Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós-graduação em Fisiologia

Paulo Sérgio Strazza Junior

Canais iônicos que governam o disparo espontâneo dos neurônios
***Cartwheel* do núcleo coclear dorsal**

Ribeirão Preto
2019

Paulo Sérgio Strazza Junior

**Canais iônicos que governam o disparo espontâneo dos neurônios
Cartwheel do núcleo coclear dorsal**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Strazza Junior, Paulo Sérgio

Canais iônicos que governam o disparo espontâneo dos neurônios *Cartwheel* do núcleo coclear dorsal. Ribeirão Preto, 2019.
146 p. : il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Departamento de Fisiologia. Área de concentração: Fisiologia.
Orientador: prof. Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão

1. Núcleo coclear dorsal. 2. Neurônios *Cartwheel*. 3. Condutâncias subliminares.
4. Canais K_{ATP}. 5. *Tinnitus*.

Nome: STRAZZA JUNIOR, Paulo Sérgio

Título: Canais iônicos que governam o disparo espontâneo dos neurônios *Cartwheel* do núcleo coclear dorsal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicado aos meus pais e meus irmãos,
toda minha gratidão pelo apoio incondicional ao
longo de todo período de elaboração deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ricardo M. X. Leão pela oportunidade oferecida e excelente orientação ao longo da realização deste projeto, sempre acessível e motivado a discutir ideias e resultados. Grato pela confiança depositada em mim, por tudo que me ensinou no tempo de convivência, pelas críticas construtivas, aconselhamentos e oportunidades acadêmicas oferecidas. Agradeço também por sua compreensão, presente em todas as situações.

A todos os membros do laboratório de Neurofisiologia e Sinapse, por toda a cooperação, suporte e ensino oferecidos, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível. Em especial agradeço ao auxílio constante do Fernando Aguiar e André Dagostin, são mestres, professores e amigos de todas as horas, que não conhecem problemas sem soluções; ao João Zugaib e Cesar Ceballos pelo companheirismo e por tudo que me ensinaram sobre o DCN e procedimentos experimentais; a Alexandra Cunha, pelas muitas vezes em que me ajudou, mesmo quando sobrecarregada de tarefas. Devo a toda equipe do laboratório meu desenvolvimento científico, profissional e pessoal nesses anos de convivência.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por todos os recursos e infraestrutura oferecidos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e suporte financeiro para realização desta pesquisa.

RESUMO

STRAZZA JUNIOR, Paulo Sérgio. **Canais iônicos que governam o disparo espontâneo dos neurônios *Cartwheel* do núcleo coclear dorsal**. 2019. 146 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Células *Cartwheel* (CW) são interneurônios glicinérgicos do Núcleo Coclear Dorsal (NCD) responsáveis pela maior parte da inibição sobre as células Fusiformes, o principal neurônio de saída do núcleo. A maioria delas (cerca de 80%) dispara potenciais de ação espontaneamente (fenótipo *Active*), enquanto o restante é silente ou apresentam um potencial de repouso na maior parte do tempo (fenótipo *Quiet*). Hiperatividade do NCD tem sido implicada na gênese do *Tinnitus* em modelos animais e estudos recentes mostraram que o Salicilato, um agente indutor do distúrbio, aumenta consideravelmente a proporção do fenótipo *Quiet* e ainda reduz, de forma concomitante, o disparo espontâneo de potenciais de ação dos neurônios CW e a neurotransmissão glicinérgica espontânea sobre os neurônios Fusiformes. Nosso estudo teve como objetivo investigar o papel de diferentes condutâncias subliminares no controle do potencial de membrana e das propriedades intrínsecas dos neurônios CWs, numa tentativa de se compreender os mecanismos iônicos envolvidos na geração dos fenótipos *Active* e *Quiet*. Registros eletrofisiológicos em fatias do NCD foram obtidos utilizando-se a técnica de *Whole Cell Patch-Clamp* em conjunto com a aplicação de agonistas/antagonistas seletivos de canais iônicos. Foram investigadas a Corrente de Na⁺ de Persistente (INap), a Corrente Catiônica Ativada por Hiperpolarização (I_h), a Corrente de Ca²⁺ do Tipo-T (ICa_T), a Corrente de K⁺ Retificadora de Entrada (IK_{ir}), a Corrente de K⁺ Sensível ao ATP (IK_{ATP}) e a Corrente de Vazamento de K⁺ (IK_{Leak}). Demonstramos que a Tolbutamida, um inibidor da IK_{ATP}, converte o fenótipo *Quiet* em *Active*, e que de maneira oposta, a Diazoxida, um agonista dos canais K_{ATP}, converte o fenótipo *Active* em *Quiet*. Outras diferenças em condutâncias específicas foram encontradas, porém estas diferenças revelaram pouca ou nenhuma contribuição na determinação do fenótipo. Os resultados sugerem que a regulação dos canais K_{ATP} integra o mecanismo fisiológico que controla a atividade e fenótipo dos neurônios CWs, e ainda, que perturbações neste mecanismo podem estar envolvidas na patofisiologia do *Tinnitus*.

Palavras-chave: Núcleo coclear dorsal. Neurônios *Cartwheel*. Condutâncias subliminares. Canais K_{ATP}. *Tinnitus*.

ABSTRACT

STRAZZA JUNIOR, Paulo Sérgio. **Ionic channels governing spontaneous firing of *Cartwheel* neurons from dorsal cochlear nucleus**. 2019. 146 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Cartwheel cells (CW) are glycinergic interneurons from the dorsal cochlear nucleus (DCN) which provide most of the inhibitory input upon Fusiform cells, the major output neuron of the nucleus. Most CW neurons (about 80%) exhibit spontaneous firing (*Active* phenotype), while the remaining is silent or present a resting membrane potential most of the time (*Quiet* phenotype). DCN hyperactivity has been implicated in the genesis of Tinnitus in many animal models and recent studies demonstrate that Salicylate, a Tinnitus inductor agent, greatly increases the populational proportion of the *Quiet* phenotype and causes a simultaneous reduction in the firing rate of CW neurons and spontaneous inhibitory events (IPSCs) upon Fusiform neurons. The aim of this work was to investigate the role of different subliminal conductances on CW neurons membrane potential and intrinsic properties, in an attempt to better understand the ionic mechanisms underlying the generation of *Active* and *Quiet* phenotypes. Electrophysiological recordings on DCN slices were obtained using the Whole Cell Patch-Clamp technique combined with selective ion channels agonists/antagonists application. We investigated the persistent Na⁺ current (I_{Nap}), the hyperpolarization activated cationic current (I_h), the T-type Ca²⁺ current (I_{CaT}), the inwardly rectifying K⁺ current (I_{K_{ir}}), the ATP sensitive K⁺ current (I_{K_{ATP}}) and the leak K⁺ current (I_{K_{Leak}}). We demonstrate that Tolbutamide, a selective K_{ATP} channel antagonist, turns *Quiet* neurons into *Active* neurons, and in an opposite manner, Diazoxide, a selective K_{ATP} channel agonist, turns *Active* neurons into *Quiet* neurons. Other differences in specific subliminal conductances were found, but they showed little or no contribution in determining the phenotype. Our results suggest that K_{ATP} channel regulation integrates the physiological mechanism that controls CW neurons activity and phenotype, and also that perturbations on this mechanism may be involved in the pathophysiology of Tinnitus.

Keywords: Dorsal cochlear nucleus. Cartwheel neurons. Subliminal conductances. K_{ATP} channels. Tinnitus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema do circuito básico do NCD e seus neurônios principais. As fibras paralelas da camada molecular conduzem informações multissensoriais e estimulam os dendritos apicais dos neurônios Fusiformes (FUS), neurônios de saída do núcleo para o colículo inferior (CI), e <i>Cartwheel</i> (CW), interneurônios glicinérgicos, principal fonte de inibição sobre os neurônios FUS. Fibras auditórias da camada profunda estimulam os dendritos basais dos neurônios FUS e os neurônios Tuberculoventrais (TV), também interneurônios glicinérgicos. Os neurônios GABAérgicos estrelados do núcleo coclear ventral (NCV) fornecem a inibição do tipo <i>broadband</i> para as FUS e TV. Também são mostrados os neurônios estrelados do DCN, GABAérgicos (S).....	24
Figura 1.2.1. Os diferentes fenótipos dos neurônios <i>Cartwheel</i> podem ser agrupados em duas categorias amplas, neurônios com atividade espontânea (acima) e neurônios silentes (abaixo). Asteriscos (*) indicam ocorrência de dois potenciais de ação complexos. Os exemplos são do próprio autor.....	27
Figura 1.2.2. Modelo de Kim e Trussel (2007) mostrando as contribuições de diferentes condutâncias iônicas na geração de padrões de disparo observados nos neurônios <i>Cartwheel</i> . O potencial complexo do tipo <i>prompt/onset</i> também é disparado isoladamente, tanto de forma espontânea como evocada/induzida. Figura extraída de Kim e Trussell (2007).	28
Figura 1.3.1. Experimentos de Bender e colaboradores (2012) para investigar o papel da corrente de Ca^{2+} do tipo-T nos neurônios CW, utilizando a técnica de <i>Cell-Attached Patch Clamp</i> . A: registros da atividade de neurônios CW feitos simultaneamente a iontoforese de Ni^{2+} ($9,1 \pm 2,8nA$ por 4s; pipeta com 100mM de $NiCl_2$) sobre o segmento inicial do axônio (AIS). Uma transição do padrão de disparo em salvas de potenciais (<i>burstings</i>) para o disparo regular de PAs (disparo tônico) é observada. B: em outro experimento a mesma transição é gerada por aplicação no banho de 1uM do antagonista seletivo TTA-P2, que nesta concentração inibe os canais de Ca^{2+} do tipo-T mas não os do tipo-R. Figura adaptada de Bender et al. (2012).	30
Figura 1.3.2. Características das correntes subliminares IK_{ir} , I_h e INa_p . A: correntes produzidas por hiperpolarizações dos neurônios fusiformes, de acordo com o protocolo de voltagem ilustrado a direita (i). Corrente sensível ao Ba^{2+} 200uM, um inibidor da IK_{ir} , obtida por subtração das correntes antes e após aplicação do Ba^{2+} (ii). Relação corrente-voltagem da IK_{ir} mostrando a retificação característica desta corrente em potenciais mais positivos que o potencial de reversão do K^+ (iii). B: correntes produzidas por hiperpolarizações da membrana antes e após aplicação do ZD7288 20uM, um inibidor seletivo da I_h (protocolo de voltagem semelhante ao mostrado para a IK_{ir}) (i). Corrente sensível ao ZD7288 (ii) e relação corrente-voltagem da I_h (iii). Tipicamente a corrente é ativada por pulsos de voltagem negativos a -50mV, atinge um pico entre -120 e -130mV e possui um potencial de reversão entre -30 e -20mV (I_h é uma corrente mista de Na^+ e K^+). C: correntes em resposta a um protocolo de voltagem do tipo rampa, como mostrado a direita, antes e após aplicação de 1uM de TTX, um inibidor dos canais de Na^+ dependentes de potencial, e portanto da INa_p (i). Corrente sensível ao TTX 1uM gerada por subtração das correntes em (i); ativação da INa_p ocorre em aprox. -70mV e sua condutância (ou magnitude) aumenta rapidamente, alcançando um pico em -50mV (ii). Extraído de Leão et al., 2012 e Ceballos et al., 2016.	33
Figura 3.3.1. Esquema do protocolo VI. 15 pulsos quadrados de 1 segundo cada são aplicados, partindo de um primeiro pulso de -300pA, até o último pulso de +400pA (incrementos de +50pA). A corrente injetada nos intervalos dos pulsos para suspender o disparo (neurônios <i>Active</i>) e estabilizar o potencial de membrana em torno de -80mV (potencial de controle) variou de neurônio para neurônio e, como a figura sugere, seu valor não é somado ao valor da corrente de cada pulso (o valor da corrente de cada pulso é absoluto).....	40
Figura 3.3.2. Esquema do protocolo IV. 10 pulsos quadrados de voltagem de 4 segundos cada são aplicados, partindo de -115mV ou -110mV, a depender do grupo experimental (indicado na seção Resultados). A cada pulso seguinte +10mV é somado. O potencial de <i>holding</i> (neste exemplo é de -65mV) variou de acordo com a condutância investigada (valor indicado na seção Resultados).	41
Figura 3.3.3. Esquema do protocolo rampa. O potencial é grampeado em -100mV por 500 milissegundos e em seguida é linearmente aumentado numa taxa de +12,5mV por segundo até atingir -50mV (duração total da rampa é de 4 segundos).	41

Figura 3.4.1. Histogramas normalizados da variação do potencial de membrana nos registros I0. Valores do eixo vertical são porcentagens (%). O intervalo (<i>bin</i>) de cada barra é de 1mV. Asteriscos (*) indicam a moda do potencial de membrana (Mpm), valor adotado como medida do potencial de membrana. O cálculo da porcentagem de tempo ocupada pela Mpm ($\%_{Mpm}$) incluiu as duas barras adjacentes. A direita são mostrados os registros que geraram os histogramas. A: exemplo de histograma bimodal típico de neurônios com padrão (relativamente regular) de disparo em salvas (<i>burstings</i>). B: exemplo de histograma de um neurônio com disparo tônico.....	44
Figura 3.4.2. Exemplo de registro produzido pela aplicação do protocolo VI, ilustrando alguns parâmetros medidos em <i>Current-Clamp</i> (ver texto para explicações). Respostas a 5 pulsos sequenciais (3 hiperpolarizantes e 2 despolarizantes) são mostradas. A seta preta menor no primeiro pulso hiperpolarizante indica o ajuste (em vermelho sólido) de uma função exponencial simples ao decaimento de potencial, usado para a medida da τ_m . O <i>sag</i> é mostrado para o terceiro pulso hiperpolarizante, ao invés do segundo, para facilitar a visualização; o ponto vermelho no início do decaimento indica a localização do pico negativo do pulso, usado no cálculo do <i>sag</i> . A linha tracejada vermelha corresponde ao limiar de atividade.	46
Figura 3.5. Histograma da porcentagem de tempo ocupada pela Mpm ($\%_{Mpm}$) para 338 registros I0, em condições controle, pertencentes a 175 neurônios (dados acumulados ao longo de todos os experimentos). O intervalo de porcentagem de cada barra é de 10%. Barras vermelhas representam o intervalo de porcentagem da Mpm ($10\% < \%_{Mpm} < 60\%$ ou 5,2 a 31,2 segundos) observado para o fenótipo <i>Active</i> (237 de 338 registros), e as barras azuis o intervalo de porcentagem da Mpm ($70\% < \%_{Mpm} \leq 100\%$ ou 36,4 a 52 segundos) observado para o fenótipo <i>Quiet</i> (95 de 338 registros). A linha tracejada indica a barra que inclui os casos raros de fenótipo intermediário (verificado em apenas 6 registros de 338), em que a Mpm é observada por 60 a 70% da duração do registro I0 ($10\% \leq \%_{Mpm} \leq 60\%$). A direita: exemplo de registro (janelas de 25 segundos) pertencente ao fenótipo <i>Active</i> (A), Intermediário (I) e <i>Quiet</i> (Q).....	48
Figura 4.1. Exemplo ilustrando a posição no eixo vertical (potencial) das escalas horizontais e verticais. Os registros são de um neurônio <i>Active</i> . As escalas mostradas no registro VI foram fixadas, sendo as mesmas utilizadas em todos os experimentos. Diferentes escalas de tempo foram utilizadas nas figuras dos registros I0, e serão especificadas para cada experimento (em geral as escalas foram de 1 segundo ou 5 segundos).	51
Figura 4.1.1. Proporção dos fenótipos <i>Active</i> e <i>Quiet</i> na população de neurônios de <i>Cartwhell</i> . A: porcentagens referentes aos experimentos em que apenas a técnica de <i>Whole-Cell</i> foi utilizada. B: porcentagens obtidas considerando todos os experimentos, incluindo os que a técnica de <i>Cell-Attached</i> foi previamente utilizada.....	52
Figura 4.1.2. Respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI em um neurônio <i>Active</i> (a esquerda) e <i>Quiet</i> (a direita) mostrando as diferenças dos fenótipos quanto a resistência e limiar de atividade. Diferenças no <i>sag</i> e constante de tempo da membrana também podem ser visualizadas. Notar que o potencial de controle (intervalo entre os pulsos) é mantido num valor ($\approx -80mV$) aproximadamente igual nos dois fenótipos (ver descrição do protocolo VI, item 3.3).	53
Figura 4.1.3. Comparação dos parâmetros eletrofisiológicos intrínsecos dos fenótipos <i>Active</i> e <i>Quiet</i> . A: potencial de membrana (Mpm, a esquerda) e limiar de atividade (a direita); notar que o LA é positivo em relação ao potencial de repouso nos neurônios <i>Quiet</i> , e mais negativo que o potencial de membrana (Mpm) nos neurônios <i>Active</i> . B: resistência de entrada, medida em <i>Voltage-Clamp</i> (a esquerda) e <i>Current-Clamp</i> (a direita). C: constante de tempo da membrana. D: medida do <i>sag</i> (ver definição no item 3.4).	53
Figura 4.1.4. Relações corrente-voltagem (curvas IV) dos fenótipos <i>Active</i> (vermelho) e <i>Quiet</i> (azul) para os protocolos-IV de -115 a -55mV (A: <i>Active</i> : n=108; <i>Quiet</i> : n=27) e -110 a -50mV (B: <i>Active</i> : n=31; <i>Quiet</i> : n=16). Linha tracejada refere-se ao valor de 0pA; notar que apenas a curva referente ao fenótipo <i>Quiet</i> cruza esta linha. C: traçados de corrente representativos de um neurônio <i>Active</i> (a esquerda) e <i>Quiet</i> (a direita). Os traçados em azul referem-se ao pulso de -55mV, e os em vermelho ao pulso de -45mV.	54
Figura 4.2.1. Janelas de 25 segundos de registros I0 ilustrando o efeito do TTX 0,5 μM , neurônio <i>Active</i> acima, e riluzole 10 μM , neurônio <i>Quiet</i> abaixo. Condição tratamento está em vermelho. Riluzole e TTX tiveram o mesmo efeito sobre o potencial de membrana dos neurônios <i>Quiets</i> . Os efeitos do riluzole	

sobre o comportamento espontâneo dos neurônios <i>Active</i> foram variáveis (ver texto). Escala horizontal: 5s.....	56
Figura 4.2.2. Exemplos de ondas curtas de despolarização observadas após aplicação do riluzole 10 μ M. O neurônio parou de disparar potenciais de Na ⁺ espontaneamente. Janelas de 25 segundos (escala horizontal: 5s).....	57
Figura 4.2.3. Efeito do riluzole sobre o limiar de atividade, representado pela linha vermelha tracejada. Os traçados são respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI.	57
Figura 4.2.4. Efeitos do riluzole e TTX sobre o potencial de membrana (Mpm) (A), a resistência de entrada (C ; medida em <i>Current-Clamp</i>) e a constante de tempo da membrana (D). B : Efeito do riluzole sobre o limiar de atividade.	58
Figura 4.2.5. Curvas IV nas condições controle e riluzole 10 μ M para o fenótipo <i>Active</i> (A ; n=12) e <i>Quiet</i> (B ; n=7). Potencial de <i>holding</i> = -75mV. Comparação da corrente sensível ao riluzole entre os fenótipos, como obtida por subtração das curvas IV (C ; <i>Active</i> : n=12; <i>Quiet</i> : n=7) e subtração das rampas (D ; <i>Active</i> : n=10; <i>Quiet</i> : n=7).....	59
Figura 4.2.6. Traçados de corrente obtidos pela aplicação do protocolo rampa nas condições controle e riluzole para um neurônio <i>Active</i> (Ai) e <i>Quiet</i> (Bi), e respectiva corrente sensível ao riluzole 10 μ M (ii), obtida por subtração dos traçados em (i).....	60
Figura 4.2.7. Gráficos das medidas de condutância, g_{corda} máx, g_{corda} (-45mV) e g_{slope} (<i>slope conductance</i>) para os dois fenótipos.	60
Figura 4.3.1. Comportamento espontâneo dos neurônios CW após aplicação do Ba ²⁺ 100 μ M. Em todos os casos ocorreu despolarização do potencial de membrana. Gráficos incluem dados do experimento com Ba ²⁺ 5mM (item 4.6), em que Ba ²⁺ 100 μ M foi inicialmente aplicado.	61
Figura 4.3.2. Despolarização causada pelo Ba ²⁺ 100 μ M; a condição controle é mostrada em i , e a condição tratamento em ii . Os exemplos são do tipo em que a droga gerou disparo tônico de PAs (caso I). A : exemplo de um neurônio <i>Quiet</i> . B : exemplos de dois neurônios <i>Active</i> ilustrando diferentes graus de despolarização gerados pelo Ba ²⁺ . Notar a diferença na forma e amplitude dos PAs nos 3 casos. Janelas de 10 segundos (escala horizontal: 1s).....	62
Figura 4.3.3. Formas extremas de biestabilidade geradas pelo Ba ²⁺ 100 μ M, como exemplificado para um neurônio <i>Quiet</i> (Ai : ctrl; Aii : Ba ²⁺) e <i>Active</i> (Bi : ctrl; Bii : Ba ²⁺). Notar as transições abruptas de estado. Janelas de 50 segundos (<i>Quiet</i>) e 25 segundos (<i>Active</i>); escala horizontal: 5s.	63
Figura 4.3.4. Respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI antes (i) e após aplicação do Ba ²⁺ 100 μ M (ii). Exemplo de um neurônio <i>Active</i> (A) e um neurônio <i>Quiet</i> (B). O aumento da resistência e da constante de tempo pode ser visualizado nos dois casos. Notar também as alterações causadas pelo Ba ²⁺ no disparo e forma dos PAs.	64
Figura 4.3.5. Efeito do Ba ²⁺ 100 μ M sobre os parâmetros medidos em <i>Current-Clamp</i> , nos dois fenótipos. A : potencial de membrana (Mpm). B : limiar de atividade. C : constante de tempo da membrana. D : resistência de entrada.....	65
Figura 4.3.6. Curvas IV nas condições controle e Ba ²⁺ 100 μ M para o fenótipo <i>Active</i> (A ; n=20) e <i>Quiet</i> (B ; n=7). Potencial de <i>holding</i> = -65mV. A corrente sensível ao Ba ²⁺ 100 μ M no fenótipo <i>Quiet</i> mostra uma componente sem retificação (evidente na faixa -75/-55mV) que não está presente no fenótipo <i>Active</i> (C). Condutância (g_{slope}) medida na faixa -115/-95mV (D).	66
Figura 4.3.7. Respostas de corrente ao protocolo IV, para os pulsos de -115mV a -65mV (7 pulsos), antes (i) e após aplicação do Ba ²⁺ 100 μ M (ii), para um neurônio <i>Active</i> (A) e <i>Quiet</i> (B). Devido a sobreposição de traçados, a corrente sensível ao Ba ²⁺ é mostrada apenas para 4 pulsos: -115, -105, -85 e -65mV (em azul) (iii). Inspeção dos traçados revela uma diferença clara de retificação da corrente entre os fenótipos.....	67
Figura 4.4.1. Comportamento espontâneo dos neurônios CW, antes (i) e após (ii) aplicação da tolbutamida 100 μ M. A : exemplos da geração de atividade espontânea pela droga em neurônios <i>Quiets</i> , característica de subtipo incomum (acima) e comum (abaixo) do fenótipo <i>Active</i> (no neurônio acima os PAs isolados são todos complexos). B : exemplo de neurônio <i>Active</i> , mostrando ausência de efeito da tolbutamida. Janela de 10 segundos (escala horizontal: 1s).....	68
Figura 4.4.2. Respostas a pulsos sequenciais de corrente (partindo de -100pA) do protocolo VI antes (i) e após (ii) aplicação da tolbutamida 100 μ M. A : exemplo da ação da droga em um neurônio <i>Quiet</i> , onde	

é possível visualizar o aumento da resistência e constante de tempo da membrana e a diminuição do limiar de atividade. B : exemplo de um neurônio <i>Active</i> , mostrando ausência de efeito da tolbutamida.	70
Figura 4.4.3. Efeitos da tolbutamida 100 μ M sobre os parâmetros potencial de membrana (Mpm) (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D), nos fenótipos <i>Active</i> e <i>Quiet</i>	71
Figura 4.4.4. Curvas IV dos fenótipos <i>Active</i> (A , n=12) e <i>Quiet</i> (B , n=8) antes e após aplicação da tolbutamida 100 μ M (potencial de <i>holding</i> = -65mV). Notar a semelhança entre as curvas IV em A e a curva IV referente à condição tolbutamida em B. C : corrente sensível a tolbutamida para ambos fenótipos. D : medidas de condutância para a $I_{K_{ATP}}$ no fenótipo <i>Quiet</i>	72
Figura 4.4.5. Traçados de corrente em resposta aos pulsos de -115mV a -55mV do protocolo IV, para um neurônio <i>Quiet</i> (A) e um <i>Active</i> (B), antes (i) e após (ii) aplicação da tolbutamida. Os traçados em azul referem-se ao pulso de -65mV e os em vermelho ao pulso de -55mV. Efeito da tolbutamida é verificado apenas no neurônio <i>Quiet</i> . Aiii : corrente sensível à tolbutamida obtida por subtração dos traçados em A; notar a ausência de retificação para os potenciais mais positivos (traçado referente ao pulso de -95mV foi eliminado para facilitar a visualização).	73
Figura 4.5.1. Efeito da diazoxida sobre o comportamento espontâneo dos neurônios <i>Actives</i> (i: Ctrl; ii: Diaz). Os neurônios tornam-se silentes, apresentando valores de potencial de repouso similares aos observados nos neurônios <i>Quiets</i> . Janelas de 10 segundos (escala horizontal: 1s).	74
Figura 4.5.2. Respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI antes (i) e após (ii) aplicação da diazoxida. É possível visualizar o efeito da droga sobre a resistência de entrada, constante de tempo da membrana e limiar de atividade.....	75
Figura 4.5.3. Efeito da diazoxida sobre o potencial de membrana (Mpm, A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D) dos neurônios <i>Actives</i> e comparação com os mesmos parâmetros do fenótipo <i>Quiet</i> (mesmos dados da Fig. 4.1.3). Não houve diferenças estatísticas entre o grupo <i>Active</i> -diazoxida e o grupo correspondente ao fenótipo <i>Quiet</i>	76
Figura 4.5.4. A : curva IV dos neurônios <i>Actives</i> (n=15) na condição controle e diazoxida. Potencial de <i>holding</i> = -65mV. B : comparação da curva IV da condição diazoxida (mesma do painel A) com a curva IV do fenótipo <i>Quiet</i> (n=27; mesma mostrada na Fig 4.1.2-A). As curvas são visualmente indistinguíveis. C : corrente sensível a diazoxida (em preto; fenótipo <i>Active</i>) comparada com a corrente sensível a tolbutamida (em cinza, mesma da Fig 4.4.4-C; fenótipo <i>Quiet</i>). D : comparação das medidas de condutância entre a $I_{K_{ATP}}$ obtida por aplicação da diazoxida (fenótipo <i>Active</i>) e da tolbutamida (fenótipo <i>Quiet</i> ; mesmos dados da Fig 4.4.4-D). Não houve diferença estatística em nenhuma das medidas.	77
Figura 4.5.5. Traçados de corrente em resposta aos pulsos de -115 a -55mV do protocolo IV, antes (Ai) e após (Aii) aplicação da diazoxida. Aiii : corrente sensível a Diazoxida obtida por subtração dos traçados em Ai e Aii (o pulso de -105mV foi excluído para facilitar a visualização). Notar a ausência de retificação. Pulso de -65mV é mostrado em azul e o de -55mV em vermelho.	78
Figura 4.6.1. Efeitos do Ba ²⁺ 100 μ M (ii) e Ba ²⁺ 5mM (iii) sobre o comportamento espontâneo dos neurônios CW (i: controle). Um exemplo de neurônio <i>Active</i> é mostrado em A , e o único neurônio <i>Quiet</i> em B . A duração dos traçados é de 5 segundos (escala horizontal: 1s).	79
Figura 4.6.2. Efeitos do Ba ²⁺ 5mM sobre o potencial de membrana (Mpm) (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (R_m , medida em <i>Voltage-Clamp</i>) (C) e constante de tempo da membrana (D). O efeito do Ba ²⁺ 100 μ M foi avaliado para os parâmetros Mpm e R_m	80
Figura 4.6.3. Respostas de voltagem a pulsos sequenciais do protocolo VI, para as condições controle (i) e Ba ²⁺ 5mM (ii). Nos dois exemplos (A e B) é possível visualizar o aumento causado pelo Ba ²⁺ 5mM na resistência de entrada e na constante de tempo da membrana, enquanto o limiar de atividade não sofre alterações. O exemplo acima (A) mostra um dos neurônios no qual o <i>sag</i> não foi alterado. Notar nos dois exemplos a mudança abrupta do potencial de membrana em resposta ao pulso positivo de corrente, o qual mantém-se inalterado mesmo após o término do pulso.	81
Figura 4.6.4. Curvas IV nas condições controle e Ba ²⁺ 100 μ M (Ai), e curvas IV nas condições Ba ²⁺ 5mM e Ba ²⁺ 100 μ M (Aii). Potencial de <i>holding</i> = -65mV. Subtração das curvas IV em (Aii) forneceu a corrente sensível ao Ba ²⁺ 5mM (n=11) (Aiii). Uma corrente apenas de K ⁺ apresentaria valores positivos em potenciais positivos ao E_K ($\approx$ -109mV), o que claramente não aconteceu, indicando inibição de correntes de entrada pelo Ba ²⁺ 5mM.....	82

