

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA**

Título

**"ESTUDO DA MODULAÇÃO DO CANAL DE SÓDIO PELA ATIVAÇÃO DA
PROTEÍNA QUINASE C"**

Autor

CARLOS MARCELO GURJÃO DE GODOY

Orientador

PROF. DR. JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

Orientador no Exterior

PROF. DR. SAMUEL CUKIERMAN

Este exemplar foi entregue em ... da tese
defendida por <u>CARLOS MARCELO GURJÃO DE GODOY</u>
Julgadora em <u>15/12/94</u>
Comissão
<i>[Assinatura]</i>

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica da UNICAMP para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica

Campinas, Dezembro de 1994

940000

"Se A é sucesso na vida, então $A = x + y + z$;

$x =$ trabalho, $y =$ diversão e $z =$ ficar com a boca fechada"

Albert Einstein

Este trabalho é dedicado aos meus pais
Benedito e Dirce, às minhas irmãs
Cândida, Cristina e Cláudia, aos meus
cunhados Jorge, Cássio, Jefferson,
Alexander e Rosecleire, aos meus sogros
Jarbas e Cida, principalmente aos
meus sobrinhos Pierre, Marina e Sarah, por
todo suporte emocional durante este
trabalho e

Para minha mulher Rose, a qual sempre
me acompanha com muito amor e carinho
nos caminhos que aparecem em nossa
vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos amigos e professores que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani que mais uma vez incentivou e apoiou todas as fases do desenvolvimento de meu trabalho e de meu aprendizado, fazendo com que me sentisse confiante e percebesse a pesquisa como algo agradável de se fazer; ao Prof Dr. Samuel Cukierman que, durante meu trabalho no exterior, apoiou meu trabalho de pesquisa em seu laboratório com muita competência e ajudou, de forma marcante, a minha formação acadêmica e; à Dra. Rosana Almada Bassani que apoiou de modo decisivo meu trabalho ajudando na correção, dando opiniões, sugerindo, fazendo críticas...enfim, sendo a Dra. Rosana que, como sempre, inspira confiança e muita competência.

Agradeço também ao CNPq pela concessão de bolsas de estudo tanto para o trabalho efetuado no Brasil quanto o efetuado no exterior.

RESUMO. Os canais de sódio são responsáveis pela geração da atividade elétrica celular associada a funções específicas, tais como a contração das células cardíacas que promove o batimento cardíaco, ou transmissão de sinais de controle para todo o corpo pelas fibras nervosas. Os canais de sódio podem ser modulados por inúmeros mecanismos celulares, inclusive pela fosforilação (ligação de íon fosfato), por proteína quinases, da proteína que o constitui. A proteína quinase C, ativada pelo aumento intracelular de diacilglicerol em resposta à estimulação alfa-adrenérgica ou colinérgica muscarínica, pode fosforilar o canal de sódio. Neste trabalho, estudamos os efeitos de três diferentes classes de ativadores da proteína quinase C (diacilgliceróis, ácidos graxos insaturados-cis e ésteres de forbol) sobre a função do canal de sódio e propomos um mecanismo biofísico pelo qual uma das classes de ativadores (os diacilgliceróis) modula o canal de sódio. Utilizamos duas técnicas de "patch clamp" para registro de corrente de sódio em células de neuroblastoma de camundongo (N1E-115): i) "perforated patch clamp" para registro de correntes macroscópicas de sódio e, ii) "cell-attached patch clamp" para registro de corrente em canais de sódio individuais ("single channel recording"). Os resultados obtidos revelaram que os ativadores da proteína quinase C tem múltiplos efeitos sobre as correntes de sódio. Isto sugeriu a existência de mais de um mecanismo de modulação do canal de sódio pela ativação da proteína quinase C. A ativação da proteína quinase C por diacilglicerol diminuiu as correntes de sódio e desviou a curva de inativação para potenciais mais negativos. A partir de um modelo biofísico baseado nas transições de estado do canal, e de resultados experimentais que confirmaram as previsões do modelo, propusemos que o mecanismo pelo qual os diacilgliceróis modulam o canal de sódio consiste do aumento no número de canais que inativam-se diretamente a partir de seu estado de repouso. Este efeito dos diacilgliceróis é um mecanismo biofísico simples e eficiente pelo qual a ativação da proteína quinase C pode modular a função do canal de sódio e, conseqüentemente, a excitabilidade elétrica celular.

ABSTRACT. Sodium channels are responsible for the generation of cellular electrical activity involved in specific functions, such as cardiac cell contraction for heart beating, or electrical signal transmission performed by nerve cells for the whole body control. Sodium channels are modulated by many cell mechanisms, including phosphorylation (phosphate ion bonding) of the channel protein by protein kinases. Protein kinase C, which is activated when intracellular diacylglycerol concentration is increased by alpha -adrenergic or cholinergic stimulation, is known to be a sodium channel phosphorylator. In this work, we have studied the effects of three different protein kinase C activators (diacylglycerols, cis-unsaturated fatty acids and phorbol esters) on sodium channel and suggested a biophysical mechanism for modulation by one kind of the protein kinase C activator (the diacylglycerols). We have used two patch clamp techniques for the sodium current recording in mouse neuroblastoma cells (N1E-115): i) perforated patch clamp for macroscopic sodium currents recording and ii) cell-attached patch clamp for single channel recording. The results showed that protein kinase C activators have multiple effects on sodium currents. These results suggested that protein kinase C activation modulates the sodium channel by more than one mechanism. Protein kinase C activation by diacylglycerol decreased the sodium current amplitude and shifted the inactivation curve to more negative voltages. Considering a biophysical model based on state transitions of the sodium channel and the experimental results that confirmed the model predictions, we proposed that the mechanism by which the diacylglycerols modulate sodium channel is an increase on the number of sodium channels directly inactivating from their resting state. This diacylglycerol effect represents a simple and efficient biophysical mechanism by which protein kinase C activation might modulate sodium channel function and consequently, the cell electrical activity.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações iniciais	1
1.2. A técnica de "patch clamp"	3
1.3. O canal de sódio	11
1.4. Modulação do canal de sódio	16
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Cultura de células	21
3.2. Soluções	22
3.3. Medições eletrofisiológicas	26
3.4. Registro das correntes	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Definições	32
4.2. Experimentos Controles	35
4.3. Efeito de diacilgliceróis sobre as correntes de sódio	38
4.4. Efeito de ésteres de forbol sobre as correntes de sódio	44

4.5. Efeito de ácidos graxos insaturados-Cis sobre as correntes de sódio	47
4.6. Efeito do ácido oleico sobre as correntes de sódio	54
4.7. Efeito dos ácidos graxos insaturados-trans e saturados sobre as correntes de sódio	57
4.8. Efeito dos diacilgliceróis sobre a atividade elétrica dos canais de sódio: Modelo Estocástico	58
4.8.A. Efeito do diacilglicerol sobre a taxa de inativação das correntes de sódio	61
4.8.B. Efeito da aplicação de DOG sobre as correntes de sódio com a inativação removida	65
4.8.C. Registros em canais de sódio individuais: efeito de diacilgliceróis sobre os canais de sódio unitários	69
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	86
7. BIBLIOGRAFIA	87
8. APÊNDICES	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

Canais iônicos são proteínas macromoleculares associadas à membrana celular que podem permitir a passagem de íons através da membrana. A passagem de íons específicos através da membrana desenvolve atividade elétrica cuja função pode variar de um tipo celular para outro. Nas células eletricamente excitáveis que compõem as fibras musculares cardíacas ou esqueléticas, a atividade elétrica dispara a contração individual de cada célula que, por sua vez, promove a contração das fibras produzindo o batimento cardíaco ou o movimento de um membro, respectivamente. Já nas células nervosas (neurônios), a atividade elétrica desempenha a função de levar e trazer sinais de controle para todo o organismo.

O controle da passagem dos íons através da membrana é feito pela abertura e fechamento dos canais iônicos que, por sua vez, dependem do potencial elétrico através da membrana. Estudos iniciais utilizando fixação artificial do potencial de membrana (técnica de "voltage clamp") conduziram à idéia básica de que a atividade elétrica celular é gerada em função da dependência de tensão e do tempo da condutância da membrana, principalmente aos íons sódio e potássio (Hodgkin e Huxley, 1952).

A alta condutância da membrana principalmente ao íon potássio mantém o potencial negativo do lado intracelular ou seja, mantém a membrana polarizada no

chamado potencial de repouso. A despolarização (natural ou artificial) da membrana produz três efeitos: (i) um rápido aumento da condutância da membrana ao íon sódio, seguido por (ii) uma diminuição lenta da condutância ao sódio, conhecida como processo de inativação do sódio, e, (iii) um aumento lento da condutância ao íon potássio. O aumento da condutância ao sódio ocorre devido a abertura de canais de sódio, permitindo o fluxo passivo deste íon de fora para dentro da célula, ou seja, a favor do seu gradiente de concentração. O fluxo de sódio despolariza ainda mais a membrana e mais canais de sódio se abrem, iniciando um processo de realimentação positiva bastante rápido (≈ 1 ms) que culmina com a total despolarização e inversão do potencial de membrana. Com o decorrer da despolarização, o processo de inativação do sódio, dependente do tempo, fecha os canais de sódio dando início à repolarização da membrana. A repolarização da membrana retorna o potencial a seu nível de repouso em decorrência do aumento da condutância da membrana principalmente ao íon potássio.

Este fenômeno de despolarização e repolarização rápidas da membrana é denominado de "potencial de ação". O potencial de ação gerado em uma parte da membrana da célula é propagado para outra parte da membrana (potencial de ação propagado) ou até mesmo para outra célula. O potencial de ação, o qual é iniciado pela abertura dos canais de sódio, é o processo pelo qual a atividade elétrica é gerada e conduzida na membrana das células.

Com o advento da técnica de "patch clamp" (Neher e Sakmann, 1976, 1978, 1992), a qual permite medir corrente iônica fluindo através de uma pequena área de membrana ("patch"), a idéia de que a condutância da membrana seja mediada por canais iônicos específicos ficou melhor estabelecida. Os experimentos com "patch clamp" possibilitaram estudos quantitativos bastante precisos das características elétricas

dos canais iônicos, tais como: condutância do canal, cinética de abertura e fechamento e dependência do potencial elétrico (Hille, 1992).

Embora a atividade elétrica nos diversos tipos celulares possa desempenhar funções diferentes, ela compartilha as mesmas bases iônicas para sua geração e condução. Vale a pena mencionar que, diferentemente dos canais de potássio e cálcio, os canais de sódio apresentam uma similaridade funcional e molecular bastante grande nos diversos tipos celulares (Hille, 1992; Hank e Sheets, 1992; Ruben et al., 1992; Cota e Armstrong, 1989; Armstrong e Cota, 1990). Dadas as características homogêneas dos canais de sódio em vários tipos celulares e sua função de iniciar o processo de excitação celular, costuma-se genericamente dizer que os canais de sódio constituem a espinha dorsal da excitabilidade celular. Neste sentido, a modulação dos processos de abertura e fechamento dos canais de sódio pode afetar de modo marcante a excitabilidade celular. Deste modo, o estudo de mecanismos celulares que modulam o canal de sódio pode levar a uma compreensão mais profunda do papel deste canal no processo de modulação da excitabilidade celular. A técnica de "patch clamp" constitui ferramenta experimental de vital importância para estes estudos.

1.2. A técnica de "patch clamp"

A técnica de "patch clamp" originou-se de um esforço para registrar correntes iônicas de canais iônicos individuais em membranas biológicas. A idéia geral foi tentar isolar uma pequena área da membrana celular ("patch") para efetuar medições elétricas locais. Para isto a ponta de um eletrodo (micropipeta de vidro preenchida com solução fisiológica) era colocada na superfície da célula de modo que correntes iônicas

do "patch" pudessem ser registradas em decorrência da fixação do potencial elétrico ("voltage clamp").

Considerações sobre o ruído basal destes registros levaram à conclusão de que tais eletrodos permitiam o registro de correntes da ordem de picoampères toda vez que a resistência de selo (resistência entre o interior da micropipeta e o meio extracelular) pudesse ser muito maior que a resistência interna do eletrodo. Otimização na geometria da micropipeta e a aplicação de uma pequena sucção dentro da micropipeta em contato com a célula conduziram à descoberta do fenômeno chamado "formação do giga-selo" (resistências de selo da ordem de giga-Ohm). Esse fenômeno consiste de uma transição repentina da resistência de selo da ordem de dezenas de mega-Ohms para giga-Ohms. Embora as bases físicas para a formação do giga-selo ainda não estejam bastante claras, sua formação certamente aumenta a resolução dos registros em uma ordem de grandeza e produz estabilidade mecânica do "patch" dentro da micropipeta.

Uma variedade de configurações de registros é possível após a formação do giga-selo. A figura 1.1 ilustra quatro configurações básicas de "patch clamp". Os números que aparecem na figura 1.1 representam potenciais elétricos (em milivolts, "mV") que foram escolhidos de modo que um potencial de -50 mV ficasse aplicado em todas as configurações representadas (assumindo um potencial de repouso da célula de -70 mV). O canto superior esquerdo representa a aproximação do eletrodo à célula para formação do giga-selo e a obtenção da configuração de "cell-attached patch clamp". A partir desta configuração podem ser obtidas: i) a configuração de "inside-out patch clamp" em decorrência do afastamento do eletrodo de modo a separar o "patch" de membrana da célula; ii) a configuração de "whole-cell patch clamp", pela ruptura do "patch" usando pulso de sucção ou tensão; e iii) a configuração de "perforated patch

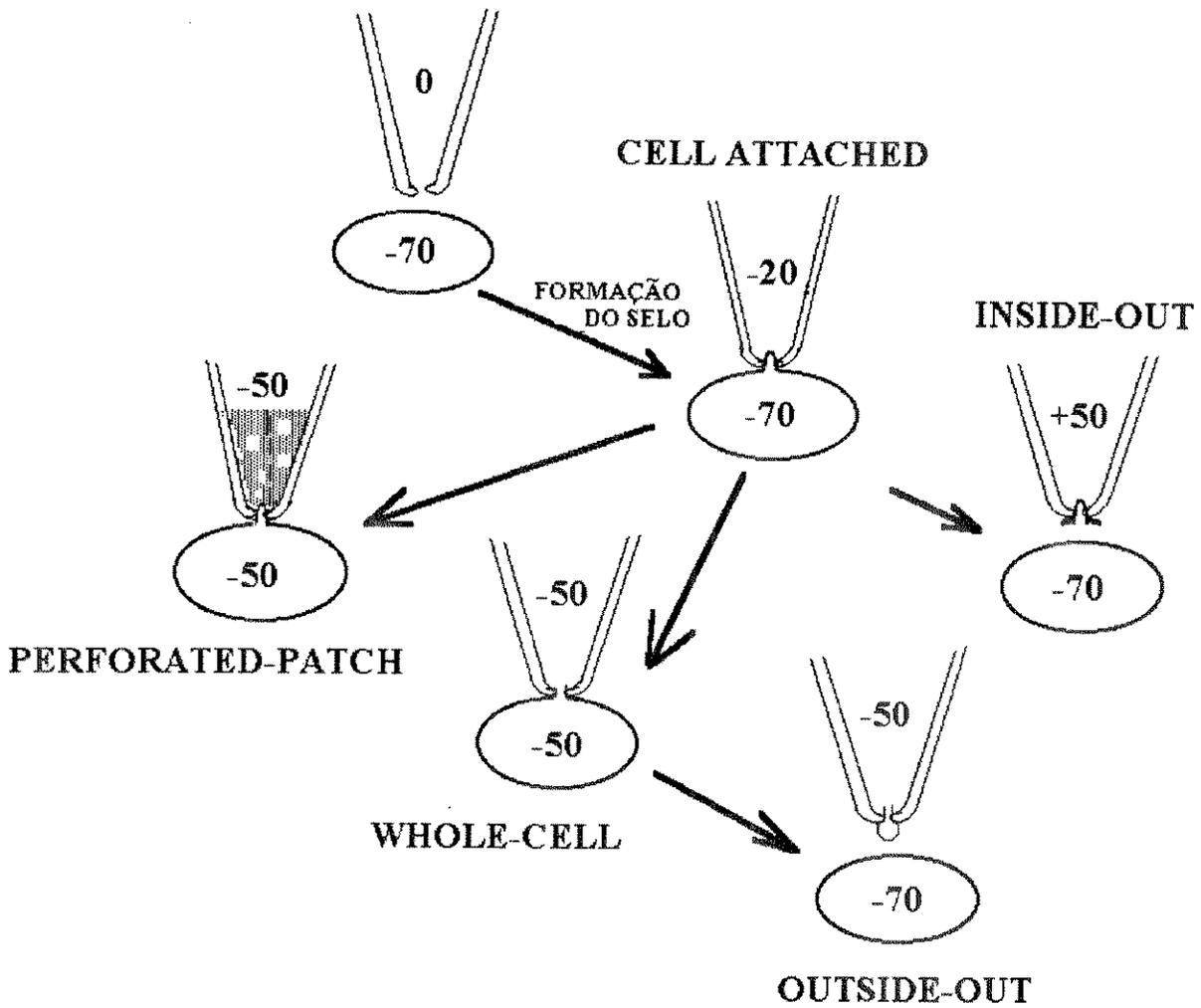


Figura 1.1. Diagrama esquemático das configurações de "patch clamp". Os detalhes de cada técnica são descritos no texto.

clamp" pela inclusão dos antibióticos nistatina ou anfotericina-B na solução fisiológica de preenchimento do eletrodo (esta técnica será abordada em mais detalhes neste capítulo). Da configuração de "whole-cell patch clamp" pode ser obtida a configuração de "outside-out patch clamp" pelo afastamento do eletrodo de modo a formar uma vesícula de membrana celular com o lado externo voltado para fora do eletrodo.

Com a técnica de "cell attached patch clamp" é possível o registro de corrente no "patch" de membrana. Dependendo do tamanho do eletrodo, estes registros podem ser de correntes macroscópicas (ponta do eletrodo com abertura suficientemente grande para abrigar vários canais de sódio no "patch") ou corrente em canais de sódio unitários (ponta do eletrodo com abertura suficientemente pequena para abrigar poucos canais de sódio no "patch"). Com a técnica de "whole-cell patch clamp" ou "perforated patch clamp", é possível o registro de corrente de toda a membrana da célula (correntes macroscópicas pelo controle do potencial elétrico intracelular). Com as técnicas de "inside-out" e "outside-out patch clamp" são possíveis registros de corrente macroscópicas de sódio de pequena amplitude e em canais de sódio unitários por meio do controle dos potenciais elétricos extracelular e intracelular, respectivamente. Estas duas últimas técnicas permitem também que as soluções externas e internas sejam controladas para o registro das correntes.

A escolha da técnica a ser adotada irá depender do teste ao qual queremos submeter os canais. Por exemplo, no caso hipotético de quisermos estudar o efeito direto de um determinado composto sobre o lado intracelular do canal sem interferências dos componentes intracelulares, a técnica de "inside-out patch clamp" parece ser a mais adequada. Neste caso, o "patch" de membrana na ponta do eletrodo (e isolado da célula) expõe o lado intracelular ao banho no qual podemos aplicar o

composto. Se, neste mesmo caso hipotético, por algum motivo o composto deva ser colocado dentro da pipeta, a técnica de "outside-out patch clamp" parece ser a mais adequada, tendo em vista que neste caso o lado intracelular (e isolado da célula) encontra-se voltado para dentro da pipeta. Vale a pena mencionar que de todas as configurações de "patch clamp", as configurações de "cell-attached patch clamp" e "perforated patch clamp" são as que mais preservam o meio intracelular intacto.

1.2.A. Técnica do "Perforated Patch Clamp"

Uma consequência inevitável nos registros de correntes iônicas de toda a membrana da célula ("whole-cell patch clamp") é a perda dos íons citoplasmáticos e outros constituintes celulares que se difundem para dentro da micropipeta. A técnica do "perforated patch clamp" permite medições de correntes em "whole-cell" de modo muito menos invasivo que as técnicas convencionais de "patch clamp" (Horn e Marty, 1988). Esta técnica usa nistatina ou anfotericina-B na solução fisiológica de preenchimento da micropipeta. O acesso elétrico ao interior da célula fica estabelecido por meio de poros permeáveis a íons monovalentes formados pela ação destes antibióticos em membranas contendo colesterol ou ergosterol, tais como membranas celulares (Fig. 1.2).

Com esta técnica, pode-se obter registros de correntes iônicas típicos da configuração de "whole-cell patch clamp" com a vantagem de não haver diálise de substâncias citoplasmáticas. Deste modo, reações com segundos mensageiros importantes para a atividade elétrica celular e regulação de canais iônicos permanecem operacionais.

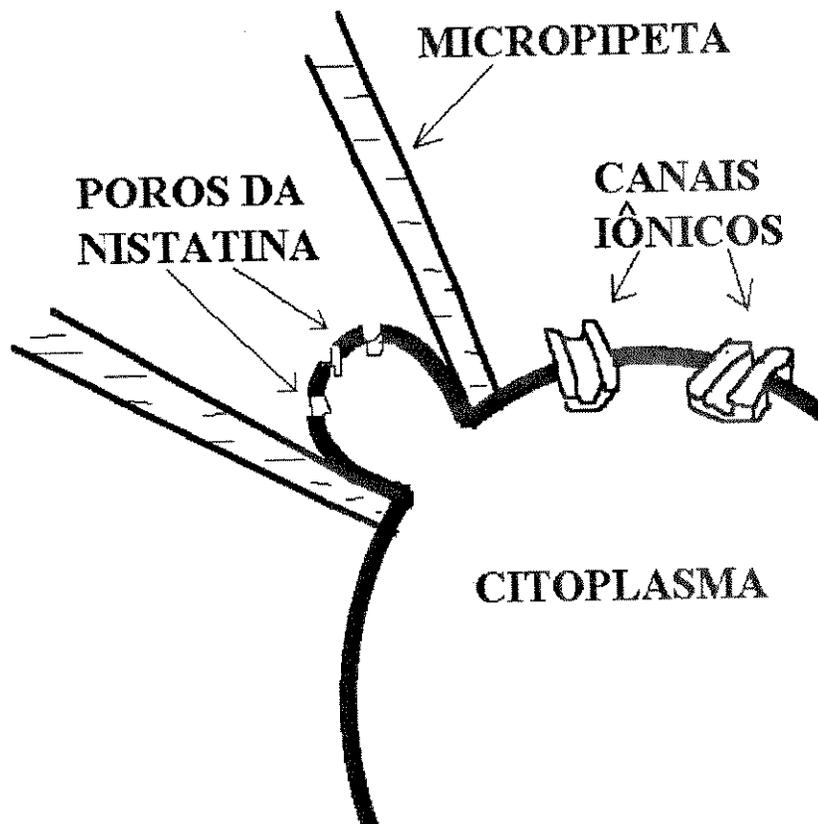


Figura 1.2. Diagrama ilustrativo da configuração de "perforated patch clamp". O acesso elétrico à célula é obtido por meio de poros permeáveis a íons monovalentes formados pela ação da nistatina dentro da micropipeta.

1.2.B. O sistema de Registro

A Figura 1.3 ilustra um sistema padrão de "patch clamp" o qual é basicamente composto por uma parte mecânica de manipulação da micropipeta e uma parte elétrica de registro de correntes iônicas. A micropipeta é fixada em um suporte ("holder") conectado a um micromanipulador, de maneira que movimentação nas três dimensões espaciais e sucção possam ser aplicadas. Um fio de prata-prata clorada (em contato com a solução da micropipeta) conecta a micropipeta a um amplificador de "patch clamp" (APC). O APC é basicamente um conversor corrente-tensão projetado de modo a produzir saída de tensão (V_s) proporcional a corrente de entrada (I_e) (ver apêndice 1). A corrente I_e flui através do resistor de realimentação (R) do APC de modo a manter o potencial V_e fixo no valor do potencial de referência (potencial de "clamp", V_{clamp}). O circuito do conversor corrente-tensão registra correntes de "pequenas amplitudes" (pA ou nA) por meio da fixação da tensão na micropipeta e pela monitoração destas correntes em um resistor de alto valor.

