

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

VIVIANE FELINTRO DE SOUZA

**Participação dos canais para  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  no controle das propriedades eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios do Núcleo Motor Dorsal do Vago.**

Ribeirão Preto

2022

VIVIANE FELINTRO DE SOUZA

**Participação dos canais para  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  no controle das propriedades eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios do Núcleo Motor Dorsal do Vago.**

**Versão Original**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Davi J. A. Moraes

Ribeirão Preto

2022

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.

Souza, Viviane Felintro de

Participação dos canais para  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  no controle das propriedades eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios do Núcleo Motor Dorsal do Vago. Ribeirão Preto, 2022.

112 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Moraes, Davi José de Almeida

1. Núcleo Motor Dorsal do Vago. 2. Canais  $K_v$ . 3. Canais  $Ca_v$ . 4. Canais  $BK$ . 5. Canais  $SK$ . 6. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas. 7. Excitabilidade. 8. Cinética do potencial de ação. 9. Transmissão sináptica.

**SOUZA, F. V. Participação dos canais para K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> no controle das propriedades eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios do Núcleo Motor Dorsal do Vago.** 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Profa. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

**“O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”**

Dedico esse trabalho a minha família, em especial a  
minha tia avó Djanira, *in memoriam*.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, Felinto e Risonete, pelo amor incondicional, ensinamentos e compreensão quando não pude estar por perto. Obrigada por serem meu porto seguro e por me amarem do jeito que sou. Vocês são a razão de eu estar onde estou. Amo vocês e estou com saudades. Obrigada por serem pais tão amigos e presentes na minha vida. Obrigada também pelos conselhos, ensinamentos, amizade e sobretudo, por acreditarem em todos os meus sonhos. Meu amor incondicional a vocês. Gratidão!

Aos meus irmãos, Marciano, Michele, Filipe e Guilherme. Especialmente ao Lipe, por ter tido a imensa honra (risos) de viver comigo toda sua infância, adolescência e parte da vida adulta e também por ter me dado a honra de ser tia de uma criança tão maravilhosa, como meu sobrinho. Amo vocês!

As minhas “coroas”, vó Beatriz e minhas tias avós, tia Maria e tia Djanira. Não tenho nem palavras para descrever meu amor e orgulho de ser neta e sobrinha das senhoras, meus MAIORES exemplos de perseverança e luta. Agradeço também ao meu vô de coração, tio Jonas, cada tijolinho lá de casa tem um pouco do seu suor, amor e dedicação. Obrigada por ser quem o senhor é. Amo vocês, minhas pretas e meu preto “véi”.

Aos meus amigos dentro e fora da USP. Não me atrevo a citar um a um, pois não quero correr o risco de esquecer de ninguém, mas cada um sabe a participação que teve e que tem na minha vida, mesmo os amigos que estão agora a muitos quilômetros de distância. Muito obrigada por tudo, não sei o que seria de mim sem o apoio de vocês, sendo meu suporte enquanto estou tão longe da minha família.

Aos amigos do laboratório, pela vivência dentro e fora do laboratório, vocês se tornaram uma grande família que vou levar no meu coração, obrigada pelas conversas, fofocas, companhias para tomar café na Val e umas caipirinhas no Silvão. Muito obrigada a todos que ainda estão e aos que já foram do laboratório durante esses quatro anos que estive aqui.

Aos meus amigos da UFRRJ que são presentes na minha vida até hoje, em especial aqueles que dividi minha vivência durante o mestrado, muito obrigada por todo o incentivo e apoio, vocês são minha base para continuar na ciência. Amo vocês, meus amigos!

A minha namorada, Nati, pelo amor, incentivo e paciência nos momentos de ausência. Obrigada por tudo, te amo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da FMRP, pelos ensinamentos que foram compartilhados. Aos funcionários e alunos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Ao meu orientador, Davi Moraes. Agradeço pela oportunidade de me desenvolver cientificamente em seu laboratório, pelos ensinamentos e conselhos. Obrigada pelo exemplo em como fazer ciência.

Aos funcionários da secretária do departamento de fisiologia e pós-graduação, em especial a Claudia pela sua gentileza e paciência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Por fim, mas não menos importante, obrigada a mim mesma por não ter desistido.



## RESUMO

SOUZA, Viviane Felintro. **Participação dos canais para  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  no controle das propriedades eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios do Núcleo Motor Dorsal do Vago.** 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

Em mamíferos, o sistema neurovegetativo coordena com maestria a geração central das atividades simpática e parassimpática para o sistema respiratório. A inervação parassimpática é de suma importância para o controle do tônus da musculatura lisa brônquica e secreção de muco, e conseqüentemente para o controle do fluxo de ar nas vias aéreas inferiores. Os motoneurônios parassimpáticos respiratórios (MNPRs) estão localizados no Núcleo Motor Dorsal do Vago (DMV) e no Núcleo Ambíguos (NA). Entretanto, a contribuição efetiva dos MNPRs do DMV para o controle das vias aéreas inferiores tem sido associada a estudos anatômicos e até hoje pouco se sabe sobre os mecanismos biofísicos que determinam a atividade elétrica dos mesmos. Alterações na atividade desta população neuronal podem contribuir para exacerbar sintomas encontrados em patologias como a asma, doença pulmonar obstrutiva, rinite alérgica, entre outras. Sabe-se também que os canais para  $K^+$  e para  $Ca^{2+}$  desempenham um papel fundamental no controle da excitabilidade celular e da cinética do potencial de ação em diferentes neurônios do sistema nervoso central. Todavia, a relevância funcional dos canais para  $K^+$  ( $K_v$ ) e  $Ca^{2+}$  ( $Cav$ ) dependentes de voltagem, bem como dos canais para  $K^+$  modulados por  $Ca^{2+}$  ( $KCa^{2+}$ ) no controle da atividade elétrica dos MNPRs do DMV de ratos ainda não está elucidada. Portanto, na presente Tese de Doutorado levantamos a hipótese de que correntes de  $K^+$  mediadas pelos canais  $K_v$  e  $KCa^{2+}$ , assim como as correntes de  $Ca^{2+}$  mediadas pelos canais  $Cav$ , controlam a excitabilidade e a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. Por meio da técnica de *whole cell patch clamp* em fatias do DMV de ratos avaliamos: I) a participação dos canais  $K_v$ ,  $Cav$  e  $KCa^{2+}$  no controle da cinética do potencial de ação, da excitabilidade, do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs, e; II) a contribuição dos canais  $KCa^{2+}$  no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs. Nossos dados demonstram que o bloqueio dos canais  $K_v$  com o tetraetilamônio reduz a

excitabilidade e a frequência de potenciais de ação espontâneos e aumenta a largura do potencial de ação dos MNPRs do DMV. Também demonstramos que o bloqueio dos canais Cav do tipo L com a nifedipina reduz a excitabilidade dos MNPRs, sem alterar a cinética do potencial de ação. Adicionalmente, o bloqueio dos canais  $KCa^{2+}$  de alta condutância (BK) com a iberiotoxina aumenta a largura do potencial de ação e reduz a frequência e amplitude das correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (sEPSCs), enquanto que o bloqueio dos canais  $KCa^{2+}$  de baixa condutância (SK) reduz somente a amplitude das sEPSCs. Sendo assim, concluímos que os canais Kv, Cav, BK e SK contribuem de maneira distinta para o controle da cinética do potencial de ação, da frequência de potenciais de ação espontâneos, da excitabilidade e da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

**Palavras chaves:** Núcleo Motor Dorsal do Vago, canais Kv, canais Cav, canais BK, canais SK, propriedades eletrofisiológicas intrínsecas, excitabilidade, cinética do potencial de ação e transmissão sináptica.

## ABSTRACT

SOUZA, Viviane Felintro. **Participation of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels in the control of electrophysiological properties of the respiratory parasympathetic motoneurons in the Dorsal Motor Nucleus of Vagus.** 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

In mammals, the neurovegetative system coordinates the generation of sympathetic and parasympathetic activities to the respiratory system. The parasympathetic innervation plays an important role controlling the bronchial smooth muscle tone and mucus secretion, and consequently the air outflow to the lower airways. The parasympathetic respiratory motoneurons (MNPRs) are located in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus (DMV) and in the Nucleus Ambiguus (NA). However, the effective contribution of the DMV MNPRs for the control of the lower airways has been associated with anatomical studies and little is known about the biophysical mechanisms that determine their electrical activity. Changes in the activity of this neuronal population can contribute to exacerbate symptoms observed in asthma, obstructive pulmonary disease, allergic rhinitis among other diseases. It's also known that the K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels play a fundamental role in the control of excitability and action potential waveform in different types of neurons in the central nervous system. However, the functional contribution of voltage-gated K<sup>+</sup> (Kv) and Ca<sup>2+</sup> (Cav) channels, as well as Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (KCa<sup>2+</sup>) in the control of DMV MNPRs electrical activity of rats is still unclear. Thus, in the present Doctoral thesis we hypothesized that the K<sup>+</sup> currents mediated by Kv and KCa<sup>2+</sup> channels, as well as Ca<sup>2+</sup> currents mediated by Cav channels, control the excitability and action potential waveform of DMV MNPRs of rats. Using the whole cell patch clamp technique on DMV slices of rats, we evaluated: I) the participation of Kv, Cav and KCa<sup>2+</sup> channels in the control of action potential waveform, excitability, resting membrane potential and frequency of spontaneous action potential of MNPRs, and; II) the contribution of KCa<sup>2+</sup> channels in the control of excitatory synaptic transmission to MNPRs. Our results demonstrate that blocking Kv channels using tetraethylammonium decreased the excitability and frequency of spontaneous action potentials and increases the action potential half-width of DMV MNPRs. We also demonstrate that blocking L-type Cav channels using

nifedipine decreased the excitability of MNPRs, without changes in the action potential waveform. Additionally, blocking large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels (BK) using iberiotoxin increased the action potential width and decreased the frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs), while blocking small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels (SK) only decreased the amplitude of the sEPSCs. Therefore, we conclude that Kv, Cav, BK and SK channels contribute differently to the control of the action potential waveform, the frequency of spontaneous action potentials, excitability and excitatory synaptic transmission to the DMV MNPRs of rats.

**Keywords:** Dorsal Motor Nucleus of Vagus, Kv channels, Cav channels, BK channels, SK channels, intrinsic electrophysiological properties, excitability, action potential waveform and synaptic transmission.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
BK	Canais para $K^+$ modulados por $Ca^{2+}$ de alta condutância
Cav	Canais para $Ca^{2+}$ dependentes de voltagem
CdCl <sub>2</sub>	Cloreto de cádmio
ChaT	Colina-acetiltransferase
DMV	Núcleo Motor Dorsal do Vago
HPP	Hiperpolarização após o potencial de ação
IBTX	Iberiotoxina
K <sub>Ca<sup>2+</sup></sub>	Canais para $K^+$ modulados por $Ca^{2+}$
Kv	Canais para $K^+$ dependentes de voltagem
MNPR	Motoneurônio parassimpático respiratório
NA	Núcleo Ambíguos
NMDA	N-metil-D-aspartato
RARs	Fibras de estiramento de adaptação rápida
SARs	Fibras de estiramento de adaptação lenta
sEPSCs	Correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias
SK	Canais para $K^+$ modulados por $Ca^{2+}$ de baixa condutância
TEA	Tetraetilamônio

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Fotomicrografias de uma fatia coronal do bulbo contendo os MNPRs do DMV. (A)** Visualização da fatia coronal, com 250  $\mu\text{m}$  de espessura, contendo o DMV (círculos vermelhos) em aumento de 4X em campo claro. **(B)** Fotomicrografia dos MNPRs do DMV, marcados com *FluoroGold*, em aumento de 40x em epifluorescência. **(C)** Fotomicrografia do MNPR representativo do DMV em campo claro e o eletrodo de registro posicionado sobre o mesmo para o registro eletrofisiológico também em aumento de 40X..... 18

**Figura 2. Capacitância dos MNPRs do DMV de ratos.** Dados dispersos da capacitância dos MNPRs registrados no DMV de ratos. n=210 de 107 ratos. ....25

**Figura 3. Caracterização do fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos. (A)** Visualização da fatia coronal do bulbo de um rato, mostrando a localização de um MNPR registrado, marcado com biocitina (verde), na região do DMV (círculo vermelho). **(B)** Magnificação do MNPR marcado com biocitina em A. **(C)** Fotomicrografia dos MNPRs do DMV ChaT-positivos (vermelhos). A seta indica o MNPR registrado. **(D)** Co-localização de ambas as marcações em B e C. Note o fenótipo motor do MNPR registrado. HN: Núcleo Motor do Hipoglosso; NTS: Núcleo do Trato Solitário; CC: Canal Central. ....27

**Figura 4. Correntes de saída de  $\text{K}^+$  mediadas por canais  $\text{Kv}$  sensíveis ao TEA nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de saída de  $\text{K}^+$  de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão do TEA (5 mM). Note as correntes de  $\text{K}^+$  mediadas pelos canais  $\text{Kv}$  sensíveis ao TEA obtidas pela subtração *off-line* **(Aiii)**. **(B)** Amplitudes médias dos picos das correntes de  $\text{K}^+$ , plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados, mediadas pelos canais  $\text{Kv}$  sensíveis ao TEA. **(C)** Valores da condutância normalizada dos canais  $\text{Kv}$  sensíveis ao TEA plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados. A linha sólida representa o ajuste da função de *Boltzmann* aos dados obtidos. n=22 células de 9 ratos. ....29

**Figura 5. Efeito do TEA na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa

de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão do TEA (5 mM). **(B)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta à rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão do TEA. Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes **(Ci)** e após **(Cii)** a superfusão do TEA. **(D)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta ao pulso de corrente despolarizante antes e após o TEA. n=19 células de 7 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e D.....31

**Figura 6. Efeito do TEA na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** **(A)** Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato, evocados por pulsos de corrente despolarizante de 150 pA, antes e após a superfusão do TEA (5 mM). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação **(B)**, da largura do potencial de ação **(C)** e da amplitude da HPP **(D)** dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão do TEA. n=15 células de 5 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em C. Utilizamos o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em B e D.....33

**Figura 7. Efeito do TEA no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão do TEA (5 mM). **(B)** Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão do TEA. **(C)** Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs antes e após a superfusão do TEA. n=19 células de 7 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em C.....35

**Figura 8. Correntes de entrada de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub> nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de Ca<sup>2+</sup> de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão do CdCl<sub>2</sub> (200 μM). Note as correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub> obtidas pela subtração *offline* **(Aiii)**. **(B)** Amplitude média do pico das correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub>. n=18 células de 11 ratos. ....37

**Figura 9. Correntes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de nifedipina (5  $\mu\text{M}$ ). Note a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada pelos canais Cav do tipo L obtidas pela subtração *offline* **(Aiii)**. **(B)** Amplitude média do pico das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina. n=24 células de 13 ratos. ....39

**Figura 10. Efeito da nifedipina na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante, de 150 pA durante 2 segundos, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de nifedipina (5  $\mu\text{M}$ ). **(B)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão de nifedipina. Traçados representativos de um MNPR em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante, de 150 pA durante 2 segundos, antes **(Ci)** e após **(Cii)** a superfusão de nifedipina. **(D)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta a um pulso de corrente despolarizante antes e após a superfusão de nifedipina. n=18 células de 9 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e D. ....41

**Figura 11. Efeito da nifedipina na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** **(A)** Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato evocados por pulsos de correntes despolarizantes de 150 pA antes e após a superfusão de nifedipina (5  $\mu\text{M}$ ). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação **(B)**, da largura do potencial de ação **(C)** e da amplitude da HPP **(D)** dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de nifedipina. n=15 células de 8 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B, C e D. ....43

**Figura 12. Efeito da nifedipina no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de nifedipina (5  $\mu\text{M}$ ). **(B)** Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão de nifedipina. **(C)** Dados agrupados da frequência



de potenciais de ação dos MNPRs antes e após a superfusão de nifedipina. n=18 células de 8 ratos. Utilizamos o teste o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em C. ....45

**Figura 13. Correntes de saída de K<sup>+</sup> mediadas por canais BK sensíveis a IBTX na concentração de 50 nM nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de saída de K<sup>+</sup> de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração voltage clamp, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de IBTX (50 nM). Note as correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX obtidas pela subtração off-line **(Aiii)**. **(B)** Amplitudes médias dos picos das correntes de K<sup>+</sup>, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados, mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX. **(C)** Valores da condutância normalizada dos canais BK sensíveis a IBTX, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados. A linha sólida representa o ajuste da função de Boltzmann aos dados obtidos. n=12 células de 6 ratos. ....47

**Figura 14. Correntes de saída de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX na concentração de 100 nM nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de saída de K<sup>+</sup> de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração voltage clamp, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de IBTX (100 nM). Note as correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX obtidas pela subtração off-line **(Aiii)**. **(B)** Amplitudes médias dos picos das correntes de K<sup>+</sup>, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados, mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX. **(C)** Valores da condutância normalizada dos canais BK sensíveis a IBTX, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados. A linha sólida representa o ajuste da função de Boltzmann aos dados obtidos. n=15 células de 11 ratos. ....48

**Figura 15. Efeitos da IBTX na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante de 150 pA, durante 2 segundos, antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de IBTX (50 nM). **(B)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta a rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão de IBTX. Traçados representativos de um MNPR em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante de 150 pA, durante 2

segundos, antes (Ci) e após (Cii) a superfusão de IBTX. (D) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta ao pulso de corrente despolarizante antes e após a superfusão de IBTX. n=16 células de 7 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e D.....50

**Figura 16. Efeito da IBTX na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. (A)** Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato evocados por pulsos de correntes despolarizantes de 150 pA antes e após a superfusão de IBTX (50 nM). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação **(B)**, da largura do potencial de ação **(C)** e da amplitude da HPP **(D)** dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de IBTX. n=10 células de 6 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B, C e D.....52

**Figura 17. Efeito da IBTX no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de IBTX (50 nM). **(B)** Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão de IBTX. **(C)** Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV antes e após a superfusão de IBTX. n=18 células de 8 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em B e o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em C.....54

**Figura 18. Efeito da IBTX na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das sEPSCs de um MNPR do DMV de rato antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de IBTX (50 nM). Dados agrupados da frequência **(C)** e da amplitude **(D)** das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de IBTX. n=23 células de 11 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em C e D.....55

**Figura 19. Correntes de saída de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais SK sensíveis a apamina nos MNPRs do DMV de ratos. (A)** Traçados representativos das correntes de saída de K<sup>+</sup> de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (preto) e após (vermelho) a superfusão de apamina (100 mM). **(B)** Dados agrupados da corrente de saída de K<sup>+</sup> nos MNPRs do DMV de ratos antes e após a

superfusão de apamina. **(C)** Traçados representativos das correntes de  $K^+$  obtidas pelo protocolo para obtenção do potencial de reversão das correntes mediadas pelos canais SK nos MNPRs do DMV de ratos. **(D)** Dados agrupados das correntes de  $K^+$  mediadas por canais SK medidas no protocolo para análise do potencial de reversão (quando a corrente foi zero) nos MNPRs do DMV de ratos. n=12 de 9 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B.....57

**Figura 20. Efeito da apamina na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.**

Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de apamina (100 mM). **(B)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta à rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão de apamina. Traçados representativos de um MNPR em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes **(Ci)** e após **(Cii)** a superfusão de apamina. **(D)** Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta ao pulso de corrente despolarizante antes e após a superfusão de apamina. n=16 células de 9 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e D. ....59

**Figura 21. Efeito da apamina na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

**(A)** Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato evocados por pulsos de corrente despolarizante de 150 pA antes e após a superfusão de apamina (100 mM). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação **(B)**, da largura do potencial de ação **(C)** e da amplitude da HPP **(D)** dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de apamina. n=14 células de 9 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B, C e D. ....61

**Figura 22. Efeito da apamina no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

Traçados representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de apamina (100 mM). **(B)** Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão de apamina. **(C)** Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs antes e após a superfusão de apamina. n=17 células de 7 ratos.

Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em C. ....63

**Figura 23. Efeito da apamina na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das sEPSCs de um MNPRs do DMV de rato antes **(Ai)** e após **(Aii)** a superfusão de apamina (100 nM). Dados agrupados da frequência **(B)** e da amplitude **(C)** das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de apamina. n=17 células de 7 ratos para ambas as análises. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em C e D.....64

**Figura 24. Efeito do tempo na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das sEPSCs de um MNPR do DMV de rato após 5 **(Ai)** e 10 minutos **(Aii)** da superfusão com os bloqueadores da transmissão sináptica inibitória. Dados agrupados da frequência **(B)** e da amplitude **(C)** das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos após 5 e 10 minutos da superfusão com os bloqueadores da transmissão sináptica inibitória. n=19 células de 8 ratos para ambas as análises. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em C e D.....65

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Sistema nervoso autônomo e o controle das vias aéreas inferiores.</b> .....	1
<b>1.2. Características eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios.</b> .....	3
<b>1.3. Excitabilidade e cinética do potencial de ação.</b> .....	4
<b>1.4. Canais para K<sup>+</sup> dependentes de voltagem.</b> .....	6
<b>1.5. Canais para Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem</b> .....	7
<b>1.6. Canais para K<sup>+</sup> modulados por Ca<sup>2+</sup></b> .....	8
<b>1.6.1. Canais BK</b> .....	9
<b>1.6.2. Canais SK e IK</b> .....	10
<b>1.7. Hipótese</b> .....	12
<b>2. OBJETIVO</b> .....	14
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
<b>3.1. Animais</b> .....	16
<b>3.2. Identificação dos MNPRs do DMV</b> .....	16
<b>3.3. Obtenção das fatias do bulbo</b> .....	17
<b>3.4. Registros eletrofisiológicos e aquisição de dados</b> .....	17
<b>3.5. Imunofluorescência</b> .....	22
<b>3.6. Análise estatística</b> .....	23

<b>4. RESULTADOS</b> .....	25
<b>4.1. Capacitância dos MNPRs no DMV de ratos.</b> .....	25
<b>4.2. Fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos</b> .....	26
<b>4.3. Correntes de K<sup>+</sup> mediadas por canais Kv sensíveis ao TEA nos MNPRs do DMV de ratos.</b> .....	28
<b>4.4. Contribuição dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.</b> 30	
<b>4.5. Contribuição dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.</b> .....	34
<b>4.6. Correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub> nos MNPRs do DMV de ratos.</b> .....	36
<b>4.7. Correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav sensíveis a nifedipina nos MNPRs do DMV de ratos.</b> .....	38
<b>4.9. Contribuição dos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.</b> .....	44
<b>4.10. Correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK nos MNPRs do DMV de ratos.</b> 46	
<b>4.11. Contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.</b> 49	
<b>4.12. Contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.</b> .....	53

4.13. Contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.....	55
4.14. Correntes de K <sup>+</sup> mediadas por canais SK nos MNPRs do DMV de ratos. 56	
4.15. Participação dos canais SK sensíveis a apamina no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. 58	
4.16. Contribuição dos canais SK sensíveis a apamina no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos. ....	62
4.17. Contribuição dos canais SK sensíveis a apamina no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.....	64
4.18. Efeito do tempo na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos. ....	65
5. DISCUSSÃO .....	67
5.1. Propriedades passivas e o fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos. 68	
5.2. Contribuição dos canais Kv no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.....	69
5.3. Contribuição dos canais Cav do tipo L no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. ....	70
5.4. Contribuição dos canais BK no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade, da cinética do potencial de ação e da transmissão sináptica nos MNPRs do DMV de ratos.	72

**5.5. Contribuição dos canais SK no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade, da cinética do potencial de ação e da transmissão sináptica nos MNPRs do DMV de ratos.74**

**6. CONCLUSÕES .....78**

**7. REFERÊNCIAS .....80**



## ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sistema nervoso autônomo e o controle das vias aéreas inferiores.

O controle do fluxo de ar para as vias aéreas inferiores é orquestrado com maestria pelo sistema nervoso autônomo. Tanto o sistema nervoso autônomo simpático quanto o parassimpático inervam as células efetoras das vias aéreas inferiores, isto é, as glândulas secretoras, a musculatura lisa e o sistema vascular, contudo, modulam de maneira distinta as respostas neurovegetativas (MAZZONE; CANNING, 2002; 2013; MAZZONE; UNDEM, 2016). A inervação parassimpática vagal é a principal reguladora do tônus da musculatura lisa das vias aéreas inferiores e da secreção de muco, desempenhando assim um papel crucial no controle do fluxo de ar frente às diferentes demandas ventilatórias (CANNING, 2006; CANNING; MORI; MAZZONE, 2006; COLERIDGE; COLERIDGE, 1994a; WINE, 2007).

Os motoneurônios parassimpáticos pré-ganglionares estão localizados no tronco encefálico, especificamente no Núcleo Ambíguo (NA) e no Núcleo Motor Dorsal do Vago (DMV), os quais fornecem modulação eferente para diferentes regiões do organismo (BENNETT *et al.*, 1981; HADZIEFENDIC; HAXHIU, 1999; HASELTON *et al.*, 1992; KALIA; MESULAM, 1980; MCALLEN; SPYER, 1978; PÉREZ FONTÁN; VELLOFF, 1997). Os motoneurônios parassimpáticos pré-ganglionares são colinérgicos e fazem sinapses em pequenos gânglios, ao longo das vias aéreas respiratórias, ativando os neurônios pós-ganglionares via receptores nicotínicos. Os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos que inervam as vias aéreas inferiores liberam acetilcolina, a qual atua principalmente nos receptores muscarínicos do tipo 3 localizados no músculo liso e nas glândulas nos brônquios, produzindo broncoconstrição e secreção de muco (KISTEMAKER *et al.*, 2012). Adicionalmente a essa via clássica pela qual a acetilcolina atua, existe ainda uma via não colinérgica, que vai depender de outros mediadores que também contribuem de maneira substancial para a regulação da secreção de muco e broncoespasmo (CANNING, 2006; COLERIDGE; COLERIDGE, 1994a; HADZIEFENDIC; HAXHIU, 1999; HAXHIU *et al.*, 2005), tais como o peptídeo intestinal vasoativo e o óxido nítrico (CANNING, 2006).

Sabe-se que a exposição a fatores alérgenos leva a alterações na atividade sensorial presente nas vias aéreas respiratórias e, conseqüentemente, desencadeiam respostas reflexas que incluem: espirro, tosse, aumento da secreção de muco e broncoespasmo, na tentativa de proteger as vias áreas inferiores (GOEHLER *et al.*, 2000). Esses fatores ambientais ou poluentes, que causam irritação do sistema respiratório, levam a liberação de mediadores que vão interagir com as células sensoriais, que por sua vez, vão alterar suas propriedades eletrofisiológicas e morfológicas para informar o sistema nervoso central (SNC), evocando uma resposta reflexa apropriada, como por exemplo, alterações no padrão respiratório, espirro e tosse, que são mecanismos de defesa contra esses agentes irritantes (CHEN *et al.*, 2001; RICCIO; MYERS; UNDEM, 1996; UNDEM *et al.*, 1999; UNDEM; TAYLOR-CLARK, 2014; WU *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2002).

Os neurônios sensoriais que inervam as vias aéreas respiratórias detectam alterações locais das condições físicas e químicas e transmitem tais informações para o SNC, desempenhando assim um papel crucial na regulação da homeostase do sistema respiratório. Classicamente, as fibras aferentes broncopulmonares podem ser divididas em fibras de estiramento de adaptação rápida (RARs), fibras de estiramento de adaptação lenta (SARs), ambas mielinizadas, e as fibras do tipo C, que não são mielinizadas (LEE; YU, 2014; MAZZONE; UNDEM, 2016). As fibras RARs estão distribuídas ao longo das vias aéreas respiratórias e são mecanossensores, isto é, são sensíveis a estímulos mecânicos, tais como inflação e deflação do pulmão, porém também são estimuladas por uma variedade de mediadores químicos e inflamatórios. Em condições de inflação do pulmão, as RARs são ativadas e transmitem as informações sensoriais para as regiões no SNC específicas estimulando a frequência respiratória e esforço inspiratório. As fibras SARs estão presentes na musculatura lisa das vias aéreas respiratórias (YU, 2021). Essas fibras detectam o grau de insuflação pulmonar e estão envolvidas no reflexo de Hering-Breuer, inibindo a inspiração para controlar o tempo inspiratório e o volume corrente (LEE; YU, 2014; MAZZONE; UNDEM, 2016; YU, 2021). Por fim, as fibras C apresentam lenta condução, além de serem amplamente distribuídas pelos pulmões e vias aéreas respiratórias, em especial os brônquios. Estímulos químicos e mecânicos, bem como, aumento da temperatura e do volume do líquido intersticial são capazes de estimular os receptores

das fibras C para gerarem entre vários efeitos a broncoconstrição (COLERIDGE; COLERIDGE, 1994b; LEE; YU, 2014).

Essa comunicação entre o sistema sensorial e o SNC, mediada pelas aferências vagais broncopulmonares, é de suma importância para a regulação precisa da função pulmonar, além de fornecer um mecanismo de defesa apurado, para manter a integridade das vias aéreas respiratórias. Essa informação sensorial das vias aéreas inferiores é transmitida ao SNC até a Área Postrema, Núcleo do Trato Solitário e Núcleo Espinhal do Nervo Trigêmeo (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000). Os motoneurônios parassimpáticos localizados no NA e DMV nessas condições podem aumentar a sua excitabilidade, reduzindo seu limiar, podendo desencadear respostas significativas mesmo que o estímulo seja baixo, além de apresentarem respostas mais duradouras (HAXHIU *et al.*, 2005; UNDEM; TAYLOR-CLARK, 2014). Essa integração contribui para a regulação da função pulmonar, fornecendo um mecanismo reflexo que é importante para preservar as funções respiratórias. Nesse sentido, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação motora para as vias áreas inferiores e, conseqüentemente, da broncoconstrição, fornecerá sem dúvida a base para o entendimento e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças que acometem o sistema respiratório (UNDEM; TAYLOR-CLARK, 2014).

## **1.2. Características eletrofisiológicas dos motoneurônios parassimpáticos respiratórios.**

Até o momento, sabemos que os motoneurônios parassimpáticos respiratórios (MNPRs) estão presentes tanto no NA quanto no DMV, no entanto, estes MNPRs aparentemente apresentam características eletrofisiológicas distintas e, portanto, é possível que possuam diferentes contribuições fisiológicas e patológicas. Nesse sentido, *Haselton et al.* (1992) utilizando cães como modelo animal, demonstraram que a microinjeção de ácido homocisteico (DLH, um potente agonista dos receptores glutamatérgicos NMDA) no NA promoveu um aumento da resistência pulmonar, aumento da pressão traqueal, redução da complacência pulmonar, sem alteração da ventilação pulmonar. Esses dados coletivamente indicam que os MNPRs do NA participam do controle da broncoconstrição. Em contrapartida, ao realizarem a mesma

estimulação dos motoneurônios do DMV não houve alterações na resistência e na complacência pulmonar, sugerindo que os motoneurônios do DMV não participam do controle da broncoconstrição. Nesse sentido, os mesmos autores sugeriram que os MNPRs do DMV poderiam participar do controle da secreção de muco.

Em estudos recentes do nosso laboratório, Moraes *et al.* (2021) demonstraram que os MNPRs do NA despolarizam durante a inspiração, com um aumento da frequência de potenciais de ação, e esse fenômeno é causado por eventos sinápticos excitatórios provenientes dos neurônios inspiratórios do tronco cerebral. Ou seja, os motoneurônios do NA desempenham um papel funcional importante na geração da broncoconstrição fásica a cada ciclo respiratório. Este fenômeno foi confirmado após vagotomia bilateral a qual eliminou a broncoconstrição fásica. Por outro lado, nos estudos desenvolvidos por Ford *et al.* (1990), utilizando estimulação antidrômica em gatos, demonstraram que os motoneurônios pulmonares e cardíacos no DMV apresentavam características eletrofisiológicas distintas. Em relação aos motoneurônios do DMV que se projetavam para as vias áreas respiratórias, em torno da metade apresentavam baixa frequência de potenciais de ação e baixa velocidade de condução axonal. Já os estudos de McAllen e Spyer (1978), demonstraram que a velocidade de condução dos axônios dos MNPRs do DMV de gatos apresentava uma velocidade de condução mais lenta em relação aos MNPRs do NA. Esses dados sugerem que os MNPRs do NA e do DMV possuem contribuições fisiológicas distintas para o controle da atividade parassimpática para as vias áreas inferiores. Sendo assim, novos estudos são necessários para elucidar as propriedades eletrofisiológicas e as possíveis contribuições funcionais desses motoneurônios para o controle das vias aéreas inferiores em condições fisiológicas e patológicas.

### **1.3. Excitabilidade e cinética do potencial de ação.**

Os neurônios processam e transmitem as informações por meio de sinais elétricos e químicos (CATTERALL, 1984). O potencial de ação consiste em rápidas alterações do potencial de membrana da célula e é o principal mecanismo de sinalização dos sinais nervosos, sendo uma característica importante das células excitáveis (BEAN, 2007). A geração de um potencial de ação é um processo

complexo, que envolve a abertura e fechamento de vários canais iônicos na membrana celular (HILLE, 2001).

O controle da capacidade das células gerarem potenciais de ação (excitabilidade) está entre as características mais importantes dos neurônios (HILLE, 2001). A maioria das células de vertebrados, incluindo os neurônios, mantém gradientes iônicos através de suas membranas (meio intra- e extracelular), de modo que, o líquido intracelular contém uma alta concentração de  $K^+$  e baixas concentrações de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  em relação ao líquido extracelular. A excitabilidade celular é influenciada por vários fatores, como por exemplo, a presença dos canais na membrana, a sua densidade e a probabilidade de abertura dos mesmos (CATTERALL, 1984; HILLE, 2001). A capacidade de gerar potenciais de ação em neurônios requer um ajuste fino da expressão de canais iônicos a qual determina a cinética do potencial de ação, entre outros parâmetros (CATTERALL, 1984; HILLE, 2001; BEAN, 2007). A cinética do potencial de ação é medida de acordo com alguns parâmetros, são eles: o limiar, a amplitude e largura do potencial de ação, assim como pela amplitude da hiperpolarização após o potencial de ação (HPP) (BEAN, 2007). A HPP ainda pode ser dividida em componentes lento, intermediário e rápido (SAH; MCLACHLAN, 1991; 1992). A adaptação da frequência de potenciais de ação ao longo do tempo, também conhecido como *spike frequency adaptation*, também é um componente importante para mensurar a excitabilidade. Refere-se a desaceleração progressiva da frequência de potenciais de ação durante um estímulo (BENDA; HERZ, 2003; PARTRIDGE; STEVENS, 1976). Esse padrão de adaptação pode ser observado em alguns neurônios, os quais mesmo na presença de correntes despolarizantes sustentadas ocorre uma adaptação de maneira tão marcante, que apenas um pequeno número de potenciais de ação é gerado. Na maioria dos casos, a adaptação na frequência dos potenciais de ação aparece com uma hiperpolarização desenvolvida lentamente após um longo período de excitação dos neurônios (BENDA; HERZ, 2003; PARTRIDGE; STEVENS, 1976)

Sabemos que, tanto os canais para  $K^+$  quanto os canais para  $Ca^{2+}$  podem modular a excitabilidade e a cinética do potencial de ação em diversos tipos neuronais (BEAN, 2007; DALLAS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2014; PEDARZANI *et al.*, 2000; SAH, 1995; SAH; MCLACHLAN, 1991; 1992; 1993). Os canais para  $K^+$  e os canais para  $Ca^{2+}$  são alguns dos principais determinantes da

cinética do potencial de ação, bem como da excitabilidade neuronal. Nesse sentido, canais para  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  podem contribuir para modular a excitabilidade e a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