Figura 4.6.5. Exemplo de traçados de corrente produzidos em resposta ao protocolo IV (<i>holding</i> = -65mV) para a condição controle (Ai), Ba ²⁺ 100μM (Aii) e Ba ²⁺ 5mM (Aiii). Os traçados em azul referem-se ao pulso de -65mV e os em vermelho ao pulso de -55mV.	83
Figura 4.7.1. Registros do comportamento espontâneo de dois neurônios <i>Actives</i> (A) e um neurônio <i>Quiet</i> (B), antes (i) e após (ii) aplicação do baclofen. O potencial de membrana adquirido pelos neurônios <i>Actives</i> foi mais negativo que o potencial de repouso do fenótipo <i>Quiet</i> (Fig. 4.1.4-A). Janelas são de 10 segundos (escalas horizontais: 1s).	84
Figura 4.7.2. Respostas de voltagem de um neurônio <i>Active</i> a pulsos sequenciais do protocolo VI na condição controle (Ai) e tratamento (Aii). É possível visualizar a diminuição da resistência de entrada e da constante de tempo da membrana, assim como o efeito do baclofen sobre o limiar de atividade, tornando-o mais positivo.	85
Figura 4.7.3. Medidas dos parâmetros potencial de membrana (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D) nas condições controle e tratamento. Os valores obtidos para o único neurônio <i>Quiet</i> registrado também foram reportados.	85
Figura 4.7.4. Curvas IV para o fenótipo <i>Active</i> antes e após aplicação do baclofen (Ai , n=9). Corrente sensível ao baclofen obtida por subtração das curvas em Ai (Aii). Potencial de <i>holding</i> = -65mV.	86
Figura 4.7.5. Traçados de corrente em resposta ao protocolo IV de um neurônio <i>Active</i> na condição controle (Ai) e tratamento (Aii). A subtração dos traçados Ai e Aii é mostrada em (Aiii). Notar o padrão linear formado pelos traçados de corrente. O pulso de -65mV é mostrado em azul e o de -55mV em vermelho.	87
Figura 4.7.6. Comportamento espontâneo de um neurônio <i>Active</i> e um neurônio <i>Quiet</i> nas 3 condições experimentais: controle, tolbutamida e tolbutamida + baclofen (na sequência). Os efeitos do baclofen não foram alterados pela aplicação prévia e simultânea da tolbutamida. Notar que o potencial de membrana gerado pelo baclofen no neurônio <i>Quiet</i> ficou um pouco mais negativo que seu potencial de repouso na condição controle. Janelas são de 5 segundos (escalas horizontais: 1s).	88
Figura 4.7.7. Medidas dos parâmetros potencial de membrana (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D) para as 3 condições experimentais: controle, tolbutamida e tolbutamida + baclofen. Os asteriscos (*) referem-se aos testes estatísticos feitos entre os grupos tolbutamida e tolbutamida + baclofen.	89
Figura 4.7.8. Curvas IV dos fenótipos <i>Active</i> (A , n=6) e <i>Quiet</i> (B , n=4) nas condições tolbutamida e tolbutamida + baclofen. Potencial de <i>holding</i> = -65mV. As mudanças causadas nas curvas IV pelo baclofen na presença de tolbutamida foram semelhantes às mudanças provocadas em relação à condição controle. A corrente sensível ao baclofen obtida na presença de tolbutamida foi semelhante entre os fenótipos (C); a corrente sensível ao baclofen obtida no primeiro experimento é mostrada em tracejado (mesma da Fig 4.7.4. Aii, n=9). Os valores das condutâncias das correntes em (C) foram equivalentes entre si (D).	90
Figura 4.8.1. Registros do comportamento espontâneo de um neurônio <i>Active</i> (A) e um <i>Quiet</i> (B) antes (i) e após (ii) aplicação do ZD7288 20μM. Notar a forte hiperpolarização produzida pela droga. Janelas são de 10 segundos (escalas horizontais: 1s).	91
Figura 4.8.2. Medidas dos parâmetros potencial de membrana (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D) nas condições controle e tratamento para os dois fenótipos.	92
Figura 4.8.3. A: medidas do parâmetro <i>sag</i> nos dois fenótipos nas condições controle e ZD 20uM. A inibição da I _h pelo ZD praticamente elimina o <i>sag</i> . B: medidas do <i>sag</i> por pulso hiperpolarizante (intensidade de corrente negativa injetada) do protocolo VI para ambos os fenótipos na condição controle (dados acumulados de todos os experimentos). Asteriscos (*) indicam diferença estatística (teste t múltiplo não pareado; da direita para a esquerda: <i>Actives</i> : n=120, 120, 111 e 62; <i>Quiets</i> : n=52, 52, 50 e 47). Tipicamente, o valor do <i>sag</i> é proporcional à intensidade da hiperpolarização (ou corrente negativa injetada). Nos neurônios CW um padrão atípico (não linear) foi observado, com valores do <i>sag</i> diminuindo a partir de correntes mais negativas que ≈ -100pA. Por esta razão escolhemos o segundo pulso hiperpolarizante (-70 a -100pA) para análise do <i>sag</i> (ver item 3.4).	93
Figura 4.8.4. Respostas de voltagem a pulsos sequenciais do protocolo VI para um neurônio <i>Active</i> (A) e um <i>Quiet</i> (B), antes (i) e após (ii) aplicação do ZD. Nos dois exemplos nota-se que o <i>sag</i> é eliminado. Também é possível verificar o aumento da resistência e da constante de tempo da membrana, e a diminuição do limiar de atividade (fica mais negativo).	94

Figura 4.8.5a. Mudanças provocadas pelo ZD nas curvas IV dos fenótipos <i>Active</i> (i) e <i>Quiet</i> (ii) para os dois valores de potencial de <i>holding</i> utilizados, -80mV (A , <i>Actives</i> : n=12; <i>Quiets</i> : n=3) e -60mV (B , <i>Actives</i> : n=9; <i>Quiets</i> : n=6). Notar que no fenótipo <i>Quiet</i> , a mudança (deslocamento para cima) é menos pronunciada e aparentemente começa num potencial mais negativo.	95
Figura 4.8.5b (continuação da Fig 4.8.5a). Corrente sensível ao ZD nos dois fenótipos para os potenciais de <i>holding</i> -80mV (Aiii) e -60mV (Biii). Um perfil (ou formato) mais característico da I_h foi obtido para o <i>holding</i> de -60mV, embora as diferenças da corrente entre os fenótipos foi semelhante para os dois valores de <i>holding</i> . C : medidas de condutância para os dois fenótipos; a g_{slope} foi calculada apenas para os dados referentes ao <i>holding</i> de -60mV; medida da g_{corda} reúne os dados referentes aos dois valores de <i>holding</i>	96
Figura 4.8.6. Exemplos de traçados de corrente em resposta ao protocolo IV de um neurônio <i>Active</i> (A) e um neurônio <i>Quiet</i> (B), antes (i) e após (ii) aplicação do ZD. Subtração dos traçados (i) e (ii) para o neurônio <i>Active</i> (Aiii) e para o neurônio <i>Quiet</i> (Biii). O traçado em vermelho refere-se ao pulso de -60mV (valor do <i>holding</i>) e os traçados em azul ao pulso de -70mV (traçados em preto referem-se aos pulsos de -110 a -80mV, de baixo para cima). Notar que no neurônio <i>Quiet</i> não ocorre inibição de corrente pelo ZD no pulso de -70mV ($I \approx 0$ pA no pulso de -70mV; o traçado referente ao pulso de -60mV foi eliminado para facilitar a visualização) e que a I_h possui maior magnitude no neurônio <i>Active</i>	97
Figura 4.9.1. Registros do comportamento espontâneo de dois neurônios <i>Actives</i> (A) e um neurônio <i>Quiet</i> (B) nas condições controle (i) e tratamento (ii). Os exemplos ilustram a despolarização do potencial de membrana causada pelo DHPG nos dois fenótipos. Janelas são de 25 segundos (escalas horizontais: 5s).	98
Figura 4.9.2. Mudanças causadas pelo DHPG nas curvas IV do fenótipo <i>Active</i> (A , n=6) e <i>Quiet</i> (B , n=2), e corrente sensível ao DHPG obtida por subtração das curvas em A e B (C). A corrente sensível possui um perfil bastante incomum nos dois fenótipos, apresentando valores progressivamente mais negativos em direção ao pico em -50mV, o que claramente exclui a possibilidade de uma componente da I_h . O neurônio <i>Quiet</i> que permaneceu silente (ver texto) após aplicação do DHPG foi excluído em B e C. Potencial de <i>holding</i> = -60mV.	99
Figura 4.10.1. Exemplos de respostas de corrente aos primeiros 300 milissegundos dos pulsos de -80mV a -50mV do protocolo IV, para o neurônio <i>Active</i> (A) e <i>Quiet</i> (B) mencionados no texto, antes (i) e após (ii) aplicação do níquel 50μM. Notar nos dois neurônios um pico negativo de corrente logo no início do pulso de -50mV (em vermelho). Aiii e Biii : subtração dos traçados em i e ii mostrando as correntes inibidas. Podemos observar que correntes inespecíficas (não sofreram inativação) foram inibidas nos pulsos de -50mV e -60mV (em azul). Potencial de <i>holding</i> = -80mV (neurônio <i>Active</i>) e -90mV (neurônio <i>Quiet</i>).	101
Figura 4.10.2. Curvas IV (estacionárias) dos fenótipos <i>Active</i> (A , n=3) e <i>Quiet</i> (B , n=3) nas condições controle e tratamento. C : corrente sensível ao níquel 50μM obtida por subtração das curvas em A e B. Potencial de <i>holding</i> = -80 e -90mV. Os valores da resistência de entrada (medida em <i>Voltage-Clamp</i>) não sofreram alterações após aplicação do níquel 50μM (D).	102
Figura 4.10.3. Registros do comportamento espontâneo de dois neurônios <i>Actives</i> (A) e um <i>Quiet</i> (B) nas condições controle (i) e tratamento (ii), mostrando a despolarização gerada pelo níquel 500μM. Janelas são de 20 segundos (escalas horizontais: 5s).	103
Figura 4.10.4. Curvas IV (estacionárias) do fenótipo <i>Active</i> (A , n=5) e <i>Quiet</i> (B , n=2) nas condições controle e tratamento. C : corrente sensível ao níquel 500μM obtida por subtração das curvas em A e B. Notar os dois pontos de reversão do sinal da corrente. Potencial de <i>holding</i> = -80mV. D : medidas em <i>Voltage-Clamp</i> da resistência de entrada nos dois fenótipos.	104
Figura 4.10.5. Registros do comportamento espontâneo de 3 neurônios (<i>Actives</i>) nas condições controle (i) e tratamento (ii), mostrando a despolarização do potencial de membrana gerada pelo mibefradil 10μM. Em A mostramos exemplos de despolarizações observadas entre 10 a 15 minutos de exposição a droga; em B mostramos um exemplo de despolarização mais acentuada verificada após mais de 20 minutos de perfusão da droga. Janelas de 20 segundos (escalas horizontais: 5s).	105
Figura 4.10.6. Curva IV (estacionária) do fenótipo <i>Active</i> na condição controle e tratamento (Ai , n=7) e corrente sensível ao mibefradil 10μM (Aii , n=7). A corrente apresentou algumas características em comum com a corrente sensível ao níquel 500μM (Fig 4.10.4 C). Potencial de <i>holding</i> = -80mV. B : medidas em <i>Voltage-Clamp</i> da resistência de entrada.	106

LISTA DE SIGLAS

aCSF	Fluido Cerebrospinal Artificial
ADP	Adenosina Difosfato
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
ATP	Adenosina Trifosfato
Ba ²⁺	Íon Bário
CW	<i>Cartwheel</i>
DHPG	S-3,5-Dihidroxifenilglicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E _K	Potencial de Equilíbrio do Potássio
FUS	Fusifome
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
g _{corda}	Condutância de Corda
g _{corda} ^{máx}	Condutância de Corda Máxima
GIRK	Retificador de Entrada Acoplado a Proteína-G
g _{slope}	Condutância Linear
HCN	<i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated</i>
ICa _T	Corrente de Cálcio do tipo-T
I _h	Corrente Catiônica Ativada por Hiperpolarização
IK _{ATP}	Corrente de Potássio Sensível ao ATP
IK _{ir}	Corrente de Potássio Retificadora de Entrada
IK _{Leak}	Corrente de Potássio de Vazamento
INa _p	Corrente de Sódio Persistente
IPSC	Corrente Pós-sináptica Inibitória
IV	Corrente-voltagem
LA	Limiar de Atividade
mGluR	Receptor Metabotrópico de Glutamato
Mpm	Moda do Potencial de Membrana
NCD	Núcleo Coclear Dorsal
Ni ²⁺	Íon Níquel
PAs	Potenciais de Ação
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PKI	Fosfatidilinositol Quinase
R _m	Resistência de Entrada
RMP	Potencial de Repouso
TV	Tuberculoventrais
TTX	Tetrodotoxina
VI	Voltagem-corrente
T _m	Constante de Tempo da Membrana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 O Núcleo Coclear Dorsal	23
1.2 Os Neurônios <i>Cartwheel</i>	25
1.3 Correntes Subliminares e Padrões de Atividade Neuronal	29
1.4 Justificativa/Motivação	34
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais e Preparação das Fatias	35
3.2 Preparação das Soluções e Drogas.....	36
3.3 Eletrofisiologia e Protocolos de Estimulação	38
3.4 Parâmetros e Análises em <i>Current-Clamp</i> e <i>Voltage-Clamp</i>	41
3.5 Classificação dos Fenótipos em <i>Active</i> e <i>Quiet</i>	46
3.6 Experimentos	49
3.7 Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Diferenças eletrofisiológicas entre os fenótipos <i>Active</i> e <i>Quiet</i> , e suas respectivas proporções populacionais.	51
4.2 Riluzole despolariza neurônios <i>Active</i> , provoca uma pequena hiperpolarização nos neurônios <i>Quiet</i> e altera marcadamente o limiar de atividade de ambos os fenótipos. INa_p é igualmente expressa nos dois fenótipos.	55
4.3 Ba^{2+} 100 μM produz despolarização acentuada, aumento da resistência e padrão de atividade predominantemente tônico em ambos fenótipos. IK_{ir} possui componente sem retificação no fenótipo <i>Quiet</i>	61
4.4 Tolbutamida não produz efeitos sob os neurônios <i>Active</i> e gera atividade espontânea nos neurônios <i>Quiet</i> , alterando os parâmetros para valores típicos do fenótipo <i>Active</i>	67
4.5 Neurônios <i>Active</i> adquirem potencial de repouso e parâmetros eletrofisiológicos característicos do fenótipo <i>Quiet</i> por ação da Diazoxida.....	73

4.6 Ba^{2+} 5mM despolariza o potencial de membrana para um valor médio positivo e eleva marcadamente a resistência de membrana.	78
4.7 Baclofen produz hiperpolarização e diminui a resistência de entrada em neurônios <i>Active</i> e <i>Quiet</i> ; os efeitos não são alterados por aplicação simultânea de Tolbutamida.....	83
4.8 ZD7288 produz hiperpolarização acentuada em ambos os fenótipos. Neurônios <i>Actives</i> tornaram-se silentes e a I_h apresentou menor magnitude nos neurônios <i>Quiet</i>	90
4.9 DHPG despolariza o potencial de membrana nos dois fenótipos sem afetar a I_h	97
4.10 Ni^{2+} 50uM não produz efeitos significativos; Ni^{2+} 500uM e Mibefradil despolarizam o potencial de membrana dos neurônios CW. ICa_T não foi detectada nos registros em <i>Voltage-Clamp</i>	99
5. DISCUSSÃO.....	107
6. CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
APÊNDICE: DIVERSIDADE FENOTÍPICA DOS NEURÔNIOS <i>CARTWHEEL</i>	134

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Núcleo Coclear Dorsal

O Nucleo Coclear Dorsal (NCD) é uma estrutura integrativa do sistema auditivo, pertencente ao complexo dos núcleos cocleares, localizado na região dorsolateral do tronco encefálico. Esse núcleo recebe informações sensoriais primárias do nervo auditivo e informações multimodais provenientes de diversas regiões cerebrais, como os núcleos vestibulares, núcleo trigemial e córtice somatosensorial, assim como informações de estações superiores da via auditiva, como o colículo inferior e córtex auditivo (Balakrishnan e Trussell, 2008; Young e Oertel, 2004). A integração da informação auditiva com informação somatosensorial, especialmente relativa à posição e movimentos da cabeça e pavilhões auditivos, está relacionada às duas funções propostas para o NCD: localização (detecção da origem) do som no plano vertical e supressão (cancelamento) dos ruídos sonoros produzidos pelas estruturas internas do organismo (Young e Davis, 2002; Oertel e Young, 2004). A primeira das funções foi bem estabelecida em estudos com gatos (Sutherland et al., 1998; May, 2000), enquanto a segunda foi recentemente demonstrada em camundongos (Singla et al., 2017).

O NCD é único no tronco encefálico por possuir uma circuitaria e organização laminar remanescentes das encontradas no cerebelo, sendo reconhecido como uma estrutura *Cerebellar-Like*. Em ratos, camundongos e gatos, 3 camadas são claramente reconhecidas: a camada molecular (mais externa), é percorrida em toda sua extensão pelas fibras paralelas, nome dado aos longos axônios dos neurônios granulares, os quais conduzem as informações multissensoriais; a camada profunda contém as terminações do nervo auditivo (VIII nervo craniano), as quais são organizadas de forma tonotópica, ou seja, conduzem informações de frequências sonoras específicas; e por fim, na camada fusiforme (intermediária), estão localizados os somas dos neurônios Fusiformes, os principais neurônios de saída do núcleo (saída para o núcleo central do colículo inferior), responsáveis pela integração das informações recebidas das duas outras camadas (Young e Davis, 2002; Oertel e Young, 2004).

A circuitaria básica (simplificada) e principais neurônios do NCD são mostrados na Figura 1.1. Podemos verificar que as fibras paralelas formam sinapses excitatórias (glutamatérgicas) com os dendritos apicais dos neurônios fusiformes (FUS) e com os dendritos dos neurônios *Cartwheel* (CW), enquanto as fibras auditivas (também glutamatérgicas) excitam os dendritos basais dos neurônios fusiformes e os dendritos dos neurônios Tuberculoventrais (TV). Como ambos os neurônios CW e TV são interneurônios inibitórios (glicinérgicos), um microcircuito de inibição anterógrada (*feed-forward*) é formado entre eles e os neurônios fusiformes, sendo caracterizado pelo pareamento de estímulos sinápticos excitatórios com os inibitórios. A este respeito, o controle exercido pelos neurônios CW sobre excitabilidade dos neurônios fusiformes, em resposta a ativação pelas fibras paralelas, já foi bem estabelecido (Zhao et al., 2009; Doiron et al., 2011).

Figura 1.1. Esquema do circuito básico do NCD e seus neurônios principais. As fibras paralelas da camada molecular conduzem informações multissensoriais e estimulam os dendritos apicais dos neurônios Fusiformes (FUS), neurônios de saída do núcleo para o colículo inferior (CI), e *Cartwheel* (CW), interneurônios glicinérgicos, principal fonte de inibição sobre os neurônios FUS. Fibras auditórias da camada profunda estimulam os dendritos basais dos neurônios FUS e os neurônios Tuberculoventrais (TV), também interneurônios glicinérgicos. Os neurônios GABAérgicos estrelados do núcleo coclear ventral (NCV) fornecem a inibição do tipo *broadband* para as FUS e TV. Também são mostrados os neurônios estrelados do NCD, GABAérgicos (S).

Apesar de alguns debates ainda persistirem, evidências recentes apontam para a existência em humanos e outros primatas das 3 camadas do NCD e uma variedade similar de neurônios (Rubio et al., 2008; Wagoner e Kulesza, 2009; Baizer

et al., 2012; Baizer et al., 2014). Os neurônios *Cartwheel*, em particular, foram identificados em tecido humano por Ryugo e colaboradores (1995) através de marcação imunocitoquímica para o receptor de inositol tri-fosfato, um marcador dos neurônios Purkinje cerebelares, os quais compartilham, além das propriedades bioquímicas, uma série de características eletrofisiológicas, genéticas, neuroquímicas e morfológicas. Por esta razão e pela função no NCD, alguns autores sugerem que os neurônios CW sejam equivalentes aos neurônios Purkinje do cerebelo (Mugnaini e Morgan 1987; Berrebi et al., 1990; Berrebi e Mugnaini, 1991; Ryugo et al., 1995).

O NCD tem recebido atenção adicional na comunidade de pesquisadores do sistema auditivo, devido seu envolvimento com o *Tinnitus* (“zumbido”), distúrbio sensorial crônico caracterizado pela percepção subjetiva de sons inexistentes (*phantom perception*) e relacionado à perda auditiva e traumas acústicos. A hiperatividade do NCD tem sido implicada na gênese do *Tinnitus* por vários estudos em modelos animais (Brozoski et al., 2002; Kaltenbach et al., 2005; Kaltenbach, 2007; Kaltenbach e Afman, 2000; Holt et al., 2010; Li et al., 2013). Como exemplo, um declínio da neurotransmissão inibitória no NCD foi verificado em estudos com animais apresentando evidência comportamental do distúrbio e também em estudos empregando o agente indutor de *Tinnitus* salicilato de sódio, droga cuja ação causa desacoplamento da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, provocando alterações no metabolismo celular (Brozoski et al., 2002; Wang et al., 2006; Wang et al., 2009; Wang et al., 2011; Middleton et al., 2011; Zugaib et al., 2016). Além disso, a ablação bilateral do NCD previne o desenvolvimento de *Tinnitus* em ratos (Brozoski et al., 2011). Como o distúrbio está relacionado à perda auditiva, foi postulado que alterações compensatórias na neurotransmissão da via somatosensorial poderiam causar um desbalanço da excitação-inibição no NCD (Dehmel et al., 2012; Kanold et al., 2011). Como um exemplo suportando esta teoria, foi observado que a lesão do nervo auditivo de animais experimentais potencializa a neurotransmissão nas fibras paralelas (Shore et al., 2007; Zeng et al., 2009).

1.2 Os Neurônios *Cartwheel*

Com respeito à função fisiológica exercida no NCD, os neurônios CW distinguem-se como sendo a principal fonte de inibição sobre os neurônios

fusiformes por uma série de fatores, três dos quais merecem destaque. Primeiro: constituem a maior população de interneurônios inibitórios do NCD; segundo: a maioria possui atividade espontânea, ou seja, disparam potenciais de ação mesmo na ausência de estímulos sinápticos; e terceiro: são densamente innervados pelas fibras paralelas, recebendo forte estimulação excitatória de suas terminações (Young e Davis, 2002; Oertel e Young, 2004; Mancilla e Manis, 2009).

Estes neurônios ainda apresentam várias características únicas no NCD. Entre elas destaca-se a capacidade de disparar potenciais de ação complexos (*Complex Spikes*), salvas curtas de potenciais de ação ($<100\text{ms}$) em alta frequência ($\approx 100\text{Hz}$) sobrepostas a uma onda lenta de despolarização (Zhang e Oertel, 1993b; Manis et al., 1994; Kim e Trussell, 2007). De forma distinta dos neurônios Purkinje, uma boa parte dos neurônios CW disparam potenciais de ação complexos espontaneamente, e de diferentes tipos. Os neurônios CW também se distinguem por expressar um amplo complemento/repertório de canais iônicos. Esta diversidade de canais é traduzida em mecanismos iônicos muito dinâmicos, que contribuem para a geração de uma variedade de padrões de atividade e fenótipos, como neurônios com disparo em salvas (*bursting*), disparo tônico, combinações entre os dois modos (padrões mistos) e padrões muito irregulares (caóticos), para os quais uma classificação simples não é possível. Numa mesma célula é possível identificar variações na frequência de disparo simples ou complexo, assim como variações na duração e formas das salvas de potenciais, algumas contendo potenciais complexos, outras apenas potenciais simples. Diferentes formas de regimes biestáveis também podem ser observadas, e até mesmo transições fenotípicas. Alguns exemplos da diversidade fenotípica são dados no Apêndice. No entanto, os fenótipos podem ser agrupados em duas categorias amplas, neurônios com atividade espontânea, os quais constituem mais de 70% da população, e neurônios silentes ou quiescentes, os quais não disparam potenciais de ação espontaneamente (Kim e Trussell, 2007; Zugaib et al., 2016), como mostrado na Figura 1.2.1.

Figura 1.2.1. Os diferentes fenótipos dos neurônios *Cartwheel* podem ser agrupados em duas categorias amplas, neurônios com atividade espontânea (acima) e neurônios silentes (abaixo). Asteriscos (*) indicam ocorrência de dois potenciais de ação complexos. Os exemplos são do próprio autor.

Alguns padrões de disparo observados nos neurônios CW foram estudados em detalhes por Kim e Trussell (2007), usando camundongos como modelo animal. Os autores identificaram as diversas condutâncias iônicas que produzem os potenciais de ação simples e duas formas de potenciais de ação complexos, e também quais destas condutâncias controlam as frequências de disparo. Como mostrado na Figura 1.2.2, canais de Na^+ sensíveis a voltagem produzem os potenciais de ação rápidos, enquanto canais de Ca^{2+} dos tipos L e P/Q produzem os potenciais de ação lentos e também participam das ondas lentas de despolarização tardias. Os canais de Ca^{2+} do tipo-T, por sua vez, geram as pós-despolarizações que sucedem os potenciais de ação simples, as quais foram hipotetizadas como o “gatilho” dos potenciais de ação complexos. Canais de K^+ ativados por Ca^{2+} e voltagem, BK e SK, controlam a repolarização e frequência dos potenciais de ação, assim como a duração das salvas. Por fim, os canais de Na^+ persistentes produzem a onda de despolarização que inicia o disparo dos potenciais de ação. Estudos

posteriores feitos por Bender e Trussell (2009) ainda demonstraram que os canais de Ca^{2+} do tipo-R e tipo-T estão colocalizados com os canais de Na^+ no segmento inicial do axônio dos neurônios CW, e controlam o padrão temporal (*timing*) e número de “*spikelets*” (indicados na Fig. 1.2.2 abaixo) dos potenciais de ação complexos, assim como a própria frequência de disparo dos potenciais de ação complexos isolados.

Figura 1.2.2. Modelo de Kim e Trussell (2007) mostrando as contribuições de diferentes condutâncias iônicas na geração de padrões de disparo observados nos neurônios *Cartwheel*. O potencial complexo do tipo *prompt/onset* também é disparado isoladamente, tanto de forma espontânea como evocada/induzida. Figura extraída de Kim e Trussell (2007).

Zugaib 2016 investigou os efeitos de doses indutoras de *Tinnitus* de salicilato de sódio sobre a neurotransmissão do NCD e propriedades intrínsecas dos principais grupos de neurônios. Nos seus experimentos, fatias do NCD de ratos Wistar foram incubadas por período prolongado (> 1 hora) em solução contendo 1,4mM de salicilato de sódio (concentração medida no fluido cerebrospinal de animais com evidência psicofísica de *Tinnitus*, Jastreboff et al., 1986) e permaneceram constantemente expostas a esta concentração da droga durante os registros eletrofisiológicos (a indução de *Tinnitus* por salicilato mostrou-se reversível em estudos in vivo, Yang et al., 2007). Em relação aos neurônios CW foi observada uma redução da proporção dos neurônios com atividade espontânea, de 73% para 38% (a proporção de neurônios silentes aumentou, portanto, de 27% para 62%), sendo que a taxa de disparo também foi reduzida. Além disso, de forma

concomitante, foi observada uma redução da frequência das IPSCs (Correntes Pós-sinápticas Inibitórias) espontâneas sobre os neurônios fusiformes, um achado certamente relacionado com a redução da atividade dos neurônios CW. Tendo em vista que o salicilato é um desacoplador metabólico, os resultados de Zugaib 2016 sugeriram uma associação entre o estado metabólico e nível de atividade dos neurônios CW.

1.3 Correntes Subliminares e Padrões de Atividade Neuronal

Condutâncias subliminares são condutâncias ativas (ou ativadas) em potenciais próximos ao potencial de repouso de um neurônio, ou mais precisamente, ativas em potenciais negativos em relação à faixa estreita de potencial que quando atingida desencadeia o disparo de potenciais de ação. Numa definição mais ampla ou geral, são correntes ativas abaixo (potenciais mais negativos) do limiar do disparo de um neurônio. Uma vasta literatura já existe sobre o papel de correntes subliminares no controle do potencial de repouso e padrões de atividade neuronal (exemplos de trabalhos explorando o tema, além dos que serão discutidos nesta seção, incluem Raman et al., 2000; Takakusaki e Kitai, 1997; Schwarz et al., 1997; Jackson et al., 2004; Swensen e Bean, 2003; Yamada-Hanff e Bean, 2015; Beatty et al., 2012; Bennett et al., 2000). Ênfase será dada a alguns exemplos pertinentes, como segue.

Um dos neurônios mais bem estudados e ao mesmo tempo muito similares aos neurônios CW (como mencionado no item anterior), são os neurônios Purkinje cerebelares. Nestes neurônios o disparo tônico de potenciais de ação simples é gerado pela corrente de Na^+ persistente (I_{NaP}) e sua inibição torna os neurônios silentes (Raman e Bean, 1999). Williams e colaboradores (2002) mostraram que a inibição da corrente catiônica ativada por hiperpolarização (I_h) provoca uma forma de biestabilidade em que são registradas transições espontâneas entre períodos de disparo tônico e quiescência. Os autores propuseram que a I_h manteria o potencial de membrana na faixa de ativação da I_{NaP} , possibilitando assim que a atividade tônica dos neurônios Purkinje permanecesse ininterrupta. Ainda neste estudo, o bloqueio de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} gerou (K_{Ca}) uma segunda forma de biestabilidade, caracterizada por períodos longos de quiescência (vários minutos)

separados por salvas (<10 segundos) de disparo irregular e de alta frequência (>100 Hz).

Nos neurônios CW, Bender e colaboradores (2012), em estudo feito com camundongos, demonstraram que o bloqueio farmacológico direto (por Ni^{2+} ou TTA-P2) ou mediado pela dopamina de canais de Ca^{2+} do tipo-T, localizados no segmento inicial do axônio, converte reversivelmente o padrão de disparo em salvas de potências de ação (*spontaneous bursting*), em disparo regular de potenciais de ação simples (disparo tônico), dois subtipos de fenótipo dentre os que podem ser observados em neurônios CW com atividade espontânea (Fig. 1.3.1). De forma interessante, os autores também mostraram que o agonista de receptores D_3 Quinpirol (1 μM) não altera a atividade dos neurônios CW com disparo tônico simples. O resultado sugeriu que neste subtipo de fenótipo o potencial de membrana não atinge valores suficientemente hiperpolarizados para liberar os canais de Ca^{2+} do tipo-T da inativação. Com referência ao modelo de Kim e Trussel (2007) mostrado na Figura 1.2.2, este trabalho ampliou a contribuição da corrente de Ca^{2+} do tipo-T para a geração de padrões de atividade nos neurônios CW.

Figura 1.3.1. Experimentos de Bender e colaboradores (2012) para investigar o papel da corrente de Ca^{2+} do tipo-T nos neurônios CW, utilizando a técnica de *Cell-Attached Patch Clamp*. **A:** registros da atividade de neurônios CW feitos simultaneamente a iontoforese de Ni^{2+} ($9,1 \pm 2,8\text{nA}$ por 4s; pipeta com 100mM de NiCl_2) sobre o segmento inicial do axônio (AIS). Uma transição do padrão de disparo em salvas de potenciais (*burstings*) para o disparo regular de PAs (disparo tônico) é observada. **B:** em outro experimento a mesma transição é gerada por aplicação no banho de 1 μM do antagonista seletivo TTA-P2, que nesta concentração inibe os canais de Ca^{2+} do tipo-T mas não os do tipo-R. Figura adaptada de Bender et al. (2012).

Leão e colaboradores (2012) investigaram os mecanismos iônicos subjacentes à geração de dois fenótipos distintos observados nos neurônios fusiformes do NCD. Metade da população apresentava atividade espontânea, sendo denominados neurônios **Actives**, enquanto a outra metade era composta de neurônios silentes (quiescentes) ou com nível de atividade muito baixa (frequência de disparo inferior a 0,5Hz), denominados **Quiets**. Os autores mostraram que o potencial de repouso dos neurônios fusiformes é controlado basicamente por uma corrente de vazamento permeável ao Na^+ , a qual despolariza a membrana, e pela corrente de K^+ retificadora de entrada (IK_{ir}), que hiperpolariza a membrana. Nos neurônios *Actives*, uma menor expressão dessa última condutância resulta num potencial de repouso que ultrapassa o limiar de disparo espontâneo de potenciais de ação gerado pela corrente de Na^+ persistente (INa_p), enquanto a maior expressão da IK_{ir} mantém o potencial de repouso abaixo desse limiar, gerando assim os neurônios *Quiets*. Outra condutância subliminar, a corrente catiônica ativada por hiperpolarização (I_h), também foi estudada nos neurônios fusiformes. Foi observado que a I_h varia sua expressão inversamente a IK_{ir} , e que este mecanismo, embora não contribua diretamente para a determinação dos fenótipos, mantém a resistência de entrada similar entre os neurônios *Actives* e *Quiets* (Ceballos et al., 2016).

