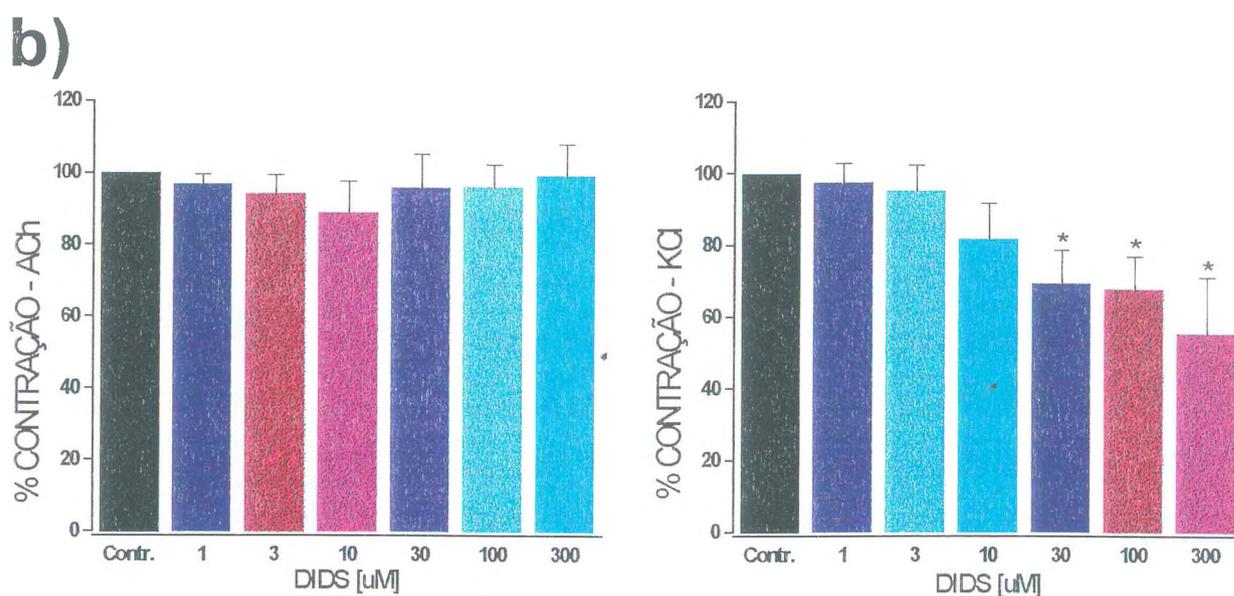
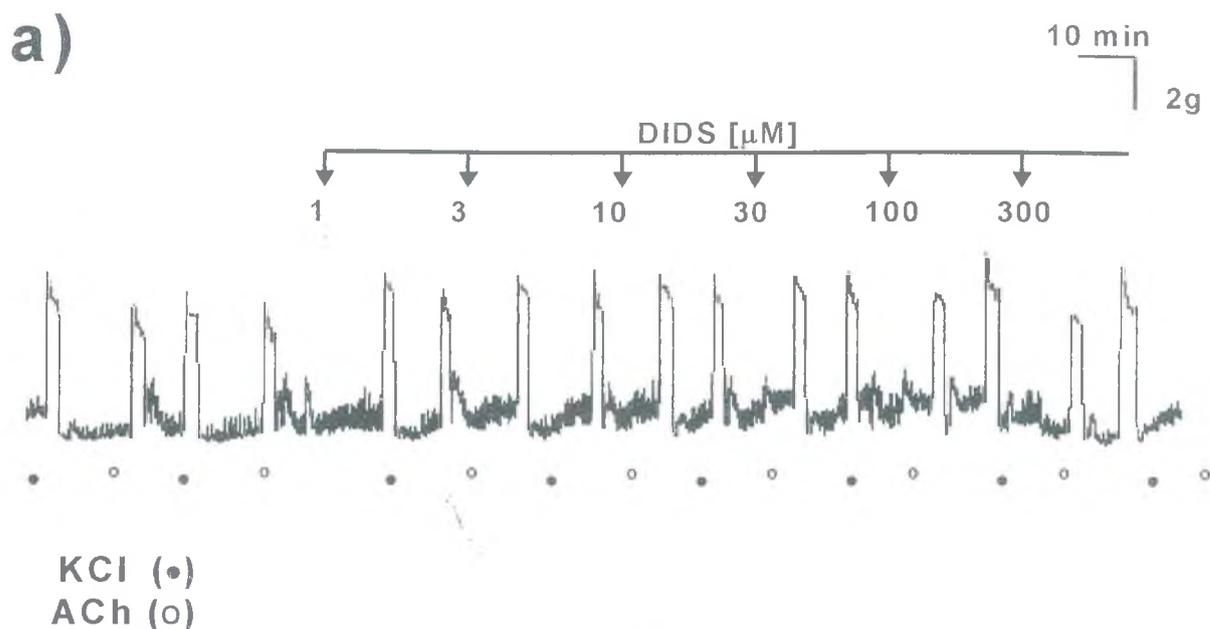


Fig. 32 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos do DIDS (1-300 μM) sobre as contrações induzidas pela ACh (10 μM , n=8) e pelo KCl (60mM, n=6) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de *n* experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

3.2 EFEITOS DOS BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CLORETO E DE CÁLCIO SOBRE AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS E ELÉTRICAS INDUZIDAS PELA SOLUÇÃO HIPOTÔNICA

3.2.1 Curva de hipotonicidade-resposta

Para avaliarmos os efeitos dos bloqueadores de canais de cloreto e a participação do cálcio extracelular sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica, inicialmente investigamos o percentual de NaCl adequado a ser modificado na solução fisiológica de Tyrode para obtermos a solução hipotônica de uso experimental. Desde que a permeabilidade da membrana depende do grau de hipotonicidade (Von Weikersthal *et al.*, 1997), construímos uma curva de contração hipotonicidade-resposta diminuindo a concentração de NaCl de 136mM (100%) para 102 (75%), 68 (50%), 34 (25%) e 0 (0%) mM da solução de Tyrode normal (Fig. 33a, n=5). A resposta contrátil induzida pelo KCl (60mM) foi utilizada como parâmetro de referência na contratilidade induzida pela solução hipotônica.

A solução hipotônica com 102mM (75%) de NaCl produziu uma contração média transitória de $3,05 \pm 0,58$ g equivalente a $85 \pm 6,86\%$ da contração induzida por 60 mM de KCl. Desde que esta contração logo retornou, espontaneamente, à linha basal, ela foi considerada inviável para o desenvolvimento do presente trabalho. As outras soluções com 68mM (50%), 34mM (25%) e 0mM (0%) de NaCl produziram contrações médias equivalentes a $3,53 \pm 0,56$ g, $3,86 \pm 0,53$ g e $4,1 \pm 0,62$ g (n=5), correspondentes a $102,44 \pm 2,82\%$, $114,74 \pm 4,99\%$ e $122,13 \pm 7,7\%$ (Fig. 33b, n=5) da contração induzida por 60mM de KCl, respectivamente. Desde que a solução hipotônica com 68mM (50%) de NaCl (SH) tenha induzido uma contração submáxima sustentada e reproduzível equivalente àquela induzida por 60mM de KCl, consideramos ser mais adequada e, portanto, foi aplicada em nossos experimentos.

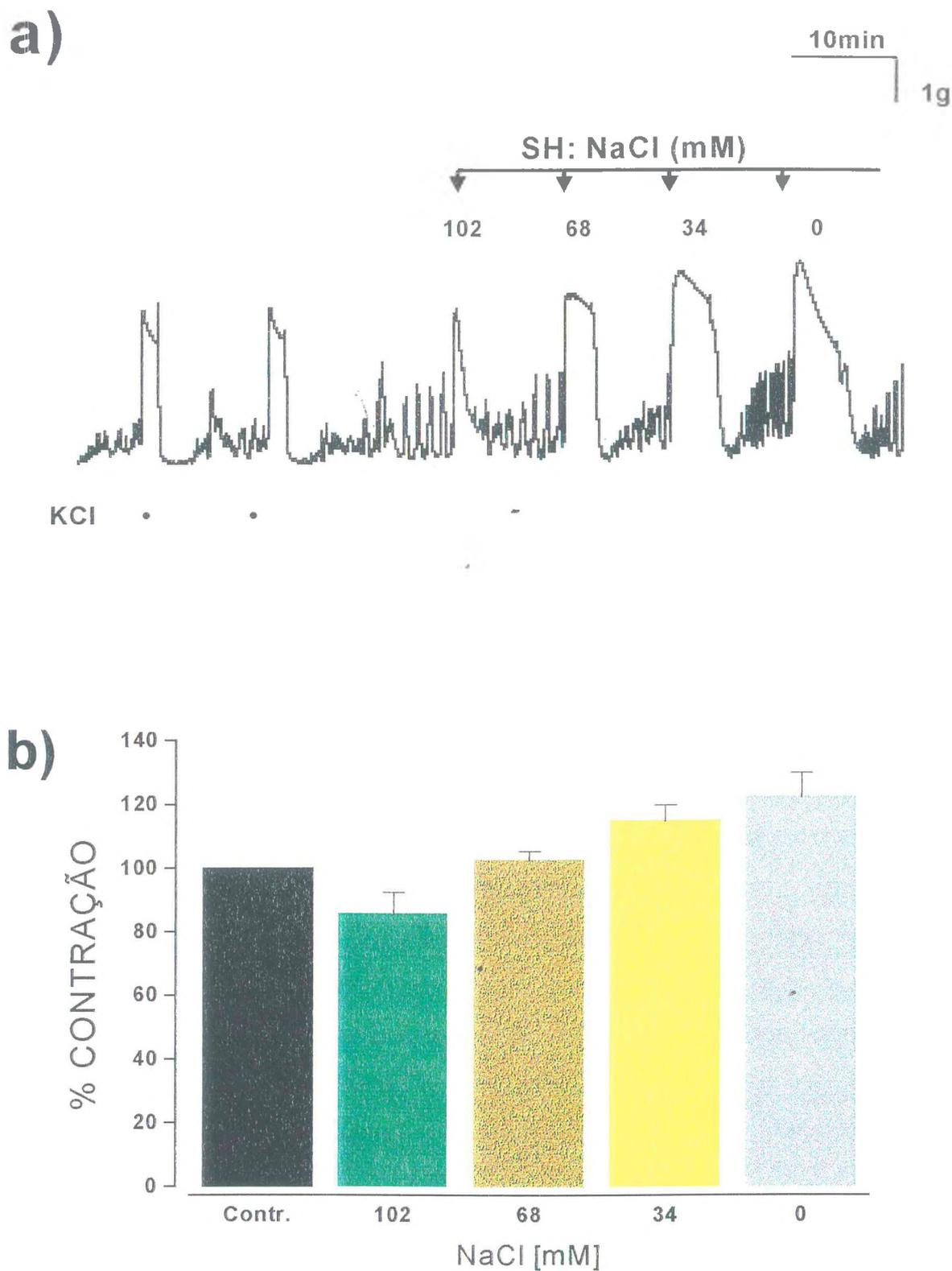


Fig. 33 - a) – Registro representativo **b)** – Curva de hipotonicidade-resposta induzida pela SH, reduzindo a concentração de NaCl para 102, 68, 34 e 0 mM de NaCl ($n=5$) da solução de Tyrode normal (135mM NaCl) em fundo isolado de estômago de rato. Valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos comparados com a contração induzida por 60mM de KCl (controle).

3.2.2 Efeitos da solução zero-cloreto sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica

Considerando que o cloreto esteja, fisiologicamente, envolvido em vários mecanismos reguladores do volume celular, como por exemplo, participando na troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, no co-transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ e por ter sua condutância sensível ao aumento de volume celular (Strange *et al.*, 1996; Hoffmann & Dunham, 1995), investigamos os efeitos da substituição do cloreto na resposta contrátil induzida pela solução hipotônica com 68mM de NaCl (50%) (SH). Avaliamos os efeitos de duas soluções hipotônicas isentas de cloreto, gluconato (SH-GLU) e acetato (SH-AC), preparadas pelas substituições isotônicas dos sais de cloreto pelos respectivos sais de gluconato e acetado, similarmente, à preparação utilizada no trabalho de Xu *et al.* (1997), no qual reduziu a concentração de cloreto extracelular substituindo o cloreto de sódio pelo gluconato de sódio, equimolarmente.

Aplicações solução hipotônica (SH) produziram contrações sustentadas e reproduzíveis com amplitude média equivalentes a $2,11 \pm 0,30\text{g}$ ($n=10$). Substituindo-se a solução de banho de Tyrode normal pela respectiva solução isenta de cloreto (GLU), as contrações espontâneas e o tônus basal permaneceram inalterados. A aplicação da solução de SH-GLU reduziu as contrações para $70,01 \pm 3,66\%$ em relação ao valor controle (SH) (Fig. 34b, $n=10$). Após 15-20 minutos da reposição do cloreto, a resposta contrátil induzida pela SH foi plenamente restabelecida, como mostramos no final do registro representativo (Fig. 34a).

Em grupo experimental à parte, aplicações solução hipotônica (SH) produziram contrações sustentadas e reproduzíveis com amplitude média equivalentes a $1,59 \pm 0,53\text{g}$ ($n=4$). Em contraste aos efeitos da SH-GLU, quando os sais de cloreto foram substituídos pelos respectivos sais de acetato na solução hipotônica (SH-AC), as respostas foram completamente diferentes. A aplicação de solução isenta de cloreto (AC) induziu ampla e transitória

contração, em todos os experimentos, que rapidamente retornou aos níveis basais. Três dos quatro experimentos, mostraram redução da atividade espontânea da preparação e diminuição do tônus basal. A resposta contrátil induzida pela SH-AC foi aumentada para $129,11 \pm 7,74\%$ do valor controle (SH) (Fig. 35b, n=4). Imediatamente após a reposição das condições normais de cloreto, houve retorno da atividade espontânea no nível da linha basal. Após 10-20 minutos, mostramos a recuperação da resposta contrátil da SH no final do registro representativo (Fig. 34a).

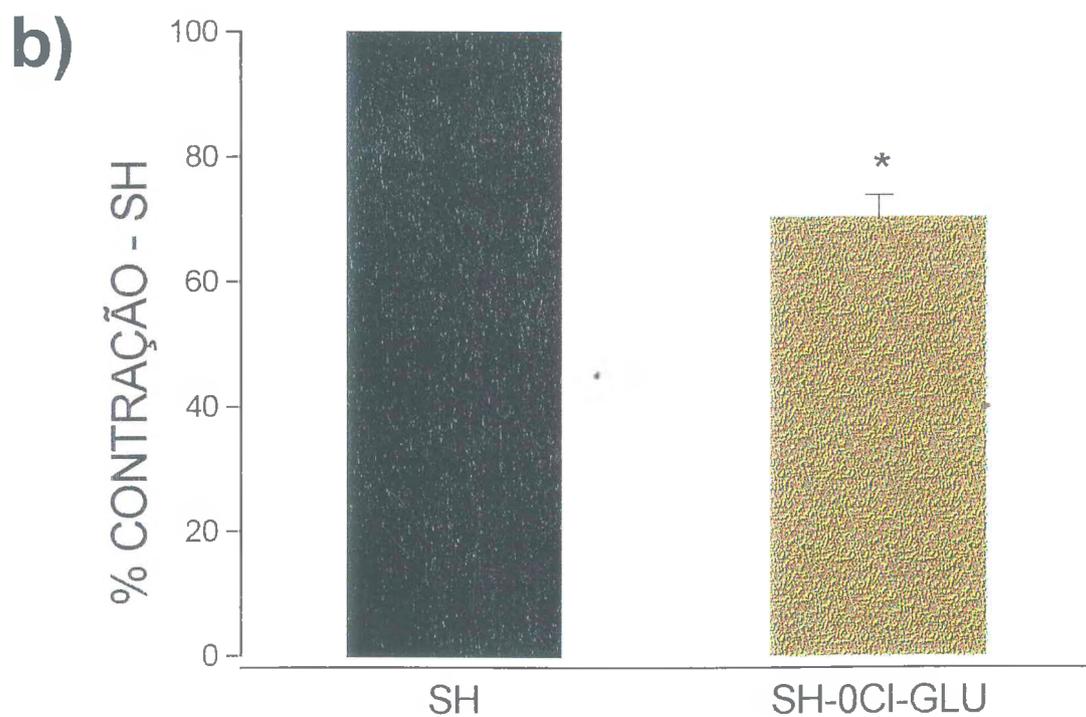
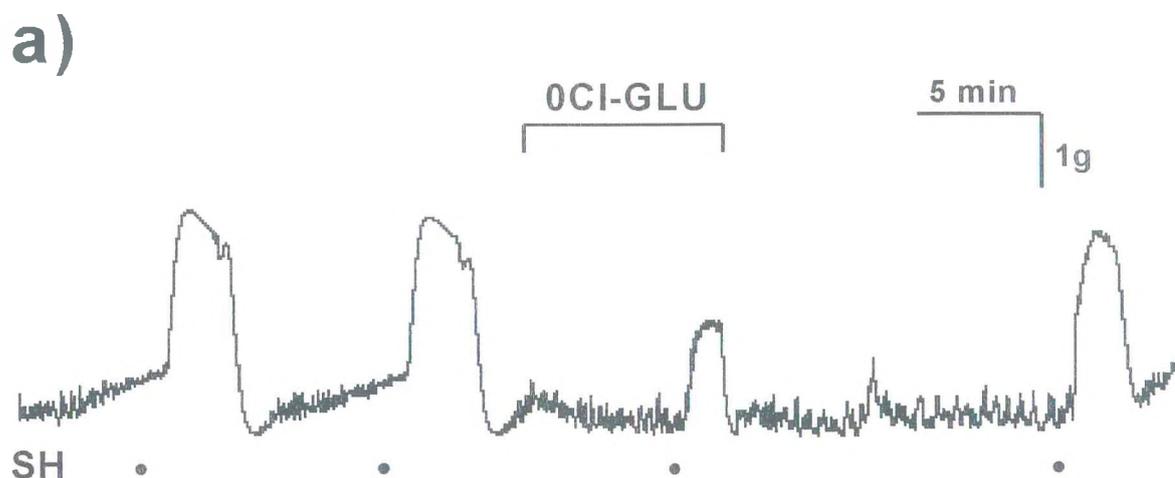


Fig. 34 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos da substituição do cloreto pelo gluconato na solução hipotônica (SH-0Cl-GLU, $n=10$) sobre as contrações induzidas pela SH em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

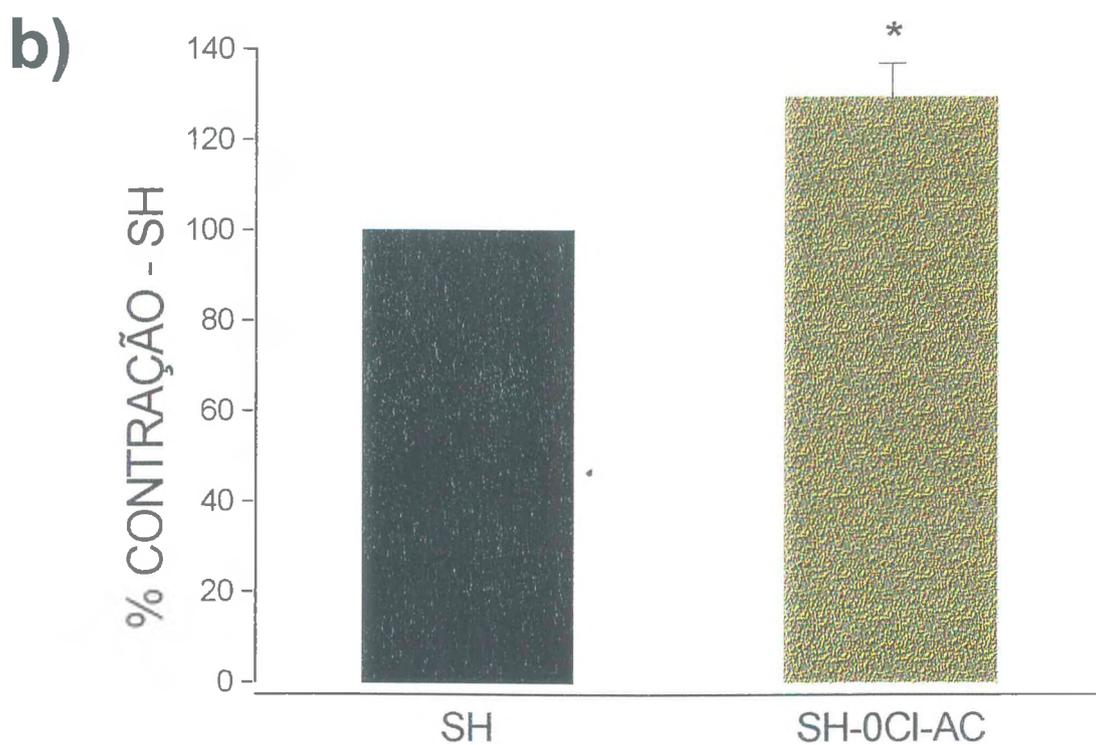
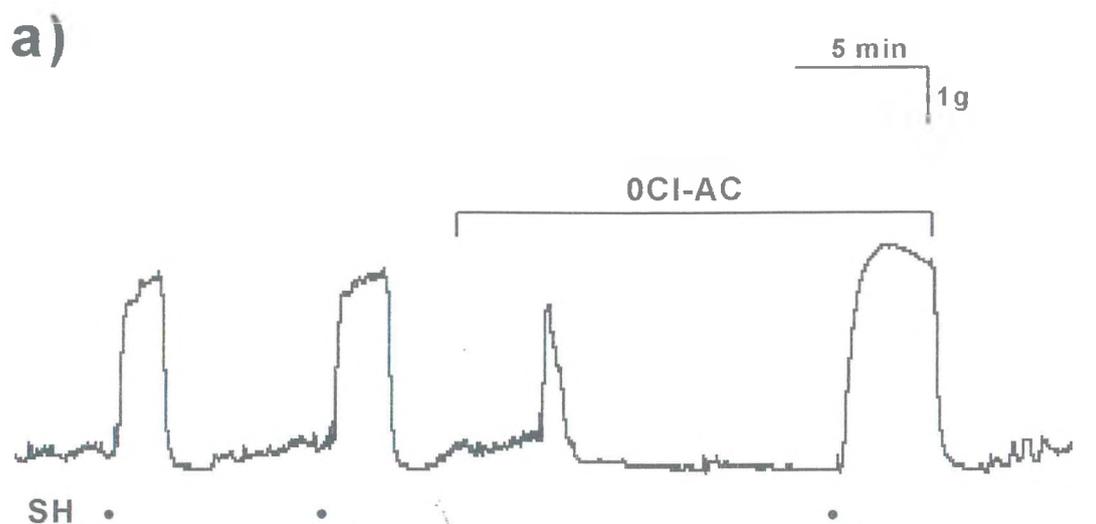


Fig. 35 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos da substituição do cloreto pelo acetato na solução hipotônica (SH-0Cl-AC, $n=4$) sobre as contrações induzidas pela SH em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p<0,05$ (*).

3.2.3 Efeitos da nifedipina e da solução zero-cálcio sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica

Desde que o cálcio esteja envolvido no mecanismo contrátil induzido por agonistas, avaliamos o seu possível envolvimento na contração induzida pela solução hipotônica (SH), utilizando a nifedipina, um clássico bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem, e removendo o cálcio do meio extracelular.

A SH induziu contrações estáveis e reproduzíveis com amplitudes médias equivalentes a $1,94 \pm 0,28\text{g}$ ($n=6$). Na presença de nifedipina (10^{-8} – 10^{-6}M) as contrações foram inibidas de maneira dependente de concentração com redução para $16,35 \pm 4,02\%$ do valor controle para a maior concentração (Fig. 36b, $n=6$). Em todas as concentrações a nifedipina reduziu o tônus basal e as contrações espontâneas da preparação.

Em grupos diferentes de animais, a SH induziu contrações estáveis e reproduzíveis com amplitudes médias equivalentes a $2,28 \pm 0,28\text{g}$ ($n=8$), as quais foram tratadas como controles. Aplicações de solução de Tyrode 0Ca (anexo A) contendo 2mM de EGTA aboliu, completamente, as oscilações espontâneas e reduziu o tônus basal da preparação. A ausência de resposta contrátil pelo estímulo com KCl (60mM) indica a ausência de cálcio extracelular (Fig. 37a). Nestas condições, as contrações induzidas pela SH foram totalmente abolidas. Após, aproximadamente, 10 minutos da reposição das condições normais de cálcio extracelular com solução de Tyrode normal, houve total recuperação do tônus basal, da atividade espontânea e da contração induzida pela SH, mostrada no final do registro representativo (Fig. 37b).

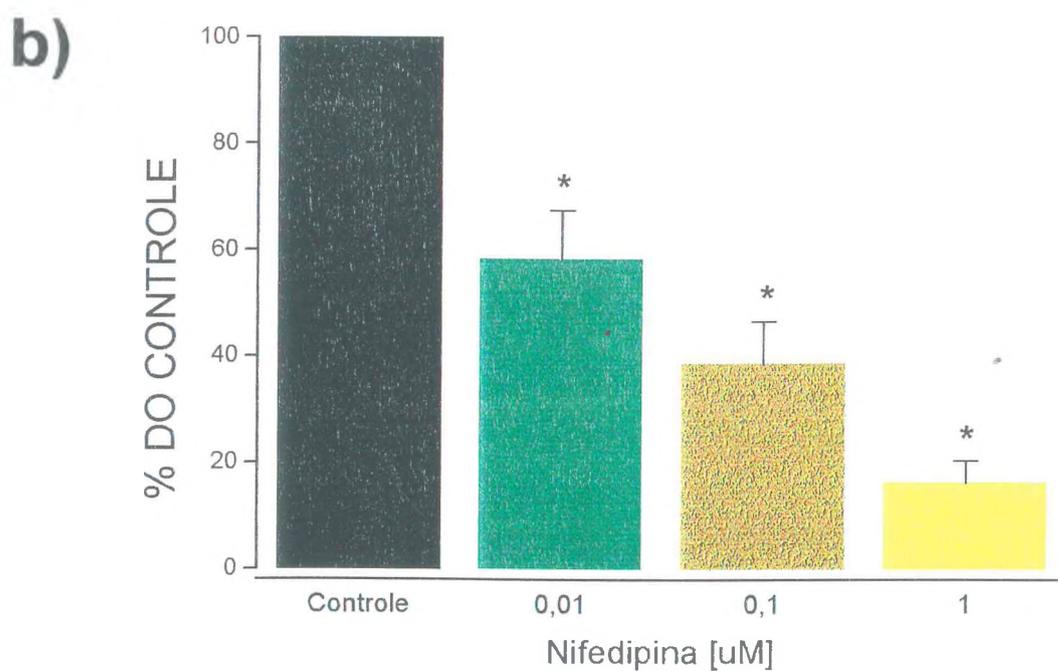
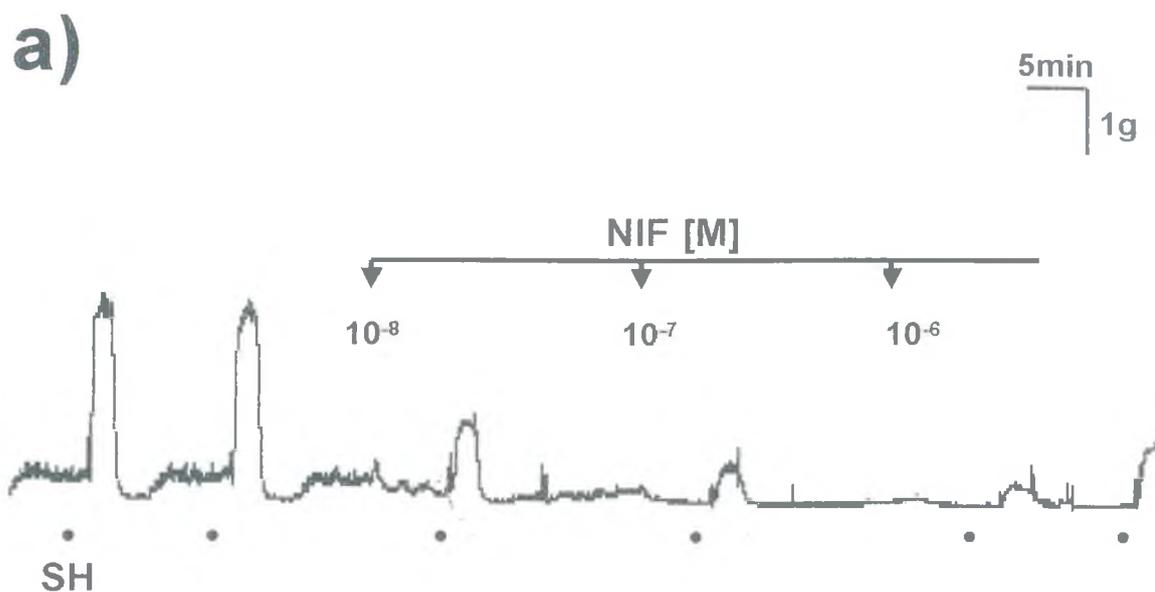


Fig. 36 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios da NIF (10^{-8} – 10^{-6} M) sobre as contrações induzidas pela SH (50% NaCl, $n=6$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

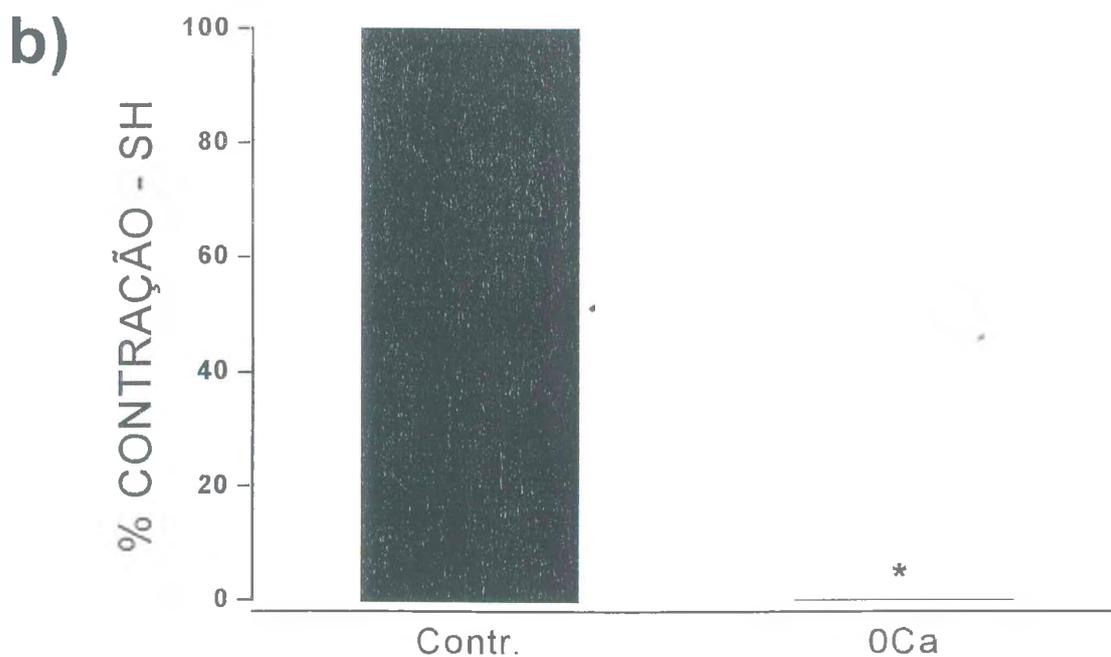
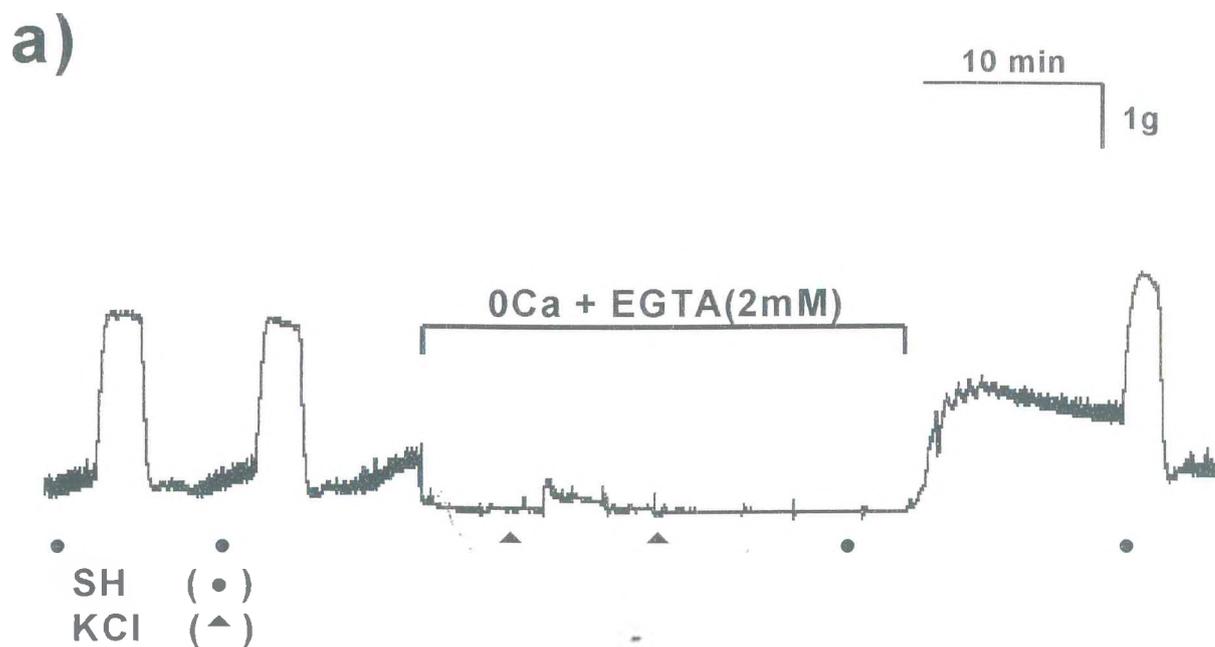


Fig. 37 - a) – Registro representativo b) – Efeitos da solução 0Ca sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica (SH 50%NaCl, n=8) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

3.2.4 Efeitos do ácido niflúmico, DIDS, tamoxifeno e NPPB sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica

Vários estudos em músculo liso mostram que o ácido niflúmico, em baixas concentrações ($\leq 30\mu\text{M}$), possui grande seletividade em inibir as correntes de cloreto ativadas pelo cálcio ($I_{Cl_{(Ca)}}$) (Hogg *et al.*, 1994a; Large & Wang, 1996). Recentemente, estudo em veia porta de coelho caracterizou um outro tipo de corrente de cloreto ativada pela hipotonicidade (I_{SWELL}) com propriedades diferentes das $I_{Cl_{(Ca)}}$, a qual foi inibida em baixas concentrações de tamoxifeno (anti-estrogênico, Fig.3) e DIDS (derivado stilbeno), mas insensível ao ácido niflúmico (Greenwood & Large, 1998). Estudos recentes mostram que, em culturas de células endoteliais de cérebros de ratos, o NPPB, DIDS e tamoxifen inibem as correntes de cloreto ativadas por hipotonicidade (Von Weikersthal *et al.*, 1999) e que, em cultura de células humanas de astrocitoma, o DIDS, SITS e NPPB também inibem estas correntes com maiores potências do que o ácido niflúmico (Bakhramov *et al.*, 1995). Embora esteja bem evidente que a hipotonicidade ative uma condutância de cloreto em vários tipos de células, os estudos funcionais em músculo liso não vasculares parecem carecer de informações. Portanto, desde que NFA, DIDS, tamoxifeno e do NPPB tenham sido utilizados como clássicas ferramentas farmacológicas neste tipo de investigação, decidimos avaliar os seus efeitos sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica.