Tanto a micropipeta quanto a membrana da célula introduzem correntes capacitivas nos registros das correntes de sódio. Circuitos complementares usados para a compensação da capacitância da micropipeta e da membrana (quando for o caso de registros em "whole-cell") foram omitidos na ilustração da figura 1.3 para simplificar a descrição do sistema de registro (ver apêndice 1). De maneira simplificada, estes circuitos realimentam negativamente sinais de corrente capacitivas na entrada do APC (entrada inversora do APC) que podem ser ajustadas de modo a neutralizar as correntes capacitivas da micropipeta e/ou da membrana da célula. No entanto, cuidados devem ser tomados no sentido de não supercompensar a capacitância e desta forma distorcer os registros.

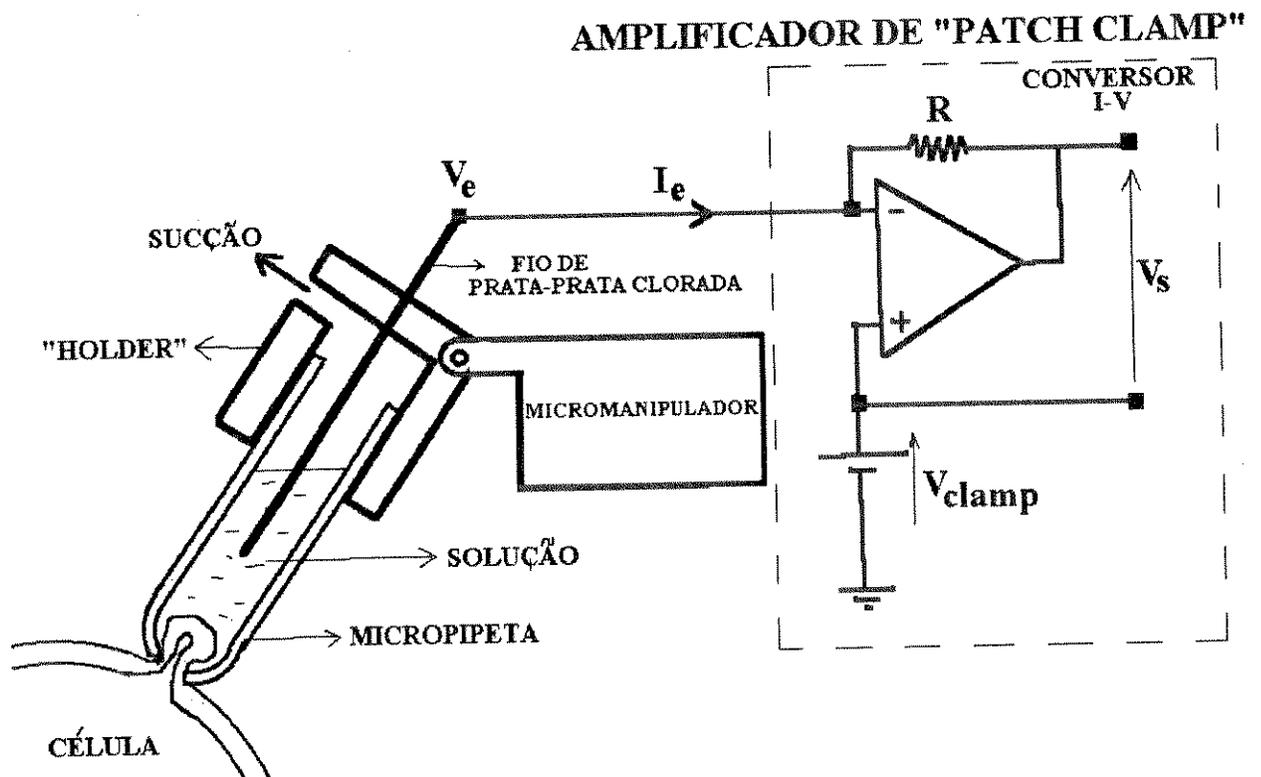


Figura 1.3. Diagrama esquemático de um sistema padrão de "patch clamp". O eletrodo (micropipeta preenchida com solução fisiológica) é fixo em um "holder" (conectado a um micromanipulador) o qual permite movimentação e sucção no eletrodo. Um fio de prata-prata clorada conecta o eletrodo ao amplificador de "patch clamp" de modo que correntes iônicas da célula em resposta a fixação de tensão possam ser registradas. Detalhes do amplificador são descritos no texto.

1.3. O canal de sódio

1.3.A. Modelo:

A figura 1.4 ilustra um modelo do canal de sódio obtido a partir de estudos eletrofisiológicos usando o método de "voltage clamp" (Catterall, 1992).

O modelo representa um poro que atravessa a membrana. Este poro, preenchido com água, é constituído por uma abertura externa com dimensões menores que sua abertura interna, um filtro seletivo que é uma porção da molécula que interage com os íons permeantes, um sensor de tensão carregado positivamente que inicia a ativação do canal abrindo a chave de ativação em resposta à despolarização da membrana, e uma chave de inativação que fecha o canal.

A eficiência do canal de sódio quanto à sua condutância e seletividade foi previamente subestimada a partir dos resultados experimentais iniciais (Almers e Levinson, 1975; Levinson e Ellory, 1973). Contudo, os registros de canais de sódio individuais confirmaram as estimativas obtidas para a ordem de grandeza da taxa de fluxo de sódio (10^7 íons/s) e um valor de condutância típico de aproximadamente 15 pS. Adicionalmente, a avaliação qualitativa e quantitativa da região que efetivamente desempenha o papel de filtro do canal de sódio revela características importantes para os futuros estudos da natureza molecular do poro do canal (Hille, 1971; Hille, 1972).

A continuidade de experimentos que avaliam a estrutura funcional do canal de sódio tem conduzido à formulação de modelos experimentais mais completos que permitem, por exemplo, representar mais precisamente o processo de inativação

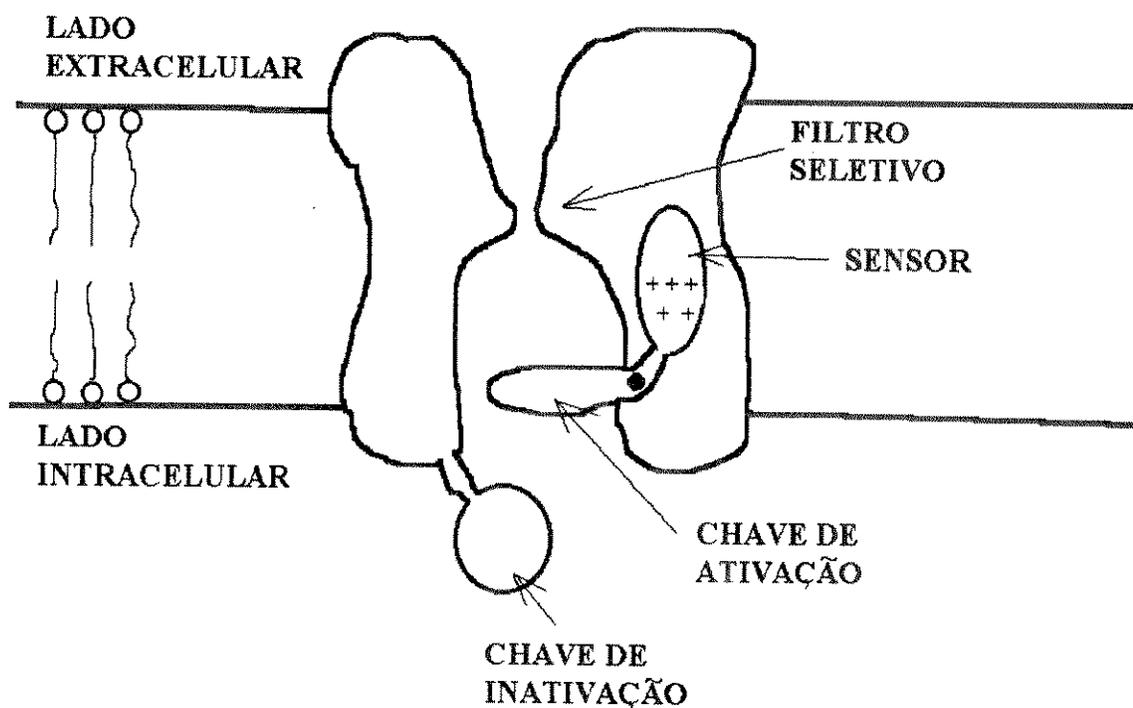
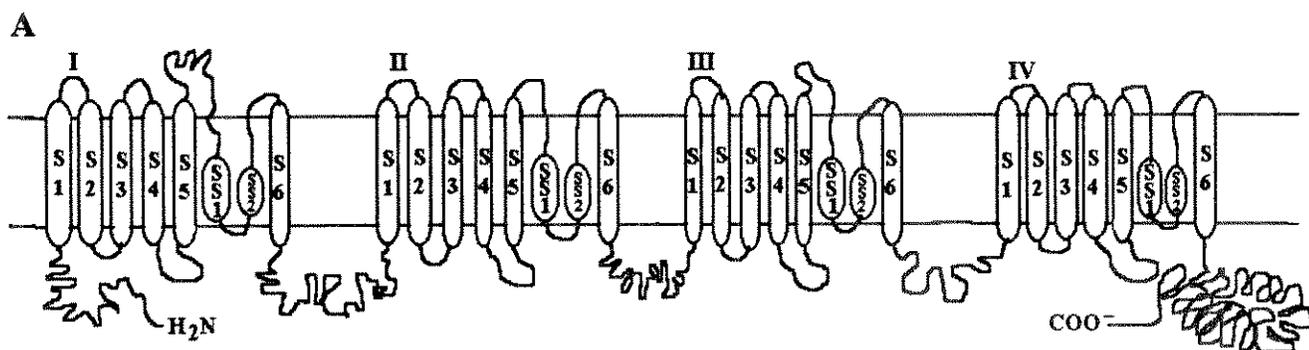


Figura 1.4. Modelo hipotético de um canal de sódio. O canal é representado como uma macromolécula com um poro no centro. As regiões funcionais - filtro seletivo, sensor, chaves de ativação e inativação servem de base para estudos estruturais do canal.

(Armstrong, 1992). Contudo, o modelo mencionado aqui, por tratar-se de uma visão clássica do funcionamento do canal de sódio, serve de base para a avaliação do comportamento deste canal em diferentes linhas de célula.

A partir dos trabalhos iniciais de Hodgkin e Huxley (1952), tem-se desenvolvido muitos modelos para a excitabilidade celular utilizando diferentes técnicas experimentais (Patlak, 1991). Contudo, foram as técnicas de biologia molecular que permitiram um avanço significativo na interpretação da relação da função do canal de sódio com sua estrutura molecular. O uso da tetrodotoxina para identificação do canal de sódio constitui, ainda hoje, um método bioquímico bastante seguro para isolamento do canal de sódio (Hafermann, 1972; Noda et al, 1989). A partir do reconhecimento do canal de sódio como uma entidade molecular, surgiram estudos evidenciando que os canais de sódio se expressam de maneira surpreendentemente homóloga nos diversos tipos celulares e em diferentes espécies animais (Noda et al, 1986; Rogart et al, 1989; Sills et al, 1989). A decorrência imediata de que os diversos subtipos de canais de sódio devem então apresentar a mesma estrutura molecular básica tem sido exhaustivamente evidenciada (Noda et al, 1984; Greenblatt et al, 1985; Guy e Seetharamulu, 1986; Trimmer e Agnew, 1989).

As propostas da estrutura molecular e funcional do canal sódio se resumem da seguinte forma: a proteína do canal de sódio é uma macromolécula constituída de quatro repetições que atravessam a membrana (Fig. 1.5.A). Cada uma das repetições parece conter de seis a oito segmentos que cruzam a membrana, sendo que um destes segmentos apresenta uma região carregada positivamente e que poderia ser o sensor de tensão do canal. O centro da proteína provavelmente formaria um poro que poderia estar aberto ou fechado, de modo a controlar a passagem de sódio (Fig



B

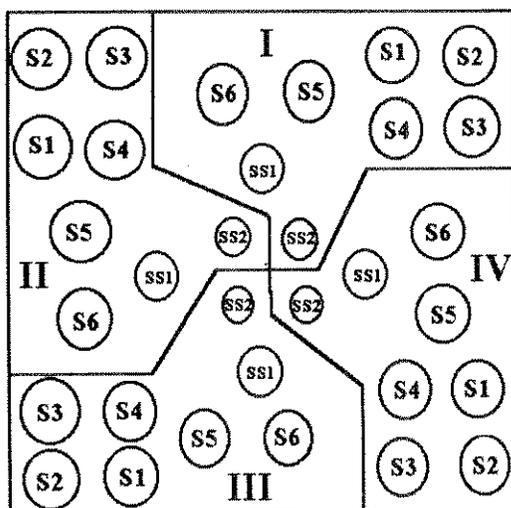


Figura 1.5. Modelos da estrutura molecular do canal de sódio. A) A seqüência linear da estrutura primária do canal de sódio é subdividida em 4 repetições homólogas classificadas de I a IV. Cada uma destas repetições tem regiões que atravessam a membrana (regiões mais espessas). Cada uma das 6 regiões espessas que atravessam a membrana é classificada de S1 a S6. Regiões putativas menores e mais curtas que estão representadas entre os segmentos S5 e S6 são denominadas SS1 e SS2. B) Modelo estrutural esquemático ilustrando 4 repetições justapostas simetricamente e ao redor de um eixo central (supostamente o poro do canal). As regiões putativas estão indicadas dentro de cada repetição.

1.5.B). Os segmentos hidrofílicos localizados na porção citoplásmica da molécula estão envolvidos com o estado de inativação do canal (Patlak, 1991; Catterall, 1992).

1.3.B. A ativação e inativação do canal de sódio

Durante a despolarização, a permeabilidade da membrana ao sódio primeiro aumenta dramaticamente e então diminui para seu nível basal em aproximadamente 1 milissegundo. Este comportamento bifásico foi descrito em termos de dois processos experimentalmente separáveis que controlam a função do canal de sódio (Hodgkin e Huxley, 1952): 1) Ativação, a qual controla a taxa e dependência de tensão do aumento de permeabilidade que acompanha a despolarização e 2) Inativação, a qual controla a taxa e dependência de tensão do subsequente retorno da permeabilidade ao sódio para o nível de repouso durante a manutenção da despolarização.

A ativação do canal de sódio ocorre quando a despolarização da membrana é detectada pelo sensor de tensão, o que promove mudanças de conformação na proteína do canal (chave de ativação, Fig. 1.4). Esta mudança de conformação abre o canal, permitindo o movimento passivo de íons sódio. O estudo destas mudanças de conformação que levam à abertura (ativação) do canal permite um entendimento mais claro de como o estado funcional do canal depende do potencial elétrico através da membrana (Patlak, 1991; Catterall, 1992). O fluxo de sódio através do canal é interrompido pelo fechamento do poro devido ao processo de inativação do canal (chave de inativação, Fig. 1.4). O canal deixa seu estado de inativado somente quando

o potencial de membrana retorna ao seu nível basal (repolarizado). Os elementos intracelulares do canal de sódio relacionados ao processo de inativação tem sido identificados por meio de enzimas que alteram a constituição molecular da proteína do canal (Rojas e Rudy, 1976). A ação principalmente de enzimas proteolíticas revela a natureza de grupos carboxila da proteína que estão envolvidos com a inativação. A principal informação obtida a partir destes resultados é que os componentes protéicos do lado intracelular do canal são essenciais para a inativação do canal de sódio.

1.4. Modulação do canal de sódio

Os canais de sódio são considerados ótimos geradores do potencial de ação. Contudo, os fisiologistas não consideravam esta função do canal de sódio como um processo fisiologicamente regulado. Porém, mais recentemente, tem-se mostrado que a função do canal de sódio pode ser modulada por fosforilação (ligação de íons fosfato) da proteína do canal por proteínas quinases (Li et al, 1993; Li et al., 1992; Linden e Routtenberg, 1989; Costa e Catterall, 1984; Dascal e Lotan, 1991; Rossie e Catterall, 1987).

As proteínas quinases são grupos de enzimas intracelulares similares em tamanho, estrutura e mecanismo de ativação (Azzi et al, 1992). A proteína quinase C é ativada pelo diacilglicerol (DAG), cujos níveis intracelulares podem ser aumentados por estimulação de receptores α -adrenérgicos, ou colinérgicos muscarínicos presentes na membrana (Fig. 1.6). Estes receptores pertencem a uma família de receptores que atuam indiretamente sobre os canais iônicos: os receptores acoplados à proteína G. A

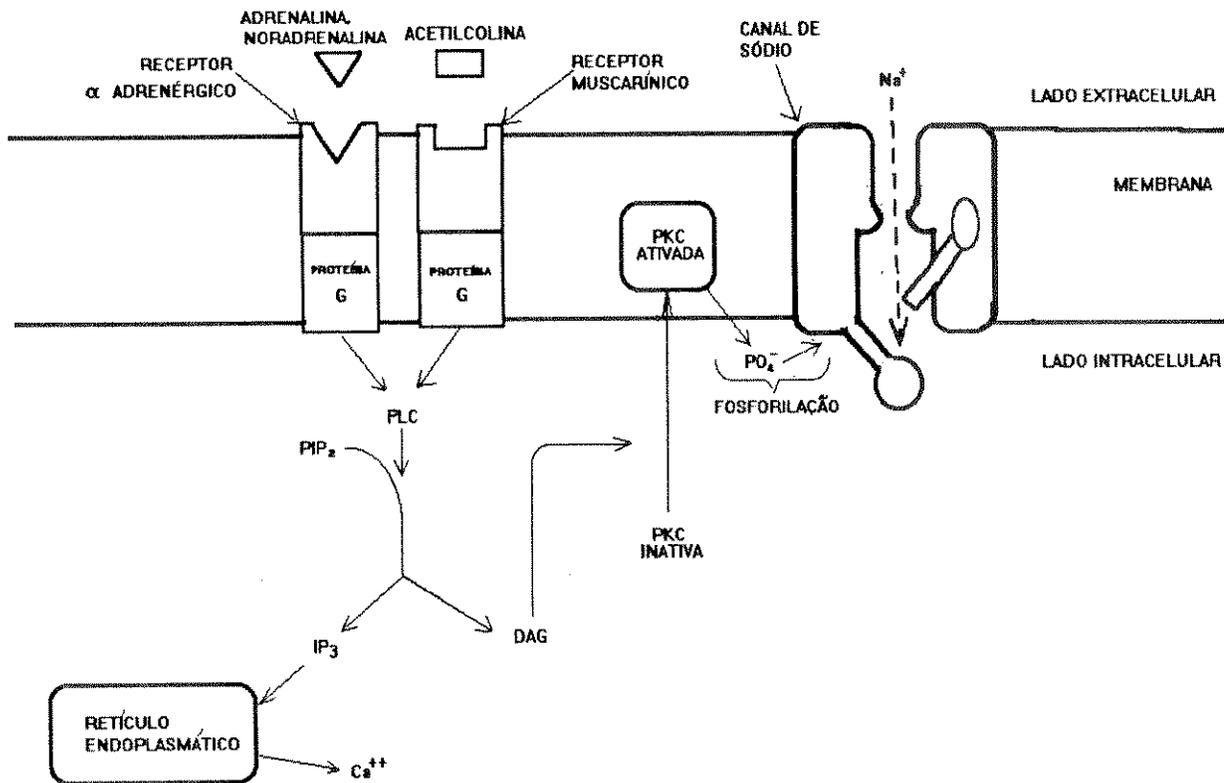


Figura 1.6. Diagrama esquemático da ativação da proteína quinase C. Os neurotransmissores adrenalina, noradrenalina e acetilcolina reconhecem e ligam-se aos receptores α -adrenérgico e/ou muscarínico ativando a proteína G. Uma vez ativada, a proteína G ativa a fosfolipase C (PLC) a qual hidrolisa fosfatidil inositol 1-4-difosfato (PIP_2) produzindo um par de segundos mensageiros, inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e dicilglicerol (DAG). IP_3 mobiliza cálcio de estoques intracelulares (e.g. retículo endoplasmático). O DAG ativa proteína quinase C (PKC) a qual fosforila o canal de sódio.

proteína G atua sobre um efetor, ou seja, uma enzima que produz um segundo mensageiro difusível. Os processos celulares ativados por estes receptores usam a proteína G para ativar a fosfolipase C. Esta enzima hidroliza fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP₂) produzindo um par de segundo mensageiros, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). O IP₃ mobiliza cálcio de estoques intracelulares (p.ex. retículo endoplasmático) e o DAG ativa a proteína quinase C (Nishizuka, 1992). O DAG, sendo hidrofóbico, situa-se dentro da membrana, onde ativa a proteína quinase C. A forma inativada desta proteína quinase fica no citoplasma. Quando o nível de DAG intracelular é aumentado, a proteína quinase C é translocada para a membrana onde pode fosforilar substratos proteicos presentes tanto na membrana quanto no citoplasma (Cohen, 1992).

Sugestões de que a via de sinalização cálcio-diacilglicerol esteja envolvida na modulação do canal de sódio têm sido fortemente apoiadas por trabalhos mostrando que as subunidades α de canais de sódio purificados de cérebro de rato são fosforiladas pela proteína quinase C "in vitro" (Costa e Catterall, 1984, Murphy e Catterall, 1992). O estudo dos efeitos da aplicação direta de diacilglicerol à proteína do canal e o anulamento destes efeitos por inibidores da proteína quinase C permitiram a identificação da subunidade α do canal de sódio como um substrato para fosforilação via proteína quinase C (Numann et al, 1991; Costa e Catterall, 1984). A modulação do canal de sódio pela proteína quinase C nas células nervosas compartilha algumas características comuns com a modulação na maioria das células excitáveis (Kallen et al, 1990, Rogart et al, 1989, Trimmer et al, 1989).

Outros ativadores da proteína quinase C, tais como os ácidos graxos insaturados (isômero cis) e ésteres de forbol têm sido utilizados para o estudo do efeito da fosforilação do canal de sódio via ativação da proteína quinase C (Moorman et al,

1989; Benz et al, 1992; Linden e Routtenberg, 1989). Geralmente os estudos dos efeitos da ativação da proteína quinase C sobre o canal de sódio baseiam-se em experimentos nos quais a corrente de sódio é registrada sob a ação de ativadores e/ou bloqueadores da proteína quinase C. Nestes trabalhos, os autores consideram que o modo pelo qual a ativação da proteína quinase C afeta as correntes de sódio não depende do ativador da proteína quinase C utilizado. No entanto, o efeito de diferentes ativadores da proteína quinase C é bastante diversificado quando observado em diferentes linhagens de células (Dascal e Lotan, 1991; Numann et al., 1991; West et al, 1991; Li et al., 1993). Além disso, o mecanismo biofísico pelo qual esta proteína quinase afeta os canais de sódio ainda não está bem estabelecido.

Neste trabalho fizemos um estudo dos efeitos de diferentes ativadores da proteína quinase C sobre os canais de sódio. A partir deste estudo, propusemos um mecanismo biofísico pelo qual o canal de sódio é modulado pela ativação da proteína quinase C.

2. OBJETIVOS:

Os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Estudar os efeitos de diferentes ativadores da proteína quinase C sobre o comportamento eletrofisiológico dos canais de sódio, utilizando técnicas de "patch clamp" para registro da corrente de sódio.

- b) Procurar sintetizar o conhecimento obtido dos dados experimentais em um modelo estocástico simples.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram feitos em temperatura ambiente (21-23 °C) utilizando duas técnicas de "patch clamp" para registro de corrente de sódio em células de neuroblastoma de camundongo N1E-115. A técnica de "perforated patch clamp" foi utilizada para registro de correntes macroscópicas de sódio. A técnica de "cell-attached patch clamp" foi utilizada para registro de corrente de sódio em canais de sódio individuais.