#### **1.4. Canais para $K^+$ dependentes de voltagem.**

Os canais para  $K^+$  localizam-se nas membranas celulares e controlam o movimento de íons  $K^+$  (efluxo e influxo) nas células. Eles desempenham papéis cruciais em células excitáveis e não excitáveis e podem ser encontrados virtualmente em praticamente todas as espécies animais. Diferentes canais para  $K^+$  podem contribuir de maneira específica para as características eletrofisiológicas de diferentes neurônios. De todos os tipos de canais iônicos conhecidos, os canais para  $K^+$  são os que apresentam maior diversidade. Esses canais são cruciais para o controle da excitabilidade neuronal, pois ajudam a determinar o potencial da membrana em repouso e a repolarização do potencial de ação (JUDGE *et al.*, 2007). Os canais para  $K^+$  podem ser agrupados de acordo com suas propriedades farmacológicas, cinéticas e estrutura molecular e são divididos basicamente em quatro grandes famílias, sendo elas: i) os retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ), composto por 2 domínios transmembrana; ii) os  $K_{2P}$  com 4 domínios; iii) os canais dependentes de voltagem ( $K_v$ ), com 6 domínios, e; iv) os canais para  $K^+$  modulados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca^{2+}}$ ), que possuem 6 ou 7 domínios (HILLE, 2001; JUDGE *et al.*, 2007; REINHART; CHUNG; LEVITAN, 1989)

Os canais  $K_v$  podem ser descritos como canais para  $K^+$  dependentes da diferença de potencial através da membrana e compreendem uma grande família de canais iônicos permeáveis ao  $K^+$ , que desempenham papéis cruciais no controle da atividade neuronal, modulando a excitabilidade neuronal (DALLAS *et al.*, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 2012) e também a duração e a forma do potencial de ação (GONZÁLEZ *et al.*, 2012). Esses canais possuem quatro subunidades  $\alpha$  transmembranas distintas que são as formadoras do poro, e embora a expressão dessa conformação tetramérica das subunidades  $\alpha$  seja o requisito mínimo para formar um canal funcional, a associação do domínio do poro com um conjunto diversificado de subunidades acessórias, como  $K_v\beta$ ,  $KChAP$ ,  $KChIP$  e  $MinK$ , confere características regulatórias multimodais e únicas aos canais  $K_v$  (RAPH; BHATNAGAR; NYSTORIAK, 2019). De maneira geral, as correntes de  $K^+$  mediadas

por canais Kv podem ser classificadas de acordo com a sua cinética, sendo assim, apresentam-se as correntes para K<sup>+</sup> do tipo A (I<sub>A</sub>) e a corrente para K<sup>+</sup> com retificação retardada. Além disso, a família dos canais Kv é composta por tipos estruturais e funcionais diferentes (Kv1 -11) (GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

Estudos prévios desenvolvidos por Sah *et al.* (1992) demonstraram que o *tetraetilamônio* (TEA) reduz as correntes de K<sup>+</sup> dos motoneurônios do DMV de ratos. Sabe-se que o TEA é um clássico bloqueador de canais para K<sup>+</sup>, especialmente dos canais Kv (sobretudo do tipo Kv3) (BEAN, 2007). Nesse estudo de Sah *et al.* (1992), foi demonstrado que os motoneurônios do DMV de ratos apresentavam pelo menos três correntes diferentes, que contribuíam para a repolarização do potencial de ação, dentre elas a corrente para K<sup>+</sup> do tipo I<sub>A</sub>. Adicionalmente, em motoneurônios do DMV, o bloqueio farmacológico com TEA não afetou a frequência de potenciais de ação espontâneos. Contudo, o TEA foi capaz de aumentar a largura do potencial de ação dos mesmos (PEDARZANI *et al.*, 2000). Em conjunto, esses dados demonstram a importância dos canais Kv para modular a cinética e a excitabilidade em diferentes motoneurônios do DMV e também demonstram a sua possível contribuição para modular tais parâmetros nos MNPRs.

### **1.5. Canais para Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem**

Os canais para Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (Cav) são ativados em resposta a estímulos despolarizantes e medeiam o influxo de Ca<sup>2+</sup>, aumentando a [Ca<sup>2+</sup>] intracelular (SIMMS; ZAMPONI, 2014). Os canais Cav podem ser divididos de acordo com as suas propriedades biofísicas, sendo eles os canais Cav ativados por alta voltagem (HVA - Cav1 e Cav2), que são ativados em resposta a grandes despolarizações na membrana, e em canais ativados por baixa voltagem (LVA- Cav3), que são ativados por pequenas alterações na voltagem da membrana (ARMSTRONG; MATTESON, 1985; SIMMS; ZAMPONI, 2014). Adicionalmente, com base em análises moleculares, sabemos que os canais HVA são formados por uma subunidade Cav $\alpha$ 1, que é a formadora de poro, mais as subunidades auxiliares Cav $\beta$  e Cav $\alpha$ 2 $\delta$ . Os canais LVA apresentam apenas a subunidade Cav $\alpha$ 1 (SIMMS; ZAMPONI, 2014). A subunidade Cav $\alpha$ 1 é a principal determinante do subtipo de canal para Ca<sup>2+</sup>. Sendo assim, as subunidades Cav $\alpha$ 1 são divididas em três subfamílias (Cav1, Cav2 e Cav3),



cada uma apresentando características farmacológicas e cinéticas distintas (SIMMS; ZAMPONI, 2014). Os canais Cav1, conhecidos como canais do tipo L, apresentam genes que codificam três subunidades (Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4) (LIPSCOMBE; HELTON; XU, 2004; RANDALL; TSIEN, 1995). Já os canais Cav2 apresentam três subunidades (Cav2.1, Cav2.2 e Cav2.3). Interessantemente, os canais Cav2.1 podem dar origem aos canais do tipo P e Q por meio de *splicing* alternativo. Os Cav2.2 codificam os canais do tipo N e os Cav2.3 correspondem aos canais do tipo R. Existem ainda os canais Cav3 que apresentam também três subunidades (Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3), representando os canais para  $Ca^{2+}$  do tipo T (SIMMS; ZAMPONI, 2014).

Os motoneurônios do DMV expressam 4 subtipos dos canais Cav, sendo eles: canais Cav do tipo L (Cav1.2 e Cav1.3), canais Cav do tipo P/Q (Cav2.1), canais Cav do tipo N (Cav2.2) e canais Cav do tipo R (Cav2.3). A maior expressão é, respectivamente, das subunidades Cav1.2, Cav2.3, Cav2.2, Cav2.1 e Cav1.3 (COOPER *et al.*, 2015). Adicionalmente, nos motoneurônios do DMV, os canais Cav estão envolvidos com o componente lento da HPP (GOLDBERG *et al.*, 2012; SAH, 1992). Portanto, devido ao seu papel funcional e também por estar presente em motoneurônios do DMV de ratos, acreditamos que os canais Cav, especialmente os canais Cav do tipo L, podem contribuir para o controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs.

### **1.6. Canais para $K^+$ modulados por $Ca^{2+}$**

Durante o potencial de ação, a membrana se despolariza e com isso ocorre o aumento da  $[Ca^{2+}]$  intracelular e ativação dos canais  $KCa^{2+}$ , gerando uma corrente de saída de  $K^+$  (VERGARA *et al.*, 1998). Os canais  $KCa^{2+}$  geralmente estão próximos aos canais Cav na membrana celular (DE VRIND *et al.*, 2016; LORENZO-CEBALLOS *et al.*, 2019; SAH, 1992). Os canais  $KCa^{2+}$  desempenham um papel crucial no controle da atividade neuronal, modulando a cinética do potencial de ação (SAH, 1995; SAH; MCLACHLAN, 1991; 1992). Os canais  $KCa^{2+}$  possuem três subfamílias distintas, são elas: os canais  $KCa^{2+}$  de alta condutância (BK), canais  $KCa^{2+}$  de condutância intermediária (IK) e canais  $KCa^{2+}$  de baixa condutância (SK) (VERGARA *et al.*, 1998). Salienta-se ainda que as suas correntes exibem propriedades cinéticas heterogêneas, assim como os diferentes canais  $KCa^{2+}$  são bloqueados por diferentes fármacos.

Esses canais também apresentam distribuição tecidual distinta (PEDARZANI *et al.*, 2000; PEDARZANI; STOCKER, 2008).

Os canais SK são expressos no sistema nervoso periférico e majoritariamente no SNC e são inibidos pelo bloqueador seletivo apamina, um composto derivado do veneno de abelha (PEDARZANI *et al.*, 2000). Já os canais IK são expressos especialmente nos glóbulos vermelhos das células sanguíneas, células endoteliais e em linhagens celulares de origem epitelial e são especialmente sensíveis ao clotrimazol, um antifúngico (JENSEN *et al.*, 1998). Os canais BK, dentre todos os  $KCa^{2+}$ , são os mais diversos. Eles são expressos em diversos tecidos do organismo e são seletivamente sensíveis à iberiotoxina (IBTX), caribdotoxina e paxilina (LATORRE; MORERA; ZAELZER, 2010; PEDARZANI *et al.*, 2000). A diversidade dos papéis fisiológicos dos canais  $KCa^{2+}$  é ampliada pela existência de inúmeras variantes de *splicing* (especialmente para os canais BK e SK) em diferentes tecidos (KSHATRI; GONZALEZ-HERNANDEZ; GIRALDEZ, 2018; SCHOLL *et al.*, 2014; SHIPSTON, 2001), bem como sua associação com subunidades auxiliares (KSHATRI; GONZALEZ-HERNANDEZ; GIRALDEZ, 2018).

### 1.6.1. Canais BK

Os canais BK são reguladores universais da excitabilidade celular, dada a sua excepcional condutividade seletiva ao  $K^+$ , que envolve o mecanismo de ativação conjunta de despolarização e aumento da  $[Ca^{2+}]$  intracelular (XIA *et al.*, 1998). Foram os primeiros canais  $KCa^{2+}$  a serem identificados, possuem condutância elevada, na ordem de cerca de 100 pS em condições fisiológicas, podendo aumentar em certas situações, chegando até à 300 pS. A ativação desses canais causa hiperpolarização da membrana pelo aumento da corrente de saída de  $K^+$ , assim levando a uma diminuição da excitabilidade celular (GHATTA *et al.*, 2006).

Esses canais são complexos heteroméricos que compreendem subunidades  $\alpha$ , formadora de poros que se associam constitutivamente a calmodulina (PEDARZANI; STOCKER, 2008; XIA *et al.*, 1998). Além das subunidades formadoras de poro, existem ainda as subunidades auxiliares. Até o momento quatro subunidades auxiliares  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ) e quatro subunidades auxiliares  $\gamma$  ( $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ) foram identificadas. Essas subunidades afetam quase todos as propriedades biofísicas e farmacológicas

dos canais BK, incluindo a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a cinética da sua corrente. Ou seja, a função dos canais BK é modulada de forma diferente pelas suas subunidades auxiliares. Portanto, a regulação dos canais BK pelas subunidades auxiliares é um mecanismo chave da diversidade funcional dos canais BK (KSHATRI *et al.*, 2018).

Os canais BK são importantes em vários processos fisiológicos, modulando a liberação de neurotransmissores (HU *et al.*, 2001), eventos de *spike frequency adaptation* (FABER; SAH, 2003; GU *et al.*, 2001), bem como o tônus da musculatura lisa das vias aéreas (KUME *et al.*, 1989; SEMENOV *et al.*, 2006). Além disso, a atividade desses canais também contribui para o componente rápido da fase da HPP (ADELMAN; MAYLIE; SAH, 2012; FABER; SAH, 2003). Os canais BK são expressos em motoneurônios do DMV de ratos, a saber o bloqueio farmacológico dos canais BK alterou a cinética do potencial de ação por meio de um aumento da sua largura. Todavia, nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que os canais BK não estão envolvidos com a frequência de potenciais de ação espontâneos (PEDARZANI *et al.*, 2000). Portanto, essas informações sugerem que os canais BK contribuam para o controle das respostas motoras vagais para as vias áreas inferiores, participando da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

### 1.6.2. Canais SK e IK

Diferentemente dos canais BK, a probabilidade de abertura dos canais SK é estritamente dependente da  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular (SCHUMACHER *et al.*, 2001). Esses canais são complexos heteroméricos que compreendem subunidades  $\alpha$ , formadora de poros, que se associam constitutivamente a calmodulina (PEDARZANI; STOCKER, 2008; XIA *et al.*, 1998). A subunidade  $\alpha$  consiste em seis hélices transmembranares (S1-S6; a região do poro é formada pelas hélices S5 e S6) e domínios citosólicos N- e C-terminais. Os canais SK apresentam condutância unitária de aproximadamente 10-20 pS. São amplamente distribuídos no SNC e sistema nervo periférico (VERGARA *et al.*, 1998). Dentro do SNC, os canais SK são expressos em muitas regiões, como células piramidais hipocâmpais, e sua atividade tem efeitos rápidos no controle da excitabilidade celular, da transmissão sináptica e mudanças a longo prazo que afetam a aprendizagem e a formação da memória (ADELMAN; MAYLIE; SAH, 2012; PEDARZANI; STOCKER, 2008).

Os canais SK apresentam três subfamílias distintas (SK1, SK2 e SK3). Todavia, a expressão das subunidades pode variar de acordo com a localização celular. No soma dos motoneurônios do DMV foi observado, por exemplo, maiores níveis de expressão de mRNA para a subunidade SK3 do que para as outras duas subunidades (SK1 e SK2) (PEDARZANI *et al.*, 2000). O canal IK, com condutância intermediária ao K<sup>+</sup>, apresenta funcionalidade e estrutura semelhante ao canal SK e também faz parte da mesma família de genes, todavia sua distribuição no SNC está mais limitada em relação ao BK e SK (ADELMAN; MAYLIE; SAH, 2012).

Estudos de Sah e MacLachlan (1992) avaliaram a contribuição das correntes de saída mediadas por canais KCa<sup>2+</sup> nos motoneurônios do DMV de ratos e demonstraram que o potencial de ação era seguido por um prolongado período HPP. Este fenômeno possuía basicamente dois componentes, uma fase de rápido decaimento (rHPP) e uma fase de lento decaimento (IHPP). Após a aplicação de apamina, eles observaram uma redução na rHPP, o que indica que os canais SK em motoneurônios vagais de ratos contribuem para a HPP. Vale destacar que, nesses estudos os motoneurônios analisados não tiveram as suas projeções identificadas, isto é uma população heterogênea de motoneurônios do DMV, que não necessariamente se projetavam para as vias áreas respiratórias, foi avaliada. Ou seja, até o momento, pouco se sabe sobre a contribuição dos canais KCa<sup>2+</sup> para as propriedades eletrofisiológicas dos MNPRs do DMV de ratos.

Adicionalmente, Pedarzani *et al.* (2000) demonstraram que os canais SK também medeiam a HPP e o bloqueio desses canais causou um aumento substancial na frequência de potenciais de ação espontâneos dos motoneurônios do DMV. Todavia, a duração dos potenciais de ação não foi alterada pelo bloqueio dos canais SK. Portanto, dada a sua importância fisiológica, o funcionamento inadequado desses canais pode levar ao surgimento de doenças no sistema nervoso central como a epilepsia (LIANG *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019), comprometimento motor (SAUSBIER *et al.*, 2004), asma (SEIBOLD *et al.*, 2008), prejuízos cognitivos semelhantes ao Alzheimer (MARTIN *et al.*, 2017), entre outros distúrbios. Neste sentido, é de suma importância entender os mecanismos biofísicos pelos quais os canais SK controlam a excitabilidade e a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

### **1.7. Hipótese**

Portanto, tendo em vista o papel dos canais Kv, Cav, BK e SK no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação de diferentes neurônios e a expressão dos mesmos nos motoneurônios do DMV de ratos, na presente Tese de Doutorado levantamos a hipótese de que as correntes de  $K^+$  mediadas pelos canais Kv, BK e SK, bem como as correntes de  $Ca^{2+}$  mediadas pelos canais Cav, controlam a excitabilidade e a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

**OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar a contribuição das correntes de  $K^+$  mediadas pelos canais Kv, BK e SK, bem como as correntes de  $Ca^{2+}$  mediadas pelos canais Cav, no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- I) Caracterizar as correntes de  $K^+$  mediadas pelos canais Kv, BK e SK nos MNPRs do DMV de ratos;
- II) Caracterizar as correntes de  $Ca^{2+}$  mediadas pelos canais Cav nos MNPRs do DMV de ratos;
- III) Avaliar a participação dos canais Kv, Cav, BK e SK no controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos;
- IV) Avaliar a participação dos canais Kv, Cav, BK e SK no controle da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos;
- V) Avaliar a participação dos canais Kv, Cav, BK e SK no controle da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos;
- VI) Avaliar a participação dos canais Kv, Cav, BK e SK no controle do potencial de membrana em repouso dos MNPRs do DMV de ratos;
- VII) Avaliar a contribuição dos canais BK e SK no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

***MATERIAL E MÉTODOS***



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Utilizamos ratos Wistar Hannover (3-4 semanas) provenientes do Serviço de Biotério da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto, mantidos em caixas coletivas no Biotério de Manutenção e Experimentação de Ratos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da FMRP/USP (protocolo #87/2019). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura média de 22°C, ciclo de claro-escuro artificial de 12 horas e alimentados com ração granulada e água *ad libitum*.

#### 3.2. Identificação dos MNPRs do DMV

Para marcação dos MNPRs do DMV, utilizamos o traçador retrógrado axonal fluorescente *FluoroGold* (Fluorochrome, UK). O *FluoroGold* tem sido amplamente utilizado para marcar neurônios de forma retrógrada, sendo absorvido nas terminações sinápticas dos neurônios, onde pode ser transportado ativamente ou por difusão pelo citoplasma até o corpo celular neuronal sem causar alterações nas propriedades eletrofisiológicas na célula marcada (FALGAIROLLE; O'DONOVAN, 2015).

Os animais foram anestesiados com a injeção intraperitoneal de mistura de cloridrato de cetamina (75 mg/Kg – Agener União, Brasil) + cloridrato de xilasina (5 mg/Kg – Hertape Calier, Brasil) e em seguida intubados (endotraqueal) para microinjeção do *FluoroGold* (3.5 µl; 5%), que foi aplicado como auxílio de um cateter de polietileno (7 cm; PE-10; Clay Adams, EUA), na superfície das vias aéreas inferiores onde os gânglios parassimpáticos se localizam (COLERIDGE; COLERIDGE, 1994a). Ao final de cada microinjeção com *FluoroGold*, uma ventilação mecânica por alguns minutos era realizada a fim de garantir que o traçador retrogrado não retornasse para as vias aéreas superiores. Por fim, os animais foram mantidos em caixas coletivas com ração e água *ad libitum* para recuperação por mais 4 dias.