Desde que o NFA e NPPB foram dissolvidos em DMSO, controles pareados foram expostos ao DMSO em concentrações equivalentes àquelas utilizadas nos experimentos, mostrando que a resposta induzida pela SH não foi inibida ao longo do período experimental (Fig. 38, n=4). As avaliações dos efeitos produzidos NFA, DIDS, tamoxifeno e NPPB foram realizados em grupos experimentais diferentes, nos quais a solução hipotônica induziu contrações estáveis e reproduzíveis com amplitudes médias equivalentes a

$3,99 \pm 0,42\text{g}$ (n=6), $2,45 \pm 0,52\text{g}$ (n=6), $3,5 \pm 0,41\text{g}$ (n=8) e $2,82 \pm 0,58\text{g}$ (n=5), respectivamente.

O ácido niflúmico (1-100 μM) reduziu as contrações induzidas pela SH para $53,4 \pm 0,42\%$ e para $10,93 \pm 1,89\%$ do valor controle (Fig. 39b), nas concentrações de 30 μM e 100 μM , respectivamente. Entretanto, na maior concentração (100 μM) as oscilações espontâneas foram, sensivelmente, reduzidas. O final do registro representativo mostra a total reversibilidade dos efeitos inibitórios do ácido niflúmico pela completa recuperação da contração induzida pela SH (Fig. 39a). Em contraste, o DIDS (1-100 μM) potencializou os efeitos contráteis induzidos pela solução hipotônica, aumentando para $141,17 \pm 7,7\%$ do valor controle, na maior concentração (Fig. 40b). Após 20-30 minutos na ausência do DIDS, a contração induzida pela SH retornou à amplitude equivalente ao controle (Fig. 40a). O tamoxifeno (1-100 μM) e o NPPB (1-100 μM) mostraram efeitos inibitórios significativos apenas na concentração de 100 μM , reduzindo as contrações induzidas pela SH para $59,06 \pm 4,26\%$ (Fig. 41b) e $15,67 \pm 1,99\%$ (Fig. 42b) do valor controle, respectivamente. A partir de 30 μM o NPPB aboliu quase que totalmente a atividade espontânea da preparação (Fig.42a).

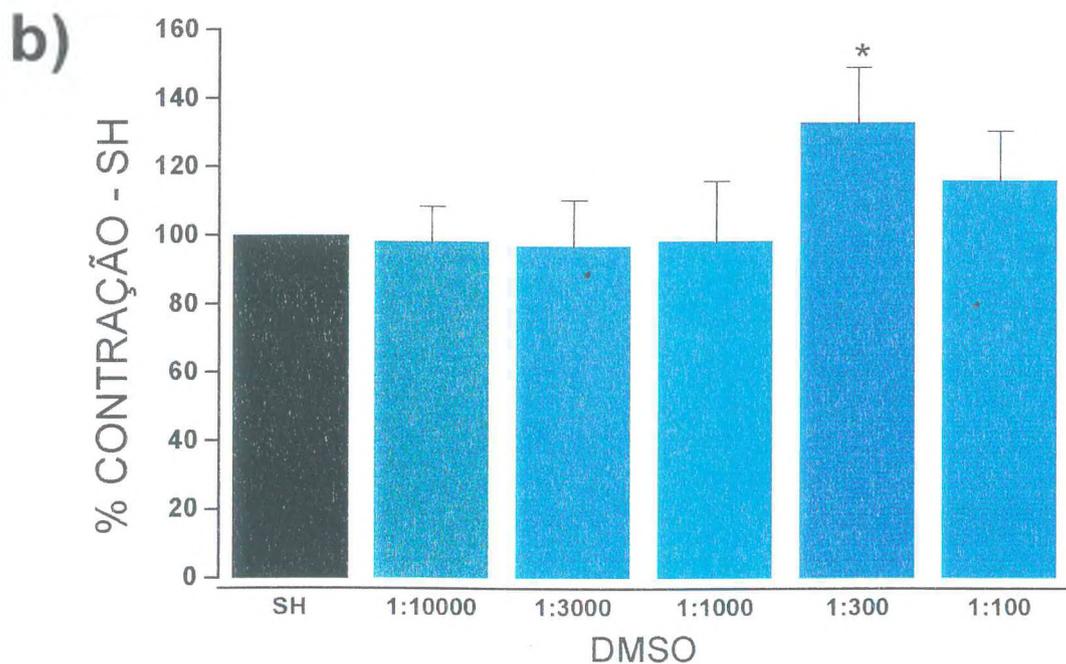
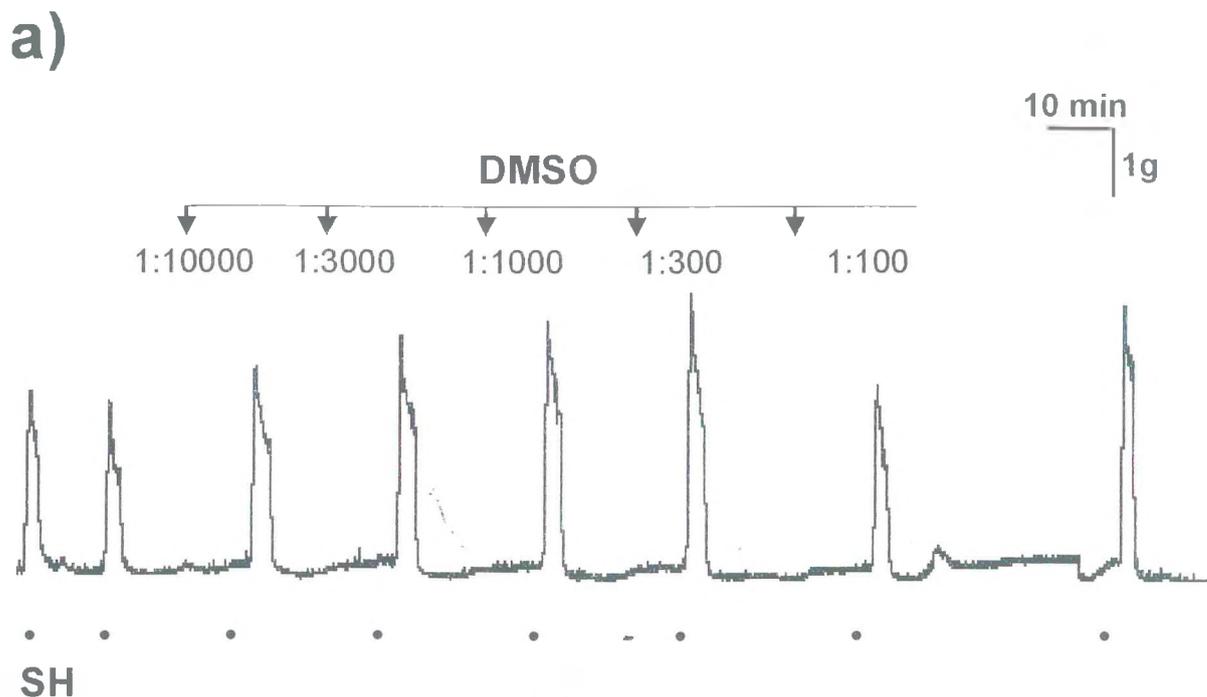


Fig. 38 - a) – Registro representativo b) – Ausência de efeitos inibitórios do DMSO sobre as contrações induzidas pela SH (50% NaCl) em fundo de estômago de rato ($n=4$), em diluições equivalentes àquelas utilizadas com NFA. Os valores mostrados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos pareados e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p < 0,05$

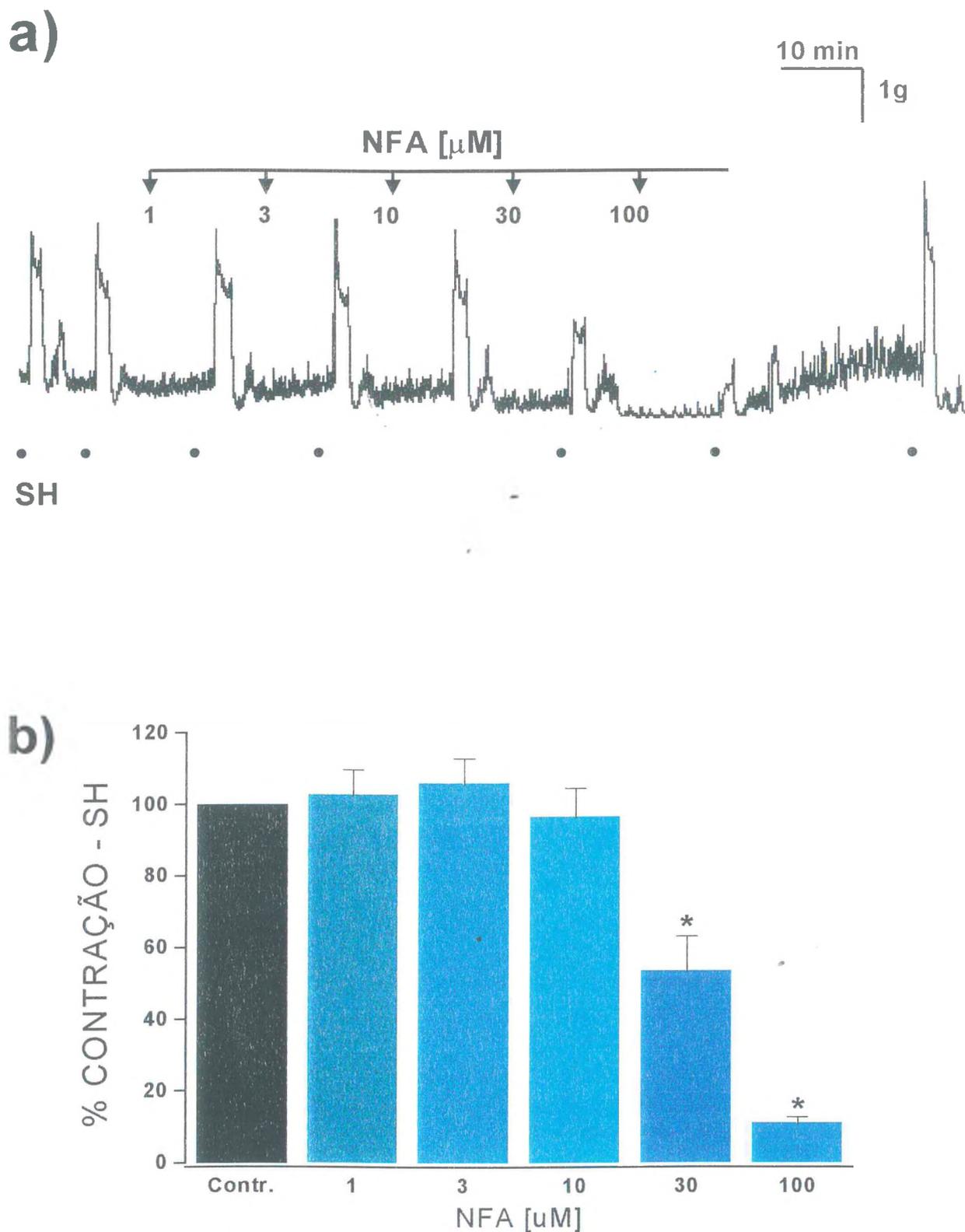
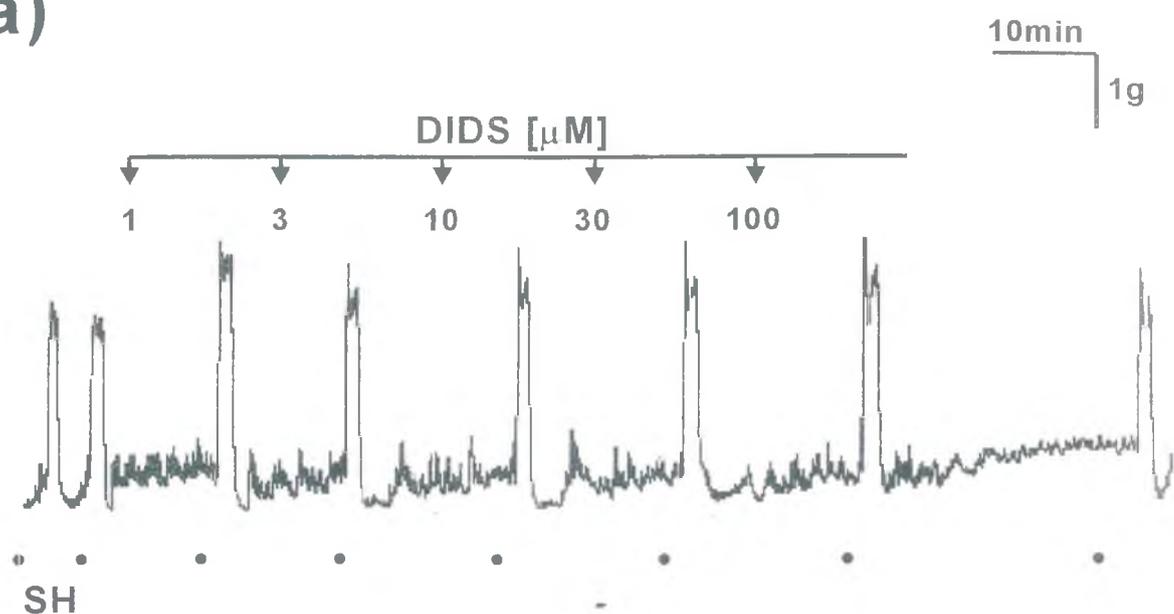


Fig. 39 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos inibitórios do NFA (1 - 100 μM) sobre as contrações induzidas pela SH (50% NaCl, n=6) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

a)



b)

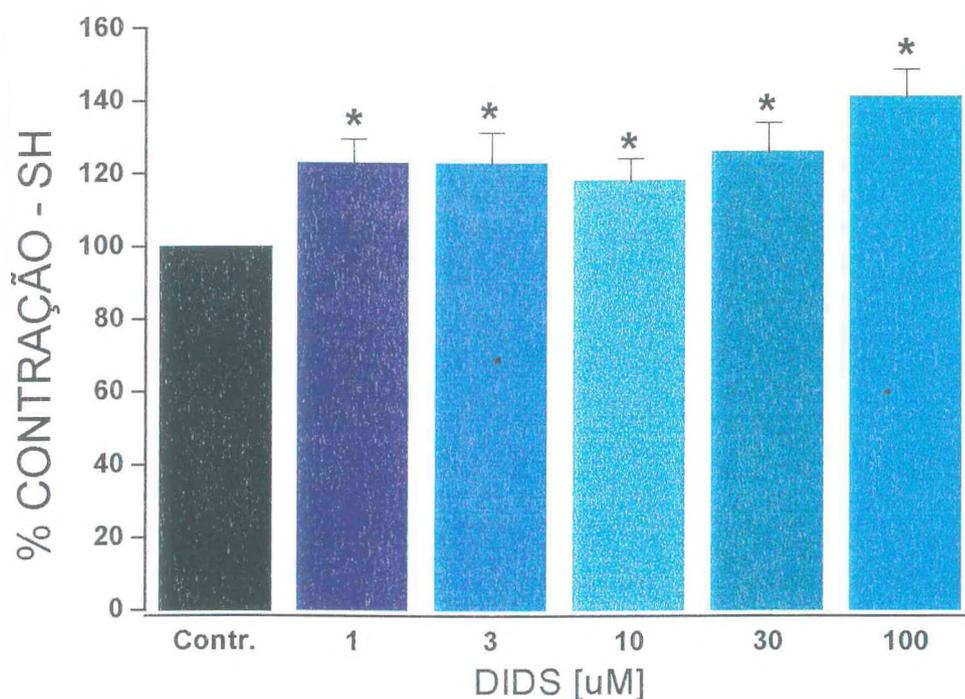


Fig. 40 - a) – Registro representativo **b)** – Ausência de efeitos inibitórios do DIDS (1 - 100 μM) sobre as contrações induzidas pela SH (50% NaCl, n=6) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de *n* experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

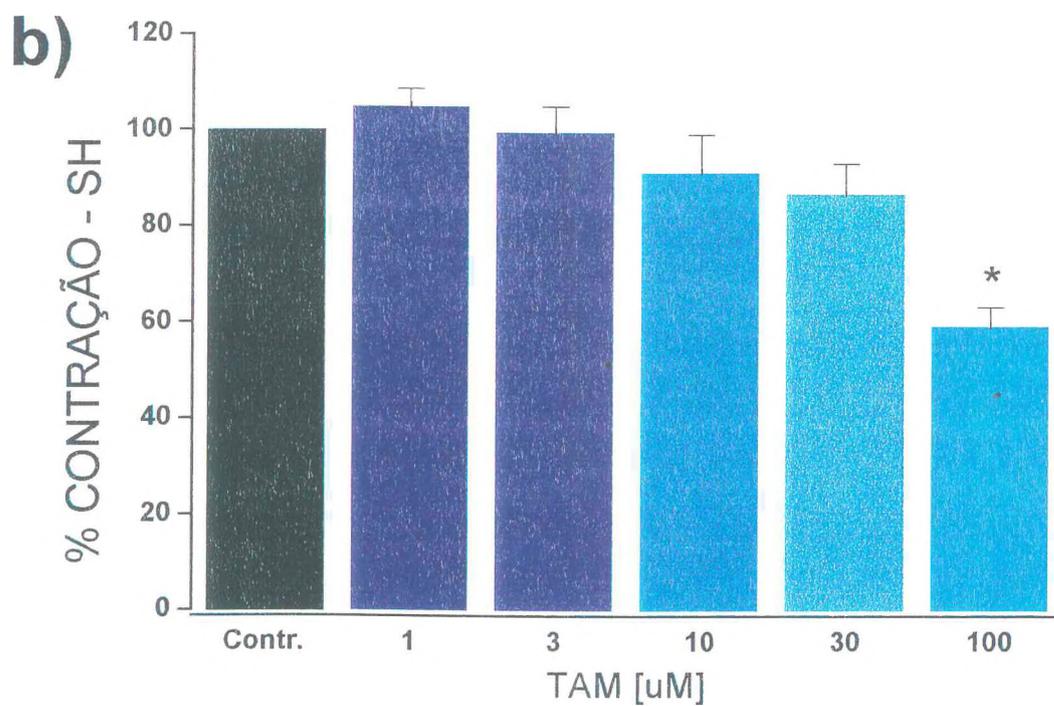
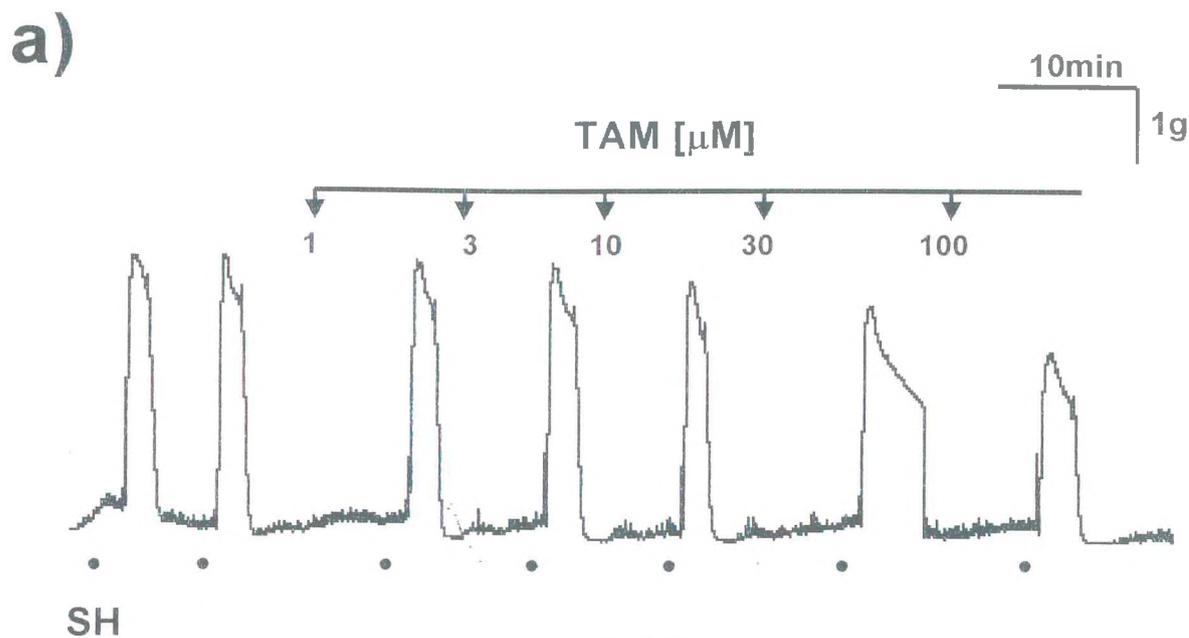


Fig. 41 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos do TAM (1 - 100 μM) sobre as contrações induzidas pela SH (50% NaCl, $n=8$) em fundo isolado de estômago de ratão. Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p<0,05$ (*).

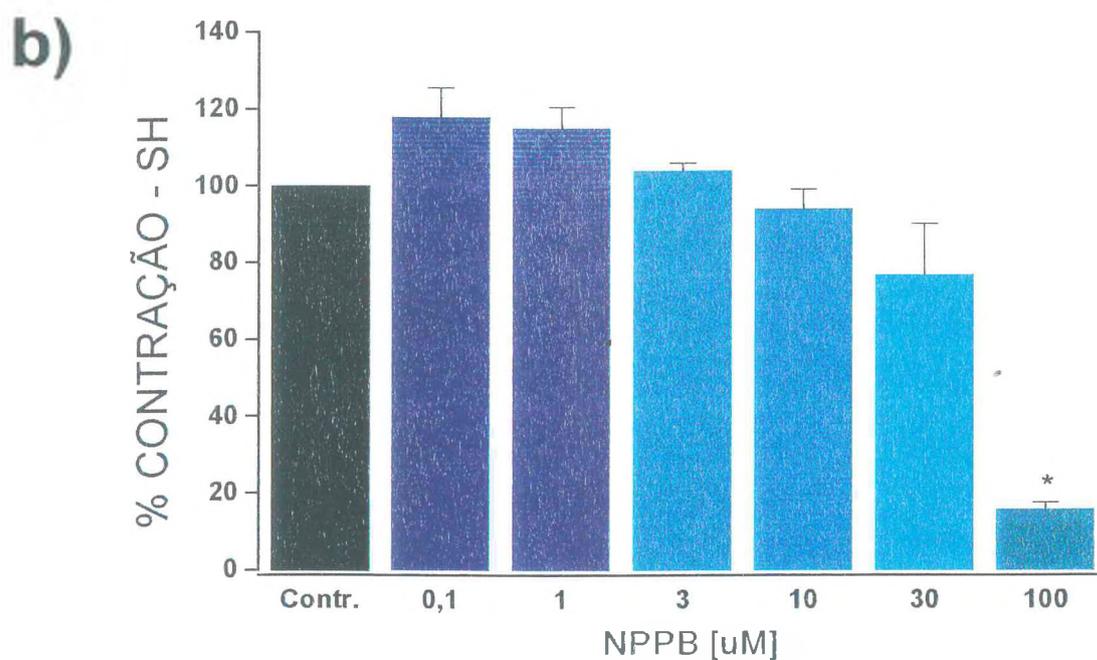
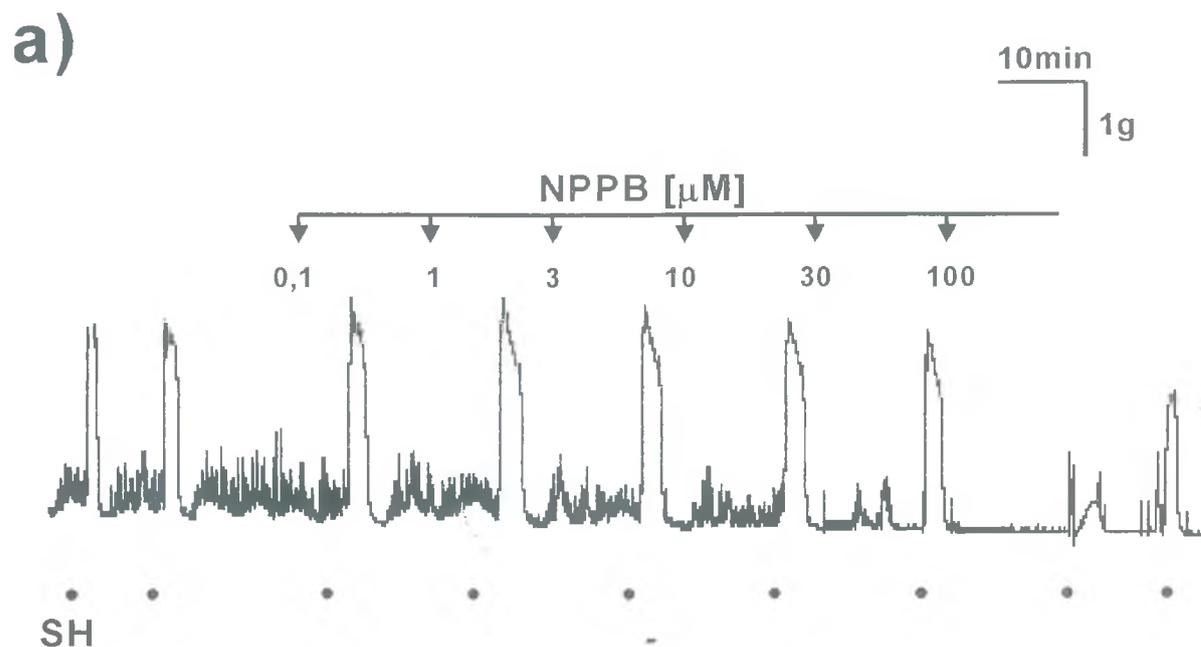


Fig. 42 - a) – Registro representativo **b)** – Efeitos do NPPB (0,1 - 100 μM) sobre as contrações induzidas pela SH (50% NaCl, n=5) em fundo isolado de estômago de rato.³ Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média (barras verticais) de *n* experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

3.2.5 Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre a despolarização da membrana induzida pela solução hipotônica

Empalamentos seriados em solução fisiológica de Tyrode normal (TN) produziram um potencial de membrana médio de $-57,25 \pm 1,41$ mV ($n=4$), derivado dos registros de um total de 90 células (N) dos “n” experimentos realizados, o qual foi tratado como controle. Aplicação de solução hipotônica (SH) com fluxo de 25-30 gotas/minuto, induziu uma despolarização lenta e progressiva, levando o potencial médio de $-57,25 \pm 1,41$ mV ($n=4$, $N=90$) para $-9,9 \pm 0,89$ mV ($n=4$, $N=129$), no período de 15-30 minutos, o qual foi completamente restabelecido após a reposição de TN ($-56,66 \pm 1,74$ mV, $n=4$, $N=83$). A adição de ácido niflúmico ($30\mu\text{M}$) não alterou o potencial de repouso da membrana em solução de TN ($-59,70 \pm 1,31$ mV, $n=4$, $N=89$), mas inibiu completamente a despolarização induzida pela SH, mantendo o valor médio de potencial de $-58,54 \pm 0,82$ mV ($n=4$, $N=122$), um valor bem próximo do potencial de controle (Fig. 43). Em contraste, a adição de nifedipina ($1\mu\text{M}$) não mostrou qualquer efeito inibitório sobre a despolarização induzida pela SH, onde o valor do potencial de membrana médio foi de $-11,83 \pm 0,26$ mV ($n=4$, $N=189$) e $-12,56 \pm 1,99$ mV ($n=4$, $N=167$) na ausência e na presença de nifedipina, respectivamente (Fig. 44).