3.1. CULTURA DE CÉLULAS

Como em outras linhagens de células (e.g. células gliais ou endócrinas), a célula de neuroblastoma de camundongo surgiu de sucessivas gerações de células nervosas cancerígenas em cultura. O grande número de linhagens de células que expressavam propriedades diferenciadas permitiu a clonagem e manutenção de diversas linhagens de células em meio de cultura. As células de neuroblastoma de camundongo N1E-115 constituem um dos clones das diversas linhagens de células derivadas de tumores de células neuronais de camundongo. Atualmente, a N1E-115 tem sido largamente utilizada em experimentos envolvendo "patch clamp".

Neste trabalho, células de neuroblastoma de camundongo N1E-115 (gentilmente cedidas pelo Prof.Dr. Fred N. Quandt - Department of Physiology, Rush University, Chicago-IL) foram cultivadas em frascos de cultura de células (70 ml) e em

lamínulas dentro de placas de Petri (35x10 mm) a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de gás carbônico. As células foram mantidas em meio de cultura composto por DMEM ("Dubecco's Modified Eagle's Medium"), 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfônico (HEPES, 20 mM) e 0.1% de penicilina/estreptomicina. A suspensão das células confluentes foi feita a cada 7 dias por meio de agitação mecânica, contagem e redivisão, de modo a obter-se densidade inicial de 10 mil células por ml. Trocas do meio de cultura foram feitas no terceiro, quinto e sexto dias após cada ressuspensão. As células foram usadas para experimentos a partir do terceiro dia após a ressuspensão.

3.2. SOLUÇÕES

As soluções de perfusão das células (solução de banho) e de preenchimento da pipeta de registro (solução de pipeta) para os experimentos com "perforated patch clamp" são descritas a seguir. Em alguns experimentos a composição destas soluções foi isotonicamente alterada para variação do potencial eletroquímico do sódio. Por conveniência, estas alterações são mencionadas no capítulo "Resultados".

Solução de banho (em mM):

75 NaCl

75 Cloreto de Colina

2.0 CaCl₂

0.2 CdCl₂

10 HEPES

pH 7.4 ajustado com NaOH.

Solução de pipeta (em mM):

10 NaF

90 CsF

30 NaCl

10 EGTA (ácido etilenoglicol-bis N,N,N',N'-tetraacético)

10 HEPES

pH 7.4 ajustado com CsOH.

As soluções de banho e de pipeta para os experimentos com a técnica de "cell-attached patch clamp" são descritas a seguir. Para assumirmos o potencial de "clamp" aplicado pelo eletrodo como o potencial efetivamente aplicado ao "patch" de membrana, é necessário que o potencial intracelular seja nulo (ou bastante próximo de zero). Para obter esta condição utilizou-se solução de banho com alta concentração de potássio. Este procedimento garantiu potencial de repouso da membrana bastante próximo a zero. A solução de pipeta continha alta concentração de sódio no sentido de aumentar o nível de corrente que flui através do canal e, conseqüentemente, melhorar a relação sinal-ruído dos registros de canais de sódio individuais ("single channel recording").

Solução de banho (mM):

150 Glutamato de Potássio

2.0 CaCl₂

10 HEPES

pH 7.4 ajustado com KOH

Solução de pipeta (mM):

300 NaCl

2.0 CaCl₂

0.2 CdCl₂

10 HEPES

pH 7.4 ajustado com NaOH.

Os fármacos utilizados para o estudo dos efeitos da proteína quinase C foram adicionados à solução do banho nas concentrações apresentadas no capítulo "Resultados". Estes fármacos foram obtidos das companhias Sigma (St. Louis, MO) e Calbiochem (San Diego, CA). Os fármacos e sua preparação são descritos a seguir. :

Fármacos relacionados à proteína quinase C:

Estes fármacos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e adicionados à solução de banho imediatamente antes de seu uso nos experimentos. A concentração final de DMSO foi inferior a 0.1% e, nesta concentração, DMSO não afetou as correntes de sódio.

Ativadores da proteína quinase C

Diacilgliceróis:

- 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG);

- 1,2-dioctanoil-rac-glicerol (DOG);

Ésteres de Forbol:

- 12,13-didecanoato de forbol;
- 12,13-diacetato de forbol;
- 12-miristato, 13 acetato de forbol;

Ácidos Graxos Insaturados (isômero cis):

- Ácido oleico (ácido cis-9-octadecenóico);
- Ácido linoleico (ácido cis,cis-9,12-octadecadienóico);
- Ácido linolênico (ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienóico);
- Ácido araquidônico (ácido cis-5,8,11,14-eicosatetraenóico);

Ácidos graxos saturados ou insaturados (isômero trans) não ativam a proteína quinase C. Estes ácidos graxos foram utilizados em experimentos "controle" para os ácidos graxos insaturados-Cis.

Ácidos graxos saturados e insaturados (isômero trans):

- Ácido elaidico (ácido trans-9-octadecenóico; insaturado);
- Ácido esteárico (ácido octadecanóico; saturado);
- Ácido mirístico (ácido tetradecanóico; saturado);

Bloqueadores da proteína quinase C:

- Estaurosporina;
- Calfofostina C;
- H7;
- Polixina B;

Fármacos utilizados para remoção da inativação do canal de sódio:

- Batraquiotoxina. O alcalóide batraquiotoxina (BTX) foi mantido em solução estoque de clorofórmio o qual era evaporado por jato suave de nitrogênio imediatamente antes do seu uso nos experimentos.

- Cloramina-T (dissolvida em água);

- N-bromoacetamida e N-bromosuccinamida (dissolvidos em clorofórmio, o qual era evaporado por jato de hidrogênio imediatamente antes do uso).

Preparação da nistatina:

-Nistatina: 10 mg de nistatina foram dissolvidos em 100 μ l de DMSO. A nistatina foi adicionada à solução da micropipeta na proporção 120 μ g nist/1ml solução. A mistura foi homogeneizada por sonicação de potência (30 segundos) imediatamente antes de sua utilização nos experimentos.

3.3. MEDIÇÕES ELETROFISIOLOGICAS

Descreve-se a seguir os procedimentos básicos para o registro de corrente de sódio empregados neste trabalho. Para maior clareza, descreve-se separadamente os procedimentos inerentes a cada configuração da técnica de "patch clamp" que se seguem a partir dos procedimentos básicos.

3.3.A. Procedimentos básicos

Preparação da célula para registro e trocas de solução:

Uma lamínula na qual a células foram cultivadas foi transferida para uma câmara de perfusão (200 μ l) montada em um microscópio invertido (Diaphot-Tmd; Nikon Co, NY, USA) (Fig. 3.1). O microscópio situava-se em uma mesa flutuante ("air table", Technical Manufacturing Corporation; MA, USA) contida em uma gaiola de Faraday. A solução de banho foi aplicada à câmara (0.6-1 ml/min) por meio da ação da gravidade e removida por um aspirador ajustável à vácuo. As trocas de soluções foram feitas com válvulas manuais conectadas a tubos de condução próximos à câmara de registro, de modo que 1 min após a abertura de uma válvula, a solução da câmara fosse trocada de 3 a 5 vezes. Um fio de Ag-AgCl foi usado como eletrodo de referência no banho.

Posicionamento do eletrodo para registro das correntes:

O eletrodo foi conectado ao "holder" de um amplificador de "patch clamp" (Axopatch-1D, Axon Instruments Inc., USA). O sinal de corrente registrado pelo amplificador de "patch clamp" foi filtrado em 5 KHz por um filtro Bessel passa baixa de 4 polos, no caso dos registros das correntes macroscópicas de sódio, e em 2 KHz, no caso dos registros de correntes nos canais de sódio individuais. Independentemente da técnica utilizada, o sinal filtrado foi monitorado em um osciloscópio Tektronix de 20 MHz (TEK 2205 Oscilloscope, Tektronix, Inc., USA) e registrado digitalmente com o uso de um computador compatível com o IBM AT (Gateway 2000 486DX2 / 50, Gateway Co, USA), equipado com uma interface

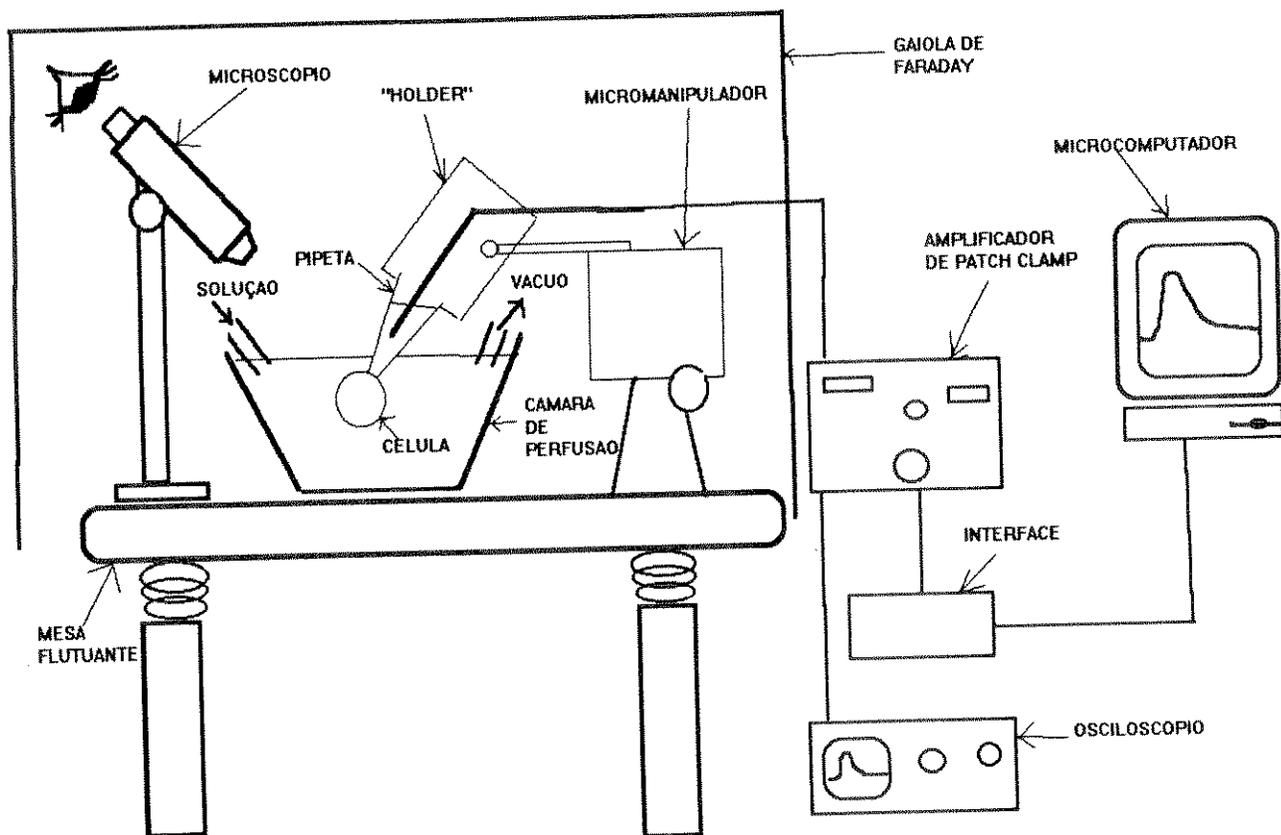


Figura 3.1: Desenho esquemático do sistema de registro para experimentos com "patch clamp".

analógico-digital (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments Inc., USA) controlada com o "software" PCLAMP (Axon Instruments Inc., USA).

A ponta do eletrodo foi imersa na solução da câmara de perfusão (por meio de um micromanipulador) e a resistência do eletrodo foi calculada em resposta a pulsos de tensão de 10 mV ("voltage clamp") aplicados pelo amplificador de "patch clamp". A configuração de "cell attached" foi obtida pela aplicação de sucção no eletrodo e, a partir desta configuração, a corrente capacitiva do eletrodo em resposta aos pulsos de "voltage clamp" foi eletronicamente cancelada com o uso do circuito de compensação de capacitância do amplificador de "patch clamp". Os experimentos foram feitos em células isoladas e aproximadamente esféricas (raio de 7 a 10 μm).

A partir deste ponto os procedimentos experimentais variaram segundo a técnica empregada.

3.3.B. Procedimentos particulares de cada técnica

"Perforated patch clamp":

Os registros das correntes macroscópicas de sódio foram feitos usando-se a configuração de "perforated patch clamp" obtida a partir da configuração de "cell-attached". Utilizou-se o antibiótico nistatina dentro da pipeta para perfurar a membrana na ponta do eletrodo e ganhar acesso elétrico ao interior da célula. O tempo inicial para os experimentos (T0) foi marcado quando a resistência de acesso intracelular atingiu valores $< 2 \text{ MOhm}$. Um potencial de -100 ou -130 mV ("holding potential") foi então

aplicado e a resistência de selo foi calculada por meio da corrente registrada no osciloscópio. A capacitância da célula foi compensada com o uso do circuito de compensação do amplificador de "patch clamp". A célula era descartada quando a resistência de selo era menor que 1 gigaohm. Os eletrodos de "patch" (ponta de 3 μm de diâmetro, 0.8-1.4 MOhm de resistência) foram feitos a partir do estiramento de tubos de borosilicato (diâmetros externo e interno de 1.5 e 1.4 mm respectivamente; Glass ThinW, no Filled, World Precision Instruments, Inc, FL, USA) utilizando um estirador de pipeta programável (Model P-87, Sutter Instruments Co., USA).

Canais individuais ("Cell-attached Patch Clamp")

A partir da configuração de "cell-attached patch clamp" aplicou-se um potencial de +100 mV (holding potential de -100 mV na convenção celular considerando a solução de banho empregada nesta técnica) e a resistência de selo foi calculada de modo similar à técnica anterior. Um período de estabilização de 15 minutos foi observado antes de T₀. Para estes registros utilizou-se o mesmo tipo de micropipeta e processo de estiramento. Contudo, o estirador de pipeta foi programado para estirar a micropipeta de modo a obter-se eletrodos com diâmetro de ponta de 0.5 μm (10MOhm de resistência).

Nas duas técnicas os eletrodos foram cobertos com uma tinta hidrofóbica (Pap Pen, Daido Sangyo Co., LTD. JAPAN) até uma distância de aproximadamente 20 μm da ponta de modo a minimizar o efeito capacitivo do eletrodo.

3.4. REGISTRO DAS CORRENTES

Para o registro das correntes macroscópicas de sódio, as células foram sujeitas a diferentes protocolos de despolarizações que visavam a caracterização das correntes em termos de ativação e inativação dos canais de sódio da membrana. Para o registro das correntes de sódio de canais individualizados, as células foram sujeitas a protocolos de despolarização que visavam a caracterização da cinética de abertura e fechamento do canal de sódio. As coleções das correntes macroscópicas de sódio e de canais individualizados armazenadas no computador foram processadas com o "software" PCLAMP para triagem inicial dos registros. As curvas experimentais, ajustadas segundo modelos matemáticos encontrados na literatura (Howe e Ritchie, 1992; Cukierman, 1991), foram processadas em LOTUS 123. Os protocolos de comandos dos pulsos de "voltage clamp" estão apresentados no capítulo "Resultados". Os registros em canais de sódio individuais ("single channel recording") foram posteriormente processados com o auxílio do "software" FETCHAN da versão PClamp6 (Axon Instruments Inc, USA) especialmente desenvolvido para este propósito.

4. RESULTADOS

Apresentam-se a seguir os resultados obtidos em experimentos envolvendo a técnica de "perforated patch clamp" para registro de correntes macroscópicas de sódio.

4.1. DEFINIÇÕES:

Para maior clareza, descreve-se a seguir os parâmetros e protocolos utilizados nas análises dos dados.

A Figura 4.1.A representa uma família típica de correntes macroscópicas de sódio obtidas em resposta a pulsos despolarizantes de potencial (5 ms de duração, 1 s de intervalo) a partir do potencial de -100 mV para um potencial-teste de -95 mV a +100 mV em passos de 5 mV. De acordo com a convenção, as correntes defletindo para abaixo representam as correntes que entram na célula. As correntes revertem sua polaridade em torno do potencial de +20 mV o qual corresponde aproximadamente ao potencial eletroquímico de equilíbrio calculado para o íon sódio (+18 mV, calculado para as soluções de banho e micropipetas utilizadas). Com este protocolo de aplicação de pulsos de "voltage clamp" foram obtidos gráficos com as amplitudes de pico de corrente de sódio em função de cada potencial-teste (curvas I-V).

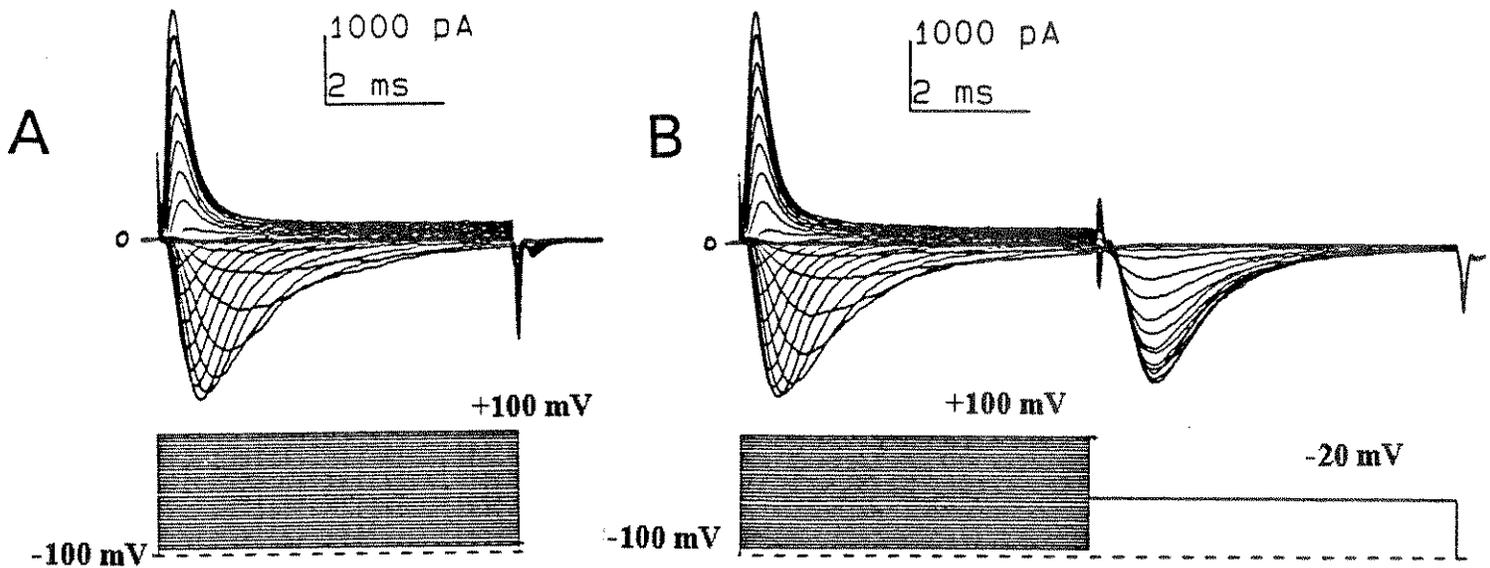


Figura 4.1. Famílias de correntes de sódio e protocolos básicos de "voltage clamp" para a caracterização das correntes. (A) Correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -95 a +100 mV (passos de 5 mV) aplicados a partir de -100 mV. As correntes que se defletem para baixo indicam fluxo de sódio de fora para dentro da célula enquanto que as correntes que se defletem para cima indicam fluxo de sódio de dentro para fora da célula. A partir do valor do pico destas correntes e seu respectivo potencial de "clamp" é possível estabelecer a relação corrente-tensão e a curva de ativação "m" destas correntes. (B) Correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -20 mV precedidos por pulsos de "voltage clamp" para -80 a +100 mV (passos de 5 mV) aplicados a partir de -100 mV. A curva dos picos da corrente de sódio no potencial de "clamp" de -20 mV contra os potenciais dos pulsos precedentes estabelece a relação entre nível de inativação da corrente de sódio e o potencial de membrana (curva de inativação "h").

As curvas de ativação, expressas como condutâncias normalizadas dos canais de sódio (G/G_{max}) em função do potencial-teste, foram obtidas a partir dos dados das curvas I-V. A condutância é calculada por:

$$G = I_p / (V - V_r)$$

onde: I_p = corrente de pico;

V = potencial-teste;

V_r = potencial de reversão;

e normalizada pelo valor máximo de G (G_{max}).

Os parâmetros constantes de tempo de ativação (τ_{on}) e decaimento (τ_h) das correntes de sódio foram calculados por meio de ajustes exponenciais das fases ascendente e descendente destas correntes, respectivamente. Estes parâmetros são apresentados em função do potencial de "clamp" que gerou as correntes.

A família de correntes de sódio na figura 4.1.B foi obtida em resposta à aplicação de pulsos despolarizantes de potencial para -20 mV (5 ms de duração, 1 s de intervalo), precedidos por pré-pulsos (5 ms de duração) que eram incrementados de modo similar ao da figura 4.1.A. A curva de inativação consiste do levantamento dos picos normalizados de corrente (I_p/I_{pmax}) durante a aplicação do pulso para -20 mV em função dos potenciais dos pré-pulsos.

4.2. EXPERIMENTOS CONTROLES

Apresentam-se a seguir os resultados do efeito do tempo sobre as correntes de sódio na célula de neuroblastoma de camundongo N1E-115.

As correntes de sódio em células N1E-115 apresentam, no seu pico, um aumento significativo dependente do tempo. A fim de quantificar os efeitos de diferentes ativadores e/ou inibidores da proteína quinase C, é necessário avaliar-se as variações dependentes do tempo dos diferentes parâmetros das correntes de sódio em condições controle. A figura 4.2 sumariza os resultados obtidos em um grupo controle de células (n=5). No painel A, os picos de corrente em resposta a um pulso de despolarização de -100 mV para -10 mV estão normalizados em relação aos picos de correntes em t = 15 min e apresentados em função do tempo. Neste painel, mostra-se que o pico da corrente aumenta durante os primeiros 15-40 minutos após a nistatina perfurar o "patch" de membrana (t=0), após o que a corrente mantém-se constante. Este aumento é estatisticamente significativo (P<0.001) e pode ser facilmente identificado em cada célula.

As curvas de ativação e inativação foram ajustadas por uma equação de Boltzman do tipo:

$$G/G_{\max} = 1/\{1 + \text{EXP}[(zF/RT)*(V-V_{1/2})]\}$$

onde:

z é a inclinação da curva;

F é a constante de Faraday;

R é a constante dos gases;

T é a temperatura Absoluta (em °K);

V é o potencial de "Clamp" no pulso teste

$V_{1/2}$ é o potencial onde metade dos canais estão ativados.

$K = RT/zF$ é proporcional a inclinação da parte aproximadamente linear da curva (R, T e F com seus valores usuais).

A figura 4.2., painel B, ilustra o efeito do tempo sobre as curvas de ativação e inativação obtidas experimentalmente e suas respectivas curvas de ajuste para as células controle. No caso das curvas de ativação, os valores dos parâmetros para ajuste das curvas foram:

Para T=15 minutos: $V_{1/2} = -14.68 \pm 0.43$ mV; $K = -7.70 \pm 0.38$ mV;

Para T=40 minutos: $V_{1/2} = -20.74 \pm 0.50$ mV; $K = -7.91 \pm 0.42$ mV.

No caso das curvas de inativação, os valores dos parâmetros para ajuste das curvas foram:

Para T=15 minutos: $V_{1/2} = -40.89 \pm 0.37$ mV; $K = 8.84 \pm 0.32$ mV;

Para T=40 minutos: $V_{1/2} = -42.01 \pm 0.24$ mV; $K = 7.97 \pm 0.20$ mV.