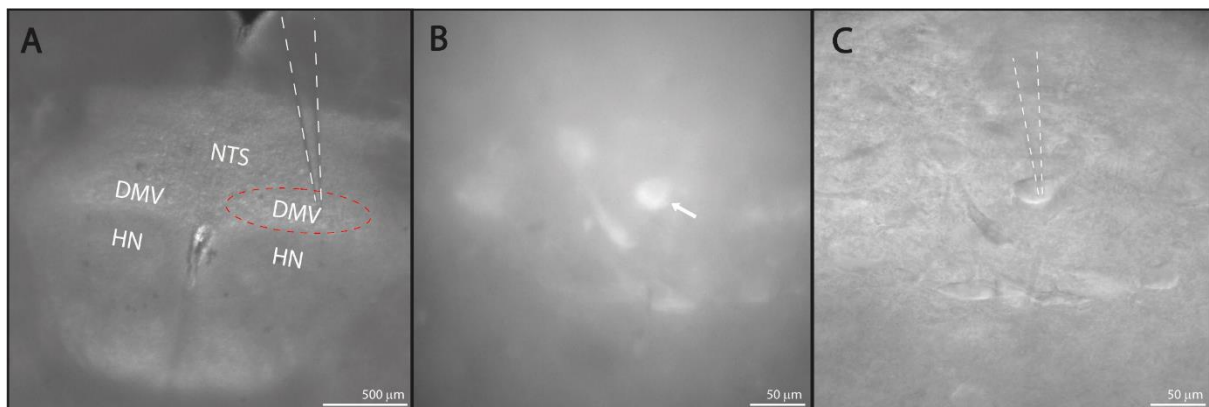
### 3.3. Obtenção das fatias do bulbo

Os ratos foram profundamente anestesiados com o anestésico inalatório isoflurano (5%; AstraZeneca do Brasil Ltda., Brasil) e decapitados rapidamente. O encéfalo e a medula espinhal cervical superior foram isolados em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF)-1, gelado (0° C) e borbulhado com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), para oxigenação e manutenção do pH em 7.4, com composição de (em mM): NaCl, 121; KCl, 2.5; MgCl<sub>2</sub>, 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glicose, 20 e CaCl<sub>2</sub>, 2; osmolalidade de ~ 310 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O. Após a transecção coronal ao nível do colículo inferior, o cerebelo foi removido para isolar o tronco encefálico. O tronco encefálico foi então montado verticalmente, com a porção caudal para cima e a rostral fixada na base do vibrátomo (Leica VT 1200S, Alemanha), utilizando cola de cianocrilato próximo a um suporte de bloco de ágar (4% em ACSF-2 – ver abaixo). O bulbo foi seccionado serialmente na orientação caudo-rostral. Fatias coronais do bulbo de 250 µm foram obtidas contendo a região do DMV e incubadas em ACSF-2 (em mM: NaCl, 121; KCl, 4; MgCl<sub>2</sub>, 1; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glicose, 10 e CaCl<sub>2</sub>, 2, com osmolalidade final de ~ 295 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O) por 30 minutos à 33° C, borbulhado continuamente com mistura carbogênica, e após esse período permaneceram à 23° C durante todo o experimento.

### 3.4. Registros eletrofisiológicos e aquisição de dados

As fatias foram transferidas para câmara de registro (300 µl), com o auxílio de um conta-gotas, e submersa sob fluxo (2 ml.min<sup>-1</sup>) de ACSF-2 a 23° C, e borbulhado com mistura carbogênica durante a realização de todo o protocolo experimental. As fatias foram imobilizadas por meio de uma rede de fios de nylon montada sobre uma armação de platina e os motoneurônios do DMV foram visualizados por meio de um microscópio equipado com óptica de contraste de interferência diferencial e infravermelho (DIC-IR; BX-51; Olympus, Japão), acoplado a uma câmera sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho (C10600 Orca R2; Hamamatsu Photonics, Japão). A identificação dos corpos celulares dos motoneurônios marcados com o traçador retrógrado *FluoroGold* foi realizada com o auxílio de um sistema de LED (comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão 430 nm, X-Cite 120

LEDBoost, Canadá) sob microscopia de fluorescência. Os motoneurônios do DMV que apresentavam marcação no corpo celular, após a injeção de *FluoroGold* nas vias aéreas inferiores, foram selecionados para os registros eletrofisiológicos pela técnica de *Whole Cell Patch Clamp* (SAKMANN; NEHER, 1984). A Figura 1 mostra uma fatia coronal do tronco encefálico de um rato contendo a região do DMV em aumento de 4x (painel A), os MNPRs marcados com *FluoroGold* em aumento de 40x (painel B) e um MNPR, escolhido para o registro eletrofisiológico, em contato com o eletrodo de registro também em aumento de 40x (painel C).



**Figura 1. Fotomicrografias de uma fatia coronal do bulbo contendo os MNPRs do DMV. (A)** Visualização da fatia coronal, com 250  $\mu\text{m}$  de espessura, contendo o DMV (círculos vermelhos) em aumento de 4X em campo claro. **(B)** Fotomicrografia dos MNPRs do DMV, marcados com *FluoroGold*, em aumento de 40x em epifluorescência. **(C)** Fotomicrografia do MNPR representativo do DMV em campo claro e o eletrodo de registro posicionado sobre o mesmo para o registro eletrofisiológico também em aumento de 40X.

Microeletrodos de borossilicato de vidro (O.D 1.5mm, I.D 0.86 mm, Sutter Instruments, EUA) foram confeccionados usando-se um estirador horizontal (P-97 puller; Sutter Instruments) e foram preenchidos com duas soluções de pipeta diferentes (em mM): 1) gluconato de  $\text{K}^+$ , 130; KCl, 20;  $\text{CaCl}_2$ , 4.3; Mg-ATP, 2; Na-GTP, 0.3; ethyleneglycol-bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA), 5; N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES), 10; pH 7.4 ajustado com KOH e osmolalidade de  $\sim 298$  mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O - para analisar as correntes de  $\text{K}^+$ , a excitabilidade neuronal, a cinética do potencial de ação e a transmissão sináptica excitatória, e; 2):  $\text{CsCl}_2$ , 110; TEA, 30;  $\text{CaCl}_2$ , 2; EGTA, 5;  $\text{MgCl}_2$ , 1; Na-ATP, 2; Na-GTP, 0.25; HEPES, 10; pH 7.4 ajustado com CsOH e osmolalidade de  $\sim 298$  mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O - para registrar as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ . A solução de pipeta 1 teve  $\sim 1$   $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  livre calculado pelo programa *Maxchelator*

(<http://maxchelator.stanford.edu/webmaxc/webmaxcE.htm>). Uma pressão positiva e constante foi aplicada na luz do eletrodo de registro (resistência entre 4 e 6 M $\Omega$ ), durante o tempo necessário para a aproximação entre o eletrodo e o motoneurônio, com o objetivo de evitar a adesão de impurezas na ponta do eletrodo e para afastar qualquer partícula nas proximidades do corpo celular. O eletrodo foi manuseado por meio de um micromanipulador (PatchStar, Scientifica, UK). Após a ponta do eletrodo encostar na membrana, a pressão positiva era interrompida e uma pressão negativa era aplicada até o estabelecimento da configuração *cell-attached*, que é caracterizada pela resistência entre o eletrodo e a membrana celular maior do que 1 G $\Omega$ . Posteriormente, mediante nova aplicação de pressão negativa ao eletrodo, a configuração *whole cell* era obtida, a qual é caracterizada pelo aparecimento das correntes capacitivas da membrana celular. Os motoneurônios foram mantidos em um potencial de membrana de -70 mV e os registros foram realizados somente após um período de estabilização de 5 minutos. O modo *current clamp* foi aplicado para a análise do potencial de membrana em repouso, frequência de potenciais de ação, excitabilidade e cinética do potencial de ação dos MNPRs, enquanto o modo *voltage clamp* foi aplicado para análise das correntes sinápticas excitatórias e mediadas por canais dependentes de voltagem e modulados por Ca<sup>2+</sup>.

Os registros do potencial de membrana em repouso, frequência de potenciais de ação, excitabilidade e cinética do potencial de ação, bem como das correntes mediadas por canais dependentes de voltagem e modulados por Ca<sup>2+</sup>, foram realizados na presença dos bloqueadores da transmissão sináptica rápida excitatória (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione - 10  $\mu$ M; DL-2-Amino-5-phosphonovaleric acid - 30  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, EUA) e inibitória (picrotoxina - 30  $\mu$ M; estriçnina - 1 mM; Sigma-Aldrich) na superfusão. O registro das correntes de K<sup>+</sup>, mediadas pelos canais Kv, foi avaliada com a superfusão do bloqueador TEA (5 mM; Sigma-Aldrich). Para o registro das correntes de Ca<sup>2+</sup>, mediadas pelos canais Cav, utilizamos primeiramente o CdCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M; Sigma-Aldrich). O registro das correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav do tipo L foi realizado com a superfusão do bloqueador específico nifedipina (5  $\mu$ M; Sigma-Aldrich). O registro das correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK foi feito com a superfusão da IBTX, (50 nM e 100 nM; Tocris, UK), enquanto o registro das correntes mediadas pelos canais SK foi realizado com a superfusão da apamina (100 mM; Tocris). Todos os registros das correntes descritas acima foram

realizados com a superfusão de tetrodotoxina (0.5  $\mu\text{M}$ ; Tocris), para bloquearmos os canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. As correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (sEPSCs) foram registradas em *voltagem clamp* (- 70 mV) na presença dos bloqueadores picrotoxina e estricnina.

No protocolo para a análise das correntes de  $\text{K}^+$ , mediadas pelos canais Kv e BK, utilizamos pulsos de voltagem de - 80 mV a 60 mV, em aumentos de 10 mV, com duração de 3 segundos cada pulso. Os pulsos de voltagem foram aplicados depois de um pré-pulso condicionante de 0.5 segundos em - 40 mV. As correntes de  $\text{K}^+$  mediadas pelos canais Kv foram isoladas após a subtração do registro basal pelo registro com a superfusão do TEA. Já as correntes de  $\text{K}^+$  mediadas pelos canais BK foram isoladas após a subtração do registro basal pelo registro com a superfusão de IBTX.

Para calcular a condutância destes canais foi necessário calcular o potencial de equilíbrio do íon permeante, neste caso o  $\text{K}^+$ . Utilizamos a Equação de *Nernst*:  $E_k = RT/zF \ln([K^+]_{out}/[K^+]_{int})$ , a qual  $E_k$  é o valor do potencial equilíbrio para o  $\text{K}^+$ ; R é a constante universal dos gases que é igual a 8.314 J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>; T é a temperatura em Kelvin; z é a valência da espécie iônica, F é a constante de *Faraday* que é igual a 96485 C.mol<sup>-1</sup>;  $[K^+]_{out}$  é a concentração de  $\text{K}^+$  no fluido extracelular;  $[K^+]_{in}$  é a concentração de  $\text{K}^+$  no fluido intracelular (HILLE, 2001). Após obter o valor do potencial de equilíbrio do  $\text{K}^+$  (- 91.62 mV), calculamos a condutância dos canais:  $G = I/V - E_k$ , a qual I é o valor de corrente, V é a voltagem da membrana e  $E_k$  é o potencial de equilíbrio do  $\text{K}^+$  calculado pela equação de *Nernst* (HILLE, 2001). Normalizamos então pela condutância máxima calculada ( $G_{m\acute{a}x}$ ),  $G/G_{m\acute{a}x}$ . Finalmente, utilizamos a função de *Boltzmann* para determinarmos a dependência de voltagem dos canais:  $G = 1/\{1 + \exp [(V_{50} - V_m)/V_c]\}$ , a qual G é a condutância relativa da membrana,  $V_{50}$  é o valor de voltagem o qual 50 por cento dos canais estão ativados e  $V_c$  é o fator de inclinação (*slope*) (MORAES; MACHADO, 2015).

Por outro lado, um pulso despolarizante para 10 mV, de duração de 0.1 segundo, após um pulso condicionante em - 60 mV, foi utilizado para isolar as correntes de  $\text{K}^+$  mediadas pelos canais SK. Para a analisar o potencial de reversão das correntes de  $\text{K}^+$  mediadas pelos canais SK, pulsos de voltagem despolarizantes de - 60 a 10 mV, também com duração de 0.1 segundo, seguidos por pulsos de voltagens de - 105 até - 55 mV, em intervalos de 10 mV e duração de 3 segundos, foram aplicados para

medir o valor de voltagem o qual a corrente é nula, e compararmos com o potencial de equilíbrio do  $K^+$  calculado pela equação de *Nerst*. A apamina foi adicionada na superfusão para isolarmos seletivamente tais correntes (MAHROUS; ELBASIOUNY, 2017).

Para isolar as correntes de  $Ca^{2+}$  mediadas pelos canais Cav, utilizamos pulsos de voltagem de -40 mV a 0 mV, em aumentos de 10 mV, com duração de 2 segundos, após um pulso condicionante em -60 mV de 0.5 segundos. As correntes de  $Ca^{2+}$ , mediadas pelos canais Cav, foram isoladas após a subtração do registro basal pelo registro com a superfusão de Cloreto de cádmio ( $CdCl_2$ ), enquanto as correntes de  $Ca^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L foram isoladas após a subtração do registro basal pelo registro com a superfusão de nifedipina.

A excitabilidade dos MNPRs foi analisada por meio de dois protocolos no modo *current clamp*: i) rampa de corrente despolarizante até 150 pA com duração de 2 segundos, totalizando 5 pulsos, e; ii) pulso quadrado de corrente despolarizante de 150 pA com duração de 2 segundos, totalizando 5 pulsos. Um pré-pulso condicionante de corrente hiperpolarizante ou despolarizante era aplicado, quando necessário, de modo que todos os motoneurônios estivessem em valores de voltagem de aproximadamente -60 mV antes da aplicação dos protocolos descritos acima. A excitabilidade foi avaliada pelo número de potenciais de ação evocados. Para estudar a cinética do potencial de ação, ainda no modo *current clamp*, analisamos a largura e a amplitude do potencial de ação, bem como a amplitude da HPP. Para tanto, um protocolo para gerar um único potencial de ação foi utilizado, o qual um pulso de corrente despolarizante de 150 pA, com duração de 0.1 segundo, foi aplicado, totalizando 5 pulsos. Um pré-pulso condicionante de corrente hiperpolarizante ou despolarizante era aplicado, quando necessário, de modo que todos os motoneurônios estivessem em valores de voltagem de aproximadamente -60 mV antes da aplicação do protocolo descrito acima. A amplitude do potencial de ação foi medida subtraindo o valor do pico do potencial de ação do limiar para sua evocação. Para o cálculo do limiar do potencial de ação, um plano de fase foi construído de acordo com da Silva *et al.* (2019). A largura do potencial de ação foi medida a partir da metade do valor da amplitude do potencial de ação. A amplitude da HPP foi medida subtraindo o pico da HPP do limiar do potencial de ação. O potencial de membrana em repouso foi considerado o valor de voltagem o qual as células passaram a maior

parte do tempo calculado por meio do histograma de amplitude (largura de caixa – 0.5 segundos). A frequência de potenciais de ação foi avaliada pelo número de potenciais de ação. O potencial juncional líquido (- 15 mV) foi corrigido *offline* nos protocolos experimentos utilizando a solução de pipeta 1.

Todos os sinais foram adquiridos (10 KHz) e filtrados (filtro *low pass* – 2 KHz) utilizando-se um amplificador (1 x; Multiclamp 700B, Molecular Devices, EUA) conectado a um computador via conversor A/D (DIGIDATA 1550, Molecular Devices). O software *pClamp* (versão 10; Molecular Devices) foi utilizado para a aquisição dos sinais, enquanto os softwares *Clampfit* (Molecular Devices) e *Mini Analysis* (Synaptosoft, Inc., EUA) foram utilizados para a análise dos resultados.

### 3.5. Imunofluorescência

O fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos foi avaliado por meio da imunofluorescência. Para tanto, utilizamos o traçador neuronal biocitina (0.2%; Molecular Probes, EUA) na solução de pipeta para identificar os MNPRs registrados. Imediatamente após os registros eletrofisiológicos, as fatias foram coletadas e armazenadas em paraformaldeído (4%) durante 24 horas. Após esse período, as fatias foram transferidas e mantidas em uma solução crioprotetora [0.1 M de salina tamponada com fosfato (PBS); 30% de etilenoglicol; 20% de glicerol] à 4° C (DA SILVA *et al.*, 2019). Para realizar a imunofluorescência, as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS (0.1 M), em seguida as fatias foram bloqueadas e permeabilizadas em PBS contendo soro fetal bovino (5%) e Triton X-100 (0.1%) durante o período de 1 hora à temperatura ambiente. Após esse processo, as fatias foram incubadas *over-night* em anticorpo primário anti-colina acetiltransferase de cabra (ChaT; 1:500; Millipore, Massachusetts, EUA). Realizamos novamente 3 lavagens com PBS e acrescentamos os anticorpos secundários: estreptavidina conjugada com Alexa 488 (1:500; Molecular Probes) e Alexa 647 anti-cabra de camundongo (1:500; Molecular Probes) e as fatias foram incubadas por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas 3 vezes em PBS e montadas sobre lâminas de vidro com *Fluoromount* (Sigma-Aldrich). Por fim, as imagens foram coletadas em microscópio confocal Leica (SP5; Wetzlar, Alemanha) com comprimentos de *lasers* 488 e 633 nm e detecção de comprimento de emissão ajustável (MORAES; MACHADO, 2015).

### 3.6. Análise estatística

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e todas as análises estatísticas foram realizadas no software *Prism 7* (GraphPad Software, EUA). Os dados foram testados em relação a sua normalidade por meio do teste de *Kolmogorov - Smirnov*. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* ou pareado não paramétrico de *Wilcoxon*, quando os dados não apresentam distribuição dentro da normalidade, para a análise dos efeitos do bloqueio farmacológico dos canais Kv, Cav, SK e BK. O nível de significância foi de  $p < 0.05$ .