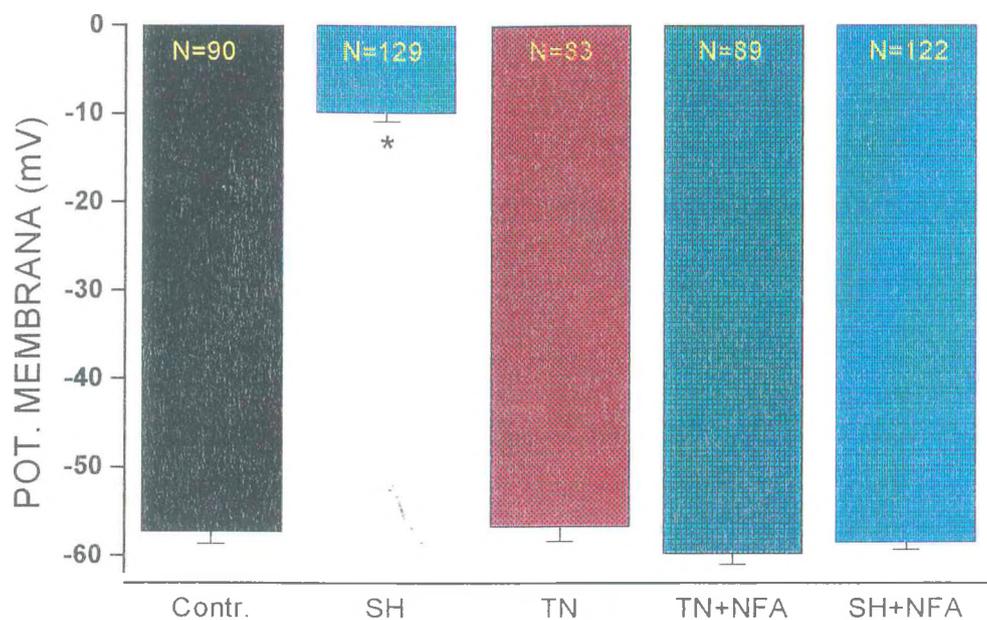


Fig. 43 - Efeitos inibitórios do NFA ($30\mu\text{M}$, $n=4$) sobre a despolarização da membrana induzida pela SH ($50\%\text{NaCl}$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*). O "N" indica o número total de medidas de potenciais de membrana de "n" experimentos realizados.

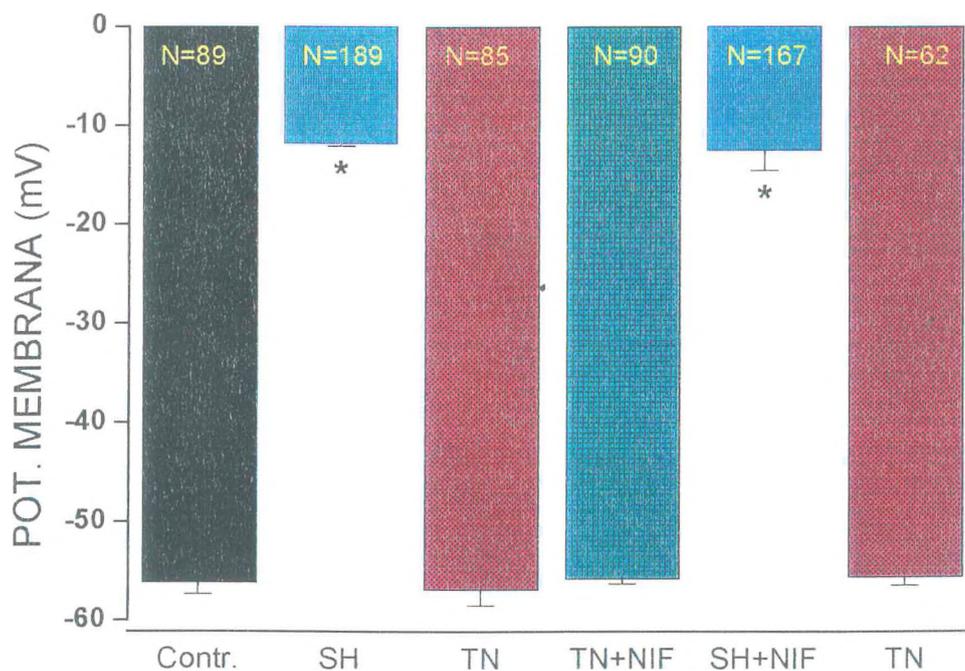


Fig. 44 - Ausência de efeitos inibitórios da NIF ($1\mu\text{M}$, $n=4$) sobre a despolarização da membrana induzidas pela SH ($50\%\text{NaCl}$) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são médias \pm erro padrão da média de n experimentos e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle para $p < 0,05$ (*). O "N" indica o número total de medidas de potenciais de membrana de "n" experimentos realizados.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Vários trabalhos reportam o envolvimento dos canais de cloreto na contração induzida por agonistas e na regulação do volume celular em músculo liso vascular. A idéia central de nosso trabalho teve início com os trabalhos de Criddle *et al.* (1996) onde descreveram, pela primeira vez, uma possível seqüência de eventos envolvendo os canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular ($Cl_{(Ca)}$) e a ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) que levariam à contração do músculo liso. Subseqüentemente, uma segunda questão importante observada por Criddle *et al.* (1997) foi que as respostas pressoras induzidas pela 5-HT foram mais sensíveis do que aquelas induzidas pela noradrenalina aos efeitos inibitórios do ácido niflúmico (NFA), o mais seletivo dos bloqueadores das correntes de cloreto ativadas pelo cálcio intracelular ($ICl_{(Ca)}$) (Large & Wang, 1996). Adicionalmente, estudos mais recentes mostram que outros bloqueadores das correntes de cloreto, como por exemplo, o tamoxifeno (TAM) e o ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico (DIDS), foram mais eficientes em inibir um outro tipo de corrente de cloreto ativada pelo volume celular (I_{SWELL}), as quais possuem propriedades farmacológicas bem distintas das $ICl_{(Ca)}$ e são insensíveis aos efeitos inibitórios do NFA em células isoladas de veia porta de coelhos (Greenwood & Large, 1998). Essas informações sugerem um possível papel fisiológico destas correntes de cloreto em muitos mecanismos fisiológicos, principalmente, na despolarização da membrana onde levaria à contração do músculo liso. Entretanto, várias das evidências sobre esses dois tipos de correntes decorrem de estudos em músculo liso vascular, mas, em tecido não vascular, há pouca informação sobre seus possíveis papéis fisiológicos. Portanto, considerando a grande sensibilidade da 5-HT ao NFA e a escassez de informação sobre as correntes de cloreto em tecido não vascular, o presente estudo avaliou o envolvimento funcional dos canais de cloreto ativados pelo cálcio ($Cl_{(Ca)}$) e pelo volume celular (I_{SWELL}) em músculo

liso longitudinal de fundo de estômago de rato, um tipo de tecido não vascular visceral, classicamente, utilizado nas investigações dos efeitos da 5-HT (Vane, 1957).

4.1 CANAIS DE CLORETO ATIVADOS CÁLCIO INTRACELULAR ($Cl_{(Ca)}$)

4.1.1 Efeitos do ácido niflúmico e da nifedipina sobre as contrações induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina, prostaglandina- $F_{2\alpha}$ e cloreto de potássio

O ácido niflúmico (NFA) e demais derivados do ácido N-arilantranílico, são genericamente conhecido como fenamatos, uma classe de drogas antiinflamatórias não esteroidais que bloqueiam o metabolismo do ácido araquidônico pela inibição da enzima cicloxigenase (Egan *et al.*, 1978; Boschelli *et al.*, 1993). Vários trabalhos reportam seus efeitos antiinflamatórios em situações clínicas como, por exemplo, no tratamento de pacientes com osteoartrite digital (Treves *et al.*, 1995), em pacientes submetidos à cirurgia plástica, onde o NFA modificou a resposta de fase aguda, especialmente, aos níveis de proteína de fase aguda (Bienvenu *et al.*, 1985) e no tratamento de patologias agudas das vias aéreas, nas quais o morniflumato, outro fenamato, mostrou efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios (Girbino *et al.*, 1990; Marchioni *et al.*, 1990). Embora a atividade biológica desse grupo de medicamentos tenha sido descoberta na década de 50, os fenamatos não obtiveram boa aceitação clínica. Terapeuticamente, eles não apresentam quaisquer vantagens sobre as outras drogas antiinflamatórias e podem, em alguns casos, causar efeitos colaterais como a hipersensibilidade (Fernandez-Rivas *et al.*, 1993) e diarreia. Desde que os fenamatos inibam a enzima cicloxigenase e reduzam tanto as respostas contráteis induzidas pela noradrenalina em aorta de rato (Cridde *et al.*, 1996) quanto as $ICl_{(Ca)}$ evocadas por agonistas (Hogg *et al.*, 1994a), um estudo recente em músculo liso de aorta de rato mostrou que a indometacina, um potente inibidor da cicloxigenase, não alterou as respostas contráteis induzidas pela

noradrenalina (Lamb & Barna, 1998b), sugerindo que os efeitos inibitórios dos fenamatos sobre as contrações induzidas pela noradrenalina ocorram, independentemente, dos efeitos inibitórios sobre a cicloxigenase. Portanto, como o NFA possui potentes efeitos inibitórios sobre as correntes de cloreto ativadas pelo cálcio intracelular ($ICl_{(Ca)}$), ele tem sido o principal composto, desta classe de drogas, utilizado como ferramenta farmacológica nas investigações sobre o envolvimento dos canais de cloreto na fisiologia do músculo liso.

O crescente interesse em conhecer as propriedades das correntes de cloreto ativadas pelo cálcio intracelular ($ICl_{(Ca)}$) advém das evidências de seu envolvimento na contratilidade induzida por agonistas em músculo liso (Large & Wang, 1996). A falta de agentes bloqueadores seletivos dessas correntes tem retardado as investigações sistemáticas para a elucidação do seu possível papel fisiológico. Entretanto, dentre os vários clássicos bloqueadores das $ICl_{(Ca)}$, o ácido niflúmico (NFA), em concentrações adequadas, parece ter maior seletividade e desponta como a principal ferramenta farmacológica para os estudos das $ICl_{(Ca)}$ na eletrofisiologia e contratilidade do músculo liso. Os resultados do presente trabalho sugerem que os $Cl_{(Ca)}$ estejam envolvidos com maior ou menor relevância nos mecanismos contráteis induzidos por agonistas como a 5-HT, ACh e $PGF_{2\alpha}$ em músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato.

Os nossos resultados mostram que NFA exerce potentes efeitos inibitórios seletivos, reversíveis e dependentes de concentração sobre as contrações induzidas pela 5-HT. Esses efeitos ocorreram em concentrações suficientes para inibir as $ICl_{(Ca)}$, como previamente reportadas em vários tipos de células de músculo liso como, por exemplo, em cultura de células de tecido vacular (Pacaud *et al.*, 1989a), em miócitos de traquéia de cães e cobaias (Janssen & Sims, 1992), em esôfago de coelhos (Akbarali & Giles, 1993) e em veia porta de coelhos (Hogg *et al.*, 1994a). Em contraste, as respostas

contráteis induzidas pela ACh em fundo isolado de estômago de rato foram insensíveis ao NFA, similarmente, aos resultados obtidos em traquéia isolada de rato (Teixeira *et al.*, 2000), enquanto a resposta da $PGF_{2\alpha}$ foi inibida em menor proporção. A taquifilaxia ou dessensibilização é um fenômeno biológico onde o efeito produzido por uma droga pode diminuir, gradualmente, ao longo do tempo após exposições sucessivas à mesma. Desde que nos experimentos controles pareados na ausência de NFA a resposta da 5-HT não diminuiu ao longo do período experimental, isto sugere que a redução da resposta induzida pela 5-HT foi devido aos efeitos inibitórios do NFA e não pela taquifilaxia. Adicionalmente, a amplitude da contração controle foi recuperada no final do período experimental.

Recentemente, um estudo detalhado em miócitos de artéria pulmonar de rato mostrou que concentrações micromolares de NFA (10-50 μ M) inibiram as $ICl_{(Ca)}$, reduzindo tanto a despolarização quanto a contração induzida pela 5-HT, sugerindo que esta corrente de cloreto contribuiria para a vasoconstrição induzida por agonista despolarizando a membrana celular. Além disso, em meio zero-cálcio, o ácido niflúmico não modificou a liberação do cálcio intracelular induzido pela 5-HT (Yuan, 1997) e nem reduziu as contrações induzidas pela noradrenalina e 5-hidroxitriptamina em aorta e leito mesentérico isolados de rato, respectivamente (Criddle *et al.*, 1996, 1997), sugerindo ser pouco provável o envolvimento do NFA na mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. Adicionalmente, desde que o NFA reduza as respostas contráteis induzidas por drogas como a noradrenalina (Criddle *et al.*, 1996, 1997), 5-hidroxitriptamina (Yuan, 1997; Teixeira *et al.*, 2000) e iniba as correntes iônicas induzidas pela endotelina-1 (Hyvelin *et al.*, 1998), angiotensina II, cafeína e ATP (Guibert *et al.*, 1997), isto reforça que o seu efeito não ocorra ao nível de receptores específicos, mas atua bloqueando um mecanismo que seja comum às respostas induzidas pelos agonistas.

Vários trabalhos mostram que substâncias excitatórias despolarizam a membrana celular pela ativação de canais catiônicos não seletivos, ativação de canais de cloreto ou pela supressão de canais de potássio (Benham *et al.*, 1985; Byrne & Large, 1987a,b; White & Aylwin, 1990; Loirand *et al.*, 1991; Pacaud *et al.*, 1991; Janssen & Sims, 1992; Greenwood & Large, 1995; Hatakeyama *et al.*, 1995; Large & Wang, 1996; Yuan, 1997), aumentando a probabilidade de abrir os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) permitindo influxo de cálcio e contração do músculo liso. Desde que o NFA bloqueie, seletivamente, a condutância de cloreto pela inibição dos $Cl_{(Ca)}$, aqueles agonistas que exercerem seus efeitos, principalmente, pela ativação de mecanismos que envolvam as correntes de cloreto, possivelmente, serão mais susceptíveis aos efeitos inibitórios do NFA.

O músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato expressa, ricamente, o subtipo de receptor 5-HT_{2B}, sugerindo que seja o principal mediador das contrações induzidas pela 5-HT neste tecido (Foguet *et al.*, 1992; Wainscott *et al.*, 1993, 1996; Baxter *et al.*, 1994; Hoyer *et al.*, 1994; Kursar *et al.*, 1994; Cox & Cohen, 1995a, 1996), levando a ativação das $ICl_{(Ca)}$. Entretanto, o mecanismo de transdução e sinalização intracelular envolvido na ativação dos receptores 5-HT_{2B} permanece desconhecido, mas parece haver consenso de que o mecanismo de sinalização e contração do músculo liso ativado pela estimulação dos receptores 5-HT_{2B} seja dependente, principalmente, do influxo de cálcio via VDCC (Secretest *et al.*, 1989; Smaili *et al.*, 1991; ver introdução). Clonagens dos receptores 5-HT_{2B} de fundo de estômago de rato e, subseqüentemente, indução de sua expressão e estimulação pela 5-HT (10 μ M) em oócitos de *Xenopus laevis* mostraram que eles estão diretamente ligados à ativação de canais de cloreto (Foguet *et al.*, 1992). Adicionalmente, estudo em células epiteliais de plexo coróide de rato também mostra que a 5-HT ativa uma condutância seletiva ao cloreto (Garner *et al.*, 1993). Essa aparente relação farmacológica dos receptores 5-HT_{2B} com a ativação dos $Cl_{(Ca)}$ parece fazer a diferença entre o seu mecanismo de ação

com aqueles induzidos pela ACh e $\text{PGF}_{2\alpha}$. Alguns estudos deixam evidências fundamentais que permitem discutir possíveis diferenças de sensibilidade ao NFA entre os agonistas avaliados na presente pesquisa.

Por exemplo, um estudo em fundo de estômago de rato mostra que a resposta contrátil induzida pela carbamilcolina, um análogo estrutural da ACh, induziu liberação de trifosfato de inositol (IP_3), o que não ocorre com as respostas induzidas pela 5-HT e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Secrest *et al.*, 1989). Neste mesmo estudo, a carbamilcolina foi bem menos sensível aos inibidores dos VDCC do que a 5-HT e $\text{PGF}_{2\alpha}$. Semelhantemente, as respostas induzidas pela 5-HT foram inibidas pela remoção do cálcio extracelular, enquanto aquelas induzidas pelo carbacol não foram, significativamente, alteradas (Smaili *et al.*, 1991), sugerindo que o cálcio extracelular e o intracelular sejam prioritários para os efeitos contráteis induzidos pela 5-HT e ACh, respectivamente. Adicionalmente, a ativação de receptores muscarínicos leva à ativação de canais catiônicos não seletivos (Ito *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993), uma via de influxo de cálcio diferente dos VDCC, mas também ativa uma condutância de cloreto em miócitos de traquéia de cobaio (Janssen & Sims, 1992), esta corrente foi, possivelmente, ativada pelo aumento da concentração de cálcio intracelular. Diferentemente da ACh e 5-HT, os efeitos contráteis induzidos pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ envolvem a ativação de duas proteínas quinases, a PKC_α e a PKC_ϵ , as quais são dependentes e independentes de cálcio, respectivamente (Kanashiro & Khalil, 1998), além disso não ativam a hidrólise do fostatidilinositol da membrana para geração de IP_3 e liberação do cálcio dos estoques intracelulares (Heaslip & Sickels, 1989; Secrest *et al.*, 1989).

No presente trabalho, o NFA inibiu as respostas induzidas pela 5-HT e, em menor proporção, pela $\text{PGF}_{2\alpha}$, mas não afetou aquelas induzidas pela ACh. Isto sugere que a ACh e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ativem mecanismos pouco ou insensíveis aos efeitos do NFA, diferentemente, daqueles ativados pela 5-HT. Desde que os três agonistas induzam contrações por mecanismos

completamente distintos, é possível especular que a diferença de sensibilidade ao NFA esteja, principalmente, no mecanismo de ativação ou geração de segundos mensageiros. Ao que nos parece, a geração de IP_3 e a ativação dos canais catiônicos não seletivos pela ACh seriam os principais responsáveis pela sua resistência aos efeitos do NFA. Por outro lado, há evidências de que a 5-HT e as $PGF_{2\alpha}$ ativem a PKC (Secrest *et al.*, 1990; Kanashiro & Khalil, 1998). Assim, desde que a PKC se desloque para uma região próxima dos canais de cálcio da membrana celular em músculo liso vascular, é possível que a atividade da PKC_{α} tenha relação com a entrada de cálcio extracelular (Kanashiro & Khalil, 1998), embora este mecanismo não esteja completamente elucidado sendo, possivelmente, resistente aos efeitos aos efeitos do NFA. Além disso, desde que a ativação da PKC_{ϵ} produza contração independente do cálcio, isto pode contribuir para a menor sensibilidade da $PGF_{2\alpha}$ aos efeitos da remoção do cálcio extracelular e parte do efeito contrátil residual induzido pela 5-HT inafetado pelo NFA. Como permanece obscuro o mecanismo de transdução de sinais induzido pela ativação dos receptores $5-HT_{2B}$, não se pode descartar a possibilidade de que haja um mecanismo desconhecido que ligue a ativação dos receptores $5-HT_{2B}$ com os canais de $Cl_{(Ca)}$ que justifique a maior sensibilidade da 5-HT ao NFA. Portanto, desde que os três agonistas induzam contrações por mecanismos distintos, os nossos resultados sugerem que a ativação dos $Cl_{(Ca)}$ seja de maior importância funcional para as respostas induzidas pela 5-HT em fundo de estômago de rato, compatível com a seletividade inibitória do ácido niflúmico.

A utilização de NFA em concentrações acima de $50\mu M$, portanto, acima daquelas utilizadas na maioria dos experimentos do presente estudo ($\leq 30\mu M$), mostra efeitos não seletivos inibindo os VDCC, ativando canais de potássio em veia porta de coelho e de rato (Hogg *et al.*, 1994a) e ativando canais de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) em veia porta de rato (Kirkup *et al.*, 1996a).

Em fundo de estômago de rato, concentrações iguais ou inferiores a $30\mu\text{M}$ de NFA não inibiram as contrações induzidas por 20 e 60mM de KCl, similarmente, aos estudos previamente realizados em aorta de rato (Criddle *et al.*, 1996), em leito mesentérico vascular (Criddle *et al.*, 1997), em intestino de coelho (Patacchini *et al.*, 1996) e em artéria pulmonar de rato (Yuan, 1997). Desde que as contrações induzidas pelo KCl dependam, exclusivamente, do influxo de cálcio extracelular, nossos resultados indicam que o NFA, nesta faixa de concentração, não interage com os VDCC e nem com os canais de potássio. Em contraste à falta de efeitos inibitórios do NFA, a nifedipina ($1\mu\text{M}$), um seletivo bloqueador de VDCC, e a levcromacalina ($3\mu\text{M}$), um ativador de canais de potássio, aboliram completamente as contrações induzidas por 60 e 20 mM de KCl, respectivamente.

As informações presentes indicam que a magnitude dos efeitos inibitórios do NFA ($30\mu\text{M}$) sobre as contrações induzidas pela 5-HT em fundo de estômago de rato foi de, aproximadamente, 85%, um efeito mais potente do que aqueles previamente encontrados em leito mesentérico vascular ($\sim 50\%$ com $30\mu\text{M}$; Criddle *et al.*, 1997) e em artéria pulmonar ($\sim 55\%$ com $50\mu\text{M}$; Yuan, 1997). Isto pode refletir que a ativação dos $\text{Cl}_{(\text{Ca})}$ tenha maior relevância fisiológica no processo de contração induzido pela 5-HT em fundo de estômago de rato quando comparados aos efeitos produzidos em músculo liso destes vasos sanguíneos, possivelmente, em consequência da presença de diferentes subtipos de receptores nesses tecidos (Humphrey *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994). De acordo com os resultados de estudos anteriores em artérias mesentéricas (Criddle *et al.*, 1997), as contrações induzidas pela 5-HT em fundo de estômago de rato foram inibidas na mesma proporção pela nifedipina, um bloqueador dos VDCC, um efeito de similar magnitude àqueles produzidos pela nitrendipina e isradipina no mesmo tipo de tecido (Secrest *et al.*, 1989; Smaili *et al.*, 1991). Desde que os efeitos inibitórios da nifedipina e do NFA não foram aditivos em fundo de estômago de rato, isto sustenta a

hipótese de que a ativação dos canais de cloreto ativados pelo cálcio intracelular (Cl_{Ca}) leva à despolarização da membrana e, conseqüentemente, abertura dos VDCC, influxo de cálcio e contração do músculo liso (Criddle *et al.*, 1996). Esta hipótese é, claramente, apoiada pelos resultados de um estudo em artéria basilar de coelho onde a nifedipina inibiu a contração, mas não a despolarização, induzida pela 5-HT neste tecido (Clark & Garland, 1993). Adicionalmente, os registros eletrofisiológicos em artéria pulmonar de rato, mostram que a corrente sensível ao NFA não foi afetada pela remoção do cálcio extracelular (Hyvelin *et al.*, 1998). Ainda em artéria pulmonar de rato, estudos reportam que os graus de inibição do NFA e da nifedipina foram similares sobre as contrações induzidas por agonistas como a angiotensina-II e endotelina-1 (Guibert *et al.*, 1997; Hyvelin *et al.*, 1998), embora seja digno de nota que, no mesmo tipo de tecido, a inibição induzida pelo NFA sobre as respostas contráteis induzidas pela endotelina-1, possa ocorrer independentemente do bloqueio dos canais de cloreto (Kato *et al.*, 1999). Entretanto, no presente estudo, embora a nifedipina e o NFA tenham bloqueado a resposta induzida pela 5-HT em proporções similares em fundo de estômago de rato, o padrão da resposta sob os efeitos dessas drogas foram, fundamentalmente, diferentes. Por exemplo, o componente oscilatório da contração induzida pela 5-HT persistiu enquanto a contração tônica foi, substancialmente, reduzida pelo NFA e ambas as respostas foram completamente abolidas pela nifedipina.

Em contraste à grande sensibilidade das contrações induzidas pela 5-HT ao NFA ($30\mu\text{M}$), as respostas induzidas pela acetilcolina (ACh) não foram inibidas mesmo na presença de elevadas concentrações de NFA ($100\mu\text{M}$). Esta falta de efeito inibitório do NFA foi compartilhado com o efeito menos potente da nifedipina sobre a ACh e $\text{PGF}_{2\alpha}$, semelhantemente aos resultados reportados em fundo de estômago de rato utilizando outros bloqueadores dos VDCC (Secrest *et al.*, 1989; Smaili *et al.*, 1991).

Substituindo o cloreto extracelular pelos íons gluconato, a contração induzida pela ACh exibiu pouca dependência do gradiente de cloreto, contrastando com a resposta induzida pela 5-HT que foi, sensivelmente, reduzida. Estas informações sustentam o argumento de que existe pouco ou nenhum envolvimento das $ICl_{(Ca)}$ nas contrações induzidas pela ACh em fundo de estômago de rato. Enquanto parece não existir qualquer estudo publicado examinando esta possibilidade em fundo de estômago de rato, certas evidências em outros tipos de músculos lisos do trato gastrointestinal são condizentes com esta hipótese. Por exemplo, em íleo isolado, a despolarização induzida pelo carbacol foi bem menos afetada pelas reduções do cloreto extracelular, substituído pelo benzenosulfonato, do que pelas reduções dos íons sódio (Bolton, 1972). Adicionalmente, a contração induzida pela ACh em músculo liso de estômago de cães (Sims, 1992) e a despolarização pelo carbacol e ACh em jejuno de coelho (Benham *et al.*, 1985) e em músculo longitudinal de íleo de cobaio (Inoue & Isenberg, 1990b), respectivamente, parecem ser mediada via ativação de canais catiônicos não seletivos, uma via, aparentemente, independente dos VDCC para o influxo de cálcio. Portanto, nossas informações são condizentes com os achados na literatura, sugerindo que a ativação das $ICl_{(Ca)}$ seja um mecanismo prioritário na contração induzida pela 5-HT que leva ao influxo de cálcio via VDCC, mas não pela ACh.

Nos experimentos em meio isento de cloreto (TN-0Cl), imediatamente após as lavagens com TN-0Cl observamos uma contração transitória que logo voltou a linha basal que, possivelmente, não foi decorrente do fluxo de cloreto em função de sua baixa permeabilidade em músculo liso. Neste tipo de tecido a permeabilidade dos íons potássio (P_K), sódio (P_{Na}) e cloreto (P_{Cl}) estão na proporção de 1 : 0,14 : 0,19, sendo que a permeabilidade absoluta do potássio é de $1,61 \cdot 10^{-8}$ cm/s (Chipperfield & Harper, 2000), uma situação completamente diferente do tecido muscular esquelético onde a permeabilidade do cloreto é extremamente alta e importante no

restabelecimento do potencial de membrana. Por exemplo, em músculo esquelético de sapo onde a P_{Cl} é alta, redução na concentração de cloreto extracelular de 120 para 30mM provoca uma despolarização transitória de aproximadamente 20mV, causada pela saída de cloreto em busca de seu equilíbrio, evidentemente, uma corrente despolarizante (Hodgkin & Horowicz, 1959). Em seguida, pelo equilíbrio de Donnan, o potencial de membrana é restaurado sob baixas concentrações intracelulares de cloreto. Em contraste, em músculo liso, a despolarização transitória pela redução do cloreto extracelular é baixíssima ou inexistente, indicando ausência de fluxo de cloreto pela sua baixa permeabilidade neste tipo de tecido (Aickin & Brading, 1982; Hirst & Van Helden, 1982). Inversamente, a alteração no potencial de membrana não altera a concentração intracelular de cloreto, isto é, despolarização de 23 mV em canal deferente de cobaio pelo aumento de potássio extracelular, não afetou a atividade do cloreto (Aickin & Brading, 1983). Interessantemente, seguindo um raciocínio indireto, uma outra evidência citada por (Chipperfield & Harper, 2000), é que quando o sódio foi substituído pelo potássio houve discreto aumento no volume celular. Isto indica que a entrada de potássio estava favorecida pelo aumento no meio extracelular, mas foi impedido pela baixa permeabilidade do cloreto, de modo que não houve entrada de KCl para o meio intracelular e, conseqüentemente, a água não se deslocou osmoticamente. Portanto, as informações sugerem que o cloreto não esteja envolvido na contração transitória induzida pela solução 0Cl devido a sua baixa permeabilidade em músculo liso, entretanto, em fundo de estômago de rato parece não existir estudos conclusivos indicando o envolvimento ou não do cloreto.

Na presente pesquisa, o NFA figura como nossa principal ferramenta farmacológica. Entretanto, dentre suas propriedades farmacológicas já descritas, três considerações importantes devem ser feitas quanto aos seus efeitos. Primeiro, o NFA não inibiu a contração induzida pela 5-HT em meio zero-cálcio em leito mesentérico vascular e artéria pulmonar de rato (Criddle

et al., 1997; Yuan, 1997). Segunda, estudos em miócitos de artéria pulmonar de rato mostram que o NFA não interfere na liberação de cálcio dos estoques intracelular induzido pela 5-HT (Yuan, 1997). Terceira, que a corrente de cloreto sensível ao NFA não foi afetada pela ausência de cálcio extracelular (Hyvelin & Guibert, 1998). Conjuntamente, as três situações sugerem que o NFA não interage com os receptores da serotonina em fundo de estômago de rato e que a ativação dos $Cl_{(Ca)}$ ocorre pelo cálcio liberado dos estoques intracelulares.

Experimentos na ausência de cálcio extracelular (TN-0Ca), mostraram que as respostas induzidas pela 5-HT, ACh e $PGF_{2\alpha}$ foram, sensivelmente, reduzidas, indicando que a resposta contrátil do músculo liso está, em última instância, ligado ao influxo do cálcio extracelular e/ou mobilização do cálcio intracelular. Desde que a resposta induzida pela ACh mostrou pouca sensibilidade aos efeitos inibitórios da nifedipina, isto sustenta a idéia de que o influxo de cálcio ocorra por uma via diferente da ativação dos VDCC, possivelmente, através dos canais catiônicos não seletivos (Chen *et al.*, 1993). De forma semelhante, as contrações induzidas em fundo de estômago de rato pela carbamilcolina, um composto análogo a ACh, foram, fracamente, inibidas pelo diltiazem e nitrendipina, os quais também bloqueiam os VDCC (Secrest *et al.*, 1989), apoiando os nossos resultados.

A hidrólise do fosfatidilinositol é um mecanismo de geração de segundo mensageiro ativado por muitos hormônios e neurotransmissores. Por exemplo, a interação de agonistas colinérgicos com os receptores muscarínicos produz trifosfato de inositol (IP_3) que leva à liberação de cálcio dos estoques intracelulares em vários tipos de tecidos (Downes, 1982; Baron *et al.*, 1984; Best *et al.*, 1985; Marc *et al.*, 1986). Similarmente, ocorre liberação de IP_3 pela interação da $PGF_{2\alpha}$ com seus receptores em tecidos como aorta de rato (Suba & Roth, 1987) e músculo papilar ventricular esquerdo de rato (Otani *et al.*, 1988) e com a 5-HT em músculo liso de aorta,

útero e veia jugular de rato, mas não de traquéia (Cohen & Wittenauer, 1987), em plaquetas de coelhos (Schachter *et al.*, 1985) e músculo liso vascular aorta torácica (Roth *et al.*, 1984). Entretanto, estudo em fundo de estômago de rato mostra que a ACh, mas não a 5-HT e nem a $\text{PGF}_{2\alpha}$, induz a geração trifosfato de inositol (IP_3) como segundo mensageiro, sugerindo maior mobilização do cálcio intracelular nas contrações induzidas pela ACh do que pela 5-HT (Cohen & Wittenauer, 1987; Secrest *et al.*, 1989). Assim, o fato de uma mesma substância ativar determinado sistema de segundo mensageiro em um tipo de tecido não pode ser extrapolado para outro. Fisiologicamente, as características teciduais podem justificar a expressão de diferentes subtipos de receptores para uma mesma substância endógena, indicando que que tal substância poderá ativar mecanismos distintos de acordo com o tipo de receptor presente no tecido alvo. Em particular, é possível que isto ocorra em fundo de estômago de rato onde, abundantemente, expressa receptores tipo 5-HT_{2B} cujo mecanismo de sinalização intracelular permanece desconhecido. Portanto, é possível que a estimulação desse tipo de receptor esteja acoplada à ativação dos $\text{Cl}_{(\text{Ca})}$, suscitando novas investigações quanto a sua relevância fisiológica no estômago.