Na figura 4.2., painel B, mostra-se que a curva de ativação ("m") das correntes de sódio desviou-se aproximadamente 6mV durante os primeiros 15-40 minutos para potenciais mais negativos. Este desvio paralelo para esquerda na curva de ativação sugere que na faixa não saturada do processo de ativação (-40 mV a 0 mV), mais canais de sódio são ativados e/ou os canais estão sendo ativados mais rapidamente

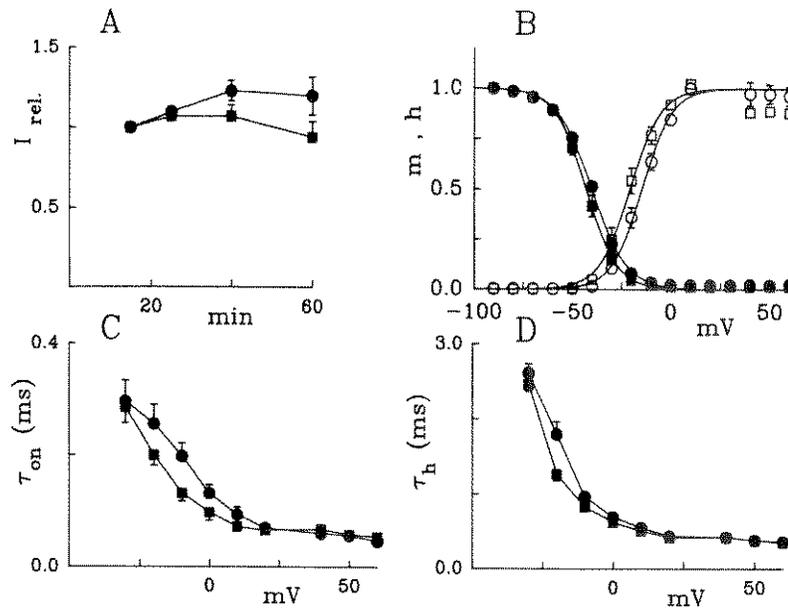


FIGURA 4.2. Alterações dependentes do tempo nas propriedades das correntes de sódio em células de neuroblatoma de camundongo (N1E-115). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão para 5 diferentes células. (A) Aumento dependente do tempo nos picos das correntes de sódio produzidas por pulsos de "voltage clamp" de -100mV para -10mV (círculos) e +60mV (quadrados). Os protocolos de pulsos de "voltage clamp" foram aplicados de 15 a 60 min após o "patch" de membrana ter sido perfurado pela nistatina na configuração de "whole-cell patch clamp" ($t=0$ min). I_{rel} é o pico da corrente no tempo t dividido pelo pico da corrente no tempo $t=15$ min; (B) Dependência de tensão da inativação (h , símbolos cheios) e ativação (m , símbolos vazios) das correntes de sódio. Os círculos e quadrados foram obtidos em 15 e 40 minutos após o começo dos registros, respectivamente. As curvas foram ajustadas por análise de regressão não linear, com os seguintes parâmetros de ajuste (ver "Material e Métodos"): h , círculos, $V_{1/2} = -40.89 \pm 0.37$ mV e $k = 8.84 \pm 0.32$ mV; quadrados, $V_{1/2} = -42.01 \pm 0.24$ mV e $k = 7.97 \pm 0.20$ mV; m , círculos, $V_{1/2} = -14.68 \pm 0.43$ mV e $k = -7.70 \pm 0.38$ mV; quadrados, $V_{1/2} = -20.74 \pm 0.50$ mV e $k = -7.91 \pm 0.42$ mV. C e D ilustram a dependência de potencial das constantes de tempo de ativação e inativação das correntes de sódio em $t=15$ min (círculos) e $t=40$ min (quadrados) após o começo dos registros, respectivamente.

com o passar do tempo. Este desvio estabiliza-se após 30 a 40 min. Este fenômeno dependente do tempo deve ser levado em consideração para a análise do efeitos de certos compostos sobre o processo de ativação dos canais de sódio. No mesmo painel, mostra-se que a curva de inativação ("h") esta essencialmente inalterada durante aquele período. O painel C mostra-se que τ_{on} diminui significativamente nos potenciais mais negativos que 0mV durante os primeiros 15-40 minutos. É provável que o desvio para a esquerda na curva de ativação das correntes de sódio (painel B, símbolos abertos) seja uma consequência desta diminuição em τ_{on} . No entanto, no painel D mostra-se que a constante de tempo de inativação das correntes de sódio (τ_h) não foi alterada apreciavelmente durante os experimentos.

4.3. EFEITO DE DIACILGLICEROL SOBRE AS CORRENTES DE SÓDIO.

A figura 4.3, painel A, mostra os efeitos de $10\mu\text{M}$ de OAG (um diacilglicerol) sobre as correntes de sódio elicítadas por pulsos de "voltage clamp" para -10 mV (correntes defletindo para baixo) e +60 mV (correntes defletindo para cima) aplicados a partir de -100 mV. Em cada potencial de membrana, o registro das correntes maiores foi obtido em condições controle (T = 15 min) enquanto que os traços das correntes menores foram obtidos 25 minutos após a aplicação do OAG. O OAG causou uma clara redução nas amplitudes das correntes em todos os potenciais. Outra alteração aparente neste figura é a aceleração no tempo para o pico sugerida pela diminuição em τ_{on} . Contudo, este efeito não foi significativamente diferente do observado normalmente nas células controle (veja figura 4.2, painel C). No painel B, figura 4.3, a relação entre o potencial de membrana e os picos da corrente de sódio são

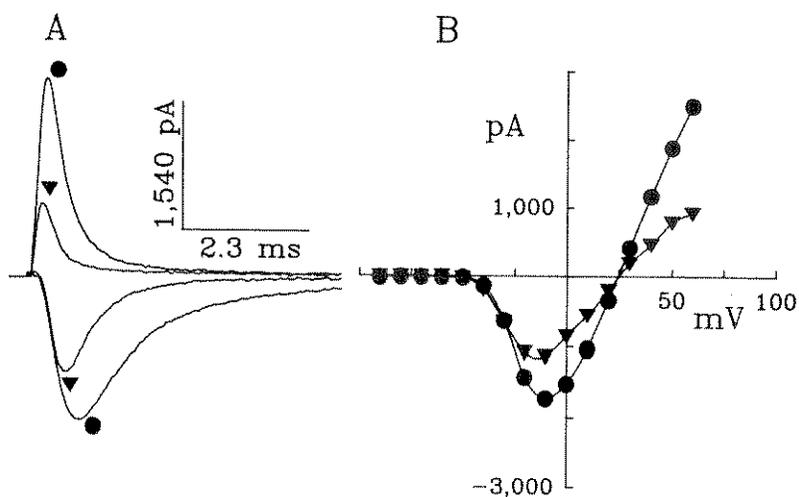


FIGURA 4.3. (A) Correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para +60 mV (correntes defletindo para cima) e -10 mV (correntes defletindo para baixo) aplicados a partir de um potencial de -100 mV. Os círculos identificam registros obtidos na condição controle ($t = 15$ min) e os triângulos identificam os registros obtidos após a exposição de $10\mu\text{M}$ de OAG por 25 min. (B) Relação entre o pico das correntes de sódio e o potencial (curva I-V) na condição controle (círculos) e na presença de $10\mu\text{M}$ de OAG (triângulos).

mostrados na condição controle (círculos) e 25 minutos após a aplicação de $10\mu\text{M}$ de OAG (triângulos).

Os efeitos dos diacilgliceróis sobre a corrente de sódio não foram reversíveis mesmo após a perfusão prolongada (15-30 min) da célula com a solução controle. O curso temporal dos efeitos de $75\mu\text{M}$ de DOG (um outro diacilglicerol) no pico das correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV aplicados a partir de -100 mV está ilustrado na figura 4.4 (círculos). Nesta figura, DOG foi aplicado e retirado em $t = 15\text{ min}$ e $t = 25\text{ min}$, respectivamente. Note que a atenuação da corrente de sódio foi relativamente rápida e completa dentro de aproximadamente 10-15 min e não se reverteu durante toda a duração do experimento.

Essencialmente, resultados similares ao apresentado na figura 4.3 foram observados em outros 4 experimentos com $10\mu\text{M}$ de OAG e em 5 experimentos com $75\mu\text{M}$ de DOG (ver tabela I). A redução nos picos das correntes de sódio causada pelo OAG e DOG foram altamente significativas em relação ao controle (OAG: $P < 0.001$; DOG: $P < 0.001$). Os parâmetros de ativação e inativação, τ_{on} e τ_{h} , e as curvas de ativação não foram significativamente diferentes nas condições controle e tratamento com estes agentes (ver tabela II). Contudo, os diacilgliceróis desviaram significativamente a curva de inativação (curva h) para potenciais mais negativos. Um desvio para esquerda na curva "h" implica que de alguma forma o processo de inativação do canal de sódio foi acelerado, isto é, num dado potencial, os canais inativam-se mais rapidamente resultando como efeito final num aumento no grau de inativação. O resultado de um experimento ilustrando este desvio é mostrado na figura 4.5. Os efeitos do OAG e DOG sobre as correntes de sódio puderam ser totalmente eliminados pela pré-exposição das células a inibidores da proteína quinase C por aproximadamente 10 minutos. Em quatro diferentes experimentos com $1\mu\text{M}$ de

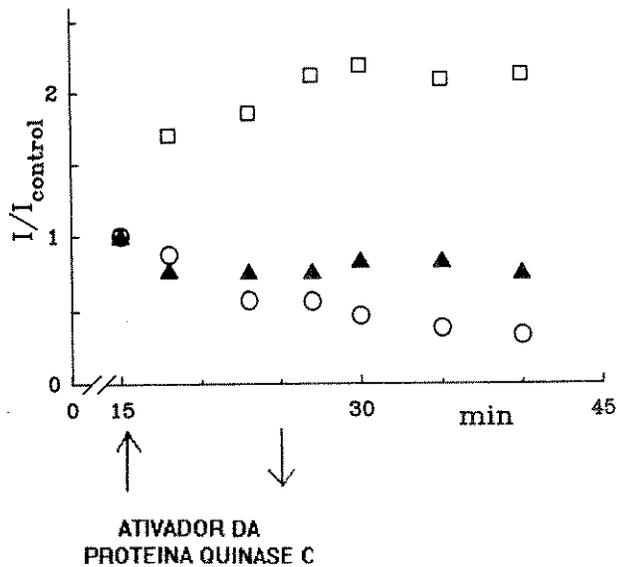


FIGURA 4.4. Curso temporal dos efeitos de ativadores da proteína quinase C sobre o pico da corrente de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV aplicados a partir de -100 mV. O ativador da proteína quinase C foi aplicado e retirado em $t = 15$ min e $t = 25$ min, respectivamente. I/I_{control} é o pico da corrente de sódio normalizado em relação ao pico da corrente de sódio em $t = 15$ min. Círculos: 75 μ M DOG; triângulos: 4 μ M ácido linoleico; quadrados: 4 μ M ácido oleico.

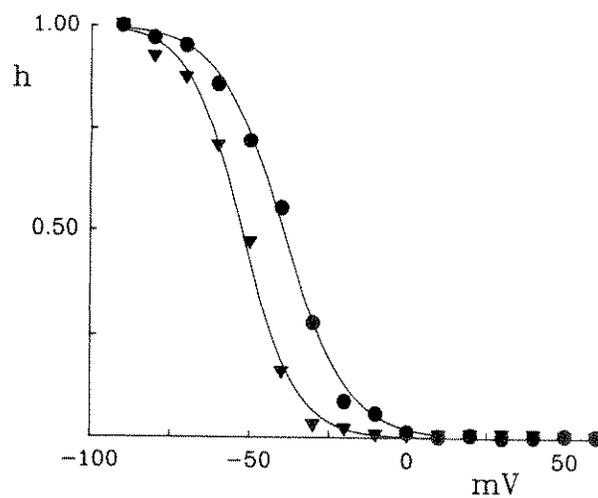


FIGURA 4.5. Curvas de inativação "h" na condição controle (círculos) e 25 min após a aplicação de $10\mu\text{M}$ de OAG. Curvas de regressão não linear foram ajustadas através dos pontos experimentais com os seguintes parâmetros de ajuste (ver "Material e Métodos"): $V_{1/2} = -39.51\text{ mV}$ (círculos) e -52.46 mV (triângulos); $k = 10.18\text{ mV}$ (círculos) e 8.41 mV (triângulos).

TABELA I: Efeitos de ativadores da proteína quinase C e compostos relacionados sobre as correntes de sódio^a.

SUBSTÂNCIAS	MUDANÇAS NO PICO DAS CORRENTES
CONTROLE ^b	1.23±0.06 [5]
DOG (75µM)	0.43±0.01 [5] *
OAG (10µM)	0.40±0.01 [5] *
ÉST. DE FORB. (1µM)	1.15±0.05 [9]
ÁC. OLEICO (4µM)	2.00±0.01 [9] *
ÁC. LINOLEICO (4µM)	0.52 [2] *
ÁC. LINOLÊNICO (4µM)	0.82±0.07 [5] *
AC. ARAQUIDÔNICO (4µM)	0.41±0.02 [4] *
AC. ELAÍDICO	1.25 [3]
AC. ESTEÁRICO	1.30 [2]

^aMudanças relativas na amplitude do pico das correntes (média ± erro padrão, n) causado por diferentes ativadores da proteína quinase C ou compostos similares em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV aplicados a partir de -100 mV. As alterações nas correntes de sódio foram avaliadas pela medição dos picos das correntes 15 minutos após a condição de "whole-cell patch clamp" ser obtida pela ação da nistatina ("perforated patch") (controle) e 25 minutos após a adição da substância ao banho.

^bUm aumento de 23% no pico das correntes de sódio ocorre durante os primeiros 15-40 minutos do início dos experimentos. Este aumento normal deve ser considerado na avaliação dos efeitos das substâncias relacionadas a proteína quinase C. Os efeitos dos ésteres de forbol, ácido elaídico e do ácido esteárico não foram significativamente diferentes da situação controle ($0.57 < P < 0.90$). As outras substâncias mostradas nesta tabela alteraram significativamente a amplitude do pico das correntes de sódio ($0.00003 < P < 0.001$).

estaurosporina, 1 experimento com $0.1\mu\text{M}$ de calfofina C, 2 experimentos com H7 ($50\mu\text{M}$) e 1 com polimixina B ($200\mu\text{M}$), a inibição nas correntes de sódio que deveria ser causada pelos diacilgliceróis (DOG e OAG) não ocorreu. Um experimento típico deste grupo está mostrado na figura 4.6. Nesta figura, traços das correntes em resposta a pulsos de "voltage clamp" de -100mV para -10mV são ilustrados. A corrente de menor amplitude foi obtida em condições controle enquanto as correntes subseqüentes, progressivamente maiores, foram obtidas na presença de $0.1\mu\text{M}$ de calfofina C e $0.1\mu\text{M}$ de calfofina C + $10\mu\text{M}$ de OAG, respectivamente. Nota-se que a calfofina C não apenas eliminou o efeito inibitório do OAG como também permitiu o aumento na corrente de sódio que ocorre normalmente nas células controle (figura 4.2).

4.4. EFEITO DE ÉSTERES DE FORBOL SOBRE AS CORRENTES DE SÓDIO

Ésteres de forbol não são facilmente degradáveis (Stryer, 1988) e desta forma, são mais efetivos do que os diacilgliceróis na estimulação da proteína quinase C. Em 9 diferentes experimentos, ésteres de forbol não afetaram as correntes de sódio. A figura 4.7 mostra dois traços de correntes: um em condição controle (corrente de menor amplitude) e o outro após a aplicação de $1\mu\text{M}$ de 12,13 didecanoato de forbol. Outros ésteres de forbol (12,13-diacetato de forbol e 12-miristato, 13 acetato de forbol), utilizados na mesma concentração, não anularam o aumento na corrente de sódio e a aceleração do curso temporal da ativação que normalmente ocorrem dentro dos 15-40 minutos após o começo dos registros (veja tabela I e figura 4.2).

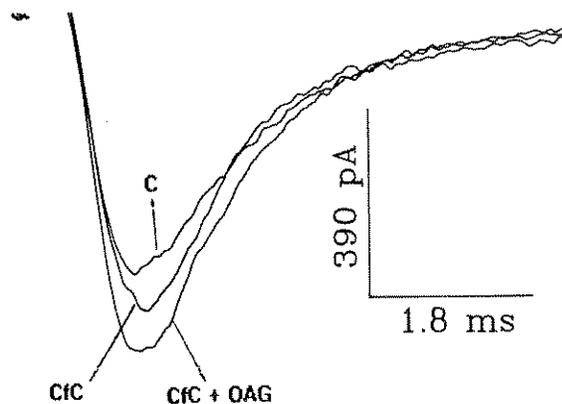


FIGURA 4.6. Efeitos da calfofostina C na modulação das correntes de sódio pelo OAG. Três traços de corrente são mostrados em resposta a pulsos de "voltage clamp" de -100 mV para -10 mV. O traço de menor amplitude foi obtido na condição controle (C, 15 min após o início dos experimentos). Os traço do meio e de maior amplitude foram obtidos após 10 min de perfusão com $0.1\mu\text{M}$ de calfofostina C (CfC, $t = 25$ min) e 20 min após o adicionamento de $10\mu\text{M}$ de OAG (CfC + OAG, $t = 45$ min) à solução contendo calfofostina C.

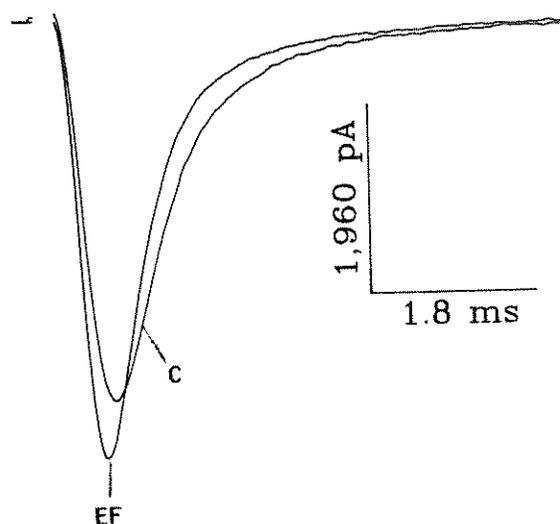


FIGURA 4.7. Efeitos de $1\mu\text{m}$ de 12, 13 didecanoato de forbol sobre as correntes de sódio. Os dois traços ilustram correntes em resposta a pulso de "voltage clamp" de -100 mV para -10 mV nas condições controle (C, $t = 15$ min) e 25 min após a adição do éster de forbol (EF).

4.5. EFEITO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (ISÔMERO CIS) (ÁCIDOS LINOLEICO, LINOLÊNICO E ARAQUIDÔNICO) SOBRE AS CORRENTES DE SÓDIO

Alguns ácidos graxos insaturados (forma cis) podem ativar proteína quinase C (Asaoka et al, 1992; Azzi et al, 1992). Pelo menos uma isoforma da proteína quinase C (proteína quinase C "ζ") pode ser especificamente ativada por estes ácidos graxos insaturados (Asaoka et al, 1992). Neste trabalho, correntes de sódio foram atenuadas por ácidos linoleico, linolênico e araquidônico e aumentados pelo ácido oleico. O efeito do ácido oleico será detalhado mais tarde neste capítulo.

A figura 4.8, painel A, mostra correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10mV e +60mV aplicados a partir de -100 mV (situação controle - correntes de maiores amplitudes) e na presença de 4 μ M de ácido linolênico. O ácido linolênico diminuiu a amplitude das correntes de sódio. Assim como os diacilgliceróis, esta inibição não foi acompanhada por alterações de τ_{on} e τ_{h} e da curva de ativação. No entanto, de modo similar aos diacilgliceróis, os ácidos graxos insaturados-cis desviaram a curva de inativação para potenciais mais negativos (ver tabela II). Adicionalmente, observou-se que, em potenciais mais negativos que 20mV, a alteração das correntes foi significativamente maior. Isto é uma distinção bastante clara entre a redução das correntes de sódio induzidas pelo grupo dos diacilgliceróis e a redução causada pelo grupo ácidos graxos insaturados (cis). Na figura 4.9 este ponto está melhor ilustrado pelo levantamento dos picos normalizados das correntes ($I/I_{control}$) contra o potencial de membrana para os experimentos ilustrados nas figuras 4.2 (círculos) e 4.8 (triângulos cheios). Enquanto a redução causada pelos diacilgliceróis foi mais forte em potenciais >20mV, a redução causada pelos ácidos

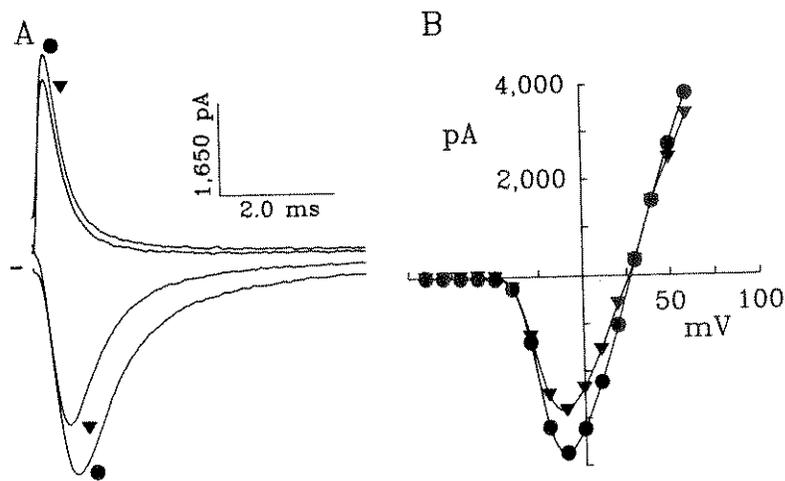


FIGURA 4.8. Efeitos de $4\mu\text{m}$ de ácido linolênico sobre a amplitude das correntes de sódio. (A) Correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV (correntes defletindo para baixo) e $+60\text{ mV}$ (correntes defletindo para cima) a partir de um potencial de -100 mV . Os triângulos indicam registros obtidos 25 min após a exposição de ácido linolênico e os círculos indicam registros obtidos na situação controle ($t = 15\text{ min}$ depois do início do experimento). (B) Relação corrente-tensão (curva I-V) do experimento ilustrado em A.

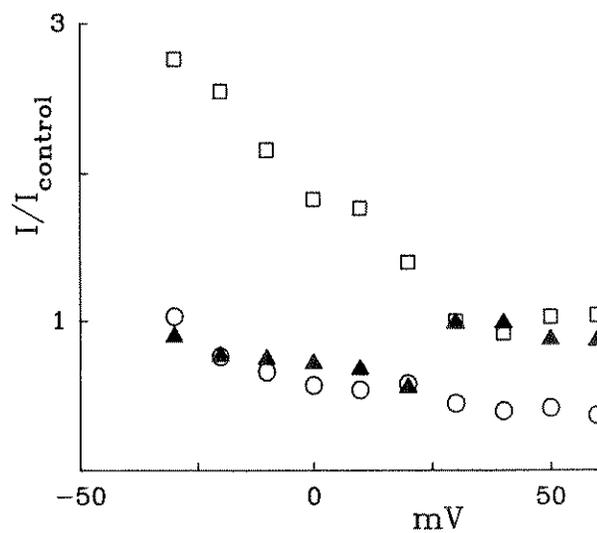


FIGURA 4.9. Picos relativos de corrente de sódio (I/I_{control}) na presença de OAG (círculos), ácido linolênico (triângulos) e ácido oléico (quadrados). Os pontos experimentais foram extraídos dos experimentos ilustrados nas figuras 4.2, 4.8 e 4.12. Note a diferença entre a inibição das correntes de sódio causada pelo OAG e o ácido linolênico.

