

**Caracterização e modulação das correntes de cálcio e
potássio dependentes de voltagem em células
quimiorreceptoras tipo I do corpo carotídeo de ratos
adultos**

Maria Jeane Margort e Silva

**Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Farmacologia do Departamento de Fisiologia e
Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará, em cumprimento às
exigências para obtenção do grau de Doutor em
Farmacologia.**

**Universidade Federal do Ceará
Fortaleza - 1996**

Esta Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Maria Jeane Margot e Silva

TESE APROVADA EM 27/11/196

Prof. José Henrique Leal Cardoso, Ph.D.

Prof. Manassés Claudino/Fonteles, Ph.D.

Prof. Carlos Costa Peres, Ph.D.

Prof. Eduardo Antônio Conde Garcia Dr.

Prof. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, Dr.

À Deus

Ao meu esposo Fawzi Salah M. Naji.
Ao meu filho Amier Fawzi Silva Naji

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
de Ciências da Saúde

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. José Henrique Leal Cardoso pela orientação criteriosa, sugestões valiosas e pela amizade.

À Profa Deborah L. Lewis pela orientação, além de ter gentilmente fornecido condições para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Stephen R. Ikeda pelo estímulo, sugestões e pela amizade, além de ter gentilmente fornecido os protocolos experimentais de sua autoria.

Ao Prof. Manoel Odorico de Moraes pelo incentivo e amizade.

Ao amigo Marco Aurélio de Paula Broto pela ajuda técnica nos experimentos que envolveram a determinação intracelular de íons cálcio.

À Elizabeth Zboran pela assistência técnica.

Ao NIH (National Institute of Health) e Medical College of Georgia pelo apoio financeiro.

Índice

	pag
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xiii
Abstract	xv
1.0 Introdução	01
2.0 Materiais e Métodos	18
2.1 Isolamento celular	18
2.2 Ensaio imunocitoquímico da tirosina hidroxilase	19
2.3 Técnicas eletrofisiológicas	20
2.3.1 Correntes macroscópicas de Ca ²⁺	20
2.3.2 Correntes macroscópicas de K ⁺	23
2.3.3 Correntes unitárias de K ⁺	24
2.4 Medidas dos níveis intracelulares de Ca ²⁺	25
2.5 Aplicação das drogas durante os experimentos eletrofisiológicos	28
2.6 Análise estatística	30
3.0 Resultados	31
3.1 Identificação morfológica e imunocitoquímica das células tipo I	

do corpo carotídeo de ratos adultos	31
3.2 Características das correntes de Ca^{2+} em células tipo I	33
3.2.1 Correntes macroscópicas de Ca^{2+}	33
3.2.2 Canais de Ca^{2+} tipo L sensíveis a diidropiridina	41
3.2.3 Canais de Ca^{2+} tipo N sensíveis a ω -conotoxina GVIA	44
3.2.4 Efeitos da ω -agatoxina IVA e ω -conotoxina MVIIC sobre as correntes de Ca^{2+} em células tipo I	46
3.2.5 Contribuição relativa dos canais de Ca^{2+} tipo L e do tipo N	49
3.3 Modulações das correntes de Ca^{2+} em células tipo I	51
3.4 Efeito do SNAP sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+}	56
3.5 Efeito do SNAP sobre as correntes de K^{+} dependentes de Ca^{2+}	62
3.5.1 Efeito SNAP sobre as correntes macroscópica e unitária de K^{+}	65
4.0 Discussão	71
4.1 Caracterização e modulação das correntes de Ca^{2+} em células tipo I	71
4.2 Modulação de correntes de K^{+} em células tipo I	74
5.0 Conclusões	82
6.0 Referências bibliográficas	83

Lista de figuras

	pag
Fig. 01 Desenho esquemático do processo de quimiotransdução	07
Fig. 02 Aspectos morfológicos de uma célula tipo I	32
Fig. 03 Correntes de Ca^{2+} de células tipo I	34
Fig. 04 Curva de inativação das correntes de Ca^{2+}	36
Fig. 05 Curva de comparação das conductâncias ao Ba^{2+} e ao Ca^{2+}	37
Fig. 06 Curva de sensibilidade a $500 \mu\text{M}$ Cd^{2+} das correntes de Ca^{2+}	39
Fig. 07 Curva de sensibilidade a $25 \mu\text{M}$ Cd^{2+} das correntes de Ca^{2+}	40
Fig. 08 Efeito do (+)202-791 sobre as correntes de Ca^{2+}	42
Fig. 09 Efeito da nimodipina sobre as correntes de Ca^{2+}	43
Fig. 10 Efeito da ω -CgTx GVIA sobre as correntes de Ca^{2+}	45
Fig. 11 Efeito da ω -CgTx MVIIC sobre as correntes de Ca^{2+}	47
Fig. 12 Efeito da ω -CgTx MVIIC sobre as correntes de Ca^{2+} após pré-tratamento com ω -CgTx GVIA	48
Fig. 13 Correntes de Ca^{2+} tipo L e do tipo N em células tipo I	50
Fig. 14 Propriedades das correntes de Ca^{2+} resistentes aos efeitos combinados da nimodipina e ω -CgTx GVIA	52
Fig. 15 Efeito do SNAP sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+}	57
Fig. 16 Efeito do SNAP sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} após pré-tratamento com cafeína	59
Fig. 17 Sensibilidade da corrente de K^{+} à Iberiotoxina	63
Fig. 18 Efeito do SNAP sobre a corrente macroscópica de K^{+}	66
Fig. 19 Amplitude da corrente unitária de K^{+} dependente de Ca^{2+} num pulso de voltagem de +50 mV	68

- Fig. 20 Amplitude da corrente unitária de K^+ dependente
de Ca^{2+} num pulso de voltagem de +80 mV 69
- Fig. 21 Efeito do SNAP sobre a atividade do canal isolado
de K^+ dependente de Ca^{2+} 70

Lista de tabelas

pag.

Tabela 01. Efeito de neurotransmissores, peptídeos e segundos mensageiros sobre a corrente de Ca^{2+}	55
Tabela 02. Efeito do SNAP sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} em células tipo I	61

Lista de abreviaturas

Ach	Acetilcolina
Ang II	Angiotensina II
ω -Aga IVA	ω -agatoxina IVA
Ba ²⁺	Íon bário
8-Br-cGMP	8-bromo-guanosina 3':5'-monofosfato cíclica
Ca ²⁺	Íon cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de íons cálcio
Cd ²⁺	Íon cádmio
ChTx	Charibdotoxina
CPA	Ácido ciclopiazônico
CO ₂	Gás carbônico
ω -CgTX GVIA	ω -conotoxina GVIA
ω -CgTX MVIIC	ω -conotoxina MVIIC
DA	Dopamina
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro padrão da média
GMPC	Guanosina monofosfata cíclica
G Ω	Giga Ohm
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HEPES	Ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

5-HT	Serotonina
IbTx	Iberiotoxina
IP ₃	Trifosfato de inositol
I-V	Corrente-Voltagem
K ⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
MEM	Meio essencial mínimo
Mg ²⁺	Íon magnésio
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmol
ms	Milisegundo
mV	Milivolt
MΩ	Mega Ohm
Na ⁺	Íon sódio
NE	Norepinefrina
Ni ²⁺	Íon níquel
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
pA	Pico ampères
PBS	Salina tampão fosfato
pCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico
pF	Pico faraday
pH _c	pH extracelular
pH _i	pH intracelular
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato

pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
pS	Pico siemens
s	segundo
SNAP	S-nitroso-acetilpenicilamina
SNC	Sistema nervoso central
SST	[D-Trp ⁸]-somatostatina
TEA	Tetraetilamônio
TH	Tirosina hidroxilase
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

Resumo

As células tipo I do corpo carotídeo são os receptores sensoriais que transduzem as variações na pO_2 , pCO_2 e pH do sangue arterial em potenciais de ação do nervo ramo do seio carotídeo. Este processo de transdução envolve a entrada de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem seguida de liberação de dopamina e outros neurotransmissores. Neste estudo caracterizaram-se os tipos de canais de Ca^{2+} em células tipo I, bem como as influências que sobre eles exercem alguns neurotransmissores e outras substâncias endógenas. A corrente total de Ca^{2+} dependente de voltagem em presença de 10 mM de Ca^{2+} atingiu uma amplitude máxima de -94 ± 4.5 pA, apresentou limiar de ativação em -40 mV, 50% de inativação em -38 mV e foi completamente bloqueada por 500 μ M de Cd^{2+} . A somatostatina e a dopamina inibiram significativamente essa corrente. As correntes foram mantidas durante os 70 ms de despolarização e foram quase duas vezes maiores quando o Ba^{2+} substituiu o Ca^{2+} como um carreador de cargas elétricas. A amplitude dessa corrente foi aumentada ($106 \pm 11\%$) pelo agonista diidropiridínico (+)202-791 no potencial de -18 mV e bloqueada em $40 \pm 5\%$ e $74 \pm 3\%$ pelo antagonista diidropiridínico nimodipina nos potenciais de manutenção de -80 e -60 mV, respectivamente. A corrente sensível a nimodipina teve uma amplitude máxima num potencial teste de -12 mV. A ω -conotoxin GVIA bloqueou a corrente total de Ca^{2+} em $40 \pm 0.1\%$ e teve uma amplitude máxima num potencial de +2 mV.

Investigou-se a existência de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} usando a técnica de "patch clamp" na configuração célula-inteira (whole cell) e célula-aderida (cell-attached). As correntes de K^+ dependentes de Ca^{2+} foram visuali-

zadas numa região de condutância de coeficiente angular negativo na curva corrente-voltagem as quais foram abolidas pela aplicação de 500 μM de Cd^{2+} , indicando uma dependência da entrada de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Este componente da corrente foi abolido pela aplicação de 100 nM iberotoxina, um inibidor seletivo dos canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} , e reduzido pela aplicação externa de 10 nM de charibdotoxina e 10 mM de TEA. Com a preparação célula-aderida a aplicação de SNAP, um doador de óxido nítrico, resultou em um aumento tempo-dependente na probabilidade de abertura dos canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} . O SNAP aumentou a concentração intracelular de Ca^{2+} em células tipo I, carregadas com Fura-2, submetidas ou não ao pré-tratamento com cafeína sozinha ou ácido ciclopiazônico e raionidina.

Em conclusão, caracterizou-se que as células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos possuem canais de Ca^{2+} tipo L (bloqueáveis pela nimodipina) e do tipo N (antagonizáveis pela ω -conotoxin GVIA) cujo funcionamento é afetado por substâncias endógenas. Essas células também possuem canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} e nelas um doador de NO promoveu um grande aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , sugerindo assim que fenômenos ligados a homeostase do Ca^{2+} com capacidade potencial de interferência na quimiotransdução estão presentes nestas células.

Abstract

The type I cells of the adult rat carotid body are the primary peripheral chemoreceptors that sense alteration of pO_2 , pCO_2 or $[H^+]$ and these in turn determine the action potential frequency in the sensory fibers of the carotid sinus nerve. This process involves influx of Ca^{2+} through voltage-dependent Ca^{2+} channels and subsequent release of dopamine and other neurotransmitters. This study has characterized the types and the properties of Ca^{2+} channels in the type I cells, and the effects of neurotransmitters and another endogenous substances upon them. The total voltage-dependent Ca^{2+} current recorded from chemoreceptor type I cells of the adult rat carotid body in 10 mM Ca^{2+} was activated around -40 mV, reached a maximum amplitude of -94 ± 4.5 pA, was half inactivated at a holding potential of -38 mV and completely blocked by 500 μ M Cd^{2+} . Somatostatin and dopamine significantly inhibited the whole-cell Ca^{2+} current in type I cells. The currents were sustained throughout a 70 ms voltage step and were almost twice as large when Ba^{2+} was used as the charge carrier instead of Ca^{2+} . The dihydropyridine agonist (+)202-791 increased the Ca^{2+} current amplitude by $106 \pm 11\%$ at a step potential of -18 mV. The dihydropyridine Ca^{2+} -antagonist nimodipine decreased the Ca^{2+} current amplitude by $40 \pm 5\%$ at a holding potential of -80 mV and $74 \pm 3\%$ at a holding potential of -60 mV. The nimodipine-sensitive current had a maximum amplitude at a membrane potential of -12 mV. The ω -Conotoxin GVIA blocked the whole-cell Ca^{2+} current by $40 \pm 0.1\%$ and the ω -CgTx GVIA-sensitive current had a maximum amplitude at a membrane potential of +2 mV.

Ca^{2+} -activated K^+ channels in adult rat type I carotid body chemoreceptor cells were studied using whole-cell and cell-attached patch clamp techniques. Ca^{2+} -activated K^+ currents were seen as a region of negative slope conductance on current-voltage plots which was abolished by $500 \mu\text{M}$ Cd^{2+} indicating a dependence on Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels. This portion of the whole-cell outward current was abolished by 100 nM iberotoxin, a selective inhibitor of Ca^{2+} -activated K^+ channels, and reduced by external application of 10 nM charybdotoxin and 10 mM TEA. In the cell-attached preparation the application of S-nitroso-acetylpenicillamine (SNAP), a nitric oxide donor, resulted in a time-dependent increase in the open probability of Ca^{2+} -activated K^+ channels. The SNAP increased intracellular Ca^{2+} in type I cells loaded with Fura-2 before and after caffeine alone or CPA and ryanodine pretreatment.

In summary, chemoreceptor type I cells of the adult rat carotid body have at least two types of voltage-dependent Ca^{2+} channels, dihydropyridine-sensitive L-type channels and ω -conotoxin GVIA-sensitive N-type channels, whose function is affected by endogenous substances. These cells also have Ca^{2+} -dependent K^+ channels which were influenced by a NO donor, possibly due to an increase in intracellular Ca^{2+} , suggesting that many biological phenomena connected to the homeostasis of Ca^{2+} with potential capacity of interference in chemotransduction may be present in type I cells.

1.0 Introdução

A respiração é um processo biológico automático, voluntário ou involuntário que através da ventilação pulmonar mantem as tensões alveolares e sanguíneas de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2). Essa respiração pulmonar se complementa com o processo pelo qual o O_2 é levado às células para oxidar nutrientes e obter energia necessária para todas as funções vitais, ao mesmo tempo que o CO_2 é liberado como produto desta reação oxidativa.

A atividade metabólica de um animal varia nos diferentes momentos de sua vida, bem como a demanda de energia. Portanto, todos os componentes envolvidos no processo respiratório necessitam variar e ajustar-se de acordo com o requerimento energético.

O controle da ventilação pulmonar depende de um sistema de controle central e periférico que, após o recebimento das informações necessárias, determinam continuamente o estado contrátil apropriado dos músculos respiratórios.

Os animais mais evoluídos possuem um sistema de controle da respiração que coordena todos os componentes envolvidos no processo respiratório, objetivando manter sua capacidade funcional de acordo com a demanda de energia das células do corpo.

O controle central da respiração envolve pelo menos três regiões do SNC: o centro respiratório bulbar (grupo de neurônios dorsais e ventrais); o centro apnêustico e o centro pneumotáxico (Berne & Levy, 1993).

O mais primitivo sistema de controle automático da respiração em mamíferos envolve o grupo de neurônios dorsais e ventrais localizados em sua maioria no Núcleo do Trato Solitário (NTS). Estes neurônios são capazes de

iniciar e manter uma ritmicidade básica essencial a qual está dividida em duas fases: inspiração e expiração. O sinal inspiratório acarreta um aumento uniforme do volume dos pulmões e provém do grupo de neurônios dorsais. Por outro lado, o grupo de neurônios ventrais, localizados nos núcleos ambíguo superior e retroambíguo inferior permanecem inativos durante a inspiração, não participam da oscilação rítmica e possuem neurônios inspiratórios e expiratórios (Mountcastle, 1978; Berne & Levy, 1993; Guyton, 1989, revisado por Bianchi, Denavit-Saubié & Champagnat, 1995).

O centro apnêustico cuja localização está na parte inferior da ponte só pode ser demonstrado após secção dos vagos. Este centro impede o desligamento dos neurônios bulbares inspiratórios e funciona como um impulso extra para a inspiração (Berne & Levy, 1993, revisado por Bianchi e col., 1995).

O centro pneumotáxico, localizado no núcleo parabraquial, limita a duração do processo inspiratório através do envio contínuo de impulsos inibitórios para o grupo de neurônios inspiratórios bulbares. Outros elementos envolvidos no controle da respiração estão localizados fora do SNC e a sua eliminação não prejudica a gênese do ritmo respiratório básico (Berne & Levy, 1993, revisado por Bianchi e col., 1995). Portanto, o controle central da ventilação pulmonar envolve a atividade intrínseca destes grupos de neurônios que são capazes de promover uma ativação dos músculos inspiratórios, ou seja, o sistema nervoso central (SNC) processa as informações provenientes das aferências sensoriais e proporciona uma eferência motora apropriada.

Acredita-se que o controle global da ventilação pulmonar é apenas parcialmente alcançado pela sensibilidade dos neurônios centrais em relação aos produtos de seu próprio metabolismo. Por isso, o centro respiratório bulbar

é modulado em seu ritmo por impulsos inibitórios e excitatórios oriundos de estruturas pontinas, cortex frontal via motoneurônios dos sistemas piramidal e extrapiramidal, por mecanorreceptores pulmonares, aferências proprioceptivas e principalmente dos impulsos que se originam nos quimiorreceptores centrais e periféricos que determinam uma apropriada ventilação pulmonar capaz de manter a homeostasia (Berne & Levy, 1993, revisado por Bianchi e col., 1995).

Sendo a respiração um processo biológico através do qual o organismo obtém do ambiente o O_2 necessário as suas atividades metabólicas básicas é razoável se esperar que a mesma disponha de um mecanismo de controle muito eficiente. Esse mecanismo de controle é capaz de detectar os níveis sanguíneos de certas substâncias usadas ou formadas durante a atividade metabólica celular (O_2 , CO_2 e H^+) e envia estas informações para as regiões de controle centrais.

A resposta reflexa do mecanismo de controle que detecta a falta de O_2 é relativamente ineficiente se operada isoladamente. No entanto, se torna poderosa quando as concentrações de O_2 do ar inspirado está reduzida para níveis inferiores a 20% do valor normal (Berne & Levy, 1993).

Os receptores sensíveis aos níveis plasmáticos de O_2 estão presentes em muitas regiões do corpo, mas o órgão sensorial primário de origem quimiorreceptora, que monitora os níveis de O_2 e forma parte do sistema integrado do controle da respiração, são os quimiorreceptores aórticos e carotídeos. Estes receptores se adaptam muito lentamente aos estímulos constantes (baixo pO_2) e são responsáveis pela hiperventilação induzida pela hipóxia crônica causada pelas altas altitudes ou por doenças cardiopulmonares (Guyton, 1989). O corpo carotídeo tem, portanto, papel fundamental no controle da ventilação pulmonar e uma importância clínica nos casos de

hipóxia causada por afecções pulmonares que afetam as trocas gasosas como a pneumonia e o enfisema pulmonar (Guyton, 1989).

Diante disso, na discussão que se segue, dar-se-á especial atenção às influências reflexas que envolvem as zonas quimiossensitivas periféricas localizadas no corpo carotídeo, uma vez que estas estruturas detectam mudanças na composição química (O_2 , CO_2 , pH) dos fluidos corporais, que refletem a demanda de O_2 e a produção de CO_2 . Assim, estas estruturas têm uma função importante no sistema integrado de controle da respiração cujo resultado final são ajustes da ventilação pulmonar para compensar as mudanças no consumo de O_2 e na produção de CO_2 .

As células quimiossensitivas periféricas se localizam em estruturas compactas - os corpúsculos aórticos e carotídeos. O corpo carotídeo de mamífero é um pequeno órgão localizado bilateralmente na bifurcação da carótida comum. É o principal quimiossensor periférico para O_2 , CO_2 e pH e está envolvido na regulação da ventilação pulmonar, contribuindo para o controle das funções cardiopulmonares (Biscoe, 1971).

O corpo carotídeo é altamente vascularizado. O suprimento sanguíneo arterial é feito por uma ou mais artérias - ramos da artéria carótida comum. A drenagem venosa é feita através de uma ou duas veias que formam um plexo venoso na superfície do órgão, terminando na veia jugular interna ou em um de seus ramos (McDonald, 1981).

A inervação do corpo carotídeo é feita por um ramo do IX par craniano (glossofaríngeo) denominado ramo do seio carotídeo ou nervo de Hering, cujos corpos celulares se localizam no gânglio petroso bem como, por fibras simpáticas originárias nos gânglios cervical superior e estrelado. Além disso, recebe fibras depressoras vagais cujo corpos celulares se localizam no gânglio

nodoso (McDonald, 1981; O'Regan & Majcherczyk, 1983; González e col., 1994).

No que tange à organização geral o corpo carotídeo é formado por grupos de células denominados glomóides. Os glomóides celulares são separados por tecido conjuntivo que converge para a superfície formando uma cápsula que envolve todo o órgão. Eles são formados por dois ou mais tipos de células quimiorreceptoras, células sensoriais primárias do corpo carotídeo, ou tipo I (glomus cells) e células de sustentação ou tipo II (sheath cells).

As células tipo I são classificadas em células tipo IA e tipo IB. Os diferentes tipos de células tipo I são baseados no número e na concentração de vesículas e em outros critérios ultraestruturais. As células denominadas tipo IA possuem vesículas significativamente maiores e em maior número quando comparadas com as do tipo IB. (De Kock, 1951; McDonald & Mitchell, 1975; Chen & Yates, 1984; Biscoe, Caddy, Duchen, Kirby, Patterson & Ponte, 1987).

As células tipo I são mais numerosas e em cultura primária aparecem como células birrefringentes, arredondadas e com um diâmetro de 8 a 15 μm . A principal característica destas células é a presença de vesículas densas e ricas em catecolaminas no seu citoplasma. Ao contrário, as células tipo II são menos frequentes e apresentam diâmetro menor que 6 μm . (Pérez-García e col., 1992; González e col., 1994).

As células tipo I são excitáveis, ou seja, são capazes de gerar potenciais de ação, ao contrário das células tipo II que não apresentam excitabilidade (Ureña, López-López, González & López-Barneo, 1989; Duchen, Caddy, Kirby, Patterson, Ponte & Biscoe, 1988).

No que tange ao processo de quimiotransdução, este envolve uma sequência de eventos que se iniciam com um estímulo natural ou farmacológico o qual inclui: hipóxia; anemia; acidose metabólica ou respiratória; alterações na osmolaridade e temperatura; substâncias tóxicas e neurotransmissores.

Várias hipóteses procuraram explicar o mecanismo envolvido na quimiotransdução. Estas propõem que terminações nervosas sensoriais do nervo ramo do seio carotídeo são ativadas em consequência da despolarização dos quimiorreceptores que são estimulados quando ocorre hipóxia e/ou hipercapnia sistêmica. O processo de quimiotransdução se inicia, portanto, com a despolarização do quimiorreceptor a qual induz a liberação de neurotransmissores, que por sua vez gera um potencial de ação nos axônios aferentes do ramo do seio carotídeo, aumentando a sua frequência de disparo. Estas fibras ascendentes terminam no NTS e estimulam os neurônios respiratórios bulbares induzindo um aumento da ventilação pulmonar (Fig. 1, Gronblad, Akderman & Eranko, 1979; Pérez-García, Obeso, López-López, Herreros & González, 1992; Obeso, Rocher, Fidone & González, 1992; González, Almaraz, Obeso & Rigual, 1992, revisado por González, Almaraz, Obeso & Rigual, 1994). Vale lembrar que este mecanismo é somente parte de um sistema de controle integrado dos processos respiratórios que governam e otimizam a função de todos os componentes do aparelho respiratório em uma dada circunstância.