4.1.2 Efeitos do DCDPC e do DIDS sobre as respostas induzidas pela 5-hidroxitriptamina, acetilcolina e cloreto de potássio

Além do ácido niflúmico, avaliamos os efeitos de outros clássicos inibidores dos canais de cloreto ativados pelo cálcio ($\text{Cl}_{(\text{Ca})}$), DCDPC e DIDS, sobre as respostas contráteis induzidas pela 5-HT, ACh e KCl. Ambas as drogas proveram menor seletividade inibitória do que o ácido niflúmico.

Embora o DCDPC, um análogo estrutural do ácido niflúmico, tenha reduzido as contrações induzidas pela 5-HT para, aproximadamente, 18% do controle, um valor equivalente aos efeitos inibitórios de $30\mu\text{M}$ de NFA, ele também inibiu as contrações induzidas pela ACh e pelo KCl na mesma faixa de concentração ($1\text{-}30\mu\text{M}$) na qual o NFA não mostrou qualquer efeito. Isto

indica que o perfil inibitório do DCDPC foi bem diferente daquele exibido pelo NFA. De fato, estudo em células isoladas de veia porta de coelhos mostra que o DCDPC inibe, com similar potência, as $ICl_{(Ca)}$ e ativa a condutância de potássio em baixas concentrações (Greenwood & Large, 1997; Jagger & Ashmore, 1998). Além disso, em concentrações similares, o DCDPC inibiu canais catiônicos são seletivos em músculo liso de íleo de cobaio (Chen *et al.*, 1993) e em músculo liso respiratório (Janssen & Sims, 1992), um mecanismo ativado por agonistas colinérgicos como carbacol e acetilcolina via receptores muscarínicos (Benham *et al.*, 1985; Inoue & Isenberg, 1990a,b; Sims, 1992; Inoue & Chen, 1993). Portanto, os efeitos inibitórios observados em nossos estudos sobre as contrações induzidas pela ACh e pelo KCl podem estar relacionados aos efeitos inespecíficos do DCDPC em afetar outras condutâncias além das $ICl_{(Ca)}$, o que não foi observado com o NFA na mesma faixa de concentração ($\leq 30\mu M$). Desde que o NFA não tenha qualquer efeito inibitório sobre as contrações induzidas pela ACh e que a substituição do cloreto pelo gluconato (0Cl-GLU) tenha tido um efeito inibitório bem menor sobre a ACh do que sobre a 5-HT, é possível que os efeitos inibitórios do DCDPC sobre essas contrações ACh tenha ocorrido, principalmente, pelas suas ações inibitórias sobre os canais catiônicos não seletivos e/ou ativação da condutância do potássio. Portanto, nossos resultados sugerem ser pouco provável o envolvimento das $ICl_{(Ca)}$ na contração induzida pela ACh em fundo de estômago de rato.

O DIDS, um outro bloqueador de canais de cloreto, estruturalmente, distinto do NFA, um derivado stilbeno, exibiu um perfil muito diferente do NFA e do DCDPC, deprimindo, preferentemente, as contrações induzidas pelo KCl e inibindo, fracamente, os efeitos induzidos pela 5-HT nas concentrações de 30 e $300\mu M$, respectivamente, enquanto as respostas contráteis induzidas pela ACh permaneceram inalteradas. Recentemente, um estudo em células isoladas de veia porta de coelhos sugere que o DIDS seja muito mais ativo em suprimir as correntes de cloreto ativadas pelo volume celular (I_{SWELL}) do

que sobre as $ICl_{(Ca)}$ (Greenwood & Large, 1998), o mesmo ocorrendo em cultura de células endoteliais cerebrais de ratos (Von Weikersthal *et al.*, 1999). Desde que o trocador Cl^-/HCO_3^- seja um dos principais mecanismos ativados na regulação do volume celular (Hoffmann & Dunham, 1995) e que seja sensível ao DIDS (Aickin & Vermue, 1983; Aickin & Brading, 1984; Chipperfield & Harper, 2000), isto suporta a sua maior eficiência inibitória do DIDS sobre as correntes ativadas por volume celular e, possivelmente, baixa atividade sobre as $IC_{(Ca)}$. Essas informações são condizentes com os nossos resultados, onde o DIDS não teve qualquer efeito sobre as contrações induzidas pela 5-HT, mesmo em concentrações bem superiores àquelas onde o NFA mostrou potente efeito inibitório. Embora o NFA e DIDS sejam clássicos bloqueadores dos canais de cloreto, suas afinidades parecem ser para condutâncias diferentes de cloreto. Desde que o DIDS não interfira nas respostas induzidas pela ACh, é possível especular que ele tenha pouca ou nenhuma influência sobre canais catiônicos não seletivos nas concentrações utilizadas neste estudo ($\leq 300\mu M$), mas parece não existir na literatura qualquer estudo que elimine esta possibilidade. Entretanto, as pesquisas eletrofisiológicas em células isoladas de fundo de estômago de rato são imperiosas para elucidar esta marcante diferença entre os efeitos dos bloqueadores de canais de cloreto utilizados no presente estudo funcional.

Portanto, dentre os bloqueadores de canais de cloreto utilizados no presente estudo o NFA mostrou maior seletividade, sugerindo ser uma ferramenta farmacológica adequada para os estudos funcionais dos $Cl_{(Ca)}$ em músculo liso longitudinal de fundo de estômago de rato.

4.2 CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO VOLUME CELULAR (Cl_{SWELL})

A ativação dos canais de cloreto regulados pelo volume celular é completamente diferente dos outros canais de cloreto. Eles não são ativados por ligantes como aqueles operados pelo GABA e glicina no sistema nervoso

central, não são modulados por voltagem, pelo cálcio intracelular e nem 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e são diferentes daqueles envolvidos na secreção de cloreto na fibrose cística.

As correntes de cloreto ativadas pelo volume celular (I_{SWELL}) (Nilius *et al.*, 1994, 1996; Greenwood & Large, 1998) juntamente com aquelas ativadas pelo cálcio intracelular ($ICl_{(\text{Ca})}$) (Pacaud *et al.*, 1989a, 1992; Lamb *et al.*, 1994; Leblanc & Leung, 1995; Clapp *et al.*, 1996; Large & Wang, 1996) constituem as duas importantes correntes de cloreto envolvidas na fisiologia do músculo liso. Entretanto, como os estudos sobre as correntes de cloretos sensíveis ao aumento do volume celular são uma área, relativamente, recente e pouco pesquisada, não temos ainda uma padronização quanto a uma nomenclatura universal para a designação deste tipo de corrente. Por exemplo, as correntes I_{SWELL} são também conhecidas como Cl_{VRAC} (canal iônico regulado pelo volume: "volume-regulated anion channel"), Cl_{VSOR} (retificador para fora sensível ao volume: "volume-sensitive outward rectifier") e $I_{\text{Cl,VOL}}$ (correntes de cloreto ativadas pelo volume: "volume-activated Cl^- currents"), dificultando a linguagem científica e pode confundir o câmbio de informações neste setor da pesquisa. Portanto, o presente trabalho fará referências às "correntes de cloreto ativadas pelo aumento do volume celular" utilizando a designação " I_{SWELL} " adotada no trabalho de Greenwood & Large (1998).

As I_{SWELL} foram reportadas em vários tipos de células (Okada, 1997) e estão envolvidas em uma variedade de funções celulares (Lambert & Hoffmann, 1993; Lang *et al.*, 1993; Nilius *et al.*, 1994, 1996;), mas apenas recentemente esta condutância teve suas propriedades bem caracterizadas em músculo liso vascular de veia porta de coelho (Greenwood & Large, 1998), mas se estas propriedades se estendem para âmbito de outros tipos de músculos lisos não-vasculares ainda permanece obscuro.

A presente pesquisa mostra que o ácido niflúmico (NFA, $30\mu\text{M}$), um bloqueador seletivo para as $ICl_{(\text{Ca})}$, produziu efeitos inibitórios reversíveis e

dependentes de concentração sobre as contrações induzidas pela solução hipotônica (SH) em fundo de estômago de rato, reduzindo a respostas para, aproximadamente, 53% do controle. Esta faixa de concentração foi a mesma necessária para inibir as correntes de cloreto ativadas pelo cálcio intracelular ($I_{Cl(Ca)}$) como discutida anteriormente e previamente reportadas em vários outros tipos de músculo liso (Pacaud *et al.*, 1989a; White & Aylwin, 1990; Janssen & Sims, 1992; Akbarali & Giles, 1993; Hogg *et al.*, 1994a; Large & Wang, 1996). Entretanto, as correntes induzidas pela hipotonicidade parecem ser, fisiológica e farmacologicamente, diferentes de acordo com o tipo de músculo liso. Por exemplo, estudo em veia porta de coelho mostrou que as I_{SWELL} foram sensíveis aos efeitos de baixas concentrações de tamoxifeno, uma droga anti-estrogênica, ao DIDS, um derivado stilbeno, mas foi sensível ao ácido niflúmico (NFA) apenas em altas concentrações ($IC_{50} = 100\mu M$) (Greenwood & Large, 1998). Porém, nesta faixa de concentração o NFA ($100\mu M$) perde muito de sua seletividade por afetar outras condutâncias como a ativação de canais de potássio e inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem (Hogg *et al.*, 1994a; Greenwood & Large, 1995; Kirkup *et al.*, 1996a), sugerindo que o seu efeito inibitório tenha sido alheio à inibição das I_{SWELL} neste tecido. Adicionalmente, a aplicação de 17β -estradiol, um antagonista estrogênico, não afetou os efeitos inibitórios do tamoxifeno sobre as I_{SWELL} , indicando que a ação dessa droga não envolve os receptores estrogênicos (Greenwood & Large, 1998) e, além disso, a inibição das I_{SWELL} pelo tamoxifeno tem sido reportada em vários outros tipos de células (Okada, 1997). Mesmo que tenha sido eficiente em inibir as I_{SWELL} em miócitos de veia porta, o DIDS e outros clássicos bloqueadores de canais de cloreto como SITS e 9-AC possuem baixa afinidade pelas I_{SWELL} (Nilius *et al.*, 1996). No presente estudo o tamoxifeno apresentou moderados efeitos inibitórios em concentrações de $100\mu M$, reduzindo a contração induzida pela SH para aproximadamente 59% do valor controle e o DIDS ($100\mu M$) potencializou estes efeitos aumentando as respostas à cerca de 41% do valor controle,

mostrando que os nossos resultados funcionais são bem diferentes daqueles mostrados, eletrofisiologicamente, em veia porta de coelho (Greenwood & Large, 1998). Entretanto, um estudo em miócitos gástricos de cobaias mostra resultados condizentes com os nossos, onde $10\mu\text{M}$ de NFA foram suficientes para inibir as I_{SWELL} (Xu *et al.*, 1997), sugerindo que as correntes induzidas pela SH possam ter um perfil farmacológico, em estômago de rato, diferente do que ocorre em músculo liso vascular. Ao que nos parece, é que várias substâncias podem afetar as I_{SWELL} mas o fazem com potências que variam, grandemente, de tecido para tecido, desde concentrações μM até mM. Assim, é possível especular que esta variabilidade seja pela existência de vários tipos de canais de cloreto sensíveis ao volume celular ou pela diversidade biológica de mecanismos de ativação presentes nos diversos tipos de células. Compostos como o NPPB, na concentração de $100\mu\text{M}$, inibiu quase que completamente as contrações induzidas pela SH em fundo de estômago de rato, mas também inibiu as I_{SWELL} em células epiteliais de sapo nesta mesma faixa de concentração (Nilius *et al.*, 1995). Entretanto, desde que o NPPB, mesmo em baixas concentrações, pareça não ter muita seletividade e pode inibir as correntes de cloreto e potássio ativadas pelo cálcio, bem como a liberação de cálcio dos estoques intracelulares (Kirkup *et al.*, 1996b), os dados aqui discutidos são insuficientes para quaisquer deduções de seus efeitos específicos sobre as I_{SWELL} , mas é possível que promova inibição das contrações induzidas pela SH pela atenuação de múltiplos processos.

É indiscutível a necessidade de cálcio na contração do músculo liso. Assim, desde que a SH induza contração, investigamos o envolvimento do cálcio extracelular e dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) neste mecanismo. É aceito que a atividade das I_{SWELL} seja independente de cálcio (Kubo & Okada, 1992) e o cloreto intracelular, por si só, controla a ativação dessa corrente (Strange, 1995), provavelmente, em função de seu acúmulo intracelular ocorrer em níveis superiores àqueles esperados de sua distribuição passiva (Chipperfield & Harper, 2000). Essa alta concentração

intracelular de cloreto gera grande força eletroquímica em favor de sua saída da célula. Considerando a hipótese do presente trabalho, onde “saída de cloreto despolarizaria a membrana levando à ativação dos VDCC e influxo de cálcio”, esta hipótese também poderia ser aplicada se a despolarização ocorresse pela saída de cloreto via ativação das I_{SWELL} que, semelhantemente, chegaria ao influxo de cálcio pela ativação dos VDCC. Neste caso, não haveria o envolvimento inicial da liberação do cálcio intracelular, como decorre dos efeitos de vários agonistas, que ativariam as $ICl_{(\text{Ca})}$. Assim sendo, os efeitos inibitórios do NFA podem ser sustentados por esta idéia. A remoção do cálcio extracelular aboliu completamente as contrações induzidas pela SH, mas isto não significa ausência de despolarização da membrana celular. Seria, aparentemente, um paradoxo dizer que as I_{SWELL} independem de cálcio se as contrações induzidas pela SH foram abolidas em meio zero-cálcio (SH-0Cl-GLU). De fato os nossos dados sugerem que as I_{SWELL} não dependem de cálcio, concordando com as informações de Kubo & Okada (1992). Desde que a nifedipina reduziu as contrações induzidas pela SH de maneira dependente de concentração, isto sugere o envolvimento dos VDCC neste mecanismo contrátil. Adicionalmente, os resultados eletrofisiológicos demonstram que a despolarização não foi afetada na presença de nifedipina ($1\mu\text{M}$). Interessantemente, a despolarização induzida pela SH deslocou o valor do potencial de membrana (E_m) para, aproximadamente, -12 mV , um valor que tendeu aproximar-se do valor estimado do potencial de equilíbrio do cloreto (E_{Cl}) na solução hipotônica ($E_{\text{Cl}} = -6\text{mV}$) (ver o cálculo estimativo do E_m no anexo B). Isto sugere que a corrente despolarizante induzida pela SH seria pela saída de cloreto, deslocando o valor do E_m para um valor capaz de ativar os VDCC e entrada de cálcio para o meio intracelular. Obviamente, o aumento da concentração intracelular de cálcio durante o aumento de volume celular induzido pela SH poderia disparar a ativação das $ICl_{(\text{Ca})}$ (Xu *et al.*, 1996), indicando o possível envolvimento das $ICl_{(\text{Ca})}$ neste mecanismo. Desde que o NFA seja o mais

seletivo dos inibidores das $ICl_{(Ca)}$, isto sugere que pelo menos parte do seu efeito inibitório sobre as contrações induzidas pela SH ocorra pela inibição das $ICl_{(Ca)}$, inibindo a despolarização e atenuando a ativação dos VDCC. Mas se o NFA possui outros efeitos inibitórios, além daqueles sobre as $ICl_{(Ca)}$, envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela hipotonicidade merece outras investigações. Entretanto, o trabalho de Xu *et al.*, (1997) mostra que o NFA possui efeitos inibitórios sobre as correntes induzidas pela hipotonicidade, onde eliminou a possibilidade de que as $ICl_{(Ca)}$ pudessem ser ativadas. Os nossos resultados mostram que a eficiência inibitória do NFA foi maior sobre as contrações induzidas por agonistas do que aquelas induzidas pelos SH. Especulativamente, talvez isto ocorra pelo fato de que apenas as $ICl_{(Ca)}$ estejam envolvidas nas contrações induzidas pelos agonistas, sobre as quais o NFA tem maior afinidade, enquanto nas contrações induzidas pela SH envolva também a ativação de outras condutâncias.

Finalmente, esperamos com este trabalho dar uma contribuição aos estudos dos canais de cloreto ativados pelo cálcio ($Cl_{(Ca)}$) e pelo aumento do volume celular (I_{SWELL}), talvez uma das pioneiras investigações em músculo liso não vascular, sugerindo que a ativação dos canais de cloreto possa ser uma recente e nova rota fisiológica ativada por substâncias endógenas biologicamente ativas, possivelmente, despontando como importante alvo no desenvolvimento de novas classes de drogas terapêuticas.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

5.1 SOBRE OS CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO CÁLCIO INTRACELULAR ($Cl_{(Ca)}$)

◆ O ácido niflúmico (NFA) exerce efeitos inibitórios seletivos sobre as contrações induzidas pela 5-HT, sugerindo que a ativação dos $Cl_{(Ca)}$ seja uma via, fisiologicamente, importante nas respostas contráteis induzidas pela 5-HT em estômago de rato.

◆ A resposta induzida pela 5-HT foi mais, sensivelmente, reduzida em meio zero-cálcio e zero-cloreto em relação àquelas induzidas pela ACh e pela $PGF_{2\alpha}$, sustentando a sua maior susceptibilidade ao NFA e, portanto, maior envolvimento dos $Cl_{(Ca)}$ no seu mecanismo de ação.

◆ A ACh foi totalmente insensível ao NFA e a $PGF_{2\alpha}$ em menor proporção e, ainda, ambas apresentaram menores sensibilidades ao gradiente de cloreto em relação a 5-HT, indicando o menor envolvimento da ativação dos $Cl_{(Ca)}$ em seus mecanismos de ação.

◆ Os resultados apoiam a nossa hipótese de que a “*ativação dos $Cl_{(Ca)}$ produzindo despolarização da membrana celular levando ao influxo de cálcio via VDCC*” seja um potente mecanismo excitatório envolvido na contração induzida por alguns neurotransmissores em fundo de estômago de rato.

◆ Desde que em concentrações suficientes para inibir os $Cl_{(Ca)}$, o NFA ($\leq 30\mu M$) não apresentou efeitos sobre os canais de potássio e nem sobre os canais de cálcio dependentes de voltagem, sugerindo ser seletivo nesta concentração, constituindo, portanto, uma ferramenta farmacológica adequada para os estudos funcionais dos $Cl_{(Ca)}$ em músculo liso não vascular.

◆ Entretanto, o DCDPC e o DIDS apresentaram efeitos inespecíficos sobre as respostas induzidas pelos agonistas e pelo KCl, indicando serem inadequados para avaliações funcionais dos $Cl_{(Ca)}$ em estômago de rato.

5.2 SOBRE OS CANAIS DE CLORETO ATIVADOS PELO VOLUME CELULAR (Cl_{SWELL})

◆ As contrações induzidas pela solução hipotônica (SH) foram apenas parcialmente dependentes de cloreto e totalmente dependentes do cálcio extracelulares. Essas contrações foram parcialmente inibidas pelo ácido niflúmico (NFA), sugerindo o possível envolvimento das $Cl_{(Ca)}$. Entretanto, é também possível o envolvimento dos Cl_{SWELL} por serem sensíveis ao NFA em estômago (Xu *et al.*, 1997), as quais foram insensíveis aos clássicos bloqueadores das Cl_{SWELL} em músculo liso vascular (DIDS e TAM: Greenwood & Large, 1998).

◆ A despolarização induzida pela solução hipotônica foi inibida pelo NFA e não pela nifedipina, sugerindo o envolvimento dos canais de cloreto e não os VDCC nesse mecanismo.

◆ Nossos resultados sugerem que a despolarização inicial induzida pela abertura dos canais de cloreto levaria à entrada de cálcio pelos VDCC, responsável pela contração do músculo liso de estômago de rato.

SUMMARY

The present study investigated the involvement of calcium- $(Cl_{(Ca)})$ and volume-activated (Cl_{SWELL}) chloride channels in the longitudinal smooth muscle of the rat stomach. We evaluated the inhibitory effects of various chloride channel blockers: niflumic acid (NFA), 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS), 3',5-dichlorophenylamino-2-carboxylic acid (DCDPC), 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) and tamoxifen (TAM) and of the transmembrane calcium and chloride gradients, on the contractile responses induced by the agonists 5-hydroxytryptamine (5-HT), acetylcholine (ACh) and prostaglandin- $F_{2\alpha}^-$ ($PGF_{2\alpha}$), by potassium chloride (KCl) and by hypotonic solution (HS: 50% NaCl) in the longitudinal smooth muscle of the rat stomach. Electrophysiologically, we evaluated the effects of niflumic acid (NFA) and nifedipine (NIF) on the electrical alterations of the cellular membrane induced by HS. NFA selectively inhibited the contractions induced by 5-HT, reduced to a lesser extent the responses induced by $PGF_{2\alpha}$ and did not alter the effects of ACh. In addition, NFA did not affect the contractions induced by 60mM or 20mM KCl, suggesting that it was not interacting with either voltage-dependent calcium channels (VDCC) or potassium channels, respectively. In contrast, DCDPC was less selective in its effects, inhibiting contractions induced by a 5-HT, ACh and KCl. DIDS was less potent than NFA and DCDPC, only inhibiting KCl at higher concentrations. The contractions induced by 5-HT were more sensitive to the effects of NFA and to withdrawal of extracellular calcium or chloride, than were those induced by ACh and $PGF_{2\alpha}$. This differential sensitivity between agonists may be indicative of different transduction mechanisms involved. HS produced NFA-sensitive contractions that were only partially dependent on extracellular chloride and totally dependent on extracellular calcium. Additionally, electrophysiological experiments demonstrated that NFA inhibited the depolarization induced by HS, whilst NIF was without effect, possibly

suggesting the involvement of $Cl_{(Ca)}$ in this mechanism. Since NFA does not inhibit VDCC or potassium channels in the concentrations employed in this study, our data are coherent with the hypothesis that "activation of chloride channels depolarizes smooth muscle, allowing influx of extracellular calcium via VDCC, producing contraction". In conclusion, our data suggest that $Cl_{(Ca)}$ possess an important functional role in the mechanism of contraction of 5-HT, and further suggest that NFA may be an adequate pharmacological tool for the functional evaluation of these channels in smooth muscle of the rat stomach.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, M.J.; CLAPHAM, D.E. Ion channels: basic science and clinical disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, n. 22, p. 1575-1586, 1997.

AICKIN, C.C. A double-barrelled micro-electrode suitable for the measurements of chloride activity (a_{Cl}^{\ominus}) in guinea-pig vas deferens. **J. Physiol.**, v. 320, p. 4, 1981.

AICKIN, C.C.; BRADING, A.F. Effect of Na^+ and K^+ on Cl^- distribution in guinea pig vas deferens, evidence for Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport. **J. Physiol.**, v. 421, p. 13-32, 1990.

AICKIN, C.C.; BRADING, A.F. Measurement of intracellular chloride in guinea-pig vas deferens by ion analysis, $^{36}Cl^-$ efflux and micro-electrodes. **J. Physiol.**, v. 326, p. 139-154, 1982.

AICKIN, C.C.; BRADING, A.F. The role of chloride-bicarbonate exchange in the regulation of intracellular chloride in guinea-pig vas deferens. **J. Physiol.**, v. 349, p. 587-606, 1984.

AICKIN, C.C.; BRADING, A.F. Towards an estimate of chloride permeability in the smooth muscle of guinea-pig vas deferens. **J. Physiol.**, v. 336, p. 179-197, 1983.

AICKIN, C.C.; VERMUE, N.A. Microelectrode measurement of intracellular chloride activity in smooth muscle cells of guinea-pig ureter. **Pflügers Arch.**, v. 397, n. 1, p. 25-28, 1983.

AKBARALI, H.I.; GILES, W.R. Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated Cl^- currents in rabbit oesophageal smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 460, p. 117-133, 1993.

ALESSI, D.; MACDOUGALL, L.K.; SOLA, M.M.; IKEBE, M.; COHEN, P. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin

phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. **Eur. J. Biochem.**, v. 210, p. 1023-1035, 1992.

ALLEN, B.G.; WALSH, M.P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **TIBS**, v. 19, p. 362-368, 1994.

AMÉDÉE, T.; LARGE, W.A.; WANG, Q. Characteristics of chloride currents activated by noradrenaline in rabbit ear artery cells. **J. Physiol. Lond.**, v. 428, p. 501-516, 1990.

ANDERSON, K.E. Clinical pharmacology of potassium channel openers. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 70, p. 244-254, 1992.

ANDREA, J.E.; WALSH, M.P. Protein kinase C of smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, p. 585-595, 1992.

ASHFORD, M.L.J.; BOND, C.T.; BLAIR, T.A.; ADELMAN, J.P. Cloning and functional expression of a rat heart K_{ATP} channel. **Nature**, v. 370, n. 456-459, 1994.

BABCOCK, D.F.; HERRINGTON, J.; GOODWIN, P.C.; PARK, Y.B.; HILLE, B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. **J. Cell. Biol.**, v. 136, n. 4, 833-844, 1997.

BADER, C.R.; BERTRAND, D.; SCHWARTZ, E.A. Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. **J. Physiol. Lond.**, v. 331, n. 253-284, 1982.

BAEZ, M.; YU, L.; COHEN, M.L. Pharmacological and molecular evidence that the contractile response to serotonin in rat stomach fundus is not mediated by activation of the 5-hydroxytryptamine_{1C} receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, n. 1, 31-37, 1990.

BAKHRAMOV, A.; FENECH, C.; BOLTON, T.B. Chloride current activated by hypotonicity in cultured human astrocytoma cells. **Exp. Physiol.**, v. 80, n. 3, 373-389, 1995.

BANDERALI, U.; ROY, G. Activation of K⁺ and Cl⁻ channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media. **J. Membr. Bio.**, v. 126, n. 3, p. 219-234, 1992.

BARANY, M.; BARANY, K. Dissociation of relaxation and myosin light chain dephosphorylation in porcine uterine muscle. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 305, n. 1, p. 2202-2204, 1993.

BARISH, M.E. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. **J. Physiol. Lond.**, v. 342, p. 309-325, 1983.

BARON, C.B.; CUNNINGHAM, M.; STRAUSS, J.F. 3rd; COBURN, R.F. Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 81, n. 21, p. 6899-6903, 1984.

BARRON, J.T.; BARANY, M.; BARANY, L. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 4954-4956, 1979.

BAXTER, G.S.; MURPHY, O.E.; BLACKBURN, T.P. Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, p. 323-331, 1994.

BENHAM, C.D.; BOLTON, T.B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. **J. Physiol. Lond.**, v. 381, p. 385-406, 1986.

BENHAM, C.D.; BOLTON, T.B.; LANG, R.J. Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells. **Nature**, v. 316, p. 345-347, 1985.

BENHAM, C.D.; BOLTON, T.B.; LANG, R.J.; TAKEWAKI, T. Calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells of rabbit jejunum and guinea-pig mesenteric artery. **J. Physiol.**, v. 371, p. 45-67, 1986.

BENHAM, C.D.; TSIEN, R.W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. **Nature**, v. 328, p. 275-278, 1987.

BENNETT, A.; HENSBY, C.N.; SANGER, G.J.; STAMFORD, I.F. Metabolites of arachidonic acid formed by human gastrointestinal tissues and their on the muscle layers. **Br. J. Pharmacol.**, v. 74, n. 2, p. 435-444, 1981.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, 1993.

BERRIDGE, M. J. The AM and FM of calcium signalling. **Nature**, v. 386, p. 759-760, 1997.

BERTHOUD, H.R.; POWLEY, T.L. Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. **J. Com. Neurol.**, v. 319, n. 2, p. 261-76, 1992

BEST, L.; BROOKS, K.J.; BOLTON, T.B. Relationship between stimulated inositol lipid hydrolysis and contractility in guinea-pig visceral longitudinal smooth muscle. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, n. 13, p. 2297-2301, 1985.

BIENVENU, J.; LAURENT, P.; PERRIN, .L.F.; COLIN, B.; REVATTU, J.P.; Use of acute phase protein changes to assess the effects of a nonsteroidal antiinflammatory drug (niflumic acid) on the inflammation process induced by limited plastic surgery. **Int. J. Clin. Pharmacol. Res.**, v. 5, n. 4, p. 269-272, 1985.

BOLTON, T.B. Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 606-718, 1979.

BOLTON, T.B. The depolarising action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 220, p. 647-671, 1972.

BOLTON, T.B.; LARGE, W.A. Are junction potentials essential? Dual mechanism of smooth muscle cell activation by transmitter released from autonomic nerves. **Q. J. Exp. Physiol.**, v. 71, n. 1, p. 1-28, 1986.

BOND, E.F. Channelopathies: potassium-related periodic paralyses and similar disorders. **AACN Clin. Issues**, v. 11, n. 2, p. 261-70, 2000.

BONEV, A.D.; NELSON, M.T. ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. C1190-1200, 1993.

BONEV, A.D.; ROBERTSON, B.E.; NELSON, M.T. Inward rectify K^+ current from rat coronary artery smooth muscle cells. **Biophys. J.**, v. 66, p. A327, 1994.

BONHAUS, D.W.; BACH, C.; DeSOUZA, A.; SALAZAR, F.H.R.; MATSUOKA, B.D.; ZUPPAN, P.; CHAN, H.W.; EGMEN, R.M. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: Comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 622-628, 1995.

BOSCHELLI, D.H.; CONNOR, D.T.; BORNEMEIER, D.A.; DYER, R.D.; KENNEDY, J.A.; KUIPERS, P.J.; OKONKWO, G.C.; SCHRIER, D.J.; WRIGHT, C.D. 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole, and 1,2,4-triazole analogs of the fenamates: in vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activities. **J. Med. Chem.**, v. 36, n. 13, p. 1802-1810, 1993.

BRADLEY, P.B.; ENGEL, G.; FENIUK, W.; FOZARD J.R.; HUMPHREY, P.P.A.; MIDDLEMISS, D.N.; MYLECHRANE, E.J.; RICHARDSON, B.P.;

SAXENA, P.R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacology**, 25, 563-576, 1986.

BRAYDEN, J.E.; NELSON, M.T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. **Science**, v. 256, p. 532-535, 1992.

BUCKINGHAM, R.E.; HAMILTON, T.C.; HOWLETT, D.R.; MOOTOO, S.; WILSON, C. Inhibition by glibenclamide of the vasorelaxant action of cromakalim in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 97, p. 57-64, 1989.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol. Rev.**, v. 24, p. 509-581, 1972.

BUSCH, A. E.; HERZER, T.; WAGNER, C.A.; SCHMIDT, F.; RABER, G.; WALDEGGER, S.; LANG, F. Positive regulation by chloride channel blockers of *IsK* channels expressed in *Xenopus* oocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 46, n. 4, p. 750-753, 1994.

BYRNE, N.G.; LARGE, W.A. Action of noradrenaline on single smooth muscle cells freshly dispersed from the rat anococcygeus muscle. **J. Physiol. Lond.**, v. 389, p. 513-525, 1987a.

BYRNE, N.G.; LARGE, W.A. Membrane mechanism associated with muscarinic receptor activation in single cells freshly dispersed from the rat anococcygeus muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 92, p. 371-379, 1987b.

CAMPBELL, W.B.; HALUSHKA, P.V. Autacóides derivados dos lipídios. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996. cap. 26, p. 438-449.

CASTEELS, R. The distribution of chloride ions in the smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. **J. Physiol.**, v. 214, p. 225-243, 1971.

CAULFIELD, M.P.; BIRDSALL, N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 2, p. 279-290, 1998.

CELESIA, G.G. Disorders of membrane channels or channelopathies. **Clin. Neurophysiol.**, v. 112, n. 1, p. 2-18, 2001.

CHAN, H.C.; FU, W.O.; CHUNG, Y.W.; HUANG, S.J.; CHAN, P.S.; WONG, P.Y. Swelling-induced anion and cation conductances in human epididymal cells. **J. Physiol.**, v. 478, p. 449-60, 1994.

CHANDY, K.G. Simplified gene nomenclature. **Nature**, v. 352 n. 6330, p. 26, 1991.

CHANDY, K.G.; WILLIAMS, C.B.; SPENCER, R.H.; AGUILAR, B.A.; GHANSHANI, S.; TEMPEL, B.L.; GUTMAN, G.A. A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. **Science**, v. 247, p. 973-975, 1990.

CHEN, S.; INOUE, R.; ITO, Y. Pharmacological characterization of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, n. 3, p. 793-801, 1993.