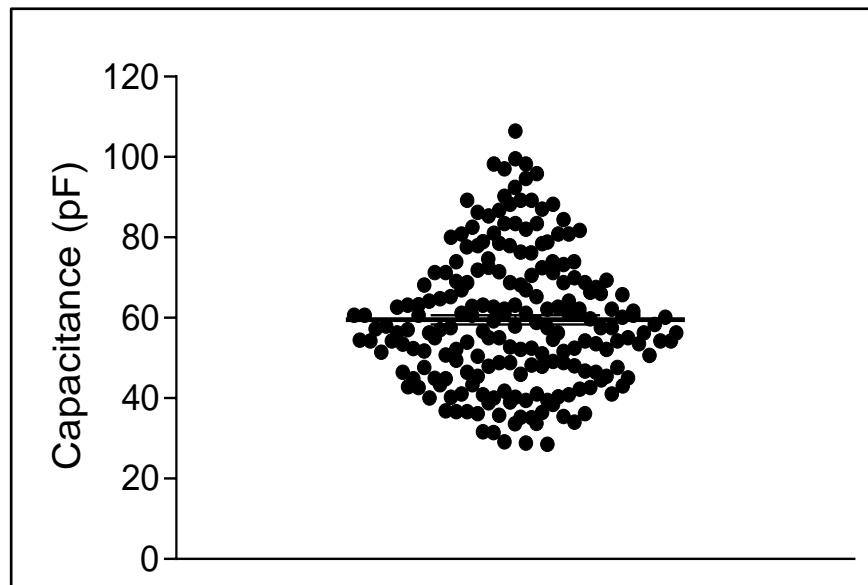


**RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Capacitância dos MNPRs no DMV de ratos.

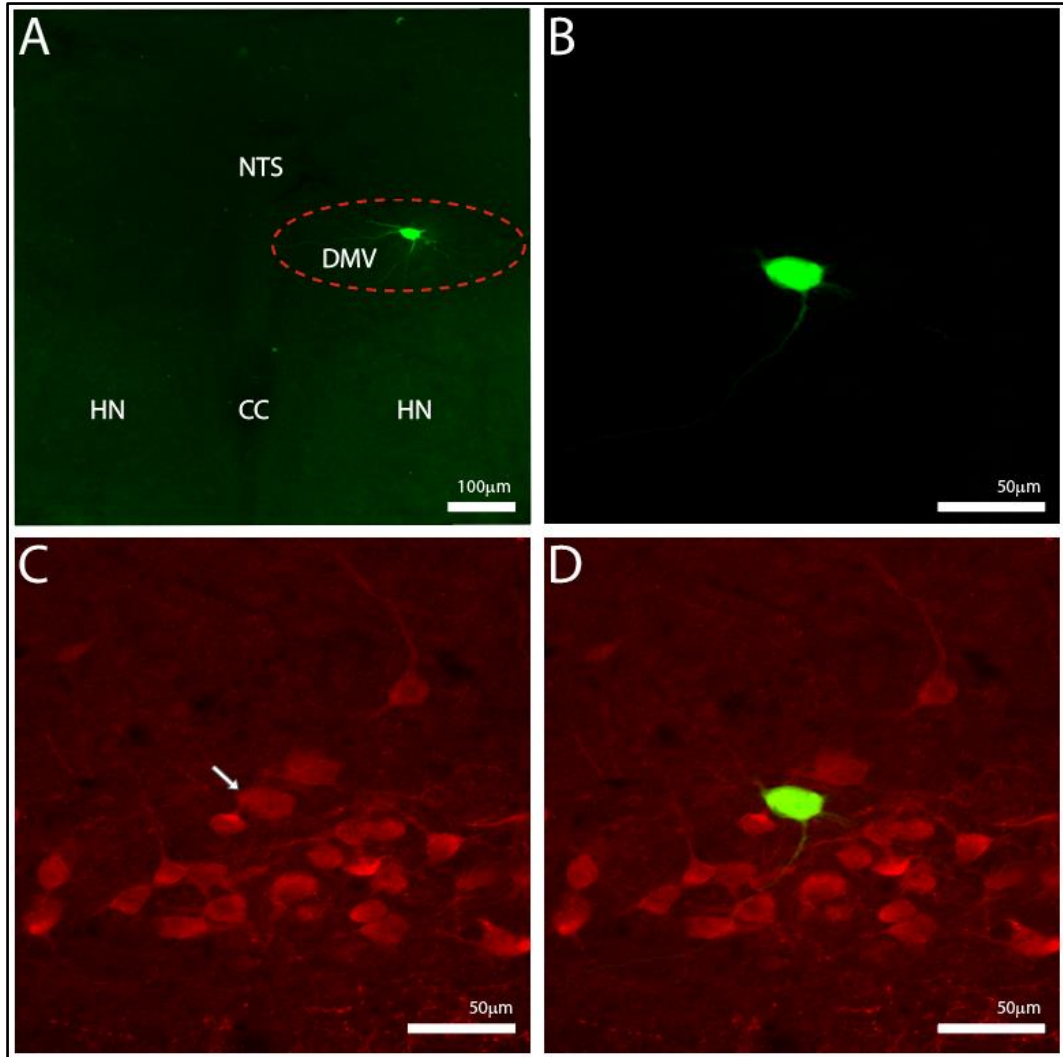
Registramos 210 MNPRs do DMV de 107 ratos nos diferentes protocolos experimentais. Os motoneurônios respiratórios registrados apresentam valores de capacitância de  $59.50 \pm 1.14$  pF.



**Figura 2. Capacitância dos MNPRs do DMV de ratos.** Dados dispersos da capacitância dos MNPRs registrados no DMV de ratos. n=210 de 107 ratos.

#### **4.2. Fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos**

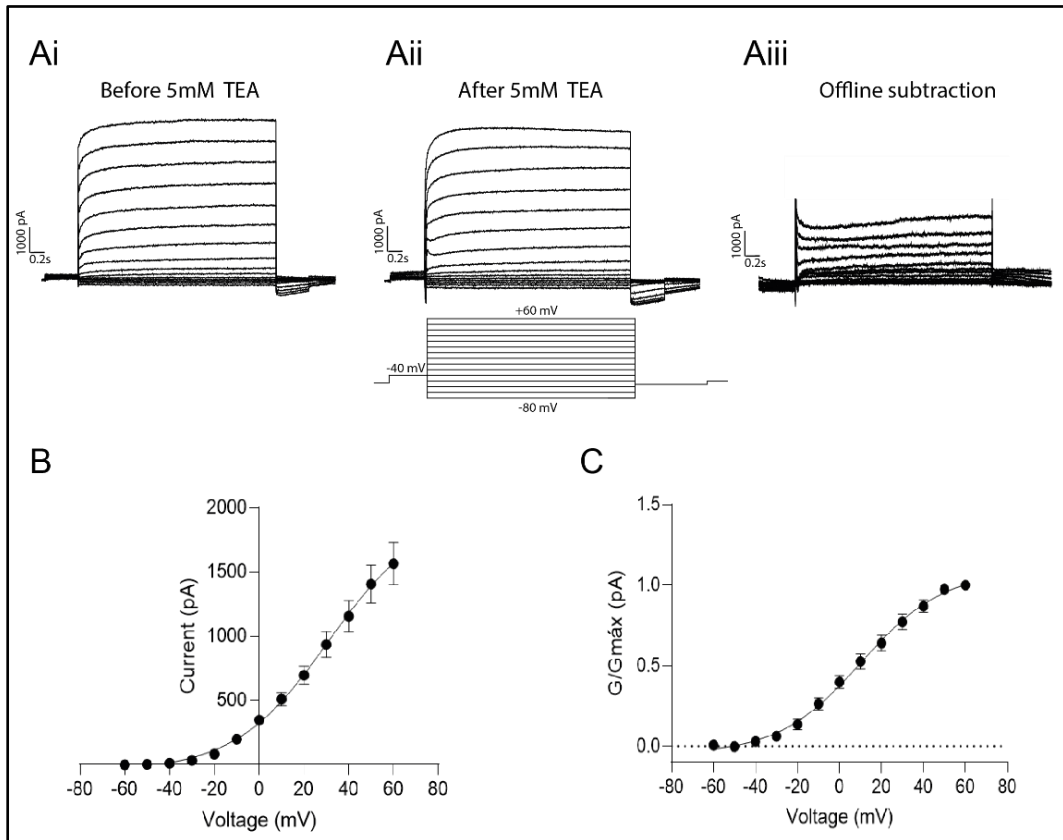
Após os registros eletrofisiológicos, selecionamos algumas fatias contendo MNPRs do DMV e, por meio da técnica de imunofluorescência, analisamos o fenótipo motor dos mesmos. Podemos observar na Figura 3, painéis A, B e C, a marcação da biocitina (verde) de um MNPR registrado na região do DMV que se projetava para as vias aéreas respiratórias, bem como da ChaT (vermelho). Note na Figura 3, painéis C e D, que o MNPR registrado na região do DMV apresenta a marcação para ChaT, demonstrando assim o seu fenótipo motor.



**Figura 3. Caracterização do fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos.** (A) Visualização da fatia coronal do bulbo de um rato, mostrando a localização de um MNPR registrado, marcado com biocitina (verde), na região do DMV (círculo vermelho). (B) Magnificação do MNPR marcado com biocitina em A. (C) Fotomicrografia dos MNPRs do DMV ChaT-positivos (vermelhos). A seta indica o MNPR registrado. (D) Co-localização de ambas as marcações em B e C. Note o fenótipo motor do MNPR registrado. HN: Núcleo Motor do Hipoglosso; NTS: Núcleo do Trato Solitário; CC: Canal Central.

### 4.3. Correntes de K<sup>+</sup> mediadas por canais Kv sensíveis ao TEA nos MNPRs do DMV de ratos.

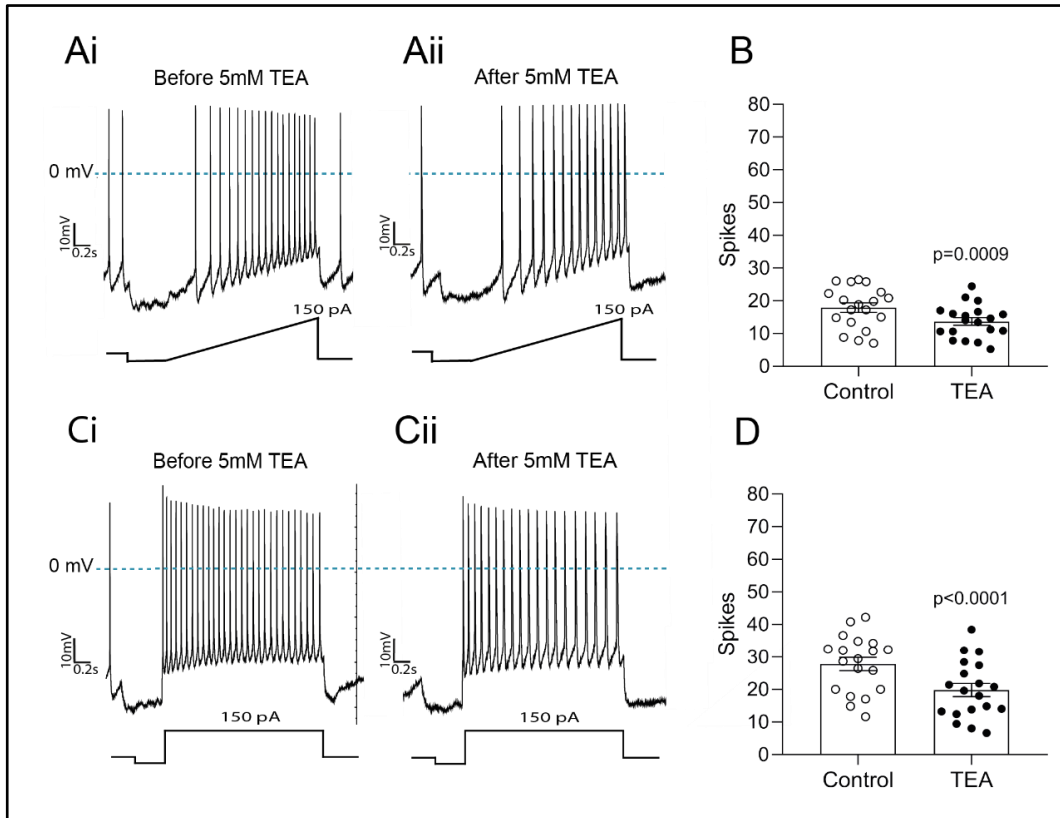
Para analisar as correntes de saída de K<sup>+</sup> mediadas por canais Kv sensíveis ao TEA, uma série de pulsos despolarizantes de -80 mV a 60 mV, em aumentos de 10 mV, foram aplicados no modo *voltage clamp*, com duração de 3 segundos cada pulso, partindo de um pré-pulso condicionante de -40 mV (Figura 4, painéis Ai e Aii). Com o intuito de avaliar a contribuição dos canais Kv para a corrente de saída de K<sup>+</sup>, utilizamos o bloqueador TEA na concentração de 5 mM (Figura 4, painel Aii). Após a subtração *offline* (Figura 4, painel Aiii), é possível observar que o TEA foi capaz de reduzir a corrente de saída de K<sup>+</sup>. É possível observar também que a partir da voltagem de aproximadamente -40 mV, a corrente de saída de K<sup>+</sup> mediada por canais Kv sensíveis ao TEA se torna proeminente, tendo seu pico máximo em 60 mV ( $1566.45 \pm 164.57$  pA; Figura 4, painel B). As correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais Kv sensíveis ao TEA são caracterizadas por uma lenta ativação e os seus valores de V<sub>50</sub> foram de  $10.26 \pm 2.55$  mV (Figura 4, painel C) e *slope* de  $19.80 \pm 2.74$  (Figura 4, painel C). Esses dados demonstram que as correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais Kv sensíveis ao TEA estão presentes nos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 4. Correntes de saída de  $K^+$  mediadas por canais Kv sensíveis ao TEA nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de saída de  $K^+$  de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (Ai) e após (Aii) a superfusão do TEA (5 mM). Note as correntes de  $K^+$  mediadas pelos canais Kv sensíveis ao TEA obtidas pela subtração *off-line* (Aiii). (B) Amplitudes médias dos picos das correntes de  $K^+$ , plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados, mediadas pelos canais Kv sensíveis ao TEA. (C) Valores da condutância normalizada dos canais Kv sensíveis ao TEA plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados. A linha sólida representa o ajuste da função de *Boltzmann* aos dados obtidos.  $n=22$  células de 9 ratos.

#### **4.4. Contribuição dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

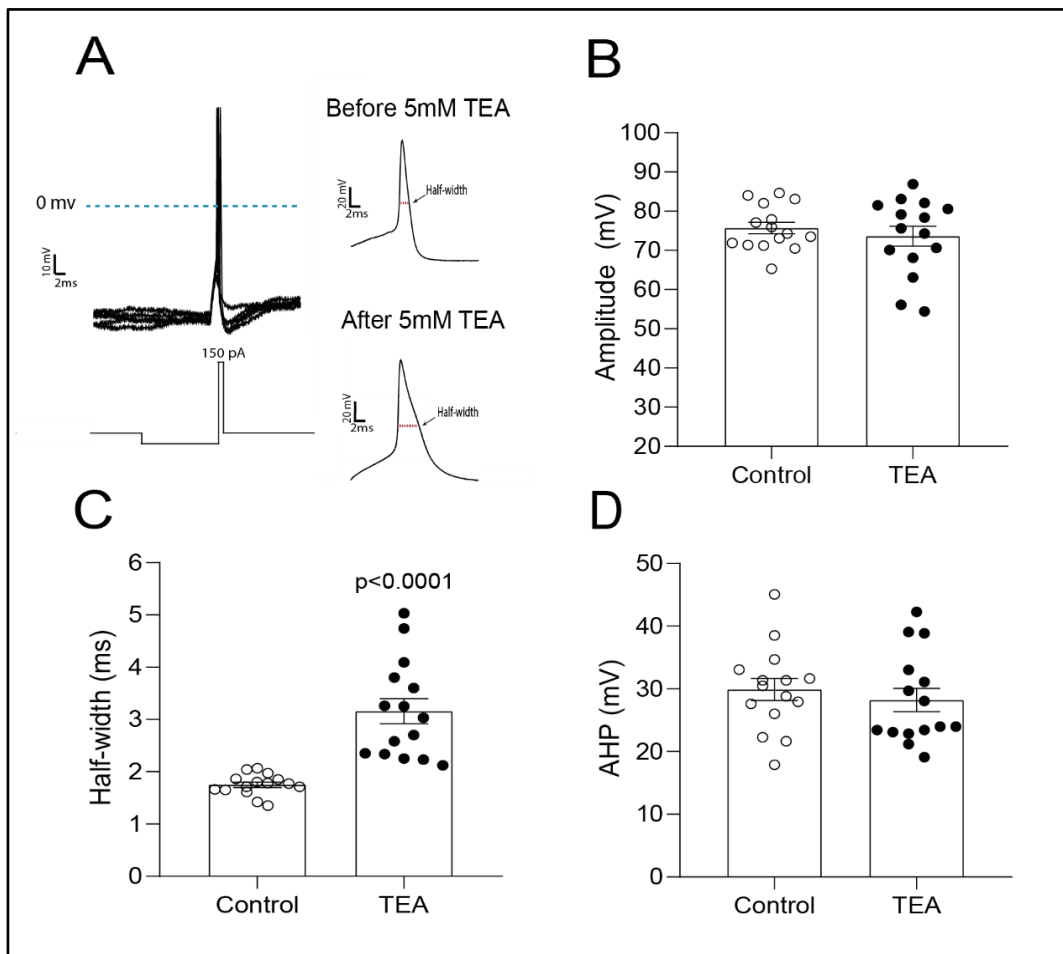
Para analisar a contribuição dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos, foram realizados dois protocolos experimentais diferentes, no modo *current clamp*, antes e após a superfusão com TEA: i) rampa de corrente despolarizante até 150 pA com duração de 2 segundos (Figura 5, painéis Ai e Aii), e; ii) pulso quadrado de corrente despolarizante de 150 pA com duração de 2 segundos (Figura 5, painéis Ci e Cii). Na Figura 5, painel B, é possível observar os dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de rampa de corrente despolarizante. Nossos resultados demonstram uma redução significativa da excitabilidade após superfusão do TEA. Os valores de excitabilidade foram de  $17.91 \pm 1.44$  antes e  $13.64 \pm 1.16$  potenciais de ação após TEA ( $p=0.0009$ ). Já no painel D, Figura 5, observamos os dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de pulso quadrado de corrente despolarizante. Os valores de excitabilidade foram de  $27.81 \pm 2.02$  antes e  $19.81 \pm 2.03$  potenciais de ação após TEA ( $p<0.0001$ ). Portanto, os canais Kv sensíveis ao TEA controlam a excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 5. Efeito do TEA na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão do TEA (5 mM). (**B**) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta à rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão do TEA. Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes (**Ci**) e após (**Cii**) a superfusão do TEA. (**D**) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta ao pulso de corrente despolarizante antes e após o TEA.  $n=19$  células de 7 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico  $t$  de *Student* em B e D.