Duas décadas atrás, admitia-se que a transmissão química entre as células quimiossensoras e as terminações do ramo do seio carotídeo envolviam apenas um tipo de neurotransmissor. A primeira indicação de que as células quimiossensoras do corpo carotídeo podiam liberar um neurotransmissor foi

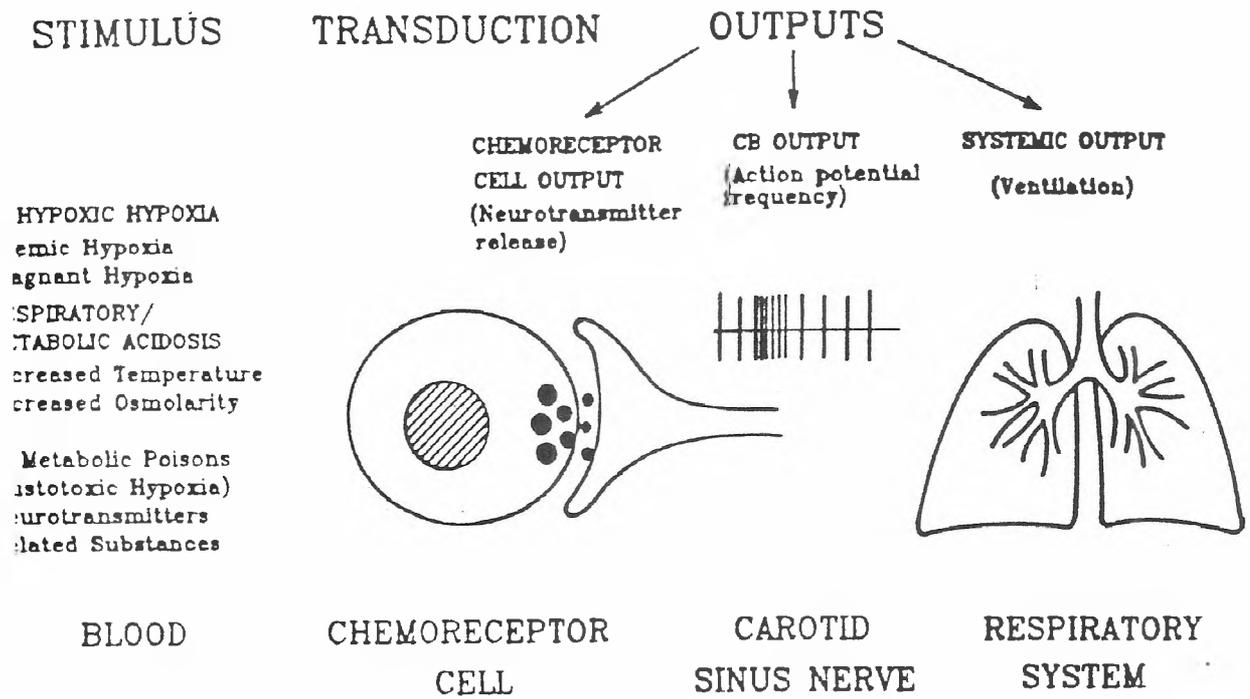


Fig. 1. Desenho esquemático do processo de quimiotransdução no corpo carotídeo de mamíferos (reproduzido de González e col., 1994).

obtida por Schweitzer e Wright (1938, revisado por González e col. 1994). Esses autores encontraram que a prostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, ativou a ventilação pulmonar de maneira semelhante à injeção de acetilcolina (Ach). Esta observação e outros trabalhos publicados posteriormente deram origem à hipótese colinérgica da neurotransmissão no corpo carotídeo. Estes achados foram criticados pois não foi identificada a presença de Ach nas células quimiossensoras do corpo carotídeo e nem foi investigada a sua ação direta sobre as terminações nervosas sensoriais que são desprovidas de receptores nicotínicos (revisado por González e col. 1994)

Por outro lado, a liberação de dopamina (DA) durante a estimulação pela hipóxia é bem documentada em inúmeros estudos em células tipo I de ratos. Os dados têm demonstrado que a hipóxia aguda depleta todos os estoques de DA das células tipo I do corpo carotídeo e este efeito é bloqueado em 95% em soluções com baixo teor de cálcio (Biscoe, 1971; Eyzaguirre & Fidone, 1980; González-Guerrero, Rigual & González, 1993; revisado por González e col. 1994; Mokashi, Guilio, Morelli & Lahiri, 1994).

Técnicas citoquímicas e imunohistoquímicas têm revelado a complexidade da sinapse sensorial do corpo carotídeo, mostrando a grande diversidade de neurotransmissores e neuromoduladores na decodificação da informação nessas sinapses, sugerindo que deve existir diferentes padrões de liberação de neurotransmissores pelas células quimiossensoras em resposta aos diferentes estímulos (Biscoe & Duchon, 1990; Eyzaguirre & Fidone, 1980; McQueen & Pallot, 1983; revisado por González e col. 1994).

Usando a técnica convencional de "patch clamp" foi constatado que as células tipo I possuem corrente de Ca^{2+} com limiar de ativação de aproximadamente -40 mV, atingindo a amplitude máxima em +20 mV.

Esta corrente é bloqueada por 10 mM de Mg^{2+} , 2 mM Co^{2+} , e concentrações submilimolares de Cd^{2+} bem como, é aumentada em 2 vezes quando o Ba^{2+} é usado como um carreador de cargas elétricas. Além disso, é ativada e inativada lentamente. Todas estas propriedades são características das correntes de Ca^{2+} dos canais tipo L (Duchen e col., 1988; Ureña e col., 1989).

Em células tipo I isoladas do corpo carotídeo de gato, o potencial de repouso foi documentado situar-se em torno de -55 mV e foram despolarizadas quando expostas à Ach (Hayashida & Eyzaguirre, 1979). Além disso, a despolarização induzida por altas concentrações de K^+ extracelular induz a liberação de DA que é dependente do Ca^{2+} extracelular (Almaraz, González & Obeso, 1986).

Estudos mais recentes mostraram que derivados diidropiridínicos modulam a liberação de DA induzida por K^+ e por hipóxia, indicando que os canais de Ca^{2+} das células tipo I envolvidos neste processo são do tipo L (Obeso e col., 1992; González e col., 1994). Outrossim, células tipo I de coelho possuem canais de Na^+ dependentes de voltagem, pois a veratridina promoveu a liberação de DA que foi dependente de Na^+ e Ca^{2+} e foi bloqueada pela tetrodotoxina (TTX, Rocher, Obeso, Herreros & González, 1988; Sato, Yoshizaki & Koyano, 1989).

No que tange à corrente de K^+ , usando um protocolo de despolarização, com clampeamento de voltagem variando até +40 mV e o potencial de manutenção (holding potential) clampeado em -80 mV, células tipo I mostram uma corrente para fora que é completamente bloqueada por 40 mM de tetraetilamônio (TEA) e desaparece completamente se dializada com uma solução contendo 140 mM de CsCl ao invés de KCl (Ureña e col., 1989).

Os registros em célula-inteira tipo I demonstraram ainda um componente dependente de Ca^{2+} que varia de célula para célula, que declina durante o curso temporal e finda após o desaparecimento da corrente de Ca^{2+} . Essa corrente é parcialmente bloqueada pela apamina e completamente bloqueada por 2 mM de Co^{2+} (Ureña e col., 1989; Duchon e col., 1988; Pérez-García e col., 1992). O componente independente de Ca^{2+} da corrente de K^+ tem um limiar de excitabilidade em -30 mV, aumenta linearmente acima de +60 mV, mostrando uma tendência à saturação. A amplitude máxima em +40mV foi de 1.5-3.5 nA e uma redução na pressão parcial de O_2 inativa o componente independente de Ca^{2+} na configuração em célula-inteira (Duchon e col., 1988; Ureña e col., 1989; López-López, Gozález, Ureña & López-Barneo, 1989).

A corrente de K^+ sensível à pO_2 identificada em células tipo I possui propriedades semelhantes às correntes de K^+ tipo A (Connor & Stevens, 1971) e ao retificador retardado (delayed rectifier, Hodgkin & Huxley, 1952a; Hodgkin & Huxley, 1952b) presentes em células excitáveis com potenciais de ação de curta duração (revisado por Rudy, 1988). A exposição das células tipo I à hipóxia (pO_2 de 10 mmHg) reduziu a amplitude da corrente de K^+ em $35 \pm 8\%$ e observou também um aumento na amplitude do potencial de ação em 4-10 mV e uma rápida despolarização, elevando a frequência de disparo celular e resultando numa resposta quimiossensora (López-López e col. 1989; Delpiano & Hescheler, 1989; López-Barneo, López-López, Ureña & González, 1988).

Registros da corrente unitária em células tipo I isoladas do corpo carotídeo de coelho demonstraram a presença de canais de K^+ cuja probabilidade de abertura diminui com a queda da pO_2 . A hipóxia modifica a cinética do canal de K^+ sensível ao O_2 mantendo-o no estado de inativação (Ganfornina & López-Barneo, 1992a). Por outro lado, foi demonstrado ainda, a

existência de uma corrente de K^+ dependente de Ca^{2+} insensível a redução da pO_2 (Ganfornina & López-Barneo, 1991; Ganfornina & López-Barneo, 1992b).

Em resumo, os registros de "patch clamp", usando a configuração célula-inteira, em células tipo I isoladas, confirmaram que estas são células excitáveis com canais de Na^+ , Ca^{2+} , e K^+ dependentes de voltagem e revelou um componente único de corrente de K^+ que foi reversivelmente inibido pela redução na pO_2 na solução extracelular. As propriedades elétricas passivas das células quimiorreceptoras tipo I são semelhantes à maioria das células excitáveis e incluem capacitância de 6 a 7 pF, de acordo com a capacitância específica da membrana de aproximadamente $1 \mu F/cm^2$ e a média da resistência de entrada de $4.6 G\Omega$ (Duchen e col., 1988; Ureña e col., 1989).

Pelas evidências enumeradas, tem-se aceito que as células tipo I são os receptores primários do corpo carotídeo de mamíferos e o processo de transdução inicia-se com uma redução na pO_2 nos fluidos corporais, que induz a despolarização das células quimiorreceptoras tipo I e este efeito é provavelmente devido a uma inibição das correntes de K^+ sensíveis à pO_2 do sangue arterial (López-Barneo e col., 1988; López-López e col., 1989; Delpiano & Hescheler, 1989; Ganfornina & López-Barneo, 1991). A despolarização estimula a entrada de Ca^{2+} através de uma ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, induzindo a liberação de DA. Além disso, o aumento na pCO_2 também despolariza os quimiorreceptores tipo I e aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} através de uma ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Buckler & Vaughan-Jones, 1994) induzindo, portanto, liberação de neurotransmissores.

Observa-se ainda que, a redução do pH extracelular (pH_e) aumenta o influxo de H^+ através de um gradiente eletroquímico e no pH de 7,4 o potencial transmembrana é de aproximadamente -55 mV. O potencial de equilíbrio dos íons H^+ é alcançado quando o pH cai para 6,48. Isto significa que há um aumento na tendência para os íons H^+ entrarem na célula a medida que o pH diminui, e vice-versa. Consistente com esta predição é fato que num meio livre em Na^+ (pH_e 7,4), isto é, quando o H^+ intracelular não pode ser trocado com o Na^+ , o estado de equilíbrio em células tipo I foi alcançado no pH de 6,35 (Wilding, Cheng & Ross, 1992). A permeabilidade passiva da membrana ao íons H^+ varia de célula para célula, mas é fortemente dependente das variações do pH extra e intracelular (pH_i). Com a redução do pH_e se observa, na maioria das células, algum mecanismo de extrusão de H^+ , redução no metabolismo de carboidratos e redução na produção metabólica de íons acidificantes (Buckler, Vaughan-Jones, Peers, Lagadic-Gossman & Nye, 1991; Buckler, Vaughan-Jones, Peers & Nye, 1991). O balanço final de todos esses processos é que em células tipo I uma unidade de modificação do pH_e (em valores de pH entre 5,5 a 8,5) produz mudanças no pH_i de 0,7 a 0,8 unidades na mesma direção, num banho extracelular tamponado com HEPES ou CO_2 /bicarbonato (Buckler e col., 1991; Wilding e col., 1992).

Em células tipo I a acidificação do meio intracelular induzido por um aumento extracelular da pCO_2 , ácido fortes e a presença de outras substâncias acidificantes no banho induzem liberação de DA das células quimiorreceptoras tipo I, que também é dependente da presença de Ca^{2+} extracelular (Obeso, Almaraz & González, 1986; Obeso, Almaraz & González, 1989). Esta liberação de DA é insensível a antagonistas diidropiridínicos nas concentrações em que os mesmos inibem a liberação induzida por altas concentrações

extracelulares de K^+ e baixo pO_2 (Obeso e col., 1992; Rigual, López-López & González, 1991; Rocher, Obeso, González & Herrero, 1991).

Em células tipo I foi observado que manipulações farmacológicas que inibem a bomba Na^+-K^+ , como a ouabaína, que produzem um aumento intracelular de Na^+ e, portanto, inverte o mecanismo de troca Na^+-Ca^+ promoveu a liberação de DA, que foi dependente das concentrações extracelulares de Na^+ e Ca^{2+} e insensível aos bloqueadores clássicos de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, indicando que em células tipo I, o mecanismo de troca Na^+-Ca^{2+} contribui fortemente para o mecanismo de quimiotransdução. Além disso, a liberação de DA induzida por um estímulo acidificante em soluções tamponadas com HEPES foi bloqueada em 60% por etilisopropilamilorida, um inibidor específico da troca Na^+-Ca^{2+} (Rocher e col., 1991).

Em adição, Buckler e Vaughan-Jones (1994) demonstraram que os canais de Ca^{2+} responsáveis pelo aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células tipo I são parcialmente sensíveis a diidropiridina (canais de Ca^{2+} tipo L) visto que, antagonistas específicos destes canais não bloquearam totalmente este efeito. Isso sugere que outros tipos de canais de Ca^{2+} contribuem para o aumento intracelular de Ca^{2+} . Os canais tipo L ou sensíveis a diidropiridina estão presentes nas células tipo I (Hescheler, Delpiano, Acker & Pietruschka, 1989; Fieber & McCleskey, 1993), mas a existência de outros tipos de canais de Ca^{2+} não tem sido investigada profundamente.

Evidências experimentais têm demonstrado a existência de vários tipos de neurotransmissores nas células tipo I e nas terminações nervosas do corpo carotídeo de mamíferos. É possível que os canais iônicos dependentes de voltagem nas células tipo I possam ser modulados pelos neurotransmissores

liberados dos terminais nervosos dentro do corpo carotídeo, por substâncias liberadas pelas próprias células tipo I, por substâncias oriundas do sangue ou liberadas pelas células endoteliais. Se estas substâncias modulam as correntes iônicas nas células tipo I então, alterações na resposta ventilatória podem ocorrer decorrentes das mudanças na pO_2 , pCO_2 , e pH.

Estudos histocitoquímicos e imunohistoquímicos demonstraram a presença de dopamina (DA) cinco vezes maior que noradrenalina (NE) no corpo carotídeo de coelho (Dearnaley, Fillenz & Woods, 1968; González-Guerrero e col., 1993). A dopamina é liberada durante a hipóxia e os dados da literatura sugerem que a DA exógena causa depressão dos quimiorreceptores via receptores tipo D_2 (McQueen, 1985).

A Serotonina (5-HT) é a mais abundante amina biogênica no corpo carotídeo de aves (Kameda, 1990), mas também foi bioquimicamente identificada em rato, camundongo, gato e no homem (González e col., 1994). A acetilcolina é outro neurotransmissor presente no corpo carotídeo de mamíferos pois foi demonstrada a presença da colina acetiltransferase e a liberação durante estimulação por hipóxia, hipercapnia e corrente elétrica (Ballard & Jones, 1972; Eyzaguirre, Koyano & Taylor, 1965). Além do mais, demonstrou-se a presença de sítios reativos nicotínicos e muscarínicos nas células tipo I de mamíferos (Eyzaguirre & Monti-bloch, 1982).

Vários laboratórios demonstraram a coexistência de aminas biogênicas com neuropeptídeos incluindo peptídeos opióides, Met-encefalina, substância P, peptídeo vasoativo intestinal (Ichikawa, Rabchevsky & Helke, 1993; Wharton, Polak, Pearse, McGregor, Bryant, Bloom, Emson, Bisgard & Will, 1980; Wang, Stensaas, Dinger & Fidone, 1992; Lundberg, Hökfelt,

Fahrenkrug, Nilsson & Terenius, 1979) nas células quimiorreceptoras do corpo carotídeo.

Outros neuropeptídeos incluindo, neurocinina A (Prabhakar, Landis, Kumar, Mullikin-Kilpatrick, Cherniack & Leeman, 1989), colecistocinina (Wang, Perrin & Cutz, 1993), galanina (Heym, & Kummer, 1989), neurotensina (Smith, Gosney, Heath & Burnett, 1990), calcitonina (Wang e col., 1993), peptídeo natriurético atrial (Wang, He, Stensaas, Dinger & Fidone, 1991) e ácido gama aminobutírico (Oomori, Nakaya, Tanaka, Iuchi, Ishikawa, Satoh & Ono, 1994) também foram identificados nestes tipos celulares

Outrossim, estudos neuroquímicos e imunohistoquímicos recentes demonstraram a presença de aminas biogênicas, neurocinina A, substância P, calcitonina, galanina, neuropeptídeo Y e VIP nas terminações nervosas sensoriais do ramo do seio carotídeo (González e col., 1994; Ichikawa e col., 1993). Estes dados enfatizam a complexidade da transmissão sináptica nas células quimiorreceptoras tipo I. Em adição, podemos sugerir que a interação entre estas células e as terminações nervosas deve ser complexa, necessitando de estudos funcionais mais aprofundados para se entender como a informação é transmitida para as terminações nervosas sensoriais. Conseqüentemente, nós testamos uma variedade destas substâncias por suas capacidades em modular as correntes de Ca^{2+} e K^{+} em um grande número de tipos celulares (Foucart, Bleakman, Bindokas & Miller, 1993; Fisher & Johnston, 1990; Baraban, Snyder & Alger, 1985; Shapiro & Hille, 1993; Berger & Takahashi, 1990; Zhu, & Ikeda, 1993; Marchetti, Carbone & Lux, 1986) e estarem presentes em células tipo I e/ou nas terminações nervosas.

Tem sido revelado que mecanismos eferentes podem inibir a quimiosensitividade do corpo carotídeo de gato (Fidone & Sato, 1970;

McDonald & Mitchell, 1981), mas os mecanismos desta modulação eferente têm permanecido obscuro até recentemente. Wang e colaboradores (Wang, Brecht, Fidone & Stensaas, 1993) mostraram que um extensivo plexo de fibras nervosas que rodeia as células tipo I contém a enzima óxido nítrico sintetase. Estas células nervosas são originárias do gânglio petroso, dos grandes neurônios do tecido conjuntivo que circunda o próprio corpo carotídeo e de prolongamentos do glossofaríngeo (Wang, Stensaas, Brecht, Dinger & Fidone, 1994).

As terminações nervosas nitrosidérgicas estão numa posição anatômica favorável para alterar as funções das células tipo I do corpo carotídeo. Wang e colaboradores (Wang, Stensaas, Dinger & Fidone, 1995) mostraram que o NO pode alterar as atividades do nervo carotídeo sensorial aferente em resposta a hipóxia bem como a concentração de GMPc nas células tipo I. Experimentos eletrofisiológicos mostraram que a inibição da óxido nítrico sintetase foi associada com um aumento na frequência de disparo do ramo do seio carotídeo, enquanto a perfusão com doadores sintéticos de óxido nítrico (nitroglicerina e nitroprussiato de sódio) produziram uma marcada inibição induzida pela hipóxia (Wang e col., 1991; Wang e col., 1994). Estes dados sugerem que a liberação do NO pelos terminais nervosos eferentes pode alterar as funções quimioceptivas das células tipo I do corpo carotídeo, sugerindo o NO como um mediador da eferência inibitória do corpo carotídeo.

Diante destes dados, a proposta do presente estudo foi investigar as propriedades biofísicas e farmacológicas das correntes de Ca^{2+} dependentes de voltagem nas células quimiossensíveis tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos, objetivando determinar os tipos de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem presentes nestas células bem como a sua modulação.

Em adição, o presente trabalho, também investigou os efeitos do NO sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} e a modulação da atividade dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} nas células quimiorreceptoras tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos adultos. Nossos dados sugerem que os quimiorreceptores do corpo carotídeo de ratos adultos possuem canais de Ca^{2+} tipo L e tipo N e os mesmos são modulados pela somatostatina e dopamina. Além disso, demonstramos que um doador de NO, o S-nitroso-acetilpenicilamina (SNAP) pode aumentar as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e ativar os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} em células quimiossensíveis tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos.

2.0 Materiais e Métodos

2.1 Isolamento celular

Os experimentos foram realizados usando células quimiorreceptoras tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos isoladas por ação enzimática. Ratos Wistar (150 - 350 g) foram decapitados usando guilhotina de laboratório, sem o uso prévio de anestesia, e em seguida toda a região da bifurcação da carótida interna foi removida e colocada em uma solução gelada de salina balanceada de Hanks (HBSS, Gibco). A solução de HBSS foi feita usando o pó manufaturado ao qual foi adicionado 4.2 mM NaHCO₃ e o pH ajustado para 7.4 (NaOH 1 N). O corpo carotídeo foi dissecado usando pinças e tesouras cirúrgicas. Os corpos carotídeos isolados foram então incubados em solução enzimática contendo (mg ml⁻¹): 0.4 colagenase tipo D; 0.1 tripsina (ambas oriundas da Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) e 0.1 DNAase tipo I (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) em uma solução salina balanceada de Earle (EBSS) a 35°C por 1 h em banho maria sob agitação constante. A solução de EBSS foi feita a partir do líquido 10 vezes mais concentrado (Sigma) sendo adicionado 10 mM de ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N¹-2-etanosulfônico (1 M HEPES Buffer, Sigma), 20 mM glicose e 2.6 mM NaHCO₃. O pH foi ajustado para 7.4 com NaOH 1N. Após a incubação, as células foram dissociadas através de leve agitação do frasco (Falgon) durante 10 s. A ação enzimática foi inativada pela adição de igual volume (6 ml) de meio de cultura composto de Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina,

1% de glutamina (todos da Gibco, Grand Island, NY, USA) e $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de insulina (Boehringer Mannheim Biochemicals). Após a dissociação, as células foram centrifugadas 2 vezes a $100 \times g$ por 6 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspendidas em meio de cultura. Em seguida, as células foram depositadas por decantação em discos de cultura (Falcon) de 35 mm de diâmetro, revestidos com poli-L-lisina. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada (5% de CO_2), e usadas no intervalo de 2 a 8 h após a preparação. As células usadas para as medidas dos níveis intracelulares de cálcio foram depositadas por decantação sobre lamínulas (Falcon, 25 mm de diâmetro e 0.16 mm de espessura) cobertos com poli-L-lisina sob as mesmas condições. Somente as células tipo I, de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diâmetro ou agregados destas células foram usados nestes experimentos. Células menores, tipo II ($< 6 \mu\text{m}$), foram facilmente distinguidas das células tipo I.

2.2 Ensaio imunocitoquímico da tirosina hidroxilase

Para confirmar a identidade das células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos em nossas preparações, investigamos a presença de tirosina hidroxilase, enzima envolvida na síntese de catecolaminas. Os estudos imunocitoquímicos foram realizados usando o sistema Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e as células isoladas do corpo carotídeo de ratos foram obtidas como descrito em 2.1. As células foram colocadas sobre lamínulas graduadas (Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ, USA) revestidas com poli-L-lisina e mantidas em discos contendo meio de cultura. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida (5% CO_2) por 4

horas. As células em cultura foram lavadas usando salina tampão fosfato (PBS) e fixadas com uma solução de 4% de paraformaldeído em PBS por 15 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3 vezes durante 5 min em PBS e então incubadas por 15 min em soro bloqueador ("horse serum" a 1.5%) de sítios de ligação inespecíficos. Em seguida foi adicionado à cultura, 2 ml por disco de anticorpo primário (anti-tirosina hidroxilase, Boehringer-Mannheim Biochemicals) diluído 1:1000 em PBS contendo 0.1% de Tween e as mesmas foram incubadas por 16 h (overnight) a 40°C. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes por 5 min com PBS e então incubadas com anticorpo secundário durante 15 min. As células foram lavadas exaustivamente e incubadas em uma solução padrão composta de avidina + complexo macromolecular de peroxidase do rabanete (horseadish peroxidase) de acordo com as instruções do fabricante por 30 min. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e submetidas a uma reação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) sendo a mesma intensificada com níquel. O desenvolvimento da coloração foi observado durante 2 min usando-se um microscópio invertido Nikon. As células foram então lavadas exaustivamente com PBS. O controle foi realizado seguindo o mesmo protocolo com a omissão do anticorpo primário.

2.3 Técnicas eletrofisiológicas

2.3.1 Correntes macroscópicas de Ca²⁺ - Célula-inteira

O isolamento das correntes macroscópicas de Ca²⁺ em célula-inteira foi obtido banhando as células em uma solução extracelular que continha (em

mM): 140 ácido metanosulfônico (MeSO₃H, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA), 140 hidróxido de tetraetilamônio (TEA-OH) (Aldrich Chemical Company), 10 HEPES, 15 glicose, 10 CaCl₂, 0,0001 tetrodotóxina (Calbiochem Corporation, La Jolla, CA, USA), pH 7.4, 330 mOsm kg⁻¹. A solução interna consistiu de (em mM): 120 N-Metil-D-glucamina (NMG), 20 cloreto de tetraetilamônio, 11 EGTA, 10 HEPES, 14 fosfocreatina, 1 CaCl₂, 4 MgATP e 0.1 Na₂GTP, pH 7.2, 305 mOsm kg⁻¹.