CHILVERS, E.R.; CHALLISS, R.A.; BARNES, P.J.; NAHORSKI, S.R. Mass changes of inositol(1,4,5)trisphosphate in trachealis muscle following agonist stimulation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 164, p. 587-590, 1989.

CHIPPERFIELD, A.R.; DAVIS, J.P.; HARPER, A.A. An acetazolamide-sensitive inward chloride pump in vascular smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 194, n. 1, p. 407-412, 1993.

CHIPPERFIELD, A.R.; DAVIS, J.P.; HARPER, A.A. Sodium-independent inward chloride pumping in rat cardiac ventricular cells. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. H735-739, 1997.

CHIPPERFIELD, A.R.; HARPER, A.A. Chloride in smooth muscle. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 74, n. 3/5, p. 175-221, 2000.

CHOI, D.S.; BIRRAUX, G.; LAUNAY, J.M.; MAROTEAUX, L. The human serotonin 5-HT_{2B} receptor: Pharmacological link between 5-HT₂ and 5-HT_{1D} receptors. **FEBS Lett.**, v. 352, p. 393-399, 1994.

CHRISTENSEN, O.; HOFFMANN, E.K. Cell swelling activates K⁺ and Cl⁻ channels as well as nonselective, stretch-activated cation channels in Ehrlich ascites tumor cells. **J. Membr. Bio.**, v. 129, n. 1, p. 13-36, 1992.

CLAPP, L.H.; TURNER, J.L.; KOZLOWSKI, R.Z. Ca(2+)-activated Cl⁻ currents in pulmonary arterial myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 5, pt. 2, p. H1577-1584, 1996.

CLARK, A.H.; GARLAND, C.J. Ca²⁺ channel antagonists and inhibition of protein kinase C each block contraction but not depolarization to 5-hydroxytryptamine in rabbit basilar artery. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 235, p. 113-116, 1993.

COHEN, M.L.; SECREST, R.J.; KAUFFMAN, R.F. Characterization of the contractile 5-HT receptor in the rat stomach fundus. In: PAOLETTI, R.; VANHOUTTE, P.M.; BRUNELLO, N.; MAGGI, F.M. (Ed.). **Serotonin from cell biology to pharmacology and therapeutics**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 355 – 359.

COHEN, M.L.; WITTENAUER, L.A. Serotonin receptor activation of phosphoinositide turnover in uterine, fundal, vascular, and tracheal smooth muscle. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 10, n. 2, p. 176-181, 1987.

COLLINS, E.M.; WALSH, M.P.; MORGAN, K.G. Contraction of single vascular smooth cells by phenylephrine at constant [Ca²⁺]_i. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. H754-762, 1992.

COX, D.A.; COHEN, M.L. 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase. **C. Behav. Brain. Res.**, v. 73, p. 289-292, 1996.

COX, D.A.; COHEN, M.L. 5-hydroxytryptamine_{2b} receptor signaling in rat stomach fundus: role of voltage-dependent calcium channels, intracellular calcium release and protein kinase. **C. J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 272, p. 143-150, 1995a.

COX, D.A.; COHEN, M.L. Is nitric oxide involved 5-HT_{2B} receptor-mediated contraction in the rat stomach fundus? **Life Sci.**, v. 56, n. 17, p. L333-338, 1995b.

CRIDDLE, D.N.; GREENWOOD, I.A.; WESTON, A.H. Levromakalin-induced modulation of membrane potassium currents, intracellular calcium and mechanical activity in rat mesenteric artery. **Nauncyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 349, p. 422-430, 1994.

CRIDDLE, D.N.; SOARES DE MOURA, R.; GREENWOOD, I.A.; LARGE, W.A. Inhibitory actions of niflumic acid on noradrenaline-induced contraction of the rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 1065-1071, 1996.

CRIDDLE, D.N.; SOARES DE MOURA, R.; GREENWOOD, I.A.; LARGE, W.A. Inhibitory action of niflumic acid on noradrenaline- and 5-hydroxytryptamine-induced pressor responses in the isolated mesenteric vascular bed of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 813-818, 1997.

CUNHA MELO, J.R.; PAULA CASTRO, L.; LANNA, J.C.B.D.; GUIMARÃES, J.T.; LANNA, J.M.D.S. Anatomia do estômago e anomalias do desenvolvimento. In: DANI, R.; CASTRO L.D **Gastroenterologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. v. 1, cap. 32, p. 449-459. ↗

CURRO, D. PREZIOSI, P. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach. **Gen. Pharmacol.**, v. 31, n. 5, p. 697-703, 1998.

D'AMATO, M.; CURRO, D.; MONTUSCHI, P. Evidence for dual components in the non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus: role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 37, n. 3, p. 175-186, 1992.

D'ANGELO, E.K.; SINGER, H.A.; REMBOLD, C.M. Magnesium relaxes arterial smooth muscle by decreasing intracellular Ca^{2+} without changing intracellular Mg^{2+} . **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 1988-1994, 1992.

DANIEL, E.E. Peptidergic nerves in the gut. **Gastroenterology**, v. 75, p. 142-144, 1978.

DANIEL, E.E.; VAN BREEMEN, C.; SCHILLING, W.P.; KWAN, C.Y. Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, p. 551-557, 1995.

DAVIS, J.P. Evidence against a contribution by $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ cotransport to chloride accumulation in rat arterial smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 491, p. 61-68, 1996.

DAVIS, J.P. The effects of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ co-transport and $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ exchange blockade on the membrane potential and intracellular chloride levels of rat arterial smooth muscle, in vitro. **Exp. Physiol.**, v. 77, n. 6, 857-862, 1992.

DAVIS, J.P.; CHIEN, P.F.; CHIPPERFIELD, A.R.; GORDON, A.; HARPER, A.A. The three mechanisms of intracellular chloride accumulation in vascular smooth muscle of human umbilical and placental arteries. **Pflügers Arch.**, v. 441, n. 1, p. 150-154, 2000.

DAVIS, J.P.; CHIPPERFIELD, A.R.; HARPER, A.A. Accumulation of intracellular chloride by (Na-K-Cl) co-transport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertension. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 25, n. 3, p. 233-237, 1993.

DILLON, P. F.; AKSOY, M. O.; DRISKA, S.P.; MURPHY, R.A. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. **Science**, v. 211, p. 495-497, 1981.

DOWNES, C.P. Receptor-stimulated inositol phospholipid metabolism in the central nervous system. **Cell. Calcium**, v. 3, n. 4/5, p. 413-428, 1982.

DROOGMANS, G.; RAEYMAEKERS, L.; CASTEELS, R. Electro and pharmacomechanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit ear artery. **J. Gen. Physiol.**, v. 70, p. 129-148, 1977.

DUAN, D.; WINTER, C.; COWLEY, S.; HUME, J.R.; HOROWITZ, B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. **Nature**, v. 390, n. 6658, p. 417-421, 1997.

DUCHEN, M.R. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. **J. Physiol.**, v. 516, p. 1-17, 1999.

EDWARDS, F.R.; HIRST, G.D.S. Inward rectification in submucosal arterioles of guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 404, p. 437-454, 1988.

EDWARDS, F.R.; HIRST, G.D.S.; SIVERBERG, G.D. Inward rectification in rat cerebral arterioles: involvement of potassium ions in autoregulation. **J. Physiol.**, v. 404, p. 455-466, 1988.

EGAN, R.W.; HUMES, J.L.; KUEHL, F.A.Jr. Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclooxygenase. **Biochemistry**, v. 17, n. 11, p. 2230-2234, 1978.

EHARA, T.; ISHIRAHA, K. Anion channels activated by adrenaline in cardiac myocytes. **Nature**, v. 347, p. 284-286, 1990.

EKBLAD, E.; MEI, Q.; SUNDLER, F. Innervation of the gastric mucosa. **Microsc. Res. Tech.**, v. 48, n. 5, p. 241-257, 2000.

ELFVIN, L.G.; LINDH, B.; HOKFELT, T. The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 471-507, 1993.

EVANS, M.G.; MARTY, A. Calcium-dependent chloride currents in isolated cells from lacrimal glands. **J. Physiol. Lond.**, v. 378, p. 437-460, 1986.

EVANS, M.G.; MARTY, A.; TAN, Y.P.; TRAUTMANN, A. Blockade of Ca-activated Cl conductance by furosemide in rat lacrimal glands. **Pflügers Arch.**, v. 406, p. 65-68, 1986.

FARRUGIA, G.; RAE, J.L.; SZURSZEWski, J.H. Characterization of an outward potassium current in canine jejunal circular smooth muscle and its activation by fenamates. **J. Physiol.**, v. 468, p. 297-310, 1993.

FELIX, R. Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders. **J. Med. Genet.**, v. 37, n. 10, p. 729-740, 2000.

FERNANDEZ-RIVAS, M.; DE LA HOZ, B.; CUEVAS, M.; DAVILA, I.; QUIRCE, S.; LOSADA, E. Hypersensitivity reactions to anthranilic acids derivatives. **Ann. Allergy**, v. 71, n. 6, p. 515-518, 1993.

FOGUET, M.; HOYER, D.; PARDO, L.A.; PAREKH, A.; FLUXEN, F.W.; KALKMAN, H.O.; STÜHMER, W.; LÜBBERT, H. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. **EMBO J.**, v. 11, p. 3481-3487, 1992.

FURUKAWA, T.; VIRAG, L.; SAWANOBORI, T.; HIRAOKA, M. Stilbene disulfonates block ATP-sensitive K⁺ channels in guinea pig ventricular myocytes. **J. Membr. Bio.**, v. 136, n. 3, p. 289-302, 1993. ✓

GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **Int. Rev. Cytol.**, v. 59, p. 129-193, 1979.

GADDUM, J.H.; PICARELLI, Z.P. Two kinds of tryptamine receptor. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 12, p. 323-328, 1957.

GALIONE, A. Ca^{2+} -induce Ca^{2+} release and its modulation by cyclic ADP-ribose. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, p. 304-306, 1992.

GANDHI, R.; ELBLE, R.C.; GRUBER, A.D.; SCHREUR, K.D.; JI, H.L.; FULLER, C.M.; PAULI, B.U. Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 48, p. 32096-32101, 1998.

GARNER, C.; FENIUK, W.; BROWN, P. Serotonin activates Cl^- channels in the apical membrane of the rat choroid plexus epithelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 239, p. 31-37, 1993.

GECK, P.; PIETRZYK, C.; BURCKHARDT, B.C.; PFEIFFER, B.; HEINZ, E. Electrically silent cotransport on Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 600, n. 2, p. 432-447, 1980.

GERSHON, M.D. The enteric nervous system. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 227-272, 1981.

GERSHON, M.D. The enteric nervous system: a second brain. **Hosp. Pract. (Off Ed)**, v. 34, n. 7, p. 31-42, 1999.

GERSTHEIMER, F.P.; MUHLEISEN, M.; NEHRING, D.; KREYE, V.A. A chloride-bicarbonate exchanging anion carrier in vascular smooth muscle of the rabbit. **Pflügers Arch.**, v. 409, n. 1/2, p. 60-66, 1987.

GERTHOFFER, W.T. Dissociation of myosin phosphorylation and active tension during muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 240, p. 8-15, 1987.

GILABERT, J.A.; PAREKH, A.B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated $\text{Ca}(2+)$ current $I(\text{CRAC})$. **EMBO J.**, v. 19, n. 2, p. 6401-6407, 2000.

GIRBINO, G.; OLIANI, C.; LAURIELLO, G. CONDOLUCI, M. [A new anti-inflammatory--analgesic--antipyretic for the treatment of acute disease of the bronchi]. **Riv. Eur. Sci Med. Farmacol.**, v.12, n. 6, p. 359-366, 1990.

GÖGELEIN, H. Chloride channels in epithelia. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 947, p. 521-547, 1988.

GÖGELEIN, H.; DAHLEM, D.; ENGLERT, H.C.; LANG, H.J. Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. **FEBS Lett.**, v. 268, n. 1, p. 79-82, 1990.

GOLDENBERG, M.M.; SUBERS. E.M. The effect of leukotriene D_4 on the isolated stomach and colon of the rat. **Life Sci.**, v. 33 n. 21, p. 2121-2127, 1983.

GOSLING, M.; SMITH, J.W.; POYNER, D.R. Characterization of a volume-sensitive chloride current in rat osteoblast-like (ROS 17/2.8) cells. **J. Physiol.**, v. 485, p. 671-682, 1995.

GREENWOOD, I.A.; LARGE, W.A. Comparison of the effects of fenamates on Ca -activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 2939-2948, 1995.

GREENWOOD, I.A.; LARGE, W.A. Inhibition Ca^{2+} -activated Cl^- -currents in smooth muscle cells by compounds structurally similar to niflumic acid. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 324P, 1997.

GREENWOOD, I.A.; LARGE, W.A. Properties of a Cl^- current activated by cell swelling in rabbit portal vein vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. H1524-1532, 1998.

GRISSEMER, S.; NGUYEN, A.N.; AIYAR, J.; HANSON, D.C.; MATHER, R.J.; GUTMAN, G.A.; KARMILOWICZ, M.J.; AUPERIN, D.D.; CHANDY, K.G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. **Mol. Pharmacol.**, v. 45, n. 6, p. 1227-1234, 1994.

GRÜNDER, S.; THIEMANN, A.; PUSCH, M.; JENTSCH, T.J. Regions involved in the opening of CLC-2 chloride channel by voltage and cell volume. **Nature**, v. 360, p. 759-762, 1992.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 3440-3450, 1985.

GUIBERT, C.; MARTHAN, R.; SAVINEAU, J.P. Oscillatory Cl⁻ current induced by angiotensin II in rat pulmonary arterial myocytes: Ca²⁺ dependence and physiological implication. **Cell. Calcium**, v. 21, n. 6, p. 421-429, 1997.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. C313-339, 1994.

HAGIWARA, N., MASUDA, H., SHODA, M., IRISAWA, H. Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. **J. Physiol.**, v. 456, p. 285-302, 1992.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F.J. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Arch.**, v. 391, p. 85-100, 1981.

HATAKEYAMA, N.; WANG, Q.; GOYAL, R.K.; AKBARALI, H.I. Muscarinic suppression of ATP-sensitive K⁺ channel in rabbit esophageal smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C877-C885, 1995.

HEASLIP, R.J.; SICKELS, B.D. Evidence that prostaglandins can contract the rat aorta via a novel protein kinase C-dependent mechanism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 250, n. 1, p. 44-51, 1989.

HELEVINSKY, K. O.; FAN, Z.; FRAME, M.; MAKIELSKI, J.C.M.; GROPPI, V.; NELSON, D.J. ATP-sensitive K^+ channel opener acts as a potent Cl^- channel inhibitor in vascular smooth muscle cells. **J. Membr. Biol.**, v. 137, p. 59-70, 1994.

HERMSMEYER, K.; STUREK, M.; RUSCH, N.J. Calcium channel modulation by dihydropyridines in vascular smooth muscle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 522, p. 225-231, 1988.

HESS, P. Calcium channels in vertebrate cells. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 13, p. 337-356, 1990.

HIRST, G.D.; EDWARDS, F.R. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. **Physiol. Rev.**, v. 69, n. 2, p. 546-604, 1989.

HIRST, G.D.S.; VAN HELDEN, D.F. Ionic basis of the resting potential of submucosal arterioles in the ileum of the guinea-pig. **J. Physiol.**, v. 333, p. 53-67, 1982.

HISADA, T.; ORDWAY, R.W.; KIRBER, M.T.; SINGER, J.J.; WALSH, J.V. Hyperpolarization-activated cationic channels in smooth muscle cells are stretch sensitive. **Pflügers Arch.**, v. 417, n. 5, p. 493-499, 1991.

HODGKIN, A.L.; HOROWICZ, P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. **J. Physiol.**, v. 148, p. 117-160, 1959.

HOFFMAN, E.P. Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride, and calcium regulation in skeletal muscle. **Annu. Rev. Med.**, v. 46, p. 431-441, 1995.

HOFFMANN, E.K.; DUNHAM, P.B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. **Int. Rev. Cytol.**, v. 161, p. 173-262, 1995.

HOFFMANN, E.K.; SIMONSEN, L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. **Physiol. Rev.**, v. 69, p. 315-382, 1989.

HOGG, R.; WANG, Q.; LARGE, W.A.. Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, p. 977-984, 1994a.

HOGG, R.; WANG, Q.; LARGE, W.A. Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. **Br. J. Pharmacol.**, v. 111, p. 1333-1341, 1994b.

HOKFELT, T.; MILLHORN, D.; SEROOGY, K.; TSURUO, Y.; CECCATELLI, S.; LINDH, B.; MEISTER, B.; MELANDER, T.; SCHALLING, M.; BARTFAI, T. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. **Experientia Suppl.**, v. 56, p. 154-179, 1989.

HOLEVINSKY, K.O.; FAN, Z.; FRAME, M.; MAKIELSKI, J.C.; GROPPA, V.; NELSON, D.J. ATP-sensitive K⁺ channel opener acts as a potent Cl⁻ channel inhibitor in vascular smooth muscle cells. **J. Membr. Biol.**, v. 137, n. 1, p. 59-70, 1994.

HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.P.A. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p. 157-203, 1994.

HUMPHREY, P.P.A.; HARTIG, P.; HOYER, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, p. 233-236, 1993.

HYVELIN, J.M.; GUIBERT, C.; MARTHAN, R.; SAVINEAU, J.P. Acellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. L269-282, 1998.

IKEBE, M.; HARTSHORNE, D.J.; ELZINGA, M. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 20, p. 9569-9573, 1987.

IKEBE, M.; KORETZ, J.; HARTSHORNE, D.J. Effects of phosphorylation of light chain residues threonine 18 and serine 19 on the properties and conformation of smooth muscle myosin. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 6432-6437, 1988.

INAGAKI, N.; TSUURA, Y.; NAMBA, N.; MASUDA, K.; GONOI, T.; HORIE, M.; SEINO, Y.; MIZUTA, M.; SEINO, S. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islet, pituitary, skeletal muscle, and heart. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 5691-5694, 1995.

INOUE, I. Modification of K^+ conductance of the squid giant axon membrane by SITS. **J. Gen. Physiol.**, v. 88, p. 507-520, 1986.

INOUE, I. Voltage-dependent Cl^- conductance of the squid giant axon membrane and its blockade by some disulfonic stilbene derivatives. **J. Gen. Physiol.**, v. 85, p. 519-537, 1985.

INOUE, R. Biophysical and pharmacological characterization of receptor-operated nonselective cation channels (ROCC) and their mechanism in smooth muscle. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 105, n. 1, p. 11-22, 1995.

INOUE, R.; CHEN, S. Physiology of muscarinic receptor-operated nonselective cation channels in guinea-pig ileal smooth muscle. **EXS**, v. 66, p. 261-268, 1993.

INOUE, R.; ISENBERG, G. Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through a G protein. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. C1173-1178, 1990a.

INOUE, R.; ISENBERG, G. Effect of membrane potential on acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 424, p. 57-71, 1990b.

ITO, S.; OHTA, T.; NAKAZATO, Y. Inward current activated by carbachol in rat intestinal smooth muscle cells. **J. Physiol. Lond.**, v. 470, p. 395-409, 1993.

JAGGER, D.J.; ASHMORE, J.F. A potassium current in guinea-pig outer hair cells activated by ion channel blocker DCDPC. **Neuroreport**, v. 9, n. 17, p. 3887-3891, 1998.

JAN, L.Y.; JAN, Y.N. Structural elements involved in specific K^+ channel functions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 537-555, 1992.

JANSSEN, L.J. Acetylcholine and caffeine activate Cl^- and suppress K^+ conductances in human bronchial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 5, pt. 1, p. L772-781, 1996.

JANSSEN, L.J.; SIMS, S.M. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. **J. Physiol.**, v. 453, p. 197-218, 1992.

JANSSEN, L.J.; SIMS, S.M. Ca^{2+} -dependent Cl^- current in canine tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C163-169, 1995.

JANSSEN, L.J.; SIMS, S.M. Histamine activates Cl^- and K^+ currents in guinea-pig tracheal myocytes: convergence with muscarinic signalling pathway. **J. Physiol.**, v. 465, p. 661-667, 1993.

JENTSCH, T.J.; FRIEDRICH, T.; SCHRIEVER, A.; YAMADA, H. The CLC chloride channel family. **Pflügers Arch.**, v. 437, p. 783-795, 1999.

JENTSCH, T.J.; GÜNTHER, W. Chloride channels: an emerging molecular picture. **Bioessays**, v. 19, p. 117-126, 1997.

JENTSCH, T.J.; STEINMEYER, K.; SCHWARZ, G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. **Nature**, v. 348, p. 510-514, 1990.

JIANG, H.; STEPHENS, N.L. Calcium and smooth muscle contraction. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 135, p. 1-9, 1994.

KAMATA, K.; KOHZUKI, M.; KASUYA, Y. Further studies concerning possible transmitters from NANC nerves in the circular muscle of the rat stomach fundus. **J. Smooth Muscle Res.**, v. 33, n. 3, p. 107-116, 1997.

KAMATA, K.; KOHZUKI, M.; MISAWA, M.; KASUYA, Y. Involvement of nitric oxide pathway in non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation in the rat stomach: differential innervation of NANC nerves in the longitudinal and circular muscle of the fundus. **Gen. Pharmacol.**, v. 24, n. 6, p. 1403-1410, 1993.

KAMM, K.E.; HSU, L.C.; KUBOTA, Y.; STULL, J.T. Phosphorylation of smooth muscle myosin heavy and light chains. Effects of phorbol dibutyrate and agonists. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 21223-21229, 1989.

KAMM, K.E.; STULL, J.T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, p. 593-620, 1985.

KANASHIRO, C.A.; KHALIL, R.A. Isoform-specific protein kinase C activity at variable Ca^{2+} entry during coronary artery contraction by vasoactive eicosanoids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, n. 12, p. 1110-1119, 1998.

KATO, K.; EVANS, A.M.; KOZLOWSKI, R.Z. Relaxation of endothelin-1-induced pulmonary artery constriction by niflumic acid and NPPB:

mechanism(s) independent of chloride channel block. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 288, n. 3, p. 1242-1250, 1999.

KATZKA, D.D.A.; MORAD, M. Properties of calcium channels in guinea-pig gastric myocytes. **J. Physiol.**, v. 413, p. 175-197, 1989.

KAWASAKI, M.; UCHIDA, S.; MONKAWA, T.; MIYAWAKI, A.; MIKOSHIBA, K.; MARUMO, F.; SASAKI, S. Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 597-604, 1994.

KEEF, K.D.; ROSS, G. Rhythmic coronary arterial contractions: changes with time and membrane potential. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. H524-529, 1986.

KELLY, M.E.; DIXON, S.J.; SIMS, S.M. Outwardly rectifying chloride current in rabbit osteoclasts is activated by hyposmotic stimulation. **J. Physiol.**, v. 475, n. 3, p. 377-389, 1994.

KENNELLY, P.; KREBS, E.G. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 15555-15558, 1991.

KIEFELE, S.; FONG, P.; BENS, M.; VANDEWALLE, A.; JENTSCH, T.J. Two highly homologous members of the CLC chloride channel family in both rat and human kidney. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 6943-6947, 1994.

KIRKUP, A.J.; EDWARDS, G.; GREEN, M.E.; MILLER, M.; WALKER, S.D.; WESTON, A.H. Modulation of membrane currents and mechanical activity by niflumic acid in rat vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 317, p. 165-174, 1996a.

KIRKUP, A.J.; EDWARDS, G.; WESTON, A.H. Investigation of the effects of 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) on membrane currents in rat portal vein. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 1, p. 175-183, 1996b.

KIRSCH, G.E.; TAGLIALATELA, M.; BROWN, A.M. Internal and external TEA block in single cloned K⁺ channels. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. C583-590, 1991.

KITAMURA, D.; YAMAZAKI, J. Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature. **Jpn J. Pharmacol.**, v. 85, p. 351-357, 2001.

KLÖCKNER, U. Intracellular calcium ions activate a low-conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery. **Pflügers Arch.**, v. 424, n. 3/4, p. 231-237, 1993.

KNAUF, P.A.; ROTHSTEIN, A. Chemical modification of membrana. I. Effects of sulfhydryl and amino reagents on anion and cation permeation of human red blood cells. **J. Gen. Physiol.**, v. 58, p. 190-210, 1971.

KNOT, H.J.; BRAYDEN, J.E.; NELSON, M.T. Calcium channels and potassium channels. In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. California: Academic Press, 1996. cap. 16, p. 203-219.

KOBAYASHI, S.; SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Guanine nucleotide- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release in rabbit main pulmonary artery. **J. Physiol.**, v. 403, p. 601-619, 1988.

KOCH, M.C.; STEINMEYER, K.; LORENZ, C.; RICKER, K.; WOLF, F.; OTTO, M.; ZOLL, B.; LEHMANN-HORN, F.; GRZESCHIK, K.H.; JENTSCH, T.J. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. **Science**, v. 257, n. 5071, p. 797-800, 1992.

KOLBEL, C.B.; HOLTSMANN, G.; MCROBERTS, J.A.; SCHOLER, S.; AENGENVOORDT, P.; SINGER, M.V.; MAYER, E.A. Involvement of chloride channels in the receptor-mediated activation of longitudinal colonic muscle. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 10, n. 6, p. 489-498, 1998.

KONCZ, C.; DAUGIRDAS, J.T. Use of MQAE for measurement of intracellular [Cl] in cultured aortic smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. H2114-2123, 1994.

KORBMACHER, C.; HELBIG, H.; STAHL, F.; WIEDERHOLT, M. Evidence for Na/H exchange and Cl/HCO₃ exchange in A10 vascular smooth muscle cells. **Pflugers Arch.**, v. 412, n. 1/2, p. 29-36, 1988.

KOTY, P.P.; PEGORARO, E.; HOBSON, G.; MARKS, H.G.; TUREL, A.; FLAGLER, D.; CADALDINI, M.; ANGELINI, C.; HOFFMAN, E.P. Myotonia and the muscle chloride channel: dominant mutations show variable penetrance and founder effect. **Neurology**, v. 47, n. 4, p.963-968, 1996.

KREYE, V.A.; BAUER, P.K.; VILLHAUÉR, I. Evidence for furosemide-sensitive active chloride transport in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 73, n. 1, p. 91-95, 1981.

KUBO, M.; OKADA, Y. Volume-regulatory Cl⁻ channel currents in cultured human epithelial cells. **J. Physiol.**, v. 456, p.351-371, 1992.

KUNZELMANN, K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 137, p. 1-70, 1999.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacol. Rev.**, v. 47, p. 387-573, 1995.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, T.; ITOH, T.; INOUE, R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 811-920, 1998.

KURIYAMA, H.; OSA, T.; TOIDA, N. Membrane properties of the smooth muscle of guinea-pig ureter. **J. Physiol.**, v. 191, n. 2, p. 225-238, 1967.

KURSAR, J.D.; NELSON, D.L.; WAINSCOTT, D.B.; BAEZ, M. Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 46, p. 227-234, 1994.

KURSAR, J.D.; NELSON, D.L.; WAINSCOTT, D.B.; COHEN, M.L.; BAEZ, M. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine_{2F}) from rat stomach fundus. **Mol. Pharmacol.**, v. 42, p. 549-557, 1992.

KUSCHINSKY, W.; WAHL, M.; BOSSE, O.; THURAU, K. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. **Cir. Res.**, v. 31, p. 240-247, 1972.

LAMB, F.S.; BARNA, T.J. Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. H151-160, 1998a.

LAMB, F.S.; BARNA, T.J. The endothelium modulates the contribution of chloride currents to norepinephrine-induced vascular contraction. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. H161-168, 1998b.

LAMB, F.S.; VOLK, J.A.; SHIBATA, E.F. Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. **Circ. Res.**, v. 75, p. 742-750, 1994.

LAMBERT, I.H.; HOFFMANN, E.K. Regulation of taurine transport in Ehrlich ascites tumor cells. **J. Membr. Biol.**, v. 131, n. 1, p. 67-79, 1993.

LANG, F.; RITTER, M.; VOLKL, H.; HAUSSINGER, D. The biological significance of cell volume. **Ren. Physiol. Biochem.**, v. 16, p. 48-65, 1993.

LANGTON, P.D.; NELSON, M.T.; HUANG, Y.; STANDEN, N.B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. H927-934, 1991.

LARGE, W.A.; WANG, Q. Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C435-454, 1996.

LARSON, J.E.; DELCARPIO, J.B.; FARBERMAN, M.M.; MORROW, S.L.; COHEN, J.C. CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 279, n. 2, p. L333-341, 2000.

LAWSON, K. Is there a role for potassium channel openers in neuronal ion channel disorders? **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 9, n. 1, p., 2269-2280, 2000.

LEBLANC, N.; LEUNG, P.M. Indirect stimulation of Ca^{2+} -activated Cl^- current by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in rabbit portal vein smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, v. 5, pt. 2, p. H1906-1917, 1995.

LEE, M.W.; BAYGUINOV, O.; SANDERS, K.M. Role of nonselective cation current in muscarinic responses of canine colonic muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. C1463-C1471, 1993.

LEFEBVRE, R.A.; DE BEURME, F.A.; SAS, S. Effect of apamin on the responses to VIP, ATP and NANC neurone stimulation in the rat and cat gastric fundus. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 11, n. 2, v. 73-83, 1991

LEFEBVRE, R.A.; VERPLANKEN, P.A.; BOGAERT, M.G. Pharmacological characterization of the postjunctional beta-adrenoceptors in the rat gastric fundus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 106, n. 1, p. 1-9, 1984.

LEFKOWITZ, R.J.; HOFFMAN, B.B.; TAYLOR, P. Neurotransmissão: os sistemas nervosos autônomo e motor somático. In: _____. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996. cap. 6, p. 77-102.

LI, C.G.; RAND, M.J. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. **Eur. J. Pharmacol.**, v.191, 3, 303-309, 1990.

LIEDTKE, C.M. Regulation of chloride transport in epithelia. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 51, p. 143-160, 1989.

LISE, B.; ROUFFINAC, C. Urinary concentrating ability: Insights from comparative anatomy. **Am. J. Physiol.**, v. 249, p. R643-666, 1985.

LIU, X.; FARLEY, J.M. Acetylcholine-induced chloride current oscillations in swine tracheal smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 276, n. 1, p. 178-186, 1996.

LLOYD, S.E.; PEARCE, S.H.; FISHER, S.E.; STEINMEYER, K.; SCHWAPPACH, B.; SCHEINMAN, S.J.; HARDING, B.; BOLINO, A.; DEVOTO, M.; GOODYER, P.; RIGDEN, S.P.; WRONG, O.; JENTSCH, T.J.; CRAIG, I.W.; THAKKER, R.V. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 445-449, 1996.

LOIRAND, G.; PACAUD, P.; BARON, A.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Large conductance calcium-activated non-selective cation channel in smooth muscle cells isolated from rat portal vein. **J. Physiol. Lond.**, v. 437, p. 461-475, 1991.

LUBIANCA, J.N. Contratores e relaxantes uterinos. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da Terapêutica Racional**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 60, p. 585-592.

MA, R.; XU, G.Y. An investigation on adrenergic receptor in rat stomach. **Sheng Li Xue Bao**, v. 42, n. 4, p. 397-400, 1990.

MARC, S.; LEIBER, D.; HARBON, S. Carbachol and oxytocin stimulate the generation of inositol phosphates in the guinea pig myometrium. **FEBS Lett.**, v. 201, n. 1, p. 9-14, 1986.

MARCHIONI, C.F.; LIVI, E.; OLIANI, C.; GUERZONI, P.; CORONA, M. Treatment of acute inflammatory pathology of the upper airway with morniflumate. **Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.**, v. 12, n. 6, p. 347-357, 1990.

MARSTON, S.B.; REDWOOD, C.S. The molecular anatomy of caldesmon. **Biochem. J.**, v. 279, p. 1-16, 1991.

MARTY, A.; TAN, Y.P.; TRAUTMANN, A. Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. **J. Physiol. Lond.**, v. 357, p. 293-325, 1984.