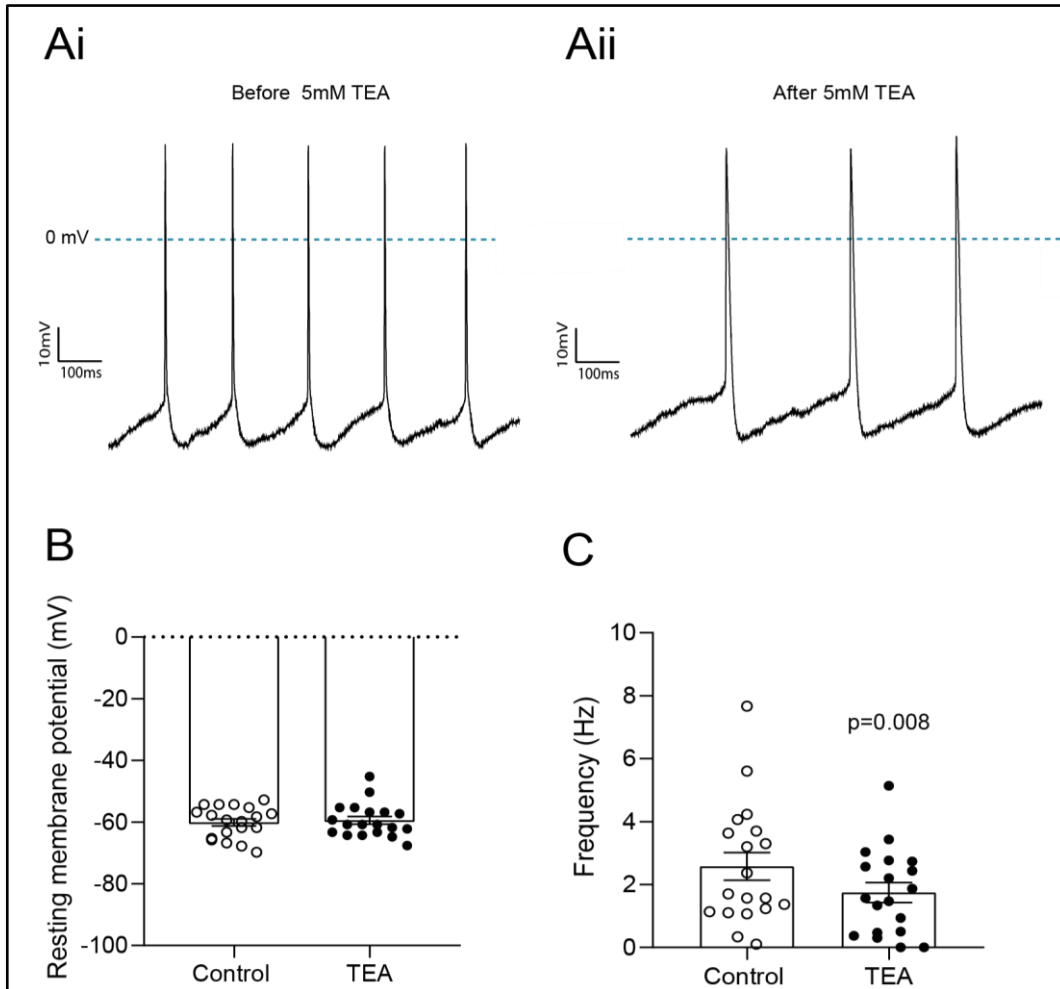
A análise da participação dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV foi feita na configuração *current clamp*, por meio da aplicação de um pulso de corrente despolarizante de 150 pA, com duração de 0.01 segundo, com intuito de gerar um único potencial de ação, antes e após a superfusão do TEA (Figura 6, painel A). Analisamos a amplitude e a largura do potencial de ação e também a amplitude da HPP. Nossos resultados demonstram um aumento significativo na largura do potencial de ação após superfusão do TEA (antes:  $1.75 \pm 0.05$ ; após TEA:  $3.15 \pm 0.24$  ms;  $p < 0.0001$ ; Figura 6, painel C). Contudo, não houve alterações significativas na amplitude do potencial de ação (antes:  $75.73 \pm 1.46$ ; após TEA:  $73.62 \pm 2.53$  mV;  $p = 0.28$ ; Figura 6, painel B), bem como na amplitude da HPP (antes:  $29.89 \pm 1.74$ ; após TEA:  $28.21 \pm 1.86$  mV;  $p = 0.15$ ; Figura 6, painel D). Os canais Kv sensíveis ao TEA participam do controle da cinética do potencial de ação, determinando a sua largura, dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 6. Efeito do TEA na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** (A) Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato, evocados por pulsos de corrente despolarizante de 150 pA, antes e após a superfusão do TEA (5 mM). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação (B), da largura do potencial de ação (C) e da amplitude da HPP (D) dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão do TEA.  $n=15$  células de 5 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico  $t$  de *Student* em C. Utilizamos o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em B e D.

#### **4.5. Contribuição dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

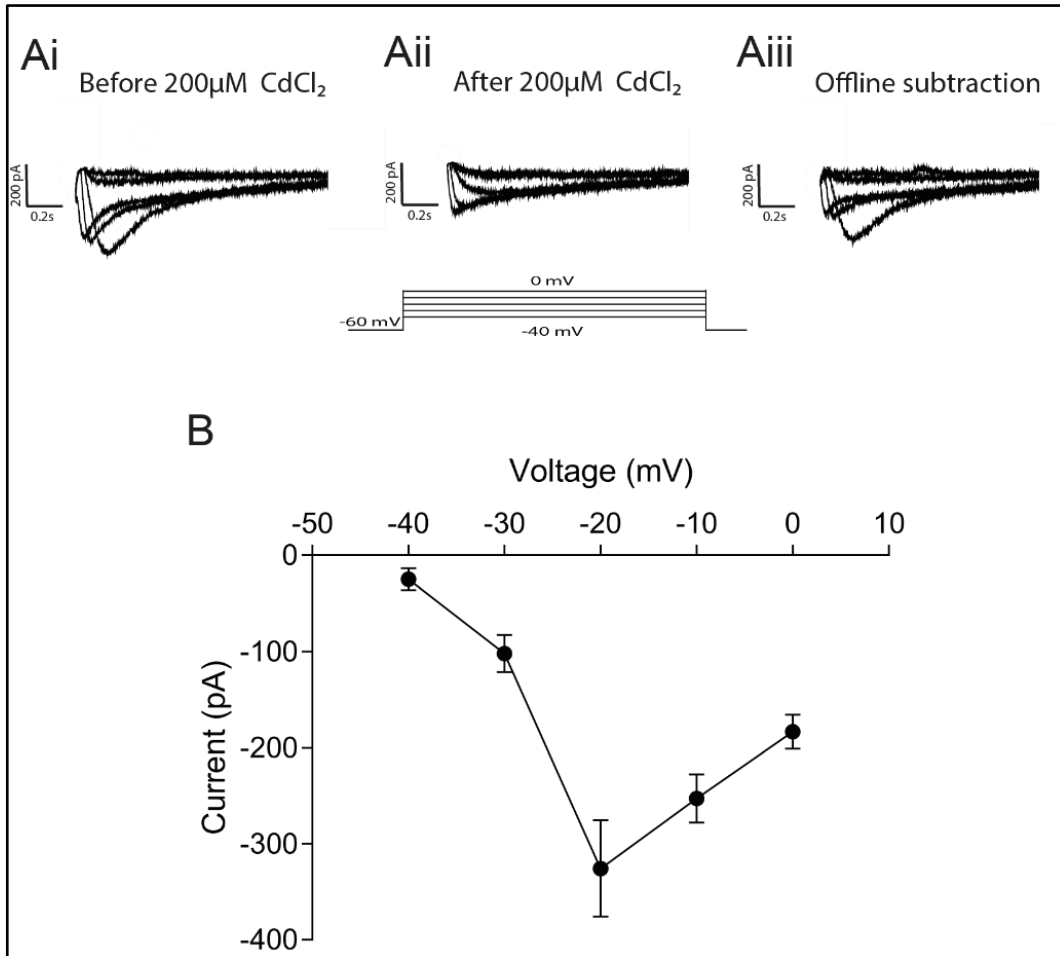
Para avaliar a contribuição dos canais Kv sensíveis ao TEA no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos, foi realizado o registro basal do potencial de membrana, no modo *current clamp*, antes e após a superfusão do TEA (Figura 7, painéis Ai e Aii). O potencial de membrana em repouso foi considerado o valor de voltagem o qual as células passaram a maior parte do tempo calculado por meio do histograma de amplitude. Nossos resultados demonstram que o potencial de membrana em repouso apresenta uma voltagem de  $-62.31 \pm 1.18$  mV antes e  $-59.45 \pm 1.24$  mV após TEA ( $p=0.52$ ; Figura 7, painel B), ou seja, não houve alteração do potencial de membrana em repouso dos MNPRs após TEA. Já em relação a frequência de potenciais de ação dos MNPRs, na Figura 7 painel C é possível observar que houve uma redução significativa da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV e os valores foram de  $2.57 \pm 0.44$  Hz antes e  $1.74 \pm 0.31$  Hz após TEA ( $p=0.008$ ; Figura 7, painel C). Portanto, os canais Kv sensíveis ao TEA modulam a frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos, mas não contribuem para o controle do potencial de membrana em repouso.



**Figura 7. Efeito do TEA no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato antes (Ai) e após (Aii) a superfusão do TEA (5 mM). (B) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão do TEA. (C) Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs antes e após a superfusão do TEA.  $n=19$  células de 7 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de Student em B e o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon em C.

#### 4.6. Correntes de $\text{Ca}^{2+}$ mediadas por canais Cav sensíveis ao $\text{CdCl}_2$ nos MNPRs do DMV de ratos.

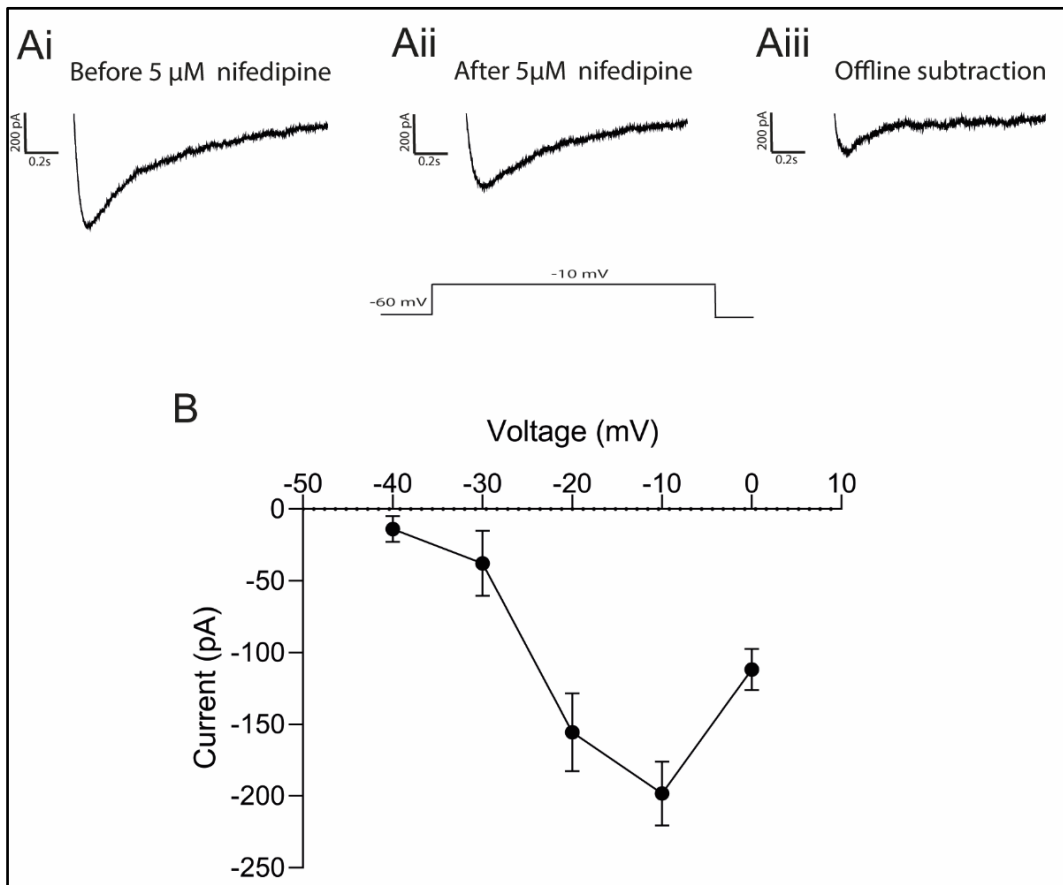
A fim de isolar as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  nos MNPRs do DMV de ratos, mediadas por diferentes canais Cav, utilizamos o  $\text{CdCl}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ). Para tanto, utilizamos pulsos de voltagem de -40 mV a 0 mV, em aumentos de 10 mV com duração de 2 segundos, após um pulso condicionante em -60 mV (Figura 8, painéis Ai e Aii). Após a subtração *offline* (Figura 8, painel Aiii), podemos observar que o  $\text{CdCl}_2$  foi capaz de reduzir a corrente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . É possível observar também que a partir da voltagem de aproximadamente -40 mV, a corrente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediadas pelos canais Cav sensível ao  $\text{CdCl}_2$ , se torna proeminente, tendo seu pico máximo em aproximadamente -20 mV (-325.67  $\pm$  50.31 pA; Figura 8, painel B). Estudos utilizando registros eletrofisiológicos e ferramentas farmacológicas em neurônios revelaram que os canais Cav possuem características distintas: os canais Cav do tipo L, de maneira geral, requerem grandes desvios do potencial de membrana para serem ativados e o pico da corrente macroscópica é em aproximadamente -10 mV, ao passo que os canais Cav do tipo T tem seu pico de corrente macroscópica em aproximadamente -40 mV (HELTON; XU; LIPSCOMBE, 2005). Os nossos resultados demonstram que o  $\text{CdCl}_2$  foi capaz de reduzir as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  nos MNPRs do DMV de ratos e a cinética da corrente observada é compatível com a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por canais Cav do tipo L.



**Figura 8. Correntes de entrada de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub> nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de Ca<sup>2+</sup> de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão do CdCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M). Note as correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub> obtidas pela subtração *offline* (**Aiii**). (**B**) Amplitude média do pico das correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas por canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub>. n=18 células de 11 ratos.

#### **4.7. Correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav sensíveis a nifedipina nos MNPRs do DMV de ratos.**

Após registrar as correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav sensíveis ao CdCl<sub>2</sub> nos MNPRs do DMV de ratos, utilizamos a nifedipina, na concentração de 5 μM, para isolar especificamente as correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav do tipo L. Para tanto, aplicamos o mesmo protocolo descrito na seção 4.6, antes e após a superfusão de nifedipina (Figura 9, painéis Ai e Aii). Após a subtração *offline* (Figura 9, painel Aiii), podemos observar que a nifedipina foi capaz de reduzir a corrente de entrada de Ca<sup>2+</sup>. A partir da voltagem de aproximadamente -40 mV as correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav do tipo L se tornam mais proeminentes, com pico máximo em -10 mV (-198.27 ± -22.29 pA; Figura 9, painel B). Esses dados demonstram que as correntes de Ca<sup>2+</sup> mediadas pelos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina estão presentes nos MNPRs do DMV de ratos.

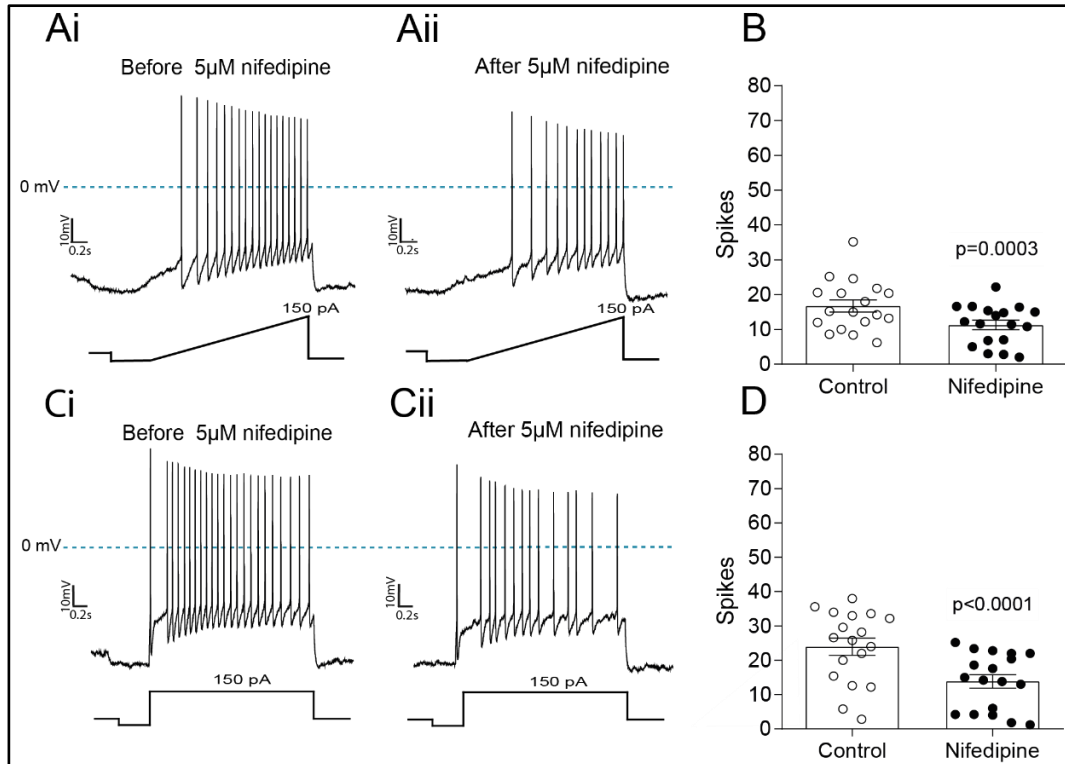


**Figura 9. Correntes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de nifedipina (5  $\mu\text{M}$ ). Note a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada pelos canais Cav do tipo L obtidas pela subtração *offline* (**Aiii**). (**B**) Amplitude média do pico das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina. n=24 células de 13 ratos.