Tabela II. Efeitos de diacilgliceróis, ésteres de forbol e ácidos graxos sobre os parâmetros de ativação e inativação das correntes de sódio.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	ATIVAÇÃO			INATIVAÇÃO		
	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	K (mV)	τ_{on} (ms)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	τ_h (ms)
Controle[5]	-6.06±2.64	9.58±2.82	0.18±0.01	-1.12±0.69	-8.2±0.63	0.83±0.04
DOG[5]	-3.91±2.20	8.47±0.87	0.16±0.03	-22.68±1.67*	-9.12±0.53	0.64±0.02
OAG[5]	-10.04±2.71	9.70±0.92	0.14±0.01	-8.40±1.16**	-7.53±0.43	0.64±0.04
E. Forbol[9]	-5.95±0.76	9.25±0.88	0.15±0.01	-1.38±0.37	-7.82±0.77	0.64±0.09
ác. Oleico[9]	-5.53±2.24	8.17±0.74	0.17±0.02	-2.28±0.42	-9.13±0.36	1.19±0.15
ác. Linoleico[2]	-4.75	8.3	0.14	-26.97*	-10.62	0.68
ác. Linolênico[5]	-8.86±4.19	7.96±1.13	0.15±0.02	-11.30±2.33***	-9.22±0.26	0.88±0.06
ác. Araquidônico[2]	-8.77	7.85	0.17	-19.81*	-9.79	0.91
ác. Elaidico[2]	-4.90	6.85	0.24	-1.60	-8.35	1.17
ác. Estearico[2]	-3.99	8.58	0.21	-2.30	-7.67	0.92

Efeitos de diacilgliceróis, ésteres de forbol e ácidos graxos em $V_{1/2}$ (potencial onde a ativação ou inativação tem a metade de seu valor máximo), k (inclinação das curvas de ativação e inativação), e τ_{on} e τ_h (constantes de tempo da ativação e inativação, respectivamente). Estes parâmetros, medidos em -10mV, foram avaliados em t = 15 min (controle) e 25 min após a exposição da célula à substância (t = 40 min). O controle mostra a variação média de $V_{1/2}$ (entre t = 15 min e 40 min) e de k (em t = 40) em células que não foram tratadas com os compostos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as medições nas células do grupo controle e nas células tratadas (* P < 6.10⁻⁶; ** P < 0.005; *** P < 0.02). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. As concentrações das diferentes substâncias são as mesmas da tabela I. Ainda que os valores expressos para τ_{on} e τ_h tenham sido medidos apenas em -10 mV, os compostos acima afetaram estas constantes de tempo em outros potenciais. Os números em parênteses após cada tratamento representam o número de células estudadas

graxos insaturados-cis foi quase completamente inexistente na mesma faixa de potencial.

No experimento da figura 4.8 o potencial de reversão (V_r) calculado foi de +18 mV. Devido ao fato de que a atenuação das correntes de sódio pelos ácidos graxos insaturados-cis foi consideravelmente menos efetiva nos potenciais maiores que +20 mV, parece possível que estes ativadores da proteína quinase C atenuem preferencialmente as corrente que medeiam a entrada de sódio na célula. Para examinar esta possibilidade, experimentos foram feitos com ácidos graxos insaturados-cis alterando-se adequadamente as soluções de banho e de pipeta de modo a obtermos diferentes valores para V_r . Na figura 4.10, a atenuação relativa dos picos das correntes de sódio está apresentada em função do potencial de membrana em três experimentos. Os círculos, quadrados e triângulos representam os dados obtidos de experimentos onde o potencial de reversão calculado foi de +51 mV, 0 mV e +18 mV, respectivamente. Os triângulos desta figura são do mesmo experimento mostrado na figura 4.8. Uma observação interessante foi a que, para os pulsos de "voltage clamp" mais positivos que o potencial de reversão, o efeito de atenuação do pico das correntes de sódio causado pelo ácido linolênico não existiu.

A atenuação causada por estes ácidos graxos insaturados-cis (linoleico, linolênico e araquidônico) pôde também ser eliminada com inibidores da proteína quinase C. Isto está ilustrado na figura 4.11. Nesta figura mostra-se traços de correntes de sódio em resposta a pulsos de despolarização ("voltage clamp") para -10mV aplicados a partir de -100 mV. A corrente de menor amplitude foi obtida em condições controle, a corrente de intensidade intermediária foi obtida quando em exposição a 0.1 μ M de calfofostina C e a corrente de maior amplitude foi obtida após a adição de 4 μ M de ácido linolênico à solução contendo a calfofostina C. Note que nem a calfofostina C nem

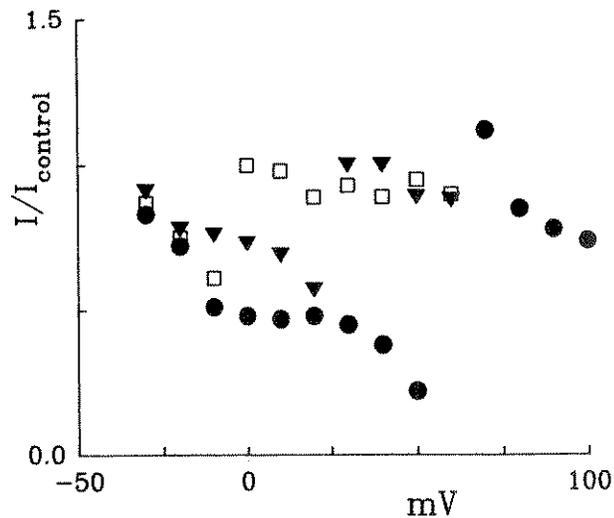


FIGURA 4.10. Picos relativos de corrente de sódio ($I/I_{control}$) e pulsos de "voltage clamp". Nos três experimentos, $4 \mu M$ de ácido linolênico foi usado para atenuar correntes de sódio. Os triângulos indicam o experimento ilustrado na figura 4.8 onde o potencial eletroquímico do sódio (V_{Na+}) calculado foi de $+18$ mV. Os quadrados indicam um experimento com 75 mM de sódio na micropipeta e no banho ($V_{Na+} = 0$ mV). Neste experimento, 35 mM de CsCl da solução de micropipeta (intracelular) foi substituído pela mesma concentração de NaCl. Os círculos indicam um experimento onde o V_{Na+} calculado é de $+51$ mV (20 mM de NaCl na solução da micropipeta foi trocado pela mesma concentração de CsF, enquanto 75 mM de cloreto de colina na solução externa (banho) foi trocada pela mesma concentração de NaCl). Note que nos três experimentos, as correntes que saem da célula (correntes nos potenciais acima de V_{Na+}) foram menos atenuadas do que as correntes que entram na célula.

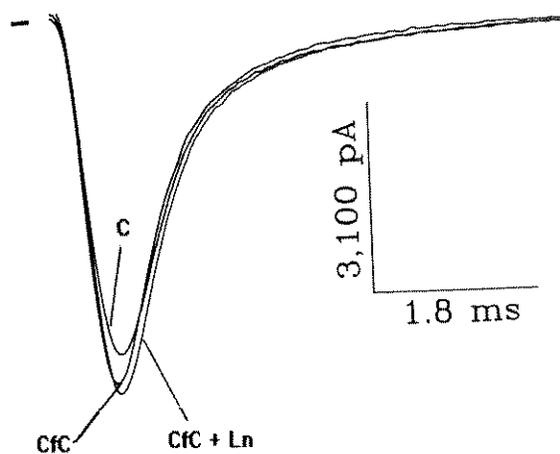


FIGURA 4.11. A diminuição das correntes de sódio causada pelo ácido linolênico é anulada por inibidores da proteína quinase C. Registros da corrente de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV aplicados a partir de -100 mV na situação controle (C, 15 min após o início dos experimento), 10 min após adicionar 0.1 μM de calyculina C (CfC, $t = 25$ min) e depois de adicionar 4 μM de ácido linolênico à solução contendo calyculina C (CfC + Ln, $t = 45$ min).

o ácido linolênico + calfofina C eliminaram o aumento dependente do tempo na corrente que é normalmente observado nestas células. Em outros 9 experimentos, o efeito inibitório dos ácidos graxos insaturados-cis foi eliminado pelo pré-tratamento das células com $0,1\mu\text{M}$ de calfofina C ($n=3$), $50\mu\text{M}$ de H7 ($n=2$) ou $1\mu\text{M}$ de estaurosporina ($n=4$).

4.6. EFEITO DO ÁCIDO OLEICO (OUTRO ÁCIDO GRAXO INSATURADO-CIS) SOBRE AS CORRENTES DE SÓDIO

Embora os demais ácidos graxos insaturados-cis testados tenham diminuído o pico das correntes de sódio, o ácido oleico aumentou correntes de sódio, e este aumento pode ser eliminado pelo pré-tratamento das células com inibidores da proteína quinase C. Este resultado está ilustrado nas figuras 4.12 e 4.13. A figura 4.12, painel A, mostra traços de correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" -10mV (correntes negativas) e +60mV (correntes positivas) aplicados a partir de -100 mV em condições controle (círculos) e, depois da adição de $4\mu\text{M}$ de ácido oleico para a solução extracelular (triângulos) por 25 minutos. No painel B da mesma figura está mostrado a relação entre o pico das correntes e o potencial de membrana. Note que o aumento nas correntes é maior em potenciais $< +20\text{mV}$. A dependência de potencial para o aumento no pico das correntes de sódio causado pelo ácido oleico também está ilustrada na figura 4.6 (quadrados).

A figura 4.13 mostra diferentes registros de correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV aplicados a

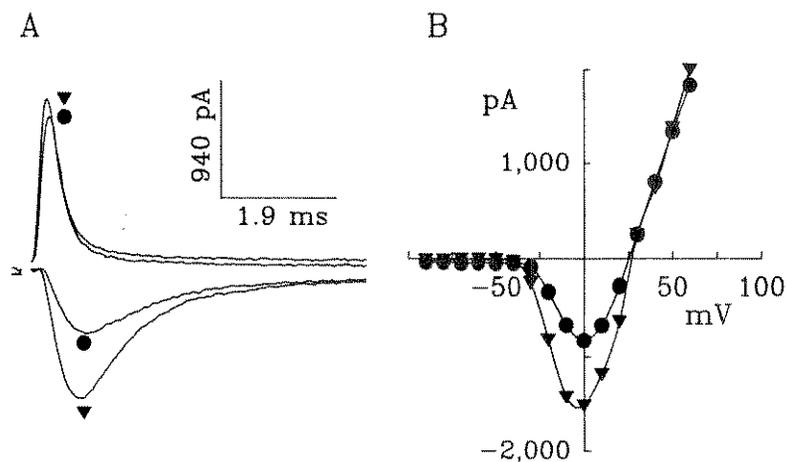


FIGURA 4.12. Aumento das correntes de sódio causada pelo ácido oleico ($4\mu\text{M}$). (A) Registros de correntes em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV (correntes defletindo para baixo) e $+60\text{ mV}$ (correntes defletindo para cima) aplicados a partir de -100 mV . Na condição controle ($t = 15\text{ min}$, círculos) e 25 min após a aplicação do ácido oleico (triângulos). (B) Relação corrente-tensão (curva I-V) do experimento ilustrado em A.

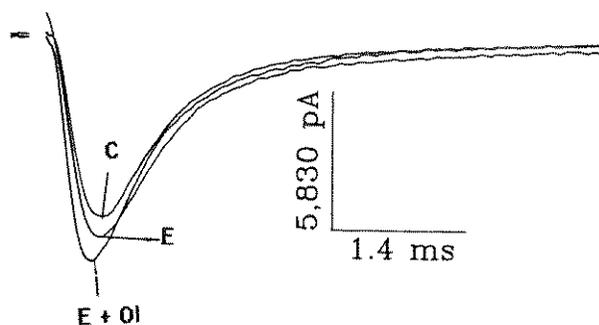


FIGURA 4.13. O efeito do ácido oleico é anulado por inibidores da proteína quinase C. Registros de correntes em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -10 mV aplicados a partir de -100 mV obtidos na situação controle (C, $t = 15$ min), 10 min após a aplicação de $1 \mu\text{M}$ de estaurosporina (E, $t = 25$ min) e com estaurosporina e $4 \mu\text{M}$ de ácido oleico (E + Ol, $t = 45$ min).

partir de -100 mV. O traço de menor amplitude foi obtido em condições controle (t = 15 min) enquanto que os traço de amplitude intermediária e de maior amplitude foram obtidos após 10 minutos de perfusão das células com 0.1 μ M de estaurosporina (T = 25 min) e 25 minutos após adicionar ácido oleico (T = 50 min) ao sistema de perfusão, respectivamente. Nestas condições, os aumentos na amplitude da corrente de sódio foram iguais aos do controle medido nos mesmos tempos (T = 15, 25 e 50 min). Resultados similares foram obtidos em experimentos com 0.1 μ M de calfostina C e em dois experimentos com H7 (50 μ M). O ácido oleico não afetou os outros parâmetros das correntes. Desta forma, o efeito observado ficou limitado apenas ao aumento na amplitude das correntes de sódio.

4.7. EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (ISÔMERO TRANS) E ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS NAS CORRENTES DE SÓDIO

Ácidos graxos insaturados-trans e ácidos graxos saturados não ativam proteína quinase C (Asaoka et al, 1992). Os ácidos elaidico (3 experimentos), esteárico (2 experimentos) e mirístico (1 experimento) não afetaram as correntes de sódio em células de neuroblastoma de camundongo (ver tabela II). Estes resultados apóiam a idéia de que os ácidos graxos insaturados (forma cis) alteram a corrente de sódio por ativação da proteína quinase C.

4.8. EFEITO DOS DIACILGLICERÓIS SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DOS CANAIS DE SÓDIO: MODELO ESTOCÁSTICO.

Para maior clareza dos resultados apresentados a seguir, descreve-se a teoria biofísica a partir da qual direcionou-se os experimentos.

Em um dado momento e em um dado potencial de membrana, a condutância das correntes macroscópicas de sódio (G_{Na}) é dada por:

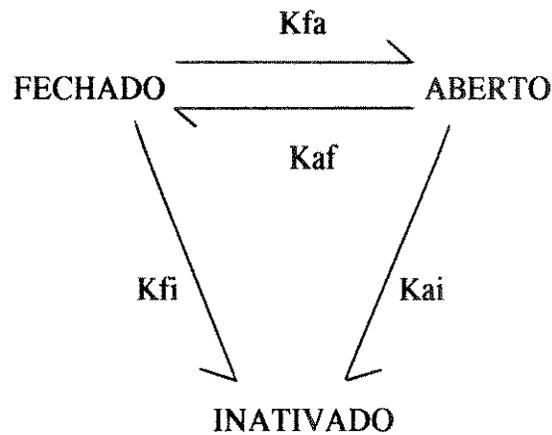
$$G_{Na}(V,t) = \bar{g}_{Na}(V) \cdot n \cdot P_o(V,t)$$

onde, \bar{g}_{Na} é a condutância de um único canal, n é o número de canais e P_o é a probabilidade do canal de sódio estar aberto.

Uma diminuição na G_{Na} pode ocorrer em consequência da diminuição de um ou mais destes parâmetros. Devido ao fato de que a condutância de um canal unitário não parece ser afetada pela ativação da proteína quinase C (Schreibmayer et.al., 1991; Numann et.al, 1991; Benz et.al., 1992) e a que atenuação da G_{Na} causada por ativadores da proteína quinase C em células N1E-115 mostrou-se dependente do potencial (figura 4.9; Godoy e Cukierman, 1994), uma diminuição em \bar{g}_{Na} e/ou n não explicaria a atenuação nas correntes de sódio induzidas por diacilgliceróis. Além disso, apenas uma diminuição em \bar{g}_{Na} e/ou n não explicaria o desvio para esquerda da curva de inativação "h" (figura 4.5).

Deste modo, nós avaliamos a possibilidade de que a ativação da proteína quinase C por diacilgliceróis atenua G_{Na} por meio de uma diminuição de P_o . O diagrama cinético abaixo representa três estados nos quais o canal de sódio pode ser

encontrado (fechado, aberto e inativado). As transições destes estados são governadas por constantes de taxas de primeira ordem e o estado inativado é um estado absorvente do qual os canais podem se recuperar somente após o potencial de membrana ter sido retornado ao valor de repouso (Hodgkin e Huxley, 1952; Armstrong e Bezanilla, 1977; Bezanilla e Armstrong 1977; Bean, 1981; Aldrich e Stevens, 1983; Vandenberg e Horn, 1984):



Alterações nas constantes de taxa de transição podem independentemente atenuar as correntes de sódio. A figura 4.14 mostra as conseqüências de modificações nas diferentes constantes de taxa de transição do esquema acima em GNa (ou Po) (ver apêndice 2). Tanto a diminuição de Kfa (painel A), quanto o aumento de Kaf (painel B) ou o aumento Kai (painel C) conduzem a atenuação das correntes de sódio (ver legenda na figura 4.14). Contudo, em cada um desses casos há uma profunda variação no curso temporal de GNa. Estas características não foram observadas quando as correntes de sódio foram atenuadas pela ativação da proteína quinase C por diacilgliceróis (Godoy e Cukierman, 1994). Contudo, se mais canais inativam-se diretamente do estado fechado (aumento de Kfi), a atenuação de GNa ocorre sem alterações apreciáveis em seu curso

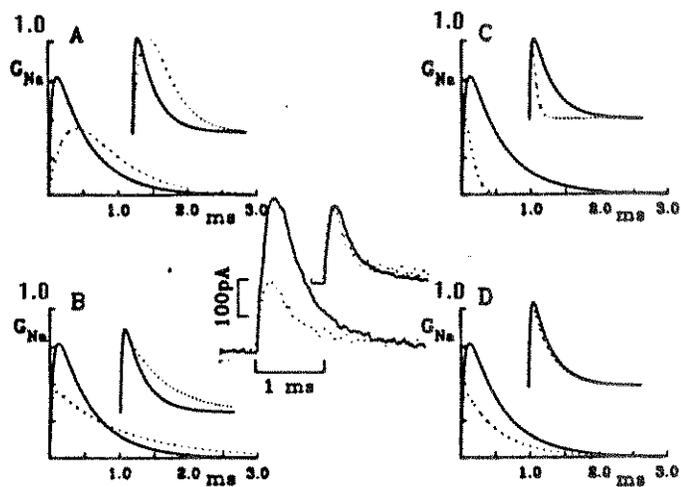


Figura 4.14. Simulações do curso temporal da condutância macroscópica de sódio (G_{Na}) baseadas no modelo biofísico ($F \rightleftharpoons A \rightarrow I$). Nos painéis de A a D as curvas sólidas representam os cursos temporais de G_{Na} obtidas na condição controle com as seguintes constantes de taxa (em ms^{-1}): $K_{fa} = 20$; $K_{af} = 0$; $K_{ai} = 2$; $K_{fi} = 0$ (Valores inspirados em modelos desenvolvidos por Bezanilla e Armstrong, 1977, e Aldrich et al, 1983). Estas simulações são apropriadas para potenciais > -10 mV (G_{Na} é máxima ou próxima da máxima e o desvio na curva de ativação dependente do tempo não varia significativamente o curso temporal das correntes de sódio). Nos painéis de A a D, as alterações nas constantes de taxa foram feitas de modo a obter um decréscimo de 50% no pico da G_{Na} (curvas pontilhadas). (A) Diminuição de K_{fa} de 20 para 3 ms^{-1} ; (B) Aumento de K_{af} de 0 para 20 ms^{-1} ; (C) Aumento de K_{ai} de 2 para 13 ms^{-1} e (D) Aumento de K_{fi} de 0 para 20 ms^{-1} . No painel central as correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" de +30 mV aplicados a partir de -100 mV são mostradas na condição controle ($t = 15$ min, curva contínua) e depois da aplicação de 25 μM de DOG (Curva pontilhada). Em todos os painéis ilustra-se, em escala menor, as condutâncias ou as correntes normalizada pelo seu respectivo valor de pico.

temporal (painel D). O painel central na figura 4.14 ilustra o curso temporal das correntes de sódio em resposta a um pulso de "voltage clamp" para +50mV aplicado a partir de -130mV em condição controle (linhas contínuas) e, após 25min de aplicação extracelular de 25 μ M de DOG (linhas pontilhadas). Note que a atenuação da corrente de sódio não é acompanhada por alterações significativas em seu curso temporal. Esta característica é melhor observada quando estas correntes são normalizadas em relação aos seus respectivos valores de pico (inserido no painel central). A grande similaridade entre a redução e o curso temporal das correntes de sódio induzidas pelos diacilgliceróis (painel central na figura 4.14, veja também figura 4.2 e Godoy e Cukierman, 1994) e a redução da amplitude e o curso temporal de GNa quando Kfi é aumentado (painel D) conduziu-nos à hipótese de que a atenuação das correntes de sódio induzida pela ativação da proteína quinase C por diacilgliceróis é predominantemente causada por um aumento do número de canais de sódio que passam diretamente do estado fechado para o estado inativado (aumento em Kfi). Tal hipótese conduz às seguintes previsões: 1) o desenvolvimento da inativação da corrente de sódio se tornaria consideravelmente mais rápido após o tratamento com diacilgliceróis, 2) a eliminação da inativação anularia a atenuação das correntes de sódio por diacilgliceróis e, 3) o aumento no processo de inativação diretamente a partir do estado de repouso deveria ser observado em um canal de sódio unitário.

4.8.A. Efeito do diacilglicerol sobre a taxa de inativação das correntes de sódio.

O curso temporal da inativação da corrente de sódio foi medida pelo levantamento da curva de Ir (pico da corrente de sódio precedido por um pré-pulso de duração variável normalizado pelo pico da corrente de sódio sem pré-pulso) para diferentes durações de pré-pulso. Com esta curva podemos observar o nível de

inativação que uma determinada duração do pré-pulso produz na corrente de sódio. A figura 4.15 mostra os resultados de experimentos em 5 células diferentes nos quais a aceleração da inativação foi medida antes (situação controle) e depois da aplicação de 25 μM de OAG por 10 minutos. Nesta figura, os pontos experimentais foram ajustados por uma equação exponencial que permite medir a constante de tempo de inativação (ver legenda da figura para equação e parâmetros de ajuste). Aplicando um pré-pulso para -60mV, a constante de tempo de inativação diminuiu na presença de OAG de 58.8 para 27.7ms (uma diminuição de 2 vezes) e, aplicando um pré-pulso de -30mV, a diminuição da constante de tempo de inativação causada pelo OAG foi de 17.6 para 4.9ms (uma diminuição de 3.6 vezes).

O resultado apresentado na figura 4.5 (desvio na curva de inativação para esquerda) é sugestivo de que a atenuação das correntes de sódio induzidas por diacilgliceróis ocorre como uma consequência do aumento na taxa de inativação dos canais de sódio. Este aumento na taxa de inativação poderia ser devido a um aumento no número de canais indo diretamente do estado fechado para o inativado (F \rightarrow I) e/ou um aumento no número de canais indo do estado fechado para o estado inativado passando pelo estado aberto (F \rightarrow A \rightarrow I). Na figura 4.14 foi mostrado que um aumento na taxa de inativação dos canais via estado aberto (F \rightarrow A \rightarrow I) deveria ocorrer com um aumento na taxa de decaimento e uma diminuição significativa na duração da corrente de sódio. Assim, se esta fosse a principal via de inativação pelo qual os canais são afetados por DOG, seria esperado que a atenuação das correntes de sódio fosse acompanhada por um aumento na taxa de decaimento das correntes macroscópicas e um encurtamento em sua duração. Isto não ocorre (figuras 4.2 e 4.3; Godoy e Cukierman, 1994). Contudo, um aumento na taxa de inativação dos canais de sódio diretamente do estado inativado (F \rightarrow I) não seria acompanhado por alterações significativas no curso temporal das correntes de sódio (veja figura 4.14, painel D).