As correntes iônicas das células quimiossensitivas tipo I foram registradas a temperatura ambiente (22 - 26°C) usando a técnica de registro convencional em célula-inteira (Hamill, Marty, Neher, Sakmann & Sigworth, 1981), utilizando-se um pré-amplificador para "patch clamp" do tipo Axopatch-200A (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA). As micropipetas foram feitas de capilares de vidro de borossilicato (1.65 mm de diâmetro externo, 1,2 mm de diâmetro interno, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA) usando um puxador modelo P-87 Flaming-Brown (Sutter Instrument Co., San Rafael, CA, USA). Os microeletrodos foram cobertos com "sylgard" 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA) e polidos ao fogo usando um microforja (Narishige, Tokyo, Japan). A resistência dos microeletrodos variaram de 3 a 5 MΩ quando preenchidos com a solução interna descrita acima. Os discos contendo as células em cultura foram colocados sobre a plataforma de um microscópio invertido (Nikon Diaphot) e foram perfundidos, por gravidade, com solução externa a uma velocidade de aproximadamente 1 ml min⁻¹. Após a formação do selo de alta resistência (Giga selamento) entre o microeletrodo e a membrana celular, essa última foi rompida por sucção. A resistência média de entrada e a capacitância da membrana determinadas usando a constante de tempo e a área do transiente

capacitivo não compensado, foram $12 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ e $5 \pm 0.1 \text{ pF}$, respectivamente ($n = 110$). A capacitância da membrana celular e as resistências em série foram eletronicamente compensadas para valores maiores que 80%. As correntes iônicas foram filtradas a 2 - 5 kHz (-3 dB) usando o filtro quadripolar tipo Bessel do axopatch-200A usado. O potencial de manutenção (holding potential) clampeado em -80 mV foi empregado na maioria dos experimentos além de outros valores quando necessário.

Os protocolos de voltagem foram gerados por um computador Macintosh IICI (Apple computer, Cupertino, CA, USA) equipado com uma placa de aquisição de dados MacAdios II (GW Instruments Inc., Cambridge, MA USA). O "software" para a aquisição dos dados e geração de protocolos foram escritos pelo Dr. Stephen R. Ikeda (Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA).

A onda quadrada (pulso) aplicada teve 70 ms de duração e foi precedida de um pré-pulso de 10 ms na grande maioria dos experimentos além de outros valores quando necessário. As amplitudes da corrente macroscópica de Ca^{2+} foram medidas como a média das correntes obtidas entre 50 - 55 ms durante a onda quadrada de voltagem aplicada (potencial teste). Estas amplitudes foram usadas para gerar as curvas corrente-voltagem (I-V) usando o programa Igor (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). As curvas I-V, sempre que necessário, foram corrigidas, ou seja, subtraídas das correntes de vazamento linear como determinado pelo potencial teste de hiperpolarização. Alterações nas amplitudes da corrente entre o controle e nas condições experimentais (tratamento com a droga) foram calculadas como percentagem de inibição ou estimulação do controle, usando os valores corrigidos quando necessário.

2.3.2 Correntes macroscópicas de potássio - Célula-inteira

As correntes de K^+ foram registradas de células quimiossensitivas tipo I em uma solução extracelular contendo (em mM): 145 NaCl; 5.4 KCl; 10 HEPES; 0.8 $MgCl_2$; 2 $CaCl_2$ (todos da Fisher Scientific); 15 glicose, 0.0001 tetrodotoxina (Calbiochem Corporation, La Jolla, CA, USA), pH 7.4, 314 mOsm Kg^{-1} a temperatura ambiente (22 - 26°C) usando a técnica convencional de registro em célula-inteira (Hamill e col., 1981) com um pré-amplificador do tipo Axopatch-200A (Axon Instruments, Inc. Foster City, CA, USA). As micropipetas foram feitas usando o procedimento já descrito previamente para o registro das correntes de Ca^{2+} (item 2.3.1). As resistências dos microeletrodos variaram de 3 a 5 $M\Omega$ quando preenchidos com a seguinte solução (em mM): 120 isoteionato de K^+ (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA); 20 KCl; 10 HEPES; 1.1 EGTA; 4 MgATP; 0.1 Na_2GTP ; 0.1 $CaCl_2$; 2 $MgCl_2$; pH 7.2, 288 mOsm kg^{-1} . As células em cultura foram colocadas sobre a plataforma de um microscópio invertido (Nikon Diaphot) e o "patch" foi obtido usando os procedimentos descritos no item 2.3.1. A resistência mínima de entrada e a capacitância da membrana, determinadas da constante de tempo e área do transiente capacitivo não compensado, foram $10 \pm 0.5 M\Omega$ e $5 \pm 0.2 pF$, respectivamente ($n = 45$). A capacitância da membrana celular e as resistências em série foram eletronicamente compensadas para valores maiores que 80%. As correntes iônicas foram filtradas de maneira já descrita em 2.3.1. O potencial de manutenção clampeado usado foi de -50 mV.

A onda quadrada (pulso) aplicada teve 200 ms de duração e foi precedida de um pré-pulso de 10 ms na grande maioria dos experimentos além

de outros valores quando necessário. As amplitudes das correntes para fora de K^+ foram medidas como a média de correntes durante a onda quadrada de voltagem entre 180 e 190 ms as quais foram usadas para gerar as curvas de corrente-voltagem usando o programa Igor (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). Os protocolos de voltagem e o "software" para aquisição e análise dos dados foram descritos no ítem 2.3.1.

2.3.3 Correntes unitárias de Potássio - Canal isolado

As correntes unitárias através dos canais isolados de K^+ dependentes de Ca^{2+} foram registradas usando uma variação da técnica convencional de "patch clamp" - registro em célula-aderida ("cell-attached configuration", Hamill et al., 1981) com um pré-amplificador do tipo Axopatch-200A (Axon Instruments) a temperatura ambiente. A solução extracelular continha (em mM): 140 KCl; 10 HEPES; 10 $MgCl_2$; 30 glicose; 0.0001 tetrodotoxina, pH 7.2, 342 mOsm kg^{-1} . A solução da micropipeta continha (em mM): 140 NaCl; 5.4 KCl; 10 HEPES; 10 $MgCl_2$; 0.0001 tetrodotoxina; pH 7.2; 321 mOsm kg^{-1} . Os registros das correntes unitárias foram filtrados a 1kHz utilizando um filtro programável de dois canais modelo 9002 (Frequency Devices, Inc., Haverhill, MA, USA) e digitalizados a 0,5 ms por ponto.

Histogramas dos eventos referentes a atividade do canal isolado de potássio foram obtidos pela classificação das amplitudes de corrente com um intervalo de classe de 0.5 pA. Após a classificação, os eventos referentes a abertura do canal foram ajustados usando o modelo da distribuição normal (curva de Gauss). A amplitude da corrente unitária foi obtida do pico da curva de Gauss. A probabilidade de abertura do canal para cada 200 ms de

despolarização foi expressa como NP_O (N, número de canais ativos no "patch" e P_O , probabilidade de abertura) e calculado como $NP_O = I/i$ (Wyatt & Peers, 1995), onde:

I é a corrente total;

i é a amplitude da corrente do canal isolado.

As correntes de vazamento foram subtraídas usando varreduras que não continham canais ativos.

Os protocolos de voltagem foram gerados por um computador Macintosh IICI (Apple Computer, Cupertino, CA, USA) equipado com uma placa de aquisição de dados MacAdios II (GW Instruments Inc., Cambridge, MA, USA). O "software" para a aquisição dos dados e geração de protocolos foram escritos pelo Dr. Stephen R. Ikeda (Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA).

2.4 Medidas dos níveis intracelulares de Ca^{2+}

Um sistema de dois canais automáticos de microespectrofluorimetria monocromático (SPEX Inc., Edison, NJ, USA) foi usado no presente estudo. Raios de luz ultravioleta oriundos de uma lâmpada "xenon arc" de 150 W (Osram) foram automaticamente centrados em 340 e 380 nm (intervalos 5 nm) e foram projetados sobre a célula através de lentes de imersão a óleo (100 x, 1.3 nA, Fluor, Nikon) de um microscópio invertido (IMT-Olympus) usando um espelho dicromático (430 DPLC, OMEGA, Inc., Brattleboro, VT, USA). A luz fluorescente emitida foi coletada por uma objetiva e transmitida através de um filtro (510WB40, OMEGA, Inc.) para um fotomultiplicador colocado ao

lado do microscópio. Os raios emitidos pelo fotomultiplicador foram filtrados a 50 Hz, digitalizados e estocados para as análises posteriores. Os transientes de Ca^{2+} apresentados são a razão da excitação em 340/380 nm da quantidade de fótons emitidos a 510 nm e corrigidos para as suas respectivas fluorescências controle (background).

As células foram expostas ao éster de fura-2 acetoximetil (fura-2 AM, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) como descrito previamente (Brotto, Nosek, Godt & Creazzo, 1995). Brevemente, dentro de 2 - 8 h após a dissociação celular as lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão (Medical Systems Corp., Greenvale, NY, USA). As células foram lavadas várias vezes com uma solução extracelular normal contendo (em mM): 140 NaCl; 5.4 KCl; 10 HEPES; 0.8 MgCl_2 ; 2 CaCl_2 ; 15 glicose; pH 7.4 (NaOH). Subsequentemente, as células foram expostas a 2 μM de fura-2 AM por 10 min a 37°C em um banho orbital rotatório que foi continuamente agitado a 20 rpm. As células foram lavadas exaustivamente com solução normal e foram mantidas a temperatura ambiente por 30 min para facilitar a desesterificação do marcador. Após, as mesmas foram lavadas com solução normal para remover algum resíduo do marcador. As células foram iluminadas somente com luz ultravioleta (UV) ou branca por reduzido período de tempo e cada lamínula com as células foi usada por tempo não superior a uma hora, para reduzir o possível efeito da perda de coloração induzida pela luz e vazamento de fura-2. Usando este protocolo, nós obtivemos níveis de fluorescência bem estáveis e reproduzíveis.

A medida da razão da fluorescência da excitação em 340/380 nm foi usada para estimar $[\text{Ca}^{2+}]_i$ usando a seguinte equação (Grynkiewicz, Poenie & Tsien, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)),$$

onde:

K_d é a constante de dissociação para a fura-2 AM;

R é a razão entre a fluorescência subtraída do "background" da excitação a 340 nm e 380 nm;

R_{min} é a razão da fluorescência avaliada quando a célula é exposta a 25 mM de EGTA (zero cálcio);

R_{max} é a razão da fluorescência obtida em presença de 10 μ M ionomicina (Calbiochem, Cálcio saturado);

β é a razão do sinal de fluorescência da excitação em 380 nm da célula exposta a EGTA (zero cálcio) e a mesma célula exposta a ionomicina (cálcio saturado).

No presente estudo os parâmetros para a determinação do $[Ca^{2+}]_i$ foram: $K_d = 224$ mM (Williams & Fay, 1990); $\beta = 5.2$; $R_{min} = 0.44$ e $R_{max} = 4.29$. Em mais que 90% das células o procedimento de calibração foi completamente atingido dentro de 10 min.

As drogas usadas foram cafeína (Sigma), ácido ciclopiazônico (CPA, Fluka), raionidina (Calbiochem), S-nitroso-acetilpenicilamina (SNAP, Research Biochemicals International) e o veículo, dimetilsulfoxido (DMSO, 0,03%, Sigma). As drogas foram aplicadas através de injeções em bolus de 50 μ l usando diretamente uma micropipeta dentro da câmara obtendo a concentração final.

2.5 Aplicação das drogas durante os experimentos eletrofisiológicos

As drogas em estudo foram aplicadas localmente a uma distância de 10 - 20 μm das células quimiossensitivas tipo I, por gravidade, usando uma micropipeta (10 - 15 μm de diâmetro de ponta, vidro tipo N51A, Garner Glass Co.). A ação da droga era encerrada através da remoção da micropipeta do meio. Todos os compostos foram diluídos em solução externa a partir das soluções estoques concentradas (aquosas ou em etanol absoluto) e diluídas à concentração final imediatamente antes do uso. As soluções estoque foram mantidas a -50°C ou -80°C . Nimodipina (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA), (+)202-791 (2,6-dimetil-3-carbometoxi-5-nitro-4-(2-trifluorometil-fenil)-1,4-diidropiridina) doada por Kathleen D. Roskaz (Sandoz Research Institute, East Hanover, NJ, USA) e L-[+]-cloreto de muscarina (Research Biochemiclas International) foram diluídas, diariamente, em solução extracelular das soluções estoques de 10 mM em etanol absoluto. A concentração final de etanol foi 0.01% que não teve efeito sobre as correntes de Ca^{2+} das células em estudo. As seguintes soluções estoque foram preparadas em água deionizada: 1 mM ω -conotoxina GVIA (ω -CgTX GVIA, Bachem Inc., Torrance, CA, USA), 100 μM ω -agatoxina IVA (ω -Aga IVA, Peptides International, Louisville, KY, USA), 100 μM ω -conotoxina MVIIC (ω -CgTX MVIIC, Peptides International), 1 mM [D-Trp⁸]-somatostatina (SST, Bachem Inc.), 0.5 mM peptídeo vasoativo intestinal (VIP, Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA), 10 mM met-enkefalina (Sigma), 1 mM substância P (Sigma), 100 mM [-]-hidroclorato de norepinefrina (NE, Sigma), 10 mM 9- β -D-ribofuranosiladenina (adenosina, Sigma), 10 mM 5-hidroclorato de hidroxitriptamina (5-HT, Sigma), 10 mM 3-hidroclorato de hidroxitiramina

(dopamina, Sigma), 1 mM angiotensina II humana (Ang. II, Sigma), 1 mM endotelina-3 (Peptídeo International), 10 mM sal sódico 8-bromo-guanosina 3':5'-monofosfato ciclica (8-Br-cGMP, Sigma), 1 M cloreto de cádmio (CdCl_2 , Fluka, Ronkonkoma, NY, USA), 1 M cloreto de bário (BaCl_2 , Sigma), 1 M cloreto de níquel (NiCl_2 , Sigma), 1 M de acetato de tetraetilamônio (TEA, Sigma), 12 μM charibdotoxina (ChTx, Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) e 100 μM iberiotoxina (IbTx, Research Biochemicals International, Natick, MA, USA). Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) foi diluído na solução extracelular a partir de uma solução estoque de 1.62 mM em dimetilsulfoxido (DMSO). S-nitroso-acetilpenicilamina (SNAP, Research Biochemicals International) foi diluído em solução extracelular usando uma solução estoque de 100 mM em dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma). A concentração final de DMSO foi de 0,03% e não teve efeito significativo sobre as correntes iônicas estudadas. O pH da solução estoque de SNAP foi ajustado para 7.2 para evitar o efeito do pH sobre a liberação interna de Ca^{2+} e ativação dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} . Soluções estoque de NE, adenosina, 5-HT, 8-Br-cGMP, CdCl_2 , e NiCl_2 , foram preparadas imediatamente antes do uso. As soluções de NE e (+)202-791 foram protegidas da luz sempre que possível.

2.6 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). Os níveis de significância estatística foram determinados pelo teste "t" de student para dados pareados ou não pareados conforme apropriado. Quando do uso de outros testes os mesmos serão mencionados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3.0 Resultados

3.1 Identificação morfológica e imunocitoquímica das células quimiorreceptoras tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos

Os dados presente neste trabalho foram obtidos de células quimiorreceptoras tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. Estas células foram distinguidas de outros tipos celulares presentes na cultura usando critérios morfológico e imunocitoquímico. Células enzimaticamente dissociadas do corpo carotídeo consistiram de um número muito pequeno de ambos os tipos celulares isolados (tipo I e tipo II) e de agregados de células de diferentes tamanhos. A Fig. 2 mostra uma fotomicrografia em contraste de fase de uma célula quimiossensitiva tipo I isolada. Imediatamente após a decantação as células apresentam-se de forma arredondada e brilhante. Após várias horas em cultura, as células aparecem como uma população homogênea com a maioria possuindo um corpo de aproximadamente 10 μm de diâmetro com pequenos processos. Estas células foram identificadas como células tipo I de acordo com os critérios morfológicos.

As células tipo I são células adrenérgicas que exibem atividade tirosina hidroxilase (TH, revisado por González e col., 1994). O teste imunoreativo para tirosina hidroxilase foi usado para confirmar a identidade das células tipo I do corpo carotídeo. As células positivas para o teste Anti-TH foram de aproximadamente 10 μm em diâmetro e puderam facilmente ser distinguidas das células de diâmetro menor, negativas para o referido teste da TH. Estes resultados eram esperados desde que dados semelhantes foram obtidos por

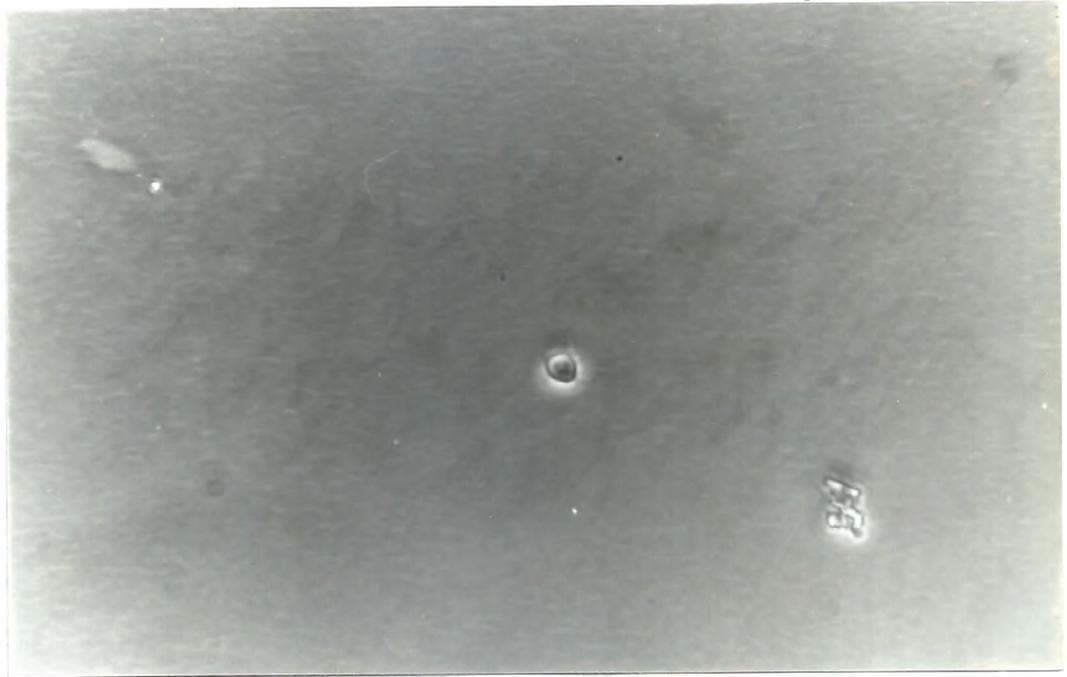


Fig. 2. Aspectos morfológicos das células quimiossensitivas tipo I isoladas pela dissociação enzimática do corpo carotídeo de ratos adultos observadas sob contraste de fase. Fotomicrografia em contraste de fase de uma célula isolada que estende pequenos processos em cultura (cultura de 2 - 8 horas). Escala (10 mm = 25 μ m).

Nurse (1990) em ratos recém-nascidos. A omissão do anticorpo primário resultou na ausência de imunoreatividade nas culturas de células controle.

3.2 Características das correntes macroscópicas de Ca^{2+} em células quimiorreceptoras tipo I do corpo carotídeo de ratos adulto

3.2.1 Correntes macroscópicas de Ca^{2+} - Célula-inteira

As características das correntes de Ca^{2+} dependentes de voltagem foram estudadas em 143 células tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos adultos. O registro da corrente macroscópica em célula-inteira foi realizado usando soluções extracelulares e interna (da micropipeta) que efetivamente isolaram as correntes de Ca^{2+} (veja métodos). Sob estas condições, as correntes de Ca^{2+} foram registradas em uma solução externa contendo 10 mM de Ca^{2+} .

Três evidências mostraram que as correntes estudadas sob estas condições eram correntes de Ca^{2+} : (1) as correntes foram aumentadas ou inibidas por agonistas ou antagonistas orgânicos dos canais de Ca^{2+} , respectivamente; (2) as correntes foram inibidas por bloqueadores inorgânicos dos canais de Ca^{2+} ; e (3) o Ba^{2+} foi conduzido através destes canais.

As correntes de entrada de Ca^{2+} , obtidas usando ondas quadradas de voltagem despolarizantes de 70 ms de duração apareceram a partir de voltagens em torno de -40 mV, atingindo geralmente uma amplitude máxima numa voltagem teste entre -3 e 2 mV e voltando a diminuir progressivamente

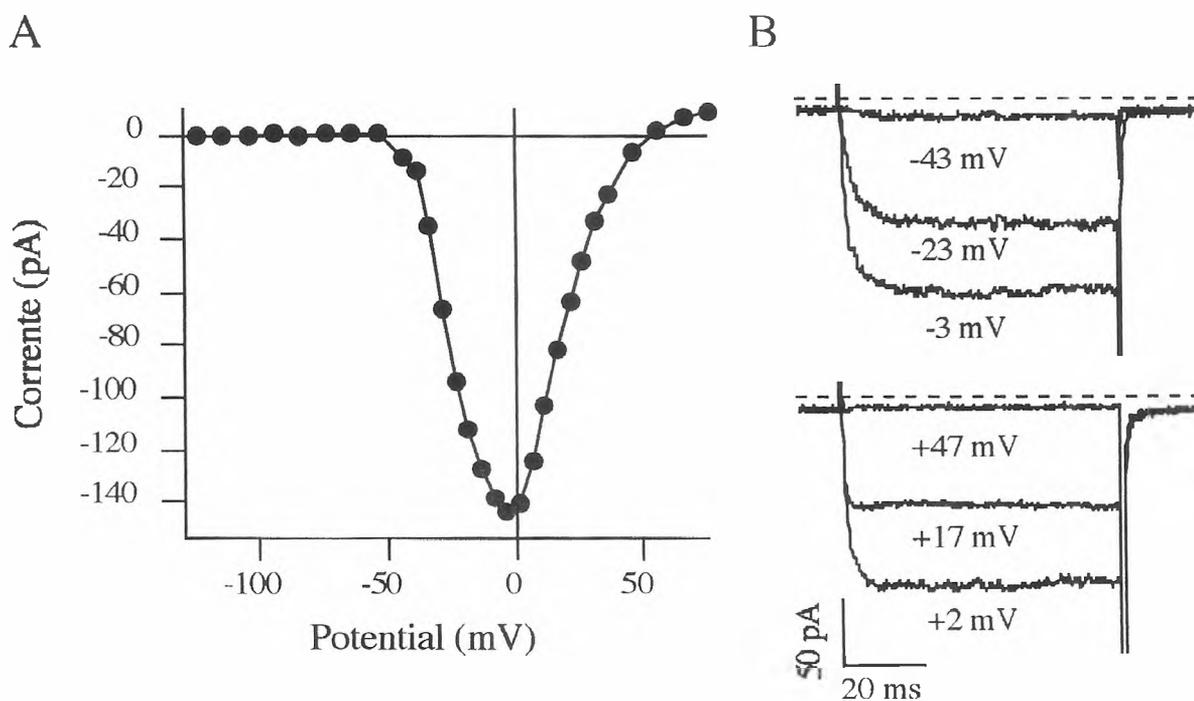


Fig. 3. Correntes de Ca^{2+} de células tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos adultos, registradas com a técnica convencional de "patch-clamp" em célula-inteira. *A*, Curva corrente-voltagem (I-V); amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV. *B*, Registros superpostos de corrente obtidos da mesma célula do gráfico em *A*, correspondentes a pulsos de clampeamento de voltagem para os valores mostrados junto aos traços. O potencial no qual obtivemos corrente igual a zero é indicado pela linha pontilhada.

com valores mais positivos de voltagem (Fig. 3). As correntes foram mantidas durante os 70 ms do pulso despolarizante (Fig 3B). A amplitude máxima de corrente variou de célula para célula e em 10 mM de Ca^{2+} externo alterou entre -30 a -270 pA com uma média de -94 ± 4.5 pA ($n = 101$).

O estado de equilíbrio de inativação da corrente de Ca^{2+} foi determinado usando o protocolo mostrado na inserção da Fig. 4. Ele consistiu de um pré-pulso de 30 s de duração com a voltagem clampeada em um dado valor entre -100 e -20 mV, seguido de um pulso de 70 ms de duração. As amplitudes de correntes foram medidas entre 50-55 ms no potencial teste de -3 mV e foram normalizadas usando a amplitude evocada quando o potencial de manutenção foi clampeado em -100 mV. A média das amplitudes foi ajustada usando a equação modificada de Boltzmann:

$$i(V) = I_{\max} [1 + \exp((V - V_{0,5})/K)]^{-1}$$

onde:

i é a amplitude da corrente numa determinada voltagem V ;

I_{\max} é a amplitude máxima da corrente;

$V_{0,5}$ é a voltagem na qual obtivemos metade da inativação;

K é o coeficiente angular.

O $V_{0,5}$ e o K de inativação da corrente de entrada de Ca^{2+} em células tipo I foram -38 mV e 11 mV, respectivamente. Os resultados nos dão a medida da dependência de voltagem da corrente de Ca^{2+} em células quimiossensitivas tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos (Fig. 4).