Além dos exemplos dados, a IK_{ir} é bem conhecida na literatura por controlar o potencial de repouso de vários outros tipos de neurônios, mais especificamente por manter (ou estabilizar) o potencial de repouso próximo ao potencial de reversão do K^+ (E_K) (Uchimura et al., 1989; Reimann e Ashcroft 1999; Hibino et al., 2010). A I_h é conhecida por gerar padrões rítmicos de atividade neuronal e ser diretamente modulada (positivamente) pelos nucleotídeos cíclicos AMP_c e GMP_c (Biel et al., 2009; Wahl-Schott e Biel 2008; He et al., 2014). A INa_p provoca uma despolarização continuada/sustentada que em muitos casos leva o potencial de membrana a atingir o limiar de disparo, gerando assim atividade (ou disparo) espontânea (Taddese e Bean, 2002; Do e Bean, 2003; Kuo et al., 2006; Harvey et al., 2006; Yamada-Hanff e Bean, 2013). A ICa_T também é bem conhecida por gerar padrões rítmicos de atividade, particularmente, por gerar salvas de potenciais após hiperpolarizações do potencial de membrana (conhecidas como “*rebound bursts*”), em geral mais negativas que -80mV. Sua inativação é muito rápida, entre 50 a 200 milisegundos, sendo que em -60mV a inativação dos canais Ca_T é quase completa (Talavera e Nilius, 2006; Perez-Reyes, 2003). Cain e Snutch (2010) revisaram as contribuições

das isoformas dos canais Ca_T , em diferentes tipos de neurônio, para o disparo em salvas (*bursting*) e disparo tônico, assim como para as transições de um padrão de atividade para outro. Outros trabalhos explorando o papel destes canais no controle da excitabilidade e padrões de atividade neuronal, assim como sua complexa regulação, são Lambert et al. (2014) e Iftinca e Zamponi, 2008.

A dependência de potencial e algumas características das correntes subliminares IK_{ir} , I_h e INa_p são mostradas na Figura 1.3.2. Os exemplos são dos trabalhos mencionados de Leão et al. (2012) e Ceballos et al. (2016). Os registros eletrofisiológicos foram feitos por meio da técnica de *Whole-Cell Patch Clamp* em fatias do NCD de ratos Wistar. Uma importante propriedade comum entre a I_h , a INa_p e a IK_{ir} , é que todas são correntes não-inativantes (não sofrem inativação).

Figura 1.3.2. Características das correntes subliminares $I_{K_{ir}}$, I_h e I_{Na_p} . **A:** correntes produzidas por hiperpolarizações dos neurônios fusiformes, de acordo com o protocolo de voltagem ilustrado a direita (i). Corrente sensível ao Ba^{2+} 200 μ M, um inibidor da $I_{K_{ir}}$, obtida por subtração das correntes antes e após aplicação do Ba^{2+} (ii). Relação corrente-voltagem da $I_{K_{ir}}$ mostrando a retificação característica desta corrente em potenciais mais positivos que o potencial de reversão do K^+ (iii). **B:** correntes produzidas por hiperpolarizações da membrana antes e após aplicação do ZD7288 20 μ M, um inibidor seletivo da I_h (protocolo de voltagem semelhante ao mostrado para a $I_{K_{ir}}$) (i). Corrente sensível ao ZD7288 (ii) e relação corrente-voltagem da I_h (iii). Tipicamente a corrente é ativada por pulsos de voltagem negativos a -50mV, atinge um pico entre -120 e -130mV e possui um potencial de reversão entre -30 e -20mV (I_h é uma corrente mista de Na^+ e K^+). **C:** correntes em resposta a um protocolo de voltagem do tipo rampa, como mostrado a direita, antes e após aplicação de 1 μ M de TTX, um inibidor dos canais de Na^+ dependentes de potencial, e portanto da I_{Na_p} (i). Corrente sensível ao TTX 1 μ M gerada por subtração das correntes em (i); ativação da I_{Na_p} ocorre em aprox. -70mV e sua condutância (ou magnitude) aumenta rapidamente, alcançando um pico em -50mV (ii). Extraído de Leão et al., 2012 e Ceballos et al., 2016.

1.4 Justificativa/Motivação

As condutâncias que contribuem para gerar diferentes padrões de disparo observados nos neurônios *Cartwheel* já foram bem estudadas. No entanto, não são conhecidos os mecanismos iônicos que determinam se o neurônio terá atividade espontânea ou será silente (quiescente). Dado o papel central dos neurônios CW na inibição dos neurônios fusiformes e as evidências que relacionam a hiperatividade dos últimos com a gênese do *Tinnitus*, entendemos ser fundamental compreender-se melhor como e quais condutâncias subliminares geram a atividade espontânea dos neurônios CW.

2. OBJETIVOS

O objeto geral foi investigar o papel das condutâncias subliminares no controle do potencial de membrana e propriedades intrínsecas dos neurônios *Cartwheel*. O objetivo principal, e específico, foi identificar quais destas condutâncias determinam o fenótipo **Active**, neurônios com atividade espontânea, e/ou **Quiet**, neurônios silentes ou com nível muito reduzido de atividade, indicando os mecanismos subjacentes. A hipótese de trabalho foi que diferenças na expressão de uma ou poucas condutâncias poderia ser suficiente para gerar um fenótipo ou o outro.

Para tanto, foram feitos registros eletrofisiológicos em fatias do NCD de ratos usando as técnicas de *Whole Cell Voltage-Clamp* e *Current-Clamp*, conjuntamente com a utilização de antagonistas/agonistas seletivos de canais iônicos e outras ferramentas farmacológicas. Foram investigadas a corrente de K^+ retificadora de entrada ($I_{K_{ir}}$), de K^+ sensível a ATP ($I_{K_{ATP}}$), de K^+ de vazamento ($I_{K_{Leak}}$), de Na^+ persistente (I_{Na_p}), de Ca^{2+} do tipo-T (I_{Ca_T}), e a catiônica ativada por hiperpolarização (I_h).

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Animais e Preparação das Fatias

Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 18 e 25 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMRP; 007/2017).

Os animais foram primeiramente anestesiados com Isoflurano e decapitados logo após o estágio profundo ser confirmado. O crânio foi então aberto expondo todo cérebro e tronco encefálico. O nervo vestibulococlear (VIII nervo craniano) foi cuidadosamente seccionado (bilateralmente) para impedir danos ao NCD ou avulsão da estrutura. O tronco encefálico foi separado e transferido para uma placa de Petri contendo solução de corte (descrição no item 3.2, seguinte) previamente oxigenada e resfriada ($\approx 4^{\circ}\text{C}$), onde as meninges foram removidas. Em seguida a superfície rostral foi rapidamente colada na base do vibratomo (VT 1000 Plus) e a superfície ventral apoiada sobre um pequeno bloco de ágar, mantendo assim o tronco em posição vertical. A câmara do vibratomo foi preenchida com a mesma solução de corte resfriada, agora continuamente gaseificada por solução carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). De 3 a 5 fatias coronais de $200\mu\text{M}$ do NCD foram bilateralmente obtidas. A circuitaria básica do NCD é preservada, dada à organização anatômica laminar do núcleo.

As fatias foram então transferidas para um béquer adaptado de 100mL contendo solução de registro (aCSF: sigla em inglês para “Fluido Cerebrospinal Artificial”; composição na Tabela 3.2.1), onde permaneceram incubadas em banho-maria a temperatura de 35°C por 45 minutos. Encerrada esta etapa, foram mantidas a temperatura ambiente por mais 40 minutos antes de serem transferidas para o *setup* de registro eletrofisiológico. A solução foi continuamente gaseificada com mistura carbogênica ($95\%\text{O}_2 + 5\%\text{CO}_2$) em todas as etapas e por toda duração do experimento.

3.2 Preparação das Soluções e Drogas

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade $\geq 18\text{M}\Omega$). Suas composições químicas são descritas a seguir.

Solução de registro ou **aCSF** (*Artificial Cerebrospinal Fluid*), em milimolares (mM): NaCl (125); NaHCO_3 (25); glicose (10); KCl (2,5); CaCl_2 (2); NaH_2PO_4 (1,25) e MgCl_2 (1). Durante o preparo, para todos os experimentos, foi acrescentado no aCSF os bloqueadores glicinérgicos e gabaérgicos estriquinina (STR; $1\mu\text{M}$) e picrotoxina (PTX; $20\mu\text{M}$), respectivamente. O bloqueador glutamatérgico DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona; $10\mu\text{M}$) foi adicionado à solução apenas no experimento com BaCl_2 5mM, devido a despolarização acentuada causada pela droga e consequente intensificação da liberação espontânea de glutamato no NCD, que é baixa em condições fisiológicas. A osmolalidade foi sempre medida após o preparo, resultando em aprox. $295\text{mOsm.kg.H}_2\text{O}^{-1}$. Durante todas as etapas experimentais (item 3.1 e 3.3) a solução foi aerada continuamente por mistura carbogênica, resultando em um pH de aprox. 7,4.

Solução de corte, em milimolares (mM): NaCl (87); sacarose (75); glicose (25); NaHCO_3 (25); MgCl_2 (7); KCl (2,5); NaH_2PO_4 (1,25) e CaCl_2 (0,2). A osmolalidade medida foi de aprox. $335\text{mOsm.kg.H}_2\text{O}^{-1}$ e o $\text{pH}\approx 7,4$ após aerada em mistura carbogênica por 10 minutos. A composição exata desta solução foi estabelecida empiricamente ao longo de muitos experimentos com o NCD realizados no laboratório.

A composição da **solução interna** foi, em milimolares (mM): gluconato de K^+ (130); KCl (20); ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico (HEPES) (10); fosfocreatina sódica (10); ATP-Mg (2); GTP-Na (0,2) e ácido etileno glicol tetracético (EGTA) (0,1). Osmolalidade medida foi de aprox. $290\text{mOsm.kg.H}_2\text{O}^{-1}$ e o $\text{pH}=7,3$ (corrigido com KOH).

Tabela 3.2.1 – Composição química das soluções utilizadas na preparação histológica e registros eletrofisiológicos. A concentração das substâncias é dada em milimolar (mM).

Solução de registro (aCSF)		Solução de Corte		Solução Interna	
NaCl	125	NaCl	87	gluconato de K ⁺	130
NaHCO ₃	25	sacarose	75	KCl	20
glicose	10	glicose	25	HEPES	10
KCl	2.5	NaHCO ₃	25	fosfocreatina sódica	10
CaCl ₂	2	MgCl ₂	7	ATP-Mg	2
NaH ₂ PO ₄	1.25	KCl	2.5	GTP-Na	0.2
MgCl ₂	1	NaH ₂ PO ₄	1.25	EGTA	0.1
Picrotoxina	0.02	CaCl ₂	0.2		
Estriquinina	0.001				
295mOsm/KgH ₂ O ⁻¹		335 mOsm/KgH ₂ O ⁻¹		290 mOsm/KgH ₂ O ⁻¹	
pH: 7,4 (aerada 95%O ₂ , 5%CO ₂)		pH: 7,4 (aerada 95%O ₂ , 5%CO ₂)		pH: 7,3 (corrigido com KOH)	

Todas as drogas (listadas na Tabela 3.2.2, abaixo) foram preparadas como solução estoque 1000X concentrada, armazenadas em alíquotas de 1 ou 0,5mL em *freezer* (-20°C), e diluídas no aCSF no momento do experimento. Para as drogas solubilizadas em DMSO (Dimetilsulfóxido), a concentração final do solvente na perfusão não ultrapassou 1%.

Tabela 3.2.2 – Informações sobre os bloqueadores sinápticos e agonistas/antagonistas de canais iônicos usados.

Nome	Solvente	Fornecedor
Bloqueadores Sinápticos		
Estriquinina	H ₂ O	Sigma Aldrich
Picrotoxina	H ₂ O	Sigma Aldrich
DNQX	DMSO	Sigma Aldrich
Agonistas/Antagonistas de canais iônicos		
BaCl ₂	H ₂ O	Sigma Aldrich
Tolbutamida	DMSO	Sigma Aldrich
Diazoxida	DMSO	Sigma Aldrich
Riluzole	DMSO	Tocris
TTX-citrato	H ₂ O	Alomone
NiCl ₂	H ₂ O	Sigma Aldrich
Mibefradil	DMSO	Cayman
ZD7288	DMSO	Tocris
Agonistas de receptores metabotrópicos		
Baclofen	DMSO	Tocris
DHPG	H ₂ O	Tocris

3.3 Eletrofisiologia e Protocolos de Estimulação

Após encerramento das etapas descritas no item 3.1, as fatias foram transferidas para a câmara de perfusão do *setup*, onde foram fixadas por uma rede adaptada feita com fios de *nylon* presos a um suporte de platina. O fluxo da solução de registro foi ajustado para 1-2mL/min (controle por gravidade ou bomba peristáltica), e a temperatura estabilizada entre 32 e 34°C por aquecedor *inline* (*Warner Instruments*). Os neurônios foram visualizados com uma objetiva de imersão de 63X em um microscópio *upright* (Olympus BX51WI) com ótica DIC/IR (Contraste Diferencial de Interferência/Infravermelho).

Para o registro utilizamos microeletrodos feitos a partir de capilares de borossilacato, confeccionados com um estirador horizontal (P87, *Sutter Instruments*) e resultando em uma resistência de 3 a 6 MΩ quando preenchidos por solução interna de gluconato de K⁺ (composição Tabela 3.2.1). Os registros eletrofisiológicos foram adquiridos por amplificador EPC-10 (HEKA Elektronik) com uma taxa de aquisição de 10 kHz e filtradas (Bessel passa-baixa) a 3 kHz.

Os neurônios CW foram identificados pela sua posição na camada molecular do NCD e morfologia (Tzonoupolous et al., 2004), porém a confirmação só se deu após acesso a configuração *Whole-Cell* e verificação do disparo de ao menos um potencial complexo (*complex spike*). O rompimento da membrana foi feito apenas após obtenção do gigaselo (resistência $>1\text{G}\Omega$).

Os protocolos de estimulação foram iniciados 3 a 5 minutos após aquisição do *Whole Cell* (tempo de estabilização do registro e diálise da solução interna). Em alguns experimentos utilizamos a técnica *Cell-Attached* (resistência de acesso de 20 a $50\text{M}\Omega$) para localizarmos neurônios silentes e posteriormente prosseguirmos com a aquisição do *Whole-Cell*. Isto foi feito para que um número suficiente de neurônios *Quiets* fosse registrado por grupo experimental, como sua proporção populacional é menor. A resistência de acesso máxima aceita foi de $20\text{M}\Omega$. Registros em que ocorreram variações de mais de 20% na resistência de acesso foram desconsiderados.

Em todos os experimentos foram aplicados os mesmos protocolos de estimulação, cada um sendo repetido ao menos uma vez em cada condição (controle e tratamento). O intervalo entre as aplicações foi de 30 a 60 segundos. Em geral, as drogas foram perfundidas por 15 a 20 minutos (as exceções serão mencionadas na seção Resultados).

Os protocolos no modo **Current-Clamp** foram:

Protocolo VI: empregado para o registro das relações voltagem-corrente, consistiu na aplicação de 15 pulsos quadrados de corrente, de um 1 segundo cada, partindo de um primeiro pulso de -300pA até o último pulso de $+400\text{pA}$, com incrementos de $+50\text{pA}$. Antes do primeiro pulso e no intervalo entre os pulsos (90 segundos), o potencial de membrana foi estabilizado em torno de -80mV (denominamos “potencial de controle”) por injeção de uma quantidade de corrente pré-determinada, sempre suficiente para suspender o disparo de potenciais de ação dos neurônios *Active*. Esta quantidade de corrente variou de -250pA a $+150\text{pA}$ a depender do nível de atividade dos neurônios *Actives* ou do potencial de repouso (RMP) dos neurônios *Quiets*, e da resistência da membrana. De forma geral, quanto maior o nível de atividade do neurônio, maior a corrente negativa injetada, quanto mais hiperpolarizado o RMP em relação ao potencial de controle ($\approx -80\text{mV}$), maior a corrente positiva injetada. Os protocolos VI foram delineados para obtenção das

relações voltagem-corrente (VI) e dos parâmetros resistência de entrada (R_m), constante de tempo da membrana (τ_m), limiar de atividade (LA) e sag (ver item seguinte, 3.4).

Figura 3.3.1. Esquema do protocolo VI. 15 pulsos quadrados de 1 segundo cada são aplicados, partindo de um primeiro pulso de -300pA, até o último pulso de +400pA (incrementos de +50pA). A corrente injetada nos intervalos dos pulsos para suspender o disparo (neurônios *Active*) e estabilizar o potencial de membrana em torno de -80mV (potencial de controle) variou de neurônio para neurônio e, como a figura sugere, seu valor não é somado ao valor da corrente de cada pulso (o valor da corrente de cada pulso é absoluto).

Protocolo I0: consistiu no registro do potencial de membrana sem injeção de corrente ($I=0pA$) por 52 segundos, ou seja, no registro do comportamento espontâneo dos neurônios, dos padrões de atividade (neurônios *Actives*) ou do potencial de repouso (neurônios *Quiets*) gerados intrinsecamente.

Os protocolos no modo **Voltage-Clamp** foram:

Protocolo IV: empregado para obtenção das relações corrente-voltagem (curvas IV), consistiu em pulsos quadrados de 4 segundos de duração, partindo de -115mV e aumentando gradativamente por incrementos de +10mV até -25mV, totalizando 10 pulsos. Para alguns experimentos os pulsos iniciaram em -110mV (indicado na seção Resultados). O intervalo entre os pulsos foi de 1 minuto. O valor do potencial definido para este intervalo, ou potencial de *holding*, variou de acordo com a condutância investigada, sendo indicado para cada grupo experimental. O protocolo IV foi delineado para obtenção da relação voltagem-corrente (curva IV) e a partir dela, das correntes sensíveis a cada droga e suas respectivas medidas de condutância (g), e também da resistência de entrada (R_m) (ver item seguinte, 3.4).

Figura 3.3.2. Esquema do protocolo IV. 10 pulsos quadrados de tensão de 4 segundos cada são aplicados, partindo de -115mV ou -110mV, a depender do grupo experimental (indicado na seção Resultados). A cada pulso seguinte +10mV é somado. O potencial de *holding* (neste exemplo é de -65mV) variou de acordo com a condutância investigada (valor indicado na seção Resultados).

Protocolo rampa: foi aplicado para investigar a I_{Na_p} . Partindo do *holding* de -80mV, o potencial foi mantido em -100mV por 500 milissegundos e em seguida linearmente elevado até -50mV em 4 segundos (12,5mV por segundo).

Figura 3.3.3. Esquema do protocolo rampa. O potencial é grampeado em -100mV por 500 milissegundos e em seguida é linearmente aumentado numa taxa de +12,5mV por segundo até atingir -50mV (duração total da rampa é de 4 segundos).

3.4 Parâmetros e Análises em *Current-Clamp* e *Voltage-Clamp*

Todas as análises descritas a seguir foram feitas utilizando-se rotinas personalizadas escritas no programa IGOR Pro 6.37 (*WaveMetrics*) pelo Dr. André Dagostin. Para todas as medidas de tensão foi somado um potencial de junção líquida de -10mV (Dagostin, 2012).

Análises dos experimentos em *Voltage-Clamp*:

As **relações corrente-tensão (curvas IV; pA/mV)** foram obtidas a partir dos registros gerados pelo protocolo-IV, plotando-se a média da corrente injetada no período estacionário (em geral no último segundo do pulso, 3 a 4s) contra a tensão de cada pulso.

A **corrente sensível (pA)** a cada uma das drogas foi obtida pela subtração das relações IV referentes à condição controle e tratamento (droga).

A **condutância linear** (*slope conductance*; g_{slope} ; **nS**) correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida aplicando-se regressão linear sobre a faixa de maior condutância da corrente (3 pontos foram utilizados).

A **condutância de corda** (g_{corda} ; **nS**) foi calculada para cada neurônio dividindo-se a corrente sensível pela força eletromotriz ($V_m - E_x$; V_m = potencial de membrana; E_x = potencial de reversão da corrente) num ponto fixo, correspondente à voltagem em que o valor máximo (pico) da corrente média foi observado. Em alguns experimentos, o ponto (voltagem) referente ao pico da corrente sensível variou individualmente entre os neurônios. Nestes casos ao invés de calcularmos a g_{corda} somente para um valor fixo de voltagem (usamos o símbolo $g_{\text{corda}}(X)$, sendo X o valor do ponto fixo para cada condutância investigada, ex: $g_{\text{corda}}(-55\text{mV})$), também a calculamos para os pontos de pico individuais, e a média da g_{corda} foi indicada como “ $g_{\text{corda}} \text{ máx}$ ”.

A **resistência de entrada** (R_m ; **M Ω**) foi medida aplicando-se regressão linear na faixa de voltagem -105/-65mV ou -95/-75mV das relações IV. O recíproco do valor do coeficiente angular da reta foi admitido como a R_m .

Análises dos experimentos em **Current-Clamp**:

O **potencial de membrana (mV)** foi obtido a partir dos registros do protocolo I0 (ver item anterior, 3.3). A variação do potencial de membrana observada durante os 52 segundos sem injeção de corrente foi convertida em histogramas de potencial, sendo agrupada em intervalos (*bins*) de 1mV (Fig. 3.4.1, abaixo). O valor correspondente ao pico do histograma (moda estatística) foi usado como medida do potencial de membrana, isto é, foi considerado o potencial mais frequentemente observado. O símbolo **Mpm** foi utilizado para lembrar que adotamos a moda do potencial de membrana e não a média do potencial de membrana como medida/parâmetro. Também calculamos a porcentagem de tempo em que potencial de membrana se manteve próximo da Mpm ao longo dos 52 segundos do registro I0 e adotamos o símbolo “%Mpm” pra esta medida/parâmetro. Para obter a %Mpm o histograma de potencial foi normalizado e as porcentagens referentes ao pico do histograma (Mpm) e as duas barras adjacentes foram somadas (Fig. 3.4.1). Portanto o cálculo considerou a $Mpm \pm 1,5\text{mV}$, ou de outra forma, a porcentagem refere-se a uma faixa de potencial de 3mV. Por exemplo, se a Mpm encontrada para um neurônio foi de -70mV, a %Mpm inclui todos os pontos do intervalo de -68,5mV a -

71,5mV. Este intervalo de $\pm 1,5\text{mV}$ ao redor da Mpm foi arbitrado de forma empírica, de modo que a $\%_{\text{Mpm}}$ não fosse afetada (ou fosse minimamente influenciada) por oscilações de baixa amplitude, tanto as artefactuais para nossa análise, como ruídos e eventuais EPSCs (Potenciais Pós-sinápticos Excitatórios, raros em nossa preparação) espontâneos, como as geradas por mecanismos iônicos intrínsecos. Definida dessa forma, a $\%_{\text{Mpm}}$ correspondeu a uma medida direta e confiável da porcentagem de tempo em que um neurônio CW com baixo nível de atividade se manteve quiescente, uma informação (parâmetro) crucial para que a classificação fenotípica (em *Active* e *Quiet*) pudesse ser realizada de modo rigoroso, como discutimos detalhadamente no item seguinte (3.6) dessa seção. Apenas por conveniência, doravante nos referimos ao parâmetro $\%_{\text{Mpm}}$ como a “porcentagem de tempo ocupada pela Mpm”.

Figura 3.4.1. Histogramas normalizados da variação do potencial de membrana nos registros I0. Valores do eixo vertical são porcentagens (%). O intervalo (*bin*) de cada barra é de 1mV. Asteriscos (*) indicam a moda do potencial de membrana (Mpm), valor adotado como medida do potencial de membrana. O cálculo da porcentagem de tempo ocupada pela Mpm ($\%_{\text{Mpm}}$) incluiu as duas barras adjacentes. A direita são mostrados os registros que geraram os histogramas. **A:** exemplo de histograma bimodal típico de neurônios com padrão (relativamente regular) de disparo em salvas (*bursts*). **B:** exemplo de histograma de um neurônio com disparo tônico.

Relações voltagem-corrente (V_I ; mV/pA) foram obtidas a partir dos protocolos-VI (item anterior, 3.3). Durante o experimento, primeiramente injetou-se uma quantidade de corrente necessária para estabilizar o potencial de membrana em torno de -80mV (potencial de controle) e, em seguida, aplicou-se o protocolo-VI. A média do potencial no período estacionário (em geral nos últimos 250 milissegundos do pulso de 1 segundo) foi plotada contra a corrente injetada em cada pulso.

A **resistência de entrada (R_m ; $M\Omega$)** foi medida aplicando-se regressão linear sobre 4 pontos da relação VI: o ponto referente ao potencial de controle e, partindo

dele, os pontos referentes às 3 primeiras hiperpolarizações. O valor do coeficiente angular da reta foi admitido como a R_m . Em geral não foram identificadas diferenças entre os valores médios obtidos para a R_m medida em *Current-Clamp* e *Voltage-Clamp*. Na seção Resultados, quando não especificado, a medida em *Current-Clamp* foi apresentada, devido ao uso mais tradicional na literatura e por refletir a situação (comportamento) fisiológica do neurônio.

O **limiar de atividade (LA; mV)** também foi extraído dos registros VI e seu valor é definido como sendo a média do potencial de membrana (no estado estacionário) produzido em resposta ao pulso de corrente imediatamente anterior ao pulso que gera o disparo continuado de potenciais de ação (Leão et al., 2012) (ver Fig. 3.4.2 abaixo). É uma estimativa do potencial de membrana sobre o qual um estímulo despolarizante (uma corrente positiva) gera atividade (disparo de PAs), ou de outra forma, corresponde ao potencial de membrana mais positivo que um neurônio pode sustentar/manter sem que o disparo espontâneo de PAs ocorra (por ação de correntes despolarizantes intrínsecas). Nos neurônios *Actives* o LA correspondeu, em boa parte dos casos, ao próprio potencial de controle, cujo valor aproximado (-80mV) foi estabelecido empiricamente injetando-se uma quantidade de corrente suficiente para suspender a atividade espontânea e gerar um potencial de membrana estável.

O **sag (mV)** foi medido a partir da resposta de voltagem da membrana ao segundo pulso hiperpolarizante (-70 a -100pA) partindo do potencial de controle (protocolo VI). O cálculo deste parâmetro é feito subtraindo-se o potencial mais negativo no início da resposta (pico negativo) do potencial médio no estado estacionário (últimos 250ms do pulso) (Fig. 3.4.2 abaixo). O sag é um indicador da presença da I_h ; seu valor é proporcional à ativação e magnitude da I_h , também sendo influenciado pela resistência da membrana (Ceballos et al., 2016). A razão da escolha do segundo pulso hiperpolarizante para medida do sag é explicada na discussão referente à I_h (seção Discussão, item 4.8).

A **constante de tempo da membrana (τ_m ; ms)** foi calculada para o primeiro pulso hiperpolarizante (-20 a -50pA) partindo do potencial de controle (protocolo VI). O valor da τ_m correspondeu a constante de tempo da função exponencial simples ajustada ao decaimento do potencial de membrana logo após a aplicação do pulso de corrente. Matematicamente, a ordenada do ponto $t = \tau_m$ corresponde à aproximadamente 63% da amplitude do decaimento. A medida indica o quão rápida

é a resposta de voltagem da membrana a um estímulo; quanto menor seu valor, menor o tempo necessário para que a resposta máxima seja atingida. Em termos eletrofisiológicos, τ_m é diretamente proporcional à resistência (R_m) e capacitância da membrana (C_m), podendo ser expressa matematicamente por $\tau_m = C_m \times R_m$, assumindo-se apenas as propriedades passivas da membrana.

Figura 3.4.2. Exemplo de registro produzido pela aplicação do protocolo VI (registro VI), ilustrando alguns parâmetros medidos em *Current-Clamp* (ver texto para explicações). Respostas a 5 pulsos sequenciais (3 hiperpolarizantes e 2 despolarizantes) são mostradas. A seta preta menor no primeiro pulso hiperpolarizante indica o ajuste (em vermelho sólido) de uma função exponencial simples ao decaimento do potencial, usado para a medida da τ_m . O sag é mostrado para o terceiro pulso hiperpolarizante, ao invés do segundo, para facilitar a visualização; o ponto vermelho no início do decaimento indica a localização do pico negativo do pulso, usado no cálculo do sag. A linha tracejada vermelha corresponde ao limiar de atividade.

3.5 Classificação dos Fenótipos em *Active* e *Quiet*

A classificação fenotípica dos neurônios CW em *Actives* e *Quiets* foi um aspecto crítico e ao mesmo tempo desafiador deste trabalho, tendo em vista os vários níveis de atividade e natureza dinâmica dos mecanismos iônicos destes neurônios. No entanto, foi possível adotar critérios empíricos para classificação fenotípica, como discutimos a seguir. Toda a discussão refere-se à classificação de registros do comportamento espontâneo (registros I0) em condições controle, acumulados de todos os experimentos realizados ao longo do trabalho/projeto.

Na medida em que dados suficientes foram sendo adquiridos, foi verificado que a maioria dos neurônios CW que apresentavam um nível de atividade espontânea muito baixo, isto é, disparavam esporadicamente potenciais de ação isolados (com frequência $<0,5\text{Hz}$) ou salvas de potenciais curtas, possuíam parâmetros eletrofisiológicos mais próximos ou mesmo semelhantes aos dos neurônios silentes (neurônios que não disparam PAs espontaneamente). Entretanto como isso não ocorria em todos os casos, isto é, uma menor parte possuía parâmetros mais próximos aos característicos dos neurônios com nível bem expressivo de atividade espontânea, surgiu a questão de como estes neurônios com baixa atividade poderiam ser classificados. Quais critérios poderiam ser adotados para incluí-los no grupo dos neurônios silentes ou no grupo dos neurônios com atividade espontânea? O problema foi resolvido analisando-se conjuntamente os histogramas de potencial obtidos dos registros I0 (ver item 3.4 e Fig. 3.4.1) e as relações IV de cada neurônio. Verificamos que todos (sem exceção) os neurônios em que a moda do potencial de membrana (Mpm) foi observada por mais de 70% da duração do registro ($\%_{\text{Mpm}} > 70\%$; mais de 36,4 segundos do total de 52 segundos), apresentavam curvas IV que cruzavam a linha 0pA (ver Fig. Fig. 4.1.4-A), ou seja, possuíam um potencial de repouso (condição de equilíbrio eletroquímico), uma propriedade compartilhada com os neurônios silentes. O mesmo não ocorria quando a $\%_{\text{Mpm}}$ era inferior a 70%, ($\%_{\text{Mpm}} < 70\%$) como será detalhamos em seguida. Assim sendo, todos os neurônios que atendiam a este critério eletrofisiológico foram classificados com **Quiets**.