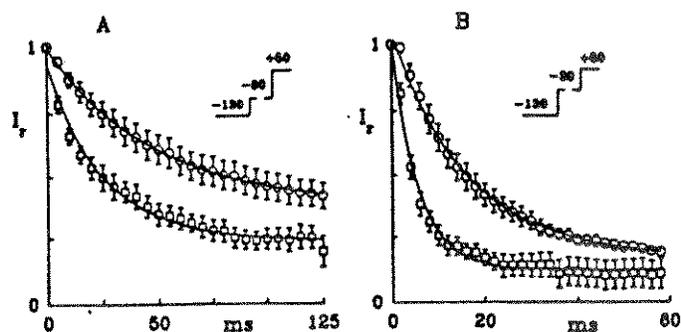


Figura 4.15. Aceleração da inativação causada por $25\mu\text{M}$ de DOG. Pulsos de "voltage clamp" para $+50$ mV foram aplicados após pré-pulsos de "voltage clamp" com intervalos variáveis em -60 mV (painel A) e -30 mV (painel B) aplicados a partir de -130 mV. Em cada painel ilustra-se os picos de corrente de sódio normalizados pelos picos de corrente de sódio sem o pré-pulso (I_r) em função da duração do pré-pulso. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 5 células. As curvas foram ajustadas pela equação: $I_r = a \cdot \exp(-t/\tau) + b$. Painel A, $a = 0.66$, $\tau = 58.8$ ms, $b = 0.34$ (círculos) e $a = 0.76$, $\tau = 27.7$ ms, $b = 0.22$ (quadrados). Painel B, $a = 0.91$, $\tau = 17.6$ ms, $b = 0.15$ (círculos) e $a = 0.90$, $\tau = 4.8$ ms, $b = 0.16$ (quadrados).

O aumento na taxa de inativação causado pelos diacilgliceróis é dependente do potencial, sendo mais pronunciado nos potenciais mais positivos (compare os painéis A e B na figura 4.15). Isto poderia explicar o desvio para a esquerda na curva de inativação das correntes de sódio: em potenciais menos negativos, mais canais iriam ser inativados após um dado intervalo na presença de DOG, resultando numa diminuição no número de canais disponíveis para ativação no pulso teste.

Em vista dos pontos mencionados acima e no sentido de buscar um mecanismo biofísico simples, parece razoável sugerir que a via crítica envolvida na atenuação das correntes de sódio induzida pela proteína quinase C seria um aumento na constante da taxa cinética governando a transição entre os estados fechado e inativado (K_{fi}). É possível reproduzir a forma de onda das correntes de sódio atenuadas pelos diacilgliceróis por meio de combinações de diferentes valores para as constantes de taxa de transição e, não apenas a alteração em uma única constante de taxa de transição como foi efetuado na figura 4.14. Contudo, se a inativação das correntes de sódio for removida e, neste caso, compostos de diacilglicerol não atenuarem as correntes de sódio, teremos uma forte evidência de que a redução das correntes de sódio por este composto está intimamente relacionada ao processo de inativação dos canais de sódio, e não à cinética de abertura e fechamento dos canais. Este fato é conceitualmente relevante devido ao fato de que podemos limitar o número de possibilidades cinéticas que explicariam a diminuição em P_o pela ativação da proteína quinase C induzida por diacilgliceróis.

4.8.B. Efeito da aplicação de DOG sobre correntes de sódio com a inativação removida pela batraquiotoxina (BTX)

Antes de considerar os efeitos do DOG sobre as correntes de sódio que não sofrem inativação, é necessário considerar os efeitos do removedor de inativação utilizado. Utilizou-se o alcalóide BTX para remoção da inativação das correntes de sódio tendo em vista sua vasta caracterização nas células utilizadas neste estudo, e em outras linhagens de células (Huang et al,1982; Tanguy e Yeh,1991). Assim, apresentamos os resultados mais relevantes para a avaliação dos efeitos do diacilglicerol sobre as correntes de sódio que tiveram a inativação removida por BTX (figura 4.16). Após a estabilização da célula ($t=0$), $0.5\mu\text{M}$ de BTX foi aplicado externamente à solução de banho. Pulsos de 2ms de -130 para +50mV foram aplicados com frequência de 100Hz por 5-10min. Este protocolo foi necessário tendo em vista que o alcalóide BTX remove a inativação das correntes de sódio ligando-se preferencialmente a canais em estado aberto (Khodorov e Revenko, 1979; Huang et al., 1982). A perfusão com BTX foi interrompida após a remoção da inativação ser obtida. O painel A da figura 4.16 mostra as correntes de sódio em resposta a pulsos de potencial de -130 para -20 (correntes que fluem de fora para dentro da célula; negativa) e +50mV (correntes que fluem de dentro para fora da célula; positiva) nas condições controle e 15min após a inativação ter sido removida pela BTX. Note a longa duração da corrente painel A. A figura 4.16, painel B, ilustra a curva I-V normalizada representando a média de 4 experimentos distintos com BTX. Os círculos cheios são registros do controle obtidos em $t=0$ (inativação intacta), enquanto os quadrados e círculos vazios mostram as curvas I-V em $t=30$ e $t=15\text{min}$ (correntes de sódio sem inativação), respectivamente. Foi demonstrado anteriormente em outras preparações, incluindo células N1E-115 (Huang et al., 1982; Goni e Hille, 1986), que a ação da BTX está associada com o

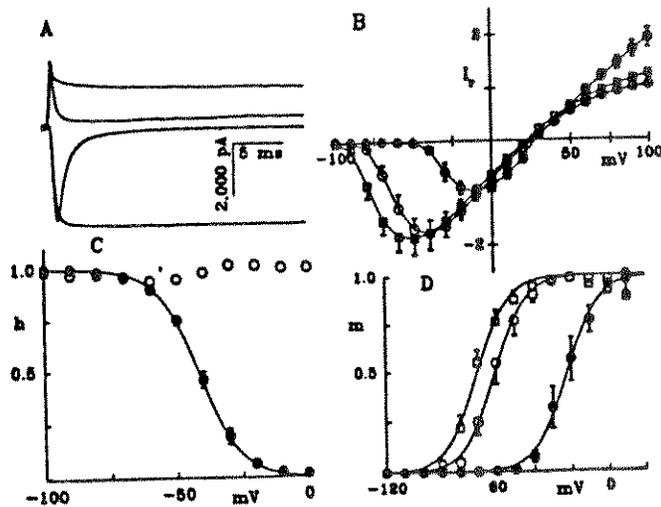


FIGURA 4.16. Remoção da inativação do canal de sódio pela batraquiotoxina (BTX). (A) Registros de correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -20 mV (correntes defletindo para baixo) e +50 mV (correntes defletindo para cima) aplicados a partir de -130 mV. Note que para cada par de registros, um deles foi obtido com a inativação intacta e o outro com a inativação removida na mesma célula. (B) Relações corrente-tensão das correntes que inativam-se normalmente (círculos cheios) e 15 min (círculos vazios) e 30 min (quadrados) após a remoção da inativação dos canais de sódio. Os círculos cheios representam picos de corrente de sódio enquanto os símbolos vazios foram medidos 25 ms após aplicação dos pulsos de -20 mV e +50 mV. (C) Curvas de inativação "h" para os canais de sódio nas condições controle (símbolos cheios; média \pm erro padrão, $n = 4$) e após a remoção da inativação (círculos vazios). A curva "h" foi ajustada aos pontos experimentais com os seguintes parâmetros (ver "Material e Métodos"): $V_{1/2} = -21.9$ mV e $k = 8.48$ mV; (D) Curva de ativação "m" das correntes de sódio nas condições controle (círculos cheios), e 15 min (círculos vazios) e 30 min após a remoção da inativação (quadrados), médio \pm erro padrão ($n = 4$). As curvas "m" foram ajustadas aos pontos experimentais com os seguintes parâmetros: $V_{1/2} = -22.1$ mV (círculos cheios); -60.5 mV (círculos vazios) e -70.0 mV (quadrados); $k = -6.8$ mV (círculos cheios); -8,24 mV (círculos vazios) e -8.41 mV (quadrados).

deslocamento da curva I-V para potenciais mais negativos (Huang et al., 1982; Tanguy e Yeh, 1991). Devido ao fato de que os efeitos dos diacilgliceróis nas correntes de sódio foram avaliados entre $t=15$ e 30min , é importante levar em consideração que durante este intervalo há um deslocamento no controle de -9.5mV na curva de ativação do canal de sódio (veja painel D). As curvas "h" do controle (círculos cheios) e das células tratadas do BTX (círculos vazios) estão apresentadas no painel C da figura 4.16. Estes resultados indicam que a inativação das correntes de sódio em células N1E-115 foi removida pela BTX de modo bastante similar ao que tem sido obtido com estas células em outros trabalhos (Huang et al., 1992).

A figura 4.17 mostra os efeitos de $25\mu\text{M}$ de DOG sobre as correntes de sódio com inativação removida pela BTX. No painel A, as correntes de sódio foram eliciadas por pulsos de "voltage clamp" de -130 para -20mV (correntes negativas) e $+50\text{mV}$ (correntes positivas). Note que DOG não atenuou as correntes de sódio que não se inativam; enquanto que para $+50\text{mV}$ as correntes de sódio em presença de inativação foram atenuadas em $55-60\%$, após a remoção da inativação, as correntes de sódio praticamente não são atenuadas. O painel B mostra a curva I-V completa para este experimento: os círculos foram obtidos em $t=15\text{min}$ (controle, correntes de sódio que não se inativam), e em $t=30\text{min}$ (15 min depois da aplicação de $25\mu\text{M}$ DOG). Para os pulsos de potencial mais positivos que -50mV , as correntes de sódio não foram atenuadas. Resultados semelhantes foram encontrados em mais três células.

O aumento das correntes de sódio que é observado para os pulsos de potencial mais negativos que -50mV pode ser explicado por um desvio normal da curva de ativação que ocorre na ausência de DOG (veja figura 4.16, painel B) e assim, não parece ser um efeito do DOG. De fato, o deslocamento da curva de ativação observado após o tratamento com DOG em correntes de sódio que não se inativam

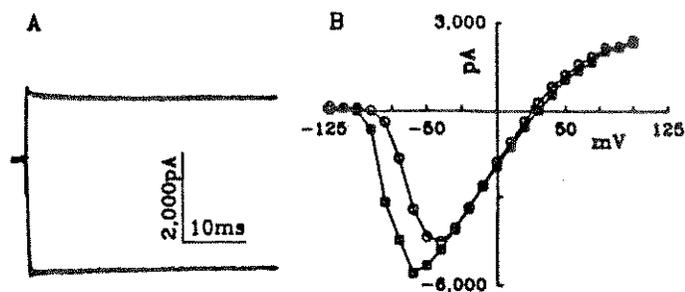


FIGURA 4.17. Efeitos de $25\mu\text{M}$ de DOG em correntes de sódio que não se inativam. (A) Correntes de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp" para -20 mV (traços de corrente defletindo para baixo) e $+50\text{ mV}$ (traços de corrente defletindo para cima) aplicados a partir de -130 mV . Note que as correntes registradas antes e após tratamento com DOG estão superimpostas. (B) Curvas I-V de correntes de sódio que não inativam levantada em $t = 15\text{ min}$ (círculos, controle) e 30 min (15 min após aplicação de DOG, quadrados). Os pontos representam medições feitas 25 ms após a abertura do pulso de -20 mV e $+50\text{ mV}$. Note que o desvio para esquerda na curva I-V não é causado pela aplicação do DOG mas sim uma característica dependente do tempo da ação da BTX nas correntes de sódio (vide Fig. 4.16).

($-11.3 \pm 0.05\text{mV}$, $n=4$) não foi notado em células que não foram tratadas com ativadores da proteína quinase C ($-9.5 \pm 0.03\text{mV}$, $n=4$). Se compararmos as figuras 4.3, painel B e 4.17, painel B, podemos observar uma ampla faixa de potencial onde, sob a ação de diacilglicerol, as correntes de sódio são atenuadas apenas quando a inativação está presente. Uma interpretação alternativa para os resultados apresentados na figura 4.17 é que a BTX de algum modo anula a fosforilação do canal de sódio pela proteína quinase C e/ou por um componente intracelular desconhecido capaz de modular o canal. Não podemos eliminar inteiramente esta possibilidade, e futuramente será importante determinar por meios bioquímicos se o canal modificado pelo BTX ou outra proteína modulatória do canal modificada pelo BTX, poderia ser fosforilado pela proteína quinase C.

4.8.C Registros em canais individuais: Efeito de diacilglicerol sobre canais de sódio individuais

Lawrence et al. (1991) e Aldrich e Stevens (1983) mostraram ser possível estimar a porcentagem de canais que inativam-se diretamente a partir de seu estado de repouso, com base no histograma dos eventos de abertura em amostragens de corrente de canais de sódio individuais. Basicamente, a porcentagem de canais inativando diretamente a partir do estado de repouso é dada por uma equação derivada da aplicação da teoria de cadeias de Markov sobre um esquema cinético idêntico ao adotado para o modelo estocástico neste trabalho. Esta equação assume, no caso de mais de um canal no "patch", que os canais são idênticos e independentes:

$$P_{FI} = \text{fração de traços em branco,}$$

onde P_{FI} é a probabilidade de inativação direta do canal do estado de repouso.

$$P_{FI} = P_{FI1} * P_{FI2} * P_{FI3} * \dots * P_{FI n}$$

onde P_{FI1} , P_{FI2} , P_{FI3} , ..., $P_{FI n}$ são as probabilidades individuais de inativação direta do estado de repouso dos canais 1, 2, 3, ..., n.

Assumindo que os canais sejam idênticos e independentes:

$$P_{FI} = P_{FI1} = P_{FI2} = P_{FI3} = \dots = P_F = P,$$

Assim:

$$P_{FI} = P^n = \text{fração de traços em branco, portanto}$$

$$P = \frac{1}{n} \text{ fração de traços em branco}$$

onde n é o número de canais no "patch"

Como o número de canais dentro do "patch" nos nossos experimentos foi 1 (um), a fração de traços sem aberturas de canal representa a probabilidade de ocorrência de inativação de canais diretamente a partir do estado de repouso. O painel A da figura 4.18 ilustra traços de correntes de um "patch" de membrana com um único canal de sódio. Estes traços foram tomados em resposta a pulsos de despolarização de -100mV para -20mV nas condições controle e após 6 min da aplicação do 25 μ M de DOG. A condutância do canal é calculada a partir da expressão:

$$G_{Na} = I_p / (V_c - V_e),$$

onde I_p é o valor médio da corrente quando o canal está aberto e V_c e V_e são os potenciais de "clamp" e de equilíbrio para o íon sódio, respectivamente.

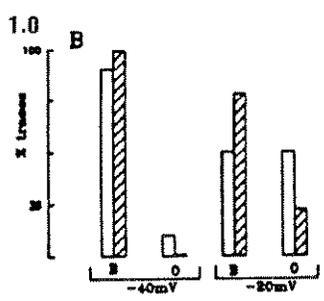
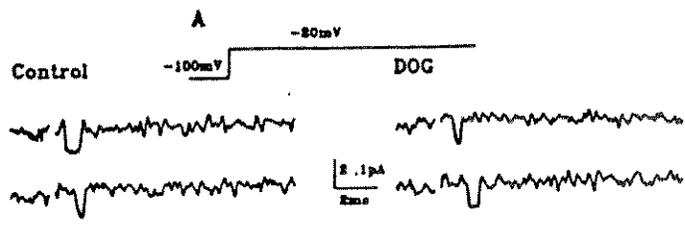


FIGURA 4.18. No painel A ilustra-se registros típicos da corrente de sódio registrados de um canal unitário ("single channel") em resposta a pulsos de despolarização de -100 mV para -20 mV. A técnica utilizada foi a de "cell-attached patch clamp. No painel B ilustra-se o histograma (em -40 e -20 mV) da fração de traços que apresentaram (ou não) aberturas de canal de sódio durante a aplicação de 100 pulsos de 10ms (protocolo ilustrado no painel A para -20mV). As letras "B" e "O" no histograma representam traços brancos e traços com abertura de canal, respectivamente. As barras brancas representam as frações obtidas após 15 minutos de estabilização da célula na configuração de "cell-attached patch clamp" (controle) e as barras hachuradas representam as frações após 6 minutos da aplicação de 25 μ M de DOG.

Neste experimento, a condutância foi estimada em aproximadamente 15pS em ambas as condições (controle e tratado). O painel B da figura 4.18 ilustra o histograma da fração dos traços onde não ocorrem aberturas do canal (B) e da fração de traços onde ocorreram abertura do canal (O) em dois potenciais de membrana (-40mV e -20mV). Em cada experimento, 100 traços foram obtidos na situação "controle" e 100 traços após a aplicação de 25 μ M de DOG por 6 minutos. Em -40mV, fração de traços no qual não ocorreu abertura do canal aumentou de 0.9 na condição controle para 0.99 após a aplicação do DOG. Em -20mV, a fração de traços no qual não ocorreu abertura do canal aumentou de 0.50 na condição controle para 0.77 após a aplicação do DOG. A fração de traços nos quais ocorrem abertura do canal é complementar à fração mencionada acima em cada caso. Resultado semelhante foi encontrado em outro experimento (ver tabela III). Não observamos efeito do tempo nas correntes durante o período estudado (tabela III).

O resultado experimental obtido na figura 4.18 é compatível com a hipótese de que a atenuação da corrente de sódio causada pelo DOG é devida a um aumento no número de canais que se inativam diretamente do estado fechado (repouso).

TABELA III- Efeito da aplicação de 75 μ M de DOG sobre a abertura de canais de sódio unitários.

EFEITO DO DOG (Fração de traços em branco)			
		CONTROLE	DOG
CÉLULA 1	40mV	0.90	0.99
	20mV	0.50	0.77
CÉLULA 2	40mV	0.93	0.98
	20mV	0.52	0.82

EFEITO DO TEMPO (Fração de traços em branco)			
		CONTROLE (T = 0 min)	CONTROLE (T = 10 min)
CÉLULA 3	40mV	0.89	0.91
	20mV	0.77	0.58

5. DISCUSSÃO

A fosforilação do canal de sódio por proteína quinases representa um importante mecanismo fisiológico pelo qual a excitabilidade celular pode ser modulada (Kaczmarek, 1988). A proteína quinase C é capaz de fosforilar o canal de sódio *in vitro* (Costa e Catterall, 1984). Esta enzima pode ser ativada por diferentes compostos químicos (Azzi et al, 1992). Na célula intacta, a fosforilação do canal de sódio pela ativação da proteína quinase C é um mecanismo celular que envolve a elevação do nível intracelular de diacilglicerol, como consequência da estimulação de receptores α adrenérgicos ou colinérgicos por mediadores químicos (adrenalina, noradrenalina ou acetilcolina) do sistema nervoso central. O diacilglicerol atua como segundo mensageiro para ativação da proteína quinase C, ou seja, como um ativador desta quinase (Azzi et al, 1992). Os ácidos graxos insaturados-cis e os ésteres de forbol também ativam a proteína quinase C. Embora sejam compostos endógenos, os ácidos graxos insaturados-cis não parecem participar da via de ativação da proteína quinase C envolvendo o diacilglicerol. Uma outra classe de ativadores da proteína quinase C, os ésteres de forbol, são compostos artificiais (produzidos sinteticamente). Neste trabalho, estudamos o efeito da aplicação desses ativadores da proteína quinase C (diacilgliceróis, ácidos graxos insaturados-cis e ésteres de forbol) sobre a função do canal de sódio. Para isso, utilizamos diferentes técnicas de "patch clamp" ("perforated patch clamp" e "cell-attached patch clamp") para registro de correntes de sódio em células de neuroblastoma de camundongo (N1E-115).

A técnica de "perforated patch clamp" permitiu registros de correntes macroscópicas de sódio em uma condição bastante próxima a fisiológica. Isto deve-se ao fato de que o acesso elétrico ao interior da célula foi obtido através de poros abertos

pela nistatina no "patch" de membrana. Estes poros permitem apenas a passagem de íons monovalentes (Horn e Marty, 1988), o que permite manter o meio intracelular razoavelmente intacto.

A técnica de "cell-attached patch clamp" permitiu registros de corrente de sódio em canais unitários. Devido ao fato de que, com esta técnica, o "patch" de membrana na pipeta não é perfurado ou rompido, o meio intracelular foi também mantido intacto. Cuidados especiais com a composição das soluções de banho (alta concentração de potássio) e de pipeta (alta concentração de sódio) foram tomados para obtermos um controle apropriado do potencial através do patch de membrana na ponta do eletrodo e uma boa relação sinal/ruído nos registros da corrente de sódio. A alta concentração de potássio no banho foi calculada de modo que, inicialmente, o potencial de toda a membrana ficasse anulado (≈ 0 mV). Desta forma, quando a ponta do eletrodo tocasse a superfície da célula e se formasse o giga-selo, o potencial do "patch" de membrana dentro da pipeta poderia ser considerado praticamente igual ao potencial da pipeta. A alta concentração de sódio na pipeta permitiu que a amplitude da corrente de sódio fosse detectável pelo sistema de medição utilizado.

A conclusão mais importante referente aos estudos efetuados para a caracterização dos efeitos da ativação da proteína quinase C sobre os canais de sódio foi a de que diferentes ativadores da proteína quinase C podem modular o canal de sódio de maneiras diferentes numa mesma linhagem de célula. Os diacilgliceróis e os ácidos graxos insaturados-cis (exceto o ácido oleico) atenuaram as correntes de sódio, enquanto o ácido oleico aumentou as correntes de sódio. A atenuação das correntes de sódio provocada pelos diacilgliceróis ou pelo ácido graxo insaturado-cis foi acompanhada por um desvio significativo da curva de inativação (curva "h") para potenciais mais negativos, enquanto que a curva de ativação e as constantes de tempo

de ativação e decaimento (curva "m", τ_{on} e τ_{h} , respectivamente) permaneceram essencialmente sem modificações. Surpreendentemente, os ésteres de forbol, conhecidos como os mais potentes ativadores da proteína quinase C, não afetaram as correntes de sódio.

Para redução da corrente de sódio pela ativação da proteína quinase C observou-se que apenas um único resíduo de aminoácido necessita ser fosforilado: serina entre os domínios III e IV da proteína do canal de sódio de cérebro de rato (West et al, 1991). Uma lentificação na inativação do canal de sódio (desvio na curva de inativação para potenciais mais positivos) foi observada por West et al (1991) e Numann et al (1991). O desvio na curva de inativação descrito por estes autores foi, portanto, na direção oposta ao desvio observado em nosso caso. No momento não podemos explicar as causas desta diferença, pois experimentos adicionais seriam necessários para verificar se, no nosso caso, a ativação da proteína quinase C está realmente envolvendo a fosforilação do mesmo resíduo serina entre os domínios III e IV da proteína do canal. Contudo, os resultados dos experimentos, nos quais o processo de inativação foi avaliado (fig. 4.15, capítulo "Resultados"), mostram uma clara aceleração na inativação do canal de sódio após a aplicação de diacilglicerol. Esta aceleração é consistente com o desvio para esquerda da curva de inativação observada em nossos experimentos.

Redução da corrente de sódio, sem alteração da curva de inativação da corrente, por ácidos graxos insaturados-cis (incluindo o ácido oleico) tem sido observada quando estes ácidos são aplicados no lado extracelular (Wieland et al, 1992; Linden e Routtenberg, 1989). No nosso caso, embora também tivéssemos aplicado os ácidos graxos do lado extracelular, observamos que a redução na corrente de sódio causada pelos ácidos graxos insaturados-cis (menos o ácido oleico) foi acompanhada

pelo desvio para esquerda na curva de inativação do canal de sódio. Este desvio causado pela adição de ácidos graxos insaturados-cis também foi observado com diacilgliceróis, sugerindo um possível mecanismo comum para modulação do canal de sódio por estes dois tipos de ativadores da proteína quinase C. Contudo, não podemos perder de vista que a inibição da corrente de sódio causada pelos diacilgliceróis teve características diferentes daquela causada pelos ácidos graxos insaturados-cis. A inibição causada pelos diacilgliceróis foi monotonicamente dependente do potencial de membrana, sendo mais intensa nos potenciais mais positivos, enquanto que os ácidos graxos insaturados-cis atenuaram preferencialmente as correntes de sódio que entram na célula.