Quando o Ba^{2+} (10 mM) substitui o Ca^{2+} (10 mM) como um carreador de cargas elétricas, a amplitude máxima de corrente foi aumentado em 80 ± 26

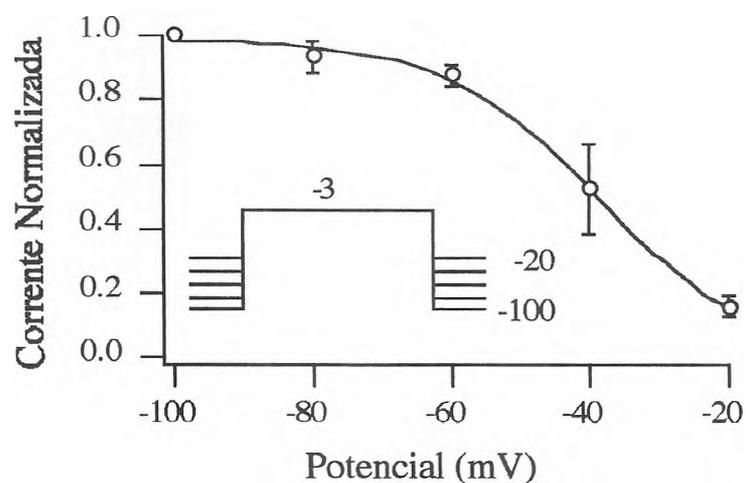


Fig. 4 Inativação das correntes de Ca^{2+} em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. Estado estacionário da amplitude de corrente medida num potencial teste de -3 mV ao final de um pulso de 70 ms de duração precedido por um pré-pulso de 30 sec de duração em que a voltagem foi clampeada em valores variando entre -100 e -20 mV (veja inserção na figura). As amplitudes de corrente foram normalizadas pela amplitude evocada com potencial do pré-pulso clampeado em -100 mV. As médias das amplitudes de correntes normalizadas (\circ , $n = 3$) são lançadas no gráfico em função do potencial do pré-pulso. A linha sólida representa a melhor curva que descreve os pontos experimentais usando a equação modificada de Boltzmann determinada pela regressão não linear dos mínimos quadrados. O potencial no qual obtivemos 50% de inativação dos canais iônicos de Ca^{2+} foi -38 mV. O valor de K foi de 11 mV. As barras verticais representam o EPM.

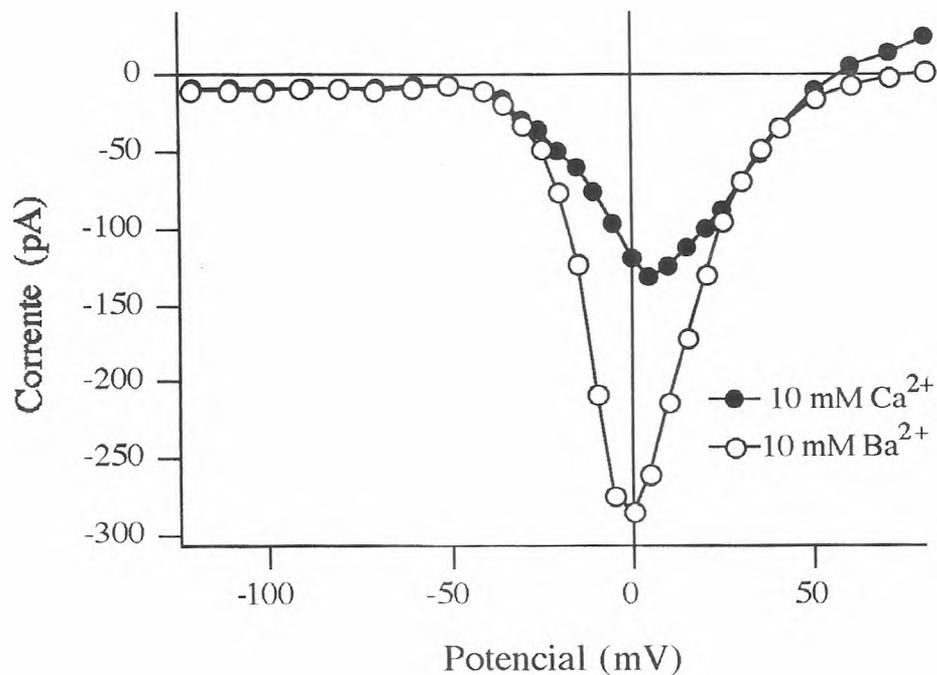


Fig. 5. Condutância ao Ba²⁺ dos canais de Ca²⁺ das células tipo I. Curvas da relação corrente-voltagem (I-V) em presença de 10 mM de Ba²⁺ (○) ou de Ca²⁺ (●). Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração total foi de 70 ms (potencial de manutenção clampeado em -80 mV). Observe que a condutância dos canais iônicos foi maior ao Ba²⁺ que ao Ca²⁺.

% (n = 5). A Fig. 5 mostra as curvas I-V superpostas para uma célula representativa na presença de 10 mM Ca²⁺ e após perfusão com 10 mM de Ba²⁺.

A sensibilidade da corrente de Ca²⁺ ao cádmio (Cd²⁺) foi testada usando duas concentrações diferentes de Cd²⁺. A amplitude de corrente, medida em -3 mV, foi reduzida em $93 \pm 1\%$ (n = 5) na presença de 500 μM de Cd²⁺ (Fig. 6). A Fig. 6B mostra os registros de corrente da mesma célula mostrada na Fig. 6A. Uma baixa concentração de Cd²⁺ (25 μM) foi usada para testar a presença de correntes de Ca²⁺ ativadas em voltagens mais negativas (Tipo T). A curva I-V na presença de 25 μM Cd²⁺ foi assimetricamente afetada (Fig 7) visto que, correntes obtidas em torno de voltagens mais negativas foram mais resistentes que as correntes obtidas nas voltagens mais positivas. A corrente de Ca²⁺ resistente a 25 μM Cd²⁺ apresentou um pico amplo entre -17 e -3 mV e se manteve durante os 70 ms de despolarização (Fig. 7B). A amplitude máxima da corrente medida no potencial de -3 mV decresceu em $63 \pm 4\%$ (n = 4) na presença de 25 μM Cd²⁺. Baixa concentração de Cd²⁺ bloqueia as correntes de Ca²⁺ ativadas em voltagens mais positivas quando comparadas às correntes ativadas em voltagens mais negativas, onde obtém-se uma ativação dos canais de Ca²⁺ tipo T (Fox, Nowycky & Tsien, 1987; Narahashi, Tsunoo & Yoshii, 1987).

Finalmente, foi testada a sensibilidade da corrente de Ca²⁺ ao níquel (Ni²⁺), um bloqueador de canais de Ca²⁺ tipo T (Tsien, Lipscombe, Madison & Fox, 1988). Esta corrente foi relativamente insensível a 28 μM de Ni²⁺. A

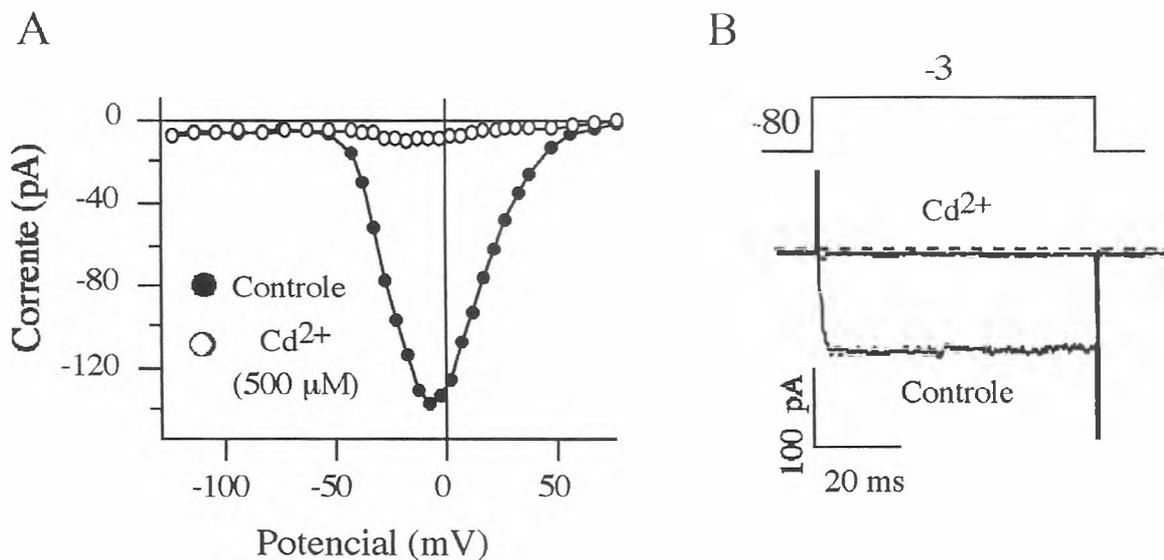


Fig. 6. Sensibilidade das correntes de Ca^{2+} das células tipo I do corpo carotídeo de ratos a $500 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . *A*, curvas da relação corrente-voltagem em presença (○) e ausência (●) de $500 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a $+80 \text{ mV}$, com incremento de 10 mV , cuja duração total foi de 70 ms (potencial de manutenção clampeado em -80 mV). *B*, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em *A*, correspondente a pulsos de clampeamento de voltagem para -3 mV , na presença e na ausência de $500 \mu\text{M}$ Cd^{2+} . A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

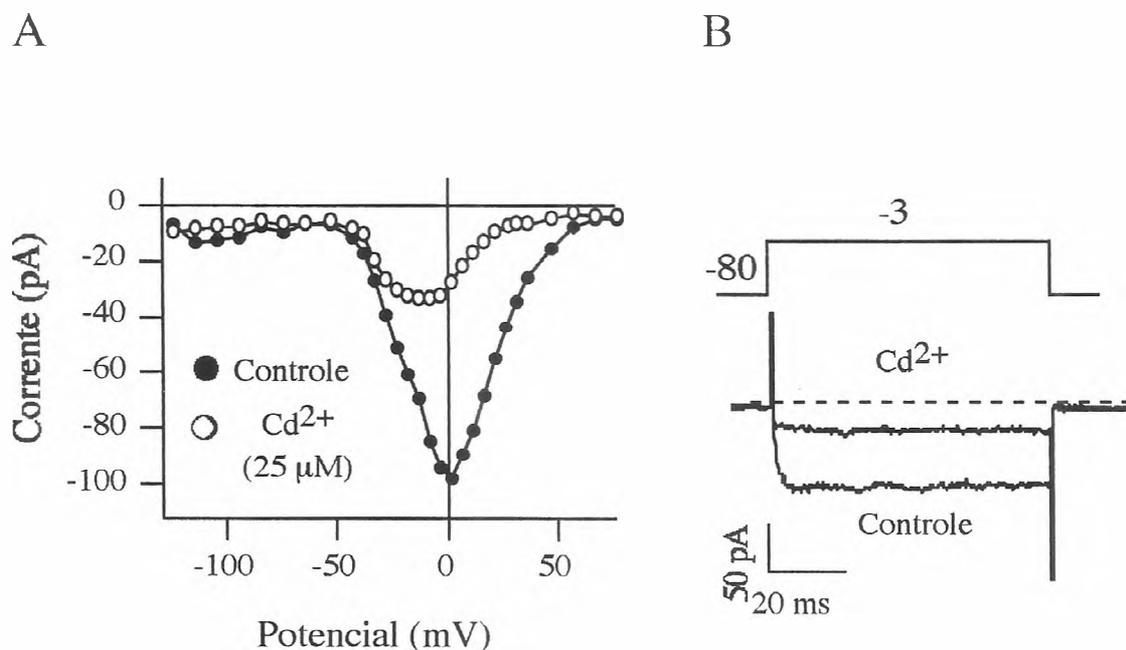


Fig. 7. Sensibilidade das correntes de Ca^{2+} das células tipo I do corpo carotídeo de ratos a $25 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . *A*, gráfico da relação corrente-voltagem em presença (\circ) e ausência (\bullet) de $25 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a $+80 \text{ mV}$, com incremento de 10 mV , cuja duração total foi de 70 ms (potencial de manutenção clampeado em -80 mV). *B*, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em *A*, correspondente a pulsos de clampeamento de voltagem para -3 mV , na presença e na ausência de $25 \mu\text{M}$ Cd^{2+} . A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

amplitude máxima da curva I-V foi reduzida em apenas $7 \pm 3\%$ ($n = 4$) na presença desta concentração de Ni^{2+} .

3.2.2 Canais de Ca^{2+} tipo L sensíveis a diidropiridina

Agonistas e antagonista de canais de Ca^{2+} foram usados para caracterizar os tipos de canais de Ca^{2+} presentes nas células tipo I. A Fig. 8A ilustra a curva I-V registrada na presença e na ausência de $1 \mu\text{M}$ de (+)202-791, um agonista diidropiridínico de canais de Ca^{2+} . A amplitude máxima da corrente aumentou assimetricamente na presença deste agonista. A ocorrência da amplitude máxima de corrente da relação I-V deslocou-se da voltagem de -3 mV para -13 mV . Em adição, observou-se, na presença deste agonista, um aumento da amplitude da cauda de corrente ao final do pulso despolarizante de -18 mV (Fig 8B). (+)202-791 promoveu um aumento na amplitude da corrente de Ca^{2+} em $106 \pm 11\%$, $79 \pm 8\%$ e $35 \pm 5\%$ em resposta aos potenciais testes de -18 , -13 e -3 mV ($n = 6$), respectivamente. Este efeito foi reversível após a lavagem da droga.

O antagonista diidropiridínico de canais de Ca^{2+} nimodipina, bloqueou parcialmente a corrente de Ca^{2+} como mostra a Fig 9. A curva I-V obtida com o potencial de manutenção clampeado em -80 mV , foi assimetricamente diminuída na presença de nimodipina induzindo uma inibição preferencial na curva em potenciais negativos em relação a -18 mV (Fig. 9A). Os registros de corrente correspondentes a deformação da curva I-V obtidos no potencial teste de -30 mV são mostrados na Fig. 9B.

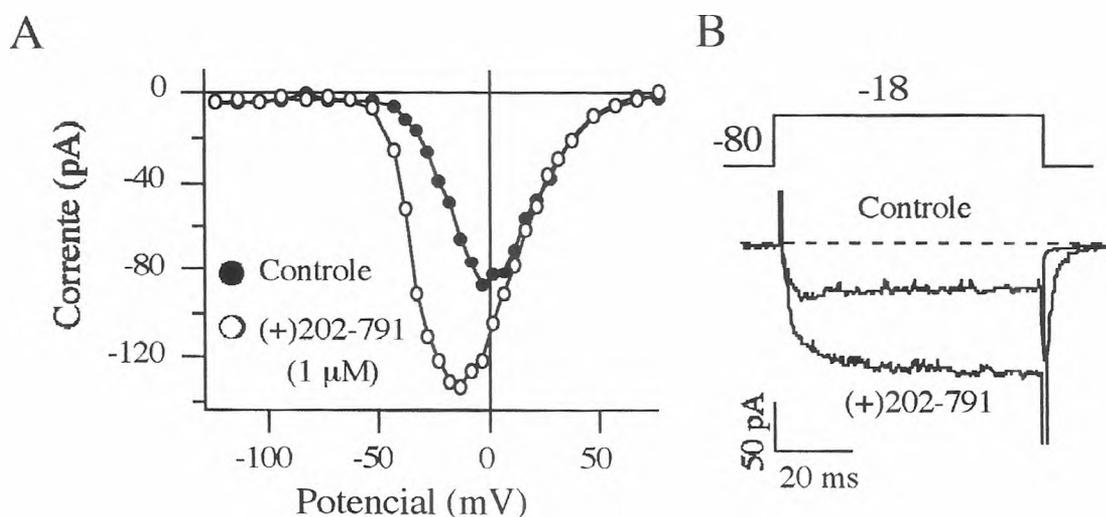


Fig.8. Efeito do agonista diidropiridínico de canais de Ca^{2+} (+)202-791, sobre a corrente de Ca^{2+} de células quimiorreceptoras tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos adultos. *A*, Curvas I-V na presença (○) e ausência (●) de 1 μM de (+)202-791. Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV. *B*, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em *A*, correspondentes a pulsos de clampeamento de voltagem para -18 mV na presença e na ausência de 1 μM (+)202-791. Observe em *B* o retardo na inativação dos canais iônicos na presença de (+)202-791, mostrado pelo aumento da amplitude da cauda de corrente, em relação ao controle. Linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

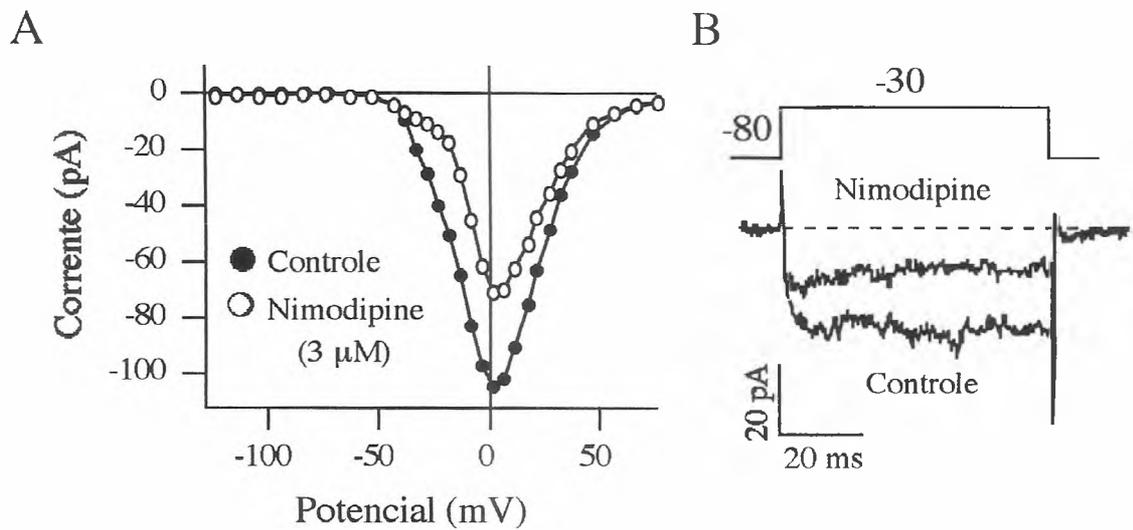


Fig. 9. Efeito do antagonista diidropiridínico de canais de Ca^{2+} nimodipina, sobre a corrente de Ca^{2+} de células tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos adultos. A, Curva I-V na presença (○) e ausência (●) de $3 \mu\text{M}$ nimodipina. Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a $+80 \text{ mV}$, com incremento de 10 mV , cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV . B, Registros superpostos de correntes na presença e na ausência de nimodipina, obtidos em pulsos em que a voltagem teste (-30 mV) se situou na faixa de potenciais em que houve inibição preferencial da corrente. A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

Para determinar se o bloqueio pela nimodipina era dependente de voltagem comparamos as amplitudes de corrente obtidas com o potencial de manutenção clampeado em -60 mV com aquelas obtidas com o clampeamento de voltagem em -80 mV. A amplitude máxima de corrente de Ca^{2+} reduziu em $40 \pm 5\%$ (-80 mV, n = 6) e $74 \pm 3\%$ (-60 mV, n = 11) numa voltagem teste de -13 mV. Esse fato mostra que em células tipo I a nimodipina foi mais potente ($p < 0,05$) em bloquear as correntes de Ca^{2+} nos potenciais de membrana menos negativo. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura especializada pois a inibição pela nimodipina é dependente de voltagem (Cohen & McCarthy, 1987).

3.2.3 Canais de Ca^{2+} tipo N sensíveis a ω -Conotoxina GVIA

Para investigar a contribuição dos canais de Ca^{2+} tipo N na corrente total de Ca^{2+} das células tipo I, testamos a capacidade da ω -CgTx GVIA de bloquear esta corrente. Esta é uma toxina isolada da lesma marinha *Conus geographus* (Oliveira, McIntosh, Cruz, Luque & Gray, 1984) sendo caracterizada como um potente e irreversível bloqueador dos canais de Ca^{2+} tipo N (McCleskey, Fox, Feldman, Cruz, Oliveira, Tsien & Yoshikami, 1987; Aosaki & Kasai, 1989; Plummer, Logothetis & Hess, 1989). Quando as células tipo I foram expostas a $10 \mu\text{M}$ de ω -CgTx GVIA, a curva I-V mostrou uma inibição assimétrica, visto que as correntes em potenciais mais negativos que -18 mV foram menos afetadas (Fig. 10). O curso temporal da corrente obtida em -3 mV não foi alterada na presença de ω -CgTx GVIA (Fig. 10B). A ω -CgTx GVIA produziu uma inibição irreversível da corrente de Ca^{2+} em todas

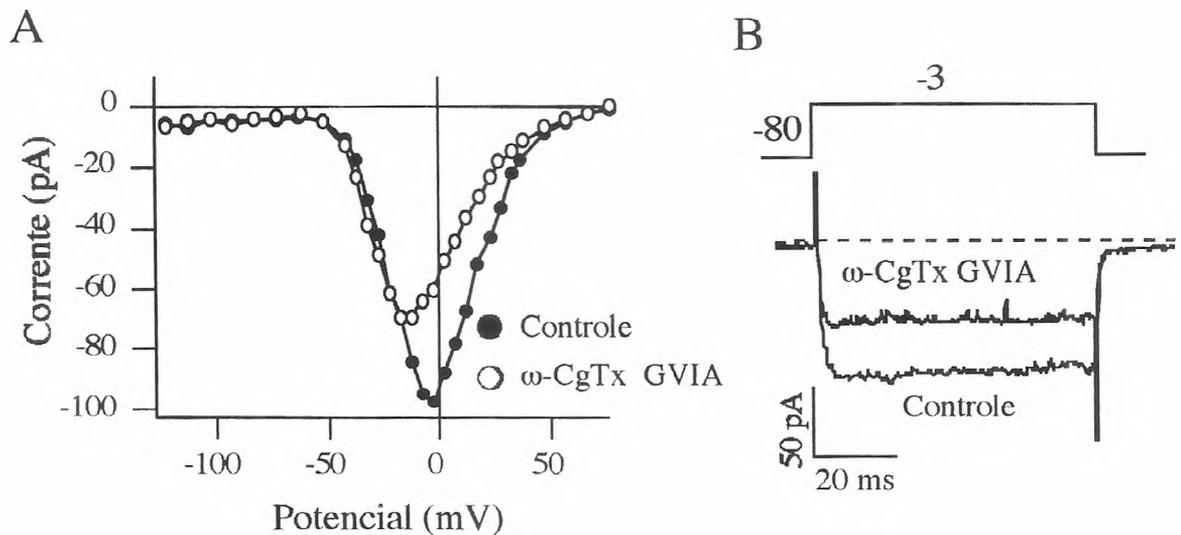


Fig. 10. Efeito da ω -CgTx GVIA sobre as correntes de Ca^{2+} de células tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos adultos. *A*, relação I-V na presença (○) e ausência (●) de $10 \mu\text{M}$ ω -CgTx GVIA. Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a $+80 \text{ mV}$, com incremento de 10 mV , cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV . *B*, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em *A*, correspondentes a pulsos de clampeamento de voltagem para -3 mV , na presença e na ausência de ω -CgTx GVIA. A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

as células testadas com uma média de inibição de $40 \pm 0,1\%$ ($n = 10$).

3.2.4 Efeitos da ω -agatoxina IVA e ω -conotoxina MVIIC sobre as correntes de Ca^{2+} de células tipo I

Os experimentos seguintes foram realizados para determinar a identidade de outros tipos de canais de Ca^{2+} que contribuem para a corrente de Ca^{2+} em células tipo I. A presença de canais de Ca^{2+} tipo P foi investigada usando o peptídeo tóxico ω -agatoxina IVA (ω -Aga IVA), que tem sido mostrado como um potente bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo P em células de Purkinje do cerebelo (Mintz, Adams & Bean, 1992). A ω -Aga IVA ($0.2 \mu M$), na presença de 0,1% de citocromo C, não teve efeito sobre a corrente de Ca^{2+} dependente de voltagem em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. De acordo com este critério, as células tipo I do corpo carotídeo de ratos não possuem canais de Ca^{2+} tipo P.