MATSUI, M.; MOTOMURA, D.; KARASAWA, H.; FUJIKAWA, T.; JIANG, J.; KOMIYA, Y.; TAKAHASHI, S.; TAKETO, M.M. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 17, p. 9579-9584, 2000.

MATSUMURA, Y.; UCHIDA, S.; KONDO, Y.; MIYAZAKI, H.; KO, S.B.H.; HAYAMA, A.; MORIMOTO, T.; LIU, W.; ARISAWA, M.; SASAKI, S.; MARUMO, F. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the ClC-K1 chloride channel. **Nature Genet.**, v. 21, p. 95-98, 1999.

McCARRON, J.G.; HALPERN, W. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. H902-908, 1990.

McCARTY, N.A.; O'NEIL, R.G. Calcium signaling in cell volume regulation. **Physiol. Rev.**, v. 72, n. 4, p. 1037-1061, 1992.

McDANIEL, N.L.; CHEN, X.L.; SINGER, H.A.; MURPHY, R.A.; REMBOLD, C.M. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and

uncoupling stress from myosin phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C461-467, 1992.

McPHERSON, G.A.; ANGUS, J.A. Evidence that acetylcholine-mediated hyperpolarization of the rat small mesenteric artery does not involve the K^+ channels opened by cromakalin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 103, p. 1184-1190, 1991.

MILEDI, R. Calcium-dependent outward current in *Xenopus laevis* oocytes. **Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, v. 215, p. 491-497, 1982.

MILENOV, K.; GOLENHOFEN, K. Contractile responses of longitudinal and circular smooth muscle of the canine stomach to prostaglandin E and F₂alpha. **Prostaglandins Leukot. Med.**, v. 8, n. 3, p. 287-300, 1982.

MILENOV, K.; NIKOLOV, R.; RAKOVSKA, A. Effect of prostacyclin (PGI_2) on the mechanical activity of isolated longitudinal and circular muscle strips of guinea-pig stomach. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 5, n. 6, p. 369-374, 1983.

MILENOV, K.; RAKOVSKA, A. The role prostaglandin in the spontaneous and cholinergic nerve-mediated motility of guinea-pig gastric muscle. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 5, n. 2, p. 121-126, 1983.

MINTA, A.; KAO, J.P.; TSIEN, R.Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 8171-8178, 1989.

MISSIAEN, L.; DE SMEDT H.; DROOGMANS G.; HIMPENS B.; CASTEELS R. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. **Pharmacol. Ther.**, v. 56, n. 2, p. 191-231, 1992.

MITRA, R.; MORAD, M. Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^+ currents in mammalian gastric smooth muscle cells. **Science**, v. 229, p. 269-272, 1985.

MOREL, N.; GODFRAIND, T. Characterization in rat aorta of the bindings sites responsible for blockade of noradrenaline-evoked calcium entry by nisoldipine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 467-477, 1991.

MORI, T.; OKADA, T.; SHIMIZU, S. Receptor-activated Ca^{2+} influxo: capacitative Ca^{2+} entry and TRP proteins. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 114, p. 3, p. 149-160, 1999.

MOXLEY III, R.T. Channelopathies. **Curr. Treat. Options Neurol.**, v. 2, n. 1, p. 31-47, 2000.

MURPHY, M.E.; BRAYDEN, J.E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **J. Physiol.**, v. 486, p. 47-58, 1995.

MURPHY, R.A. What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation. **FASEB J.**, v. 8, p. 311-318, 1994.

NATTEL, S. Sodium channel inactivation abnormalities associated with heart disease: ionic remodeling and arrhythmogenic channelopathies. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v. 12, v. 2, p. 226-228, 2001.

NEHER, E.; SAKMANN, B. Single-channel currents recorded from membrane of enervated frog muscle fibers. **Nature**, v. 260, p. 779-802, 1976.

NEILD, T.O.; KOTTECHA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and potassium. **Circ. Rev.**, v. 60, p. 791-795, 1987.

NELSON, M.T.; CONWAY, M.A.; KNOT, H.J.; BRAYDEN, J.E. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. **J. Physiol.**, v. 502, p. 259-264, 1997.

NELSON, M.T.; PATLAK, J.B.; WORLEY, J.F.; STANDEN, N.B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. C3-18, 1990.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C799-822, 1995.

NELSON, M.T.; STANDEN, N.B.; BRAYDEN, J.E.; WORLEY, J.F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, p. 382-385, 1988.

NILIUS, B.; EGGERMONT, J.; VOETS, T.; DROOGMANS, G. Volume-activated Cl^- channels. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 7, p. 1131-1140, 1996.

NILIUS, B.; SEHRER, J.; De SMET, P.; VAN DRIESSCHE, W.; DROOGMANS, G. Volume regulation in a toad epithelial cell line: role of coactivation of K^+ and Cl^- channels. **J. Physiol.**, v. 487, p. 367-378, 1995.

NILIUS, B.; SEHRER, J.; VIANA, F.; DE GREEF, C.; RAEYMAEKERS, L.; EGGERMONT, J.; DROOGMANS, G. Volume-activated Cl^- currents in different mammalian non-excitabile cell types. **Pflügers Arch.**, v. 428, v. 3/4, p. 364-371, 1994.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**, v. 258, p. 607-614, 1992.

NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. **Nature**, v. 308, p. 693-698, 1984.

NOMA, A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, p.147-148, 1983.

NORDEN, A.G.; SCHEINMAN, S.J.; DESCHODT-LANCKMAN, M.M.; LAPSLEY, M.; NORTIER, J.L.; THAKKER, R.V.; UNWIN, R.J.; WRONG, O.

Tubular proteinuria defined by a study of Dent's (CLCN5 mutation) and other tubular diseases. **Kidney Int.**, v. 57, n. 1, p. 240-249, 2000.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, p. 462-465, 1984.

OHTA, T.; ITO, S.; NAKAZATO, Y. Chloride currents activated by caffeine in rat intestinal smooth muscle cells. **J. Physiol.**, v. 465, p. 149-162, 1993.

OHYA, Y.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Modulation of ionic currents in smooth muscle balls of the intestine by intercellularly perfused ATP and cyclic AMP. **Pflügers Arch.**, v. 408, p. 465-473, 1987.

OKABE, K.; KAJIOKA, S.; NAKAO, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H.; WESTON, A.H. Actions of cromakalim on ionic currents recorded from single smooth muscle cells of the rat portal vein. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 250, p. 832-839, 1990.

OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflügers Arch.**, v. 409, n. 6, p. 561-568, 1987.

OKADA, Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C755-789, 1997.

OTANI, H.; OTANI, H.; DAS, D.K. Positive inotropic effect and phosphoinositide breakdown mediated by arachidonic acid and prostaglandin F2 alpha. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244, n. 3, p. 844-851, 1988.

OTTOLIA, M.; TORO, L. Potentiation of large conductance KCa channels by niflumic, flufenamic, and mefenamic acids. **Biophys. J.**, v. 67, v. 6, p. 2272-2279, 1994.

OVERTURF, K.E.; RUSSELL, S.N.; CARL, A.; VOGALIS, F.; HART, P.J.; HUME, J.R.; SANDERS, K.M.; HOROWITZ, B. Cloning and characterization of a Kv1.5 delayed rectifier K⁺ channel from vascular and visceral smooth muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. C1231-1238, 1994.

OWEN, N.E. Regulation of Na/K/Cl cotransport in vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 125, p. 500-508, 1984.

OZAKI, H.; OHYAMA, T.; SATO, K.; KARAKI, H. Ca²⁺-dependent and independent mechanisms of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 52, p. 509-512, 1990.

PACAUD, P.; LOIRAND, G.; BARON, A.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Ca²⁺ channel activation and membrane depolarization mediated by Cl⁻ channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, n. 4, p. 1000-1006, 1991.

PACAUD, P.; LOIRAND, G.; LAVIE, J.L.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. **Pflügers Arch.**, v. 413, p. 629-636, 1989a.

PACAUD, P.; LOIRAND, G.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Noradrenaline activates a calcium-dependent chloride conductance and increases the voltage-dependent calcium current in cultured single cells of the rat portal vein. **Br. J. Pharmacol.**, v. 97, p. 139-146, 1989b.

PACAUD, P.; LOIRAND, G.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Calcium dependence of the calcium-activated chloride current in smooth muscle cells of the rat portal vein. **Pflügers Arch.**, v. 421, p. 125-130, 1992.

PALADE, P.T.; BARCHI, R.L. On the inhibition of muscle membrane chloride conductance by aromatic carboxylic acids. **J. Gen. Physiol.**, v. 69, p. 879-896, 1977.

PANDOL, S.J. Introduction to the function and control of the gastrointestinal system. In: WEST, J.B. **Best & Taylor's physiological basis of medical practice**. 12th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990. cap. 42, p. 606-612.

PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C.A. Effect of NFA on electromechanical coupling by tachykinin NK₁ receptor activation in rabbit colon. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 303, n. 3, p. 197-204, 1996.

PEROUTKA, S.J.; SNYDER, S.H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid diethylamide and [³H]spiroperidol. **Mol. Pharmacol.**, v. 16, p. 687-699, 1979.

POLLOCK, N.S.; KARGACIN, M.E.; KARGACIN, G.J. Chloride channel blockers inhibit Ca²⁺ uptake by the smooth muscle sarcoplasmic reticulum. **Biophys. J.**, v. 75, n. 4, p. 1759-1766, 1998.

PONGS, O. Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, n. 9, p. 359-365, 1992.

POPP, R.; ENGLERT, H.C.; LANG, H.J.; GOGELEIN, H. Inhibitors of nonselective cation channels in cells of the blood-brain barrier. **EXS**, v. 66, p. 213-218, 1993.

PRITCHARD, K.; MARSTON, S.B. The Ca²⁺-sensitizing component of smooth muscle thin filaments: properties of regulatory factors that interact with caldesmon. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, v. 668-673, 1993.

QUAYLE, J.M.; DART, C.; STANDEN, N.B. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 494, p. 715-726, 1996.

QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-Sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 77, n. 4, p. 1165-1232, 1997.

RADOMIROV, R.; VENKOVA, K. Responsiveness of rat vas deferens and stomach smooth muscle after treatment with indomethacin. **Gen. Pharmacol.**, v. 17, n. 4, p. 425-429, 1986.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: _____. **Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997a, cap. 11, p. 169-193.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Transmissão colinérgica. In: _____. **Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997b. cap. 6, p. 91-114.

REEVER, C.M.; FERRARI-DILEO, G.; FLYNN, D.D. The M5 (m5) receptor subtype: fact or fiction? **Life Sci.**, v. 60, n. 13/14, p. 1105-1112, 1997.

REMBOLD, C.M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in biochemistry of smooth muscle contraction. [S. l.]: **Academic Press**, 1996. p. 227-239.

REMBOLD, C.M.; MURPHY, R.A. Myoplasmic $[Ca^{2+}]$ determines myosin phosphorylation in agonist-stimulated swine arterial smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 63, p. 593-603, 1988.

RIDGEWAY, E.B.; ASHLEY, C.C. Calcium transients in single muscle fibers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 20, p. 229-234, 1967.

RIKER, W.F.; WESCOE, W.C. The pharmacology of flaxedil with observations on certain analogs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 54, p. 373-394, 1951.

ROBERDS, S.L.; KNOTH, K.M.; PO, S.; BLAIR, T.A.; BENNETT, P.B.; HARTSHORNE, R.P.; SNYDERS, D.J.; TAMKUN, M.M. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v. 4, n. 1, p. 68-80, 1993.

ROBERTSON, B.E.; NELSON, M.T. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. C1589-1597, 1994.

ROLE, L.W.; BERG, D.K. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. **Neuron**, v. 16, p. 1077-1085, 1996.

ROTH, B.L.; NAKAKI, T.; CHUANG, D.M.; COSTA, E. Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover. **Neuropharmacology**, v. 23, n. 10, p. 1223-1225, 1984.

RUSSELL, J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport. **Physiol. Rev.**, v. 80, n. 1, p. 211-276, 2000.

SAKAMOTO, Y.; NASU, Y. Electrical and mechanical interaction between circular and longitudinal muscle layers of the guinea-pig stomach. **Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi**, v. 23, n. 2, n. 67-73, 1987.

SANDERS, K.M.; NORTHRUP, T.E. Prostaglandin synthesis by microsomes of circular and longitudinal gastrointestinal muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 244, n. 4, p. G442-448, 1983.

SANDERS, K.M.; PUBLICOVER, N.G. Excitation-contraction coupling in gastric muscles. **Dig. Dis. Sci.**, v. 39, v. 12, suppl, p. 69S-72S, 1994.

SANGUINETTI, M.C.; SPECTOR, P.S. Potassium Channelopathies. **Neuropharmacolog**, v. 36, p. 755-762, 1997.

SCHACHTER, M.; GODFREY, P.P.; MINCHIN, M.C.; McCLUE, S.J.; YOUNG, M.M. Serotonergic agonists stimulate inositol lipid metabolism in rabbit platelets. **Life Sci.**, v. 37, n. 17, p. 1641-1647, 1985.

SCHMUCK, K.; ULLMER, C.; ENGELS, P.; LÜBBERT, H. Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. **FEBS Lett.**, v. 342, p. 85-90, 1994.

SCHOFIELD, P.R. Genetics, an alternative way to discover, characterize and understand ion channels. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 28, n. 1/2, p. 84-88, 2001.

SCHWIEBERT, E.M.; MILLS, J.W.; STANTON, B.A. Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 10, p. 7081-7089, 1994.

SECRET, R.J.; LUCAITES, V.L.; MÊNDELSON, L.G.; COHEN, M.L. Protein kinase C translocation in rat stomach fundus: Effects of serotonin, carbamylcholine and phorbol dibutyrate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 256, p.103-109, 1991.

SECRET, R.J.; SCHOEPP, D.D.; COHEN, M.L. Comparison of contractions to serotonin, carbamylcholine and prostaglandin F_{2α} in rat stomach fundus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 250, n. 3, p. 971-978, 1989.

SHIMIZU, H.; ITO, M.; MIYAHARA, M.; ICHIKAWA, K.; OKUBO, S.; KONISHI, T.; NAKA, M.; TANAKA, T.; HIRANO, K.; HARTSHORNE, D.J.; NAKANO, T. Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 48, 30407-30411, 1994.

SHIRAZI, A.; IIZUDA, K.; FADDEN, P.; MOSSE, C.; SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; HAYSTEAD, T.A.J. Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 50, p. 31598-31606, 1994.

SIMON, D.B.; BINDRA, R.S.; MANSFIELD, T.A.; NELSON-WILLIAMS, C.; MENDONÇA, E.; STONE, R.; SCHURMAN, S.; NAYIR, A.; ALPAY, H.;

BAKKALOGLU, A.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; MORALES, J.M.; SANJAD, S.A.; TAYLOR, C.M.; PILZ, D.; BREM, A.; TRACHTMAN, H.; GRISWOLD, W.; RICHARD, G.A.; JOHN, E.; LIFTON, R.P. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. **Nat. Genet.**, v. 17, n. 2, p. 171-178, 1997.

SIMS, S.M. Cholinergic activation of a non-selective cation current in canine gastric smooth muscle is associated with contraction. **J. Physiol.**, v. 449, p. 377-398, 1992.

SIMS, S.M.; WALSH, J.V.; SINGER, J.J. Cholinergic agonists suppress a potassium current in freshly dissociated smooth muscle cells of the toad. **J. Physiol. Lond.**, v. 367, p. 503-529, 1985.

SKACH, W.R. Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Kidney Int.**, v. 57, n. 3, p. 825-831, 2000.

SKUTELLA, M.; RÜEGG, U.T. Studies on capacitative calcium entry in vascular smooth muscle cells by measuring $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx. **J. Recept. Signal Transduct.**, v. 17, p. 163-175, 1997.

SMAILI, S. S.; JURKIEWICZ, N.H.; GARCIA, A.G.; JURKIWICZ, A. Comparison of the effect of calcium withdrawal from the medium and of blockade of extracellular calcium entry by isradipine on the contractile responses of the isolated rat stomach. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 953-956, 1991.

SMAILI, S.S.; CAVALCANTI, P.M.; OSHIRO, M.E.; FERREIRA, A.T.; JURKIEWICZ, A. Ca^{2+} release-activated channels in rat stomach smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 342, n. 1, p. 119-122, 1998.

SMITH, J.M.; JONES, A.W. Calcium-dependent fluxes of potassium-42 and chloride-36 during norepinephrine activation of rat aorta. **Circ. Res.**, v. 56, p. 507-516, 1985.

SOBUE, K.; MURAMOTO Y.; FUJITA, M.; KAKIUCHI, S. Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.**^a, v. 78, p. 5652-5655, 1981.

SOBUE, K.; SELLERS, J.R. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 12115-12118, 1991.

SOMLYO, A.P.; WALKER, J.W.; GOLDMAN, Y.E.; TRENTHAM, D.R.; KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A.V. Inositol trisphosphate, calcium and muscle contractions. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, v. 320, p. 399-414, 1988.

SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 159, p. 129-145, 1968.

SPEEDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, p. 363-372, 1992.

SPERELAKIS, N. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In: SPERELAKIS, N.; BANKS, R.O. (Ed.). **Physiology**. Boston: Little-Brown, 1993. cap. 15, p. 223-241.

STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 164, n. 4, p. 549-557, 1998.

STEINMEYER, K.; KLOCKE, R.; ORTLAND, C.; GRONEMEIER, M.; JOCKUSCH, H.; GRUNDER, S.; JENTSCH, T.J. Inactivation of muscle

chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. **Nature**, v. 354, n. 6351, p. 304-308, 1991.

STRANGE, K. Are all cell volume changes the same ? **News Physiol Sci.**, v. 9, p. 223-228, 1995.

STRANGE, K.; EMMA, F.; JACKSON, P.S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. C711-730, 1996.

SUBA, E.A.; ROTH, B.L. Prostaglandins activate phosphoinositide metabolism in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 136, n. 3, p. 325-332, 1987.

TAKAHASHI, K.; HIWADA, K.; KOKUBU, T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 141, p. 20-26, 1986.

TANAKA, C.; NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 17, p. 551-567, 1994.

TANSEY, M.G.; HORI, M.; KARAKI, H.; KAMM, K.E.; STULL, J.T. Okadaic acid uncouples myosin light chain phosphorylation and tension in smooth muscle. **FEBS Lett.**, v. 270, p. 219-221, 1990.

TANSEY, M.G.; WORD, R.A.; HIDAKA, H.; SINGER, H.A.; SCHWORER, C.M.; KAMM, K.E.; STULL, J.T. Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells. **J. Biol.Chem.**, v. 267, p. 12511-12516, 1992.

TEIXEIRA, M.C., COELHO, R.R.; LEAL-CARDOSO, J.H.; CRIDDLE, D.N. Comparative effects of niflumic acid and nifedipine on 5-hydroxytryptamine- and acetylcholine-induced contraction of the rat trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 394, n. 1, p. 117-122, 2000.

THAKKER, R.V. Molecular pathology of renal chloride channels in Dent's disease and Bartter's syndrome. **Exp. Nephrol.**, v. 8, n. 6, p. 351-360, 2000a.

THAKKER, R.V. Pathogenesis of Dent's disease and related syndromes of X-linked nephrolithiasis. **Kidney Int.**, v. 57, n. 3, p. 787-793, 2000b.

THAYER, S.A.; MILLER, R.J. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. **J. Physiol.**, v. 425, p. 85-115, 1990.

THOMAS, E.A.; EHLERT, F.J. Involvement of the M₂ muscarinic receptor in contractions of the guinea pig trachea, guinea pig esophagus and rat fundus. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, n. 6, p. 779-788, 1996.

TOSUN, M.; PAUL, R.J.; RAPOPORT, R.M. Coupling of store-operated Ca⁺⁺ entry to contraction in rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 285, n. 2, p. 759-766, 1998a.

TOSUN, M.; PAUL, R.J.; RAPOPORT, R.M. Intracellular Ca²⁺ elevation and contraction due to prostaglandin F₂ in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 340, p. 203-208, 1997.

TOSUN, M.; PAUL, R.J.; RAPOPORT, R.M. Role of extracellular Ca⁺⁺ influxo via L-type and non-L-type Ca⁺⁺ channels in thromboxane A₂ receptor-mediated contraction in rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 284, n. 3, p. 921-928, 1998b.

TRAFFORD, A.W.; DIAZ, M.E.; EISNER, D.A. Ca-activated chloride current and Na-Ca exchange have different timecourses during sarcoplasmic reticulum Ca release in ferret ventricular myocytes. **Pflügers Arch.**, v. 435, n. 5, p. 743-745, 1998.

TREVES, R.; MAHEU, E.; DREISER, R.L. Therapeutic trials in digital osteoarthritis. A critical review. **Rev. Rhum. Engl.**, v. 62, n. 6, suppl. 1, p. 33S-41S, 1995.

TSIEN, R.W. Calcium channels in excitable cell membranes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 45, p. 341-358, 1983.

TSIEN, R.W.; HESS, P.; McCLESKEY, E.W.; ROSENBERG, R.L. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, v. 16, p. 265-290, 1987.

TSIEN, R.Y. Fluorescence probes of cell signalling. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 12, p. 227-253, 1981.

TSIEN, R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis and properties of prototype structures. **Biochemistry**, v. 19, p. 2396-2404, 1980.

TSIEN, R.Y.; POZZAN, T.; RINK, T.J. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicators. **J. Cell Biol.**, v. 94, p. 325-334, 1982.

UCHIDA, S. In vivo role of CLC chloride channels in the kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, n. 5, p. F802-808, 2000.

ULLMER, C.; BODDEKE, H.G.; SCHMUCK, K.; LUBBERT, H. 5-HT_{2B} receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 6, p.1081-1088, 1996.

VAN HELDEN, D.F. An α -adrenoceptor-mediated chloride conductance in mesenteric veins of the guinea-pig. **J. Physiol.**, v. 401, p. 489-501, 1988.

VANE, J.R. A sensitive method for the assay of 5-HT. **Br. J. Pharmacol.**, v. 12, p. 344-349, 1957.

VOGALIS, F.; PUBLICOVER, N.G.; SANDERS, K.M. Regulation of calcium current by voltage and cytoplasmic calcium in canine gastric smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. C691-700, 1992.

VON WEIKERSTHAL, S.F.; BARRAND, M.A.; HLADKY, S.B. Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells. **J. Physiol.**, v. 516, p. 75-84, 1999.

VON WEIKERSTHAL, S.F.; HICKMAN, M.E.; HLADKY, S.B.; BARRAND, M.A. Hypotonicity-induced changes in anion permeability of cultured rat brain endothelial cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1325, n. 1, p. 99-107, 1997.

WAINSCOTT, D.B.; COHEN, M.L.; SCHENCK, K.W.; AUDIA, J.E.; NISSEN, J.S.; BAEZ, M.; KURSAR, J.D.; LUCAITES, V.L.; NELSON, D.L. Pharmacological characteristics of the newly cloned rat 5-hydroxytryptamine_{2F} receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 43, p. 419-426, 1993.

WAINSCOTT, D.B.; LUCAITES, V.L.; KURSAR, J.D.; BAEZ, M.; NELSON, D.L. Pharmacologic characterization of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor: evidence for species differences. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 276, n. 2, p. 720-727, 1996.

WALDEGGER, S.; JENTSCH, T.J. From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 7, p. 1331-1339, 2000a.

WALDEGGER, S.; JENTSCH, T.J. Functional and structural analysis of CLC-K chloride channels involved in renal disease. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 32, p. 24527-24533, 2000b.

WALSH, K.B.; KASS, R.S. Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed I_K by protein kinase A and C. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. C1081-1090, 1991.

WANG, H.Y.; EBERLE-WANG, K.; SIMANSKY, K.J.; FRIEDMAN, E. Serotonin-induced muscle contraction in rat stomach fundus is mediated by a $G_{\alpha z}$ -like guanine nucleotide binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v 267, p. 1002-1011, 1993.

WANG, J.; KRYSIAK, P.S.; LAURIER, L.G.; SIMS, S.M.; PREIKSAITIS, H.G. Human esophageal smooth muscle cells express muscarinic receptor subtypes M(1) through M(5). **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 279, n. 5, p. G1059-1069, 2000.

WANG, Q.; AKBARALI, H.I.; GOYAL, R.K. Calcium-activated chloride currents in opossum esophageal circular muscle. **Gastroenterology**, v. 106, p. A586, 1994.

WANG, Y.X.; KOTLIKOFF Signalling pathway for histamine activation of non-selective cation channels in equine tracheal myocytes. **J. Physiol.**, v. 523, pt. 1, p. 131-138, 2000.

WEINER, D.M.; LEVEY, A.I.; BRANN, M.R. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 18, p. 7050-7054, 1990.

WHITE, M.M.; AYLWIN, M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 37, n. 5, p. 720-724, 1990.

WILLIAMS, D.A.; FAY, F.S. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin 2. **Am. J. Physiol.**, v. 250, n. 5, pt. 1, p. C779-791, 1986.

WILLIAMS, D.A.; FOGARTY, K.E.; TSIEN, R.Y.; FAY, F.S. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. **Nature**, v. 318, p. 558-561, 1985.

WILSON, C. Inhibition by sulphonylureas of vasorelaxation induced by K^+ channel activators in vitro. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 9, p. 9-16, 1989.

WILSON, K.; ADAIKAN, P.G. As drogas e o sistema reprodutivo. In: PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFMAN, B.B. **Farmacologia integrada**. São Paulo: Manole, 1999. cap. 13, p. 287-304.

WINDER, S.J.; WALSH, M.P. Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contractions. **Cell. Signal**, v. 5, p. 677-686, 1993.

WU, G.; HAMILL, O.P. NPPB block Ca^{++} -activated Cl^- currents in *Xenopus* oocytes. **Pflügers Arch.**, v. 420, n. 2, p. 227-229, 1992.

XU, W.X.; KIM, S.J.; KIM, S.J.; SO, I.; KANG, T.M.; RHEE, J.C.; KIM, K.W. Effect of stretch on calcium channel currents recorded from the antral circular myocytes of guinea-pig stomach. **Pflügers Arch.**, v. 432, n. 2, p.159-164, 1996.

XU, W.X.; KIM, S.J.; SO, I.; KANG, T.M.; RHEE, J.C.; KIM, K.W. Volume-sensitive chloride current activated by hyposmotic swelling in antral gastric myocytes of the guinea-pig. **Pflügers Arch.**, v. 435, n. 1, p. 9-19, 1997.

XUAN, Y.T.; WANG, O.L.; WHORTON, A.R. Thapsigargin stimulates Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle cells: Nicardipine-sensitive and -insensitive pathways. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. C1258-1265, 1992.

YAMAMOTO, K.; COX, J.P.; FRIEDRICH, T.; CHRISTIE, P.T.; BALD, M.; HOUTMAN, P.N.; LAPSLEY, M.J.; PATZER, L.; TSIMARATOS, M.; VAN'T HOFF, W.G.; YAMAOKA, K.; JENTSCH, T.J.; THAKKER, R.V. Characterization of renal chloride channel (CLCN5) mutations in Dent's disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 8, p. 1460-1468, 2000.

YAMAZAKI, J.; DUAN, D.; JANIACK, R.; KUENZLI, K.; HOROWITZ, B.; HUME, J.R. Functional and molecular expression of volume-regulated chloride

channels in canine vascular smooth muscle cells. **J. Physiol.**, v. 507, p. 729-736, 1998.

YUAN, X-J. Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. L959-968, 1997.

ZUCCARELLO, M.; BOCCALETTI, R.; TOSUN, M.; RAPOPORT, R.M. Role of extracellular Ca^{2+} in subarachnoid hemorrhage-induced spasm of the rabbit basilar artery. **Stroke**, v. 27, p. 1896-1902, 1996.

ANEXOS

ANEXOS - A

ANEXOS - B

CÁLCULO ESTIMATIVO DAS ALTERAÇÕES DO POTENCIAL DE MEMBRANA PELA SOLUÇÃO HIPOTÔNICA

Potencial de equilíbrio iônico dado pela equação de Nernst $\rightarrow E_{\text{ion}} = \frac{RT}{nF} \log_e \left(\frac{[\text{ion}]_o}{[\text{ion}]_i} \right)$

R = 1,99 cal/°C/mol ou 8,3 Joule/°C/mol (constante universal dos gases)

T = temperatura em graus Kelvin (310K)

n = valência do íon

F = 23,062 cal/volt/mol ou 96,500 Joule/°C/mol (constante de Faraday)

Se, n=1 e $\log_e = 2,3 \log_{10}$ teremos a equação de Nernst simplificada:

$$E_{\text{ion}} = 61,5 \cdot \log_{10} \left(\frac{[\text{ion}]_o}{[\text{ion}]_i} \right)$$

Utilizando informações de músculo liso canal deferente de cobaio - (Aickin & Brading, 1990)

1) - Em condições normais :

$[K]_o = 5,4 \text{ mM}$	$[Na]_o = 136 \text{ mM}$	$[Cl]_o = 135,5 \text{ mM}$
$[K]_i = 176 \text{ mM}$	$[Na]_i = 10 \text{ mM}$	$[Cl]_i = 53,9 \text{ mM}$
↓	↓	↓
$E_K = -93 \text{ mV}$	$E_{Na} = +70 \text{ mV}$	$E_{Cl} = -25 \text{ mV}$

2) - Solução hipotônica – 50% de NaCl:

$[K]_o = 5,4 \text{ mM}$	$[Na]_o = 68 \text{ mM}$	$[Cl]_o = 67,5 \text{ mM}$
$[K]_i = 176 \text{ mM}$	$[Na]_i = 10 \text{ mM}$	$[Cl]_i = 53,9 \text{ mM}$
↓	↓	↓
$E_K = -93 \text{ mV}$	$E_{Na} = +51 \text{ mV}$	$E_{Cl} = -6 \text{ mV}$

3) - Permeabilidades iônicas relativas (Chipperfield & Harper, 2000)

$\left. \begin{aligned} P_K &= 1,61 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \\ P_{Na} &= 0,2255 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \\ P_{Cl} &= 0,3059 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \end{aligned} \right\}$	\rightarrow	$P_K : P_{Na} : P_{Cl}$ $1 : 0,14 : 0,19$
--	---------------	---

Cálculo do potencial de repouso da membrana (E_m) aplicando a equação de Goldman-Hodgkin-Katz

1) – Em concentrações normais de NaCl:

$$E_m = 61,5 \cdot \log_{10} \left[\frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o} \right]$$

$$E_m = 61,5 \cdot \log_{10} \left[\frac{1,5,4 + 0,14 \cdot 136 + 0,19 \cdot 53,9}{1,176 + 0,14 \cdot 10 + 0,19 \cdot 135,5} \right]$$

$$E_m = -47 \text{ mV}$$

2) -- Em solução hipotônica – 50% de NaCl:

$$E_m = 61,5 \cdot \log_{10} \left[\frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o} \right]$$

$$E_m = 61,5 \cdot \log_{10} \left[\frac{1,5,4 + 0,14 \cdot 68 + 0,19 \cdot 53,9}{1,176 + 0,14 \cdot 10 + 0,19 \cdot 67,5} \right]$$

$$E_m = -54 \text{ mV}$$

ANEXOS - C



Selective inhibitory effects of niflumic acid on 5-HT-induced contraction of the rat isolated stomach fundus

H.C. Scarparo, ²G.C.M. Santos, ²J.H. Leal-Cardoso & ^{*,2}D.N. Criddle

Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Cel. Nunes de Melo 1127, Mangabussu, Fortaleza, CE, Brazil and ²Laboratório de Eletrofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, CCS, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Fortaleza CE 60740-000, Brazil

1 The effects of niflumic acid (NFA), an inhibitor of calcium-activated chloride currents $I_{Cl(Ca)}$, were compared with the actions of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) blocker nifedipine on 5-hydroxytryptamine (5-HT)- and acetylcholine (ACh)-induced contractions of the rat isolated fundus.

2 NFA (1–30 μ M) elicited a concentration-dependent inhibition of contractions induced by 5-HT (10 μ M) with a reduction to $15.5 \pm 6.0\%$ of the control value at 30 μ M. 1 μ M nifedipine reduced 5-HT-induced contraction to $15.2 \pm 4.9\%$ of the control, an effect not greater in the additional presence of 30 μ M NFA.