A porcentagem de tempo em que a Mpm de um neurônio CW foi observada ($\%_{\text{Mpm}}$) em registros do comportamento espontâneo (registros I0) variou de 10%, para neurônios com padrão de atividade muito irregular/instável, a 100%, para neurônios silentes, com um potencial de repouso (a própria Mpm) muito estável. Curiosamente a análise dos histogramas de potencial também revelou que em apenas 6 casos (menos de 2% dos casos), a Mpm foi observada por 60 a 70% da duração do registro I0 ($60\% \leq \%_{\text{Mpm}} \leq 70\%$). Estes casos muito raros correspondiam a um fenótipo intermediário entre o classificado como *Quiet* (segundo o critério que acabamos de apresentar) e todo o restante dos casos. A característica intermediária evidenciou-se não apenas no nível de atividade observado nos registros I0, como também nas relações IV. Dentre os 6 casos, 3 curvas IV cruzaram a linha 0pA e 3 não. Por estas razões, estes 6 registros foram excluídos da análise dos dados. Por

fim, todos os neurônios em que a Mpm ocupou menos de 60% da duração dos registros IO ($\%_{Mpm} < 60\%$) apresentaram curvas IV que não cruzaram a linha 0pA (valores de corrente negativos para todas as voltagens, Fig. 4.1.4-A), isto é, não se verifica nestes neurônios uma condição de equilíbrio eletroquímico ou potencial de repouso. Naturalmente, estas foram as propriedades eletrofisiológicas que definiram o fenótipo **Active**. A figura abaixo sumariza o que foi discutido.

Distribuição dos registros IO de acordo com a porcentagem de tempo ocupada pela Mpm ($\%_{Mpm}$)

Figura 3.5. Histograma da porcentagem de tempo ocupada pela Mpm ($\%_{Mpm}$) para 338 registros IO, em condições controle, pertencentes a 175 neurônios (dados acumulados ao longo de todos os experimentos). O intervalo de porcentagem de cada barra é de 10%. Barras vermelhas representam o intervalo de porcentagem da Mpm ($10\% < \%_{Mpm} < 60\%$ ou 5,2 a 31,2 segundos) observado para o fenótipo *Active* (237 de 338 registros), e as barras azuis o intervalo de porcentagem da Mpm ($70\% < \%_{Mpm} \leq 100\%$ ou 36,4 a 52 segundos) observado para o fenótipo *Quiet* (95 de 338 registros). A linha tracejada indica a barra que inclui os casos raros de fenótipo intermediário (verificado em apenas 6 registros de 338), em que a Mpm é observada por 60 a 70% da duração do registro IO ($60\% \leq \%_{Mpm} < 70\%$). A direita: exemplo de registro (janelas de 25 segundos) pertencente ao fenótipo *Active* (A), Intermediário (I) e *Quiet* (Q).

Algumas transições fenotípicas foram observadas, isto é, alguns neurônios se comportaram como *Active* no primeiro registro IO, e como *Quiet* no segundo (na repetição do protocolo minutos depois), ou vice-versa (não houve um sentido prevalente para estas transições). Quando ocorreram, monitoramos o comportamento do neurônio por mais cerca de 5 minutos, sem aplicação de corrente ($I=0pA$), e repetimos os protocolos de estimulação mais uma ou duas vezes. Estes neurônios foram então classificados de acordo com o comportamento predominante, ou seja, o fenótipo observado mais vezes (em dois ou mais registros IO) foi o escolhido na classificação e considerado na análise dos dados. Transições fenotípicas ocorreram em cerca de 20% dos neurônios *Quiets* (11 em 52) e em 9%

dos neurônios *Actives* (11 em 123). Este último valor pode estar um pouco subestimado.

3.6 Experimentos

Tendo em vista os objetivos apresentados, testamos individualmente os efeitos de uma série de drogas e delineamos 2 classes de experimentos de acordo com a ação das mesmas: aplicação de antagonistas e agonistas de canais iônicos e aplicação de agonistas de receptores metabotrópicos. Em alguns casos combinamos a aplicação de duas ou mais drogas no mesmo experimento (detalhes na seção Resultados). Em todos os experimentos avaliamos separadamente os efeitos das drogas para cada fenótipo, *Active* e *Quiet*, e então comparamos os resultados entre os fenótipos, investigando diferenças nas condutâncias específicas e parâmetros eletrofisiológicos.

Como já apresentado, os neurônios CW possuem um amplo complemento de canais iônicos. Investigamos as condutâncias subliminares sabidamente expressas nestas células ou no NCD e associadas ao controle de padrões de atividade neuronal. As drogas selecionadas, a concentração final e os respectivos canais/correntes sobre os quais atuam são listados na tabela:

Tabela 3.6.1 – Concentração final e ação dos agonistas/antagonistas de canais iônicos utilizados.

Nome/Sigla	[Conc] _{final}	Ação
BaCl ₂	100μM	Inibidor dos canais de K ⁺ retificadores de entrada (canais K _{ir})
BaCl ₂	5mM	Inibidor de canais de K ⁺ de vazamento (canais K _{Leak}) e canais de K ⁺ dependentes de voltagem (K _V)
Tolbutamida	100μM	Antagonista dos canais de K ⁺ sensíveis a ATP (canais K _{ATP})
Diazoxida	200μM	Agonista dos canais de K ⁺ sensíveis a ATP (canais K _{ATP})
Riluzole	10μM	Inibidor da corrente de Na ⁺ persistente (I _{Na_p})
TTX	0.5μM	inibidor de canais de Na ⁺ dependentes de potencial (canais Na _V)
NiCl ₂	50μM	Inibidor (não-seletivo) da corrente de Ca ²⁺ do tipo T (I _{Ca_T})
Mibefradil	10μM	Inibidor (não-seletivo) da corrente de Ca ²⁺ do tipo T (I _{Ca_T})
ZD7288	20μM	inibidor da corrente catiônica ativada por hiperpolarização (I _h)

Correntes subliminares são moduladas por receptores metabotrópicos e diversos neurotransmissores que ativam estes receptores estão presentes no NCD.

Dados preliminares sugerem que uma fração significativa das correntes subliminares dos neurônios CW de camundongos são correntes de K^+ retificadoras de entrada (comunicação pessoal do prof. Dr. Ricardo M. Leão) e como os canais K_{ir} acoplados a proteína G (canais GIRK; *G Protein-Coupled Inwardly-Rectifying Potassium Channels*) são modulados positivamente pela ativação de receptores $GABA_B$ (Padgett e Slesinger 2010; Gähwiler e Brown, 1985), testamos os efeitos do agonista Baclofen. Também investigamos os efeitos do agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do tipo-1 e tipo-5 (mGluR1 e mGluR5) S-3,5-Dihidroxifenilglicina (DHPG) sobre os canais HCN (sigla para “*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated*”, canais que produzem a I_h). Em neurônios Purkinje cerebelares a I_h é modulada positivamente pela ativação dos mGluR1 através de via dependente da PKA (Proteína Quinase A), enquanto em outros neurônios a I_h é inibida por via dependente da PKC (Proteína Quinase C) (Correa et al., 2017). As concentrações e ações dos agonistas são listadas na tabela:

Tabela 3.6.2 – Concentração final e receptores dos agonistas metabotrópicos utilizados.

Nome/Sigla	[Conc] _{final}	Receptores
Baclofen	5 μ M	agonista de receptores $GABA_B$
DHPG	10 μ M	agonista de receptores mGluR1 e mGluR5

As concentrações das drogas foram escolhidas com base em valores tradicionalmente adotados (validados) na literatura especializada e em trabalhos prévios publicados pelo laboratório.

3.7 Análise Estatística

Toda análise estatística foi feita no programa Prism 6 (GraphPad). Teste t pareado foi aplicado para comparar os parâmetros antes (condição controle) e após aplicação das drogas (condição tratamento). Teste t não-pareado foi empregado para comparar os parâmetros entre os fenótipos *Active* e *Quiet*. Em outras comparações além das citadas, o teste utilizado é informado.

O nível de significância adotado foi de 0,05 (testes de duas caudas). Asteriscos (*) foram usados nos gráficos para indicar diferença estatística. Todos os dados foram expressos como Média $\pm$ EPM (Erro Padrão da Média).

4. RESULTADOS

Nota geral sobre as escalas das figuras: em todas as figuras que ilustram o comportamento espontâneo (registros I0) dos neurônios CW a posição da barra de escala horizontal corresponde ao potencial de -100mV. Nas figuras ilustrando as respostas de voltagem ao protocolo VI, a posição da barra de escala horizontal corresponde ao potencial de -110mV. Para os dois casos, as barras de escala vertical são de 20mV, com as extremidades correspondendo aos potenciais de -90mV e -70mV. A figura abaixo ilustra o que foi dito.

Figura 4.1. Exemplo ilustrando a posição no eixo vertical (potencial) das escalas horizontais e verticais. Os registros são de um neurônio *Active*. As escalas mostradas no registro VI foram fixadas, sendo as mesmas utilizadas em todos os experimentos. Diferentes escalas de tempo foram utilizadas nas figuras dos registros I0, e serão especificadas para cada experimento (em geral as escalas foram de 1 segundo ou 5 segundos).

4.1 Diferenças eletrofisiológicas entre os fenótipos *Active* e *Quiet*, e suas respectivas proporções populacionais.

A proporção (%) encontrada do fenótipo *Active* foi de aprox. 82% e, portanto, cerca de 18% da população é composta de neurônios *Quiets*. O cálculo foi feito de duas formas: considerando uma parte dos experimentos em que apenas a técnica de *Whole-Cell Patch Clamp* foi utilizada (Fig. 4.1.1-A) e considerando todos os experimentos, incluindo aqueles em que a técnica de *Cell-Attached* foi previamente empregada para localizar neurônios silentes na população (Fig. 4.1.1-B). Em *Cell-Attached* neurônios CW foram identificados pela presença de *complex spikes* e/ou salvas de potências de ação (*burstings*), e quando um neurônio silente era localizado, procedia-se com a aquisição do *Whole-Cell*. A proporção populacional

dos fenótipos obtida pelas duas técnicas foi praticamente a mesma, razão pela qual os dados foram agrupados.

Figura 4.1.1. Proporção dos fenótipos *Active* e *Quiet* na população de neurônios *Cartwheel*. **A**: porcentagens referentes aos experimentos em que apenas a técnica de *Whole-Cell* foi utilizada. **B**: porcentagens obtidas considerando todos os experimentos, incluindo os que a técnica de *Cell-Attached* foi previamente utilizada.

Com relação aos parâmetros eletrofisiológicos, o potencial de membrana (Mpm) dos neurônios *Quiets* foi de $-82,9 \pm 0,7\text{mV}$ ($n=52$) e o dos neurônios *Active* foi $-72,5 \pm 0,6\text{mV}$ ($n=133$) ($p<0,001$). O limiar de atividade do fenótipo *Quiet* é mais positivo em relação ao do fenótipo *Active* (*Quiet*: $-75,9 \pm 0,9\text{mV}$, $n=52$; *Active*: $-79,9 \pm 0,4\text{mV}$, $n=124$; $p<0,001$).

A resistência de entrada dos neurônios *Quiets* é menor que a dos neurônios *Actives*, como medido em *Currente-Clamp* (*Quiet*: $86,5 \pm 2,2\text{ M}\Omega$, $n=52$; *Active*: $116,3 \pm 1,9\text{ M}\Omega$, $n=123$; $p<0,001$) e em *Voltage-Clamp* (*Quiet*: $84,1 \pm 3,6\text{ M}\Omega$, $n=52$; *Active*: $114,4 \pm 3,1\text{ M}\Omega$, $n=155$; $p<0,001$). Em concordância com este resultado, a constante de tempo da membrana também é menor no fenótipo *Quiet*, igual a $13,1 \pm 0,5\text{ ms}$ ($n=52$), sendo a do fenótipo *Active* ($n=121$) igual a $21,6 \pm 0,5\text{ ms}$ ($p<0,001$).

Quanto ao *sag*, o valor médio encontrado para os neurônios *Quiets* ($n=52$) também foi menor em relação aos neurônios *Actives* ($n=120$), $1,3 \pm 0,1\text{ mV}$ contra $2,1 \pm 0,1\text{ mV}$, respectivamente ($p<0,001$).

Figura 4.1.2. Respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI em um neurônio *Active* (a esquerda) e *Quiet* (a direita) mostrando as diferenças dos fenótipos quanto a resistência e limiar de atividade. Diferenças no sag e constante de tempo da membrana também podem ser visualizadas. Notar que o potencial de controle (intervalo entre os pulsos) é mantido num valor ($\approx -80\text{mV}$) aproximadamente igual nos dois fenótipos (ver descrição do protocolo VI, item 3.3).

Figura 4.1.3. Comparação dos parâmetros eletrofisiológicos intrínsecos dos fenótipos *Active* e *Quiet*. **A**: potencial de membrana (Mpm, a esquerda) e limiar de atividade (a direita); notar que o LA é positivo em relação ao potencial de repouso nos neurônios *Quiet*, e mais negativo que o potencial de membrana (Mpm) nos neurônios *Active*. **B**: resistência de entrada, medida em *Voltage-Clamp* (a esquerda) e *Current-Clamp* (a direita). **C**: constante de tempo da membrana. **D**: medida do sag (ver definição no item 3.4).

As curvas IV (relação corrente-voltagem) apresentaram uma diferença clara entre os fenótipos *Active* e *Quiet*, a qual fica evidente a partir de -90mV e torna-se mais pronunciada em direção aos potenciais mais positivos. Como pode ser observado nas Figuras 4.1.4-A e 4.1.4-B, no fenótipo *Quiet* (n=43) a curva IV (em azul) cruza a linha OpA em aproximadamente -80mV e a partir deste ponto as correntes são positivas. Já no fenótipo *Active* (n=139) a curva IV (em vermelho) não cruza a linha 0pA e correntes negativas são registradas em todos os potenciais. Nota-se ainda um desvio da curva para baixo em aproximadamente -70mV, ou de forma mais precisa, uma região de inclinação (condutância linear) negativa a partir deste potencial. No fenótipo *Quiet* esta característica é menos evidente. Na faixa de potencial mais negativa, de -115 a -95mV, as curvas dos fenótipos foram semelhantes.

Figura 4.1.4. Relações corrente-voltagem (curvas IV) dos fenótipos *Active* (vermelho) e *Quiet* (azul) para os protocolos-IV de -115 a -55mV (**A**; *Active*: n=108; *Quiet*: n=27) e -110 a -50mV (**B**; *Active*: n=31; *Quiet*: n=16). Linha tracejada refere-se ao valor de 0pA; notar que apenas a curva referente ao fenótipo *Quiet* cruza esta linha. **C**: traçados de corrente representativos de um neurônio *Active* (a esquerda) e *Quiet* (a direita). Os traçados em azul referem-se ao pulso de -55mV, e os em vermelho ao pulso de -45mV.

As diferenças eletrofisiológicas encontradas entre os fenótipos *Active* e *Quiet* foram muito importantes tanto para interpretação de uma série de resultados que serão apresentados como para o delineamento de novos experimentos ao longo do projeto. Particularmente, as diferenças entre as curvas IV dos fenótipos forneceram indicações sobre quais correntes subliminares poderiam estar envolvidas. Nesse sentido, a diferença gradativa verificada na faixa mais positiva de potencial, de -75 a -55mV (Figs. 4.1.4-A e 4.1.4-B), poderia conter uma componente gerada pela corrente de Na^+ persistente (INa_p), hipótese que investigamos no experimento descrito a seguir.

4.2 Riluzole despolariza neurônios *Active*, provoca uma pequena hiperpolarização nos neurônios *Quiet* e altera marcadamente o limiar de atividade de ambos os fenótipos. INa_p é igualmente expressa nos dois fenótipos.

Exceto para os resultados referentes ao limiar de atividade, os dados dos experimentos com riluzole $10\mu\text{M}$ e TTX $0,5\mu\text{M}$ foram reunidos e analisados conjuntamente, pois os valores médios dos parâmetros foram semelhantes entre os experimentos.

Os efeitos do riluzole e TTX sobre o comportamento espontâneo (registros IO) dos neurônios CW foram diferentes entre os fenótipos. Nos neurônios *Active*, curiosamente, ocorreu uma despolarização da Mpm (Ctrl: $-73,0 \pm 1,2\text{mV}$; Ril/TTX: $-60,9 \pm 2,7\text{mV}$; $n=17$; $p=0,0003$) enquanto no fenótipo *Quiet* uma pequena hiperpolarização foi observada (Ctrl: $-82,5 \pm 2,2\text{mV}$; Ril/TTX: $-85,3 \pm 2,1\text{mV}$; $n=7$; $p=0,0032$). Além disso, no fenótipo *Active*, o riluzole e o TTX mudaram o comportamento espontâneo dos neurônios de formas distintas, embora a média do potencial de membrana (Mpm) gerado por efeito das duas drogas fosse igual. O TTX bloqueou os potenciais de ação, como esperado para ação da droga, tornando os neurônios silentes e com um potencial de membrana estável (Mpm TTX: $-62,6 \pm 1,7\text{mV}$; $n=5$). Já com respeito ao riluzole, num total de 12 neurônios, 2 tornaram-se silentes (com um potencial de membrana relativamente estável; sendo que em um deles ocorreu hiperpolarização), 7 pararam de disparar potenciais de Na^+ - embora características como ondas curtas ($<2\text{s}$) de despolarização (partindo de -70mV a -

90mV), potenciais lentos de Ca^{+} e regimes biestáveis foram observadas - e finalmente, 3 continuaram disparando PAs, todos de forma tônica. Nenhum dos 12 neurônios perdeu a capacidade de disparar PAs em resposta à injeção de corrente positiva (no protocolo VI, na maioria dos casos, o pulsos de +50 a +100pA foram suficientes para elicitar PAs).

Active

Quiet

Figura 4.2.1. Janelas de 25 segundos de registros I0 ilustrando o efeito do TTX 0,5 μ M, neurônio *Active* acima, e riluzole 10 μ M, neurônio *Quiet* abaixo. Condição tratamento está em vermelho. Riluzole e TTX tiveram o mesmo efeito sobre o potencial de membrana dos neurônios *Quiets*. Os efeitos do riluzole sobre o comportamento espontâneo dos neurônios *Active* foram variáveis (ver texto). Escala horizontal: 5s.

Figura 4.2.2. Exemplos de ondas curtas de despolarização observadas após aplicação do riluzole 10 μ M. O neurônio parou de disparar potenciais de Na⁺ espontaneamente. Janelas de 25 segundos (escala horizontal: 5s).

O limiar de atividade foi marcadamente afetado pelo riluzole nos dois fenótipos (como o TTX bloqueia os PAs, este parâmetro não pode ser avaliado para esta droga). Nos neurônios *Actives* mudou de $-80,0 \pm 1,3\text{mV}$ para $-66,2 \pm 2,5\text{mV}$ ($n=13$; $p<0,0001$), e nos *Quiets* de $-74,8 \pm 2,6$ para $-59,5 \pm 1,6\text{mV}$ ($n=6$; $p=0,0009$).

Figura 4.2.3. Efeito do riluzole sobre o limiar de atividade, representado pela linha vermelha tracejada. Os traçados são respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI.

O riluzole e o TTX não afetaram a resistência de entrada (*Active*: Ctrl: $130,2 \pm 6,4\text{M}\Omega$; Ril: $129,4 \pm 6,0\text{M}\Omega$; $n=14$; *Quiet*: Ctrl: $82,7 \pm 6,8\text{M}\Omega$; Ril: $75,6 \pm 4,3\text{M}\Omega$; $n=7$; $p=0,86$ e $p=0,17$; respectivamente; medidas em *Current-Clamp*) e a constante de

tempo da membrana (*Active*: Ctrl: $19,4 \pm 1,0\text{ms}$; Ril: $19,8 \pm 5,8\text{ms}$; $n=15$; *Quiet*: Ctrl: $10,7 \pm 1,0\text{ms}$; Ril: $9,1 \pm 0,8\text{ms}$; $n=7$; $p=0,76$ e $p=0,12$; respectivamente) tanto nos neurônios *Actives* como *Quiets*.

Figura 4.2.4. Efeitos do riluzole e TTX sobre o potencial de membrana (Mpm) (A), a resistência de entrada (C; medida em *Current-Clamp*) e a constante de tempo da membrana (D). B: Efeito do riluzole sobre o limiar de atividade.

A mudança da relação corrente-voltagem (curva IV) após aplicação da droga foi semelhante nos dois fenótipos. A análise da corrente sensível ao riluzole $10\mu\text{M}$ não revelou diferenças quanto a magnitude do pico de corrente (protocolo IV/-45mV: *Active*: $-464 \pm 37\text{pA}$, $n=12$; *Quiet*: $-485 \pm 89\text{pA}$, $n=7$; $p=0,81$; protocolo rampa/-50mV: *Active*: $-354 \pm 45\text{pA}$, $n=10$; *Quiet*: $433 \pm 46\text{pA}$, $n=7$; $p=0,25$), medidas de condutância (*Actives*: $g_{\text{corda}}(\text{máx.}) = 4,6 \pm 0,4\text{nS}$; $g_{\text{corda}}(-45\text{mV}) = 3,8 \pm 0,3\text{nS}$; $g_{\text{slope}} = -21,5 \pm 1,8\text{nS}$; $n=15$; *Quiets*: $g_{\text{corda}}(\text{máx.}) = 4,7 \pm 0,9\text{nS}$; $g_{\text{corda}}(-45\text{mV}) = 4,2 \pm 0,8\text{nS}$; $g_{\text{slope}} = -22,1 \pm 3,7\text{nS}$; $n=7$; $p=0,92$; $p=0,48$; $p=0,87$, respectivamente),

dependência de potencial (ativação ocorre em $\approx -85\text{mV}$ em ambos fenótipos) ou outras características da INa_p entre os neurônios *Active* e *Quiet*.

Figura 4.2.5. Curvas IV nas condições controle e riluzole 10 μM para o fenótipo *Active* (A; $n=12$) e *Quiet* (B; $n=7$). Potencial de *holding* = -75mV . Comparação da corrente sensível ao riluzole entre os fenótipos, como obtida por subtração das curvas IV (C; *Active*: $n=12$; *Quiet*: $n=7$) e subtração das rampas (D; *Active*: $n=10$; *Quiet*: $n=7$).

Figura 4.2.6. Traçados de corrente obtidos pela aplicação do protocolo rampa nas condições controle e riluzole para um neurônio *Active* (Ai) e *Quiet* (Bi), e respectiva corrente sensível ao riluzole 10 μ M (ii), obtida por subtração dos traçados em (i).

Figura 4.2.7. Gráficos das medidas de condutância, $g_{corda\ max}$, $g_{corda\ (-45mV)}$ e g_{slope} (*slope conductance*) para os dois fenótipos.

4.3 Ba^{2+} 100 μ M produz despolarização acentuada, aumento da resistência e padrão de atividade predominantemente tônico em ambos fenótipos. IK_{ir} possui componente sem retificação no fenótipo *Quiet*.

Como explicado na introdução, a corrente de K^+ retificadora de entrada (IK_{ir}) é bem conhecida por controlar o potencial de repouso de vários tipos de neurônios, entre os quais inclui-se os neurônios fusiformes do NCD (Leão et al., 2012). Neste experimento investigamos a IK_{ir} nos neurônios CW.

A aplicação do Ba^{2+} (Ba) gerou uma forte despolarização do potencial de membrana nos dois fenótipos (*Active*: Ctrl: $-70,9 \pm 1,4$ mV; Ba: $-47,9 \pm 3,2$ mV; $n=23$; $p<0,0001$; *Quiet*: Ctrl: $-81,1 \pm 1,7$ mV; Ba: $-56,3 \pm 4,8$ mV; $n=8$; $p=0,0011$). Diferentes formas de despolarização foram observadas, as quais puderam ser classificadas, grosso modo, em 3 tipos: disparo predominantemente tônico (1); regimes biestáveis e/ou predomínio de padrões de disparo em salvas (todos os casos envolvendo histogramas de potencial bimodais) (2); ausência de disparo de PAs, com um Mpm acima (mais positivo) de -46mV (*Actives*: $Mpm_{m\acute{a}x} = -14,3$ mV; *Quiets*: $Mpm_{m\acute{a}x} = -28,3$ mV) (3).

Figura 4.3.1. Comportamento espontâneo dos neurônios CW após aplicação do Ba^{2+} 100 μ M. Em todos os casos ocorreu despolarização do potencial de membrana. Gráficos incluem dados do experimento com Ba^{2+} 5mM (item 4.6), em que Ba^{2+} 100 μ M foi inicialmente aplicado.

Com relação à (1), disparo tônico de PAs simples e complexos foram observados, em diferentes frequências. Tanto em (1) como (2), a amplitude e forma dos potenciais de Na^+ e Ca^{2+} também foram variáveis. Mais especificamente, a amplitude dos PAs sofreu reduções de diferentes graus, em geral proporcionais à intensidade da despolarização. Em (2) algumas formas extremas de regimes

biestáveis, envolvendo transições abruptas de estado, foram registradas. As salvas de potenciais variaram no padrão temporal (duração e frequência) e forma, contendo diferentes tipos e sequências de PAs. Com relação à (3), a ausência de disparo espontâneo deveu-se a forte despolarização e consequente inativação dos canais de Na^+ dependentes de potencial. Nos casos (1) e (2) também foi observado, de forma geral, um aumento do disparo de potenciais de ação complexos (observação qualitativa). Em condições controle, o disparo de PAs complexos pode ser gradualmente intensificado em boa parte dos neurônios, na medida em que mais corrente positiva é injetada, porém com frequência claramente inferior à observada por ação do Ba^{2+} .

Figura 4.3.2. Despolarização causada pelo Ba^{2+} $100\mu\text{M}$; a condição controle é mostrada em i, e a condição tratamento em ii. Os exemplos são do tipo em que a droga gerou disparo tônico de PAs (caso I). **A**: exemplo de um neurônio *Quiet*. **B**: exemplos de dois neurônios *Active* ilustrando diferentes graus de despolarização gerados pelo Ba^{2+} . Notar a diferença na forma e amplitude dos PAs nos 3 casos. Janelas de 10 segundos (escala horizontal: 1s).

Figura 4.3.3. Formas extremas de biestabilidade geradas pelo Ba^{2+} 100 μM , como exemplificado para um neurônio *Quiet* (**Ai**: ctrl; **Aii**: Ba^{2+}) e *Active* (**Bi**: ctrl; **Bii**: Ba^{2+}). Notar as transições abruptas de estado. Janelas de 50 segundos (*Quiet*) e 25 segundos (*Active*); escala horizontal: 5s.

O limiar de atividade não foi afetado em nenhum dos fenótipos (*Active*: Ctrl: $-78,5 \pm 1,0\text{mV}$; Ba: $-78,2 \pm 0,8\text{mV}$; $n=20$; $p=0,7577$; *Quiet*: Ctrl: $-73,3 \pm 2,8\text{mV}$; Ba: $-74,5 \pm 2,7\text{mV}$; $n=7$; $p=0,3429$). A resistência de entrada aumentou de $114,7 \pm 5,1\text{M}\Omega$ para $166,7 \pm 9,1\text{M}\Omega$ ($n=20$; $p<0,0001$) no fenótipo *Active*, e de $91,7 \pm 4,9\text{M}\Omega$ para $165,6 \pm 14,7\text{M}\Omega$ no fenótipo *Quiet* ($n=8$; $p=0,0005$). Em acordo, a constante de tempo também aumentou (*Active*: Ctrl: $21,4 \pm 1,2\text{ms}$; Ba: $27,4 \pm 1,3\text{ms}$; $n=16$; $p=0,0027$; *Quiet*: Ctrl: $13,9 \pm 1,5\text{ms}$; Ba: $23,1 \pm 2,1\text{ms}$; $n=8$; $p=0,0007$).

Figura 4.3.4. Respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI antes (i) e após aplicação do Ba^{2+} $100\mu\text{M}$ (ii). Exemplo de um neurônio *Active* (A) e um neurônio *Quiet* (B). O aumento da resistência e da constante de tempo pode ser visualizado nos dois casos. Notar também as alterações causadas pelo Ba^{2+} no disparo e forma dos PAs.

Figura 4.3.5. Efeito do Ba^{2+} 100 μM sobre os parâmetros medidos em *Current-Clamp*, nos dois fenótipos. **A:** potencial de membrana (Mpm). **B:** limiar de atividade. **C:** constante de tempo da membrana. **D:** resistência de entrada.

A análise dos registros em *Voltage-Clamp* revelou uma diferença entre os fenótipos. Como pode ser percebido na Figura 4.3.6, a corrente sensível ao Ba^{2+} 100 μM no fenótipo *Quiet* possui uma componente sem retificação, bem evidente na faixa de -75 a -55mV. Nota-se que a diferença de retificação começa em aproximadamente -85mV e torna-se progressivamente maior em direção a -55mV, ponto em que é mais pronunciada. Na faixa de potencial mais negativa, próxima ao E_K (valor teórico calculado de -109mV), a corrente é semelhante entre os fenótipos, o que foi confirmado pela medida da condutância linear (g_{slope}) na faixa -115/-95mV (*Active*: $15,8 \pm 1,5\text{nS}$; $n=20$; *Quiet*: $17,0 \pm 2,5\text{nS}$; $n=6$; $p=0,7059$). Os picos negativos das correntes (-115mV) também foram equivalentes (*Actives*: $-206 \pm 22\text{pA}$, $n=19$; *Quiets*: $-231 \pm 43\text{pA}$, $n=6$; $p=0,5889$).

Figura 4.3.6. Curvas IV nas condições controle e Ba^{2+} 100 μ M para o fenótipo *Active* (A; n=20) e *Quiet* (B; n=7). Potencial de *holding* = -65mV. A corrente sensível ao Ba^{2+} 100 μ M no fenótipo *Quiet* mostra uma componente sem retificação (evidente na faixa -75/-55mV) que não está presente no fenótipo *Active* (C). Condutância (g_{slope}) medida na faixa -115/-95mV (D).

Figura 4.3.7. Respostas de corrente ao protocolo IV, para os pulsos de -115mV a -65mV (7 pulsos), antes (i) e após aplicação do Ba^{2+} 100 μ M (ii), para um neurônio *Active* (A) e *Quiet* (B). Devido a sobreposição de traçados, a corrente sensível ao Ba^{2+} é mostrada apenas para 4 pulsos: -115, -105, -85 e -65mV (em azul) (iii). Inspeção dos traçados revela uma diferença clara de retificação da corrente entre os fenótipos. Escala horiz.: 1s.

4.4 Tolbutamida não produz efeitos sob os neurônios *Active* e gera atividade espontânea nos neurônios *Quiet*, alterando os parâmetros para valores típicos do fenótipo *Active*.

Os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATPs}) são membros da família dos canais de K^+ retificadores de entrada (canais K_{ir}) que exibem pouca retificação (Hibino et al., 2010). Neste experimento exploramos a hipótese de que esta característica poderia estar associada à diferença de retificação da IK_{ir} (bem evidente na faixa de -75 a -55mV) entre os fenótipos *Active* e *Quiet* encontrada no experimento anterior.

Aplicação de 100 μ M de tolbutamida não teve efeitos significativos sobre o comportamento espontâneo dos neurônios *Actives*, porém no fenótipo *Quiet* gerou

atividade espontânea em 9 dos 11 neurônios registrados ($\approx 82\%$), não tendo efeitos significativos nos parâmetros dos outros dois. Mais precisamente, no fenótipo *Active*, a tolbutamida teve um efeito claro em apenas 1 dos 16 neurônios registrados, provocando despolarização do potencial de membrana (Mpm) e aumento da resistência de entrada. Em relação à atividade espontânea gerada pela tolbutamida nos neurônios *Quiets*, em 6 casos o subtipo de fenótipo *Active* gerado foi relativamente semelhante ao que se pode observar comumente em condições controle (subtipos comuns), embora em 2 destes casos uma despolarização mais acentuada (relativamente parecida com algumas observadas por ação do Ba^{2+} $100\mu\text{M}$) ocorreu após 15 minutos de perfusão da droga. Nos outros 3 casos (total de 9 neurônios), subtipos incomuns ou raros de fenótipo *Active* foram gerados, sendo que em um deles também ocorreu uma despolarização mais acentuada após exposição prolongada à tolbutamida.