A ω -CgTx MVIIC é um peptídeo sintético que inibe uma corrente de Ca^{2+} resistente a ω -CgTx GVIA em neurônios CA1 do hipocampo (Hillyard, Monje, Mintz, Bean, Nadasdi, Ramachandran, Miljanich, Azim-Zoonooz, McIntosh, Cruz, Imperial & Oliveira, 1992), uma corrente de Ca^{2+} tipo Q em neurônios granulares do cerebelo (Randall, Wendland, Schweizer, Miljanich, Adams & Tsien, 1993; Zhang, Randall, Ellinon, Horne, Sather, Tanabe, Schwarz & Tsien, 1993) e correntes de Ca^{2+} α_1A expressos em oócitos de *Xenopus* (Sather, Tanabe, Zhang, Mori, Adams & Tsien, 1993). A ω -CgTx MVIIC ($1 \mu M$) quando aplicada nas células tipo I reduziu a corrente de Ca^{2+} em $38 \pm 5\%$ ($n = 6$) no potencial teste de -3 mV (Fig. 11). No entanto, desde que a ω -CgTx MVIIC pode inibir correntes de Ca^{2+} tipo N (Hillyard e col.,

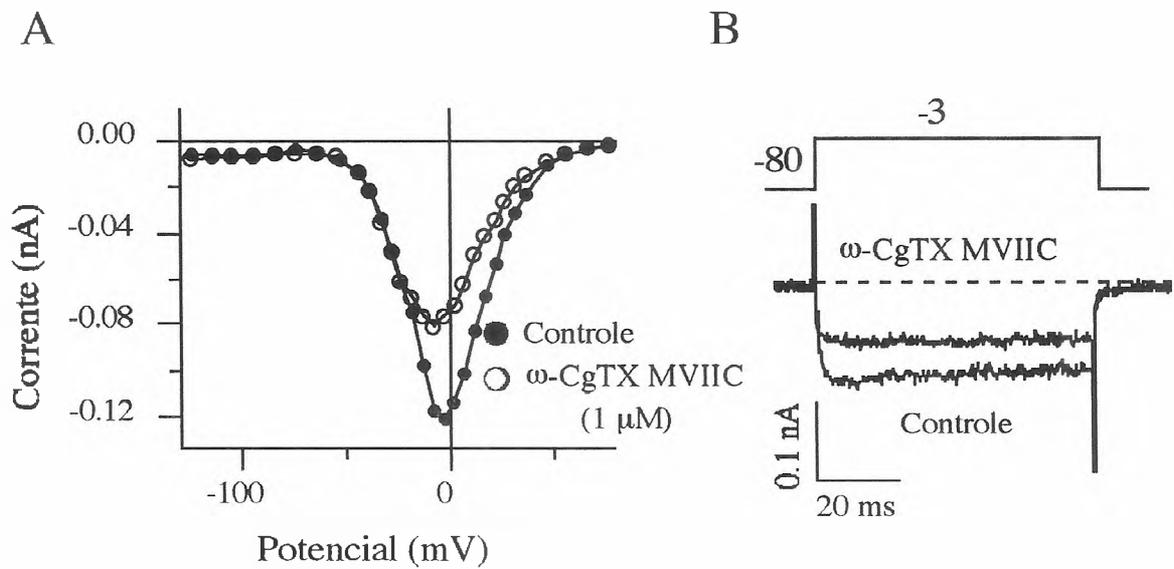


Fig. 11. Efeito da ω -CgTx MVIIC sobre as correntes de Ca^{2+} de células tipo I isoladas do corpo carotídeo de ratos. A, curva I-V na presença (○) e ausência (●) de 1 μM ω -CgTx MVIIC. Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV. B, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em A, correspondentes a pulsos de clampeamento de voltagem para -3 mV, na presença e na ausência de ω -CgTx MVIIC. A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

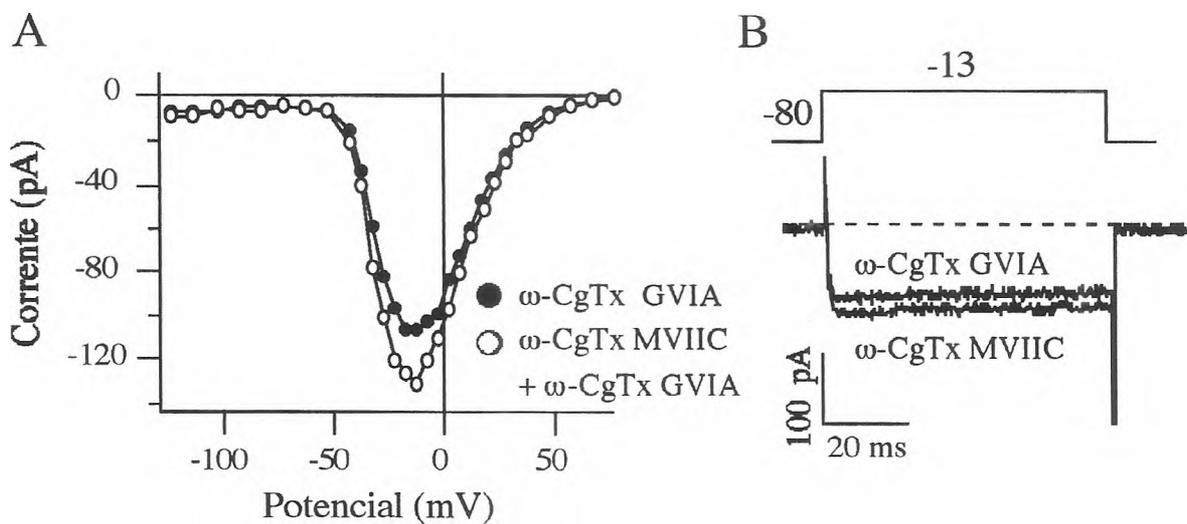


Fig. 12. Efeito da ω -CgTx MVIIC sobre as correntes de Ca^{2+} de células tipo I isoladas após pré-tratamento com ω -CgTx GVIA. A, Curva I-V na presença (●) de $10 \mu\text{M}$ ω -CgTx GVIA e na presença (○) de $1 \mu\text{M}$ ω -CgTx MVIIC após pré-tratamento com ω -CgTx GVIA. Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV. B, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em A, correspondentes a pulsos de clampeamento de voltagem para -13 mV, da mesma célula mostrada em A na presença de ω -CgTx GVIA e na presença de ω -CgTx MVIIC após pré-tratamento com ω -CgTx GVIA. A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

1992), nós aplicamos 1 μM de $\omega\text{-CgTx MVIIC}$ após pré-tratamento com 10 μM de $\omega\text{-CgTx GVIA}$. Este protocolo experimental teve por objetivo determinar se a inibição produzida pela $\omega\text{-CgTx MVIIC}$ foi devido ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo N. Os resultados mostraram que a aplicação de $\omega\text{-CgTx MVIIC}$ não bloqueou os canais de Ca^{2+} que foram insensíveis a $\omega\text{-CgTx GVIA}$ (Fig. 12). Ao contrário, obtivemos um aumento da corrente de Ca^{2+} voltagem-dependente em $11 \pm 2\%$ ($n = 4$) após pré-tratamento com a $\omega\text{-CgTx GVIA}$.

3.2.5 Contribuição relativa dos canais de Ca^{2+} tipos L e tipo N na corrente total

As células tipo I têm pelo menos dois tipos de canais de Ca^{2+} que podem ser distinguidos por critérios farmacológicos: um canal tipo L, sensível a nimodipina e um canal tipo N, sensível a $\omega\text{-CgTx GVIA}$. Para estudarmos as contribuições relativas e os limites de voltagem de ativação destes dois tipos de canais de Ca^{2+} na corrente em célula-inteira, nós realizamos um experimento usando a combinação de nimodipina e $\omega\text{-CgTx GVIA}$. A Fig. 13A ilustra o efeito combinado de 3 μM de nimodipina mais 10 μM de $\omega\text{-CgTx GVIA}$ sobre as curvas I-V em células tipo I isoladas. A curva I-V na presença de nimodipina e $\omega\text{-CgTx GVIA}$ não foi bloqueada completamente (Fig. 13A, círculos abertos). Após lavagem das drogas, a curva I-V não recuperou completamente (Fig. 13A, triângulos fechados) devido ao bloqueio pela $\omega\text{-CgTx GVIA}$, que é irreversível. Os registros de corrente para a voltagem teste de -8 mV em condições controle, na presença de nimodipina mais $\omega\text{-CgTx GVIA}$ e após lavagem são mostradas na Fig. 13B. Além disso, a corrente de

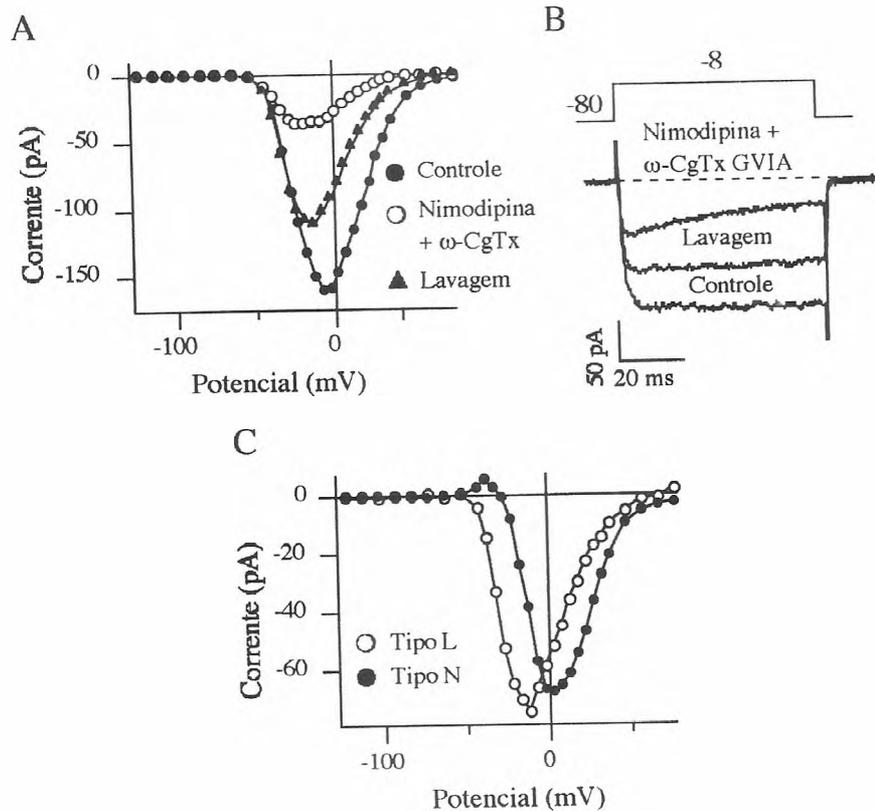


Fig. 13. Correntes de Ca^{2+} tipo L e tipo N. A, Curvas I-V na ausência (●) e na presença (○) da aplicação combinada de nimodipina ($3 \mu\text{M}$) e $\omega\text{-CgTx GVIA}$ ($10 \mu\text{M}$) e após lavagem (▲). Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV. Observe que o componente de corrente sensível a nimodipina recuperou após a lavagem. B, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em A, correspondentes a pulsos de clampeamento de voltagem para -8 mV. C, A subtração das curvas I-V mostradas em A produziu os componentes de correntes de Ca^{2+} tipo L sensível a nimodipina (○) e tipo N sensível a $\omega\text{-CgTx GVIA}$ (●).

Ca^{2+} não foi inativada durante os 70 ms de despolarização quando usamos cada droga isoladamente. No entanto, a corrente de Ca^{2+} na presença de nimodipina mais ω -CgTx GVIA mostra um transiente que inativou-se com uma constante de tempo de 25.5 ± 2 ms ($n = 5$). As correntes tipo N e tipo L, obtidas pela subtração das correntes em presença dos bloqueadores e após a lavagem dos mesmos, mostrou características da curva I-V quando os referidos bloqueadores foram usados isoladamente (Fig. 13C). Nestas células, as correntes tipo L atingiram sua amplitude máxima no potencial teste de -13 mV ($-12,4 \pm 1.8$ mV, $n = 8$) e as correntes tipo N em +2 mV (2.0 ± 1.4 mV, $n = 8$).

Uma série de experimentos foi realizada para caracterizar a corrente de Ca^{2+} resistente aos efeitos combinados da nimodipina e ω -CgTx GVIA. Esta corrente foi bloqueada em $82 \pm 6\%$ ($n = 3$) por $25 \mu\text{M}$ Cd^{2+} (Fig. 14A) e $36 \pm 3\%$ ($n = 3$) por $200 \mu\text{M}$ Ni^{2+} (Fig. 14B). O Ba^{2+} , usado como um carreador de cargas elétricas, substituiu o Ca^{2+} e aumentou a corrente resistente a nimodipina e ω -CgTx GVIA em $87 \pm 10\%$ ($n = 2$, Fig 14C). Esta corrente é provavelmente composta de canais de Ca^{2+} que são incompletamente bloqueados pela nimodipina e/ou possivelmente outros tipos adicionais de canais de Ca^{2+} .

1.3 Modulações das correntes de Ca^{2+} em células tipo I

O corpo carotídeo contém uma variedade de neurotransmissores incluindo norepinefrina, dopamina, Ach, 5-HT, VIP, encefalina, substância P, galanina, neuropeptídeo Y, bombesina, colecistocinina e peptídeo natriurético

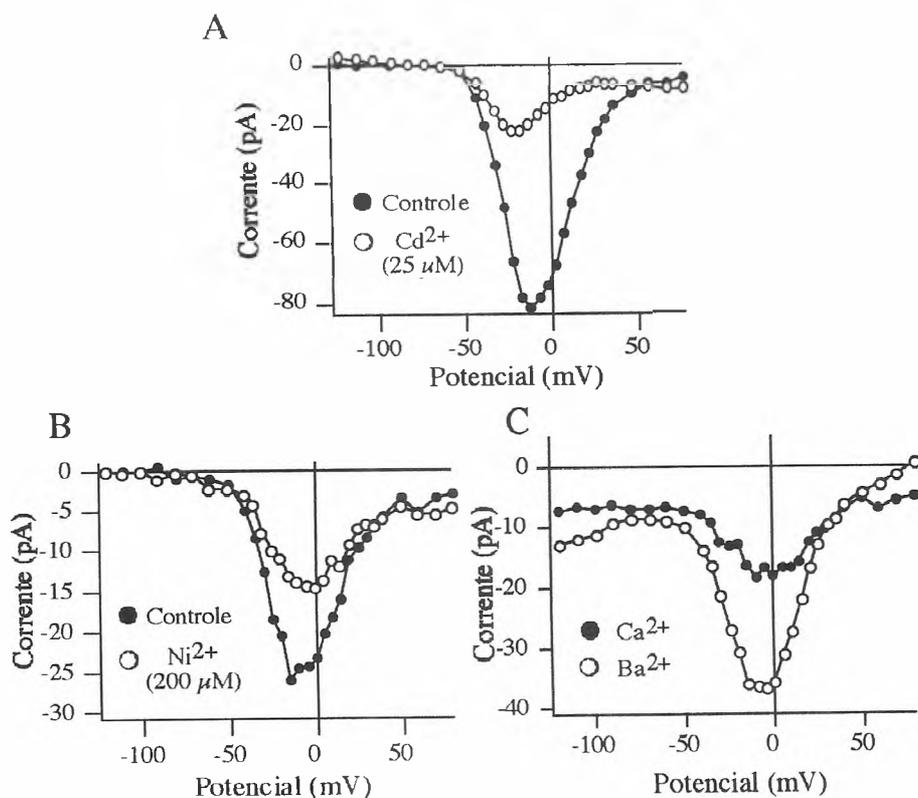


Fig. 14. Correntes de Ca^{2+} resistentes aos efeitos combinados da nimodipina e $\omega\text{-CgTx}$ GVIA em células tipo I. A, Corrente de Ca^{2+} resistente aos efeitos combinados dos antagonistas (●) foi reduzida na presença de $25 \mu\text{M}$ Cd^{2+} (○). B, Curva I-V representativa na presença (○) e ausência (●) de $200 \mu\text{M}$ Ni^{2+} . C, Curva I-V na presença de 10 mM Ca^{2+} (●) e na presença de 10 mM Ba^{2+} (○). Amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem que variaram de -120 mV a $+80 \text{ mV}$, com incremento de 10 mV , cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV . Todos os experimentos foram realizados na presença de $3 \mu\text{M}$ de nimodipina após pré-tratamento com $10 \mu\text{M}$ de $\omega\text{-CgTx}$ GVIA.

atrial localizados nos corpos celulares e/ou terminações nervosas (revisado por González e col., 1994). A ativação dos receptores: colinérgicos muscarínicos pela L-[+]-muscarina ($10 \mu\text{M}$, $n = 4$); adrenérgicos pela norepinefrina ($100 \mu\text{M}$, $n = 4$) e opióides, com $1 \mu\text{M}$ de met-enkefalina ($n = 3$), todos presentes nas células tipo I, não teve efeito significativo sobre as correntes de Ca^{2+} das referidas células (Tabela I). O VIP, encontrado nas terminações nervosas presentes no corpo carotídeo, ativa descargas quimiossensoras, mas o mecanismo de ação não está esclarecido (revisado por González e col., 1994). Nós, portanto, testamos se o VIP poderia ter efeito direto em alterar as correntes de Ca^{2+} nas células tipo I. A aplicação de $1 \mu\text{M}$ VIP ($n = 3$) não teve efeito significativo sobre este tipo de corrente nas células tipo I (Tabela I).

Vários subtipos de receptores serotoninérgicos têm sido recentemente clonados, mas não foram ainda mapeados no corpo carotídeo de rato. Desde que 5-HT está presente no corpo carotídeo, nós testamos se as correntes de Ca^{2+} das células tipo I são sensíveis a este neurotransmissor. 5-HT ($10 \mu\text{M}$, $n = 3$) não teve efeito significativo sobre as correntes de Ca^{2+} .

A Substância P ($1 \mu\text{M}$, $n = 3$) e a adenosina ($10 \mu\text{M}$, $n = 5$) também foram testadas e os dados obtidos mostraram que as mesmas não alteram as correntes de Ca^{2+} nas células em estudo (Tabela I). Contudo, a DA ($10 \mu\text{M}$) e a SST ($0,1 \mu\text{M}$) inibiram, de forma significativa e reversível a amplitude máxima de corrente, em $25 \pm 0,5\%$ ($n = 2$) e $24 \pm 2\%$ ($n = 11$) no potencial de -3 mV . Além disso, a SST ativou a corrente de Ca^{2+} mais lentamente que na corrente controle. Esta ativação lenta é característica da inibição dependente de voltagem mediada pela proteína G (Bean, 1989; Ikeda, 1991).

Substâncias tais como, angiotensina II, endotelina e óxido nítrico, presentes no sangue podem atingir as células quimiorreceptoras pela alta

vascularização do corpo carotídeo, modulando suas funções. O óxido nítrico também pode ser liberado das fibras nervosas que contêm óxido nítrico sintetase as quais formam um extensivo plexo que inerva as células quimiorreceptoras do corpo carotídeo e os vasos sanguíneos associados (Wang e col., 1994). Nem a angiotensina II ($1 \mu\text{M}$, $n = 3$), nem a endotelina-3 ($1 \mu\text{M}$, $n = 4$) ou o doador de óxido nítrico - a S-nitroso-N-penicilamina ($250 \mu\text{M}$, $n = 5$) produziram efeitos sobre as correntes de Ca^{2+} nas células tipo I.

Posto que se acredite serem alguns efeitos do óxido nítrico mediados através da proteína quinase dependente de GMPc (Southam & Garthwaite, 1991; Vincent, 1994) nós verificamos se o análogo de GMPc, o 8-Br-cGMP, poderia alterar a corrente de Ca^{2+} nas células tipo I. De maneira semelhante ao doador de óxido nítrico, o 8-Br-cGMP (1 mM) também não teve nenhum efeito significativo ($n = 3$) sobre as correntes de Ca^{2+} das células tipo I (Tabela I).

Outro modulador de correntes iônicas é a proteína quinase C. Com o intuito de investigarmos seus efeitos sobre as correntes de Ca^{2+} nas células em estudo, utilizamos um ativador de proteína quinase C, o PMA. Os resultados obtidos mostraram que a ativação da proteína quinase C pelo PMA ($0,5 \mu\text{M}$, $n = 7$) também não produziu efeito significativo sobre as correntes de Ca^{2+} nas células tipo I (Tabela I).

Tabela 1. Efeito de neurotransmissores, peptídeos e segundo mensageiros sobre correntes de Ca^{2+} em células tipo I do corpo carotídeo de ratos (Média \pm EPM).

Droga	N [▲]	Dose (μM)	Razão [⊗]
L-[+]-muscarina	4	10	0.88 ± 0.05
NE	4	100	0.90 ± 0.03
VIP	3	1	0.97 ± 0.02
Met-Encefalina	3	1	0.96 ± 0.03
Subs. P	3	1	0.96 ± 0.02
5-HT	3	10	0.99 ± 0.006
Adenosina	5	10	0.90 ± 0.04
Somatostatina	11	0.1	0.76 ± 0.02
Ang. II	3	1	0.98 ± 0.01
Endothelin-3	4	1	0.84 ± 0.02
SNAP	5	250	0.87 ± 0.02
8-Br-cGMP	3	1000	1.07 ± 0.03
PMA	7	0.5	0.90 ± 0.02
Dopamina	2	10	0.75 ± 0.005

⊗ Amplitude experimental/ Amplitude controle, Razão de amplitude de corrente medida entre 50-55 ms do curso temporal para um pulso de voltagem clampeada em -3 mV, cuja duração total foi de 70 ms e o potencial de manutenção clampeado em -80 mV.

▲ N, número de experimentos.

3.4 Efeito do doador de óxido nítrico (SNAP) sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+}

S-nitrosotióis incluindo S-nitroso-glutatio e o SNAP têm sido usados recentemente por suas capacidades em liberar NO (Kowaluk & Fung, 1990). Para examinar a capacidade das células tipo I de responder ao NO exógeno, nós monitoramos os níveis de Ca^{2+} intracelulares em resposta ao SNAP. Esta substância foi usada neste estudo porque: 1) é o mais estável dos compostos S-nitrosotiois (George & Shibata, 1995); 2) é também aceito como um ótimo doador de NO e 3) tem uma alta eficácia como um liberador de NO (Southam & Garthwaite, 1991; Kowaluk & Fung, 1990). Aplicações em bolus de SNAP (concentração final $250 \mu\text{M}$) induziu um aumento de 8 vezes nos níveis de Ca^{2+} intracelulares nas células tipo I (Fig. 15 e Tabela 2). A média dos níveis basais do Ca^{2+} intracelular foi $62 \pm 5 \text{ nM}$ ($n = 25$). Quando o SNAP ($250 \mu\text{M}$) foi aplicado, os níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentaram para $480 \pm 80 \text{ nM}$ ($n = 8$). O tempo médio necessário para a obtenção do pico de Ca^{2+} foi $121 \pm 29 \text{ s}$ ($n = 8$, Tabela 2). Para assegurar que o aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} não foi devido ao processo da aplicação em bolus, nós aplicamos o veículo (DMSO 0.03%) obedecendo o mesmo protocolo experimental. O DMSO não teve nenhum efeito sobre $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular ($N = 2$, Fig. 15 e Table 2).

O aumento nos níveis de Ca^{2+} interno pode ser devido ao influxo através da membrana ou devido a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos. Em células quimiorreceptoras tipo I, é pouco provável que este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ interna causado pelo SNAP, seja devido ao influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+}

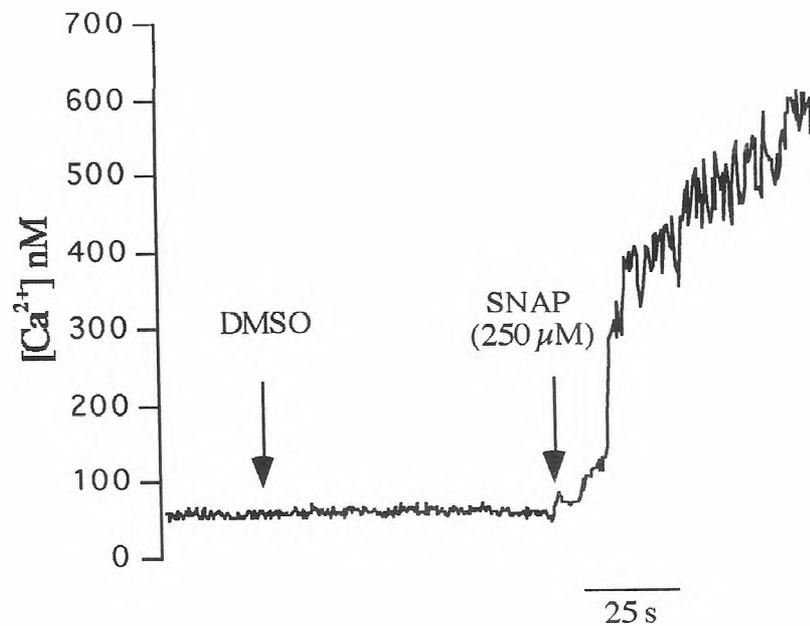


Fig. 15 Efeito de um doador de óxido nítrico, a S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), sobre a concentração do Ca^{2+} intracelular em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. Observe que a aplicação em bolus de SNAP (250 μ M) induziu lentamente um aumento de 8 vezes nos níveis intracelulares de Ca^{2+} . A aplicação em bolus do veículo (DMSO 0,03%) não teve nenhum efeito sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} nas mesmas condições experimentais.

voltagem dependentes, pois a aplicação de 250 μM SNAP resultou numa inibição da amplitude máxima da corrente de Ca^{2+} ($12 \pm 2\%$, $n = 5$, Tabela I)

Para investigarmos se o aumento intracelular da $[\text{Ca}^{2+}]$ decorria da liberação pelos estoques internos sensíveis a raionidina, células quimiossensíveis tipo I foram expostas a 250 μM SNAP após pré-tratamento com as seguintes drogas: cafeína (90 mM), ácido ciclopiazônico (30 μM) e raionidina (100 μM).