No presente trabalho, o aumento das correntes de sódio provocado pelo ácido oleico não foi acompanhado por outras alterações nas correntes. O aumento da corrente de sódio pela aplicação de ácido oleico já foi previamente observado em célula muscular esquelética humana (Weiland et al, 1992). Contudo, de maneira oposta ao nosso caso, neste trabalho o ácido oleico não afetou as correntes de sódio quando aplicado do lado extracelular e aumentou as correntes de sódio somente quando aplicado do lado intracelular. Não há uma justificativa esclarecedora para os efeitos observados para o ácido oleico. Considerando-se que o ácido oleico pode ativar predominantemente as isoformas da proteína quinase C que são independentes do íon cálcio (Khan et al, 1993), parece razoável supor que os efeitos observados para o ácido oleico poderiam ser menos dependentes do cálcio intracelular do que aqueles causados por outros ativadores da proteína quinase C. Esta suposição não explica como o ácido oleico pode estar afetando o canal de sódio. Porém, esta suposição está de acordo com a idéia de que a ativação da proteína quinase C por diferentes agonistas pode envolver outros fatores intracelulares que irão afetar o efeito final do agonista. Neste caso

específico, os mecanismo celular envolvendo o ácido oleico poderia ser, supostamente, diferenciado pelo seu grau de dependência ao cálcio.

Os efeitos dos diversos ativadores da proteína quinase C estudados neste trabalho puderam ser totalmente bloqueados pelo pré-tratamento das células (10 a 15 min) com inibidores da proteína quinase C. Os inibidores da proteína quinase C não modificaram as correntes de sódio quando aplicados sozinhos, ou seja, os inibidores *per se* não alteraram a corrente de sódio. Adicionalmente, os ácidos graxos saturados e os insaturados-trans (que não ativam a proteína quinase C) não afetaram as correntes de sódio, o que representa uma evidência de que os efeitos observados para os ácidos graxos insaturados-cis parecem ser devidos à ativação da proteína quinase C.

As alterações causadas pelos ativadores da proteína quinase C nas correntes de sódio foram irreversíveis dentro do período de duração dos experimentos. A natureza hidrofóbica dos ativadores da proteína quinase C poderia explicar esta irreversibilidade. Estes compostos poderiam provavelmente ligar-se a outras estruturas intracelulares, dificultando sua difusão para fora da célula e conseqüente interrupção da ativação da proteína quinase C. Em conjunto, estes resultados sugerem que as alterações nas correntes de sódio causadas pelos diacilgliceróis e ácidos graxos insaturados-cis sejam realmente mediadas pela fosforilação do canal de sódio induzida pela ativação da proteína quinase C.

A ativação da proteína quinase C tem sido associada à atenuação das correntes de sódio em diferentes linhagens de células (Catterall, 1992; Sigel e Bauer, 1988; Wieland et al, 1992). De particular interesse para os nossos resultados com diferentes ativadores é o trabalho desenvolvido por Linden e Routtenberg (1989), que investigaram os efeitos de diferentes ativadores da proteína quinase C sobre as correntes

de sódio na mesma linhagem de célula usada no presente trabalho. Contudo, diferenças significativas foram encontradas entre os resultados experimentais destes autores e os apresentados neste trabalho: (1) Linden e Routtenberg não observaram efeitos de OAG (um diacilglicerol) sobre as correntes de sódio; (2) ácidos graxos insaturados-cis (incluindo o ácido oleico) atenuaram as correntes de sódio sem afetar a curva de inativação; (3) os efeitos dos ativadores da proteína quinase C foram reversíveis dentro de poucos minutos; (4) o ácido oleico reduziu, e não aumentou, a amplitude da corrente de sódio. Deste modo, a única observação descrita por Linden e Routtenberg (1989) similar às apresentadas neste trabalho foi a ausência de efeitos dos ésteres de forbol sobre as correntes de sódio em células de neuroblastoma de camundongo (N1E-115), assim como descrito no presente trabalho.

Os efeitos dos ativadores da proteína quinase C sobre as correntes de sódio descritos por Linden e Routtenberg (1989) também foram abolidos por diferentes inibidores da proteína quinase C. No entanto, procurando uma razão para as discrepâncias observadas, notamos a existência de uma diferença metodológica entre os experimentos efetuados neste trabalho e o do outro grupo. Enquanto eles utilizaram a técnica convencional de "whole-cell patch clamp" para registro das correntes, neste trabalho utilizou-se a técnica de "perforated patch clamp". Estas técnicas causam diferentes graus de perturbação na composição do meio intracelular. Por exemplo, com "whole-cell patch clamp", a composição do citoplasma é drasticamente alterada, e compostos solúveis nele presentes (como por exemplo: mensageiros intracelulares e uma variedade de enzimas, incluindo a forma inativa da proteína quinase C) difundem-se para o interior da micropipeta. Neste caso, mecanismos dependentes destes compostos podem ser profundamente alterados. À primeira vista, as diferenças observadas entre os resultados experimentais deste trabalho e os previamente apresentados por Linden e Routtenberg (1989) poderia ser o uso de diferentes técnicas

de "patch clamp". Se esta idéia for correta, a modulação das correntes de sódio por diferentes ativadores da proteína quinase C pode ser um fenômeno altamente complexo em condições fisiológicas normais.

Explicações razoáveis para todas ou algumas destas observações não poderiam ser propostas sem que fosse feito um estudo mais aprofundado dos efeitos da ativação da proteína quinase C sobre os canais de sódio. Duas hipóteses não exclusivas mutuamente poderiam explicar a diversidade dos resultados experimentais obtidos neste estudo. Uma delas está relacionada à existência de diferentes isoformas da proteína quinase C (Asaoka et al, 1992; Azzi et al, 1992) e à presença de vários sítios de fosforilação no canal de sódio (Murphy e Catterall, 1992). É possível que diferentes ativadores da proteína quinase C mobilizem diferentes grupos de isoformas da proteína quinase C (Khan et al, 1992). Uma vez mobilizadas, estas isoformas poderiam fosforilar os canais de sódio com diferentes padrões, resultando em diferentes modulações da função do canal de sódio. Neste sentido, vale a pena mencionar que a isoforma "ζ" da proteína quinase C não possui o domínio de ligação para os ésteres de forbol (Kochs, et al., 1993; Asaoka et al., 1992). Como os ésteres de forbol não modificaram as correntes de sódio nas células de neuroblastoma de camundongo (N1E-115), é possível que a proteína quinase C "ζ" seja uma das isoformas que afeta a função do canal de sódio neste tipo celular. Outra possibilidade que deve ser considerada é que um componente intracelular desconhecido possa, após ter sido fosforilado pela proteína quinase C, interagir e modular os canais de sódio. Alternativamente, as duas hipóteses podem ser combinadas, ou seja, diferentes isoformas da proteína quinase C poderiam afetar o canal de sódio direta ou indiretamente por fosforilação de diferentes substratos. Esta parece ser uma possibilidade interessante devido ao fato de que os efeitos da ativação da proteína quinase C parecem depender da preservação do meio intracelular.

Tem-se sugerido que os ácidos graxos podem modular alguns canais iônicos por interação direta com os canais (Ordway et al., 1991). Conseqüentemente, alguns dos efeitos observados neste estudo poderiam potencialmente decorrer destas interações diretas com os canais de sódio. Algumas evidências para isto foram publicadas (Takenaka et al, 1987; Wieland et al, 1992). No entanto, devido ao fato de que os inibidores da proteína quinase C anularam os efeitos dos ácidos graxos insaturados-cis sobre os canais de sódio, é razoável supor que a ativação pela proteína quinase C esteja envolvida na produção destes efeitos. Os múltiplos efeitos de diferentes ativadores da proteína quinase C sobre as correntes de sódio sugerem que cuidados especiais devam ser tomados na tentativa de inferir sobre as conseqüências fisiológicas da ativação da proteína quinase C em uma dada função celular.

A despeito de todas as informações sobre os efeitos da ativação da proteína quinase C sobre as correntes de sódio, as bases biofísicas para estes efeitos permanecem desconhecidas. No sentido de estudar possíveis mecanismos que pudessem explicar os resultados observados, adotamos um modelo estocástico do canal de sódio no qual fosse possível simular alterações na correntes de sódio a partir de alterações no estado funcional do canal. Dada a natureza múltipla dos efeitos observados para os vários ativadores da proteína quinase C, optamos por estudar com mais profundidade os efeitos de uma classe de ativadores fisiológicos da proteína quinase C, os diacilgliceróis. A análise comparativa das correntes de sódio sob efeito dos diacilgliceróis com as correntes simuladas pelo modelo do canal de sódio sugeriu um mecanismo biofísico simples pelo qual a ativação da proteína quinase C induzida pelos diacilgliceróis poderia afetar estes canais. Este mecanismo envolve o aumento na taxa de transição dos canais de sódio de seu estado fechado (repouso) diretamente para seu estado inativado. As predições das alterações na corrente de sódio sugerida pelo modelo (aceleração do processo de inativação e aumento do número de canais inativando-se

diretamente de seu estado fechado) foram confirmadas com sucesso nos experimentos nos quais o processo de inativação foi avaliado especificamente. A aplicação dos diacilgliceróis, como previsto pelo modelo, resultou na aceleração da inativação dos canais de sódio e no aumento no número de canais que foram inativados diretamente a partir de seu estado de repouso. Uma aceleração da inativação causada por diacilgliceróis mais pronunciada nos potenciais de membrana mais positivos poderia explicar o desvio para esquerda observado na curva de inativação das correntes de sódio (o aumento no grau de inativação causado pelo diacilglicerol em um potencial mais positivo é maior que o aumento no grau de inativação num potencial mais negativo).

A probabilidade dos canais de sódio se inativarem diretamente do estado de repouso pode ser calculada a partir da fração de traços sem abertura de canal de sódio em resposta a pulsos de "voltage clamp". Este cálculo tem sido utilizado em trabalhos, nos quais a inativação a partir do estado de repouso ou do estado aberto são estudadas separadamente (Aldrich e Stevens, 1983; Lawrence et al, 1991). Sabe-se que para estes cálculos, os autores assumem premissas experimentais que nem sempre são verdadeiras em um sistema real. Sendo assim, grande parte do trabalho experimental destes autores é feita para minimizar este problema. Contudo, no nosso caso, conseguimos obter registros de um único canal de sódio e, desta forma, eliminamos problemas intrínsecos ao cálculo, tais como a estimativa do número de canais no "patch" ou limitações experimentais para aplicar o modelo no potencial estudado.

No presente trabalho, a fração de canais inativando-se diretamente a partir de seu estado de repouso foi obtida a partir de registros de canais de sódio unitários. O comportamento do canal de sódio unitário obtido nestes experimentos é consistente com o comportamento de canais de sódio descritos na literatura (Quandt, 1987; Nilius et al., 1989). Adicionalmente, a condutância de 15 pS estimada para estes

canais indica que os registros obtidos tratam-se realmente de canais de sódio (Armstrong, 1992; Catterall, 1992). A aplicação do diacilglicerol DOG não afetou a condutância do canal, porém aumentou a fração de traços em branco, o que, segundo o modelo, significa um aumento na probabilidade do canal inativar-se diretamente a partir de seu estado de repouso. Isto confirmou a proposta de que a redução observada nas correntes macroscópicas devido à aplicação de diacilgliceróis deveria envolver alterações na inativação do canal de sódio. Adicionalmente, poderíamos questionar se a premissa de que os canais de sódio são inativados diretamente de seu estado de repouso é compatível com o que se observa nas correntes macroscópicas de sódio. Tomando-se como base as correntes macroscópicas de sódio em condições controle, tem-se que a probabilidade de inativação do canal de sódio é de aproximadamente 95% no potencial de membrana de -20 mV (figura 1, Godoy e Cukierman, 1994). Neste caso, a inativação estimada apresentaria um componente devido à inativação de canais abertos durante o pré-pulso de "voltage clamp", e um componente devido à inativação de canais diretamente a partir do estado de repouso. Em experimentos com registro de canais individuais, observamos uma fração de 0,5 correspondente aos traços em branco durante a aplicação do mesmo potencial de "voltage clamp" (-20mV, vide Fig. 4.18). Isto indica que pelo menos 50% da inativação estimada com correntes macroscópicas neste potencial parece ser devido à inativação do canal de sódio diretamente do estado fechado, em condições controles, sugerindo que este componente possa participar significativamente no processo de inativação. Por outro lado, após tratamento com diacilglicerol, a participação deste componente no mesmo potencial parece chegar a 80% (veja Fig. 4.18) da inativação das correntes macroscópicas, que é máxima neste potencial (Fig. 4.5)

O modelo também prediz que, dada à correlação do mecanismo de inativação dos canais de sódio com os efeitos observados, a remoção da inativação

anularia os efeitos dos diacilgliceróis. Este fato também foi evidenciado nos experimentos onde a inativação foi removida antes da aplicação dos diacilgliceróis. Neste sentido, vale à pena mencionar alguns aspectos do processo de remoção da inativação. Neste trabalho, utilizamos perfusão extracelular de batraquiotoxina (BTX) para remoção da inativação. Outros agentes que removem inativação já foram previamente descritos (veja Cukierman, 1991). Contudo, neste trabalho, observamos que o tratamento com baixas concentrações ($\approx 0.01\text{mM}$) de cloramina-T ou N-bromoacetamida, ou N-bromosuccinimida não removeu a inativação. Concentrações maiores ($\approx 2\text{mM}$) destas substâncias romperam o giga-selo e foram danosas para as células, como previamente observado em outras preparações (veja Rack et al., 1986). Outra categoria de compostos químicos que removem inativação, enzimas proteolíticas tais como pronase, tripsina, papaína etc, não foram testadas por duas razões. Primeiramente, estas enzimas são efetivas somente do lado de intracelular dos canais, e elas não teriam acesso às células através de pequenos poros feitos pela nistatina. Em segundo, estas enzimas são altamente inespecíficas e poderiam interromper, em princípio, o complexo metabolismo da(s) via(s) envolvida(s) na atenuação da corrente de sódio induzida pela proteína quinase C pelos diacilgliceróis. Portanto, e até este ponto, alcalóide BTX foi o único composto que efetivamente removeu a inativação. A remoção da inativação com a BTX permitiu-nos mostrar que, na ausência de inativação, a ativação da proteína quinase C (via OAG ou DOG) não causou alterações nas correntes de sódio.

Concluindo, com a utilização do modelo estocástico adotado, nossos resultados experimentais permitem-nos sugerir que a atenuação das correntes de sódio induzida por diacilgliceróis envolve a inativação das correntes de sódio, e que a principal causa para este efeito é um aumento do número de canais de sódio que sofrem transição direta do estado fechado para o estado inativado ($F \rightarrow I$). Ainda que esta

transição tenha sido recentemente determinada em canais de sódio (Bean 1981; Aldrich e Stevens, 1983; Vandenberg e Horn, 1984), sua função fisiológica ainda é obscura. Deste modo, parece plausível que um aumento no número de canais que são inativados diretamente do estado fechado em consequência da ativação da proteína quinase C possa representar um modo simples e efetivo para "desativar" canais de sódio e, conseqüentemente diminuir a capacidade celular de geração e/ou propagação dos potenciais de ação.

Uma continuidade natural e interessante deste estudo seria a verificação do quão geral é este mecanismo de inativação direta do estado de repouso, pelo qual os diacilgliceróis afetam os canais de sódio, em relação aos outros ativadores da proteína quinase C. A comparação das correntes simuladas pelo modelo com as correntes afetadas pelos outros ativadores da proteína quinase C pode sugerir outro(s) mecanismo(s) de modulação do canal de sódio. O procedimento experimental que certamente deverá ser usado para a confirmação das previsões fornecidas pelo modelo deverá envolver novamente experimentos com técnicas de "patch clamp". Adicionalmente, considerando que os canais de sódio apresentam características homólogas em vários tipos celulares, parece interessante testar as predições do modelo em outro tipo celular no qual as isoformas da proteína quinase C potencialmente envolvidas na fosforilação destes canais possam ser diferentes.

A importância da modulação do canal de sódio pode ser significativa na modulação da função das células nervosas. Modificações da função dos canais de sódio nos neurônios afetam a atividade elétrica de um modo dependente da localização do canal no neurônio. Por exemplo, a modulação dos canais de sódio do corpo celular do neurônio ou do início dos segmentos axônicos pode determinar o limiar para a geração do potencial de ação e, desta forma, influenciar a frequência de disparo dos potenciais

de ação neurais enquanto que, em terminais nervosos, a modulação do canal de sódio pode influenciar a quantidade de neurotransmissor liberada da terminação nervosa pré-sináptica (Catterall, 1992). Deste modo, a redução das correntes de sódio pelos diacilgliceróis poderia, por exemplo, desempenhar um papel na abreviação da resposta excitatória pós-sináptica à estimulação trans-sináptica por neurônios adrenérgicos e/ou colinérgicos suprindo um mecanismo relativamente rápido de realimentação negativa confinado à própria célula, sem envolver circuitos paralelos de inervação inibitória.

O entendimento de como os canais de sódio podem ser modulados poderia contribuir para o conhecimento do complexo controle da excitabilidade celular em tecidos neurais. Assim, embora tenhamos estudado e sugerido um mecanismo biofísico específico de modulação do canal de sódio (ativação da proteína quinase C pelos diacilgliceróis), nossos resultados são sugestivos de que esta via bioquímica pode, em última análise, participar efetivamente da modulação da excitabilidade neuronal.

6. CONCLUSÕES

1. Os efeitos de atenuação da corrente de sódio e desvio na curva de inativação causados pela ativação da proteína quinase C por diacilglicerol estão relacionados com o processo de inativação do canal de sódio e,

2. O principal mecanismo biofísico para estes efeitos consiste de uma aceleração na via de inativação que ocorre diretamente a partir do estado fechado.

7. BIBLIOGRAFIA

Aldrich, R. W.; Corey, D. P. e Stevens, C. F. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. Nature, 306:436-441, 1983.

Almers, N. e Levinson, S. R. Tetrodotoxin binding to normal and depolarized frog muscle and the conduction of a single sodium channel. J. of Physiol., Lond., 247:483-509, 1975.

Armstrong, C. M. Voltage-dependent ion channels and their gating. Physiol. Rev., 72 (suppl): S5-S13, 1992

Armstrong, C. M. e Bezanilla, F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. J. Gen. Physiol. 70:567-590, 1977.

Armstrong C. M. e Cota, G. Modification of sodium channel gating by lanthanum. J. Gen. Physiol. 96: 1129-1140, 1990.

Asaoka, Y; Nakamura, S.; Yoshida, k. e Nishizuka, Y. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. TIBS 17:414-417, 1992.

Azzi, A.; Boscoboinik, D. e Hensey, C. The protein kinase C family. Eur. J. Biochem. 208:547-557, 1992.

Bean, B. P. Sodium channel inactivation in crayfish giant axon. Must channels open before inactivating?. Biophys. J. 35:595-614, 1981.

Benz, I.; Herzig, J. W. e Kohlhardt, M. Opposite effects of angiotensin II and the protein kinase C activator OAG on cardiac sodium channels. J. Membr. Biol. 130:183-190, 1992.

Bezanilla, F. e Armstrong, C. M. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. J. Gen. Physiol. 70:549-566, 1977.

Catterall, W. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. Physiol. Rev. 72 (suppl): S15-S48, 1992

Cohen, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. TIBS 17:408-413, 1992.

Costa, M. R. e Catterall, W. A. Phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel by protein kinase C. Cell. Mol. Neurobiol. 4:291-297, 1984

Costa, M. R. e Catterall, W. A. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel in synaptic nerve ending particles. J. Biol. Chem. 259:8210-8218, 1984.

Cota, G. e Armstrong, C. M.. Sodium channel gating in clonal pituitary cells. J. Gen. Physiol. 94:213-232, 1989.

Cukierman, S. Inactivation modifiers of sodium currents and the gating of rat brain sodium channel in planar lipid membranes. Pflügers Arch. 419:514-521, 1991.

Dascal, N. e Lotan, I. Activation of protein kinase C alters voltage dependence of sodium channel. Neuron **6**:165-175, 1991.

Godoy, C. M. G. e Cukierman, S. Multiple effects of protein kinase C activators on sodium channel in mouse neuroblastoma cells. J. Membr. Biol. **140**:101-110, 1994.

Gonoi, T. e Hille, B. Gating of sodium channels: inactivation modifiers discriminate among models. J. Gen. Physiol. **89**:253-274, 1987.

Greenblatt, R. E.; Blatt, E. Y. e Montal, M. The structure of the voltage-sensitive sodium channel. Inference derived from computer-aided analysis of the *Electrophorus electricus* channel primary structure. FEBS Lett. **193**:125-134, 1985.

Guy, H.R. e Seetharamulu, P. Molecular model of the action potential sodium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA): **83**:508-512, 1986.

Hanck, D. A. E Sheets, M. F. Time-dependent changes in kinetics of sodium currents in single canine cardiac Purkinje cells. Am. J. Physiol. **262** (Heart Circulation Physiol. **31**):H1197-H1207, 1992.

Hille, B. The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. J. Gen. Physiol. **58**:599-619, 1971.

Hille, B. The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve. J. Gen. Physiol. **59**:637-658, 1972.

Hille, B. Ionic Channels of Excitable Membrane. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. 1992

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. e Katz, B. Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. J. Physiol., Lond., 116:424-448, 1952.

Hodgkin, A. L. e Huxley, A. F.. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. J. Physiol., Lond., 116:449-472, 1952.

Horn, R. e Marty, A. Muscarinic activation of ionic currents by a new whole-cell recording method. J. Gen. Physiol. 92:145-159, 1988.

Howe, J. R. e Ritchie, J. M. Multiple kinetic component of sodium channel inactivation in rabbit schwann cells. J. Physiol., Lond., 445:529-566, 1992.

Huang, L. Y. M.; Moran, N. e Ehrenstein, G. Gating kinetics of batrachotoxin modified sodium channels in neuroblastoma cells determined from single channel measurements. Biophys. J. 45:313-321, 1984.

Kallen, R. G.; Sheng, Z. H.; Yang, J.; Chen, L. Q.; Rogart, R. B. e Barchi, R. L. Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. Neuron 4:233-242, 1990.

Khan, W. A.; Blobe, G. C. e Hannun, Y. A. Activation of protein kinase C by oleic acid. J. Biol. Chem. 267:3605-3612, 1992.

Kochs, G.; Hummel, R.; Meyer, D.; Hug, H.; Marmé, D. e Sarre, T. F. Activation and substrate specificity of the human protein kinase C alpha and psi isoenzymes. Eur. J. Biochem. 216:597-606, 1993.

Khodorov, B. I. e Revenko, S. V. Further analysis of the mechanism of action of batrachotoxin on the membrane of the myelinated nerve. Neurosciences. 4:1315-1330, 1979.

Lawrence, J. H.; Yue, D. T.; Rose, W. C. e Marban, E. Sodium channel inactivation from resting states in guinea-pig ventricular myocytes. J. Physiol., Lond. 433:629-650, 1991.

Levinson, S. R. e Ellory, J. C. Molecular size of the tetrodotoxin binding site estimated by irradiation inactivation. Nature New Biol. 245:122-123, 1973

Li, M.; West, J. W.; Numann, R.; Murphy, B. J.; Scheuer, T. L. e Catterall, W. A. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. Science 261:1439-1442, 1993.

Li, M.; West, J. M.; Lai, Y.; Scheuer, T. e Catterall, W. A. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. Neuron 8:1151-1159, 1992.

Linden, D.J. e Routtenberg, A. Cis-fatty acids, which activate protein kinase C, attenuate sodium and calcium currents in mouse neuroblastoma cells J. Physiol., Lond., 419:95-119, 1989

Moorman, J. R.; Kirsch, G. E. e Brown, A. M. Angiotensin II and phorbol ester modulate cardiac sodium channels in neonatal rat. Biophys. J. 55:229

Murphy, B. J. e Catterall, W. A. Phosphorylation of purified rat brain sodium channel reconstituted into phospholipid vesicles by protein kinase C. J. Biol. Chem. 267:16129-16134, 1992.

Neher, E. e Sakmann, B. Single channels currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260:799-802, 1976.

Neher, E.; Sakmann, B. e Steinbach, J. H.. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. Pflügers Arch. 375:219-228, 1978.

Neher, E. e Sakmann, B. The patch clamp technique. Scientific American 44-51, March 1992.

Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258:607-614, 1992.