Figura 4.4.1. Comportamento espontâneo dos neurônios CW, antes (i) e após (ii) aplicação da tolbutamida $100\mu\text{M}$. **A:** exemplos da geração de atividade espontânea pela droga em neurônios *Quiets*, característica de subtipo incomum (acima) e comum (abaixo) do fenótipo *Active* (no neurônio acima os PAs isolados são todos complexos). **B:** exemplo de neurônio *Active*, mostrando ausência de efeito da tolbutamida. Janelas de 10 segundos (escala horizontal: 1s).

Os valores médios do potencial de membrana (Mpm) e limiar de atividade (LA) não sofreram alterações no fenótipo *Active* (Mpm: Ctrl: $-70,6 \pm 1,0\text{mV}$; Tolb: $-69,5 \pm 1,4\text{mV}$; $n=14$; $p=0,2099$; LA: Ctrl: $-77,6 \pm 1,1\text{mV}$; Tolb: $-79,0 \pm 1,1\text{mV}$; $n=14$; $p=0,0548$), ao contrário do observado para o fenótipo *Quiet*, onde ocorreu despolarização do Mpm e diminuição do LA (Mpm: Ctrl: $-81,1 \pm 1,7\text{mV}$; Tolb: $-69,1 \pm 2,3\text{mV}$; $n=9$; $p=0,0035$; LA: Ctrl: $-73,3 \pm 2,0\text{mV}$; Tolb: $-80,6 \pm 1,2\text{mV}$; $n=9$; $p=0,0023$).

Tolbutamida também não teve efeito sobre a resistência de entrada (R_m) e constante de tempo da membrana (τ_m) dos neurônios *Actives* (R_m : Ctrl: $115,3 \pm 5,6\text{M}\Omega$; Tolb: $114,2 \pm 5,3\text{M}\Omega$; $n=15$; $p=0,6807$; τ_m : Ctrl: $22,9 \pm 1,0\text{ms}$; Tolb: $22,9 \pm 0,9\text{ms}$; $n=15$; $p=0,9998$), enquanto no fenótipo *Quiet* ambos os parâmetros aumentaram (R_m : Ctrl: $88,7 \pm 5,4\text{M}\Omega$; Tolb: $115,8 \pm 8,2\text{M}\Omega$; $n=9$; $p=0,0015$; τ_m : Ctrl: $13,0 \pm 1,0\text{ms}$; Tolb: $19,4 \pm 1,7\text{ms}$; $n=8$; $p=0,0035$).

De forma muito interessante, a comparação dos parâmetros Mpm, LA, R_m e τ_m entre a condição controle do fenótipo *Active* e a condição tratamento do fenótipo *Quiet* não revelou nenhuma diferença estatística (Mpm: $p=0,4917$; LA: $p=0,0773$; R_m : $p=0,9590$; τ_m : $p=0,0696$). O mesmo também foi observado em relação ao sag ($p=0,3895$, grupo *Active*-Ctrl: $n=15$; grupo *Quiet*-Tolb: $n=7$).

Figura 4.4.2. Respostas a pulsos sequenciais de corrente (partindo de -100 pA) do protocolo VI antes (i) e após (ii) aplicação da tolbutamida 100μ M. **A**: exemplo da ação da droga em um neurônio *Quiet*, onde é possível visualizar o aumento da resistência e constante de tempo da membrana e a diminuição do limiar de atividade. **B**: exemplo de um neurônio *Active*, mostrando ausência de efeito da tolbutamida.

Figura 4.4.3. Efeitos da tolbutamida 100μM sobre os parâmetros potencial de membrana (Mpm) (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D), nos fenótipos *Active* e *Quiet*.

Em concordância com os resultados apresentados, as curvas IV no fenótipo *Active* não sofreram alterações significativas após aplicação da tolbutamida (exceto por 1 neurônio no qual a droga teve efeito) enquanto no fenótipo *Quiet*, uma alteração clara foi verificada nas curvas IV dos neurônios nos quais a droga teve efeito. Curiosamente a corrente sensível à tolbutamida no fenótipo *Quiet* mostrou pouca ou nenhuma retificação, sendo que o valor de pico ocorreu em -55mV (300 ± 52 pA). Mais especificamente, uma pequena retificação ocorreu apenas na faixa de -115 a -85mV, sendo ausente na faixa mais positiva de potencial, de -85 a -55mV. As medidas de condutância de corda foram g_{corda} (máx) = $5,9 \pm 0,8$ nS e g_{corda} (-55mV) = $5,5 \pm 0,9$ nS (n=8 para ambas). A condutância linear foi medida na faixa de maior condutância da corrente, de -75 a -55mV, e seu valor foi $g_{\text{slope}} = 10,0 \pm 1,8$ nS (n=8).

Figura 4.4.4. Curvas IV dos fenótipos *Active* (A, n=12) e *Quiet* (B, n=8) antes e após aplicação da tolbutamida 100 μ M (potencial de *holding* = -65mV). Notar a semelhança entre as curvas IV em A e a curva IV referente à condição tolbutamida em B. C: corrente sensível a tolbutamida para ambos fenótipos. D: medidas de condutância para a $I_{K_{ATP}}$ no fenótipo *Quiet*.

Figura 4.4.5. Traçados de corrente em resposta aos pulsos de -115mV a -55mV do protocolo IV, para um neurônio *Quiet* (A) e um *Active* (B), antes (i) e após (ii) aplicação da tolbutamida. Os traçados em azul referem-se ao pulso de -65mV e os em vermelho ao pulso de -55mV. Efeito da tolbutamida é verificado apenas no neurônio *Quiet*. Aiii: corrente sensível à tolbutamida obtida por subtração dos traçados em A; notar a ausência de retificação para os potenciais mais positivos (traçado referente ao pulso de -95mV foi eliminado para facilitar a visualização). Escala horiz.: 1s.

4.5 Neurônios *Active* adquirem potencial de repouso e parâmetros eletrofisiológicos característicos do fenótipo *Quiet* por ação da Diazoxida.

No experimento anterior encontramos que a tolbutamida não produz efeitos significativos no fenótipo *Active*. Então surgiu a questão se os neurônios *Actives* não expressariam canais K_{ATP} ou se esses canais estariam fechados. Testamos as duas hipóteses simultaneamente aplicando a diazoxida nos neurônios *Active*.

Diazoxida 200 μ M teve efeito em 15 de 17 neurônios *Actives* registrados ($\approx 88\%$). Em relação ao comportamento espontâneo 13 tornaram-se silentes e 2 tiveram a atividade reduzida (redução da duração das salvas em um deles e

aumento da % M_{pm} no outro), sendo que ainda permaneceram *Actives*. Curiosamente os 13 neurônios mencionados adquiriram um potencial de repouso muito semelhante ao observado no fenótipo *Quiet*.

Figura 4.5.1. Efeito da diazoxida sobre o comportamento espontâneo dos neurônios *Actives* (i: Ctrl; ii: Diaz). Os neurônios tornam-se silentes, apresentando valores de potencial de repouso similares aos observados nos neurônios *Quiets*. Janelas de 10 segundos (escala horizontal: 1s).

Exceto por um neurônio, a droga causou hiperpolarização do Mpm nos 15 neurônios (Ctrl: $-69,8 \pm 1,5\text{mV}$; Diaz: $-81,3 \pm 1,6\text{mV}$; $n=15$; $p<0,0001$). O limiar de atividade tornou-se mais positivo, mudando de $-81,3 \pm 1,0\text{mV}$ para $-72,4 \pm 1,6\text{mV}$ ($n=16$; $p<0,0001$). A resistência de entrada e a constante de tempo de tempo da membrana sofreram diminuição (R_m : Ctrl: $113,5 \pm 3,8\text{M}\Omega$; Tolb: $80,3 \pm 3,6\text{M}\Omega$; $n=15$; $p<0,0001$; τ_m : Ctrl: $18,3 \pm 1,1\text{ms}$; Tolb: $11,5 \pm 1,1\text{ms}$; $n=15$; $p<0,0001$).

Figura 4.5.2. Respostas a pulsos sequenciais de corrente do protocolo VI antes (i) e após (ii) aplicação da diazoxida. É possível visualizar o efeito da droga sobre a resistência de entrada, constante de tempo da membrana e limiar de atividade.

Como os parâmetros na condição tratamento apresentaram valores muito próximos aos característicos do fenótipo *Quiet*, procedemos com a comparação estatística entre estes grupos (testes-t não pareados). Os mesmos dados do item 4.1 foram utilizados (52 neurônios *Quiets*) na comparação. De forma muito interessante não encontramos diferenças significativas em nenhum dos parâmetros investigados (Mpm: $p=0,3324$; LA: $p=0,0770$; R_m : $p=0,1726$; τ_m : $p=0,1392$). O *sag*, inclusive, também tornou-se igual ao do fenótipo *Quiet* ($p=0,4859$, grupo *Active-Diaz*: $n=13$).

Figura 4.5.3. Efeito da diazoxida sobre o potencial de membrana (Mpm, **A**), limiar de atividade (**B**), resistência de entrada (**C**) e constante de tempo da membrana (**D**) dos neurônios *Actives* e comparação com os mesmos parâmetros do fenótipo *Quiet* (mesmos dados da Fig. 4.1.3). Não houve diferenças estatísticas entre o grupo *Active*-diazoxida e o grupo correspondente ao fenótipo *Quiet*.

Os resultados obtidos em *Voltage-Clamp* confirmaram o que foi encontrado em *Current-Clamp*. Por ação da diazoxida, a curva IV adquiriu um formato típico do fenótipo *Quiet*, e mais do que isso, tornou-se virtualmente indistinguível da curva IV do fenótipo *Quiet* (mesma mostrada na Fig. 4.1.4-A), um resultado muito significativo. A corrente sensível a diazoxida apresentou características similares a corrente sensível a tolbutamida obtida no experimento anterior (Fig. 4.4.4-C). Não apresentou retificação e seu pico também ocorreu em -55mV. A faixa de maior condutância também ocorreu entre -75 a -55mV, na qual medimos a condutância linear $g_{slope} = 8,5 \pm 0,8$ nS ($n=14$). Os valores para as condutâncias de corda foram g_{corda} (máx) = $7,1 \pm 0,4$ nS e g_{corda} (-55mV) = $5,3 \pm 0,5$ nS ($n=15$ para ambas). Comparamos cada uma destas medidas de condutância com as obtidas para a corrente sensível à tolbutamida (Fig. 4.5.4-D) e não encontramos diferenças

estatísticas ($p=0,3739$; $p=0,1542$; $p=0,8744$; respectivamente). Os valores de pico da corrente (-55mV) também foram equivalentes (Diaz: 278 ± 28 pA, $n=15$; Tolb: 300 ± 52 pA, $n=8$; $p=0,6924$).

Figura 4.5.4. **A:** curva IV dos neurônios *Actives* ($n=15$) na condição controle e diazoxida. Potencial de *holding* = -65mV. **B:** comparação da curva IV da condição diazoxida (mesma do painel A) com a curva IV do fenótipo *Quiet* ($n=27$; mesma mostrada na Fig. 4.1.4-A). As curvas são visualmente indistinguíveis. **C:** corrente sensível a diazoxida (em preto; fenótipo *Active*) comparada com a corrente sensível a tolbutamida (em cinza, mesma da Fig. 4.4.4-C; fenótipo *Quiet*). **D:** comparação das medidas de condutância entre a IK_{ATP} obtida por aplicação da diazoxida (fenótipo *Active*) e da tolbutamida (fenótipo *Quiet*; mesmos dados da Fig. 4.4.4-D). Não houve diferença estatística em nenhuma das medidas.

Figura 4.5.5. Traçados de corrente em resposta aos pulsos de -115 a -55mV do protocolo IV, antes (Ai) e após (Aii) aplicação da diazoxida. Aiii: corrente sensível a Dizoxida obtida por subtração dos traçados em Ai e Aii (o pulso de -105mV foi excluído para facilitar a visualização). Notar a ausência de retificação. Pulso de -65mV é mostrado em azul e o de -55mV em vermelho. Escala horiz.: 1s.

4.6 Ba^{2+} 5mM despolariza o potencial de membrana para um valor médio positivo e eleva marcadamente a resistência de membrana.

Correntes de vazamento de K^+ (IK_{Leak}) são produzidas pela superfamília de canais de K^+ de dois poros (canais K2P, amplamente distribuídos no sistema nervoso central) e contribuem para o estabelecimento do potencial de repouso de neurônios (Goldstein et al., 2001; Kim, 2005; Lotshaw, 2007; Enyed e Czirják, 2010). Membros dos canais K2P são expressos no NCD e as subunidades TWIK-1 e TASK-5 estão entre as 5 subunidades de canais de K^+ mais abundantes do núcleo (Friedland et al., 2007).

Neste experimento aplicamos de forma sequencial 100 μM e 5mM de BaCl_2 na tentativa de investigar o papel da IK_{Leak} nos neurônios CW. A aplicação inicial de Ba^{2+} 100 μM foi feita com o objetivo de se isolar os efeitos da IK_{Leak} dos efeitos da IK_{ir} . A perfusão de Ba^{2+} 100 μM foi feita por um intervalo de tempo de 3 a 5 minutos e em seguida Ba^{2+} 5mM foi perfundido por mais 10 a 15 minutos adicionais. Apenas os protocolos I0 e IV foram aplicados durante a perfusão de Ba^{2+} 100 μM e, de acordo

com o delineamento experimental, comparações estatísticas foram feitas entre os grupos controle vs Ba^{2+} 100 μ M e Ba^{2+} 100 μ M vs Ba^{2+} 5mM para os parâmetros Mpm e resistência de entrada (medida em *Voltage-Clamp*). Como apenas um neurônio *Quiet* foi registrado neste experimento as descrições dos resultados referem-se ao fenótipo *Active*.

Com relação ao comportamento espontâneo, Ba^{2+} 5mM gerou uma despolarização muito acentuada, caracterizada por potenciais de membrana estáveis (ausência de PAs e oscilações) sendo o valor mais negativo registrado de -7mV (*Actives*: Mpm: Ctrl: $-71,6 \pm 2,0$ mV; Ba100 μ M: $-63,1 \pm 3,8$ mV ; Ba5mM: $+1,4 \pm 1,4$ mV; n=11; p=0,0478 e p<0,0001, respectivamente; *Quiet*: Ctrl: -76,9 mV; Ba100 μ M: -40,9 mV ; Ba5mM: +3,6 mV).

Figura 4.6.1. Efeitos do Ba^{2+} 100 μ M (ii) e Ba^{2+} 5mM (iii) sobre o comportamento espontâneo dos neurônios CW (i: controle). Um exemplo de neurônio *Active* é mostrado em **A**, e o único neurônio *Quiet* em **B**. A duração dos traçados é de 5 segundos (escala horizontal: 1s).

Ba^{2+} 5mM também elevou de forma acentuada a resistência de entrada (*Actives*: Ctrl: $106,4 \pm 7,2$ M Ω ; Ba100 μ M: $122,4 \pm 8,9$ M Ω ; Ba5mM: $270,9 \pm 22,9$ M Ω ; n=11; p=0,0003 e p<0,0001, respectivamente; *Quiet*: Ctrl: 86,5 M Ω ; Ba100 μ M: 148,4 M Ω ; Ba 5mM: 296,6 M Ω), e em acordo, a constante de tempo da membrana também aumentou (*Actives*: Ctrl: $27,2 \pm 1,8$ ms; Ba5mM: $42,9 \pm 4,8$ ms; n=6; p =0,0139). O limiar de atividade não foi afetado pelo Ba^{2+} 5mM (*Actives*: Ctrl: $-77,14 \pm 0,8$ mV; Ba 5mM: $-78,4 \pm 1,6$ mV; n=7; p=0,4009). O número amostral (n) foi menor para os dois últimos parâmetros, pois em alguns neurônios não foi possível controlar o potencial de membrana (estabiliza-lo em ≈ -80 mV) para aplicação do protocolo VI. De fato o

potencial de membrana tornou-se bastante instável quando hiperpolarizado por injeção de corrente negativa (como consequência do bloqueio das correntes de K^+ subliminares e de baixo limiar pelo Ba^{2+} 5mM), sofrendo transições abruptas para valores próximos aos observados na ausência de corrente ($I=0pA$) (ver Fig. 4.6.3).

Figura 4.6.2. Efeitos do Ba^{2+} 5mM sobre o potencial de membrana (Mpm) (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (R_m , medida em *Voltage-Clamp*) (C) e constante de tempo da membrana (D). O efeito do Ba^{2+} 100µM foi avaliado para os parâmetros Mpm e R_m .

Ao analisar o efeito do Ba^{2+} 5mM sobre o *sag*, verificamos que em dois neurônios, num total de seis, o valor do parâmetro não aumentou, ao contrário do que se esperaria em decorrência do aumento acentuado da resistência de entrada. Embora o valor médio do *sag* aumentasse (Ctrl: $3,5 \pm 0,5$ mV; Ba5mM: $5,5 \pm 1,1$ mV, $p=0,0436$, $n=6$), o aumento provocado pelo Ba^{2+} 100µM, no experimento anterior (item 4.3), foi mais significativo (Ctrl: $2,3 \pm 0,4$ mV; Ba5mM: $3,8 \pm 0,4$ mV, $p=0,0013$, $n=17$).

Figura 4.6.3. Respostas de voltagem a pulsos sequenciais do protocolo VI, para as condições controle (i) e Ba^{2+} 5mM (ii). Nos dois exemplos (A e B) é possível visualizar o aumento causado pelo Ba^{2+} 5mM na resistência de entrada e na constante de tempo da membrana, enquanto o limiar de atividade não sofre alterações. O exemplo acima (A) mostra um dos neurônios no qual o sag não foi alterado. Notar nos dois exemplos a mudança abrupta do potencial de membrana em resposta ao pulso positivo de corrente, o qual mantém-se inalterado mesmo após o término do pulso.

A mudança na curva IV causada pelo Ba^{2+} 100 μ M foi similar à verificada no experimento anterior (item 4.3), embora tenha sido mais sutil. Já o Ba^{2+} 5mM gerou mudanças não esperadas na curva IV. A curva foi deslocada para cima em potenciais negativos a -65mV (potencial de *holding* adotado neste experimento) e para baixo em potenciais positivos a -65mV (Fig. 4.6.4-Aii). Se apenas correntes de K^+ tivessem sido inibidas, estas mudanças teriam ocorrido em relação ao potencial de reversão do K^+ ($E_K \approx -109$ mV). Correntes de entrada (negativas) devem ter sido inibidas para que este perfil fosse produzido. A corrente sensível ao Ba^{2+} 5mM, obtida subtraindo-se as curvas IV produzidas pelo Ba^{2+} 100 μ M e pelo Ba^{2+} 5mM, apresentou um perfil relativamente linear com reversão de sinal em -65mV, potencial a partir do qual torna-se positiva.

Figura 4.6.4. Curvas IV nas condições controle e Ba^{2+} $100\mu\text{M}$ (**Ai**), e curvas IV nas condições Ba^{2+} $100\mu\text{M}$ e Ba^{2+} 5mM (**Aii**). Potencial de *holding* = -65mV . Subtração das curvas IV em (**Aii**) forneceu a corrente sensível ao Ba^{2+} 5mM ($n=11$) (**Aiii**). Uma corrente apenas de K^+ apresentaria valores positivos em potenciais positivos ao E_{K} ($\approx -109\text{mV}$), o que claramente não aconteceu, indicando inibição de correntes de entrada pelo Ba^{2+} 5mM .

Figura 4.6.5. Exemplo de traçados de corrente produzidos em resposta ao protocolo IV (*holding* = -65mV) para a condição controle (Ai), Ba^{2+} 100 μM (Aii) e Ba^{2+} 5mM (Aiii). Os traçados em azul referem-se ao pulso de -65mV e os em vermelho ao pulso de -55mV. Escala horiz.: 1s.

4.7 Baclofen produz hiperpolarização e diminui a resistência de entrada em neurônios *Active* e *Quiet*; os efeitos não são alterados por aplicação simultânea de Tolbutamida.

Como mencionado no item 3.6, correntes de K^+ retificadoras de entrada (IK_{ir}) produzidas por canais GIRK (*G Protein-Coupled Inwardly-Rectifying Potassium Channels*) são reguladas positivamente por ativação de receptores GABA_B . Além disso, proteínas G ativam canais K_{ATP} bloqueados pelo ATP (Terzic et al., 1994). Neste experimento testamos os efeitos do agonista GABA_B Baclofen.

O efeito do baclofen 5 μM sobre o comportamento espontâneo dos neurônios CW foi bem uniforme. Todos os neurônios *Actives* tornaram-se silentes, com um

potencial de membrana bastante estável, e no único neurônio *Quiet* registrado, uma hiperpolarização do potencial de membrana foi observada (*Actives*: Mpm: Ctrl: $-75,0 \pm 1,8\text{mV}$; Baclofen: $-86,5 \pm 1,9\text{mV}$; $n=12$; $p<0,0001$; *Quiet*: Ctrl: $-79,9\text{mV}$; Baclofen: $-89,3\text{mV}$). O valor médio do potencial de membrana (Mpm) adquirido pelos neurônios *Actives* foi mais negativo que o valor do potencial de repouso do fenótipo *Quiet* ($p=0,0481$).

Figura 4.7.1. Registros do comportamento espontâneo de dois neurônios *Actives* (A) e um neurônio *Quiet* (B), antes (i) e após (ii) aplicação do baclofen. O potencial de membrana adquirido pelos neurônios *Actives* foi mais negativo que o potencial de repouso do fenótipo *Quiet* (Fig. 4.1.3-A). Janelas são de 10 segundos (escalas horizontais: 1s).

Baclofen teve efeito sobre o limiar de atividade (LA), tornando-o mais positivo (*Actives*: LA: Ctrl: $-81,7 \pm 1,3\text{mV}$; Baclofen: $-75,0 \pm 1,7\text{mV}$; $n=12$; $p=0,0003$). O LA não sofreu alteração no neurônio *Quiet* (Ctrl: $-77,6\text{mV}$; Baclofen: $-78,3\text{mV}$). A resistência de entrada diminuiu (*Actives*: R_m : Ctrl: $119,8 \pm 5,7\text{M}\Omega$; Baclofen: $91,0 \pm 14,9\text{M}\Omega$; $n=12$; $p<0,0001$; *Quiet*: Ctrl: $108,8\text{M}\Omega$; Baclofen: $88,3\text{M}\Omega$), assim como a constante de tempo da membrana (*Actives*: τ_m : Ctrl: $21,2 \pm 1,6\text{ms}$; Baclofen: $13,1 \pm 1,0\text{ms}$; $n=12$; $p<0,0001$; *Quiet*: Ctrl: $19,9\text{ms}$; Baclofen: $16,7\text{ms}$).

Figura 4.7.2. Respostas de voltagem de um neurônio *Active* a pulsos sequenciais do protocolo VI na condição controle (**Ai**) e tratamento (**Aii**). É possível visualizar a diminuição da resistência de entrada e da constante de tempo da membrana, assim como o efeito do baclofen sobre o limiar de atividade, tornando-o mais positivo.

Figura 4.7.3. Medidas dos parâmetros potencial de membrana (**A**), limiar de atividade (**B**), resistência de entrada (**C**) e constante de tempo da membrana (**D**) nas condições controle e tratamento. Os valores obtidos para o único neurônio *Quiet* registrado também foram reportados.

A mudança na curva IV causada pelo baclofen foi relativamente parecida à mudança causada pela diazoxida, ocorrendo um deslocamento da curva IV para

cima (passando pelo ponto $I=0$ pA) para potenciais positivos em relação ao E_K (≈ -109 mV). As diferenças em relação à mudança produzida pela diazoxida foram que o deslocamento mostrou-se um pouco mais pronunciado na faixa de -105 a -75 mV, e que, no potencial -115 mV, o valor da corrente total registrada na condição tratamento ficou muito próximo (um pouco mais negativa) ao valor da condição controle. A corrente sensível ao baclofen também apresentou um perfil relativamente linear, com um pico em -55 mV (279 ± 23 pA; $n=9$) e condutância $g_{\text{corda}}(-55\text{mV}) = 5,1 \pm 0,4$ nS ($n=9$).

Figura 4.7.4. Curvas IV para o fenótipo *Active* antes e após aplicação do baclofen (**Ai**, $n=9$). Corrente sensível ao baclofen obtida por subtração das curvas em **Ai** (**Aii**). Potencial de *holding* = -65 mV.

Figura 4.7.5. Traçados de corrente em resposta ao protocolo IV de um neurônio *Active* na condição controle (**Ai**) e tratamento (**Aii**). A subtração dos traçados Ai e Aii é mostrada em (**Aiii**). Notar o padrão linear formado pelos traçados de corrente. O pulso de -65mV é mostrado em azul e o de -55mV em vermelho. Escala horiz.: 1s.

Um trabalho realizado por Roeper et al. (1990) em neurônios com disparo espontâneo da substância negra de cobaias ofereceu evidências de que canais K_{ATP} seriam ativados pelo baclofen. No estudo o baclofen ($10\mu M$) suspendeu o disparo espontâneo dos neurônios, gerando hiperpolarização do potencial de membrana e diminuição da resistência de entrada. Estes efeitos foram revertidos por aplicação simultânea de $100\mu M$ de tolbutamida que, curiosamente, não tinha efeitos na ausência de baclofen.

Dada a relativa similaridade entre a corrente sensível ao baclofen e a IK_{ATP} ativada pela diazoxida (Fig. 4.5.4-C), e o estudo mencionado, testamos a hipótese de que o baclofen estaria ativando canais K_{ATP} nos neurônios CW. Para tanto, delineamos um segundo experimento em que inicialmente aplicamos tolbutamida ($100\mu M$) por 10 a 15 minutos e, após este intervalo, aplicamos simultaneamente tolbutamida ($100\mu M$) + baclofen ($5\mu M$).

Verificamos que os efeitos da tolbutamida foram similares ao descritos no item 4.4 para ambos os fenótipos, como esperado, e não serão descritos novamente. Avaliamos neste segundo experimento os efeitos do baclofen na

presença de tolbutamida e por esta razão, apesar dos dados referentes à condição controle serem incluídos nos gráficos de cada um dos parâmetros, reportamos apenas as comparações estatísticas entre os grupos tolbutamida (Tolb) e tolbutamida + baclofen (Tolb+Bac).

Assim como ocorreu no primeiro experimento, o baclofen suspendeu a atividade espontânea dos neurônios, gerando um potencial de membrana (Mpm) estável e com valor médio mais negativo que o potencial de repouso do fenótipo *Quiet* (*Actives*: Tolb: $-72,1 \pm 3,0\text{mV}$; Tolb+Bac: $-84,6 \pm 3,0\text{mV}$; $n=6$; $p=0,0008$; *Quiets*: Tolb: $-74,3 \pm 3,7\text{mV}$; Tolb+Bac: $-88,6 \pm 2,9\text{mV}$; $n=4$; $p=0,0073$).

Figura 4.7.6. Comportamento espontâneo de um neurônio *Active* e um neurônio *Quiet* nas 3 condições experimentais: controle, tolbutamida e tolbutamida + baclofen (na sequência). Os efeitos do baclofen não foram alterados pela aplicação prévia e simultânea da tolbutamida. Notar que o potencial de membrana gerado pelo baclofen no neurônio *Quiet* ficou um pouco mais negativo que seu potencial de repouso na condição controle. Janelas são de 5 segundos (escalas horizontais: 1s).

Nos neurônios *Actives* o baclofen tornou mais positivo o limiar de atividade, enquanto nos neurônios *Quiet* o parâmetro não foi alterado (*Actives*: Tolb: $-80,8 \pm 2,3\text{mV}$; Tolb+Bac: $-75,1 \pm 2,5\text{mV}$; $n=6$; $p=0,0183$; *Quiets*: Tolb: $-82,1 \pm 2,5\text{mV}$; Tolb+Bac: $-79,1 \pm 2,4\text{mV}$; $n=4$; $p=0,0976$). Em ambos os fenótipos a resistência de entrada diminuiu (*Actives*: Tolb: $104,6 \pm 5,5\text{M}\Omega$; Tolb+Bac: $72,5 \pm 5,3\text{M}\Omega$; $n=6$; $p<0,0001$; *Quiets*: Tolb: $103,2 \pm 4,9\text{M}\Omega$; Tolb+Bac: $74,2 \pm 2,9\text{M}\Omega$; $n=4$; $p=0,0046$), assim como a constante de tempo da membrana (*Actives*: Tolb: $24,4 \pm 2,8\text{ms}$; Tolb+Bac: $12,9 \pm 0,8\text{ms}$; $n=6$; $p=0,0054$; *Quiets*: Tolb: $26,4 \pm 3,4\text{ms}$; Tolb+Bac: $13,6 \pm 1,4\text{ms}$; $n=4$; $p=0,0104$).

Figura 4.7.7. Medidas dos parâmetros potencial de membrana (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D) para as 3 condições experimentais: controle, tolbutamida e tolbutamida + baclofen. Os asteriscos (*) referem-se aos testes estatísticos feitos entre os grupos tolbutamida e tolbutamida + baclofen.

Na presença de tolbutamida a mudança causada pelo baclofen na curva IV foi semelhante entre os fenótipos *Active* e *Quiet*, e também semelhante à mudança verificada no primeiro experimento (Fig. 4.7.4-Ai). De fato, como pode ser observado na Fig. 4.7.8-C, não há diferenças significativas entre a corrente sensível ao baclofen obtida para este experimento e a obtida no primeiro experimento (Fig. 4.7.4-Aii). As condutâncias de corda medidas para os fenótipos *Active* e *Quiet* foram equivalentes entre si ($p=0,4604$), respectivamente, $g_{\text{corda}}(-55\text{mV})= 6,4 \pm 0,6\text{nS}$ ($n=6$) e $g_{\text{corda}}(-55\text{mV})= 5,5 \pm 0,9\text{nS}$ ($n=4$). Também não houve diferenças estatísticas entre estas medidas e a medida de condutância obtida no primeiro experimento ($p=0,0981$ e $p=0,5765$, respectivamente). Os picos das correntes dos dois fenótipos também foram equivalentes (*Actives*: $349 \pm 34\text{pA}$, $n=6$; *Quiets*: $295 \pm 65\text{pA}$, $n=4$; $p=0,4338$).

Figura 4.7.8. Curvas IV dos fenótipos *Active* (A, n=6) e *Quiet* (B, n=4) nas condições tolbutamida e tolbutamida + baclofen. Potencial de *holding* = -65mV. As mudanças causadas nas curvas IV pelo baclofen na presença de tolbutamida foram semelhantes às mudanças provocadas em relação à condição controle. A corrente sensível ao baclofen obtida na presença de tolbutamida foi semelhante entre os fenótipos (C); a corrente sensível ao baclofen obtida no primeiro experimento é mostrada em tracejado (mesma da Fig 4.7.4. Aii, n=9). Os valores das condutâncias das correntes em (C) foram equivalentes entre si (D).

4.8 ZD7288 produz hiperpolarização acentuada em ambos os fenótipos. Neurônios *Actives* tornaram-se silentes e a I_h apresentou menor magnitude nos neurônios *Quiet*.