A cafeína é usada como uma ferramenta para se estudar as propriedades da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis à raionidina (Avidor, Clementi, Schwartz & Atlas, 1994). É aceito que a cafeína interage com os canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático tornando-os mais sensíveis ao Ca^{2+} que efetivamente depleta os estoques internos. Estes efeitos podem ser vistos pela diminuição na responsividade a repetidas aplicações de cafeína (Sitsapesan & Williams, 1990; Usachev, Shmigol, Pronchuk, Kostyuk & Verkhrtasky, 1993; Friel & Tsien, 1992). A aplicação em bolus de cafeína aumentou os níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células tipo I em torno de 9 vezes. As células tipo I responderam à primeira aplicação de 30 mM de cafeína com um rápido aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular (Fig. 16) retornando aos níveis basais subsequentemente. Uma segunda aplicação, mantendo a primeira, causou somente um leve aumento nas concentrações de Ca^{2+} (Fig. 16). Na terceira aplicação nenhuma resposta ocorreu indicando uma completa depleção dos estoques de Ca^{2+} sensíveis à cafeína. Em seguida, a aplicação do SNAP (250 μM) resultou num grande aumento nas concentrações de Ca^{2+} interno (Fig. 16). O pico intracelular de Ca^{2+} , em resposta ao SNAP, após pré-tratamento com cafeína, foi de 937 ± 317 nM ($n = 3$). O doador de óxido nítrico, SNAP, aumentou o Ca^{2+} intracelular mesmo após a depleção induzida

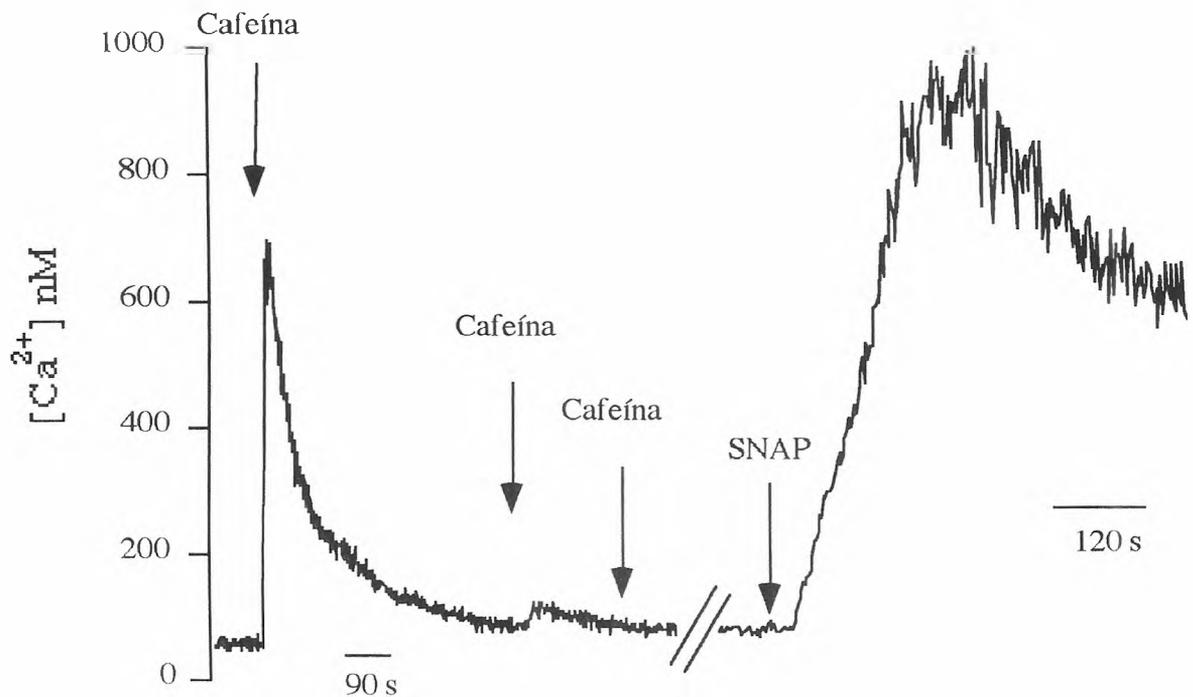


Fig. 16 Efeito de um doador de óxido nítrico, S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP), sobre a $[Ca^{2+}]_i$ após completa depleção dos estoques internos de Ca^{2+} induzida com cafeína. A aplicação em bolus de cafeína (30 mM) induziu um significativo aumento (9 vezes) nos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Uma segunda aplicação de cafeína, mantendo a primeira aplicação, produziu somente um pequeno efeito e uma terceira aplicação não produziu nenhuma liberação de Ca^{2+} . Uma aplicação subsequente de SNAP (250 μ M) causou um largo aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelulares. As barras obliquas interrompendo o registro indicam mudança de escala no domínio temporal.

pela cafeína.(Fig 16). Não existe diferença significativa na magnitude do aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelulares e no tempo para a obtenção do pico de Ca^{2+} quando comparamos o pré-tratamento com cafeína em resposta ao SNAP com o SNAP sozinho. (Tabela 2).

O ácido ciclopiazônico, uma micotoxina produzida por certos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *penicilium*, é um potente inibidor da Ca^{2+} ATPase Ca^{2+} dependente do retículo sarcoplasmático (Goeger, Riley, Dorner & Cole, 1988; Demaurex, Lew & Krause, 1992). Um outro agente usado para sondar a função do retículo sarcoplasmático é o alcalóide raionidina (Fairhurst, 1974). A raionidina em concentrações de 1-10 μM deixa os canais de liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático num estado de subcondutância causando a inibição da liberação de Ca^{2+} mediada pela cafeína e pelo Ca^{2+} (Friel & Tsien, 1992). Isso ocorre devido a prevenção da acumulação de Ca^{2+} nos estoques internos. Altas concentrações de raionidina (em torno de 100 μM) induz o bloqueio dos canais de liberação de Ca^{2+} ativados pelo Ca^{2+} (Kostyuk & Verkhatsky, 1994). O pré-tratamento com CPA (30 μM) e altas concentrações de raionidina (100 μM) por 30 a 40 min não alterou o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promovido pelo SNAP (Tabela 2). Contudo, o pré-tratamento com CPA e raionidina aumentou significativamente ($p < 0.05$) o tempo para a obtenção do pico da concentração intracelular de Ca^{2+} em resposta ao SNAP, que aumentou de 121 ± 29 s para 467 ± 101 s (Tabela 2).

Em resumo, nossos dados demonstram que o SNAP, um doador de óxido nítrico, promove um aumento significante nos níveis intracelulares de Ca^{2+} que não podem ser atribuídos ao influxo via canais de Ca^{2+} voltagem

Tabela 2. Efeitos do S-Nitroso-N-Penicilamina (SNAP) na presença de bloqueadores da liberação de Ca^{2+} dos estoques internos sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em células quimiorreceptoras tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. Valores expressos em Média \pm EPM

Tratamento	N	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)	Tempo (s)
Basal	25	62 ± 5.0	
DMSO	2	60 ± 3.5	
SNAP	8	480 ± 80^a	121 ± 29
Cafeína	3	540 ± 157^a	48 ± 36
SNAP após pré-tratamento com cafeína	3	937 ± 317^a	243 ± 106
SNAP após pré-tratamento com CPA & Riaonidina	5	422 ± 87^a	467 ± 101^b

^a Significativamente diferente do controle ($p < 0.05$, ANOVA e teste de Dunn para contraste).

^b Significativamente diferente do valor correspondente em presença apenas de SNAP ($p < 0.05$, ANOVA e teste de Bonferroni para contraste).

dependentes nem à liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares que são sensíveis à raionidina.

3.5 Efeito do doador de óxido nítrico, SNAP, sobre as correntes de K^+ dependentes de Ca^{2+}

Como demonstramos que o doador de óxido nítrico induziu um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} e está documentado que o NO participa na modulação da excitabilidade da célula tipo I (Wang e col., 1995), procuramos determinar o papel do SNAP em uma corrente importante para a excitabilidade neuronal que é a corrente de K^+ ativada pelo Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}).

Como a existência desses canais em células tipo I de ratos está documentada apenas em ratos neonatos (Wyatt & Peers, 1995), procuramos inicialmente investigar a presença desses canais em células tipo I de ratos adultos.

Correntes de K^+ foram isoladas de outros tipos de correntes dependentes de voltagem usando agentes farmacológicos e a substituição de íons (Veja métodos). As correntes de K^+ foram obtidas durante um intervalo de 200 ms de despolarização a partir de um pulso de clampeamento de voltagem com o potencial de manutenção clampeado em -50 mV. Potenciais de membrana mais positivos que -30 mV produziram, nas células em estudo, correntes para fora de potássio que foram dependentes do tempo e da voltagem e foram mantidas durante os 200 ms de despolarização. O curso temporal e a magnitude das correntes dependeram fortemente do potencial de membrana e o limiar para

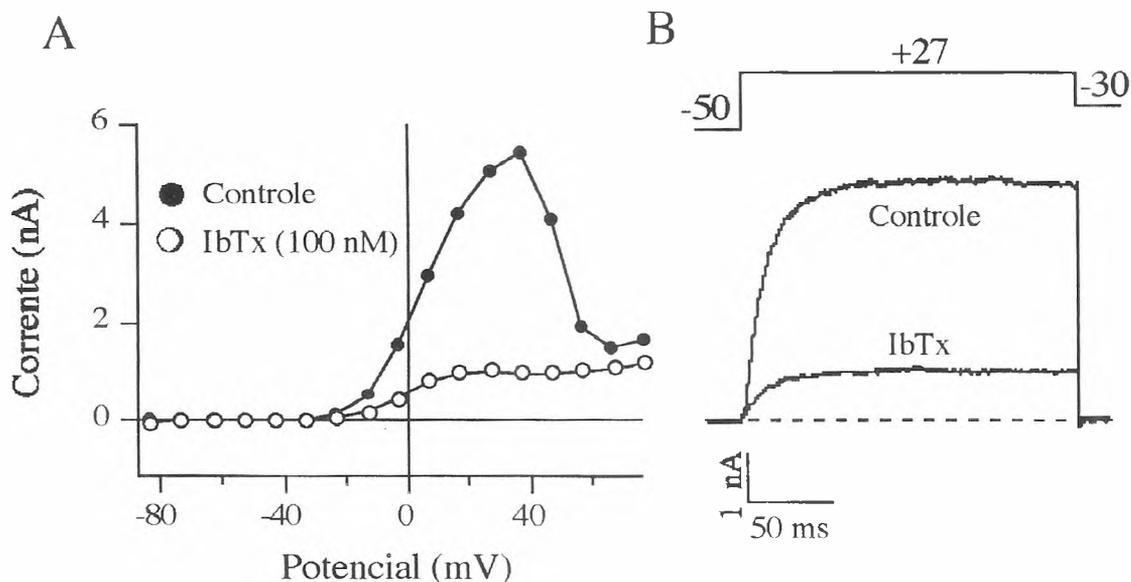


Fig. 17 Sensibilidade da corrente de saída de K^+ das células tipo I à iberiotoxina. *A*, Curvas I-V obtidas na presença (○) e ausência (●) de 100 nM IbTx. A amplitude da corrente foi medida entre 180 e 190 ms do curso temporal dos pulsos testes de clampeamento de voltagem. Estes pulsos variaram de -80 a +80 mV, com incremento de 10 mV, cuja duração total foi de 200 ms. O potencial de manutenção clampeado foi de -50 mV. *B*, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em *A*, correspondentes a pulsos de voltagem clampeada em +27 mV, da mesma célula mostrada em *A* obtidos na presença e na ausência de IbTx. A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

ativação foi -30 mV. A amplitude dessa corrente e a região de inclinação angular negativa da curva I-V foram bloqueadas em 74 ± 3.5 (n = 4) e 75 ± 3.0 % (n = 6) com a aplicação externa de 10 mM TEA e 500 μ M Cd²⁺, respectivamente. Esta concentração de Cd²⁺ bloqueia completamente as correntes de Ca²⁺ dependentes de voltagem nestas células (veja Fig. 6). Estes resultados sugerem a presença de canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺ em células tipo I.

Para confirmar a presença dessas correntes nessas células de ratos adultos, testamos a sensibilidade para dois tipos de toxinas, a ChTx e a IbTx. Estas toxinas são dois pequenos peptídeos purificados dos venenos de escorpiões *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Gimenez-Gallego, Navia, Reuben, Katz, Kaczorowski & Garcia, 1988) e *Buthus tamulus* (Galvez, Gimenez-Gallego, Reuben, Roy-Contancin, Feigenbaum, Kaczorowski & Garcia, 1990), respectivamente. ChTx e IbTx são conhecidas por bloquearem os canais de K⁺ de larga condutância dependentes de Ca²⁺ em um grande número de preparações (MacKinnon & Miller, 1988; Sugg, Garcia, Reuben, Patchett & Kaczorowski, 1990; Galvez e col., 1990). Contudo, IbTx é um bloqueador que se acredita ser seletivo para essa classe de canais de K⁺ (Galvez e col., 1990; Deutsch, Price, Lee, King & Garcia, 1991). A aplicação externa de 10 nM de ChTx reduziu em $73 \pm 6\%$ (n = 4) a corrente de K⁺ durante um pulso despolarizante de +27 mV. Aplicações externas de 100 nM de IbTx reduziu de forma irreversível a corrente de K⁺ em $73 \pm 3\%$ a +27 mV (n = 3) como ilustrado na Fig. 17.

3.5.1 Efeito do SNAP, um doador de óxido nítrico, sobre as correntes macroscópicas e unitárias de K⁺

Desde que o SNAP pode aumentar os níveis de Ca²⁺ intracelulares, esta mudança pode ativar a corrente de K⁺ dependente de Ca²⁺ nas células tipo I do corpo carotídeo de ratos e produzir uma medida independente da liberação de Ca²⁺ intracelular. O SNAP (250 μM) quando aplicado externamente por 5 min aumentou significativamente (22 ± 3%, p < 0.007) de forma reversível a corrente macroscópica de K⁺ em 5 das 13 células tipo I testadas (Fig. 18).

Desde que o método de registro de correntes iônicas utilizando a configuração célula-inteira pode perturbar mecanismos biológicos intracelulares, e com isso alterar a expressão e/ou modulação desses canais iônicos, nós investigamos o efeito do SNAP a nível do canal isolado usando o método de "patch clamp" na configuração célula-aderida (cell-attached). Este método tem a vantagem de assegurar a atividade do canal sem perturbação do meio interno.

O registro das propriedades do canal unitário de K⁺ nas células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos mostrou uma corrente de larga amplitude. Esses canais são dependentes de voltagem e apresentam tempo de abertura longo (Figs. 19 e 20). Usando histograma de distribuição de frequência das amplitudes com ajustamento ao modelo da distribuição normal, as amplitudes de corrente no canal isolado à voltagem clampeada em +50 mV mostraram um pico de amplitude de 9.6 pA (Fig. 19A). No pulso de voltagem clampeada em +80 mV o histograma de distribuição de frequência das amplitudes de corrente permitiu a visualização de dois picos de amplitudes - 11.7 e 21.2 pA

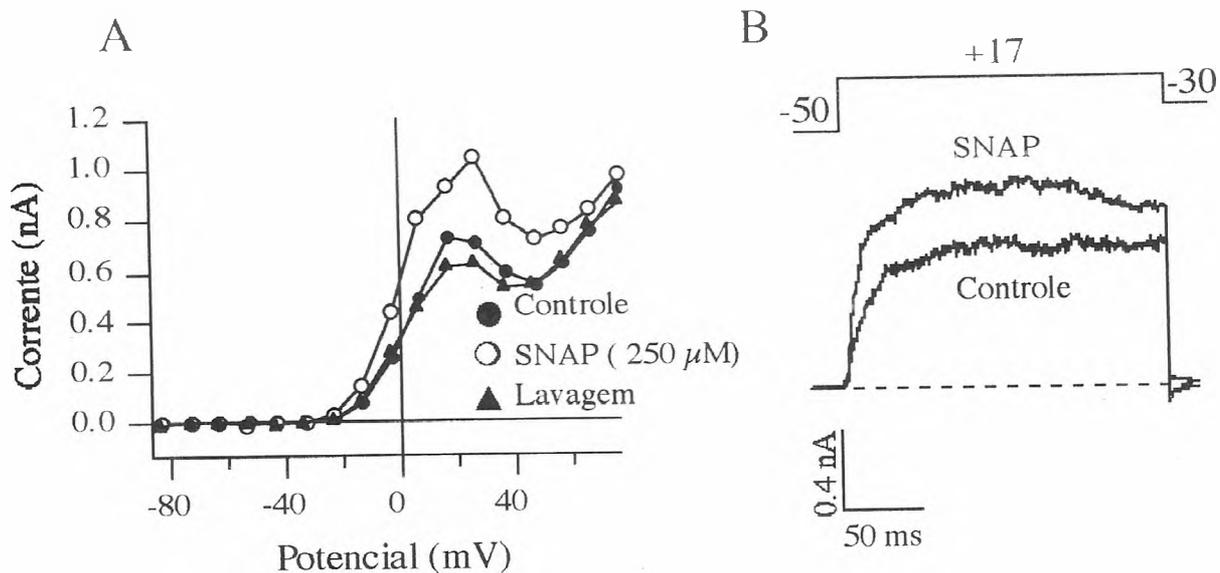


Fig. 18 Efeito do S-Nitroso-N-Penicilamina (SNAP), um doador de óxido nítrico, sobre a corrente macroscópica de K^+ em célula tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. *A*, Curva I-V para a corrente controle (●), na presença de $250 \mu\text{M}$ SNAP (○) e após a lavagem do SNAP (▲). A corrente foi medida entre 180-190 ms do curso temporal dos pulsos-teste que variaram de -80 mV a +80 mV, com incremento de 10 mV. A duração desses pulsos foi de 200 ms e o potencial de manutenção foi estabelecido em -50 mV. *B*, Registros superpostos de corrente da mesma célula do gráfico em *A*, correspondente a pulsos de voltagem clampada em +17 mV, da mesma célula mostrada em *A* na presença e na ausência de $250 \mu\text{M}$ de SNAP. A linha interrompida mostra o nível zero de corrente.

(Fig 20A). As Figuras 19B e 20B mostram registros representativos das correntes unitárias de K^+ para um pulso de voltagem clampeada em +50 mV e +80 mV, respectivamente. A grande amplitude e o longo tempo de abertura destes canais são característicos de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} que se manifestam com alta condutância relatado em células tipo I do corpo carotídeo de ratos neonatos (Wyatt & Peers, 1995).

A atividade do canal isolado de K^+ dependente de Ca^{2+} obtida durante pulsos de 200 ms de duração em que a voltagem foi clampeada em +50 mV, foi monitorada com o intuito de determinar se o doador de óxido nítrico, SNAP, poderia alterar sua probabilidade de abertura (NP_O).

Em 6 "patches", o SNAP (250 μ M) aumentou a NP_O em $88 \pm 19\%$ (faixa: 43 a 178%, $p < 0.0001$) após 2 min. No entanto, em 3 outros "patches" não se pode observar nenhum efeito. A Fig. 21 ilustra o aumento na NP_O na presença do SNAP e mostra registros representativos da corrente antes e durante a aplicação de 250 μ M SNAP.

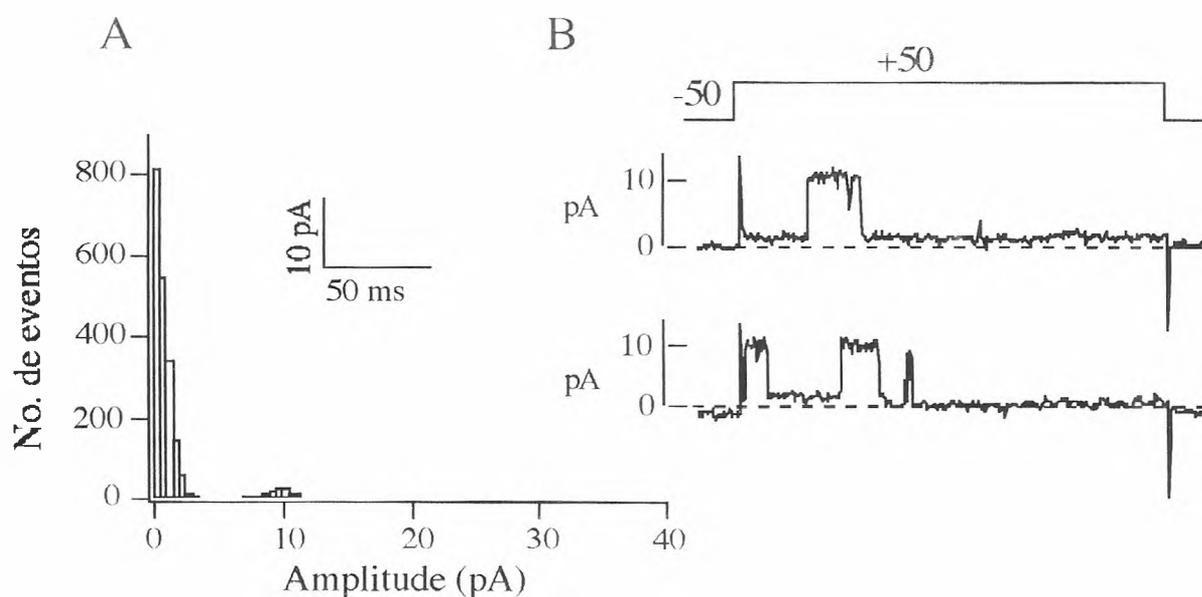


Fig. 19 Amplitudes de correntes unitárias de K^+ dependentes de Ca^{2+} em células-aderidas registradas em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. *A*, Histograma construído a partir do traçado de seis pulsos de 200 ms de duração em que a voltagem foi clampedada em +50 mV a partir de um potencial de manutenção de -50 mV. O histograma de distribuição de frequência mostrou a presença de um canal cuja amplitude de corrente é de 9.6 pA. *B*, Registros de corrente representativos da atividade do canal isolado, obtidos durante pulsos de clampeamento de voltagem de 200 ms de duração. Linhas pontilhadas indicam o nível zero de corrente. A abertura do canal corresponde às deflexões para cima. Os artefatos da corrente capacitiva podem ser visualizados no começo e no final dos traços de corrente.

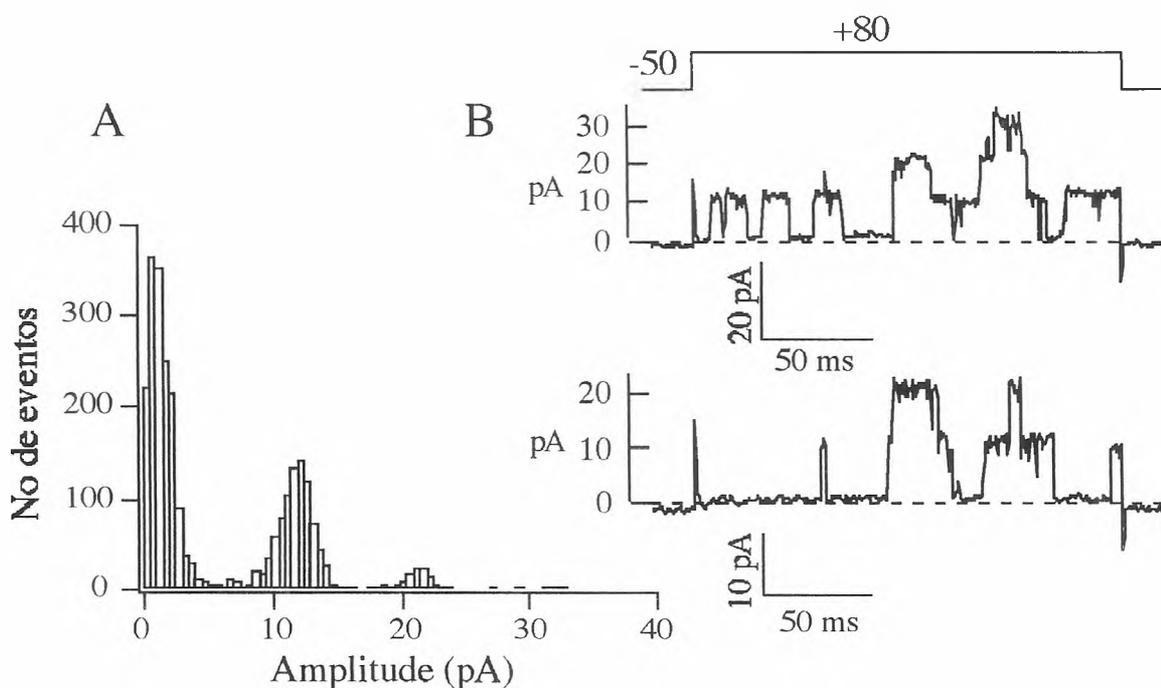


Fig. 20 Amplitudes de correntes unitárias de K^+ dependentes de Ca^{2+} em células-aderidas registradas em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. *A*, Histograma construído a partir do traçado de seis pulsos de 200 ms de duração em que a voltagem foi clampeada em +80 mV a partir de uma voltagem clampeada em -50 mV. O histograma de distribuição de frequência mostrou a presença de canais de K^+ com amplitudes de corrente de 11.7 e 21.2 pA. A possibilidade de um terceiro pico não está clara. *B*, Registros de corrente representativos da atividade do canal isolado, obtidos durante pulsos de clampeamento de voltagem de 200 ms de duração. Linhas pontilhadas indicam o nível zero de corrente. A abertura do canal corresponde às deflexões para cima. Os artefatos da corrente capacitiva podem ser visualizados no começo e no final dos traços de corrente.