Nilius, B.; Tytgat, J. e Albitz, R. Modulation of cardiac sodium channels by angiotensin II. Bioch. Biophys. Acta 1014: 259-262, 1989

Noda, M.; T.; Suzuki, Numa, S. e Stuhmer, W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on sodium channels II. FEBS Let. 259:213-216, 1989.

Noda, M.; Ikeda, T.H.; Kayano, T.; Suzuki, H; Takeshima, H.; Kurasaki, M.; Takahashi, H. e Numa, S. Existence of distinct (sodium channel) messenger RNAs in rat brain. Nature 320:188-192, 1986.

Noda, M.; Tanabe, M. T.; Takai, T.; Kayano, T.; Ikeda, T.; Takahashi, H; Nakayama, H.; Kanaoka, Y.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H.; Raftery, M. A.; Hirose, T.; Inayama, S.; Hayashida, H.; Mayata, T. e Numa, S. Primary Structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature 312:121-127, 1984

Numann, R. W.; Catterall, W. A. e Scheuer, T. Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. Science, (Wash. DC): 254:115-118, 1991.

Ordway, R. W.; Singer, J. J. e Walsh, J. V. Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. Trends Neurol. Sci. 14:96-100, 1991.

Patlak, J. Molecular kinetics of voltage-dependent sodium channels. Physiol. Rev. 71:1047-1080, 1991

Quandt, F. N. Burst kinetics of sodium channels which lack fast inactivation in mouse neuroblastoma cells. J. Physiol., Lond., 392:563-585, 1987.

Rack, M.; Rubly, N. e Waschow, C. Effects of some chemical reagents on sodium current inactivation in myelinated nerve fibers of the frog. Biophys. J. 50:557-564, 1986.

Rogart, R. B.; Cribbs, L. L.; Muglia, L. K.; Kephart, D. D. e Kaiser, M. W. Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart sodium channel isoform. Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 86:8170-8174, 1989.

Rojas, E. e Rudy, B. Destruction of sodium channel conductance inactivation by a specific protease in perfused nerve fibres from *Loligo*. J. Physiol., (London): 262:501-531, 1976.

Rossie, S. e Catterall, W. A. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels in primary cultures of rat brain neurons J. Biol. Chem. 262:12735-12744, 1987.

Ruben, P. C.; Starkus, J. G. e Rayner, M. D. Steady-state availability of sodium channels. Biophys. J. 61:941-955, 1992.

Schreibmayer, W.; Dascal, N.; Lotan, I.; Wallner, M. e Weigl, L. Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel alpha-subunit expressed in *Xenopus oocytes*. FEBS Let. 291:2:341-344, 1991.

Sigel, E. e Bauer, R. Activation of protein kinase C differentially modulated neuronal sodium, calcium, and gamma-aminobutyrate type A channels. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:6192-6196, 1988.

Sills, M. N.; Xu, Y. C.; Baracchine, E.; Goodman, R. H.; Cooperman, S. S.; Mandel, G. e Chien, K. R. Expression of diverse sodium channel messenger RNAs in rat myocardium. Evidence for a cardiac-specific sodium channel. J. Clin. Invest. 84:331-336, 1989.

Stryer, L. Biochemistry. Third Edition, W. H. Freeman (Ed.), New York, 1988.

Takenaka, T.; Hori, H. e Hori, H. Effects of fatty acids on membrane currents in the squid axon. J. Membr. Biol. 95:113-120, 1987.

Tanguy, J. e Yeh, J. Z. BTX Modification of sodium channels in squid axons. I. State dependence of BTX action. J. Gen. Physiol. 97:499-520, 1991.

Trimmer, J. S. e Agnew, W. S. Molecular diversity of voltage-sensitive sodium channels. Annu. Rev. Physiol. 51:401-418, 1989.

Trimmer, J. S.; Coopermann, S. S.; Tomiko, S. A.; Zhou, J. Y.; Crean, S. M.; Boyle, M. B.; Kallen, R. G.; Sheng, Z. H.; Barchi, R. L.; Sigworth, F. J.; Goodman, R. H.; Agnew, W. S. e Mandel, G. Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. Neuron 3:33-49, 1989.

Vandenberg, C. e Horn, R. Inactivation viewed through single sodium channels. J. Gen. Physiol. 84:535-564, 1984.

West, J. W.; Numann, R.; Murphy, B. J.; Scheuer, T. e Catterall, W. A. A phosphorylation site in the sodium channel required for modulation by protein kinase C. Science 254:866-868, 1991.

Wieland, S. J.; Fletcher, J. E. e Gong, Q. H. Differential modulation of a sodium conductance in skeletal muscle by intracellular and extracellular fatty acids. Am. J. Physiol. 263:C308-C312, 1992.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1

CIRCUITOS DO AMPLIFICADOR DE PATCH CLAMP

1- O AMPLIFICADOR DE "PATCH CLAMP" IDEAL.

Na técnica de "patch clamp", o potencial de membrana é mantido constante, isto é, "clamped", enquanto a corrente que flui através da membrana em resposta à aplicação deste potencial é medida. O amplificador de "patch clamp" ideal consiste simplesmente de uma bateria, uma chave, um fio condutor e um amperímetro (figura 1).

Considerando que o fio condutor tenha resistência ôhmica igual a zero, o potencial de membrana (V_m) fica instantaneamente igual ao potencial da bateria (V_{cmd}) quando a chave fecha. Isto gera uma corrente transiente que carrega a capacitância da membrana (C_m), seguida por uma corrente sustentada que mantém constante o potencial através da resistência da membrana (R_m). Neste exemplo, o potencial é a variável independente. Seu valor é controlado e igual ao valor do potencial da bateria (V_{cmd}). A corrente é a variável dependente; seu valor é medido pelo amperímetro "A". Devido a estas características, o circuito do amplificador de "patch clamp" é as vezes chamado de "seguidor de corrente".

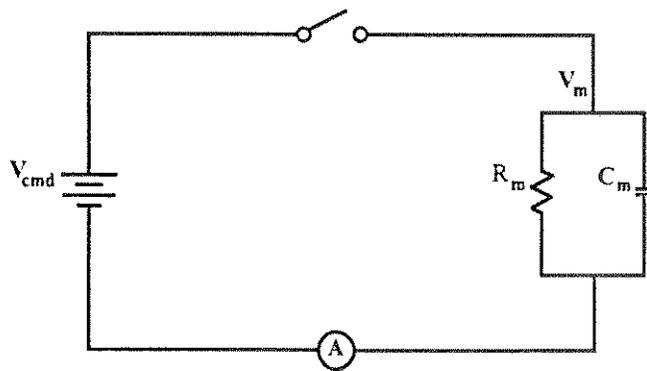


Figura 1. Amplificador de "patch clamp" ideal. A capacitância C_m e o resistor R_m em paralelo representam o circuito equivalente da membrana. Quando a chave fecha, o potencial de membrana (V_m) fica instantaneamente igual ao potencial da bateria (V_{cmd}). Por simplicidade, assume-se que $V_m = 0$ antes de fechar a chave. Com o fechamento da chave gera-se uma corrente transiente devido à capacitância da membrana (C_m) com carga $Q = C_m \cdot V_{cmd}$, seguida por uma corrente constante igual a V_{cmd}/R_m .

2- O AMPLIFICADOR DE "PATCH CLAMP" REAL.

A figura 2 ilustra um diagrama em blocos e a temporização de um ciclo para controle do potencial e registro da corrente de um amplificador de "patch clamp" real. Uma micropipeta (ME1) é utilizada para permitir a conexão do amplificador de "patch clamp" à célula. Na configuração da figura 2, a micropipeta penetra a célula e o potencial registrado (V_p) é mantido por um amplificador de ganho unitário (unity-gain headstage ou byffer, A1). No início do ciclo para controle do potencial e registro da corrente do amplificador de "patch clamp", assumimos que V_p é exatamente igual ao potencial de membrana V_m . Um circuito de "sample-and-hold" (SH1) registra o valor V_{ms} durante todo o ciclo. V_{ms} é comparado com o potencial de comando (V_{cmd}) em um amplificador diferencial (A2). A saída deste amplificador torna-se a entrada de uma fonte controladora de corrente (CCS) se a chave S1 estiver na posição de passar corrente ("current passing", ver fig. 2). A corrente I_0 é a corrente necessária para que o potencial V_p seja mantido constante (ver figura 3 para circuito elétrico do amplificador de "patch clamp"). Ignorando os efeitos de elementos elétricos passivos da pipeta, célula e circuitos do amplificador, a corrente I_0 é diretamente proporcional à variação da condutância da membrana em resposta ao potencial aplicado e mantido constante. A CCS aplica uma corrente na micropipeta que é diretamente proporcional ao potencial na entrada da CCS independentemente da resistência da micropipeta. O ganho deste circuito (o qual funciona como uma transcondutância) é G_T . O período da aplicação da corrente está ilustrado no início da forma de onda (fig. 2). S1 é mostrada na posição de passar corrente, durante a qual um pulso retangular de corrente é aplicado na micropipeta causando uma elevação em V_p . A taxa de elevação deste potencial é limitado por efeitos capacitivos através da parede de vidro da micropipeta com a solução de banho e da capacitância de entrada do amplificador A1. O valor final

de V_p é praticamente a queda de potencial através da micropipeta devido à passagem da corrente I_0 através da resistência da pipeta R_p . Somente uma pequena fração de V_p consiste do potencial de membrana (V_m) registrado na ponta da micropipeta. S1 então comuta para a posição de registro do potencial ("voltage recording", ver fig. 2). Quando a entrada de CCS é zero volts (chave S1 na posição "voltage recording", 0 volts; ver figura 2), sua saída de corrente é zero e V_p decai passivamente. Durante o período de registro do potencial, V_p decai assintoticamente para o valor V_m . Um período de tempo suficiente deve ser permitido para V_p atingir níveis de 1 milivolt ou níveis menores que V_m . No final do período de registro do potencial, uma nova amostragem de V_m é tomada e um novo ciclo começa. O valor que usa-se para registro é V_{ms} . Como ilustrado na curva temporal mais inferior (fig. 2), V_{ms} varia em pequenos incrementos em torno de um valor médio. A diferença entre V_{ms} médio e V_{cmd} é o erro do potencial de "clamp" que aparece devido ao ganho (G_T) de CCS ser finito. O erro torna-se progressivamente menor com o aumento de G_T .

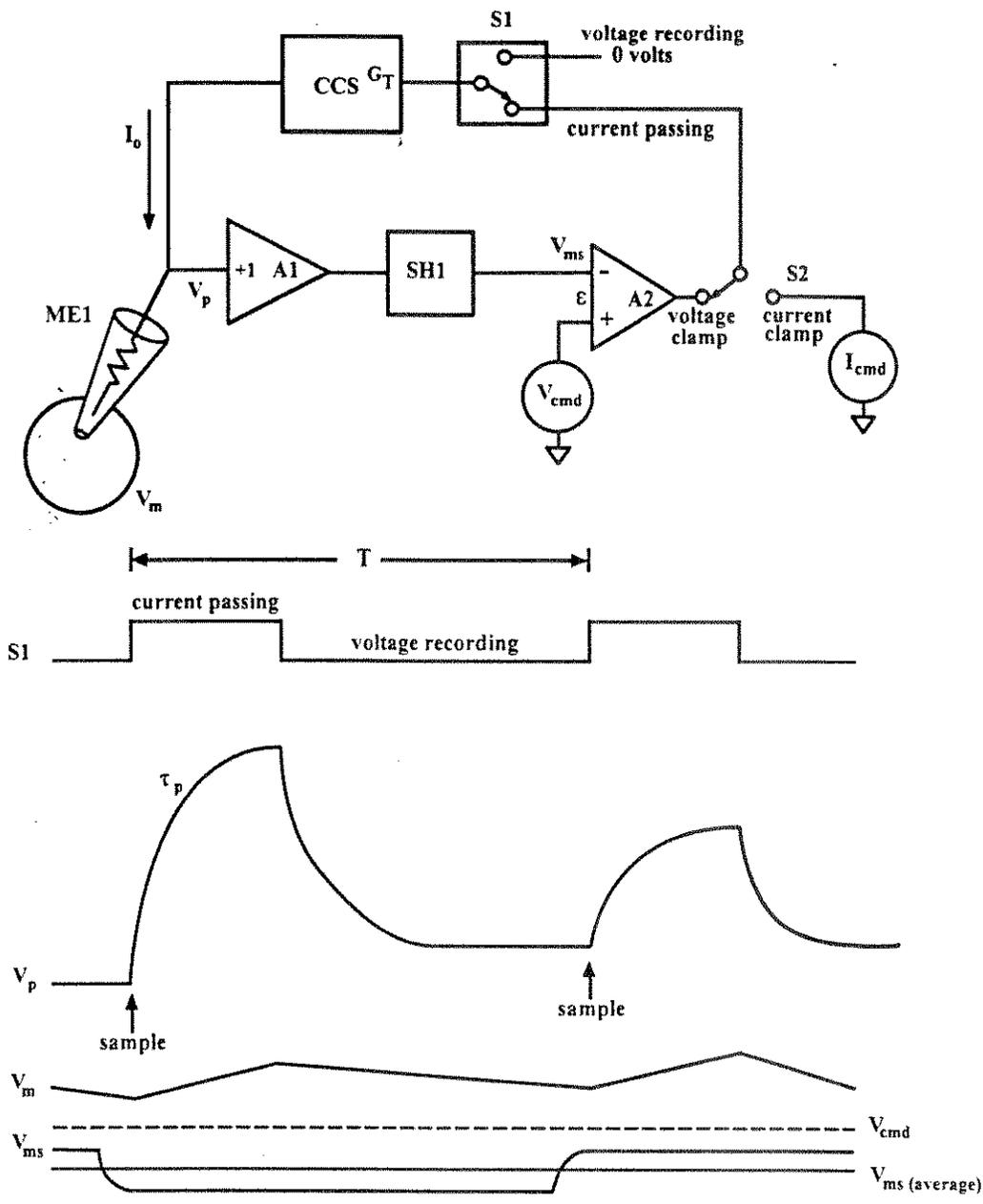


Figura 2. Diagrama em blocos do circuito de um amplificador de "patch clamp" real e de formas de onda de temporização do processo de controle do potencial e registro da corrente.

2.1- Circuito de compensação da capacitância da pipeta

A compensação da capacitância da pipeta tem basicamente três propósitos. Primeiro, muitos pesquisadores querem remover o transiente dos registros por razões estéticas. Segundo, durante o transiente, o potencial na ponta da pipeta muda lentamente enquanto a capacitância da pipeta se carrega. A figura 3 ilustra o circuito elétrico do amplificador de "patch clamp" conectado a um circuito de compensação de capacitância da pipeta. O carregamento rápido da capacitância da pipeta pelo circuito de compensação faz com que o potencial na ponta do eletrodo atinja seu valor mais rapidamente, reduzindo a probabilidade de distorção de correntes iônicas que aparecem rapidamente após a aplicação do potencial. Terceiro, a capacitância não compensada tem um efeito nocivo aos circuitos de correção da resistência em série da pipeta. Normalmente utiliza-se dois pares de controle da capacitância da pipeta. Com estes controles é frequentemente possível reduzir transientes de pipeta a níveis extremamente baixos. O transiente rápido nos registros é reduzido por meio do uso dos controles "fast magnitude" e constante de tempo rápida ("fast mag" e "fast 6", fig 3). O controle de magnitude compensa a carga da malha ("net charge"). O controle 6 ajusta a constante de tempo de carga do circuito de compensação para neutralizar a constante de tempo da via de comando (V_{cmd}) e para compensar pequenas não linearidades na resposta em frequência da pipeta e dos aparatos eletrônicos associados. O componente residual visto em muitas pipetas é reduzido pelo uso dos controles de "slow mag" e "slow 6".

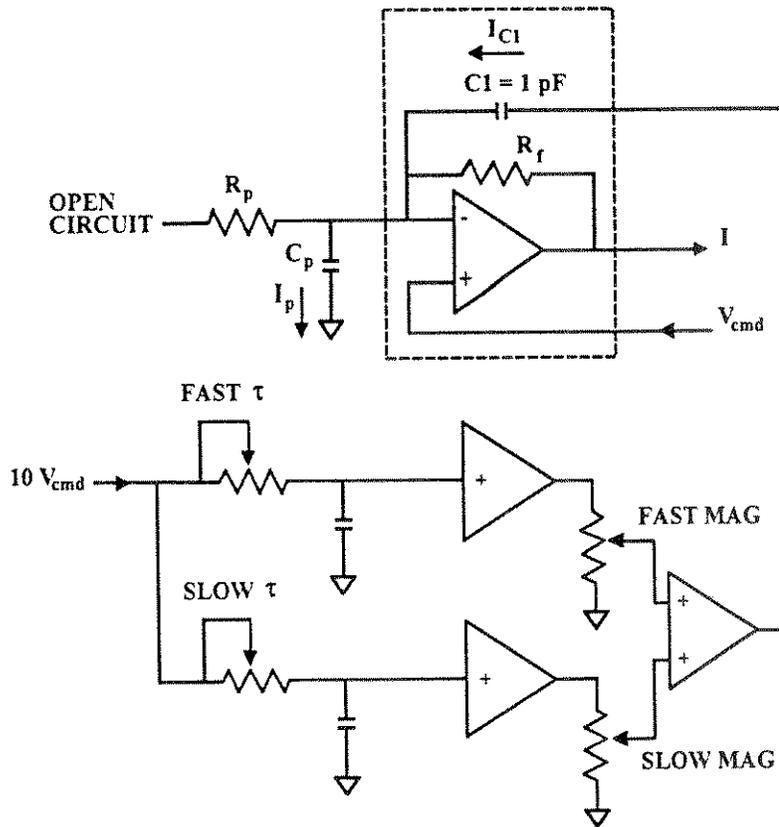


Figura 3. Circuito de compensação da capacitância da pipeta.

2.2- Circuito de compensação da capacitância da membrana.

Na configuração de "whole-cell patch clamp" ou "perforated patch clamp", quando o potencial de membrana é alterado há uma significativa corrente transiente necessária para carregar a capacitância da membrana. Dependendo do tamanho da célula, mesmo um pequeno comando de potencial da ordem de dezenas de milivolts pode necessitar de uma quantidade grande de corrente para carregar a membrana que, por não poder ser suprida por R_f , satura o amplificador operacional. Este problema de saturação é eliminado por um ajuste apropriado dos controles da resistência em série e da capacitância de "whole-cell". A função destes ajustes é amenizar o carregamento da carga capacitiva sobre resistor de realimentação R_f por meio do desvio da carga de carregamento da capacitância da membrana de R_f para C_2 . A figura 4 ilustra um circuito de compensação da capacitância da membrana da célula ("whole-cell"). Assumindo que a capacitância da pipeta já tenha sido previamente compensada, pode-se apropriadamente ajustar a resistência em série e a capacitância de "whole cell" por meio de controles que aplicam corrente em C_2 a qual anula a corrente transiente de membrana (I_m). Estes ajustes não alteram as constantes de carga da membrana e o circuito de resistência em série opera sem causar saturação na entrada do amplificador operacional.

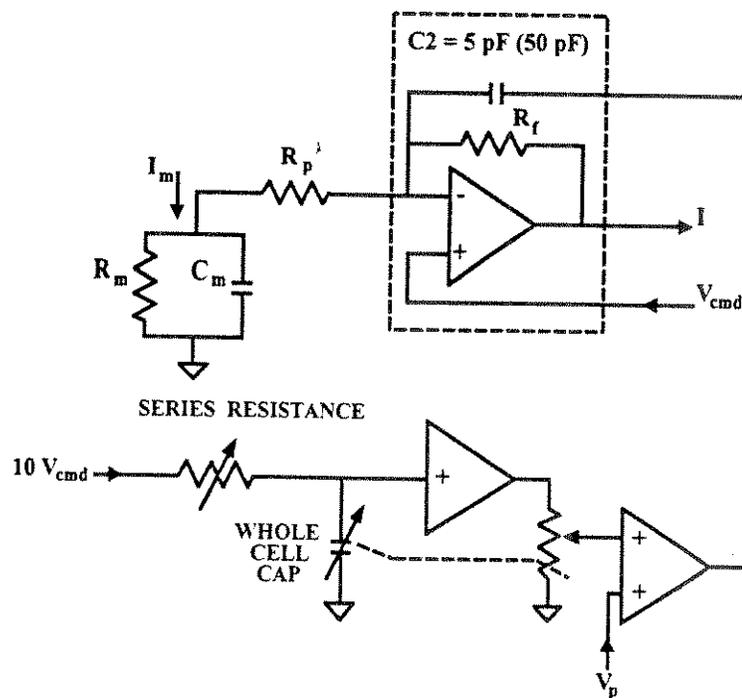
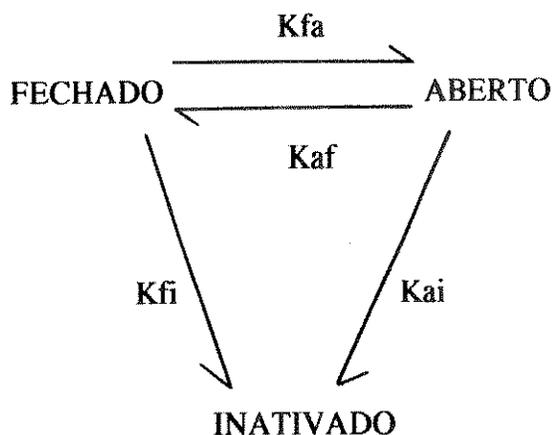


Figura 4. Circuito de compensação da capacitância da membrana de célula.

APÊNDICE 2

DEDUÇÃO MATEMÁTICA DO MODELO ESTOCÁSTICO DO CANAL DE SÓDIO

ESQUEMA CINÉTICO



Neste esquema cinético, as transições de estado (fechado, F; aberto, A; e inativado, I) são governadas por constantes de taxa (Kfa, Kaf, Kai, Kfi). No caso dos canais de sódio, o esquema cinético acima é válido para descrever a cinética de abertura, fechamento e inativação do canal de sódio nos potenciais de membrana maiores ou iguais a -10mV. Este esquema cinético pode ser descrito com a seguinte equação diferencial:

$$dA(t)/dt = F(t) \cdot Kfa - A(t) \cdot (Kai - Kfa/Kaf)$$

onde F(t) e A(t) são funções dependentes do tempo (t; na faixa de potencial mencionada) dos estados fechado e aberto do canal de sódio.

$$F(t) = F(0) \cdot \text{EXP}[-(Kfi + Kaf) \cdot t]$$

Assim:

$$dA(t)/dt = F(0) \cdot \text{EXP}[-(Kfi + Kaf) \cdot t] \cdot Kfa - A(t) \cdot (Kai - Kfa/Kaf)$$

Rearranjando, temos:

$$dA(t)/dt + A(t).(K_{ai} - K_{fa}/K_{af}) = F(0).EXP[-(K_{fi} + K_{af}).t].K_{fa}$$

Fazendo:

$$dA(t)/dt = dy/dx;$$

$$A(t) = y;$$

$$(K_{ai} - K_{fa}/K_{af}) = p(x) \text{ e}$$

$$F(0).EXP[-(K_{fi} + K_{af}).t].K_{fa} = G(x)$$

Temos:

$$dy/dx + y.p(x) = G(x)$$

cuja solução geral é:

$$y = A1.EXP[-\int p(x).dx] + EXP[-\int p(x).dx]. \int \{G(x).EXP[\int p(x).dx]\}.dx$$

onde A1 é uma constante de integração.

Resolvendo a integral acima para o nosso caso, obtemos a expressão matemática que representa o esquema cinético acima:

$$A(t) = [-K_{fa}/(K_{ai} - K_{fa} - K_{fi} - K_{af})].F(0).\{EXP[-K_{ai} + K_{fa}/K_{af}.t] - EXP[-(K_{fa} - K_{af} - K_{fi}).t]\}$$

Esta expressão pode ser implementada em um programa de computador com recursos matemáticos e gráficos (e.g. Lotus 123) para simulação da variação da condutância da membrana ao sódio (G_{Na}) pois, com valores apropriados das constantes de taxa, $A(t)$ torna-se diretamente proporcional a $G_{Na}(t)$.