Como mencionado na introdução, a corrente catiônica ativada por hiperpolarização (I_h) foi investigada por Ceballos et al. (2016) nos neurônios fusiformes do NCD de ratos Wistar. Nos neurônios CW, a presença do *sag* (ver definição no item 3.4) foi verificada em respostas de potencial a pulsos hiperpolarizantes de corrente (modo *Current-Clamp*). Como o *sag* é um parâmetro associado à ativação

da I_h , realizamos este experimento para investigar o papel desta corrente nas propriedades intrínsecas dos neurônios CW.

O efeito do ZD ($20\mu\text{M}$) sobre o comportamento espontâneo dos neurônios CW foi bastante uniforme: a droga gerou um potencial de membrana estável e bem hiperpolarizado nos dois fenótipos (*Actives*: Ctrl: $-75,0 \pm 1,4\text{mV}$; ZD: $-92,6 \pm 0,8\text{mV}$; $n=24$; $p<0,0001$; *Quiets*: Ctrl: $-86,7 \pm 1,5\text{mV}$; ZD: $-94,7 \pm 1,0\text{mV}$; $n=11$; $p<0,0001$). Em alguns casos observamos que após um período prolongado ($>15\text{min}$) o ZD gerou efeitos inespecíficos (confirmados pela análise das correntes inibidas em *Voltage-Clamp*), caracterizados por despolarizações acentuadas do potencial de membrana. Os registros referentes a estes efeitos foram excluídos da análise dos dados.

Figura 4.8.1. Registros do comportamento espontâneo de um neurônio *Active* (A) e um *Quiet* (B) antes (i) e após (ii) aplicação do ZD7288 $20\mu\text{M}$. Notar a forte hiperpolarização produzida pela droga. Janelas são de 10 segundos (escalas horizontais: 1s).

O ZD alterou o limiar de atividade da mesma forma em ambos os fenótipos, tornando-o mais negativo (*Actives*: Ctrl: $-82,1 \pm 0,8\text{mV}$; ZD: $-87,0 \pm 0,8\text{mV}$; $n=25$; $p<0,0001$; *Quiets*: Ctrl: $-80,3 \pm 2,0\text{mV}$; ZD: $-88,0 \pm 0,8\text{mV}$; $n=11$; $p=0,0004$). Também nos dois fenótipos, a resistência de entrada aumentou (*Actives*: Ctrl: $103,1 \pm 3,5\text{M}\Omega$; ZD: $134,2 \pm 4,5\text{M}\Omega$; $n=14$; $p<0,0001$; *Quiets*: Ctrl: $84,7 \pm 5,0\text{M}\Omega$; ZD: $126,3 \pm 7,6\text{M}\Omega$; $n=12$; $p<0,0001$), assim como a constante de membrana (*Actives*: Ctrl: $22,9 \pm 1,5\text{ms}$; ZD: $32,3 \pm 2,2\text{ms}$; $n=15$; $p<0,0001$; *Quiets*: Ctrl: $14,0 \pm 1,2\text{ms}$; ZD: $21,6 \pm 1,2\text{ms}$; $n=11$; $p=0,0007$).

Figura 4.8.2. Medidas dos parâmetros potencial de membrana (A), limiar de atividade (B), resistência de entrada (C) e constante de tempo da membrana (D) nas condições controle e tratamento para os dois fenótipos.

Como esperado em virtude da inibição da I_h , o ZD praticamente eliminou o *sag* em ambos os fenótipos (*Actives*: Ctrl: $1,6 \pm 0,1\text{mV}$; ZD: $0,44 \pm 0,04\text{mV}$; $n=24$; $p<0,0001$; *Quiets*: Ctrl: $1,1 \pm 0,2\text{mV}$; ZD: $0,38 \pm 0,06\text{mV}$; $n=11$; $p=0,0013$). Após a aplicação do ZD, na maioria dos casos, nenhum pico negativo de potencial foi identificado no início da resposta ao pulso hiperpolarizante e o valor mínimo do potencial nos primeiros 300 milissegundos do pulso foi usado para o cálculo do *sag*.

Como descrito no item 3.4, a medida do *sag* foi feita a partir do segundo pulso hiperpolarizante (-70 a -100pA) do protocolo VI. A razão para esta escolha deveu-se a uma característica atípica dos neurônios CW quanto à dependência do parâmetro em relação à intensidade da hiperpolarização (Fig. 4.8.3-B). Tipicamente a magnitude do *sag* é proporcional à quantidade de corrente negativa injetada num

pulso hiperpolarizante, porém nos neurônios CW descobrimos que o *sag* possui maior magnitude (média) no segundo do que no terceiro (-120 a -150pA) ou quarto (-170 a -200pA) pulso hiperpolarizante. Curiosamente um perfil típico (relativamente linear) da relação *sag* vs corrente hiperpolarizante foi obtido após inibição da $I_{K_{ir}}$ pelo Ba^{2+} 100uM, no experimento descrito no item 4.3 (dados não mostrados).

Figura 4.8.3. **A:** medidas do parâmetro *sag* nos dois fenótipos nas condições controle e ZD 20uM. A inibição da I_h pelo ZD praticamente elimina o *sag*. **B:** medidas do *sag* por pulso hiperpolarizante (intensidade de corrente negativa injetada) do protocolo VI para ambos os fenótipos na condição controle (dados acumulados de todos os experimentos). Asteriscos (*) indicam diferença estatística (teste t múltiplo não pareado; da direita para a esquerda: *Actives*: n=120, 120, 111 e 62; *Quiets*: n=52, 52, 50 e 47). Tipicamente, o valor do *sag* é proporcional à intensidade da hiperpolarização (ou corrente negativa injetada). Nos neurônios CW um padrão atípico (não linear) foi observado, com valores do *sag* diminuindo a partir de correntes mais negativas que ≈ -100 pA. Por esta razão escolhemos o segundo pulso hiperpolarizante (-70 a -100pA) para análise do *sag* (ver item 3.4).

Figura 4.8.4. Respostas de voltagem a pulsos sequenciais do protocolo VI para um neurônio *Active* (A) e um *Quiet* (B), antes (i) e após (ii) aplicação do ZD. Nos dois exemplos nota-se que o sag é eliminado. Também é possível verificar o aumento da resistência e da constante de tempo da membrana, e a diminuição do limiar de atividade (fica mais negativo).

Com relação aos registros em *Voltage-Clamp* dois valores para o potencial de *holding* (protocolo IV) foram utilizados: -80mV e -60mV. O primeiro valor foi inapropriado (muito negativo) para o estudo da I_h uma vez que, como já exposto na legenda da Fig. 1.3.2, a corrente é tipicamente ativada em resposta a pulsos mais negativos que -50mV. No entanto, como alguns parâmetros referentes ao *holding* de -80mV foram estatisticamente equivalentes aos obtidos para o *holding* de -60mV, os dois conjuntos de dados serão apresentados.

O efeito do ZD sobre as curvas IV dos fenótipos *Active* e *Quiet* foi relativamente similar, exceto pela magnitude do deslocamento causado e uma pequena diferença no ponto (potencial) a partir do qual não se percebe mais diferenças entre as curvas na condição controle e tratamento. Estas diferenças ficaram mais claras no perfil da corrente sensível ao ZD. No *holding* de -80mV a corrente apresentou um perfil linear e menor valor de pico relativamente a corrente obtida para o *holding* de -60mV, cuja condutância aumentou em direção aos potenciais mais negativos (como ocorre tipicamente). No fenótipo *Quiet*, para os dois valores de *holding*, a magnitude da corrente foi menor e sua ativação,

aparentemente, ocorreu num potencial mais negativo em relação ao fenótipo *Active*. Os dados foram agrupados para as medidas da condutância de corda e pico de corrente, cujos valores médios foram maiores no fenótipo *Active* (g_{corda} : *Actives*: $4,1 \pm 0,3\text{nS}$; $n=21$; *Quiets*: $3,2 \pm 0,3\text{nS}$; $n=9$; $p=0,0356$; pico de corrente: *Actives*: $-345 \pm 23\text{pA}$; $n=19$; *Quiets*: $-262 \pm 22\text{pA}$; $n=9$; $p=0,0307$). Já a condutância linear foi medida para os dados referentes ao *holding* de -60mV , sendo o valor médio equivalente entre os fenótipos (*Actives*: $10,0 \pm 0,9\text{nS}$; $n=9$; *Quiets*: $9,8 \pm 0,8\text{nS}$; $n=8$; $p=0,9091$).

Figura 4.8.5a. Mudanças provocadas pelo ZD nas curvas IV dos fenótipos *Active* (i) e *Quiet* (ii) para os dois valores de potencial de *holding* utilizados, -80mV (A, *Actives*: $n=12$; *Quiets*: $n=3$) e -60mV (B, *Actives*: $n=9$; *Quiets*: $n=6$). Notar que no fenótipo *Quiet*, a mudança (deslocamento para cima) é menos pronunciada e aparentemente começa num potencial mais negativo.

Figura 4.8.5b (continuação da Fig. 4.8.5a). Corrente sensível ao ZD nos dois fenótipos para os potenciais de *holding* -80mV (**Aiii**) e -60mV (**Biii**). Um perfil (ou formato) mais característico da I_h foi obtido para o *holding* de -60mV, embora as diferenças da corrente entre os fenótipos foi semelhante para os dois valores de *holding*. **C**: medidas de condutância para os dois fenótipos; a g_{slope} foi calculada apenas para os dados referentes ao *holding* de -60mV; medida da g_{corda} reúne os dados referentes aos dois valores de *holding*.

Figura 4.8.6. Exemplos de traçados de corrente em resposta ao protocolo IV de um neurônio *Active* (A) e um neurônio *Quiet* (B), antes (i) e após (ii) aplicação do ZD. Subtração dos traçados (i) e (ii) para o neurônio *Active* (Aiii) e para o neurônio *Quiet* (Biii). O traçado em vermelho refere-se ao pulso de -60mV (valor do *holding*) e os traçados em azul ao pulso de -70mV (traçados em preto referem-se aos pulsos de -110 a -80mV, de baixo para cima). Notar que no neurônio *Quiet* não ocorre inibição de corrente pelo ZD no pulso de -70mV ($I \approx 0$ pA no pulso de -70mV; o traçado referente ao pulso de -60mV foi eliminado para facilitar a visualização) e que a I_h possui maior magnitude no neurônio *Active*. Escala horiz.: 1s.

4.9 DHPG despolariza o potencial de membrana nos dois fenótipos sem afetar a I_h .

Neste experimento verificamos se o agonista mGluR1 e mGluR5 DHPG (S-3,5-Dihidroxifenilglicina) produz efeitos sobre a I_h (a partir da ativação dos receptores mGluR1), particularmente se a modula positivamente, como ocorre nos neurônios Purkinje cerebelares (Correa et al., 2017).

O DHPG despolarizou o potencial de membrana em ambos os fenótipos, sendo que em um neurônio *Quiet* a despolarização foi sutil ($\approx +2\text{mV}$) e a célula permaneceu silente (observação qualitativa). A resistência de entrada, medida em *Voltage-Clamp*, não sofreu alteração (*Actives*: Ctrl: $113,0 \pm 12,8\text{M}\Omega$; DHPG: $135,5 \pm 24,3\text{M}\Omega$; $n=6$; $p=0,1526$; *Quiets*: Ctrl: $77,2 \pm 26,2\text{M}\Omega$; DHPG: $94,7 \pm 29,9\text{M}\Omega$; $n=3$; $p=0,0967$).

Figura 4.9.1. Registros do comportamento espontâneo de dois neurônios *Actives* (A) e um neurônio *Quiet* (B) nas condições controle (i) e tratamento (ii). Os exemplos ilustram a despolarização do potencial de membrana causada pelo DHPG nos dois fenótipos. Janelas são de 25 segundos (escalas horizontais: 5s).

As mudanças provocadas pelo DHPG nas curvas IV de ambos os fenótipos não continham características que pudessem ser atribuíveis a um efeito da droga sobre a I_h ou outra condutância subliminar conhecida. Nos dois fenótipos a corrente sensível apresentou valores negativos (de entrada) e uma inclinação negativa por toda faixa de voltagem, sendo que sua magnitude aumentou gradualmente em direção ao valor de pico em -50mV . No fenótipo *Quiet* o perfil da corrente foi relativamente linear e no fenótipo *Active*, um aumento da condutância linear ocorreu entre -60 e -50mV .

Figura 4.9.2. Mudanças causadas pelo DHPG nas curvas IV do fenótipo *Active* (A, n=6) e *Quiet* (B, n=2), e corrente sensível ao DHPG obtida por subtração das curvas em A e B (C). A corrente sensível possui um perfil bastante incomum nos dois fenótipos, apresentando valores progressivamente mais negativos em direção ao pico em -50mV, o que claramente exclui a possibilidade de uma componente da I_h . O neurônio *Quiet* que permaneceu silente (ver texto) após aplicação do DHPG foi excluído em B e C. Potencial de *holding* = -60mV.

4.10 Ni^{2+} 50uM não produz efeitos significativos; Ni^{2+} 500uM e Mibefradil despolarizam o potencial de membrana dos neurônios CW. ICa_T não foi detectada nos registros em *Voltage-Clamp*.

Em estudos feitos em camundongos Kim e Trussel (2007) e Bender et al. (2012) demonstraram a participação da corrente de Ca^{2+} do tipo-T (ICa_T) na geração de potenciais complexos (*complex spikes*) e padrão de atividade em salvas (*bursting*) nos neurônios CW. Os experimentos descritos a seguir foram realizados com o intuito principal de examinar as possíveis contribuições da ICa_T para geração do fenótipo *Active*.

Realizamos 3 experimentos distintos utilizando dois inibidores semi-seletivos de canais de Ca^{2+} com maior afinidade para os canais de Ca^{2+} do tipo-T, o níquel

($\text{Ni}^{2+}/\text{NiCl}_2$) nas concentrações de $50\mu\text{M}$ e $500\mu\text{M}$, e Mibefradil $10\mu\text{M}$ (as duas drogas também inibem canais de Ca^{2+} do tipo-R, embora de forma menos efetiva). Nos 3 experimentos as correntes produzidas em resposta ao protocolo IV foram analisadas tanto no período estacionário (curva IV estacionária, como descrito no item 3.4) como nos primeiros 300 milissegundos dos pulsos, intervalo no qual a ICa_T propriamente dita é detectada, dada sua inativação rápida (50 a 200ms). Entretanto em nenhum dos experimentos conseguimos identificar, de forma definitiva, uma corrente com as propriedades da ICa_T . Apesar disso, descreveremos alguns dos resultados encontrados, os quais envolvem efeitos inespecíficos das drogas, bem evidentes nos experimentos com Ni^{2+} $500\mu\text{M}$ e mibefradil $10\mu\text{M}$.

No primeiro experimento, com Ni^{2+} $50\mu\text{M}$, verificamos efeitos significativos em apenas dois neurônios, um *Active* e um *Quiet*, entre os seis registrados. Em ambos ocorreu despolarização do potencial de membrana, sendo que o neurônio *Quiet* passou a ter atividade espontânea (padrão em salvas de PAs curtas; $<1\text{s}$) e o *Active* mudou seu padrão misto de potenciais complexos isolados e salvas de PAs curtas ($<1\text{s}$) para um padrão em salvas mais longas (4 a 8s) com disparo de PAs em alta frequência. Ainda verificamos uma redução da frequência de PAs complexos em resposta a pulsos de corrente positiva (despolarizantes) do protocolo VI no neurônio *Active*, enquanto o neurônio *Quiet* perdeu a capacidade de disparar PAs de Na^+ de forma continuada nos pulsos acima de $+200\text{pA}$ (observações qualitativas).

Com relação aos registros em *Voltage-Clamp* um pico negativo de corrente com menos de 50 milissegundos de duração ocorreu logo no início do pulso de -50mV do protocolo IV, aumentando sua amplitude no pulso de -40mV (aparentemente, em alguns casos o pico começou em -60mV , possuindo amplitude inferior a 100pA). Este pico poderia corresponder a ativação da ICa_T , porém não foi eliminado ou reduzido por ação do Ni^{2+} $50\mu\text{M}$ em nenhum dos seis neurônios registrados.

Figura 4.10.1. Exemplos de respostas de corrente aos primeiros 300 milissegundos dos pulsos de -80mV a -50mV do protocolo IV, para o neurônio *Active* (A) e *Quiet* (B) mencionados no texto, antes (i) e após (ii) aplicação do níquel 50 μ M. Notar nos dois neurônios um pico negativo de corrente logo no início do pulso de -50mV (em vermelho). Aiii e Biii: subtração dos traçados em i e ii mostrando as correntes inibidas. Podemos observar que correntes inespecíficas (não sofreram inativação) foram inibidas nos pulsos de -50mV e -60mV (em azul). Potencial de *holding* = -80mV (neurônio *Active*) e -90mV (neurônio *Quiet*).

O níquel 50 μ M provocou uma mudança perceptível na curva IV estacionária apenas nos dois neurônios mencionados no parágrafo anterior, indicando que os efeitos descritos para eles foram inespecíficos. Especificamente, as curvas de ambos sofreram uma deflexão para baixo entre -70 e -60mV. Como consequência disso, a corrente sensível ao níquel 50 μ M apresentou um valor levemente positivo em -60mV. A resistência de entrada (medida em *Voltage-Clamp*) não sofreu alterações em nenhum dos seis neurônios (*Actives*: Ctrl: $117,6 \pm 29,5\text{M}\Omega$; Ni^{2+} 50 μ M: $118,0 \pm 26,8\text{M}\Omega$; $n=3$; $p=0,9202$; *Quiets*: Ctrl: $80,0 \pm 4,0\text{M}\Omega$; Ni^{2+} 50 μ M: $87,4 \pm 0,5\text{M}\Omega$; $n=3$; $p=0,1883$).

Figura 4.10.2. Curvas IV (estacionárias) dos fenótipos *Active* (A, n=3) e *Quiet* (B, n=3) nas condições controle e tratamento. C: corrente sensível ao níquel 50μM obtida por subtração das curvas em A e B. Potencial de *holding* = -80 e -90mV. Os valores da resistência de entrada (medida em *Voltage-Clamp*) não sofreram alterações após aplicação do Ni²⁺ 50μM (D).

Num segundo experimento aumentamos a concentração do Ni²⁺ para 500μM. Nesta concentração a droga causou despolarização do potencial de membrana nos sete neurônios registrados, cinco *Actives* e dois *Quiets*. Os neurônios *Quiets* passaram a exibir atividade espontânea com padrão misto de salvas de potenciais longas (>10s) e curtas (<2s) (observações qualitativas) (Fig. 4.10.3).

O pico de corrente negativa presente no início do pulso de -50mV do protocolo IV (mostrado na Fig. 4.10.1) também não foi eliminado ou reduzido após aplicação do níquel 500μM. Confirmando a ocorrência de efeitos inespecíficos, o Ni²⁺ 500μM causou uma mudança clara nas curvas IV estacionárias dos dois fenótipos, como pode ser visualizado nas Figs. 4.10.4-A e 4.10.4-B. A corrente sensível ao Ni²⁺ 500μM apresentou um formato incomum, com características que certamente não pertencem a nenhuma condutância específica. Pode-se perceber

que há dois pontos de reversão do sinal da corrente ($\approx -100\text{mV}$ e $\approx -60\text{mV}$) e que um pico positivo ocorre em -80mV . Claramente ocorreu inibição de ao menos duas correntes distintas, uma corrente de entrada (negativa) e a outra de saída (positiva). A resistência de entrada (medida em *Voltage-Clamp*) nos neurônios *Actives* não sofreu alteração (Ctrl: $121,7 \pm 23,5\text{M}\Omega$; Ni^{2+} $500\mu\text{M}$: $132,3 \pm 23,3\text{M}\Omega$; $n=5$; $p=0,1640$) e nos neurônios *Quiets* mudou de $98,2\text{M}\Omega$ para $122,7\text{M}\Omega$ ($n=2$).

Figura 4.10.3. Registros do comportamento espontâneo de dois neurônios *Actives* (A) e um *Quiet* (B) nas condições controle (i) e tratamento (ii), mostrando a despolarização gerada pelo níquel $500\mu\text{M}$. Janelas são de 20 segundos (scalas horizontais: 5s).

Figura 4.10.4. Curvas IV (estacionárias) do fenótipo *Active* (A, n=5) e *Quiet* (B, n=2) nas condições controle e tratamento. C: corrente sensível ao níquel 500 μ M obtida por subtração das curvas em A e B. Notar os dois pontos de reversão do sinal da corrente. Potencial de *holding* = -80 mV. D: medidas em *Voltage-Clamp* da resistência de entrada nos dois fenótipos.

No terceiro e último experimento aplicamos o mibefradil 10 μ M para verificar se resultados diferentes dos anteriores seriam obtidos. Registramos sete neurônios *Actives* e o mibefradil causou uma despolarização do potencial de membrana em todos eles (em um deles a despolarização foi bem sutil). Três neurônios perderam a capacidade de disparar potenciais de Na^+ de forma espontânea após exposição prolongada a droga (> 20 min), sendo que em dois deles uma despolarização mais acentuada ocorreu após o intervalo de tempo mencionado. Estes dois neurônios também perderam a capacidade de disparar PAs de Na^+ de forma evocada (em resposta a pulsos de corrente positiva do protocolo VI).

Figura 4.10.5. Registros do comportamento espontâneo de 3 neurônios (*Actives*) nas condições controle (i) e tratamento (ii), mostrando a despolarização do potencial de membrana gerada pelo mibefradil $10\mu\text{M}$. Em **A** mostramos exemplos de despolarizações observadas entre 10 a 15 minutos de exposição a droga; em **B** mostramos um exemplo de despolarização mais acentuada verificada após mais de 20 minutos de perfusão da droga. Janelas de 20 segundos (escalas horizontais: 5s).

Ao analisarmos as respostas de corrente no início (primeiros 300 milissegundos) dos pulsos do protocolo IV observamos que o mibefradil provocou uma redução do pico negativo presente no pulso de -50mV (mesmo para o pulso de -40mV). Em geral a amplitude dos picos foi reduzida aproximadamente pela metade, embora em dois neurônios tenha sido maior. Entretanto, ao realizarmos uma investigação mais ampla, verificamos que o pico de corrente em questão é eliminado ou quase completamente eliminado pelo TTX ($0,5\mu\text{M}$) (em todos os seis neurônios analisados). Em concordância com os experimentos anteriores, este resultado também apontou para a ausência da ICa_T nos registros.

Assim como o Ni^{2+} $500\mu\text{M}$, o mibefradil também provocou mudanças incomuns na curva IV estacionária. Como pode ser visualizado na Fig. 4.10.6-Aii, a corrente sensível ao mibefradil apresentou um perfil semelhante à encontrada para o Ni^{2+} $500\mu\text{M}$, com diferenças nos pontos em que o pico positivo e a segunda reversão de sinal ocorreram e também na magnitude do pico negativo (-50mV), que foi um pouco maior. A resistência de entrada (medida em *Voltage-Clamp*) também não mudou (Ctrl: $120 \pm 13\text{M}\Omega$; Mibe: $118 \pm 16\text{M}\Omega$; $n=7$; $p=0,8439$).

Como efeitos inespecíficos consideráveis também foram verificados neste experimento, não exploramos mais adiante os dados.

Figura 4.10.6. Curva IV (estacionária) do fenótipo *Active* na condição controle e tratamento (**Ai**, n=7) e corrente sensível ao mibefradil 10 μ M (**Aii**, n=7). A corrente apresentou algumas características em comum com a corrente sensível ao níquel 500 μ M (Fig. 4.10.4-C). Potencial de *holding* = -80mV. **B**: medidas em *Voltage-Clamp* da resistência de entrada.

5. DISCUSSÃO

A proporção populacional dos fenótipos que encontramos, 82% para o fenótipo *Active* e 18% para o *Quiet* (n=294) (Fig. 4.1.1), foi relativamente similar a encontrada por Zugaib (2016) em experimentos utilizando a mesma técnica e os mesmos animais (ratos Wistar machos com 18 a 25 dias de idade), respectivamente 73% e 27% (n=11), e por Kim e Trussell (2007) em experimentos utilizando a técnica de *Perforated Patch-Clamp* (Gramicidina) em camundongos, 76,3% e 33,7% respectivamente (n=335). Dada a forte inibição dos neurônios CW sobre os neurônios fusiformes, mesmo mudanças pequenas na proporção dos fenótipos poderiam resultar em alterações fisiológicas importantes no NCD. Zugaib et al. (2016), por exemplo, observou um aumento de mais de 2X na proporção populacional do fenótipo *Quiet* (que tornou-se o mais abundante) após incubação das fatias do NCD em aCSF contendo salicilato de sódio, agente indutor do *Tinnitus*.

Os fenótipos *Active* e *Quiet* mostraram propriedades intrínsecas bem distintas, apresentando diferenças nas medidas de todos os parâmetros eletrofisiológicos investigados (Fig. 4.1.3). O valor do potencial de repouso do fenótipo *Quiet* que encontramos, de -82,9mV, foi bastante similar ao valor de -82,3mV encontrado por Kim e Trussell (2007), e foi cerca de 10mV mais negativo que o potencial de membrana (Mpm) do fenótipo *Active* (-72,5mV). Já o limiar de atividade (LA) foi mais positivo no fenótipo *Quiet* (-75,9mV) que no fenótipo *Active* (-79,9mV). Este resultado, a princípio, sugeriu uma diferença numa condutância subliminar envolvida na determinação do LA, parâmetro que poderia ser semelhante entre os fenótipos. A primeira hipótese levantada foi uma diferença na corrente de Na^+ persistente (INa_p), uma condutância bem conhecida por controlar o LA e promover atividade espontânea em vários tipos de neurônios (Leão et al., 2012; Taddese e Bean, 2002; Raman e Bean, 1999). De forma geral, uma condutância que torna o LA mais negativo, ainda favorece a geração e manutenção de atividade por outras correntes subliminares despolarizantes. Uma corrente hiperpolarizante, em geral uma corrente de K^+ , pode manter o potencial de membrana em um valor mais negativo que a faixa de ativação da INa_p (como ocorre nos neurônios fusiformes, por ação da IK_{ir} ; Leao et al., 2012) e/ou contrapor-se a ação intrínseca da INa_p (uma corrente de vazamento de K^+ , por exemplo, poderia atuar nesse sentido), neste caso tornando o limiar de atividade mais positivo. Como esta última situação foi verificada

no fenótipo *Quiet*, nós hipotetizamos, inicialmente, que este fenótipo poderia expressar a I_{Na_p} em menores níveis e/ou expressar a $I_{K_{Leak}}$ em maiores níveis, em relação ao fenótipo *Active*.

O fato da resistência de entrada, medida em aproximadamente -80mV, e a constante de tempo da membrana serem menores no fenótipo *Quiet* (respectivamente 86,5MΩ e 13,1ms; contra 116,3MΩ e 21,6ms do fenótipo *Active*), indicou que nos neurônios *Quiets* haveria uma maior expressão de uma ou mais condutâncias subliminares, a princípio podendo ser uma diferença quanto a $I_{K_{ir}}$, $I_{K_{Leak}}$ ou mesmo a I_h . Qualquer uma das três possibilidades poderia contribuir para que o *sag* do fenótipo *Quiet* também fosse menor que o do fenótipo *Active* (1,3mV contra 2,1mV), uma vez que o parâmetro é associado à ativação da I_h e dependente da resistência de entrada.

As diferenças que encontramos entre as curvas IV dos fenótipos *Active* e *Quiet* (Fig. 4.1.4) permitiram uma apreciação melhor, em conjunto com os dados em *Current-Clamp*, de quais condutâncias subliminares poderiam estar envolvidas na determinação dos fenótipos. Primeiramente ressaltamos o fato da curva IV do fenótipo *Quiet* cruzar a linha 0pA uma vez, em aproximadamente -80mV, valor correspondente ao potencial de repouso, enquanto a curva IV do fenótipo *Active* apresentou apenas valores negativos de corrente, indicando a ausência de uma condição de equilíbrio eletroquímico e a presença de correntes de entrada (despolarizantes), ativas por toda faixa subliminar de potencial, excedendo as correntes de saída. Este resultado foi consistente com os dados obtidos em *Current-Clamp* e importante para a classificação fenotípica, como já discutido no item 3.5.

Na faixa de potencial mais negativa, entre -115mV e -95mV, as curvas IV dos fenótipos foram similares (Fig. 4.1.4-A e Fig. 4.1.4-B), o que sugeriu, numa primeira análise, que correntes como a $I_{K_{ir}}$ e a I_h poderiam ser expressas em níveis comparáveis, o que não correspondeu exatamente aos achados posteriores. O deslocamento para cima da curva do fenótipo *Quiet*, evidente a partir de -90mV e progressivamente maior em direção aos potenciais mais positivos, poderia envolver diferenças na expressão tanto de correntes subliminares de K^+ como de correntes de entrada (negativas) como a I_{Na_p} . A região de condutância (ou inclinação) negativa nas curvas IV, partindo de aproximadamente -70mV e intensificando-se na direção positiva, indicou claramente a presença da I_{Na_p} . Esta característica ficou bem evidente nas curvas IV do fenótipo *Active*, enquanto no fenótipo *Quiet* pôde ser

melhor distinguível apenas na curva da Fig. 4.1.4-B. A princípio este resultado havia aumentado as expectativas quanto a uma possível diferença na expressão da INa_p , o que, no entanto, não foi confirmado posteriormente.

Kim e Trussell (2007) obtiveram resultados semelhantes em relação às curvas IV estacionárias (de -110 a -55mV) pertencentes a neurônios CW silentes e neurônios com atividade espontânea. As curvas IV também cruzaram a linha 0pA no grupo silente, o que não ocorreu na maioria dos neurônios com atividade espontânea. Os autores mencionaram um deslocamento para cima da curva IV do grupo silente e verificaram uma região de condutância negativa partindo de aprox. -70mV nos dois grupos. Mais detalhes não foram dados a respeito das curvas IV, porém os autores sugeriram, com base em outros dados (não publicados), que um balanço entre a IK_{ir} , a I_h e correntes de vazamento poderia determinar o nível de atividade dos neurônios CW.