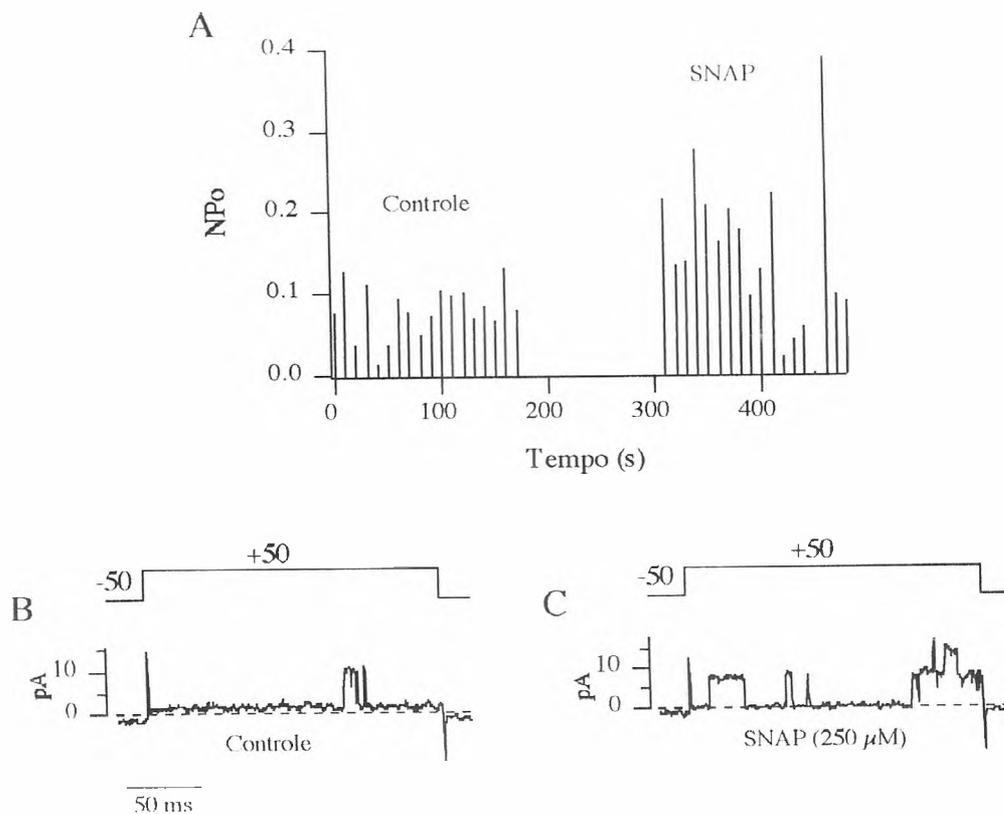


Fig. 21 Efeito da S-Nitroso-N-Penicilamina (SNAP), um doador de óxido nítrico na atividade do canal isolado de K^+ dependente de Ca^{2+} em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. A, Probabilidade de abertura do canal (NP_0) antes e durante a exposição da preparação ao SNAP (250 μ M). Registros representativos de corrente unitária no canal isolado durante o controle (B) e em presença de SNAP (C), obtidos a partir de um pulso de clampeamento de voltagem de 200 ms de duração com o potencial de manutenção clampeado em -50 mV e o potencial teste de +50 mV. As linhas pontilhadas indicam os níveis zero de corrente.

4.0 Discussão

4.1 Caracterização e modulação das correntes de cálcio em células tipo I

As células tipo I do corpo carotídeo são sensíveis às mudanças da pO_2 , pCO_2 e pH sanguíneo e transmitem este sinal sensitivo através da liberação de dopamina. Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem das células tipo I têm, segundo os dados da literatura, um papel fundamental na secreção do neurotransmissor do corpo carotídeo e conseqüentemente na quimiotransdução. Esta importância se deve ao fato de que a liberação de dopamina das células tipo I depende do Ca^{2+} extracelular, e pode ser reduzida pelos bloqueadores de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Fidone, González & Yoshizaki, 1982; Obeso, Fidone & González, 1987).

Já está documentada a presença de canais de Ca^{2+} tipo L, sensíveis a diidropiridina nas células tipo I do corpo carotídeo de coelho e de rato (Monti-Bloch & Eyzaguirre, 1980; Duchon e col., 1988; Hescheler e col., 1989; Fieber & McCleskey, 1993). O presente estudo forneceu nova evidência para um tipo adicional de corrente de Ca^{2+} dependente de voltagem em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. Nós encontramos que as células tipo I possuem pelo menos 2 tipos de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem: um canal tipo L sensível a nimodipina e um canal tipo N sensível a ω -CgTx GVIA. Fieber e McCleskey (1993) reportaram que a ω -CgTx GVIA inibiu a corrente de Ca^{2+} em somente uma das quatro células testadas. Em contraste, nós encontramos que a ω -CgTx GVIA bloqueou em 40% a amplitude máxima das correntes de Ca^{2+} de forma irreversível, em todas as células testadas, sugerindo

que os canais de Ca^{2+} tipo N contribuem para a corrente total de Ca^{2+} nas células tipo I. As diferenças nos protocolos de obtenção e manutenção das células em cultura bem como no protocolo de registros suportam essa contestação.

Buckler e Vaughan-Jones (1994) sugeriram que outros canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, além dos canais tipo L, podem contribuir para a elevação do Ca^{2+} intracelular. Nossos resultados dão suporte a esta hipótese pois demonstramos que outro tipo adicional de canal de Ca^{2+} dependente de voltagem está presente nas células tipo I do corpo carotídeo de ratos os quais podem contribuir para a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} durante a hipercapnia ocasionada por uma acidose. Ambos os tipos de canais de Ca^{2+} (L e N) identificados em nosso estudo podem contribuir para a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} durante o potencial de ação nas células estudadas. No entanto, estudos adicionais serão necessários para determinar os papéis dos canais de Ca^{2+} tipo L e tipo N no processo de excitação-secreção no corpo carotídeo.

A contribuição de correntes iônicas mediadas por canais tipo T não foi evidenciada em nossos estudos pois o Ni^{2+} mostrou-se pouco efetivo em bloquear as correntes de Ca^{2+} nas células em estudo bem como, $25 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} preferencialmente bloqueou o componente da corrente evocado em potenciais mais positivos.

Observou-se ainda, um bloqueio preferencial induzido pelo antagonista diidropiridínico, nimodipina, em potenciais mais negativos que -18 mV . Essa inibição preferencial possivelmente poderá corresponder ao mesmo tipo de canal responsável pela corrente remanescente obtida na presença de $25 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} .

Além disso, não evidenciamos a presença de correntes tipo P (Mintz e col. 1992) ou Q (Randall e col., 1993; Zhang e col., 1993) pois de acordo com os critérios farmacológicos utilizados nem a ω -Aga IVA nem a ω -CgTx MVIIC sozinha ou após pré-tratamento com a ω -CgTx GVIA produziram alterações significativas das correntes de Ca^{2+} . O aumento na amplitude da corrente de Ca^{2+} obtido na presença da ω -CgTx MVIIC após pré tratamento com a ω -CgTx GVIA foi provavelmente devido a diminuição do bloqueio pela a ω -CgTx GVIA visto que, a ω -CgTx MVIIC é capaz de deslocar a ω -CgTx GVIA dos sítios de alta afinidade (Hillyard e col., 1992). Estes resultados sugerem que as células quimiossensíveis tipo I não possuem correntes de Ca^{2+} tipo Q que é sensível a ω -CgTx MVIIC e insensível a ω -CgTx GVIA.

As correntes de Ca^{2+} das células tipo I não foram sensíveis a modulação por alguns neurotransmissores e neuropeptídeos encontrados no corpo carotídeo, os quais são conhecidos por modularem correntes de Ca^{2+} em outros tipos de células. No entanto, a somatostatina e a dopamina tiveram efeito inibitório significativo sobre as correntes iônicas estudadas nestas células do corpo carotídeo. Os nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura que mostram que a dopamina tem efeito inibidor sobre as correntes de Ca^{2+} em células tipo I do corpo carotídeo de coelho (Benot & López-Barneo, 1990). Além disso, mais recentemente ficou demonstrado o efeito inibitório da prostaglandina E_2 sobre estas correntes de Ca^{2+} e liberação de DA (Gómez-Niño, López-López, Almaraz & González, 1994).

Adicionalmente, em nossas condições experimentais e número de observações, nem o PMA, nem o 8-Br-cGMP ou o doador de oxido nítrico, SNAP, tiveram efeitos significantes sobre as correntes de Ca^{2+} em células tipo I, indicando que estes canais iônicos não são modulados pela proteína quinase

C, proteína quinase dependente de GMPc ou óxido nítrico nas condições de registro em célula-inteira. Outras condições experimentais que causem menos interferência nas vias dos segundo mensageiros intracelulares podem revelar outros processos modulatórios e esperam futuras investigações.

De acordo com os dados obtidos podemos sugerir que, pelo menos dois tipos de canais de Ca^{2+} contribuem para a corrente total de Ca^{2+} nos quimiorreceptores tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos. Estes tipos de canais de Ca^{2+} incluem o canal tipo L sensível a nimodipina e o canal tipo N sensível a ω -CgTx GVIA. Ambos os tipos (L e N) de canais de Ca^{2+} podem contribuir para o processo da quimiotransdução nas referidas células. Em adição, a somatostatina e a dopamina podem modificar o sinal de quimiotransdução pela inibição das correntes de Ca^{2+} nas células investigadas.

4.2 Modulação das correntes de potássio em células tipo I

Recentemente, tem sido sugerido que a inibição do quimiorreceptor do corpo carotídeo mediada pela porção eferente do ramo do seio carotídeo (Fidone & Sato, 1970) pode ser mediada pela liberação de óxido nítrico das fibras nervosas sensoriais (Wang e col., 1995). O mecanismo através do qual o óxido nítrico altera as funções das células quimiossensoras tipo I do corpo carotídeo não está bem esclarecido. Portanto, experimentos foram realizados para se estudar os mecanismos de modulação da quimiotransdução nas células tipo I do corpo carotídeo de ratos pelo óxido nítrico. O doador de óxido nítrico, SNAP, foi usado e o mesmo induziu um aumento dos níveis intracelulares de

Ca²⁺ nas células tipo I e aumentou a atividade dos canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺.

Nas nossas condições experimentais 250 μ M de SNAP aumentou o Ca²⁺ intracelular de um nível basal de 62 nM para um pico de 480 nM. Aumentos semelhantes no Ca²⁺ intracelular em células intersticiais do colon de cão em resposta ao NO foi relatada por Publicover, Hammond e Sanders (1993).

Vários mecanismos podem ser aventados para explicar o aumento do Ca²⁺ intracelular induzido pelo NO, incluindo: i) um aumento no influxo do Ca²⁺ extracelular através dos canais de Ca²⁺ da membrana plasmática, ii) uma liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares ou iii) uma mudança na atividade de troca Na⁺/Ca²⁺ (Bers, Lederer & Berlin, 1990; Lederer, Berlin, Cohen, Hadley, Bers & Cannell, 1990; Bridge, Smolley, Spitzer & Chin, 1991).

Na possibilidade do aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular ser devido a entrada de Ca²⁺ através da membrana, como nós demonstramos, este não se deve ao influxo via canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem. Portanto, este Ca²⁺ poderia ser decorrente do influxo através de canais operados por receptor ou através de mecanismo de troca, e neste caso, um candidato é o mecanismo de troca Na⁺-Ca²⁺. Por outro lado, se este aumento da concentração de Ca²⁺ for decorrente da liberação dos estoques internos este não provem de um "pool" interno acessível à cafeína/raionidina, como discutiremos a seguir.

Para investigar a origem do aumento intracelular de Ca²⁺ induzido pelo SNAP vários experimentos foram realizados. Primeiro, para determinar se o SNAP podia liberar Ca²⁺ dos estoques sensíveis à raionidina, células tipo I foram expostas a altas concentrações de cafeína (90 mM). Vários autores têm demonstrado que cafeína em concentrações maiores que 10 mM libera o Ca²⁺

interno através de um mecanismo relacionado com o receptor de raionidina e depleta todo Ca^{2+} associado aos estoques sensíveis a mesma (Sitsapesan & Williams, 1990; Usachev e col. 1993; Friel & Tsien, 1992). Após 3 exposições consecutivas a 30 mM de cafeína nenhuma liberação adicional de Ca^{2+} foi observada o que indicou que os estoques de Ca^{2+} sensíveis à raionidina foram depletados. Sob estas condições experimentais 250 μM SNAP ainda foi capaz de aumentar significativamente os níveis de Ca^{2+} intracelulares, o que sugere entre outras hipóteses que o SNAP pode mobilizar Ca^{2+} de um "pool" intracelular que é inacessível à cafeína.

Em outra série de experimentos, células tipo I foram pré-tratadas com 100 μM de raionidina e 30 μM de CPA. Com o uso combinado destas drogas é esperado bloqueio total da liberação e da captação de Ca^{2+} mediada através dos estoques internos sensíveis à raionidina. Nestas condições, o SNAP ainda manteve sua capacidade em aumentar os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Estes resultados sugerem que não é via um receptor de raionidina que o SNAP promove aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular.

Por outro lado, várias linhas de pesquisa sugerem que pode existir uma ligação entre NO e a produção de ADP-ribose cíclica (Berridge, 1993) com uma conseqüente mobilização de Ca^{2+} intracelular via ativação dos receptores de raionidina (Galione, White, Willmott, Turner, Potter & Watson, 1993). Nossos dados sugerem que, se o NO estimula a liberação de Ca^{2+} , é a partir de um estoque insensível à raionidina. Assim, o papel do ADP-ribose cíclico como um mediador desta resposta permanece para ser determinado.

Rojas e colaboradores (Rojas, Nassar-Gentina, Pollard & Luxoro, 1992) trabalhando com fibras musculares de moluscos e lagosta desnudadas com saponina propuseram que sob condições fisiológicas existem pelo menos dois

mecanismos diferentes de liberação de Ca^{2+} acessíveis, um ao trifosfato de inositol (IP_3) e outro à cafeína/raionidina. Mecanismos semelhantes têm sido proposto para neurônios, células musculares lisas, células glandulares gástricas, ovos de ouriço-do-mar e hepatócitos (Gill, Mullaney & Ghosh, 1988; Lee & Hokin, 1989; Mayrleitner, Chadwick, Timerman, Fleischer & Schindler, 1991; Missiaen, Taylor & Berridge, 1991; Hofer & Machen, 1993; Hille, 1992). Em células musculares lisas, é geralmente aceito que os compartimentos sensíveis ao IP_3 são dominantes, enquanto os compartimentos sensíveis à raionidina dão menor contribuição para a liberação intracelular de Ca^{2+} . No entanto, em neurônios ambos os "pools" parecem ter contribuições significantes para a liberação de Ca^{2+} (Hille, 1992).

Em adição, NO estimula a secreção de insulina induzindo uma liberação de Ca^{2+} das mitocôndrias de células INS-1 através de uma desenergização destas organelas (Laffranchi, Gogvadze, Richter & Spinas, 1995). No entanto, a hipótese de que NO possa induzir liberação de Ca^{2+} via desenergização mitocondrial em células tipo I requer estudos futuros.

Uma outra explicação para a origem do Ca^{2+} pode ser através da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Existem evidências (Bers, 1991) sugestivas de que a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, em circunstâncias em que influencia pouco os níveis intracelulares de Ca^{2+} , pode funcionar como um possível mecanismo para liberar Ca^{2+} dos estoques internos. Se o SNAP, por exemplo, está parcialmente inibindo a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} pode ser esperado desde que a troca tenha um papel fundamental na extrusão de Ca^{2+} do citoplasma, com o objetivo de manter os níveis basais de Ca^{2+} . Esta hipótese merece investigações posteriores já este mecanismo tem papel importante no balanço intracelular de Ca^{2+} em células tipo I (Rocher e col., 1991).

Os íons Ca^{2+} possuem vários efeitos dentre os quais a modulação de canais iônicos. Até o momento, foi relatado que a condutância de vários canais de Ca^{2+} , K^+ e Cl são modulados pela alteração dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Os canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}), estão presentes em vários tipos celulares e são de fácil identificação, pois possuem corrente unitária de grande intensidade, sendo fácil o seu registro. Os nossos resultados demonstram a presença desta classe de canal de K^+ também em células tipo I de ratos adultos e estão de acordo com os dados obtidos em estudos anteriores em células tipo I de coelho adultos e neonatos (Duchen e col., 1988; Hescheler e col., 1989; López-Barneo e col., 1988) bem como, em células tipo I de ratos neonatos (Peers e O'Donnell, 1990).

A probabilidade de abertura dos canais isolados de K^+ dependentes de Ca^{2+} em células tipo I aumentou 88% na presença do SNAP. O mecanismo de ativação destes canais não foi explorado com profundidade neste estudo mas pode ser devido a vários mecanismos incluindo o aumento no Ca^{2+} intracelular induzido pelo NO. Por outro lado, dados da literatura mostram que NO ativa vários tipos de canais de K^+ em músculo liso e este efeito, em parte, envolve a elevação da guanosina 3':5'-monofosfato cíclico (Koh, Campbell, Carl & Sanders, 1995).

Foi mostrado que em músculo liso vascular NO ativa uma corrente de K^+ sensível a ChTx através de um mecanismo dependente de cGMP (Archer, Huang, Hampl, Nelson, Shultz & Weir, 1994). Em outro estudo, um aumento direto da atividade do canal de K^+ dependente de Ca^{2+} induzido pelo NO foi observado em células musculares lisas isoladas da artéria aortica de coelho (Bolotina, Najibi, Palacino, Pagano & Cohen, 1994). Permanece a ser investigado quais os mecanismos que estão envolvidos na ativação dos canais

de K^+ dependentes de Ca^{2+} em células quimiossensitivas tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos.

As células tipo I possuem várias características em comum com outras células excitáveis. A elevação de $[Ca^{2+}]_i$ é essencial para a liberação de catecolaminas. Em adição, a elevação na $[Ca^{2+}]_i$ aumenta a atividade dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} e este efeito resulta numa hiperpolarização celular, inibindo os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, bloqueando então a liberação de catecolaminas (Dopamina). Assim é pertinente o questionamento se o antagonismo à entrada de Ca^{2+} criado pela ativação do BK_{Ca} influencia o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ a ponto de não permitir que $[Ca^{2+}]_i$ atinja os níveis mínimos requeridos para a liberação de catecolaminas. Documentamos que o aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} (480 nM) induzido pelo SNAP pode induzir liberação de catecolaminas visto que, a secreção desses neurotransmissores ocorre quando os níveis intracelulares de Ca^{2+} ultrapassem um valor de 180 ± 43 nM (Montoro, Ureña, Fernández-Chacón, Alvarez de Toledo & López-Barneo, 1996). É razoável supor, contudo, que a dualidade acima mencionada, gerada pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ possa influenciar aspectos da liberação do neurotransmissor, como o curso temporal.

Para entendermos o papel do Ca^{2+} e a sua homeostase intracelular é necessário conhecer melhor os mecanismos regulatórios dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em células tipo I. Estes mecanismos incluem: tampões endógenos de Ca^{2+} ; captação de Ca^{2+} nos estoques intracelulares; vazamento passivo e extrusão de Ca^{2+} através da membrana plasmática; bem como trocas e atividades das bombas de Ca^{2+} a nível das membranas celulares. Entretanto, fatores adicionais deverão ser identificados e investigados em pesquisas futuras. Por exemplo, o envolvimento de outros compartimentos de captação,

transporte e estoque de Ca^{2+} , como as mitocôndrias visto que, estas organelas representam uma especialização funcional destas células na detecção da alteração da pO_2 (Biscoe & Duchon, 1989).

Em resumo, o presente estudo mostrou que um doador de NO foi capaz de aumentar a concentração interna de Ca^{2+} por mecanismos muito provavelmente independentes de ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e de liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis à cafeína/raionidina. Portanto, merece investigação posterior, entre outros mecanismos, o possível envolvimento da liberação de Ca^{2+} de estoques internos insensíveis à cafeína/raionidina (tais como, um "pool" sensível ao IP_3), das mitocôndrias ou ainda o mecanismo de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Potenciais de membrana mais positivos que -30 mV produziram, nas células em estudo, correntes para fora de potássio que foram dependentes do tempo e da voltagem. O limiar para ativação foi -30 mV que foi similar aqueles das correntes de K^+ dependentes de voltagem das células tipo I de coelho (Duchen e col., 1988) e das células tipo I de ratos neonatos (Peers & O'Donnell, 1990; Wyatt and Peers, 1995). Esta corrente foi bloqueada pelo TEA, Cd^{2+} , ChTx e IbTx. Estes dados documentam a presença de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} em células tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos e os nossos resultados estão de acordo com os dados disponíveis na literatura especializada que demonstraram-os em células tipo I de outras espécies e em ratos neonatos. A documentação da presença desses canais em ratos adultos apresenta interesse, pois não era de antecipação óbvia, já que é bem documentado que alterações nas estruturas subcelulares em células tipo I ocorrem durante a maturação da resposta respiratória a hipóxia aguda (Eden and Hanson, 1987). Além disso, mudanças na expressão e modulação dos

canais iônicos ocorrem no decorrer da maturação e diferenciação dos tecidos excitáveis (Hagiwara, 1983; Day, Pickering, Johnson & Cook, 1993).

Em nossos estudos o SNAP, um doador de NO, aumentou a probabilidade de abertura dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , e uma boa hipótese para explicar este fenômeno pode ser o aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} induzido por esta droga. O aumento da corrente através destes canais de K^+ pode provavelmente promover uma hiperpolarização da membrana e portanto, uma alteração da frequência de disparo das células quimiorreceptoras tipo I. De acordo com Wang e col. (1994) este mecanismo pode mediar o efeito eferente inibitório onde a célula quimiorreceptor tipo I do corpo carotídeo e/ou o tecido vascular funcionam como efetores da inibição induzida pelo NO exógeno. Este mecanismo poderia assim ter função moduladora do processo de excitação-secreção e quimiotransdução no corpo carotídeo.

5.0 Conclusões

01. A corrente de Ca^{2+} dependente de voltagem em células quimiossensitivas tipo I do corpo carotídeo de ratos adultos a qual apresentou um limiar de ativação em torno de -40 mV, uma inativação de 50% em -38 mV e em 10 mM de Ca^{2+} , atingiu uma amplitude máxima de -94 pA, foi parcialmente bloqueada pela SST e DA e completamente bloqueada pelo Cd^{2+} (500 μM).
02. Os quimiorreceptores tipo I possuem pelo menos dois tipos de canais de Ca^{2+} , o canal tipo L sensível a nimodipina e o canal tipo N sensível a ω -CgTx GVIA. Ambos os canais contribuem com grande percentagem da corrente total de entrada de Ca^{2+} o que sugere serem os dois importantes no processo de excitação-secreção nestas células.
03. As células quimiorreceptoras de ratos adultos possuem canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} os quais foram bloqueados completamente com 500 μM de Cd^{2+} , TEA, ChTx e IbTx.
04. O SNAP, um doador de óxido nítrico, aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular. Essa alteração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ não foi explicável através de interferência significativa com a corrente transmembrana de Ca^{2+} através dos canais voltagem dependentes nem por liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis à cafeína/raionidina. Além disso, o SNAP também induziu um aumento na probabilidade de abertura dos canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} , um efeito talvez causado pelo aumento nos níveis basais de Ca^{2+} induzido pelo SNAP.