3 In contrast, the contractile response to ACh (10 μ M) was not inhibited by NFA in concentrations $\leq 100 \mu$ M, although this response was partly inhibited by nifedipine (1 μ M) to $67.6 \pm 11.8\%$ of the control value.

4 NFA (1–30 μ M) did not affect contraction induced by either 20 mM or 60 mM KCl, suggesting that this drug was not acting *via* blockade of VDCCs or activation of potassium channels. In contrast, 3,5-dichlorophenylamine-2-carboxylic acid and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid were less selective in their inhibitory effects, inducing reductions of 60 mM KCl-induced contraction at concentrations $\geq 10 \mu$ M.

5 Our results show that NFA can exert selective inhibitory effects on the chloride-dependent 5-HT-induced contractions of the rat fundus. The data support the hypothesis that activation of $Cl_{(Ca)}$ channels leading to calcium entry *via* VDCCs is a mechanism utilized by 5-HT, but not by ACh, to elicit contraction of the rat fundus.

British Journal of Pharmacology (2000) **130**, 678–684

Keywords: Stomach fundus; niflumic acid; 5-hydroxytryptamine; acetylcholine; $I_{Cl(Ca)}$; chloride

Abbreviations: ACh, acetylcholine; DCDPC, 3,5-dichlorophenylamine-2-carboxylic acid; DIDS, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid; DMSO, dimethyl sulphoxide; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; $I_{Cl(Ca)}$, calcium-activated chloride currents; VDCC, voltage-dependent calcium channels

Introduction

In recent years there has been growing interest in the possible physiological role of calcium-activated chloride channels $Cl_{(Ca)}$ in the contractile responses induced by neurotransmitters in smooth muscle (see Large & Wang, 1996). Fenamates such as niflumic acid (NFA) have been shown to selectively inhibit $I_{Cl(Ca)}$ in isolated smooth muscle cells (Pacaud *et al.*, 1989; Janssen & Sims, 1992; Akbarali & Giles, 1993; Hogg *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1994) aiding a functional evaluation of these channels in smooth muscle.

We have previously shown that NFA reduces the amplitude of noradrenaline-induced contractions in aorta (Criddle *et al.*, 1996). Since the magnitude of inhibition was comparable to that produced by nifedipine, and not further increased by a combination of NFA and nifedipine, we proposed from these functional data that activation of $Cl_{(Ca)}$ by neurotransmitters may lead to a depolarization-induced entry of calcium into the cell *via* voltage-dependent calcium channels (VDCCs) causing contraction of vascular smooth muscle. Subsequent studies with noradrenaline in rat aorta and endothelin in pulmonary artery have provided data to support this hypothesis (Hyvelin *et al.*, 1998; Lamb & Barna, 1998), although important recent evidence in pulmonary artery has also suggested that niflumic

acid may exert relaxant effects independently of chloride channel blockade (Kato *et al.*, 1999). Whether this constitutes a common excitatory mechanism utilized by neurotransmitters to contract smooth muscle in general remains to be determined.

Despite electrophysiological studies showing the existence of $I_{Cl(Ca)}$ in a variety of non-vascular smooth muscle, including trachea (Janssen & Sims, 1992), myometrium (Arnaudeau *et al.*, 1994), ileum (Ito *et al.*, 1993) and oesophagus (Akbarali & Giles, 1993; Wang *et al.*, 1994), little information is available at present regarding the possible functional role of $Cl_{(Ca)}$ channels in visceral smooth muscle. Previously we found that the pressor effects of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the rat mesenteric vascular bed were sensitive to NFA, with approximately 50% of the response being inhibited by a concentration of 30 μ M (Criddle *et al.*, 1997). In the present study we decided to evaluate the effects this $I_{Cl(Ca)}$ blocker on 5-HT-induced contraction of the rat fundus, a non-vascular smooth muscle preparation classically used to assay 5-HT (Vane, 1957). We have compared the effects of NFA and the voltage-dependent calcium channel (VDCC) blocker nifedipine on contractions elicited by 5-HT and acetylcholine (ACh). In addition, we have also evaluated the effects of other putative chloride channel blockers 3,5-dichlorophenylamine-2-carboxylic acid (DCDPC), a structural analogue of NFA, and

*Author for correspondence; E-mail: criddle@uece.br

stilbene derivative, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). Some of these results have previously been presented to the British Pharmacological Society (Criddle *et al.*, 1999).

Methods

Wistar rats (250–350 g) were killed by stunning and cervical dislocation. The abdomen was opened and the fundus removed. The fundus was dissected and washed in Tyrode's solution. Longitudinal strips (10 mm long) were carefully prepared and mounted vertically in an organ bath (10 ml capacity) containing Tyrode's solution bubbled with air (37°C, pH 7.4). Tissues were mounted under an initial resting tension of 2 g and left to equilibrate for a period of 1 h, following which a further 2 g was applied before starting the experimental protocol. Tension changes were recorded using isometric force transducers (Grass Model 113, Quincy, MA, U.S.A.) connected to a Grass chart recorder (Model 5D).

The effects of NFA were assessed on contractions induced by 60 mM KCl, 5-HT (10 μ M) and ACh (10 μ M) with each agent being evaluated in a separate experimental group. Following stable contractions to the contractile agent, NFA was applied in increasing concentrations and further responses recorded (contact time of 15 mins). Since DMSO was used as a solvent for stock solutions of NFA, the effects of this solvent at various concentrations were assessed as time-matched controls on 5-HT-induced contraction of the fundus. In addition, the effects of 1 μ M nifedipine and a combination of 1 μ M nifedipine and 30 μ M NFA were also assessed on 5-HT-induced contraction. Similar experiments were also performed to assess the effects of NFA on 20 mM KCl induced contractions, to examine any potential action to induce potassium conductances. In this protocol 3 μ M levromakalim was employed as a positive control.

In separate experiments, the effect of extracellular chloride removal from the bathing solution on the responses of the contractile agonists was assessed. Initially control contractions to 5-HT (10 μ M) and ACh (10 μ M) were obtained. The tissues were then bathed in a modified Tyrode's solution (0Cl⁻), in which all chloride salts had been substituted by their gluconate equivalents. Since application of 0Cl⁻ solution to the fundus caused a transient contraction, reapplication of 5-HT or ACh was carried out only when basal levels of tone were restored. In addition, the reversibility of any effect on agonist-induced contraction by 0Cl⁻ solution was assessed, by introducing normal (Cl⁻-containing) Tyrode's solution to the bath and repeating the application of 5-HT or ACh.

Materials and drugs

The following drugs were used: 5-hydroxytryptamine (5-HT), acetylcholine (ACh), niflumic acid, DIDS and nifedipine were purchased from Sigma Chemical Company. Levromakalim, DCDPC were generous gifts from SmithKline Beecham and Dr I. Greenwood, respectively. Nifedipine stock solution was prepared in 70% ethanol under conditions of reduced illumination and all experiments with nifedipine were performed under similar conditions. NFA was prepared as a stock solution (10 mM) in dimethyl sulphoxide (DMSO) and added on the day of the experiment in Tyrode's solution.

The bathing solution was a standard Tyrode's solution of the following composition (mM): NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, NaH₂PO₄ 0.36, NaHCO₃ 11.9, glucose 5.5. In

solutions in which the potassium concentration was raised (60 mM), the NaCl concentration was concomitantly reduced to maintain osmolarity. The chloride-free solution was of the same composition as standard Tyrode's solution, except that all the chloride salts were replaced by their gluconate equivalents. The pH was always maintained constant throughout the experimental period at 7.4.

Analysis of data

Data are expressed as the mean of *n* observations \pm s.e.mean. Inhibitory effects are expressed as per cent of control responses in the absence of the drug. Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test and values were taken to be significantly different when *P* < 0.05.

Results

Effects of NFA and nifedipine on contractions induced by 60 mM KCl

Since NFA has been shown to possess actions apart from blockade of I_{Cl(Ca)} when in sufficient concentration, such as the induction of K⁺-currents and blockade of Ca²⁺-channels (Hogg *et al.*, 1994; Greenwood & Large, 1995), we initially assessed the selectivity of this drug by evaluating its effects on 60 mM KCl-induced contractions. In concentrations up to 30 μ M, NFA did not inhibit the contractions induced by KCl, in contrast to nifedipine (1 μ M) which almost completely blocked this response (Figure 1, *n* = 6). 100 μ M NFA, however, started to produce an inhibitory effect on KCl-induced contraction, possibly indicating non-specific effects of the drug (data not shown). Thus only concentrations < 100 μ M were used in subsequent experiments to assess the action of NFA on 5-HT-induced contraction.

Effects of NFA and nifedipine on contractions induced by 5-HT

Application of 5-HT (10 μ M) to the rat fundus induced a tonic contraction (1.52 \pm 0.40 g, *n* = 8) with an oscillatory component superimposed (Figure 2a). In the presence of NFA (1–

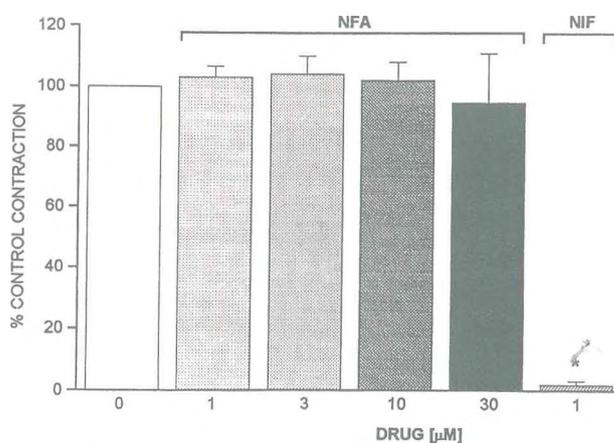


Figure 1 Comparative effects of niflumic acid (NFA 1–30 μ M) and nifedipine (NIF 1 μ M, *n* = 6) on the contraction of the rat isolated fundus induced by 60 mM KCl. Values are shown as the mean \pm s.e.mean of six experiments, and results are shown to differ significantly from the control when *P* < 0.05 (*).

M) the tonic contractions were concentration-dependently inhibited with a maximal reduction to $15.5 \pm 6.0\%$ of the control value at the highest concentration of NFA used (Figure 2b). The inhibitory effect of NFA was fully reversible on washout of the drug from the tissue. In control paired experiments exposed only to the solvent DMSO at equivalent concentrations, the response to 5-HT did not diminish over the experimental period ($n=8$). Interestingly, whilst the tonic contraction of the response was inhibited by NFA, the oscillatory component of the 5-HT response remained largely unaffected (Figure 2a).

In separate experiments $1 \mu\text{M}$ nifedipine, which completely inhibited the contraction induced by 60 mM KCl (Figure 1), reduced the 5-HT-induced contraction to $15.2 \pm 4.9\%$ of control (Figure 3a,b, $n=6$). In contrast to the effects of nifedipine, niflumic acid completely blocked the oscillatory component of the 5-HT response (Figure 3a). The effects of NFA and nifedipine were not additive such that in the combined presence of $1 \mu\text{M}$ nifedipine and $30 \mu\text{M}$ NFA, the 5-HT contraction was decreased to $10.4 \pm 4.7\%$ of the control, a reduction not significantly ($P > 0.05$) greater than that elicited by nifedipine alone (Figure 3a,b, $n=8$).

Effects of NFA and nifedipine on acetylcholine-induced contractions

$10 \mu\text{M}$ induced stable, non-oscillatory contractions of the rat fundus of mean amplitude $3.11 \pm 0.44 \text{ g}$ ($n=7$) (Figure 4a). In contrast to the inhibitory effects on 5-HT-induced contraction, NFA ($10\text{--}100 \mu\text{M}$) did not inhibit contractions induced by $10 \mu\text{M}$ ACh (Figure 4a,b, $n=7$). In separate experiments $1 \mu\text{M}$ nifedipine inhibited the contractions induced by $10 \mu\text{M}$ ACh to $67.6 \pm 11.8\%$ of the control value ($n=4$).

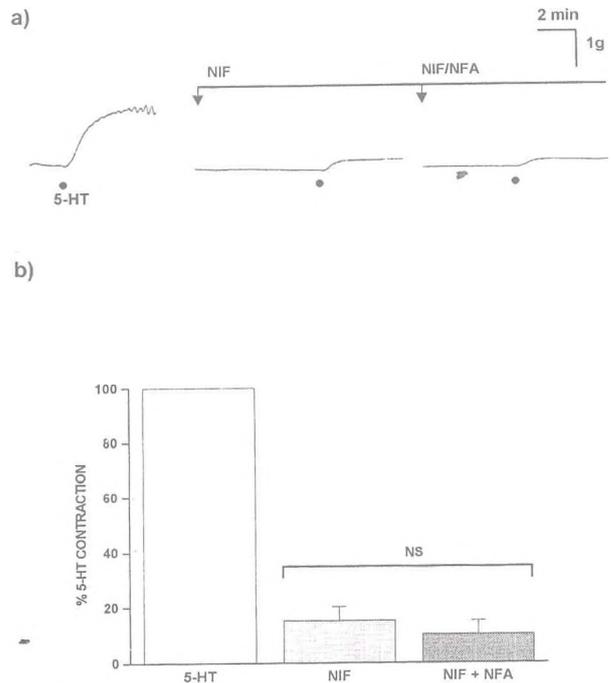


Figure 3 (a) Representative trace and (b) mean data showing the lack of additive inhibitory effect of a combination of nifedipine and niflumic acid (NIF $1 \mu\text{M}$ /NFA $30 \mu\text{M}$), compared with that of nifedipine (NIF, $1 \mu\text{M}$) alone, on the contraction of the rat isolated fundus induced by 5-HT (●, $10 \mu\text{M}$). Values are shown as the mean \pm s.e. mean of eight experiments. N.B. The difference between the responses to 5-HT in the presence of NIF alone and NIF/NFA together was not significant (NS).

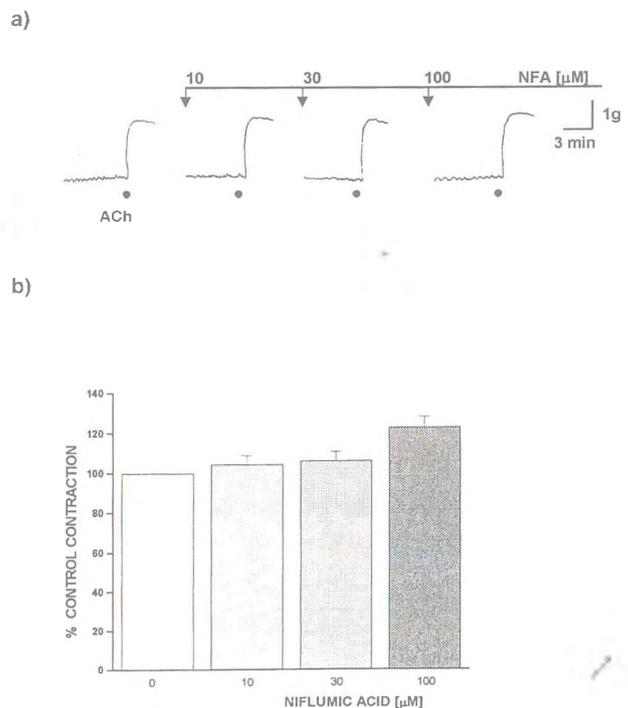
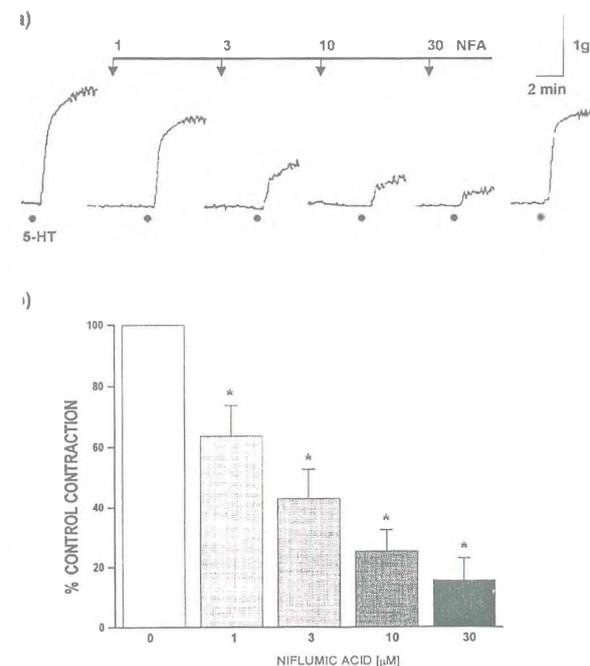


Figure 4 (a) Representative trace and (b) mean data showing the lack of inhibitory effect of niflumic acid (NFA, $10\text{--}100 \mu\text{M}$) on contractions of the rat isolated fundus induced by ACh (●, $10 \mu\text{M}$). Values are shown as the mean \pm s.e. mean of seven experiments, and results are shown to differ significantly from the control when $P < 0.05$ (*).

Effects of 0Cl^- solution on the contractile response to 5-HT and acetylcholine

Replacement of 0Cl^- (gluconate-substituted) physiological solution to the rat fundus elicited a small transient contraction which returned to basal levels within a few minutes. In the continued presence of 0Cl^- the contractile responses to 5-HT ($10\ \mu\text{M}$) and ACh ($10\ \mu\text{M}$) were reduced to $32.2 \pm 6.0\%$ ($n=10$) and $68.2 \pm 11.0\%$ ($n=6$) of their respective control values (Figure 5). These reductions were fully reversible on washout to normal (Cl^- -containing) Tyrode's solution.

Effects of NFA and levcromakalim on 20 mM KCl-induced contractions

20 mM KCl produced reproducible contractions of mean amplitude $3.11 \pm 0.37\ \text{g}$ (Figure 6a, $n=6$). NFA ($30\ \mu\text{M}$) did not inhibit this response, with the contraction being $6 \pm 11.2\%$ of the control value (Figure 6a,b, $n=6$). In contrast the ATP-dependent K^+ -channel opener levcromakalim ($3\ \mu\text{M}$) completely abolished this response (Figure 6a,b, $n=6$).

Effects of DCDPC and DIDS on 5-HT-, ACh- and KCl-induced contractions

In separate experiments the effects of DCDPC, a structural analogue of NFA, and DIDS, a stilbene derivative, were evaluated on the contractions induced by 5-HT ($10\ \mu\text{M}$), ACh ($10\ \mu\text{M}$) and KCl ($60\ \text{mM}$). DCDPC (10 – $100\ \mu\text{M}$) concentration-dependently inhibited the contractions induced by all three spasmogens, with reductions to $13.9 \pm 9.3\%$, $19.6 \pm 7.9\%$ and $28.1 \pm 12.2\%$ of the control responses to 5-HT, ACh and KCl, respectively, at the highest concentration tested (Figure 7c).

In contrast, DIDS (1 – $300\ \mu\text{M}$) was without inhibitory effect on ACh-induced contraction (Figure 8b), whilst contractions induced by 5-HT were inhibited only at the highest concentration used ($300\ \mu\text{M}$) to $68.3 \pm 6.4\%$ of the control value (Figure 8a, $n=6$). The contraction induced by 60 mM KCl, however, was more sensitive to the action of DIDS, with inhibition occurring at concentrations $\geq 30\ \mu\text{M}$ (Figure 8c, $n=6$).

Discussion

The present study has shown that NFA exerts selective, reversible and concentration-dependent inhibitory effects on 5-HT-induced contraction of the rat stomach fundus. These effects occurred at concentrations previously shown to inhibit $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ in a variety of smooth muscle cell types (Pacaud *et al.*, 1989; Janssen & Sims, 1992; Akbarali & Giles, 1993; Hogg *et al.*, 1994). Recently, a detailed study in the rat pulmonary artery has demonstrated that NFA inhibits $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ in isolated myocytes, and both depolarizations and contractions elicited by 5-HT in the intact vessel (Yuan, 1997). Certain evidence exists to support the possibility that 5-HT-induced contraction in the rat fundus, probably via the 5-HT_{2B} subtype (Kursar *et al.*, 1994; Foguet *et al.*, 1992; Baxter *et al.*, 1994; Hoyer *et al.*, 1994), involves the activation of $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. For example, stimulation of rat fundus 5-HT_{2B} receptors expressed in *Xenopus* oocytes has been shown to directly activate $\text{Cl}(\text{Ca})$ channels (Foguet *et al.*, 1992), whilst 5-HT-induced activation of $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ occurs in epithelial cells of the rat choroid plexus (Garner *et al.*, 1993). However, a NFA-sensitive activation of $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ has yet to be shown in isolated myocytes of the rat fundus.

Higher concentrations of NFA than those employed in the current study ($> 50\ \mu\text{M}$) have been shown to inhibit VDCCs and activate K^+ -channels in rabbit portal vein (Hogg *et al.*, 1994) and activate K_{ATP} in rat portal vein (Kirkup *et al.*, 1996). In the rat fundus we found that NFA in concentrations $\leq 30\ \mu\text{M}$ did not inhibit contractions to either 20 mM or 60 mM KCl, in agreement with previous studies in rat aorta (Criddle *et al.*, 1996), mesenteric vascular bed (Criddle *et al.*, 1997), rabbit colon (Patacchini *et al.*, 1996) and rat pulmonary artery (Yuan, 1997). This would appear to indicate that at these concentrations NFA is not interacting with either Ca^{2+}

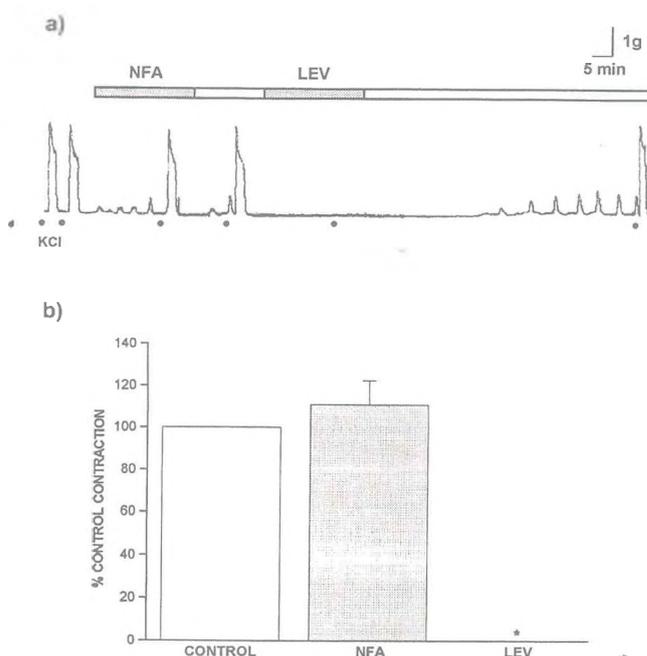


Figure 6 (a) Representative trace and (b) mean data showing the effects of niflumic acid (NFA, $30\ \mu\text{M}$) and levcromakalim (LEV, $3\ \mu\text{M}$) on the contraction of the rat isolated fundus induced by 20 mM KCl (●). Values are shown as the mean \pm s.e. mean of five experiments, and results are shown to differ significantly from the control when $P < 0.05$ (*). N.B. A washout period has been included after the inhibitory effect of levcromakalim to show recovery of the control response to 20 mM KCl (●).

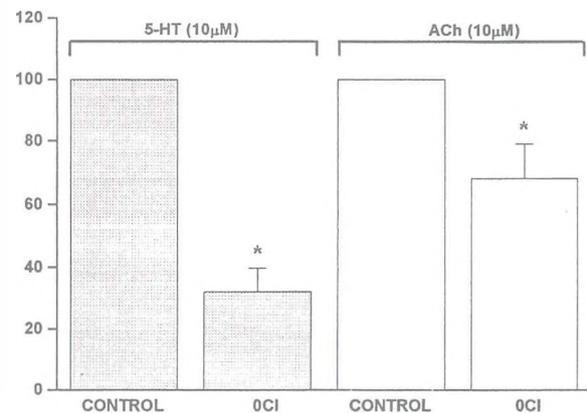
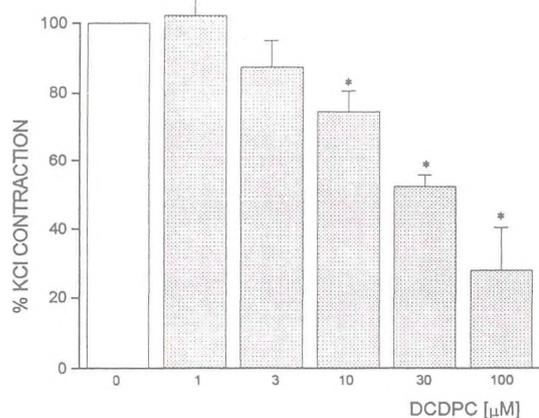
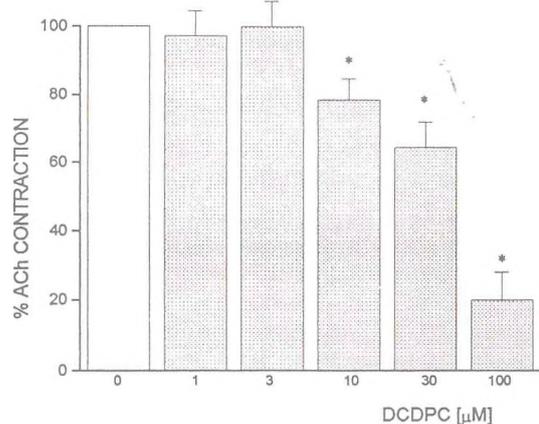
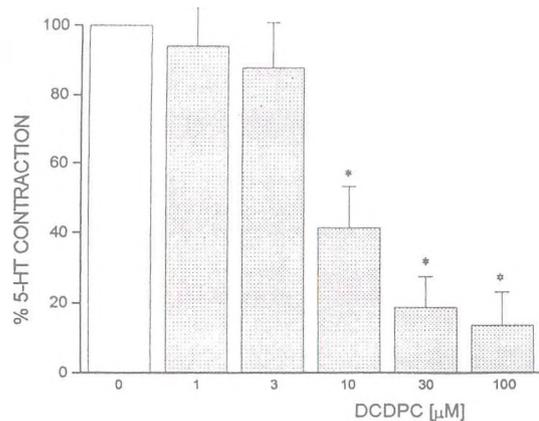


Figure 5 Inhibitory effects of 0Cl^- solution (gluconate-substituted) on contractions of the rat isolated fundus induced by 5-HT ($10\ \mu\text{M}$, $n=10$) and ACh ($10\ \mu\text{M}$, $n=6$). Values are shown as the \pm s.e. mean of n experiments, and results are shown to differ significantly from the control when $P < 0.05$ (*).



7 Effects of 3,5-dichlorophenylamine-2-carboxylic acid PC; 1–100 μM) on the contraction of the rat isolated fundus d by (a) 5-HT (10 μM , $n=9$), (b) ACh (10 μM , $n=6$) and (c) 50 mM, $n=6$). Values are shown as the mean \pm s.e. mean of n nents, and results are shown to differ significantly from the l when $P < 0.05$ (*).

channels in the functional protocols of this study. The f inhibitory effects of NFA contrasted with the profiles of of the VDCC blocker nifedipine and the K^+ -channel r levcromakalim, which completely blocked 60 and 4 KCl-induced contractions of the fundus, respectively. r current data indicate that the magnitude of the tory effect of NFA on 5-HT responses in the fundus % with 30 μM) was greater than that previously found in senteric vascular bed (~50% with 30 μM ; Criddle *et al.*, and pulmonary artery (~55% with 50 μM ; Yuan, 1997).

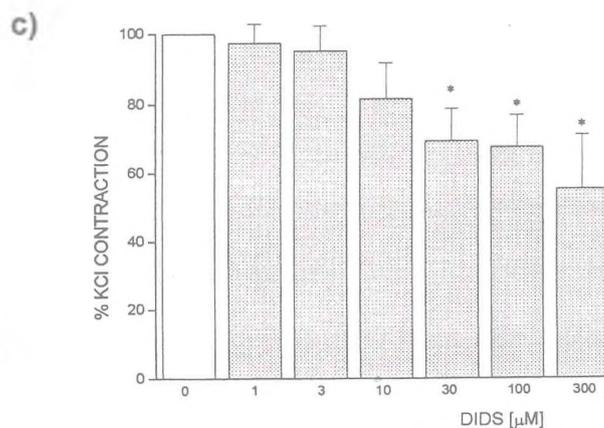
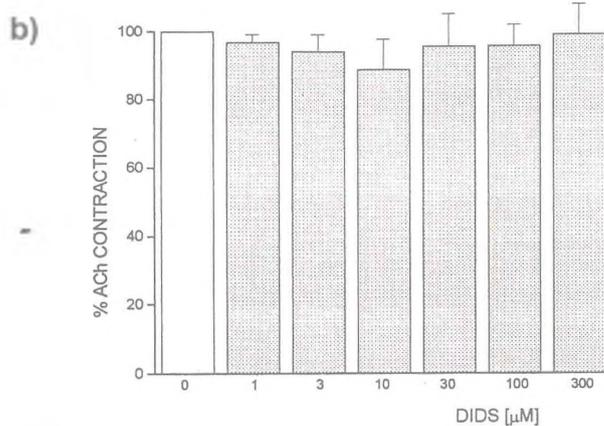
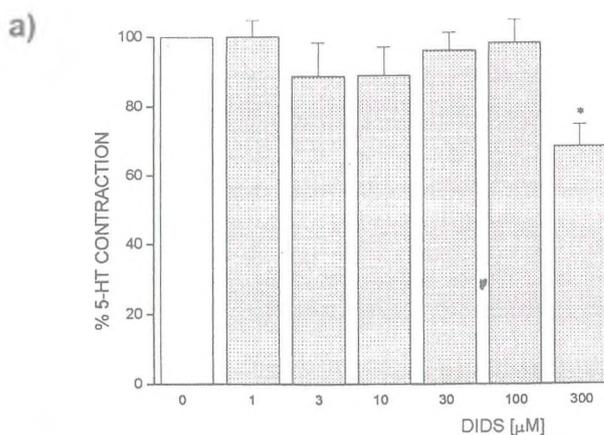


Figure 8 Effects of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS; 1–300 μM) on the contraction of the rat isolated fundus induced by (a) 5-HT (10 μM , $n=6$), (b) ACh (10 μM , $n=8$) and (c) KCl (60 mM, $n=6$). Values are shown as the mean \pm s.e. mean of n experiments, and results are shown to differ significantly from the control when $P < 0.05$ (*).

This may reflect a slightly greater importance of the activation of $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ in the contractile process elicited by 5-HT in the rat fundus compared with these blood vessels, possibly as a consequence of the different subtypes of receptors activated in these tissues (Humphrey *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994). In accord with our previous findings in mesenteric arteries (Criddle *et al.*, 1997), the contractile response to 5-HT in the rat fundus was inhibited to a similar extent by the VDCC blocker nifedipine, the magnitude of which was in close agreement with earlier studies in this tissue using nitrendipine and isradipine (Secrest *et al.*, 1989; Smaili *et al.*, 1991). That the effects of nifedipine and NFA were not additive in the rat

lus is in accord with the hypothesis that activation of $Cl_{(Ca)}$ channels, leading to depolarization, opens VDCCs to contract both muscle (Criddle *et al.*, 1996). This is supported by the findings of an earlier study in rabbit basilar artery showing the contraction, but not the depolarization, induced by 5-HT in rabbit basilar artery is greatly inhibited by nifedipine (Criddle & Garland, 1993). In addition, several studies in coronary artery have reported a similar proportional inhibition of agonist-induced contractions occurring with NFA and nifedipine, using angiotensin II and endothelin-1 as contractile agents (Guibert *et al.*, 1997; Hyvelin *et al.*, 1998), although it should be noted that NFA-induced inhibition of endothelin-1-mediated contraction in this tissue may occur independently of blockade of chloride channels (Kato *et al.*, 1999). However, in the present study, although nifedipine and DCDPC blocked a similar proportion of the 5-HT response in the fundus their actions were clearly fundamentally different. For example, the oscillatory component of the 5-HT-induced contraction persisted when the tonic contraction had been partially reduced by NFA, whereas it was completely blocked by nifedipine.