Alguns resultados inesperados (e elucidativos) foram revelados pelos nossos experimentos com o riluzole e o TTX. A INa_p é ativada num potencial bem negativo nos neurônios CW, entre -85mV e -80mV, uma vez que nos neurônios *Quiets* as drogas provocaram uma pequena hiperpolarização do potencial de repouso (mudou de -82,3mV para -85,3mV) (Fig. 4.2.1). Em seus experimentos utilizando o TTX (0,5μM), Kim e Trussell (2007) não observaram alterações no potencial de repouso dos neurônios CW silentes e a ativação da INa_p ocorreu em aproximadamente -75mV, um valor mais próximo do tipicamente reportado na literatura ($\approx$ -70mV). Inusitadamente, nos neurônios *Actives* as drogas causaram uma despolarização do potencial de membrana, ao invés de uma hiperpolarização, que seria esperada por consequência do bloqueio de uma corrente de entrada não-inativante (Fig. 4.2.1 e Fig. 4.2.2). Este resultado é difícil de explicar, porém uma hipótese plausível seria que correntes de K^+ dependentes de Na^+ (IK_{Na}) teriam sido suprimidas por efeito indireto das drogas (bloqueio da entrada de Na^+). Além disso, nos neurônios CW ocorrem fortes hiperpolarizações pós-potenciais de ação (*afterhyperpolarizations*) causadas pela ativação de canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} (K_{Ca} ; Kim e Trussell, 2007), os quais contribuem para tornar o potencial (modal) de membrana mais negativo nos neurônios com atividade espontânea. Com a inibição dos potenciais de ação pela TTX essas fortes hiperpolarizações são atenuadas. Kim e Trussell (2007) observaram que o potencial de membrana dos neurônios CW que possuíam atividade espontânea variou de -75mV a -50mV após aplicação do TTX, sendo que

no subtipo com disparo (tônico) relativamente regular verificaram uma despolarização média de +10mV em relação ao potencial inter-potencial de ação (*interspike trough potential*) da condição controle. Os autores, porém, não ofereceram uma explicação para seus resultados. Em relação ao comportamento espontâneo, ainda verificamos que a maior parte dos neurônios *Actives* parou de disparar potenciais de ação de Na⁺ sob efeito do riluzole. Nos casos em que uma despolarização mais acentuada ocorreu, canais rápidos de Na⁺ provavelmente sofreram inativação, enquanto no restante dos casos (a maioria), embora ocorresse uma despolarização, ela não foi suficiente para que o limiar de disparo de PAs fosse atingido, cujo valor é de -53,5mV nos neurônios CW de ratos, segundo Zugaib (2016) (Mancilla e Manis 2009 reportaram um valor similar, de -50mV). Este resultado mostrou que a INa_p, em boa parte dos neurônios CW, é necessária para que o limiar de disparo seja atingido, e consequentemente para que o disparo espontâneo ocorra.

As drogas não afetaram a resistência de entrada e constante de tempo nos dois fenótipos (Fig. 4.2.4-C e Fig. 4.2.4-D), o que pode ser explicado pelo fato da INa_p ser ativada em potenciais próximos ao potencial de controle (ao redor de -80mV) que usamos para as medidas em *Current-Clamp*, faixa de potencial que possui baixa magnitude. Já o efeito considerável do riluzole e TTX sobre o limiar de atividade era esperado (LA médio ficou cerca de 15mV mais positivo; Figs. 4.2.3 e 4.2.4-B), principalmente com base no trabalho de Leão et al. 2012, e o ponto mais interessante do resultado foi o fato do efeito ter sido de magnitude similar nos dois fenótipos. Considerado de forma isolada, este resultado já apontaria para níveis de expressão da INa_p semelhantes entre os fenótipos. O efeito sobre o LA significa que na ausência da INa_p qualquer estímulo intrinsicamente gerado ou externo (sináptico) precisa produzir uma despolarização muito maior para que potenciais de ação fossem evocados. Este resultado salienta, portanto, a capacidade inerente da INa_p de promover atividade espontânea e sua forte influência sobre a excitabilidade.

A análise dos registros em *Voltage-Clamp*, tanto curvas IV como as rampas, confirmaram o que já era sugerido pelos dados em *Current-Clamp*. Nos traçados da corrente sensível ao riluzole e TTX é possível perceber claramente a ativação da INa_p em torno de -85mV em ambos os fenótipos (Figs. 4.2.5-C e 4.2.5-D). Contrariando as primeiras expectativas baseadas nas diferenças dos parâmetros eletrofisiológicos entre os dois fenótipos, especialmente entre as curvas IV e limiar de

atividade (como já tinha sido mencionado), nenhuma diferença foi encontrada a respeito de qualquer característica ou medida da I_{Na_p} : a corrente é igualmente expressa em ambos os fenótipos. Foi nesse momento que a hipótese de que alguma corrente de K^+ estaria contrapondo a ação da I_{Na_p} tornou-se a mais plausível.

No experimento seguinte observamos que a inibição da $I_{K_{ir}}$ causou forte despolarização nos dois fenótipos, com a Mpm variando em média mais de +20mV (Figs. 4.3.2 e 4.3.3). Os padrões de atividade gerados foram de ao menos 3 tipos (Fig. 3.2.1), sendo todos muito distintos dos padrões observados em condições controle, incluindo formas alteradas de todos tipos de potenciais de ação (dentre os simples e complexos). O disparo espontâneo de PAs foi, inclusive, interrompido nos casos de despolarização mais acentuada. Estes resultados demonstraram que a $I_{K_{ir}}$ é necessária para que um potencial de membrana estável seja estabelecido, uma função bem conhecida desta corrente (Uchimura et al., 1989; Reimann e Ashcroft, 1999; Hibino et al., 2010), e portanto, para que o próprio fenótipo *Quiet* exista; necessária também para que padrões normais (fisiológicos) de atividade sejam gerados. De forma mais geral, ficou claro que a $I_{K_{ir}}$ participa de modo crucial no controle do potencial de membrana em ambos os fenótipos.

O aumento na resistência de entrada e constante de tempo da membrana era esperado como resultado da inibição da $I_{K_{ir}}$ (ou qualquer outra corrente subliminar de K^+) e foi um pouco mais pronunciado no fenótipo *Quiet* (Figs. 4.3.5-C e 4.3.5-D). Uma explicação para o fato do limiar de atividade não ter sido afetado seria que a $I_{K_{ir}}$ possui maior condutância em potenciais próximos ao E_K (potencial de equilíbrio do K^+ , aprox. -109mV na nossa preparação), isto é, apresenta baixa condutância e magnitude na faixa de potencial de maior condutância (linear e de corda) da I_{Na_p} (que começa a aumentar rapidamente sua condutância a partir de aprox. -65mV).

O achado mais inusitado do experimento, e ao mesmo tempo o mais significativo para os objetivos específicos do projeto, foi a diferença encontrada entre os fenótipos na corrente sensível ao Ba^{2+} (Fig. 4.3.6-C). A corrente mostrou-se semelhante na faixa de -115mV a -95mV porém apresentou uma diferença bastante expressiva na retificação, diferença que começou em -85mV e aumentou de forma progressiva em direção aos potenciais mais positivos. Isto indicou que uma componente sem retificação foi inibida apenas no fenótipo *Quiet*. Esta diferença seria muito difícil de ser prevista ou inferida com base apenas em registros em *Current-Clamp* e sua grande relevância pode ser apreciada ao retomarmos a

diferença entre as curvas IV dos fenótipos *Active* e *Quiet* (Figs. 4.1.4-A e 4.1.4-B), caracterizada por desvio progressivo da curva do fenótipo *Quiet* para cima na direção positiva. Como sabíamos que os canais K_{ATP} são membros da família de canais K_{ir} que produzem uma corrente com pouca retificação (Hibino et al., 2010), uma de nossas hipóteses foi que haveria uma diferença na expressão da IK_{ATP} entre os fenótipos. Alternativamente, uma diferença na expressão de uma corrente de K^+ de baixo limiar (*low-threshold potassium current*), que poderia estar sendo inibida pelo Ba^{2+} , também poderia explicar o achado em questão.

No experimento seguinte o antagonista de canais K_{ATP} tolbutamida foi aplicado e os resultados foram consistentes com a primeira hipótese que acabamos de mencionar, oferecendo uma resposta mais clara a pergunta específica e central do projeto. A droga não teve efeitos significativos sobre o comportamento espontâneo dos neurônios *Actives* ao mesmo tempo que gerou atividade espontânea em 9 dos 11 neurônios *Quiets* registrados (Fig. 4.4.1), e mais importante, em 6 dos 9 neurônios, os padrões de atividade gerados foram semelhantes aos observados em neurônios *Actives* em condições controle (nos outros 3 neurônios subtipos mais raros de fenótipos foram gerados). De modo ainda mais surpreendente, nos neurônios *Quiets*, todos os cinco parâmetros que analisamos em *Current-Clamp*, moda do potencial de membrana (Mpm), limiar de atividade (LA), resistência de entrada (R_m), constante de tempo da membrana (τ_m) e *sag*, adquiriram valores característicos do fenótipo *Active* (Fig. 4.4.3). De fato, não encontramos diferenças estatísticas entre a condição controle do fenótipo *Active* e tratamento do fenótipo *Quiet*. Estes resultados deram um primeiro suporte à ideia de que uma diferença na expressão da IK_{ATP} poderia ser um fator determinante na geração dos fenótipos *Active* e *Quiet*.

A análise dos dados em *Voltage-Clamp* novamente revelou um resultado surpreendente e muito significativo ao mesmo tempo. A corrente inibida pela tolbutamida, no fenótipo *Quiet*, além de ter mostrado muito pouca retificação, apresentou maior condutância na faixa de -75mV a -55mV (Fig. 4.4.4-C), exatamente a mesma faixa de potencial onde a diferença entre os fenótipos se concentra, tanto em relação a IK_{ir} (Fig. 4.3.6-C) como a corrente total (curvas IV características dos fenótipos, Figs. 4.1.4-A e 4.1.4-B). Condizente com os dados em *Current-Clamp*, no fenótipo *Active* a tolbutamida não inibiu de forma significativa

nenhuma corrente. Portanto, os dados deste experimento ofereceram forte evidência de que uma única condutância, a IK_{ATP} , seria capaz de gerar neurônios *Quiets*.

Como já mencionado na seção Resultados, uma importante questão surgiu após a análise dos achados que acabamos de discutir: nos neurônios *Actives* os canais K_{ATP} não seriam expressos ou estariam fechados? Para responder a pergunta realizamos um experimento com o agonista de canais K_{ATP} Diazoxida. Se a primeira hipótese fosse verdadeira, a droga não teria efeitos nos neurônios *Actives*, caso a segunda fosse verdadeira, o oposto seria observado. Aconteceu que a diazoxida teve ação em 15 dos 17 neurônios *Actives* registrados, tornando 13 silentes, com valores de potencial de repouso muito similares aos tipicamente observados nos neurônios *Quiets* em condições controle (Fig. 4.5.1), o que acabou confirmando a última hipótese. Para nossa surpresa, o mesmo foi verificado em relação a todos os parâmetros medidos em *Current-Clamp*: as medidas da M_{pm} , LA , R_m , τ_m e sag dos 15 neurônios após aplicação diazoxida foram estatisticamente equivalentes às medidas do fenótipo *Quiet* (Fig. 4.5.3). Os dados obtidos em *Voltage-Clamp* foram ainda mais surpreendentes e confirmatórios: por ação da diazoxida, a curva IV dos neurônios *Actives* tornou-se virtualmente indistinguível da curva IV do fenótipo *Quiet* (Fig. 4.5.4-B) e, além disso, a corrente sensível a diazoxida foi muito similar a corrente sensível a tolbutamida (Fig. 4.5.4-C), apresentando as mesmas características (mesmo perfil) e medidas de condutância equivalentes.

Analisados conjuntamente, os resultados obtidos nos dois experimentos foram complementares e confirmatórios entre si: a inibição da IK_{ATP} pela tolbutamida foi suficiente para converter a maioria dos neurônios *Quiets* em *Actives*, e de maneira inversa, a ativação da IK_{ATP} pela diazoxida converteu neurônios *Actives* em *Quiets*. Isto demonstrou de forma definitiva que a regulação da IK_{ATP} constitui o principal mecanismo responsável pela determinação dos fenótipos, sendo que nos neurônios *Active* os canais K_{ATP} são mantidos fechados enquanto nos neurônios *Quiets* os canais K_{ATP} estão abertos. Os dados também mostraram que um mecanismo secundário de determinação dos fenótipos existe, uma vez que a tolbutamida não teve efeito em 2 de 11 neurônios *Quiets* e a diazoxida em 2 de 17 neurônios *Actives*, sendo que outros 2 ainda permaneceram *Actives*.

Mas afinal, por que os canais K_{ATP} são mantidos fechados num fenótipo e abertos no outro? A função desses canais está estreitamente acoplada ao

metabolismo celular e embora sua regulação fisiológica seja complexa, dependente da concentração de nucleotídeos intracelulares, o ATP intracelular (ATPi) livre é o principal regulador (a razão ATPi/ADPi, assim como a concentração individual de ATPi, é um fator regulatório central). Os canais K_{ATP} são constituídos por 4 subunidades formadoras de poro $K_{ir}6.2$ e 4 subunidades reguladoras SUR.x, as quais contêm os sítios de ligação das sulfoniluréias, como a tolbutamida e a diazoxida. O ATPi inibe a abertura do canal por interação direta com as regiões citoplasmáticas da subunidade $K_{ir}6.2$, enquanto nucleotídeos difosfato como o ADPi, ao contrário, estimulam (na presença de Mg^{2+} , ADP-Mg) a abertura do canal por interação com sítios citoplasmáticos das subunidades SUR.x. Já as sulfoniluréias podem tanto inibir como estimular a abertura dos canais K_{ATP} por interação com sítios específicos das subunidades SUR.x, como é o caso da tolbutamida e diazoxida, respectivamente (Hibino et al., 2010). Todas estas informações são importantes na tentativa de se responder a pergunta imposta pelo nosso achado. A hipótese mais imediata, porém bem plausível, seria que a concentração de ATPi metabólico é suficientemente baixa nos neurônios *Quiets* para que os canais K_{ATP} permaneçam abertos, ou seja, o fenótipo seria determinado pelo estado (*status*) metabólico dos neurônios. Nesse sentido, as transições fenotípicas (em 10 a 20% dos casos) que observamos nas duas direções (*Quiet* $\leftrightarrow$ *Active*) poderiam ser uma consequência de flutuações metabólicas transientes. Outro fator importante a ser analisado é a concentração de 2mM de ATP-Mg que usamos na solução interna. Concentrações da ordem da ordem de dezenas a centenas de micromolar (μM) de ATPi metabólico já são suficientes para o fechamento de canais K_{ATP} $K_{ir}6.2$ /SUR1, os mesmos encontrados nas células β -pancreáticas e muito provavelmente também nos neurônios CW, como não há evidências de que expressam a subunidade $K_{ir}6.1$ (Friedland et al., 2007) e a tolbutamida, na concentração usada (100 μM), provoca inibição apenas dos subtipos $K_{ir}6.2$ /SUR1 (Hibino et al., 2010).

A princípio nossos registros em *Whole-Cell* estariam sendo afetados pela dialise do ATP-Mg da solução interna, que provocaria o fechamento dos canais K_{ATP} e despolarização dos neurônios, porém uma série de fatores não sustenta esta ideia. Primeiramente a proporção dos fenótipos que encontramos em *Whole-Cell* foi igual à encontrada em *Cell-Attached*, e também próxima ao valor observado por Kim e Trussell (2007) em seus experimentos empregando a técnica de *Perforated Patch-Clamp*, que preserva o meio intracelular. Um segundo fator foi que, como

demonstrado pela ação da tolbutamida e diazoxida, canais K_{ATP} são mantidos abertos nos neurônios *Quiets*, o que dificilmente seria verificado caso o ATP-Mg proveniente da solução interna os estivesse inibindo. Além disso, em um trabalho realizado pelo nosso grupo investigando a influência da variação da concentração externa de glicose sobre a atividade dos canais K_{ATP} em neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), não foram encontradas evidências de que os registros em *Whole-Cell* estariam sendo afetados pela concentração de 3-4mM de ATP-Mg usada na solução interna (Murat e Leão, 2019). Resultados similares foram reportados por Balfour et al. (2006) também em neurônios do NTS, e por Müller et al. (2002) e Song et al. (2001), em neurônios do núcleo motor dorsal do vago e hipotálamo, respectivamente. Como uma possível explicação, a manutenção da atividade dos canais K_{ATP} pelo ATP-Mg pode dar-se pela estimulação de PIKs (fosfatidilinositol quinases) dependentes de ATP, cuja ação aumenta a produção do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) (Hilgemann e Ball, 1996; Hibino et al., 2010), um fator regulatório que reduz a afinidade (ou sensibilidade) dos canais K_{ATP} pelo ATPi (Baukrowitz et al., 1998; Shyng et al., 2000; Huang et al., 1998). Somado a isto, a compartimentalização dos canais K_{ATP} em microdomínios próximos às enzimas produtoras de ATP, mitocondriais e citosólicas, também pode contribuir para a ausência de efeitos inibitórios significativos do ATP-Mg proveniente do eletrodo (Garg et al., 2009). A respeito do papel dos canais K_{ATP} no controle do potencial de membrana dos neurônios do NTS, Murat e Leão (2019) verificaram que a maior parte dos neurônios silentes, em condições normoglicêmicas (5mM de glicose), responderam a tolbutamida (100 μ M) com uma taxa de disparo média de 2,3Hz. Já em condições hiperglicêmicas (10mM de glicose) os neurônios do NTS apresentaram um potencial de repouso (RMP) mais despolarizado e uma menor parcela respondeu a tolbutamida, sugerindo uma inibição dos canais K_{ATP} pelo ATPi metabólico derivado da glicose externa. A diazoxida (200 μ M) hiperpolarizou a maioria dos neurônios do NTS, porém foi aplicada na presença de TTX, o que torna mais difíceis inferências a respeito de mudanças fenotípicas referentes ao padrão de atividade. Em neurônios do sistema nervoso central, até onde conhecemos, não existem na literatura achados similares ao nosso, em que o estado condutivo de canais K_{ATP} é capaz de gerar integralmente fenótipos do tipo silente e ativo (com atividade espontânea), com propriedades intrínsecas tão distintas.

Na introdução comentamos que o agente indutor de *Tinnitus* salicilato é um desacoplador metabólico que age na cadeia respiratória das mitocôndrias e que a hiperexcitabilidade dos neurônios fusiformes esta implicada na gênese do *Tinnitus*. Além disso, num trabalho também realizado pelo nosso grupo, Zugaib et al. (2016) mostrou que o salicilato aumenta a proporção dos neurônios CW silentes e reduz a frequência de disparo dos neurônios CW com atividade espontânea, ao mesmo tempo que também reduz a frequência das IPSCs espontâneas sobre os neurônios fusiformes. Todos estes achados são condizentes com a hipótese que levantamos, na qual uma diferença de estado metabólico dos neurônios CW estaria diretamente relacionada ao papel determinante dos canais K_{ATP} na geração dos fenótipos *Quiet* e *Active*. O desacoplamento metabólico causado pela exposição prolongada ao salicilato provocaria uma depleção do ATPi, que por sua vez estimularia a abertura dos canais K_{ATP} (uma vez que o ATPi é o principal fator inibitório). A ativação da IK_{ATP} ocasionaria a perda e redução da atividade espontânea dos neurônios CW e consequentemente a inibição sobre os neurônios fusiformes seria severamente atenuada/reduzida. Nós propomos que este seja um dos mecanismos patofisiológicos do *Tinnitus*.

No experimento seguinte tentamos isolar os efeitos de correntes de vazamento de K^+ (IK_{Leak}) a partir da aplicação sequencial de Ba^{2+} 100 μ M e Ba^{2+} 5mM. Qual seria a contribuição da IK_{Leak} para o controle do potencial de membrana dos neurônios CW? A IK_{Leak} estaria envolvida no mecanismo secundário de determinação fenotípica? No sistema nervoso auditivo, por exemplo, em um estudo realizado pelo nosso grupo, Dagostin et al. (2015) mostrou que a IK_{Leak} controla o disparo fásico de neurônios auditivos do prosencéfalo de aves.

Ao registramos um número suficiente de neurônios e realizarmos uma primeira análise obtemos uma combinação de resultados tanto esperados quanto inesperados. A despolarização acentuada causada pelo Ba^{2+} 5mM (Fig. 4.6.1), assim como o aumento da resistência de entrada e constante de tempo da membrana (Figs. 4.6.2-C e 4.6.2-D) podem ser atribuíveis a inibição de uma IK_{Leak} expressa em níveis robustos. Ao contrário do que obtemos, uma alteração do limiar de atividade para valores mais positivos também seria esperada por consequência da inibição da IK_{Leak} (ao menos se originalmente expressa em níveis substanciais), pois ao contrário da IK_{ir} , a IK_{Leak} apresenta uma condutância praticamente invariável por toda faixa subliminar de potencial e por esta razão deveria contrapor, em alguma

medida, a I_{Na_p} . Um segundo resultado inusitado, e difícil de explicar inicialmente, foi o efeito moderado ou ausente do Ba^{2+} 5mM sobre o sag (Fig. 4.6.3-A), em comparação com o efeito do Ba^{2+} 100 μ M. Um aumento do sag deveria ser observado em todos os casos, dado o aumento acentuado da resistência de entrada provocado pelo Ba^{2+} 5mM, em relação ao Ba^{2+} 100 μ M (Fig. 4.6.2-C).

A análise posterior dos dados em *Voltage-Clamp* revelou claramente que correntes de entrada também foram inibidas pelo Ba^{2+} 5mM, uma vez que a corrente sensível apresentou valor positivo apenas em -55mV, com um valor próximo de 0pA em -65mV (Fig. 4.6.4-Aiii). Se apenas a inibição de correntes de K^+ tivesse ocorrido, o ponto 0pA estaria próximo do E_K ($\approx$ -109mV) e valores positivos de corrente seriam verificados para potenciais positivos ao E_K . Como a corrente sensível apresentou um perfil linear, a princípio supomos que correntes de vazamento de Na^+ produzidas por canais do tipo NALCN – um subtipo de canal de Na^+ não-seletivo envolvido no controle do potencial de membrana e padrões rítmicos de atividade neuronal (Ren, D., 2011; Lu e Feng, 2012) – poderiam ter sido inibidas pelo Ba^{2+} 5mM, porém não encontramos registros na literatura de que este canal é inibido pelo Ba^{2+} . Numa segunda análise, baseada nos achados inusitados do Ba^{2+} 5mM em relação ao sag, verificamos que a droga na alta concentração (5mM) que usamos poderia ter causado uma inibição parcial da I_h (Biel et al., 2009). A hipótese tornou-se mais plausível pelo fato da corrente ainda poder apresentar um perfil relativamente linear com uma reversão em potenciais mais positivos que o *holding* de -65mV utilizado neste experimento. Como será discutido mais adiante, a inibição da I_h altera o limiar de atividade (LA) na direção negativa, o que poderia contribuir para o fato do Ba^{2+} 5mM não ter modificado este parâmetro, uma vez que a inibição da $I_{K_{Leak}}$ deveria alterar o parâmetro na direção positiva (tornar o LA mais positivo). Devido aos efeitos inespecíficos gerados pelo Ba^{2+} 5mM, não pudemos chegar a nenhuma conclusão a respeito das duas perguntas levantadas no início do parágrafo anterior, as quais se aplicam para as duas outras condutâncias subliminares que discutiremos mais adiante, a I_h e a I_{Ca_T} . No entanto, considerando o objetivo geral do projeto, como uma despolarização acentuada foi observada em relação à condição Ba^{2+} 100 μ M, é bem provável que a $I_{K_{Leak}}$ inibida pelo Ba^{2+} 5mM seja necessária para o estabelecimento de um potencial de repouso e níveis normais (fisiológicos) de atividade, assim como a $I_{K_{ir}}$.

Explorando um pouco a modulação de correntes de K^+ nos neurônios CW, no primeiro experimento com o agonista metabotrópico $GABA_B$ baclofen verificamos que a droga causou uma hiperpolarização do potencial de membrana (um pouco mais pronunciada que a gerada pela diazoxida) em todos os neurônios registrados (incluindo um neurônio *Quiet*) (Fig. 4.7.1), acompanhada da diminuição da resistência de entrada e constante de tempo da membrana (Figs. 4.7.3-C e 4.7.3-D). A princípio todos estes efeitos poderiam ser derivados da ativação dos canais GIRKs (canais K_{ir} acoplados a proteína G; ver item 3.6). No entanto o baclofen produziu um efeito robusto sobre o limiar de atividade (Fig. 4.7.3-B), que variou mais de 6mV na direção positiva, alcançando nos neurônios *Actives* um valor médio semelhante ao do fenótipo *Quiet*. No experimento com Ba^{2+} 100 μ M, a inibição da IK_{ir} não alterou o limiar de atividade, ou seja, alguma corrente de K^+ com condutância expressiva na faixa de potencial de INa_p estava sendo ativada pelo baclofen.

Mais uma vez os dados em *Voltage-Clamp* esclareceram melhor o que poderia estar acontecendo. A corrente sensível ao baclofen apresentou um perfil linear, sem retificação (Fig. 4.7.4-Aii), relativamente similar ao perfil obtido para a corrente sensível a diazoxida, outro achado inusitado, visto que as correntes ativadas pelos canais GIRKs tipicamente apresentam alguma retificação, como o próprio nome destes canais indica. De fato, a magnitude de pico da corrente e sua condutância de corda em -55mV foram semelhantes as medidas encontradas para a IK_{ATP} . Como os dados referiam-se apenas a neurônios *Actives* neste primeiro experimento, nós hipotetizamos que a IK_{ATP} poderia estar sendo ativada pelo baclofen. A ideia ainda encontrava respaldo em trabalhos como os de Roeper et al. (1990) e Terzic et al. (1994), que reportaram a abertura de canais K_{ATP} em decorrência da ativação de receptores acoplados a proteína G e aplicação direta de ativadores de proteínas G, respectivamente. Em Roeper et al. (1990), por exemplo, a tolbutamida (100 μ M) não alterou a atividade espontânea e a resistência de entrada de neurônios da substância negra, mas reverteu os efeitos do baclofen (10 μ M), que similarmente aos nossos achados, provocou uma hiperpolarização do potencial de membrana (de modo a tornar os neurônios silentes) e diminuição da resistência de entrada.

Os resultados que obtemos no segundo experimento, em que investigamos os efeitos do baclofen na presença da tolbutamida, foram semelhantes aos

encontrados no primeiro (Figs. 4.7.6 e 4.7.7), o que ofereceu forte evidência contra a hipótese que acabamos de apresentar. Se o baclofen estivesse ativando canais K_{ATP} , seu efeito seria ao menos atenuado na presença da tolbutamida, o que não ocorreu. Adicionalmente, neste segundo experimento, registramos um número mínimo de neurônios *Quiets* para que conclusões sobre este fenótipo fossem possíveis. A tolbutamida, confirmando os resultados anteriores, converteu os neurônios *Quiets* em *Actives*, sendo que todos os 4 neurônios adquiriram padrões de atividade ou subtipos de fenótipo *Active* comumente observados em condições controle (Fig. 4.7.6). Os efeitos do baclofen foram os mesmos observados para os neurônios originalmente *Actives*, exceto por uma alteração mais sutil nos valores do limiar de atividade (Fig. 4.7.7-B). A ausência de diferença estatística entre o valor médio do LA na condição tolbutamida e tolbutamida + baclofen pode ser explicada pelo fato de apenas 4 neurônios compor nossa amostra. Como pode ser verificado na Fig. 4.7.8-C, os perfis da corrente sensível ao baclofen obtidos nos dois experimentos foram praticamente indistinguíveis, e portanto, pudemos concluir que a droga ativa uma corrente de vazamento de K^+ . A regulação de canais de vazamento de K^+ por receptores acoplados a proteínas G já é bem conhecida (Mathie, 2007). Por exemplo, aumentos na amplitude da IK_{Leak} produzida por canais de vazamento de K^+ do tipo TREK2 (membro da família de canais K2P; ver parágrafo inicial do item 4.6) foram observados seguindo estimulação de receptores mGluR2 e ativação de proteínas $G_{\alpha i}$ (Lesage et al., 2000), um subtipo de proteína G comumente associado aos receptores $GABA_B$ (Morishita et al., 1990). Além disso, e de forma importante, os dois fenótipos não apresentaram diferenças quanto a ativação da IK_{Leak} , o que sugere um nível equivalente de expressão dos canais K_{Leak} .

No experimento seguinte investigamos os efeitos do antagonista de canais HCN ZD7288. A droga gerou uma hiperpolarização acentuada nos dois fenótipos (Fig. 4.8.1), comparativamente maior que a observada por ação da diazoxida ou baclofen. A Mpm da grande maioria dos neurônios, tanto *Actives* como *Quiets*, atingiu valores mais negativos que -90mV. Todos os neurônios *Actives* registrados tornaram-se silentes, demonstrando de forma clara que a I_h é necessária para que a atividade espontânea seja gerada. De forma importante, a mudança (média) da Mpm nos neurônios *Actives* foi de mais de -17mV, cerca de duas vezes maior que a mudança ocorrida nos neurônios *Quiets*, de -8mV, o que sugeriu uma diferença na expressão da I_h entre os fenótipos (Fig. 4.2.8-A). O aumento provocado na

resistência de entrada e constante de tempo (Figs. 4.2.8-C e 4.2.8-D) era esperado por consequência da inibição de uma condutância ativa por toda faixa subliminar de potencial, especialmente nas mais negativas, as quais incluem a faixa do potencial de controle (ao redor de -80mV) que utilizamos nos protocolos VI.

Inicialmente não tínhamos uma ideia clara de como a I_h contribuiria com o limiar de atividade. A mudança substancial do parâmetro na direção negativa (ficou mais negativo) causada por ação do ZD (Fig. 4.8.2-B), nos dois fenótipos, muito provavelmente foi uma consequência indireta do aumento da resistência de entrada. A ativação da INa_p nos neurônios CW ocorre entre -85mV e -80mV e espera-se que um aumento da resistência de entrada potencialize seu efeito sobre o limiar de atividade. De fato nós observamos que após aplicação do ZD, tão logo a faixa de ativação da INa_p fosse atingida por injeção de corrente positiva, uma forte e rápida despolarização ocorria, de modo que os neurônios passavam a sustentar (de forma praticamente imediata) um nível de atividade bem elevado. Nos registros VI mostrados na Fig. 4.8.4 é possível visualizar este comportamento, em resposta ao pulso despolarizante, nos dois neurônios representativos. Em alguns casos mais extremos esta despolarização abrupta alcançou valores mais positivos que o limiar de disparo ($\approx$ -50mV), ocasionando inativação dos canais rápidos de Na^+ . Após aplicação do ZD, uma dificuldade que enfrentamos neste experimento foi manter o potencial de membrana dos neurônios ao redor de -80mV (potencial de controle) durante aplicação do protocolo VI; na maioria dos casos, nos dois fenótipos, o valor do potencial de controle (do protocolo VI) ficou mais negativo que -80mV (os registros VI em que o potencial de controle ficou muito negativo ou instável foram excluídos da análise dos dados). Podemos verificar que após aplicação do ZD o limiar de atividade dos fenótipos *Active* e *Quiet* ficou igual, com valores médios mais negativos que -85mV, um resultado que de forma isolada já indicaria a presença da INa_p nos dois fenótipos e também sua ativação mais negativa.

Após aplicação do ZD o *sag* foi quase eliminado, como esperado pela inibição da I_h (Fig. 4.8.3-A). É possível que uma eliminação completa tenha ocorrido, de forma que o valor médio ($\approx$ 0,4mV) real tenha ficado mais próximo de 0mV. Nos registros VI, os picos negativos no início dos pulsos foram de fato eliminados, como evidenciado na Fig. 4.8.4, e o valor médio do *sag* após aplicação do ZD pode ter ficado superestimado por termos usado no cálculo o potencial mínimo em torno de 300 milissegundos do pulso. Se tivéssemos considerado apenas os primeiros 150 a

200 milissegundos do pulso (intervalo mais próximo da ocorrência do pico negativo em condições controle), o valor médio do *sag* seria significativamente menor (mais próximo de 0mV). O perfil atípico (não-linear) da dependência do *sag* em relação à magnitude da corrente hiperpolarizante injetada, mostrado na Fig. 4.8.3-B, foi verificado na grande maioria dos neurônios CW que registramos ao longo do projeto, e curiosamente, apenas na condição tratamento dos experimentos com Ba^{2+} 100uM e Ba^{2+} 5mM um perfil mais típico (linear) foi obtido. Isto poderia estar ocorrendo devido à diminuição gradativa da resistência de entrada dos neurônios CW em direção aos potenciais mais negativos, a qual é determinada em larga escala pela IK_{ir} . Isso fica claro observando-se na Fig. 4.3.6 (A e B) as curvas IV antes e após aplicação do Ba^{2+} 100 μM : ocorre uma redução drástica da condutância linear total (g_{slope} total) na faixa mais negativa de potencial por consequência da inibição da IK_{ir} .