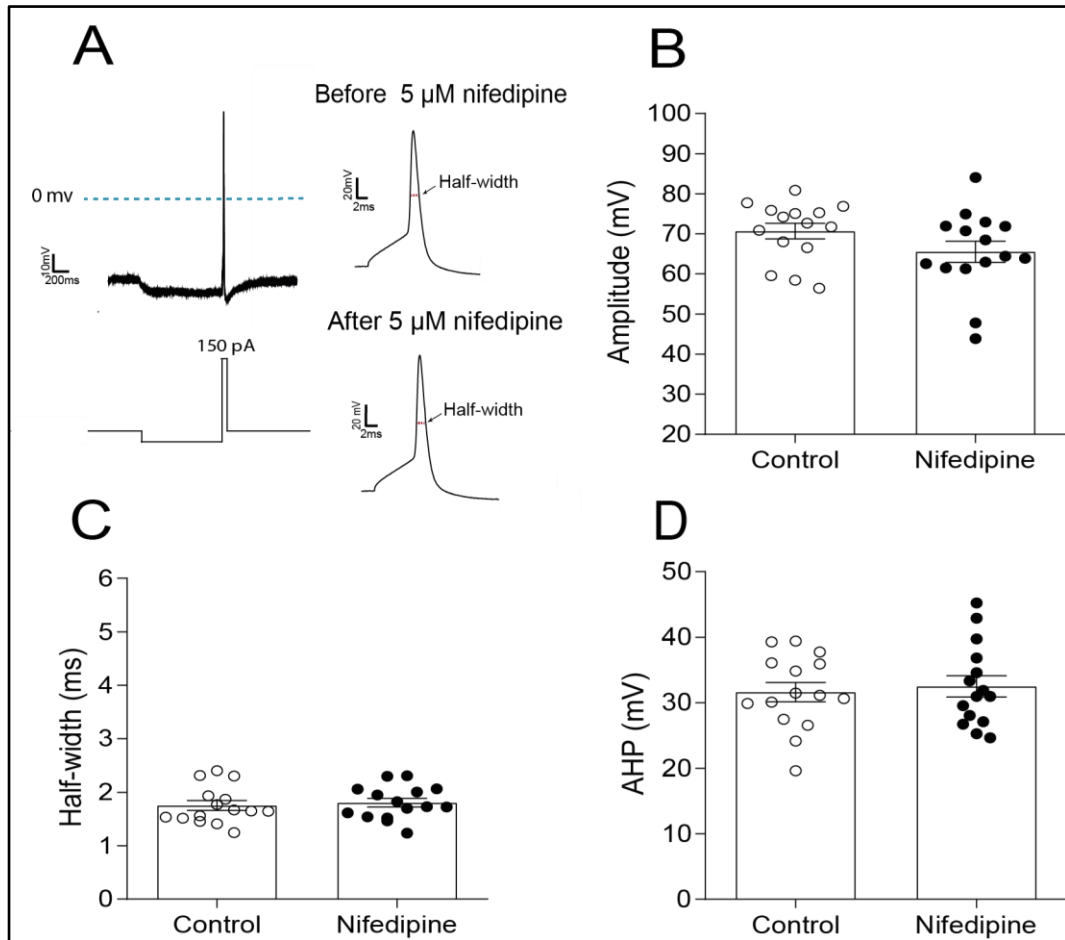
#### **4.8. Participação dos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

Para analisar a contribuição dos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina no controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos, foram realizados dois protocolos experimentais distintos, como descrito na seção 4.4, antes e após a superfusão com nifedipina (Figura 10, painéis Ai e Aii). Na Figura 10 painel B é possível observar os dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de rampa de corrente despolarizante. Observamos uma redução na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos após a nifedipina. Os valores de excitabilidade foram de  $16.73 \pm 1.71$  antes e  $11.31 \pm 1.35$  potenciais de ação após nifedipina ( $p=0.0003$ ). Já no painel D da Figura 10, observamos os dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de pulso quadrado de corrente despolarizante. Os valores de excitabilidade foram de  $23.97 \pm 2.47$  antes e  $13.86 \pm 1.95$  potenciais de ação após nifedipina ( $p<0.0001$ ). Portanto, os canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina controlam a excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 10. Efeito da nifedipina na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante, de 150 pA durante 2 segundos, antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de nifedipina (5  $\mu$ M). (**B**) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão de nifedipina. Traçados representativos de um MNPR em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante, de 150 pA durante 2 segundos, antes (**Ci**) e após (**Cii**) a superfusão de nifedipina. (**D**) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta a um pulso de corrente despolarizante antes e após a superfusão de nifedipina.  $n=18$  células de 9 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico  $t$  de Student em B e D.

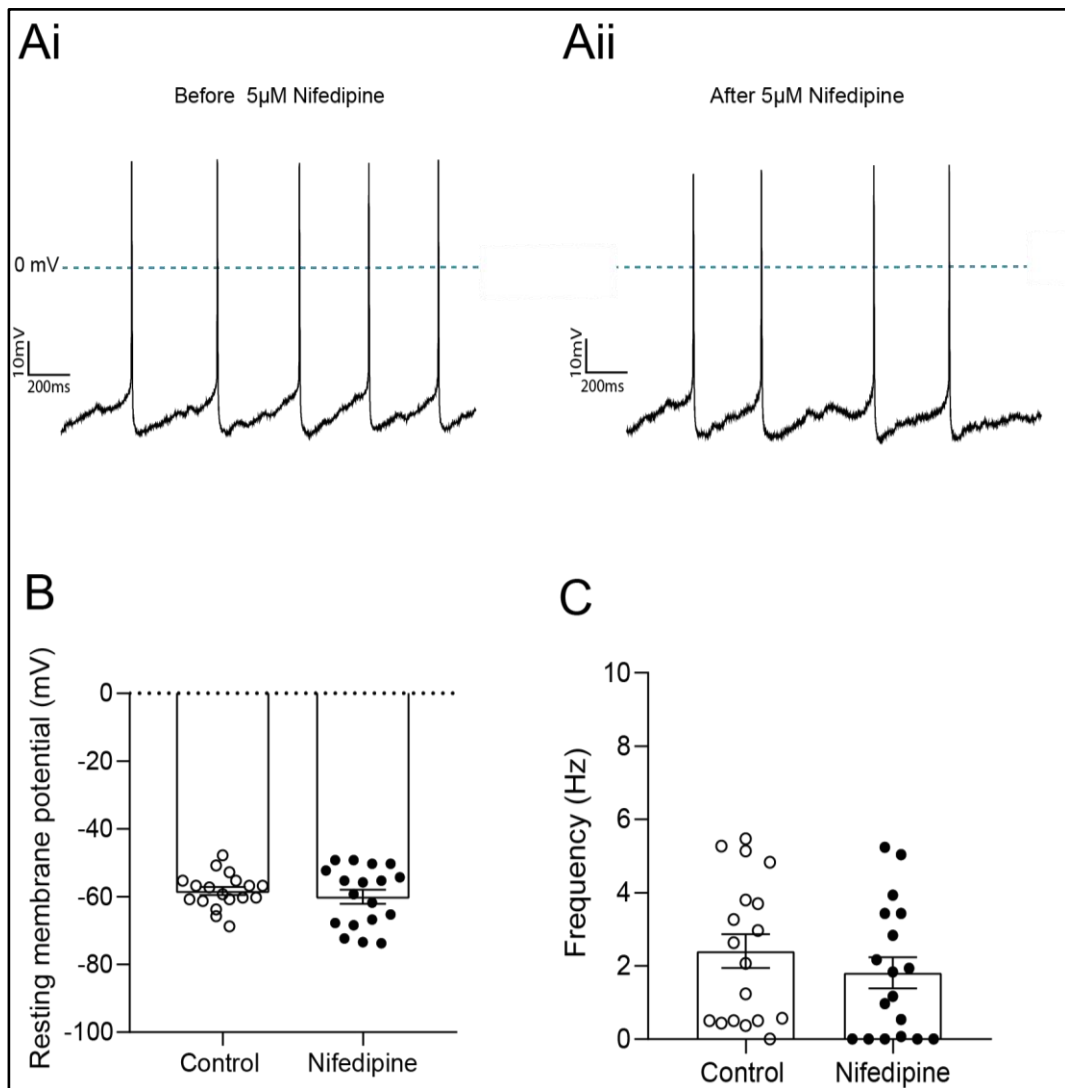
A análise da participação dos canais Cav do tipo L sensíveis à nifedipina no controle da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV foi feita, como descrito na seção 4.4, antes e após a superfusão de nifedipina (Figura 11, painéis Ai e Aii). Analisamos a amplitude e a largura do potencial de ação e também a amplitude da HPP. Nossos dados demonstram que não houve alterações significativas na amplitude do potencial de ação (antes:  $70.68 \pm 1.92$ ; após nifedipina:  $65.54 \pm 2.62$  mV;  $p=0.05$ ; Figura 11, painel B), na largura do potencial de ação (antes:  $1.75 \pm 0.09$ ; após nifedipina:  $1.80 \pm 0.07$  ms;  $p=0.37$ ; Figura 11, painel C) e na amplitude da HPP (antes:  $31.62 \pm 1.47$ ; após nifedipina:  $32.52 \pm 1.62$  mV;  $p=0.53$ ; Figura 11, painel D). Portanto, a nifedipina reduz a excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos sem alterar os parâmetros da cinética do potencial de ação.



**Figura 11. Efeito da nifedipina na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** (A) Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato evocados por pulsos de correntes despolarizantes de 150 pA antes e após a superfusão de nifedipina (5  $\mu\text{M}$ ). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação (B), da largura do potencial de ação (C) e da amplitude da HPP (D) dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de nifedipina.  $n=15$  células de 8 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico t de *Student* em B, C e D.

#### **4.9. Contribuição dos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

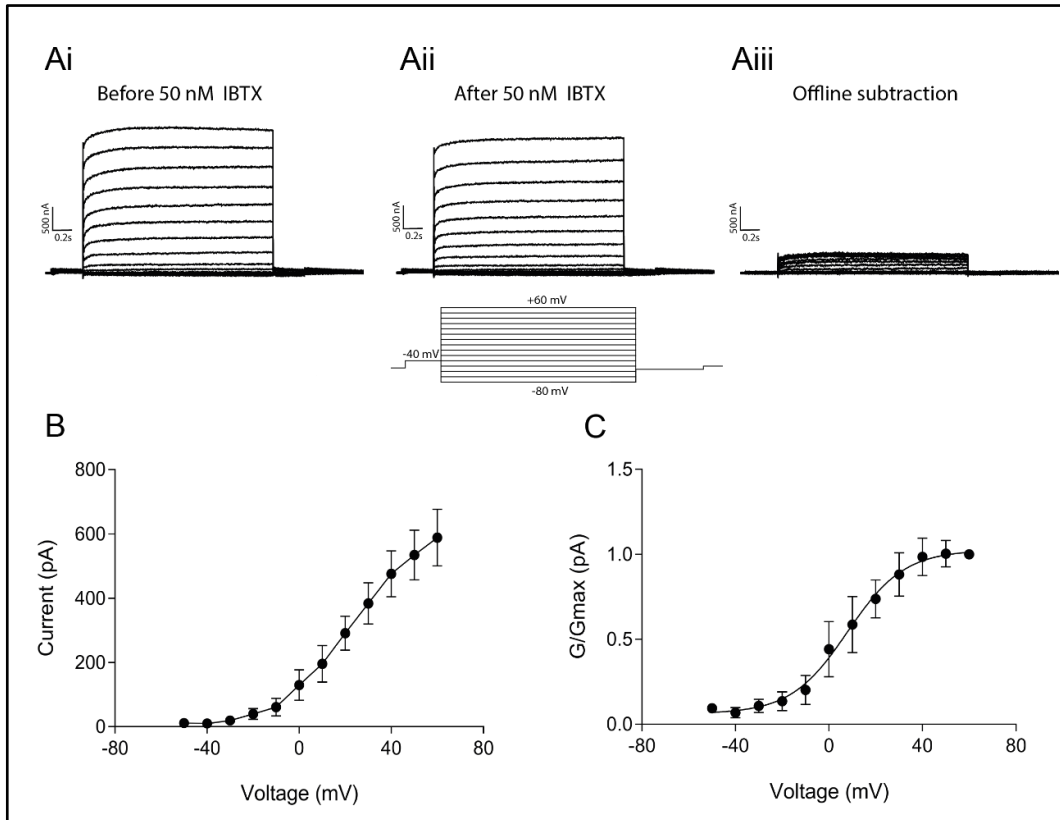
A avaliação da contribuição dos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência dos potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos foi feita como descrito na seção 4.5, antes e após a superfusão de nifedipina (Figura 12, painéis Ai e Aii). O potencial de membrana em repouso foi considerado o valor de voltagem o qual as células passaram a maior parte do tempo calculado por meio do histograma de amplitude. Nossos resultados demonstram que o potencial de membrana em repouso não foi alterado após a nifedipina e apresentam uma voltagem de  $-58.34 \pm 1.21$  mV antes e  $-60.03 \pm 2.06$  mV após nifedipina ( $p=0.46$ ; Figura 12, painel B). Já em relação a frequência de potenciais de ação, na figura 12 painel C é possível observar que não houve alteração significativa da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV após a nifedipina ( $2.40 \pm 0.46$  Hz antes;  $1.80 \pm 0.42$  Hz após nifedipina;  $p=0.06$ ; Figura 12, painel C). Portanto, os canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina não participam do controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 12. Efeito da nifedipina no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato, antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de nifedipina (5  $\mu$ M). (**B**) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão de nifedipina. (**C**) Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs antes e após a superfusão de nifedipina. n=18 células de 8 ratos. Utilizamos o teste o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em C.

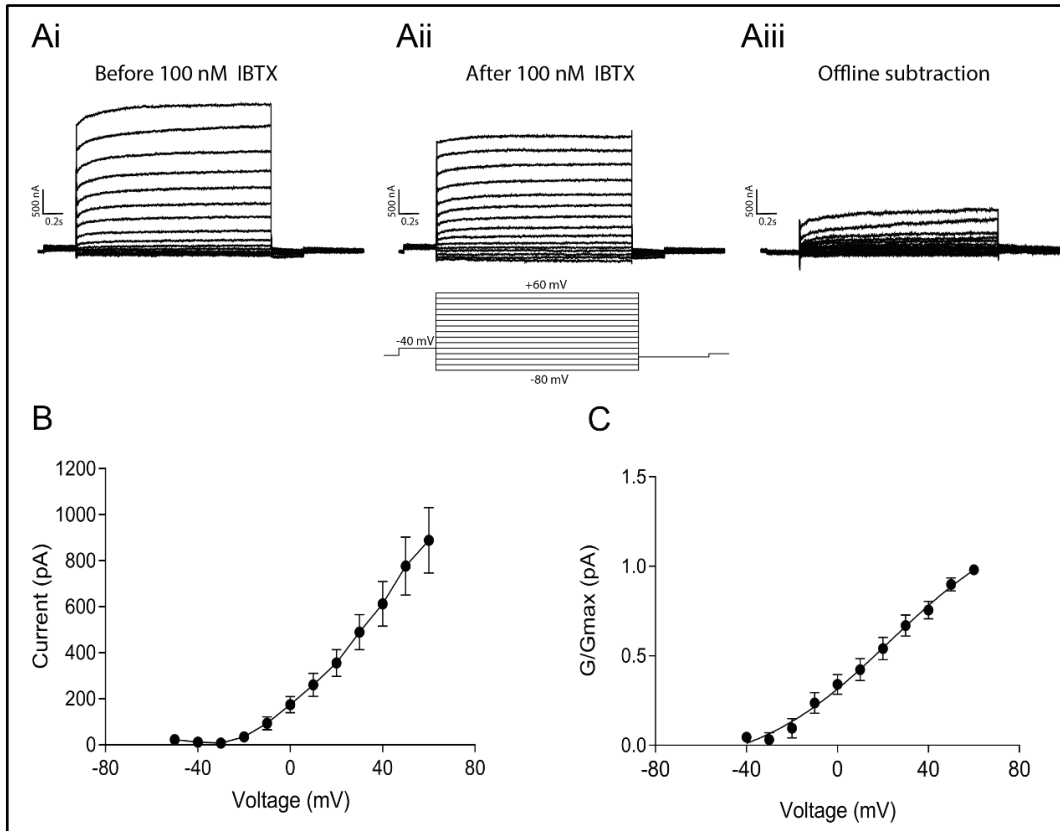
#### 4.10. Correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK nos MNPRs do DMV de ratos.

Para analisar as correntes de saída de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX, utilizamos o mesmo protocolo descrito na seção 4.3 antes e após a superfusão de IBTX. Utilizamos a IBTX em duas concentrações diferentes (50 nM e 100 nM; Figuras 13 e 14, painel Aii). Após a subtração *offline*, tanto a concentração de 50 nM (Figura 13, painel Aiii) quanto de 100 nM (Figura 14, painel Aiii) de IBTX foram capazes de reduzir a corrente de saída de K<sup>+</sup>. É possível observar que na concentração de 50 nM de IBTX a corrente de saída de K<sup>+</sup> se torna proeminente a partir da voltagem de aproximadamente -40 mV, tendo seu pico máximo em 60 mV ( $588.6 \pm 63.05$  pA; Figura 13, painel B). A corrente de K<sup>+</sup> é caracterizada por uma lenta ativação e os seus valores de V<sub>50</sub> foram de  $7.92 \pm 4.17$  mV (Figura 13, painel C) e *slope*  $12.13 \pm 4.05$  (Figura 13, painel C). Na concentração de 100 nM de IBTX, a corrente de K<sup>+</sup> também se torna proeminente a partir da voltagem de -40 mV, com pico máximo em 60 mV ( $888.1 \pm 90.67$  pA; Figura 14, painel B). Além disso, seus valores de V<sub>50</sub> foram de  $21.26 \pm 6.11$  mV (Figura 4, painel C) e *slope*  $16.35 \pm 5.18$  (Figura 14, painel C). Esses dados demonstram que as correntes K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX (50 nM e 100 nM) estão presentes nos MNPRs do DMV de ratos. Todavia, a fim de minimizar a resposta inespecífica da IBTX, e fundamentado na resposta do bloqueio farmacológico frente as correntes analisadas, escolhemos para todos os experimentos seguintes a concentração de 50 nM de IBTX.