In contrast to the sensitivity of 5-HT-induced contraction, ACh-induced response was not inhibited by NFA, even at a high concentration of 100 μ M. This lack of effect was not blocked by nifedipine, as previously reported in this preparation (Secrest *et al.*, 1989; Smaili *et al.*, 1991). Accordingly, there was little chloride-dependency exhibited by the ACh contraction, in contrast to the 5-HT-induced response which was greatly reduced when extracellular chloride was replaced by gluconate ions. These observations support the argument that there is little or no involvement of $I_{Cl(Ca)}$ in ACh-induced contraction in the rat fundus. Whilst the authors are currently unaware of any published study examining this possibility, certain evidence from other gastrointestinal smooth muscle would appear to support this hypothesis. For example, depolarization induced by carbachol is much less affected by reductions in extracellular chloride (substituted by benzenesulphonate) than by reductions in extracellular sodium ions in isolated rat fundus (Bolton, 1972), whilst the contraction induced by ACh in canine gastric smooth muscle (Sims, 1992) and the response to carbachol in rabbit jejunum (Benham *et al.*, 1985) appear to be mediated *via* activation of a non-voltage cation conductance.

The other putative $Cl_{(Ca)}$ channel blockers tested in this study, DCDPC and DIDS, proved to be less selective in their inhibitory effects than NFA. For example, although DCDPC inhibited the contractions produced by 5-HT to approximately 14% of the control in common with NFA, it also inhibited contractions to both KCl and ACh within a similar concentration range i.e. 10–100 μ M. DCDPC has previously been shown to inhibit $I_{Cl(Ca)}$ in single cells from rabbit portal vein with a similar potency to NFA (Greenwood & Large, 1997), however, it also activated a K^+ conductance at much lower concentrations. In addition, the indiscriminate inhibitory effects observed in our study may also be related to the ability of this compound to inhibit smooth muscle non-selective cation channels at similar concentrations (Chen *et al.*, 1993). The structurally-distinct chloride channel blocker DIDS exhibited a different profile of action, preferentially depressing the contractile response to KCl, with only a weak inhibition of the 5-HT-induced response apparent at a concentration of 300 μ M. A recent study has suggested that DIDS is more active at suppressing volume-activated chloride currents than $I_{Cl(Ca)}$ in smooth muscle (Greenwood & Large, 1998), possibly explaining the comparative lack of effect of this compound on 5-HT-induced contraction compared with NFA observed in the present study. Further detailed electrophysiological experiments in single cells of the rat fundus would be required to resolve the apparent differences between the chloride channel blockers evaluated in the present functional study.

In conclusion, our results show that NFA exerts selective inhibitory effects on 5-HT-induced contraction of the rat fundus. The comparative inhibitory actions of nifedipine and NFA in this tissue are in accord with similar observations on agonist-induced contraction of vascular smooth muscle (Criddle *et al.*, 1996; 1997; Guibert *et al.*, 1997; Hyvelin *et al.*, 1998), and the current data support the hypothesis that activation of $Cl_{(Ca)}$ channels leading to the entry of extracellular calcium ions through VDCCs, is an excitatory mechanism utilized by 5-HT, but not by ACh, to contract the rat fundus. However, conclusions derived purely from contractile studies must remain cautious, especially in the light of recent evidence casting doubt on the selectivity of currently available chloride channel blockers (Kato *et al.*, 1999).

*This study was supported by the CNPq and FUNCAP.

References

- CRIDDLE, D.N., GILES, W.R. & GARLAND, C.J. (1993). Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated Cl^- currents in rabbit oesophageal smooth muscle. *J. Physiol.*, **0**, 117–133.
- CRIDDLE, D.N., LEPETRE, N. & MIRONNEAU, J. (1994). Chloride and monovalent ion-selective cation currents activated by tytoxin in pregnant rat myometrial cells. *Am. J. Obstet. Gynaecol.*, **171**, 491–501.
- CRIDDLE, D.N., MURPHY, O.E. & BLACKBURN, T.P. (1994). Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5- Γ_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 323–331.
- CRIDDLE, D.N., BOLTON, T.B. & LANG, R.J. (1985). Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells. *Nature*, **316**, 345–347.
- CRIDDLE, D.N., BOLTON, T.B. (1972). The depolarising action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. *J. Physiol.*, **220**, 647–671.
- CRIDDLE, D.N., INOUE, R. & ITO, Y. (1993). Pharmacological characterization of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 793–801.
- CLARK, A.H. & GARLAND, C.J. (1993). Ca^{2+} channel antagonists and inhibition of protein kinase C each block contraction but not depolarization to 5-hydroxytryptamine in rabbit basilar artery. *Eur. J. Pharmacol.*, **235**, 113–116.
- CRIDDLE, D.N., SCARPATO, H.C., SANTOS, G.C.M. & LEAL-CARDOSO, J.H. (1999). Selective inhibitory effects of niflumic acid on 5-HT-induced contraction of the rat isolated fundus. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 103P.
- CRIDDLE, D.N., SOARES DE MOURA, R., GREENWOOD, I.A. & LARGE, W.A. (1996). Inhibitory actions of niflumic acid on noradrenaline-induced contraction of the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1065–1071.
- CRIDDLE, D.N., SOARES DE MOURA, R., GREENWOOD, I.A. & LARGE, W.A. (1997). Inhibitory action of niflumic acid on noradrenaline- and 5-hydroxytryptamine-induced pressor responses in the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 813–818.

- ET, M., HOYER, D., PARDO, L.A., PAREKH, A., FLUXEN, F.W., ALKMAN, H.O., STÜHMER, W. & LÜBBERT, H. (1992). Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO J.*, **11**, 3481–3487.
- IER, C., FENIUK, W. & BROWN, P. (1993). Serotonin activates $5-HT_2$ channels in the apical membrane of the rat choroid plexus epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **239**, 31–37.
- NWOOD, I.A. & LARGE, W.A. (1995). Comparison of the effects of fenamates on Ca-activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 29–2948.
- NWOOD, I.A. & LARGE, W.A. (1997). Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^- -currents in smooth muscle cells by compounds structurally similar to niflumic acid. *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 324P.
- NWOOD, I.A. & LARGE, W.A. (1998). Properties of a Cl^- current activated by cell swelling in rabbit portal vein vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **275**, H1524–H1532.
- ERT, C., MARTHAN, R. & SAVINEAU, J.P. (1997). Oscillatory current induced by angiotensin II in rat pulmonary arterial myocytes: Ca^{2+} dependence and physiological implication. *Cell Calcium*, **21**, 421–429.
- ER, R., WANG, Q. & LARGE, W.A. (1994). Action of niflumic acid evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 977–984.
- ER, R. D., CLARKE, D.E., FOZARD, J.R., HARTIG, P.R., MARTIN, G., MYLECHARANE, E.J., SAXENA, P.R. & HUMPHREY, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, **46**, 157–203.
- ER, R., HARTIG, P. & HOYER, D. (1993). A proposed nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 233–236.
- ER, R., GUIBERT, C., MARTHAN, R. & SAVINEAU, J.P. (1998). Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes. *Am. J. Physiol.*, **275**, L269–L282.
- ER, R., OHTA, T. & NAKAZATO, Y. (1993). Inward current activated by carbachol in rat intestinal smooth muscle cells. *J. Physiol.*, **470**, 395–409.
- ER, R., L.J. & SIMS, S.M. (1992). Acetylcholine activates non-contractile cation and chloride conductances in canine and guinea-tracheal myocytes. *J. Physiol.*, **453**, 197–218.
- ER, R., K., EVANS, A.M. & KOZLOWSKI, R.Z. (1999). Relaxation of endothelin-1-induced pulmonary artery constriction by niflumic acid and NPPB: mechanism(s) independent of chloride channel block. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 1242–1250.
- KIRKUP, A.J., EDWARDS, G., GREEN, M.E., MILLER, M., WALKER, S.D. & WESTON, A.H. (1996). Modulation of membrane currents and mechanical activity by niflumic acid in rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **317**, 165–174.
- KURSAR, J.D., NELSON, D.L., WAINSCOTT, D.B. & BAEZ, M. (1994). Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Mol. Pharmacol.*, **46**, 227–234.
- LAMB, F.S. & BARNA, T.J. (1998). Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction. *Am. J. Physiol.*, **275**, H151–H160.
- LAMB, F.S., VOLK, J.A. & SHIBATA, E.F. (1994). Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. *Circ. Res.*, **75**, 742–750.
- LARGE, W.A. & WANG, Q. (1996). Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **271**, C435–C454.
- PACAUD, P., LOIRAND, G., MIRONNEAU, C. & MIRONNEAU, J. (1989). Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflügers Arch.*, **413**, 629–636.
- PATACCHINI, R., SANTICIOLI, P. & MAGGI, C.A. (1996). Effect of NFA on electromechanical coupling by tachykinin NK₁ receptor activation in rabbit colon. *Eur. J. Pharmacol.*, **303**, 197–204.
- SECRET, R.J., SCHOEPP, D.D. & COHEN, M.L. (1989). Comparison of contractions to serotonin, carbamylcholine and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in rat stomach fundus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **250**, 971–978.
- SIMS, S.M. (1992). Cholinergic activation of a non-selective cation current in canine gastric smooth muscle is associated with contraction. *J. Physiol.*, **449**, 377–398.
- SMAILI, S.S., JURKIEWICZ, N.H., GARCIA, A.G. & JURKIEWICZ, A. (1991). Comparison of the effect of calcium withdrawal from the medium and of blockade of extracellular calcium entry by isradipine on the contractile responses of the isolated rat stomach. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **24**, 953–956.
- VANE, J.R. (1957). A sensitive method for the assay of 5-HT. *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 344–349.
- WANG, Q., AKBARALI, H.I. & GOYAL, R.K. (1994). Calcium-activated chloride currents in opossum esophageal circular muscle. *Gastroenterology*, **106**, A586.
- YUAN, X.-J. (1997). Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone. *Am. J. Physiol.*, **272**, L959–L968.

(Received July 30, 1999)

Revised February 29, 2000

Accepted February 29, 2000)

ANEXOS - D

EFEITOS ANTI-ESPASMÓDICOS DO 3,5-DICLOROFENILAMINA 2-CARBOXÍLICO EM FUNDO DE ESTÔMAGO DE RATO*

Anti-spasmodic effects of the 3,5-dichlorophenylamine 2-carboxylic in rat stomach fundus

Henrique Clasen Scarparo¹; Geam Carles Mendes Santos²; José Henrique Leal-Cardoso²; David Neil Criddle³

RESUMO

Investigamos os efeitos inibitórios do 3,5-diclorofenilamina 2-carboxílico (DCDPC), um bloqueador dos canais de cálcio ativados pelo cálcio ($Cl_{(Ca)}$), sobre as contrações das pela 5-HT, ACh e KCl em fundo isolado de estômago para avaliar a adequação dessa droga como ferramenta cológica em estudos funcionais. O DCDPC (10-100 μ M) produziu efeitos inibitórios de maneira dependente da concentração sobre a contração induzida pela 5-HT (10 μ M), com IC_{50} para $13,9 \pm 9,3$ do valor controle ($IC_{50} = 10,8 \mu$ M). No entanto, os efeitos não foram seletivos, desde que houve uma redução das contrações induzidas pela KCl e ACh, com valores de IC_{50} de 18,4 e 49,3 μ M, respectivamente, sugerindo ações além da inibição dos $Cl_{(Ca)}$. Concluímos que o DCDPC parece não ser uma droga adequada como ferramenta cológica para os estudos funcionais dos $Cl_{(Ca)}$ em músculo, por falta de seletividade.

Palavras-chave: Canais de cloreto ativados pelo cálcio, ácido 3,5-diclorofenilamina 2-carboxílico (DCDPC), fundo de estômago, 5-hidroxitriptamina (5-HT), contração.

ABSTRACT

We investigated the inhibitory effects of the 3,5-dichlorophenylamine 2-carboxylic acid (DCDPC), a calcium-activated chloride channel ($Cl_{(Ca)}$) blocker, on the contractions induced by 5-HT, ACh, and KCl in rat isolated stomach fundus, to evaluate its suitability as a selective pharmacological tool in functional studies. DCDPC (10-100 μ M) produced concentration-dependent inhibitory effects on the contraction induced by 5-HT (10 μ M), with a reduction to $13,9 \pm 9,3$ of the control value ($IC_{50} = 10,8 \mu$ M). However, these effects were not selective since a reduction of the contractions induced by KCl and ACh also occurred, with IC_{50} values of 18.4 and 49.3 μ M, respectively, suggesting actions apart from $Cl_{(Ca)}$ inhibition. We conclude that DCDPC appears not to be a suitable drug for use as a pharmacological tool in functional studies of $Cl_{(Ca)}$ in smooth muscle, due to its lack of selectivity.

Keywords: Calcium-activated chloride channels ($Cl_{(Ca)}$), 3,5-dichlorophenylamine 2-carboxylic acid (DCDPC), stomach fundus, 5-hydroxytryptamine (5-HT), contraction.

financieiro: CNPq e FUNCAP.

¹ Departamento Farmacologia e Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Eletrofisiologia, CCS, Universidade Estadual do Ceará.

³ Departamento Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará. E-mail: criddle@uece.br

INTRODUÇÃO

Pesquisas anteriores sugerem que os canais de cloreto dos pelo cálcio ($Cl_{(Ca)}$) possuem importante papel fisiológico participando na despolarização da membrana e contração do músculo liso (LARGE & WANG, 1996). Trabalhos realizados em células isoladas de músculo liso demonstram que o ácido níflúmico (NFA) inibe seletivamente os canais $Cl_{(Ca)}$ (LAUD et al., 1989; JANSSEN & SIMS, 1992; AKBARALI et al., 1993; HOGG et al., 1994; LAMB et al., 1994), possibilitando uma avaliação funcional dos $Cl_{(Ca)}$ em tecidos isolados.

Recentemente demonstrou-se que o ácido níflúmico também possui efeitos inibitórios sobre contrações induzidas por neurotransmissores, em aorta (CRIDDLE et al., 1996) e em músculo mesentérico vascular isolado perfundido (CRIDDLE et al., 1997) de ratos, sem interferir com os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) ou canais de potássio sensíveis à glibenclolamida (GPI). Propôs-se que a ativação dos $Cl_{(Ca)}$ pelo cálcio intracelular inicie o processo de despolarização da membrana até que esta atinja o potencial capaz de ativar os VDCC, levando ao influxo do cálcio externo e contração do músculo liso (CRIDDLE et al., 1996).

Em células de músculo liso de veia porta de coelhos, o ácido 3,5-diclorofenilamina 2-carboxílico (DCDPC), um bloqueador de canais de cloreto ativados pelo cálcio ($Cl_{(Ca)}$) essencialmente similar ao NFA, mostrou inibir as $ICl_{(Ca)}$ na mesma concentração do NFA, apesar de induzir uma condutância dependente de potássio (K^+) em concentrações menores (GREENWOOD & GREENWOOD, 1997). Baseando-se nessas observações eletrofisiológicas, o DCDPC parece ser menos seletivo na inibição dos canais $Cl_{(Ca)}$ do que o NFA, embora não haja informações sobre a propriedade tenha conseqüências funcionais.

O efeito seletivo do NFA na contração induzida pela 5-hidroxitriptamina (5-HT) em fundo de estômago de rato, demonstrado sem afetar a resposta induzida pelo potássio pela acetilcolina (CRIDDLE et al., 1999). Então, decidiu-se comparar os efeitos do DCDPC sobre as contrações induzidas pelas mesmas substâncias, nesta preparação, com os resultados obtidos previamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratos machos Wistar pesando entre 250 e 350 gramas foram sacrificados por concussão cerebral e deslocamento cervical. Através de uma incisão na região abdominal, o estômago foi dissecado, removido e imediatamente imerso em solução fisiológica de Tyrode. Em seguida, preparou-se, cuidadosamente, tiras de fundo do estômago de aproximadamente 2 cm de comprimento, as quais foram montadas verticalmente em solução de Tyrode e mantidas com borbulhamento de ar, 37°C e pH 7,4. A partir da montagem da preparação em repouso, foi aplicada uma tensão prévia de aproximadamente 2-3 gramas e aguardado-se que a mesma se estabilizasse e assumisse sua linha basal. Posteriormente, aplicou-se uma nova tensão até que a preparação assumisse o estado de equilíbrio durante 1 hora sob tensão de aproxima-

damente 1 grama, antes de iniciar o experimento. As variações de tensões foram transformadas por um transdutor de força isométrico (Grass Model FTO.3, Quincy, Mass., USA), conectado a um pré-amplificador e coletadas utilizando um sistema computadorizado (WINDAQ).

Os efeitos do DCDPC e da nifedipina (1 μ M) foram avaliados sobre as contrações induzidas pela 5-HT (10 μ M), ACh (10 μ M) e KCl (60 mM), onde cada um foi observado em grupo experimental separado. Após a obtenção de pelo menos duas respostas contráteis estáveis do agonista controle, o DCDPC foi aplicado em concentrações crescentes (1-100 μ M).

As respostas dos contráteis foram obtidas após o decorrer de 10 minutos de contato do DCDPC e da nifedipina com a preparação. Em seguida, a preparação foi lavada com a solução de banho de Tyrode normal por 15 minutos antes da aplicação da concentração subsequente. Desde que o Dimetil sulfoxido (DMSO) fora utilizado como solvente para a solução estoque de DCDPC, avaliamos os seus possíveis efeitos sobre as contrações induzidas pela 5-HT, paralelamente em tecidos pareados, em concentrações equivalentes às aquelas utilizadas de DCDPC.

2.1 Drogas e Soluções

As drogas 5-hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina (ACh) e nifedipina (Nif) foram compradas da Sigma Chemical Company. O DCDPC foi gentilmente cedido pelo Dr. I. Greenwood (St. Georges Hospital Medical School, London, U.K.). As soluções de 5-HT e ACh foram preparadas em água deionizada. A nifedipina e o DCDPC foram preparados em soluções padrão de álcool etílico e DMSO, respectivamente, ambas na concentração de 10 μ M. As demais diluições necessárias para todas as drogas foram feitas no dia do experimento em Tyrode normal.

2.2 Análise Estatística

Os dados estão expressos pelas médias do número de observações \pm erro padrão. Os efeitos inibitórios são mostrados em percentuais da resposta controle obtida na ausência da droga. Para a análise estatística, utilizou-se o test t-Student, aceitos como estatisticamente diferentes os valores para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos do DCDPC nas Contrações Induzidas pela Acetilcolina (ACh), Serotonina (5-HT) e Cloreto de Potássio (KCl)

Aplicações de ACh (10 μ M), 5-HT (10 μ M) e KCl (60 mM) em tecido isolado de fundo de estômago de rato, induziram contrações sustentadas comparáveis equivalentes a $2,38 \pm 0,30$ g (n=6), $2,43 \pm 0,34$ g (n=9) e $2,02 \pm 0,22$ g (n=6), respectivamente. As contrações induzidas pela ACh, 5-HT e KCl exibiram padrões diferentes. Por exemplo, a 5-HT apresentou uma contração com platô oscilatório, enquanto o KCl e ACh mostraram contrações tônicas sem oscilações.

Na presença de DCDPC (10-100 μM) as contrações induzidas pela ACh, 5-HT e KCl foram inibidas de maneira dependente de concentração (Figura 1), sendo a redução para $62 \pm 7,9\%$, $13,93 \pm 9,32\%$ e $20,87 \pm 5,38\%$, da resposta controle com a maior concentração, respectivamente. Dentre os agentes contráteis, a 5-HT apresentou maior sensibilidade ao DCDPC, cujos os valores das IC_{50} foram 49,27 μM , 76 μM , 18,42 μM , respectivamente (Tabela 1). Após a lavagem, o efeito inibitório do DCDPC foi completamente revertido. Nos controles pareados de DMSO, em concentrações equivalentes às das DCDPC, as respostas da 5-HT permaneceram inalteradas ao longo do período experimental (n=7).

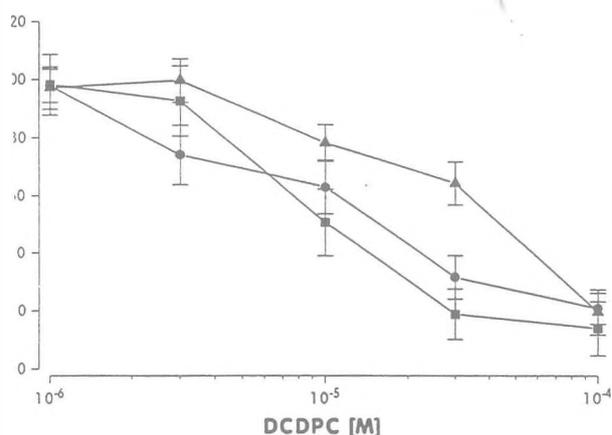


Figura 1 – Efeitos inibitórios do DCDPC sobre as contrações induzidas pela 5-HT 10 μM (■), n=9, ACh 10 μM (▲), n=6 e 50 mM (●), n=6, em fundo isolado de estômago de rato. Os valores mostrados são percentuais médios de “n” observações \pm erro médio padrão (barras verticais).

3.2 Efeitos da Nifedipina nas Contrações Induzidas pela Acetilcolina (ACh), Serotonina (5-HT) e Cloreto de Potássio (KCl)

Na presença de 1 μM de nifedipina a resposta contrátil de KCl (60 μM) foi quase que completamente bloqueada, sendo reduzida para $1,87 \pm 1,21\%$ do valor controle. A contração induzida pela 5-HT (10 μM) foi inibida pela nifedipina (1 μM) nas mesmas proporções do DCDPC (100 μM), sendo $15,20 \pm 4,92\%$ (n=8) do valor controle. Em contraste, o grau de inibição da nifedipina (1 μM) na contração induzida pela ACh (10 μM) foi bem menor, sendo reduzido para $67,56 \pm 11,84\%$ (n=4) da resposta controle (Figura 2).

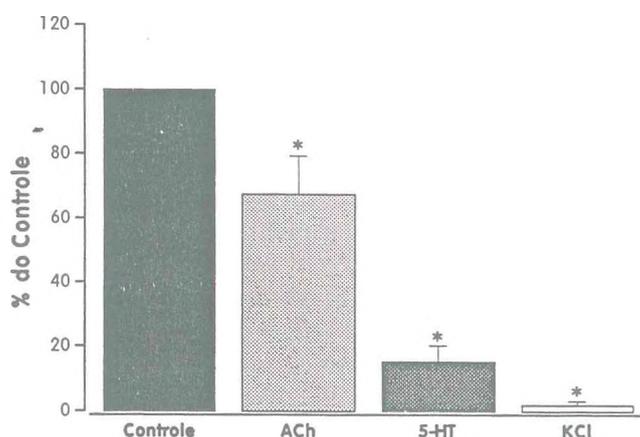


Figura 2 – Efeito inibitório da nifedipina (1 μM) sobre as contrações induzidas pela 5-HT (10 μM , n=8), ACh (10 μM , n=4) e KCl (60 mM, n=7) em fundo isolado de estômago de rato. Os valores são percentuais médios \pm erro médio padrão (barras verticais) de “n” observações. O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Valores de IC_{50} do DCDPC sobre as contrações induzidas pela 5-HT, ACh e KCl em fundus de estômago de rato.

Agente contrátil (dose)	IC_{50} [M]
5-HT (dose)	$1,07 \times 10^{-5}$ (0,49 – 1,63, n=9)
KCl (dose)	$1,84 \times 10^{-5}$ (0,25 – 3,43, n=6)
ACh	$4,93 \times 10^{-5}$ (3,24 – 6,62, n=6) *

Valores são apresentados como médias de “n” observações (* $p < 0,05$ comparação à 5-HT). Os limites de confiança de (95%) estão incluídos em parêntesis.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que o DCDPC, um análogo do exerce um efeito reversível, não-seletivo e inibitório, dependente de concentração, sobre as contrações induzidas pela ACh e KCl, em musculatura lisa longitudinal de fundo de estômago de rato. Essa inibição ocorreu na mesma faixa de concentração em que inibiu correntes de $Cl_{(Ca)}$, em células musculares isoladas de veia porta de coelhos (GREENWOOD & JEFFREY, 1997). Há evidências que suportam a possibilidade de contração induzida pela 5-HT, em fundo de estômago de rato pela ativação do subtipo de receptores 5-HT_{2B} (KURSAR et al, 1994; BAXTER et al, 1994; HOYER et al, 1994), estaria relacionada à ativação dos canais de $Cl_{(Ca)}$ (FOGUET et al, 1992).

Nesse estudo, mostramos que na concentração de 10 μ M o DCDPC inibiu a resposta da 5-HT de forma similar à observada com o 30 μ M de NFA, na mesma preparação (CRIDDLE et al, 1999), sendo a redução para aproximadamente 15% do valor controle. Interessantemente, o grau de inibição da nifedipina (1 μ M) também ocorreu nas mesmas condições do DCDPC e do NFA (CRIDDLE et al, 1999), sustentando a hipótese de que a ativação dos canais $Cl_{(Ca)}$ induzida pela 5-HT levaria à abertura dos canais VDCC, permitindo o influxo de cálcio e conseqüente contração (CRIDDLE et al, 1996). Um estudo detalhado mostrou a importância do cálcio extracelular na contração induzida 5-HT, em fundo de estômago de rato (COX & COHEN, 1995).

Por outro lado, o perfil dos efeitos do DCDPC, no presente estudo, foi bem diferente ao do NFA. Por exemplo, o DCDPC inibiu as contrações induzidas pela ACh e KCl em preparações nas quais o NFA não mostrou nenhum efeito (CRIDDLE et al, 1999). Experiências eletrofisiológicas prévias sustentam a capacidade do DCDPC em afetar outros canais além dos $Cl_{(Ca)}$, como a ativação da condutância de cálcio em veia porta de coelho (GREENWOOD & LARGE, 1997), a ativação de correntes retificadoras de potássio (JAGGERS & ASHMORE, 1998) e inibição de canais catiônicos voltagem-dependentes e de VDCC (CHEN et al, 1993).

No presente estudo, os efeitos inibitórios do DCDPC sobre as respostas induzidas pela ACh podem ter ocorrido por um mecanismo independente da inibição dos $Cl_{(Ca)}$, como, por exemplo, bloqueio de canais catiônicos não-seletivos, um mecanismo utilizado pela ACh em músculo liso respiratório (GREENWOOD & SIMS, 1992) e gastrointestinal (SIMS, 1992; GREENWOOD et al, 1985). É pouco provável o envolvimento dos $Cl_{(Ca)}$ na contração induzida pela ACh em fundo de estômago de rato, uma vez que o NFA não mostrou efeito inibitório e o cloreto foi substituído pelo gluconato na solução de fundo de estômago, a resposta da ACh foi também muito menos afetada pela inibição à 5-HT (CRIDDLE et al, 1999). Em nosso estudo, a contração induzida pela ACh foi muito menos sensível à nifedipina, condizente com os resultados de (SECRET et al, 1999), mostrando a importância de outros mecanismos como, por exemplo, a liberação de cálcio intracelular e o influxo de cálcio independente dos VDCC, utilizados pelos neurotransmissores (BOLTON, 1979).

O DCDPC inibiu as contrações induzidas pelo KCl (60 μ M) com valor de IC_{50} semelhante ao da 5-HT. Desde que a nifedipina (1 μ M) inibiu completamente a contração induzida pelo KCl, o influxo de cálcio pelos VDCC parece ser importante no seu mecanismo de ação. Estudo prévio demonstrou a capacidade do DCDPC em inibir os VDCC em músculo gastrointestinal (CHEN et al, 1993) que, possivelmente, explicaria o efeito inibitório do DCDPC sobre o KCl nesse estudo funcional.

Concluindo, este estudo mostrou que o DCDPC, um análogo estrutural do NFA, apresentou efeito inibitório não seletivo sobre as contrações induzidas pela 5-HT, ACh e KCl em fundo de estômago de rato, o que não foi observado em nossos estudos anteriores com NFA (CRIDDLE et al, 1999), indicando ser o NFA mais seletivo no bloqueio dos $Cl_{(Ca)}$, como também reportado por (GREENWOOD & LARGE, 1997), em células isoladas. Portanto, o DCDPC parece não ser uma droga adequada como ferramenta farmacológica para os estudos funcionais dos $Cl_{(Ca)}$ em músculo liso, por falta de seletividade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARALI, H.I. & GILES, W.R. 1993. Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated Cl^- currents in rabbit oesophageal smooth muscle. *J. Physiol.*, 460: 117-133.
- BAXTER, G.S., MURPHY, O.E. & BLACKBURN, T.P. 1994. Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 323-331.
- BENHAM, C.D., BOLTON, T.B. & LANG, R.J. 1985. Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells. *Nature*, 316: 345-347.
- BOLTON, T.B. 1979. Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 59: 606-718
- CHEN, S., INOUE, R., ITO Y 1993. Pharmacological characterization of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 793-801.
- CLARK, A.H., GARLAND, C.J. 1993. Ca^{2+} channel antagonists and inhibition of protein kinase C each block contraction but not depolarization to 5-hydroxytryptamine in rabbit basilar artery. *Eur. J. Pharmacol.*, 235: 113-116.
- COX, D.A., COHEN, M.L. 1995. 5-Hydroxytryptamine_{2B} Receptor Signaling in Rat Stomach Fundus: Role of Voltage-Dependent Calcium Channels, Intracellular Calcium Release and Protein Kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272: 143-150.
- CRIDDLE, D.N., SOARES DE MOURA, R., GREENWOOD, I.A., LARGE, W.A. 1996. Inhibitory actions of niflumic acid on noradrenaline-induced contraction of the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 118: 1065-1071.
- CRIDDLE, D.N., SOARES DE MOURA, R., GREENWOOD, I.A., LARGE, W.A. 1997. Inhibitory action of niflumic acid on noradrenaline- and 5-hydro-

- tyryptamine-induced pressor responses in the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 120: 813-818.
- DDLE, D.N., SCARPARO, H.C., SANTOS, G.C.M., LEAL-CARDOSO, J.H. 1999 Selective inhibitory effects of niflumic acid on 5-HT-induced contraction of the rat isolated fundus. *Br. J. Pharmacol.*, 126: 103P.
- FUET, M., HOYER, D., PARDO, L.A., PAREKH, A., FLUXEN, F.W., KALKMAN, H.O., STÜHMER, W., LÜBBERT, H. 1992. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO J.*, 11: 3481-3487.
- FENWOOD, I.A., LARGE, W.A. 1997. Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in smooth muscle cells by compounds structurally similar to niflumic acid. *Br. J. Pharmacol.*, 123: 324P.
- GG, R., WANG, Q., LARGE, W.A. 1994. Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 977-984.
- YER, D., CLARKE, D.E., FOZARD, J.R., HARTIG, P.R., MARTIN, G.R., MYLECHARANE, E.J., SAXENA, P.R., HUMPHREY, P.P. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, 46: 157-203.
- ISSEN, L.J., SIMS, S.M. 1992. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J. Physiol.*, 453: 197-218.
- JAGGER, D.J., ASHMORE, J.F. 1998. A potassium current in guinea-pig outer hair cells activated by ion channel blocker DCDPC. *Neuroreport.*, 9 (17): 3887-91.
- KURSAR, J.D., NELSON, D.L., WAINSCOTT, D.B., BAEZ, M. 1994. Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Mol. Pharmacol.*, 46: 227-234.
- LAMB, F.S., VOLK, J.A., SHIBATA, E.F. 1994. Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. *Circ. Res.*, 75: 742 - 750.
- LARGE, W.A., WANG, Q. 1996. Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activated Cl^{-} conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 271: C435-C454.
- PACAUD, P., G. LOIRAND, C. MIRONNEAU, MIRONNEAU, J. 1989. Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pfluegers Arch.*, 413: 629-636.
- SECRET, R.J., SCHOEPP, D.D., COHEN, M.L. 1989. Comparison of contractions to serotonin, carbamylcholine and prostaglandin F_{2a} in rat stomach fundus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250 (3): 971-978.
- SIMS, S.M. 1992. Cholinergic activation of a non-selective cation current in canine gastric smooth muscle is associated with contraction. *J. Physiol.*, 449: 377-398.