Os dados em *Voltage-Clamp* mostraram uma diferença na corrente sensível ao ZD entre os dois fenótipos, confirmando o que tinha sido indicado pelos registros em *Current-Clamp*. A corrente sensível apresentou menor magnitude no fenótipo *Quiet* em comparação ao *Active* em todos os potenciais examinados (Figs. 4.8.5b-Aiii e 4.8.5b-Biii). Diferenças estatísticas foram encontradas tanto para a medida do pico da corrente como para a condutância de corda. Uma outra característica interessante que pode ser visualizada na Fig. 4.8.5b é que, aparentemente, a corrente sensível do fenótipo *Quiet* está deslocada para a esquerda em relação a corrente do fenótipo *Active*. É possível que esta seja uma segunda diferença entre os fenótipos, que baseado na regulação dos canais HCN, poderia ser decorrente de menores níveis de AMP cíclico (ou GMPc) nos neurônios *Quiets*. O deslocamento da curva de ativação da I_h para a direita (facilitação da ativação dos canais HCN) em função do aumento da concentração de AMPc é uma propriedade singular da corrente (Biel et al., 2009). Experimentos adicionais teriam de ser realizados para investigarmos a modulação da I_h por AMPc nos dois fenótipos.

Repetindo a mesma pergunta feita para a IK_{Leak} , poderia esta diferença na expressão da I_h fazer parte do mecanismo secundário de determinação fenotípica dos neurônios CW? A pergunta pode ser explorada com base no experimento anterior com a tolbutamida. Os neurônios *Quiets* foram convertidos em *Actives* após inibição da IK_{ATP} pela tolbutamida, o que significa que apesar do fato do fenótipo expressar a I_h em menores níveis, ela ainda promove a atividade espontânea. É possível, no entanto, que especificamente na parcela ($\approx 20\%$) de neurônios *Quiets*

que não respondem a tolbutamida, a menor expressão da I_h , combinada com uma diferença na expressão de correntes de vazamentos, esteja gerando o estado quiescente. Nestes neurônios *Quiets*, um aumento na amplitude da I_h para os níveis expressos no fenótipo *Active* poderia promover a atividade espontânea. Esta hipótese poderia ter sido explorada nos experimentos com o DHPG, visto que nos neurônios Purkinje a I_h é modulada positivamente pela ativação de receptores mGluR1 (Correa et al., 2017; Shim et al., 2016), porém como descrito na seção Resultados e discutido na sequência, a droga não teve efeitos sobre a I_h nos neurônios CW. A hipótese em questão ainda poderia ser investigada em experimentos utilizando a técnica *Dynamic-Clamp*, a qual permitiria um aumento artificial da amplitude da I_h via interface computacional (Ceballos et al., 2016).

Em nosso experimento com o DHPG, os registros em *Voltage-Clamp* mostraram claramente que I_h nos neurônios CW não é modulada pela ativação de receptores mGluR1, como ocorre nos neurônios Purkinje cerebelares (Correa et al., 2017). O perfil muito incomum/atípico da corrente sensível ao DHPG que obtemos não se assemelha ao perfil de qualquer corrente subliminar por nos conhecida (Fig. 4.9.2-C). Em um trabalho recente empregando as mesmas técnicas de *Whole-Cell Current-Clamp* e *Voltage-Clamp*, Alhadas (2019) obteve resultados similares ao nosso em neurônios do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB). O DHPG ($10\mu\text{M}$) provocou uma despolarização do potencial de membrana, aumento da resistência de entrada e deslocamento da curva IV (derivada de protocolo rampa de -120mV a -30mV , em 2 segundos) para baixo. A corrente sensível ao DHPG apresentou a mesma forma/perfil que obtemos para o fenótipo *Active*, mostrada na Fig. 4.9.2-C, embora sua magnitude tenha sido menor, atingindo um pico de aprox. -100pA em -40mV . Na tentativa de compreender sua base iônica, o autor pôde concluir que a corrente não é produzida por canais de Na^+ dependentes de potencial (Na_v), uma vez que o TTX não alterou os efeitos do DHPG. Pelo fato da corrente apresentar valores progressivamente menores em direção ao E_K (-101mV na sua preparação) o autor sugeriu que o ao invés de estar ativando uma corrente de entrada, o DHPG poderia estar bloqueando uma corrente de K^+ .

Em nosso primeiro experimento investigando a ICa_T observamos alguns efeitos claros do Ni^{2+} $50\mu\text{M}$ em apenas 2 neurônios. No neurônio *Active* a diminuição da frequência dos potenciais complexos isolados em resposta aos pulsos despolarizantes do protocolo VI poderia ser decorrente da inibição da ICa_T . No

estudo feito por Kim e Trussell (2007), embora o Ni^{2+} $50\mu\text{M}$ não tenha sido utilizado, a aplicação de $1,5\mu\text{M}$ de mibefradil praticamente eliminou o disparo de potenciais complexos isolados, tanto os espontâneos como os evocados (ver no item 1.3 da introdução e Fig. 1.2.2 a participação da ICa_T na base iônica deste tipo de potencial de ação). No entanto nossos registros em *Voltage-Clamp* (Fig. 4.10.1) mostraram que nenhuma corrente com as propriedades da ICa_T foi inibida pelo Ni^{2+} $50\mu\text{M}$, e ainda que uma corrente de saída estacionária foi inibida no pulso de -60mV nos dois neurônios em questão, indicando que os efeitos observados foram inespecíficos.

Em seus experimentos Kim e Trussell (2007) aplicaram o Ni^{2+} na concentração de $500\mu\text{M}$ (na presença de TTX) e verificaram que os potenciais lentos de Ca^{2+} - presumivelmente os mesmos que formam os diferentes tipos de potenciais complexos - foram eliminados em resposta a pulsos de $+200\text{pA}$ partindo de -80mV . Em nossos registros VI apenas em um neurônio *Quiet* pudemos verificar claramente uma forte redução na frequência de potenciais complexos evocados. Em relação ao comportamento espontâneo, o Ni^{2+} $500\mu\text{M}$ provocou uma despolarização em todos os neurônios registrados (Fig. 4.10.3) e não observamos nos neurônios *Actives* mudanças do padrão de atividade em salvas para o disparo tônico, como reportado por Bender et al. (2012) em decorrência da inibição dos canais Ca_T do segmento inicial do axônio, região onde estes canais se concentram nos neurônios CW (Bender e Trussell, 2009).

Como no experimento com o Ni^{2+} $50\mu\text{M}$, não detectamos inibição de nenhuma corrente com as propriedades da ICa_T nos registros em *Voltage-Clamp*. Além disso, como pode ser visualizado na Fig. 4.10.4-C, ao menos duas correntes estacionárias, uma de saída e uma de entrada, foram inibidas pelo Ni^{2+} $500\mu\text{M}$. O fato de um ponto de reversão (0pA) ocorrer em torno de -105mV sugere que a corrente de saída seja uma corrente de K^+ . Por estas razões, a inibição dessas correntes inespecíficas deve ter gerado os efeitos observados em *Current-Clamp* e nenhuma conclusão a respeito da ICa_T pode ser auferida deste experimento. O mesmo podemos afirmar sobre o experimento com Ni^{2+} $50\mu\text{M}$.

Além dos efeitos mencionados sobre o disparo de potenciais complexos, Kim e Trussell (2007) observaram, na presença de TTX, uma pequena despolarização do potencial de membrana dos neurônios CW após aplicação do mibefradil ($1,5\mu\text{M}$ e $3\mu\text{M}$). Na ausência de TTX, nos subtipos que disparavam apenas potenciais de ação

simples, os autores reportaram um aumento da frequência de disparo. Em nossos experimentos o mibefradil ($10\mu\text{M}$) também causou uma despolarização do potencial de membrana (Fig. 4.10.5), sendo que em ao menos cinco neurônios (de sete registrados no total) também observamos um aumento da frequência média de disparo (observações qualitativas). A despolarização que observamos foi mais acentuada que a reportada por Kim e Trussell (2007), o que a princípio poderia ser uma consequência da maior concentração da droga que usamos. Inusitadamente, três dos sete neurônios perderam a capacidade de disparar potenciais de Na^+ espontaneamente, dois dos quais também de forma evocada, indicando que o mibefradil inibiu canais rápidos de Na^+ .

Diferentemente do Ni^{2+} , o mibefradil bloqueou parcialmente os picos negativos de corrente no início dos pulsos de -50mV e -40mV do protocolo IV (Fig. 4.10.1), os quais foram eliminados por aplicação do TTX, um resultado também indicando inibição de correntes de Na^+ pelo mibefradil em nossa preparação. Trabalhos como o de Eller et al. (2000), McNulty e Hanck (2004) e Zhu et al. (2008) exploraram os efeitos inibitórios do mibefradil sobre canais de Na^+ dependentes de potencial. De modo similar ao Ni^{2+} , o mibefradil também inibiu correntes estacionárias inespecíficas (Fig. 4.10.6-Aii). Assim como no experimento anterior com Ni^{2+} $500\mu\text{M}$, um ponto de reversão próximo ao E_K também foi exibido pela corrente sensível ao mibefradil. Em um estudo explorando os efeitos inibitórios do mibefradil sobre correntes de K^+ , Liu et al. (1999) mostrou que o mibefradil na concentração que usamos ($10\mu\text{M}$) bloqueia parcialmente a IK_{ir} , o que acreditamos ter ocorrido em nosso experimento, uma vez que a corrente sensível apresentou um pico positivo em -95mV , com valores progressivamente menores (mais negativos) na direção positiva. Mais uma vez, os resultados em *Voltage-Clamp* indicaram que as alterações observadas nos registros em *Current-Clamp* devem ter sido causadas pela inibição de correntes inespecíficas.

Pelo que foi exposto, uma hipótese possível para o conjunto de resultados obtidos nos três experimentos é de que a ICa_T não é expressa em níveis significativos nos neurônios CW de ratos.

6. CONCLUSÃO

Em relação aos objetivos específicos do projeto, nossos resultados demonstraram que a regulação dos canais K_{ATP} integra o mecanismo fisiológico que controla a atividade dos neurônios *Cartwheel*. No fenótipo *Quiet* os canais K_{ATP} estão abertos enquanto nos neurônios *Actives* são mantidos fechados, de modo que a inibição farmacológica da IK_{ATP} é suficiente para converter o fenótipo *Quiet* em *Active*, e sua ativação suficiente para converter o fenótipo *Active* em *Quiet*. Mudanças de estado metabólico estão diretamente associadas à função dos canais K_{ATP} e podem ter forte impacto sobre o controle da atividade dos neurônios CW, incluindo alterações na proporcional populacional dos fenótipos *Active* e *Quiet*. Um segundo mecanismo (secundário) intrínseco de determinação fenotípica existe nos neurônios CW, visto que cerca de 20% dos neurônios *Quiets* não responde a tolbutamida, o qual não envolve a INa_p , pois é igualmente expressa nos fenótipos *Active* e *Quiet*. A I_h é expressa em menores níveis nos neurônios *Quiets*, uma diferença que pode contribuir para a manutenção de um estado quiescente apenas na parcela de neurônios *Quiets* resistentes à tolbutamida.

Em relação aos objetivos gerais, podemos concluir que a INa_p é a principal condutância subliminar que controla o limiar de atividade dos neurônios CW e que sua expressão é necessária para que o limiar de disparo seja atingido (de forma intrínseca) numa parcela considerável dos neurônios CW; a IK_{ir} exerce forte controle sobre o potencial de membrana dos neurônios CW, sendo necessária para o estabelecimento de um potencial de repouso e níveis normais (fisiológicos) de atividade; a I_h é necessária para a geração de atividade espontânea nos neurônios CW; a ICa_T parece não ser expressa em níveis significativos nos neurônios CW de ratos; o agonista $GABA_B$ baclofen ativa correntes de K^+ de vazamento de mesma magnitude nos dois fenótipos, a qual hiperpolariza o potencial de repouso dos neurônios *Quiets* e torna silentes todos os neurônios *Actives*; o agonista mGluR1 e mGluR5 DHPG não tem efeitos sobre a I_h e ativa corrente(s) de entrada inespecífica(s) ou alternativamente bloqueia correntes de K^+ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHADAS, E. S. **Modulação excitatória das células principais do núcleo medial do corpo trapezóide por receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo I**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

BAIZER, J. S. et al. Laminar and neurochemical organization of the dorsal cochlear nucleus of the human, monkey, cat, and rodents. **The Anatomical Record**, v. 297, n. 10, p.1865-1884, 2014.

BAIZER, J. S. et al. Understanding tinnitus: the dorsal cochlear nucleus, organization and plasticity. **Brain Research**, v. 1485, p.40-53, 2012.

BALAKRISHNAN, V.; TRUSSELL, L. O. Synaptic inputs to granule cells of the dorsal cochlear nucleus. **Journal of Neurophysiology**, v. 99, n. 1, p.208-219, 2008.

BALFOUR, R. H.; HANSEN, A. M. K.; TRAPP, S. Neuronal responses to transient hypoglycaemia in the dorsal vagal complex of the rat brainstem. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 3, p.469-484, 2006.

BAUKROWITZ, T. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. **Science**, v. 282, n. 5391, p.1141-1144, 1998.

BEATTY, J. A. et al. Complex autonomous firing patterns of striatal low-threshold spike interneurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 3, p.771-781, 2012.

BENDER, K. J. et al. Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 1, p.109-118, 2011.

BENDER, K. J.; TRUSSELL, L. O. Axon initial segment Ca²⁺ channels influence action potential generation and timing. **Neuron**, v. 61, n. 2, p.259-271, 2009.

BENNETT, B. D.; CALLAWAY, J. C.; WILSON, C. J. Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 22, p.8493-8503, 2000.

BERREBI, A. S.; MORGAN, J. I.; MUGNAINI, E. The purkinje cell class may extend beyond the cerebellum. **Journal of Neurocytology**, v. 19, n. 5, p.643-654, 1990.

BERREBI, A.; MUGNAINI, E. Distribution and targets of the cartwheel cell axon in the dorsal cochlear nucleus of the guinea pig. **Anatomy and Embryology**, v. 183, n. 5, p.427-454, 1991.

BIEL, M. et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 3, p.847-885, 2009.

BROZOSKI, T. J.; BAUER, C. A.; CASPARY, D. M. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 6, p.2383-2390, 2002.

BROZOSKI, T. J. et al. Bilateral dorsal cochlear nucleus lesions prevent acoustic-trauma induced tinnitus in an animal model. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 13, n. 1, p.55-66, 2011.

CAIN, S. M.; SNUTCH, T. P. Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. **Channels**, v. 4, n. 6, p.475-482, 2010.

CEBALLOS, C. C. et al. I_h equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, a. 249, 2016.

CORREA, A. M. B. et al. Control of neuronal excitability by group I metabotropic glutamate receptors. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p.835-845, 2017.

Dagostin A. A. **Caracterização eletrofisiológica dos neurônios Nidopálio Caudomedial, uma área responsável pelo processamento auditivo em aves canoras**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

DAGOSTIN, A. A. et al. Control of phasic firing by a background leak current in avian forebrain auditory neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, a. 471, 2015.

DEHMEL, S. et al. Noise overexposure alters long-term somatosensory-auditory processing in the dorsal cochlear nucleus: possible basis for tinnitus-related hyperactivity? **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 5, p.1660-1671, 2012.

DO, M. T. H; BEAN, B. P. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons. **Neuron**, v. 39, n. 1, p.109-120, 2003.

DOIRON, B.; ZHAO, Y.; TZOUNOPOULOS, T. Combined LTP and LTD of modulatory inputs controls neuronal processing of primary sensory inputs. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p.10579-10592, 2011.

ELLER, P. et al. High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p.669-677, 2000.

ENYEDI, P.; CZIRJÁK, G. Molecular background of leak K^+ currents: two-pore domain potassium channels. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p.559-605, 2010.

FRIEDLAND, D. R.; EERNISSE, R.; POPPER, P. Potassium channel gene expression in the rat cochlear nucleus. **Hearing Research**, v. 228, n. 1-2, p.31-43, 2007.

GAHWILER, B. H.; BROWN, D. A. GABA_B-receptor-activated K^+ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 5, p.1558-1562, 1985.

GARG, V.; JIAO, J.; HU, K. Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels by caveolin-enriched microdomains in cardiac myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 1, p.51-58, 2009.

GOLDSTEIN, S. A. N. et al. Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 3, p.175-184, 2001.

HARVEY, P. J. et al. Persistent sodium currents and repetitive firing in motoneurons of the sacrocaudal spinal cord of adult rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 3, p.1141-1157, 2006.

HE, C. et al. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. **Progress in Neurobiology**, v. 112, p.1-23, 2014.

HIBINO, H. et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p.291-366, 2010.

HILGEMANN, D. W.; BALL, R. Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. **Science**, v. 273, n. 5277, p.956-959, 1996.

HOLT, A. G. et al. Evidence of key tinnitus-related brain regions documented by a unique combination of manganese-enhanced MRI and acoustic startle reflex testing. **Plos One**, v. 5, n. 12, e14260, 2010.

HUANG, C.; FENG, S.; HILGEMANN, D. W. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by G_{βγ}. **Nature**, v. 391, n. 6669, p.803-806, 1998.

IFTINCA, M. C.; ZAMPONI, G. W. Regulation of neuronal T-type calcium channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 1, p.32-40, 2009.

JACKSON, A. C. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 37, p.7985-7998, 2004.

JASTREBOFF, P. J. et al. Differential uptake of salicylate in serum, cerebrospinal fluid, and perilymph. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 112, n. 10, p.1050-1053, 1986.

KALTENBACH, J. A.; AFMAN, C. E. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. **Hearing Research**, v. 140, n. 1-2, p.165-172, 2000.

KALTENBACH, J. A.. The dorsal cochlear nucleus as a contributor to tinnitus: mechanisms underlying the induction of hyperactivity. **Tinnitus: Pathophysiology and Treatment**, p.89-106, 2007.

KALTENBACH, J. A.; ZHANG, J.; FINLAYSON, P. Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. **Hearing Research**, v. 206, n. 1-2, p.200-226, 2005.

KANOLD, P. O.; DAVIS, K. A.; YOUNG, E. D. Somatosensory context alters auditory responses in the cochlear nucleus. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 3, p.1063-1070, 2011.

KIM, D. Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 21, p.2717-2736, 2005.

KIM, Y.; TRUSSELL, L. O. Ion channels generating complex spikes in cartwheel cells of the dorsal cochlear nucleus. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 2, p.1705-1725, 2007.

KUO, J. J. et al. Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. **The Journal of Physiology**, v. 574, n. 3, p.819-834, 2006.

LAMBERT, R. C. et al. The many faces of T-type calcium channels. **Pflügers Archives - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 3, p.415-423, 2013.

LEAO, R. M. et al. Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 107, n. 11, p.3008-3019, 2012.

LESAGE, F. et al. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and g_s, g_i, and g_q protein-coupled receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p.28398-28405, 2000.

LI, S.; CHOI, V.; TZOUNOPOULOS, T. Pathogenic plasticity of Kv7.2/3 channel activity is essential for the induction of tinnitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p.9980-9985, 2013.

LIU, J. et al. Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca²⁺ and K⁺ currents in human fusion-competent myoblasts. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 1, p.245-250, 1999.

LOTSHAW, D. P. Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 47, n. 2, p.209-256, 2007.

LU, T. Z.; FENG, Z. NALCN: a regulator of pacemaker activity. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 3, p.415-423, 2012.

MANCILLA, J. G.; MANIS, P. B. Two distinct types of inhibition mediated by cartwheel cells in the dorsal cochlear nucleus. **Journal of Neurophysiology**, v. 102, n. 2, p.1287-1295, 2009.

MANIS, P. B. et al. Physiology and morphology of complex spiking neurons in the guinea pig dorsal cochlear nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 348, n. 2, p.261-276, 1994.

MATHIE, A. Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. 2, p.377-385, 2007.

MAY, B. J. Role of the dorsal cochlear nucleus in the sound localization behavior of cats. **Hearing Research**, v. 148, n. 1-2, p.74-87, 2000.

McNULTY M. M.; HANCK D. A. State-dependent mibefradil block of Na⁺ channels. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 6, p.1652-1661, 2004.

MIDDLETON, J. W. et al. Mice with behavioral evidence of tinnitus exhibit dorsal cochlear nucleus hyperactivity because of decreased GABAergic inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 18, p.7601-7606, 2011.

MORISHITA, R.; KATO, K.; ASANO, T. GABA_B receptors couple to G proteins G_o, G_q and G_{i1} but not to G_{i2}. **Febs Letters**, v. 271, n. 1-2, p.231-235, 1990.

MUGNAINI, E.; MORGAN, J. I. The neuropeptide cerebellin is a marker for two similar neuronal circuits in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 23, p.8692-8696, 1987.

MÜLLER, M; BROCKHAUS, J; BALLANYI, K. ATP-independent anoxic activation of ATP-sensitive K⁺ channels in dorsal vagal neurons of juvenile mice in situ. **Neuroscience**, v. 109, n. 2, p.313-328, 2002.

MURAT, C. B.; LEÃO, R. M. A voltage-dependent depolarization induced by low external glucose in neurons of the nucleus of the tractus solitarius: interaction with K_{ATP} channels. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 9, p.2515-2532, 2019.

OERTEL, D.; YOUNG, E. D. What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 2, p.104-110, 2004.

PADGETT, C. L.; SLESINGER, P. A. GABA_B receptor coupling to G-proteins and ion channels. **Gababreceptor Pharmacology - A Tribute to Norman Bowery**, p.123-147, 2010.

PEREZ-REYES, E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 1, p.117-161, 2003.

RAMAN, I. M.; BEAN, B. P. Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar purkinje neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 5, p.1663-1674, 1999.

RAMAN, I. M.; GUSTAFSON, A. E.; PADGETT, D. Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p.9004-9016, 2000.

REIMANN, F.; ASHCROFT, F. M. Inwardly rectifying potassium channels. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 4, p.503-508, ago, 1999.

REN, D. Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors. **Neuron**, v. 72, n. 6, p.899-911, 2011.

ROEPER, J.; HAINSWORTH, A. H.; ASHCROFT, F. M. Tolbutamide reverses membrane hyperpolarisation induced by activation of D2 receptors and GABA_B receptors in isolated substantia nigra neurones. **Pflugers Archives - European Journal Of Physiology**, v. 416, n. 4, p.473-475, 1990.

RUBIO, M. et al. Revealing the molecular layer of the primate dorsal cochlear nucleus. **Neuroscience**, v. 154, n. 1, p.99-113, 2008.

RYUGO, D. K. et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: immunocytochemical localization in the dorsal cochlear nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 358, n. 1, p.102-118, 1995.

SCHWARZ, C.; MÖCK, M.; THIER, P. Electrophysiological properties of rat pontine nuclei neurons *in vitro*. I. Membrane potentials and firing patterns. **Journal of Neurophysiology**, v. 78, n. 6, p.3323-3337, 1997.

SHIM, H. G. et al. MGlu1 receptor mediates homeostatic control of intrinsic excitability through I_h in cerebellar Purkinje cells. **Journal Of Neurophysiology**, v. 115, n. 5, p.2446-2455, 2016.

SHORE, S. E. et al. Dorsal cochlear nucleus responses to somatosensory stimulation are enhanced after noise-induced hearing loss. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 1, p.155-168, 2007.

SHYNG, S. I.; FERRIGNI, T.; NICHOLS, C. Regulation of K_{ATP} channel activity by diazoxide and MgADP. **The Journal of General Physiology**, v. 110, n. 6, p.643-654, 1997.

SINGLA, S. et al. A cerebellum-like circuit in the auditory system cancels responses to self-generated sounds. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 7, p.943-950, 2017.

SONG, Z. et al. Convergence of pre and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p.2673-2681, 2001.

SUTHERLAND, D. Role of acoustic striae in hearing: reflexive responses to elevated sound-sources. **Behavioural Brain Research**, v. 97, n. 1-2, p.1-12, 1998.

SWENSEN, A. M.; BEAN, B. P. Ionic mechanisms of burst firing in dissociated purkinje neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 29, p.9650-9663, 2003.

TADDESE, A.; BEAN, B. P. Subthreshold sodium current from rapidly inactivating sodium channels drives spontaneous firing of tuberomammillary neurons. **Neuron**, v. 33, n. 4, p.587-600, 2002.

TAKAKUSAKI, K; KITAI, S.t. Ionic mechanisms involved in the spontaneous firing of tegmental pedunculo pontine nucleus neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 78, n. 3, p.771-794, 1997.

TALAVERA, K; NILIUS, B. Biophysics and structure–function relationship of T-type Ca^{2+} channels. **Cell Calcium**, v. 40, n. 2, p.97-114, 2006.

TERZIC, A. et al. G proteins activate ATP-sensitive K^+ channels by antagonizing ATP-dependent gating. **Neuron**, v. 12, n. 4, p.885-893, 1994.

TZOUNOPOULOS, T. et al. Cell-specific, spike timing–dependent plasticities in the dorsal cochlear nucleus. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 7, p.719-725, 2004.

UCHIMURA, N.; CHERUBINI, E.; NORTH, R. A. Inward rectification in rat nucleus accumbens neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 62, n. 6, p.1280-1286, 1989.

WAGONER, J. L.; KULESZA, R. J. Topographical and cellular distribution of perineuronal nets in the human cochlear nucleus. **Hearing Research**, v. 254, n. 1-2, p.42-53, 2009.

WAHL-SCHOTT, C.; BIEL, M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 3, p.470-494, 2008.

WANG, H. et al. Plasticity at glycinergic synapses in dorsal cochlear nucleus of rats with behavioral evidence of tinnitus. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p.747-759, 2009.

WANG, H. et al. Sodium salicylate reduces inhibitory postsynaptic currents in neurons of rat auditory cortex. **Hearing Research**, v. 215, n. 1-2, p.77-83, 2006.

WANG, H.; BROZOSKI, T. J.; CASPARY, D. M. Inhibitory neurotransmission in animal models of tinnitus: Maladaptive plasticity. **Hearing Research**, v. 279, n. 1-2, p.111-117, 2011.

WILLIAMS, S. R. et al. Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current I_h in rat cerebellar Purkinje neurons *in vitro*. **The Journal of Physiology**, v. 539, n. 2, p.469-483, 2002.

YAMADA-HANFF, J.; BEAN, B. P. Persistent sodium current drives conditional pacemaking in CA1 pyramidal neurons under muscarinic stimulation. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 38, p.15011-15021, 2013.

YAMADA-HANFF, J.; BEAN, B. P. Activation of I_h and TTX-sensitive sodium current at subthreshold voltages during CA1 pyramidal neuron firing. **Journal of Neurophysiology**, v. 114, n. 4, p.2376-2389, 2015.

YANG, G. et al. Salicylate induced tinnitus: behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats. **Hearing Research**, v. 226, n. 1-2, p.244-253, 2007.

YOUNG, E. D.; DAVIS, K. A. Circuitry and function of the dorsal cochlear nucleus. **Integrative Functions in the Mammalian Auditory Pathway**, p.160-206, 2002. Springer New York.

YOUNG, E. D.; OERTEL, D. Cochlear nucleus. **The Synaptic Organization of the Brain**, p.125-164, 2004. Oxford University Press.

ZENG, C. et al. Cochlear damage changes the distribution of vesicular glutamate transporters associated with auditory and nonauditory inputs to the cochlear nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p.4210-4217, 2009.

ZHANG, S.; OERTEL, D. Cartwheel and superficial stellate cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 69, n. 5, p.1384-1397, 1993b.

ZHANG, S.; OERTEL, D. Tuberculoventral cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 69, n. 5, p.1409-1421, 1993a.

ZHAO, Y.; RUBIO, M. E.; TZOUNOPOULOS, T. Distinct functional and anatomical architecture of the endocannabinoid system in the auditory brainstem. **Journal of Neurophysiology**, v. 101, n. 5, p.2434-2446, 2009.

ZHU, H. et al. Molecular and biophysical properties of voltage-gated Na⁺ channels in murine vas deferens. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 8, p.3340-3351, 2008.

ZUGAIB, J. **Efeitos e mecanismos de ação do salicilato de sódio, um agente indutor de *Tinnitus*, sobre a excitabilidade, neurotransmissão e plasticidade sináptica de neurônios do núcleo coclear dorsal**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

ZUGAIB, J.; CEBALLOS, C. C.; LEÃO, R. M. High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. **Hearing Research**, v. 332, p.188-198, 2016.

APÊNDICE: DIVERSIDADE FENOTÍPICA DOS NEURÔNIOS *CARTWHEEL*

Como apresentado no item 1.2 da Introdução os neurônios CW expressam um vasto complemento de canais iônicos, os quais interagem entre si de forma muito dinâmica, dando origem uma grande diversidade de fenótipos ou padrões de atividade. Uma classificação e caracterização sistemática de todos os subtipos de fenótipo *Active* seria uma tarefa bem difícil/complicada ou mesmo impraticável, porém com base numa análise qualitativa de 167 registros IO (registros do comportamento espontâneo) podemos dizer que cerca de 30% da população do fenótipo *Active* apresenta disparo apenas de potenciais de ação simples (em variadas frequências) sob um potencial de base relativamente estável (ausência de oscilações e/ou ondas de despolarização lentas), cerca de 35% apresenta padrões de atividade predominantemente em salvas (*burstings*), incluindo disparo de PAs simples e complexos, e uma variedade de formas/tipos de salvas (todos os casos apresentando histogramas de potencial bimodais bem definidos; a Fig. 3.4.1 contém um exemplo), e os 35% restantes incluem os padrões mistos, disparo apenas de potenciais complexos, padrões caóticos ou muito irregulares (indefiníveis), entre outros que serão ilustrados. Os registros IO a seguir fornecem uma ideia da diversidade fenotípica dos neurônios CW (notar as diferentes janelas temporais). As escalas de potencial são originais e, portanto, é necessário somar o valor do potencial de junção líquida de -10mV. Neurônios com disparo apenas de potenciais de ação complexos são indicados por (*) e fenótipos mais raros são indicados por (**).

(*)(**)

(*)(**)

(*)(**)

(**)

(*)(**)

(**)

(**)

(**)

(**)

ERRATA

STRAZZA JUNIOR, Paulo Sérgio. **Canais iônicos que governam o disparo espontâneo dos neurônios *Cartwheel* do núcleo coclear dorsal**. 2019. 146 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Seção/Item	Pág.	Linha/Fig.	Onde se lê	Leia-se
Resumo	9	5	Apresentam	Apresenta
Resumo	9	13	CWs	CW
Resumo	9	17	Na ⁺ de Persistente	Na ⁺ Persistente
Resumo	9	26	CWs	CW
Item 4.3	61	Fig. 4.3.1	Média Mmp	Média Mpm
Item 4.3	65	Fig. 4.3.5-D (Eixo X)	Actives	Controle
Item 4.3	65	Fig. 4.3.5-D (Eixo X)	Quiets	Bario 100µM
Item 4.3	65	Fig. 4.3.5 (Legenda)	C	D
Item 4.3	65	Fig. 4.3.5 (Legenda)	D	C