6.0 Referências bibliográficas

- Almaraz, L., González, C. & Obeso, A. (1986). Effects of high potassium on the release of [³H]dopamine from the cat carotid body in vitro. *Journal of Physiology* **379**, 293-307.
- Aosaki, T. & Kasai, H. (1989). Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons: differential sensitivity to dihydropyridines and ω -conotoxin GVIA. *Pflügers Archiv* **414**, 150-156.
- Archer, S. L., Huang, J. M. C., Hampl, V., Nelson, D. P., Shultz, P. J. & Weir, E. K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K⁺ channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 7583–7587.
- Avidor, T., Clementi, E., Schwartz, L. & Atlas, D. (1994). Caffeine-induced transmitter release is mediated via ryanodine-sensitive channel. *Neuroscience Letters* **165**, 133-136.
- Ballard, K. J. & Jones, J. V. (1972) Demonstration of choline acetyltransferase activity in the carotid body of the cat. *Journal of Physiology* **227**, 87-94.
- Baraban, J. M., Snyder, S. H. & Alger, (1985). Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: Electrophysiological

effects of phorbol esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, 2538-2542.

Bean, B. P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* **340**, 153–156.

Benot, A. & López-Barneo, J. (1990). Feedback inhibition of Ca²⁺ currents by dopamine in glomus cells of the carotid body. *European Journal of Neuroscience* **2**, 809-812.

Berger, A. J. & Takahashi, T. (1990). Serotonin enhances a low-voltage-activated calcium current in rat spinal motoneurons. *The Journal of Neuroscience* **10**, 1922-1928.

Berne, R. M. & Levy, M. N. (1993). Control of Breathing. In: *Physiology*. 3rd ed. by Mosby - Year Book, Inc. St. Louis, Missouri, USA. p. 599-611.

Berridge, M. J. (1993). A tale of two messengers. *Nature* **365**, 388–389.

Bers, D. M., Lederer, W. J. & Berlin, J. R. (1990) Intracellular Ca transients in rat cardiac myocytes: Role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *American Journal of Physiology* **258**, C944-954.

Bers, D. M. (1991) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. In *Developments in Cardiovascular Medicine*, Vol. 122, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M., & Chanpagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: Neuronal circuitry, Membrane properties, and Neurotransmitters. *Physiological Reviews* **75**, 1-45.

- Biscoe, T. J. (1971). Carotid body: structure and function. *Physiological Reviews* **51**, 437-494.
- Biscoe, T. J.; Caddy, K. W. T., Duchen, M. R., Kirby, G. C., Patterson, D. L. & Ponte, J. (1987). Preparation and identification of freshly dissociated cells from the rabbit carotid body for electrophysiological study. *Journal of Physiology* **392**, 11p.
- Biscoe, T. J. & Duchen, M. R. (1989). Electrophysiological responses of dissociated type I cells of the rabbit carotid body to cyanide. *Journal of Physiology* **413**, 447-468.
- Biscoe, T. J. & Duchen, M. R. (1990). Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *American Journal of Physiology* **258**, L271-278.
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850-853.
- Bridge, J. H. B., Smolley, J., Spitzer, K. W. & Chin, T. K. (1991) Voltage dependence of sodium-calcium exchange and the control of calcium extrusion in the heart. *Annals of New York Academy of Science* **639**, 34-47.
- Brotto, M. A. P., Nosek, T. M., Godt, R. E. & Creazzo, T. L. (1995). Measurements of calcium transients in chick heart using low and high levels of Fura-2. *Biophysical Journal* **68**, A418.
- Buckler, K. J., Vaughan-Jones, R. D., Peers, C., Lagadic-Gossmann, D. & Nye, P.C.G. (1991). Effects of extracellular pH, P_{CO2} and HCO₃⁻ on

- intracellular pH in isolated type I cells of neonatal rat. *Journal of Physiology* **444**, 703-721.
- Buckler, K. J., Vaughan-Jones, R. D., Peers, C. & Nye, P. C. G. (1991). Intracellular pH and its regulation in isolated type I carotid body cells of the neonatal rat. *Journal of Physiology* **436**, 107-129.
- Buckler, K. J. & Vaughan-Jones, R. D. (1994). Effects of hypercapnia on membrane potential and intracellular calcium in rat carotid body type I cells. *Journal of Physiology* **478**, 157-171.
- Chen, I-Li, Yates, R. D. (1984). Two types of glomus cell in the rat carotid body as revealed by α -bungarotoxin binding. *Journal of Neurocytology* **13**, 281-302.
- Cohen, C. L. & McCarthy, R. T. (1987). Nimodipine blocks of calcium channels in rat anterior pituitary cells. *Journal of Physiology* **387**, 195-225.
- Connor, J. A. & Stevens, C. F. (1971). Predictions of repetitive firing behavior from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *Journal of Physiology* **213**, 31-53.
- Day, M. L., Pickering, S. J., Johnson, M. H. & Cook, D. I. (1993). Cell-cycle control of a large conductance K^+ channel in mouse early embryos. *Nature* **365**, 560-562.
- Dearnaley, D. P., Fillenz, M. & Woods, R. I. (1968). The identification of dopamine in the rabbit's carotid body. *Proc. R. Soc. London. Biol. Sci.* **170**, 195-203.

- De Kock, L. L. (1951). Histology of the carotid body. *Nature* **167**, 611-612.
- Delpiano, M. A. & Hescheler, J. (1989). Evidence for a pO₂-sensitive K⁺ channel in the type-I cell of the rabbit carotid body. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **249**, 195-198.
- Demaurex, N., Lew, D. P. & Krause, K. H. (1992). Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca²⁺ stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 2318-2324.
- Deutsch, C., Price, M., Lee, S., King, V. F. & Garcia, M. L. (1991). Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in human T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3668-3674.
- Duchen, M. R., Caddy, K. W. T., Kirby, G. C., Patterson, D. L., Ponte, J. & Biscoe, T. J. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* **26**, 291-311.
- Eden, G. J. & Hanson, M. A. (1987). Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *Journal of Physiology* **392**, 1-9.
- Eyzaguirre, C. Koyano, H. & Taylor, J. R. (1965). Presence of acetylcholine and transmitter release from carotid body chemoreceptors. *Journal of Physiology* **178**, 463-476.
- Eyzaguirre, C. & Fidone, S. J. (1980). Transduction mechanisms in carotid body: glomus cells, putative neurotransmitters, and nerve endings. *American Journal of Physiology* **239**, C135-152.

- Eyzaguirre, C. & Monti-Bloch, L. (1982). Nicotinic and muscarinic reactive sites in mammalian glomus cells. *Brain Research* **252**, 181-184.
- Fairhurst, A. S. (1974). A ryanodine/caffeine sensitive membrane fraction of skeletal muscle. *American Journal of Physiology* **227**, 1124-1131.
- Fidone, S. J. & Sato, A. (1970). Efferent inhibition and antidromic depression of chemoreceptor A-fibers from the cat carotid body. *Brain Research* **22**, 181-193.
- Fidone, S. J, González, C. & Yoshizaki, K. (1982). Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body *in vitro*. *Journal of Physiology* **333**, 93-110.
- Fieber, L. A. & McCleskey, E. W. (1993). L-Type calcium channels in type I cells of the rat carotid body. *Journal of Neurophysiology* **70**, 1378-1384.
- Fisher, R. & Johnston, D. (1990). Differential modulation of single voltage-gated calcium channels by cholinergic and adrenergic agonists in adult hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* **64**, 1291-1302.
- Foucart, S., Bleakman, D., Bindokas, V. P. & Miller, R. J. (1993). Neuropeptide Y and pancreatic polypeptide reduce calcium currents in acutely dissociated neurons from adult rat superior cervical ganglia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **265**, 903-909.
- Fox, A. P., Nowycky, M. D. & Tsien, R. W. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *Journal of Physiology* **394**, 149-172.

- Friel, D. D. & Tsien, R. W. (1992). A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca^{2+} entry on $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Journal of Physiology* **450**, 217-246.
- Galione, A., White, A., Willmott, N., Turner, M., Potter, B. V. L. & Watson, S.P. (1993). cGMP mobilizes intracellular Ca^{2+} in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* **365**, 456-459.
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J. & Garcia, M. L. (1990). Purification and characterization of a unique potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 11083-11090.
- Ganformina, M. D. & López-Barneo, J. (1991). Single K^+ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O_2 tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**, 2927-2930.
- Ganformina, M. & López-Barneo, J. L. (1992a). Potassium channel types in arterial chemoreceptor cells and their selective modulation by oxygen. *Journal of General Physiology* **100**, 401-426.
- Ganformina, M. D., & López-Barneo, J. L. (1992b). Gating of O_2 -sensitive K^+ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modulation induced by low pO_2 . *Journal of General Physiology* **100**, 427-455.

- George, M. J. & Shibata, E. F. (1995). Regulation of Calcium-activated potassium channels by S-nitrosothiol compounds and cyclic guanosine monophosphate in rabbit coronary artery myocytes. *Journal of Investigative Medicine* **43**, 451- 458.
- Gill, D. L., Mullaney, J. M. & Ghosh, T. K. (1988). Intracellular calcium translocation: Mechanism of activation by guanine nucleotides and inositol phosphates. *Journal of Experimental Biology* **139**, 105-133.
- Gimenez-Gallego, G., Navia, M. A., Reuben, J. P., Katz, G. M., Kaczorowski, G. J. & Garcia, M. L. (1988). Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**, 3329-3333.
- Goeger, D. E., Riley, R. T., Dorner, J. W. & Cole, R. J. (1988). Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca²⁺-transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasm reticulum vesicles. *Biochemical Pharmacology* **37**, 978-981.
- Gómez-Niño, A., López-López, J. R., Almaraz, L. & González, C. (1994). Inhibition of [³H]catecholamine release and Ca²⁺ currents by prostaglandin E₂ in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Journal of Physiology* **476**, 269-277.
- González, C., Almaraz, L., Obeso, A. & Rigual, R. (1992). Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends in Neuroscience* **15**, 146-153.

- González, C., Almaraz, L. Obeso, A. & Rigual, R. (1994). Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. *Physiological Reviews* **74**, 829-898.
- González-Guerrero, P. R., Rigual, R. & González, C. (1993). Opioid peptides in the rabbit carotid body; identification and evidence for co-utilization and interactions with dopamine. *Journal of Neurochem.* **60**, 1762-1768.
- Gronblad, M., Akderman, K. E. & Eranko, O. (1979). Induction of exocytosis from glomus cells by incubation of the carotid body of the rat with calcium and ionophore A 23187. *Anatomical Record* **195**, 387-395.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450.
- Guyton, A. C. (1989) .Regulação da respiração. In *Tratado de Fisiologia Médica*, 7ª edição, Editora Guanabara, RJ, p. 401-410.
- Hagiwara, S. (1983). Membrane potential-dependent ion channels in cell membranes. Distinguished lecture series of the Society of General Physiologists, Vol. 3, Raven, New York, p. 93-97.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**,85-100.
- Hayashida, Y. and Eyzaguirre, C. (1979). Voltage noise of carotid body type I cells. *Brain Research* **167**, 189-194.

- Hescheler, J., Delpiano, M. A., Acker, H. & Pietruschka, F. (1989). Ionic currents on type I cells of the rabbit carotid body measured by voltage-clamp experiments and the effect of hypoxia. *Brain Research* **486**, 79-88.
- Heym, C. & Kummer, W. (1989). Immunohistochemical distribution and colocalization of regulatory peptides in the carotid body. *Journal Electron Microsc. Tech.* **12**, 331-342.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hillyard, D. R., Monje, V. D., Mintz, I. M., Bean, B. P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Imperial, J.S. & Oliveira, B. M. (1992). A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron* **9**, 67-77.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *loligo*. *Journal of Physiology* **116**, 449-472.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952b). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology* **117**, 500-544.
- Hofer, A. M. & Machen, T. E. (1993). Technique for *in situ* measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using fluorescent indicator mag-fura-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**, 2598-2602.

- Ichikawa, H., Rabchevsky, A. & Helke, C. J. (1993). Presence and coexistence of putative neurotransmitters in the carotid sinus baro- and chemoreceptor afferent neurons. *Brain Research* **611**, 67-74.
- Ikeda, S. R. (1991). Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *Journal of Physiology* **439**, 181-214.
- Kamede, Y. (1990). Distribution of serotonin-immunoreactive cells around arteries arising from the common carotid artery in the chicken. *Anatomical Record* **227**, 87-96.
- Koh, S. D., Campbell, J. D., Carl, A. & Sanders, K. M. (1995). Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *Journal of Physiology* **489**, 735-743.
- Kostyuk, P. & Verkhratsky, A. (1994). Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience* **63**, 381-404.
- Kowaluk, E.A. & Fung, Ho-L. (1990). Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for *in vitro* vascular relaxation by S-nitrosothiols. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **255**, 1256-1264.
- Laffranchi, R., Gogvadze, V., Richter, C. & Spines, G. A. (1995). Nitric oxide (Nitrogen monoxide, NO) stimulates insulin secretion by inducing calcium release from mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **217**, 584-591.
- Lederer, W. J., Berlin, J. R., Cohen, N. M., Hadley, R.W., Bers, D.M. & Cannell, M. B. (1990) Excitation-contraction coupling in heart cells: Roles

of the sodium-calcium exchange, the calcium current, and the sarcoplasmic reticulum. *Annals of New York Academy of Science* **588**, 190-206.

Lee, C. H. & Hokin, L. E. (1989) Inositol 1,2-cyclic 4,5-trisphosphate is an order of magnitude less potent than inositol 1,4,5-trisphosphate in mobilizing intracellular stores of calcium in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**, 561-656.

López-Barneo, J., López-López, J. R., Ureña, J. & González, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by pO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* **241**, 580-582.

López-López, J., González, C., Ureña, J. & López-Barneo, J. (1989). Low pO₂ selectively inhibits K⁺ channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *Journal of General Physiology* **93**, 1001-1015.

Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Fahrenkrug, J., Nilsson, G. & Terenius, L. (1979). Peptides in the cat carotid body (glomus caroticum): VIP-, enkephalin-, and substance P-like immunoreactivity. *Acta Physiol. Scand.* **107**, 279-281.

McDonald, D. M. and Mitchell, R. A. (1975). A quantitative analysis of synaptic connections in the rat carotid body. In *The peripheral Arterial chemoreceptors*. Edited by M.J. Purves. Cambridge Univ. Press. New York, p. 101-131.

McDonald, D. M. & Mitchell, R. A. (1981). The neural pathway involved in "efferent inhibition" of chemoreceptors in the cat carotid body. *The Journal of Comparative Neurology* **201**, 457-476.

- McDonald, D. M. (1981). Peripheral chemoreceptors: structure-function relationships of the carotid body. In *Lung Biology in Health and Disease: The Regulation of Breathing*, ed. Hornbein T.F., Vol. 17, p. 105–319. Dekker, New York.
- MacKinnon, R. & Miller, C. (1988). Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Journal of General Physiology* **91**, 335-349.
- Marchetti, C., Carbone, E. & Lux, H. D. (1986). Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch.iv*, **406**, 104-111.
- Mayrleitner, M., Chadwick, C. C., Timerman, A. P., Fleischer, S. & Schindler, H. (1991). Purified IP_3 receptor from smooth muscle forms an IP_3 gated and heparin sensitive Ca^{2+} channel in planar bilayers. *Cell Calcium* **12**, 505–514.
- McCleskey, E. W., Fox, A. P., Feldman, D. H., Cruz, L. J., Oliveira, B. M., Tsien, R. W. & Yoshikami, D. (1987). ω -Conotoxin: Direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**, 4327-4331.
- McQueen, D. S. & Pallot, D. J. Peripheral arterial chemoreceptors. In *Control of Respiration*, Edited by D.J. Pallot. Oxford University Press Inc., New York. p. 1-40.

- McQueen, D. S. (1985). Carotid body chemoreceptors as a pharmacological model. *TIPS* **06**, 167-170.
- Mintz, I. M., Adams, M. E. & Bean, B. P. (1992). P-Type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* **9**, 85-95.
- Missiaen, L., Taylor, C. W. & Berridge, M. J. (1991). Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* **352**, 241-244.
- Mokashi, A.; Guilio, C. D.; Morelli, L. & Lahiri, S. (1994). Chronic hyperoxic effects on cat carotid body catecholamines and structure. *Respiration Physiology* **97**, 25-32.
- Monti-Bloch, L. & Eyzaguirre, C. (1980). A comparative physiological and pharmacological study of cat and rabbit carotid body chemoreceptors. *Brain Research* **193**, 449-470.
- Montoro, R. J., Ureña, J., Fernández-Chacón, R., Alvarez de Toledo, G. & López-Barneo, J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *Journal of Genenal Physiology* **107**, 133-143.
- Mountcastle, V.B. (1978). Fatores neurogênicos no controle da respiração. In *Fisiologia Médica*, 13ª ed. Editora Guanabara Koogan, RJ, p. 1429-1453.
- Narahashi, T., Tsunoo, A. & Yoshii, M. (1987). Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Physiology* **383**, 231-249.

- Nurse, C. A. (1990). Carbonic anhydrase and neuronal enzymes in cultured glomus cells of the carotid body of rat. *Cell and Tissue Research* **261**, 65-71.
- Obeso, A., Fidone, S. J. & González, C. (1987). Pathways for calcium entry into type I cells: significance for the secretory response. In *Chemoreceptors in Respiratory Control*, ed. by Ribeiro, J. A. and Pallot, D. J., pp. 91-98. Croom Helm, London.
- Obeso, A., Almaraz, L. & González, C. (1986). Effects of 2-deoxy-D-Glucose on in vitro cat carotid body. *Brain Research* **371**, 25-36.
- Obeso, A., Almaraz, L. & González, C. (1989). Effects of cyanide and uncouplers on chemoreceptor activity and ATP content of the cat carotid body. *Brain Research* **481**, 250-257.
- Obeso, A., Rocher, A., Fidone, S. & González, C. (1992). The role of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels in stimulus-evoked catecholamine release from chemoreceptor cells of the carotid body. *Neuroscience* **47**, 463-472.
- Oliveira, B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Luque, F. A & Gray, W. R. (1984). Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* **23**, 5087-5090.
- Oomori, Y., Nakaya, K., Tanaka, H., Iuchi, H., Ishikawa, K., Satoh, Y. & Ono, K. (1994). Immunohistochemical and histochemical evidence for the presence of noradrenaline, serotonin and gamma-aminobutyric acid in chief cells of the mouse carotid body. *Cell Tissue Research* **278**, 249-254.

- O'Regan, R.G. & Majcherczyk, S. (1983). Control of peripheral chemoreceptors by efferent nerves. In *Physiology of the Peripheral Arterial Chemoreceptors*, eds Acker, H. & O'Regan, R.G, p. 257–298. Elsevier.
- Peers, C. & O'Donnell, J. (1990). Potassium currents recorded in type I carotid body cells from the neonatal rat and their modulation by chemoexcitatory agents. *Brain Research* **522**, 259-266.
- Pérez-García, M. T., Obeso, A., López-López, J. R., Herreros, B. & González, C. (1992). Characterization of cultured chemoreceptor cells dissociated from adult rabbit carotid body. *American Journal of Physiology* **263**, C1152-1159.
- Plummer, M. R., Logothetis, D. E. & Hess, P. (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.
- Prabhakar, N. R., Landis, S. C., Kumar, G. K., Mullikin-Kilpatrick, D., Cherniack, N.S & Leeman. (1989). Substance P and neurokinin A in the cat carotid body: localization, exogenous effects and changes in content in response to arterial pO₂. *Brain Research* **481**, 205-214.
- Publicover, N.G., Hammond, E.M. & Sanders, K.M. (1993). Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**, 2087-2091.
- Randall, A. D., Wendland, B., Schweizer, F., Miljanich, G., Adams, M. E. & Tsien, R. W. (1993). Five pharmacologically distinct high voltage-activated

- Ca²⁺ channels in cerebellar granule cells. *Society for Neuroscience Abstracts* **19**, 1478.
- Rigual, R., López-López, J. R. & González, C. (1991). Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low P_{O₂} and high P_{CO₂} stimulation of the cat carotid body. *Journal of Physiology* **433**, 519-531.
- Rocher, A., Obeso, A., Herreros, B. & González, C. (1988) Activation of the release of dopamine in the carotid body by veratrine. Evidence for the presence of voltage-dependent Na⁺ channels in type I cells. *Neuroscience Letters* **94**, 274-278.
- Rocher, A., Obeso, A., González, C. & Herrero. (1991). Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *Journal of Physiology* **433**, 533-548.
- Rojas, E., Nassar-Gentina, V., Pollard, M.E. & Luxoro, M. (1992). Mechanisms of calcium release from terminal cisternae in crustacean muscle. In *Excitation-Contraction Coupling in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle*. Ed. Frank, G.B., pp. 305-317. Plenum Press, NY.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K⁺ channels. *Neuroscience* **2**, 729-749.
- Sather, W. A., Tanabe, T., Zhang, J. F., Mori, Y., Adams, M. E. & Tsien, R. W. (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel α_1 subunits. *Neuron* **11**, 291-303.

- Sato, M., Yoshizaki, K. & Koyano, H. (1989). Veratridine stimulation of sodium influx in carotid body cells from newborn rabbits in primary culture. *Brain Research* **504**, 132-135.
- Shapiro, M. S. & Hille, B. (1993). Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron* **10**, 11-20.
- Sitsapesan, R. & Williams, A. J. (1990). Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology* **423**, 425-439.
- Smith, P., Gosney, J., Heath, D. & Burnett, H. (1990). The occurrence and distribution of certain polypeptides within the human carotid body. *Cell Tissue Research* **261**, 565-571.
- Southam, E. & Garthwaite J., (1991). Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neuroscience Letters* **130**, 107-111.
- Sugg, E. E., Garcia, M. L., Reuben, J. P., Patchett, A. A. & Kaczorowski, G. J. (1990). Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 18745-18748.
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R. & Fox, A. P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neuroscience* **11**, 431-438.

- Ureña, J., López-López, J., González, C. & López-Barneo, J. (1989). Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *Journal of General Physiology* **93**, 979-999.
- Usachev, Y., Shmigol, A., Pronchuk, N., Kostyuk, P. & Verkhrtasky, A. (1993). Caffeine-induced calcium release from internal stores in rat sensory neurons. *Neuroscience* **57**, 845-859.
- Vincent, S. R. (1994). Nitric oxide: A radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* **42**, 129-160.
- Wang, Y. Y., Perrin, D. G. and Cutz, E. (1993). Localization of cholecystokinin-like and calcitonin-like peptides in infant carotid bodies: a light- and electron-microscopic immunohistochemical study. *Cell Tissue Research* **272**, 169-174.
- Wang, Z.Z., Stensaas, L.J., Vente, J. de, Dinger, B. and Fidone, S.J. (1991). Immunocytochemical localization of cAMP and cGMP in cells of the rat carotid body following natural and pharmacological stimulation. *Histochemistry* **96**, 523-530.
- Wang, Z.Z., He, L., Stensaas, L.J., Dinger, B.G. & Fidone, S.J. (1991). Localization and in vitro actions of atrial natriuretic peptide in the carotid body. *J. Appl. Physiol.* **70**, 942-946.
- Wang, Z. Z., Stensaas, L. J., Dinger, B. G. & Fidone, S. J. (1992). The co-existence of biogenic amines and neuropeptides in the type I cells of the carotid body. *Neuroscience* **47**, 473-480.

- Wang, Z. Z., Brecht, D. S., Fidone, S. J. & Stensaas, L. J. (1993). Neurons
Journal of Comparative Neurology **336**, 419-432.
- Wang, Z. Z., Stensaas, L. J., Brecht, D. S., Dinger, B. & Fidone, S. J. (1994).
Localization and actions of nitric oxide in the cat carotid body.
Neuroscience **60**, 275-286.
- Wang, Z. Z., Stensaas, L. J., Dinger, B. G. & Fidone, S. J. (1995). Nitric oxide
mediates chemoreceptor inhibition in the cat carotid body. *Neuroscience*
65, 217-229.
- Wharton, J., Polak, J. M., Pearse, A. G. E., McGregor, G. P., Bryant, M. G.,
Bloom, S. R., Emson, P. C., Bisgard, G. E. & Will, J. A. (1980).
Enkephalin-, VIP- and substance P-like immunoreactivity in the carotid
body. *Nature* **284**, 269-271.
- Wilding, T. J., Cheng, B. & Ross, A. (1992). pH regulation in adult rat carotid
body glomus cells. *Journal of General Physiology* **100**, 593-608.
- Williams, D.A. & Fay, F.S. (1990). Intracellular calibration of the fluorescent
calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium* **11**, 75-83.
- Wyatt, C. N. & Peers, C. (1995) Ca²⁺-activated K⁺ channels in isolated type I
cells of the neonatal rat carotid body. *Journal of Physiology* **483**, 559-565.
- Zhang, J. F., Randall, A. D., Ellinor, P. T., Horne, W. A., Sather, W. A.,
Tanabe, T., Schwarz, T. L. & Tsien, R. W. (1993). Distinctive
pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their

possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**, 1075-1088.

Zhu, Y. & Ikeda, S.R. (1993). Adenosine modulates voltage-gated Ca^{2+} channels in adult rat sympathetic neurons. *Journal of Neurophysiology* **70**, 610-620.