**Figura 13. Correntes de saída de K<sup>+</sup> mediadas por canais BK sensíveis a IBTX na concentração de 50 nM nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de saída de K<sup>+</sup> de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de IBTX (50 nM). Note as correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX obtidas pela subtração *off-line* (**Aiii**). (**B**) Amplitudes médias dos picos das correntes de K<sup>+</sup>, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados, mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX. (**C**) Valores da condutância normalizada dos canais BK sensíveis a IBTX, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados. A linha sólida representa o ajuste da função de *Boltzmann* aos dados obtidos. n=12 células de 6 ratos.

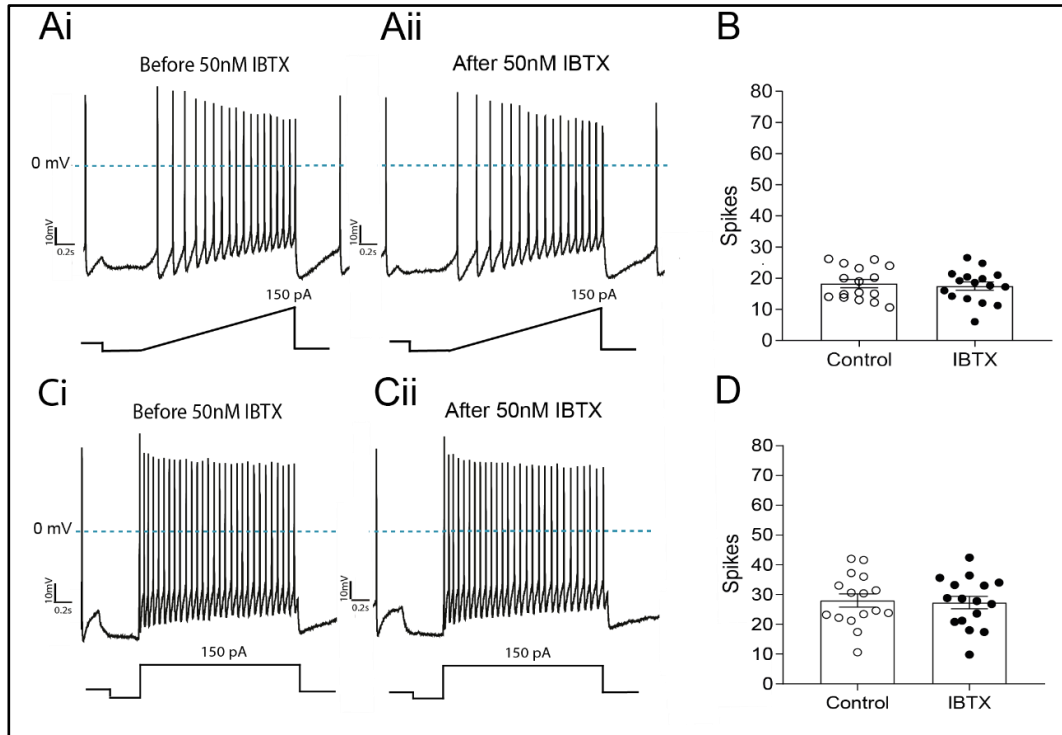




**Figura 14. Correntes de saída de  $K^+$  mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX na concentração de 100 nM nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das correntes de saída de  $K^+$  de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (Ai) e após (Aii) a superfusão de IBTX (100 nM). Note as correntes de  $K^+$  mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX obtidas pela subtração *off-line* (Aiii). (B) Amplitudes médias dos picos das correntes de  $K^+$ , plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados, mediadas pelos canais BK sensíveis a IBTX. (C) Valores da condutância normalizada dos canais BK sensíveis a IBTX, plotadas em relação aos pulsos de voltagem aplicados. A linha sólida representa o ajuste da função de *Boltzmann* aos dados obtidos. n=15 células de 11 ratos.

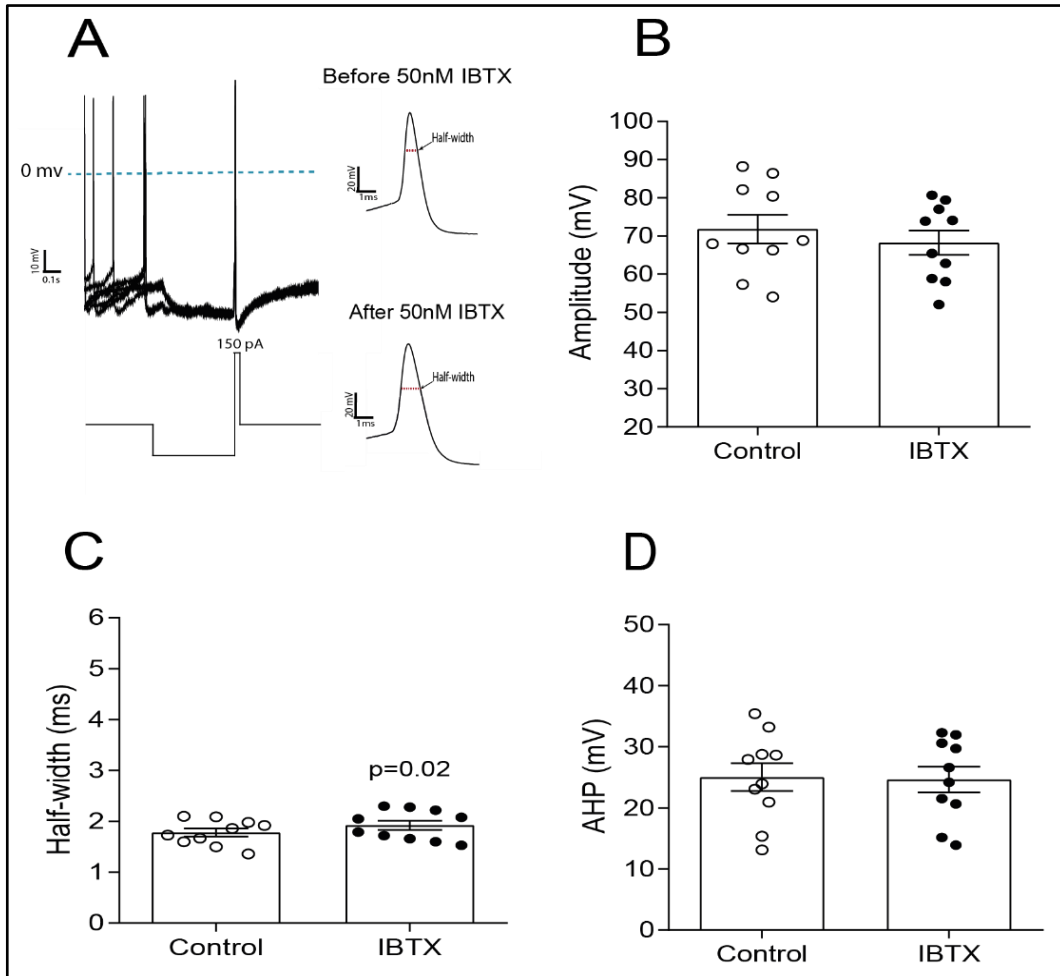
#### **4.11. Contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

Com o objetivo de analisar a contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX (50 nM) no controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos, foram realizados dois protocolos experimentais distintos, como descrito na seção 4.4, antes e após a superfusão de IBTX (Figura 15, painéis Ai, Aii, Ci e Cii). Na Figura 15 painel B é possível observar nos dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de rampa de corrente despolarizante que não houve alterações significativas após a superfusão de IBTX. Os valores de excitabilidade foram de  $18.26 \pm 1.3$  antes e  $17.46 \pm 1.31$  potenciais de ação após a superfusão de IBTX ( $p=0.27$ ). Já no painel D, Figura 15, observamos nos dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de pulso quadrado de corrente despolarizante que não houve alterações significativas após a superfusão de IBTX. Os valores de excitabilidade foram de  $28.04 \pm 2.18$  antes e  $27.34 \pm 2.12$  potenciais de ação após IBTX ( $p=0.9$ ). Desta forma, podemos concluir que os canais BK sensíveis a IBTX não participam do controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 15. Efeitos da IBTX na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante de 150 pA, durante 2 segundos, antes (Ai) e após (Aii) a superfusão de IBTX (50 nM). (B) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta a rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão de IBTX. Traçados representativos de um MNPR em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante de 150 pA, durante 2 segundos, antes (Ci) e após (Cii) a superfusão de IBTX. (D) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta ao pulso de corrente despolarizante antes e após a superfusão de IBTX. n=16 células de 7 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico t de Student em B e D.

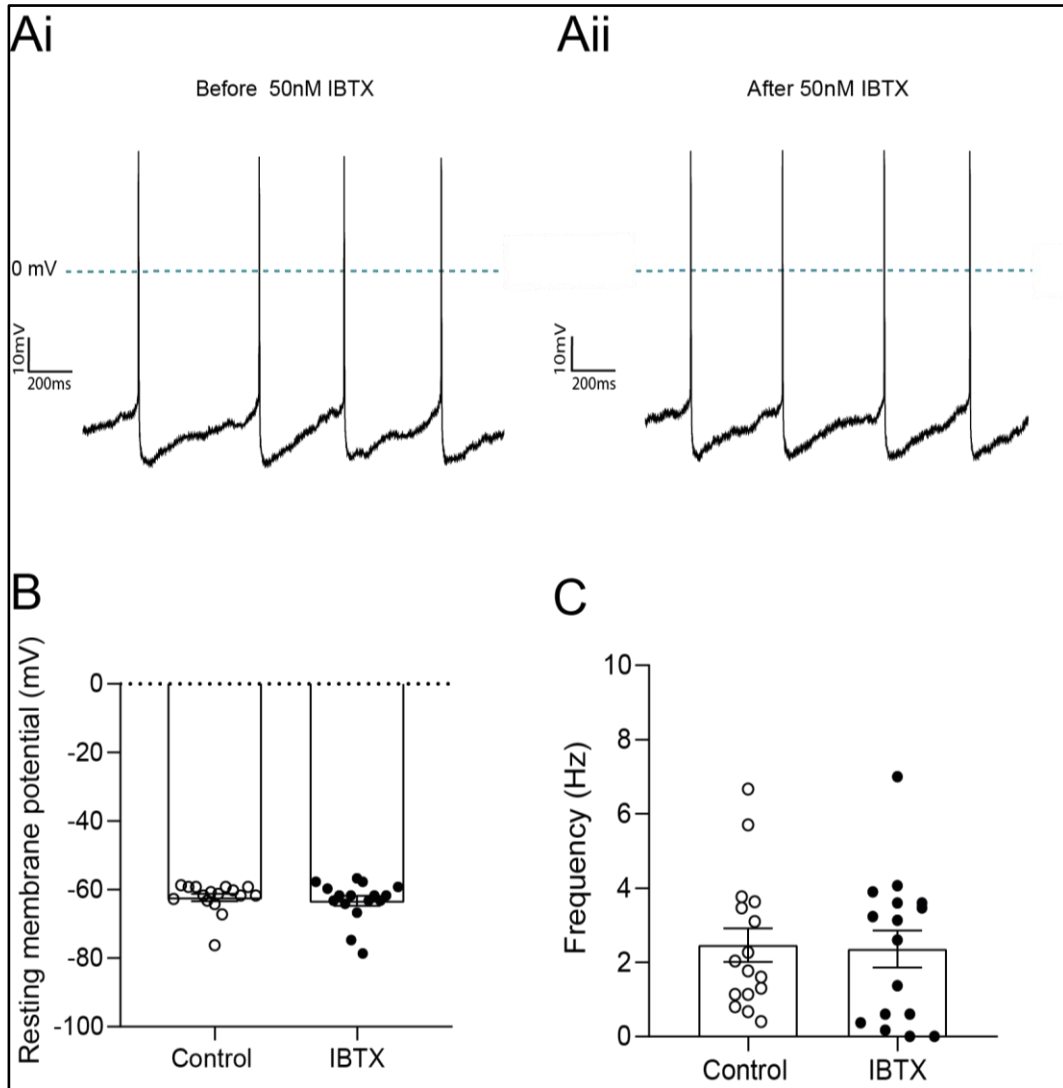
A análise da participação dos canais BK sensíveis a IBTX no controle da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV foi feita, como descrito na seção 4.4, antes e após a superfusão de IBTX (Figura 16, painel A). Analisamos a amplitude e largura do potencial de ação, bem como a amplitude da HPP. Nossos resultados demonstram um aumento significativo da largura do potencial de ação após a superfusão de IBTX (antes:  $1.78 \pm 0.07$ ; após IBTX:  $1.92 \pm 0.09$  ms;  $p=0.02$ , Figura 16, painel C). Por outro lado, não houve alterações significativas na amplitude do potencial de ação (antes:  $71.81 \pm 3.75$ ; após IBTX:  $68.21 \pm 3.18$  mV;  $p=0.05$ ; Figura 6, painel B), bem como na amplitude da HPP (antes:  $25.03 \pm 2.27$ ; após IBTX:  $24.66 \pm 2.12$  mV;  $p=0.63$ ; Figura 16, painel D). Os canais BK sensíveis a IBTX participam do controle da cinética do potencial de ação, determinando a largura do potencial de ação, dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 16. Efeito da IBTX na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** (A) Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato evocados por pulsos de correntes despolarizantes de 150 pA antes e após a superfusão de IBTX (50 nM). Dados agrupados da amplitude do potencial de ação (B), da largura do potencial de ação (C) e da amplitude da HPP (D) dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de IBTX. n=10 células de 6 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico t de Student em B, C e D.

#### **4.12. Contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

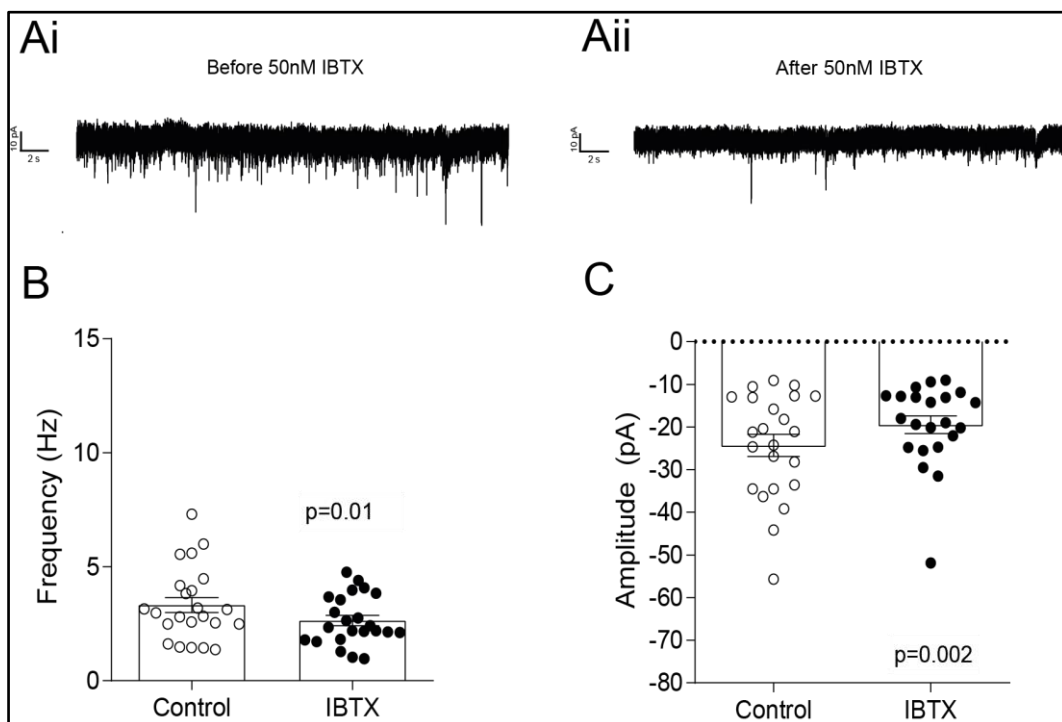
A avaliação da contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos foi feita como descrito na seção 4.5, antes e após a superfusão de IBTX (Figura 17, painéis Ai e Aii). O potencial de membrana em repouso foi considerado o valor de voltagem no qual as células passaram a maior parte do tempo calculado por meio do histograma de amplitude. Nossos resultados demonstram que o potencial de membrana em repouso não foi alterado após a superfusão de IBTX e apresentam uma voltagem de  $-62.31 \pm 1.08$  mV antes e  $-63.26 \pm 1.47$  mV após IBTX ( $p=0.43$ ; Figura 17, painel B). Já em relação a frequência de potenciais de ação, na figura 17 painel D é possível observar que não houve alterações significativa da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV após a IBTX ( $2.46 \pm 0.45$  Hz antes;  $2.35 \pm 0.49$  Hz após IBTX;  $p=0.70$ ; Figura 17, painel D). Portanto, os canais BK sensíveis a IBTX não participam do controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 17. Efeito da IBTX no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de IBTX (50 nM). (**B**) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão de IBTX. (**C**) Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV antes e após a superfusão de IBTX. n=18 células de 8 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em B e o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em C.

#### 4.13. Contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

A fim de compreender a contribuição dos canais BK sensíveis a IBTX no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos, registramos as sEPSCs, na configuração *voltage clamp* (-70 mV), antes e após a superfusão de IBTX (Figura 18, painéis Ai e Aii). Analisamos a amplitude e a frequência das sEPSCs. Nossos resultados demonstram que após a superfusão de IBTX houve uma redução significativa da frequência das sEPSCs (antes:  $3.32 \pm 0.33$  Hz; após IBTX:  $2.64 \pm 0.22$  Hz;  $p=0.018$ , Figura 18, painel B). Além disso, uma redução significativa da amplitude das sEPSCs foi observada (antes:  $-24.33 \pm 2.57$  pA; após IBTX:  $-19.37 \pm 1.97$  pA;  $p=0.002$ , Figura 18, painel C). Portanto, os canais BK sensíveis à IBTX participam da modulação da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

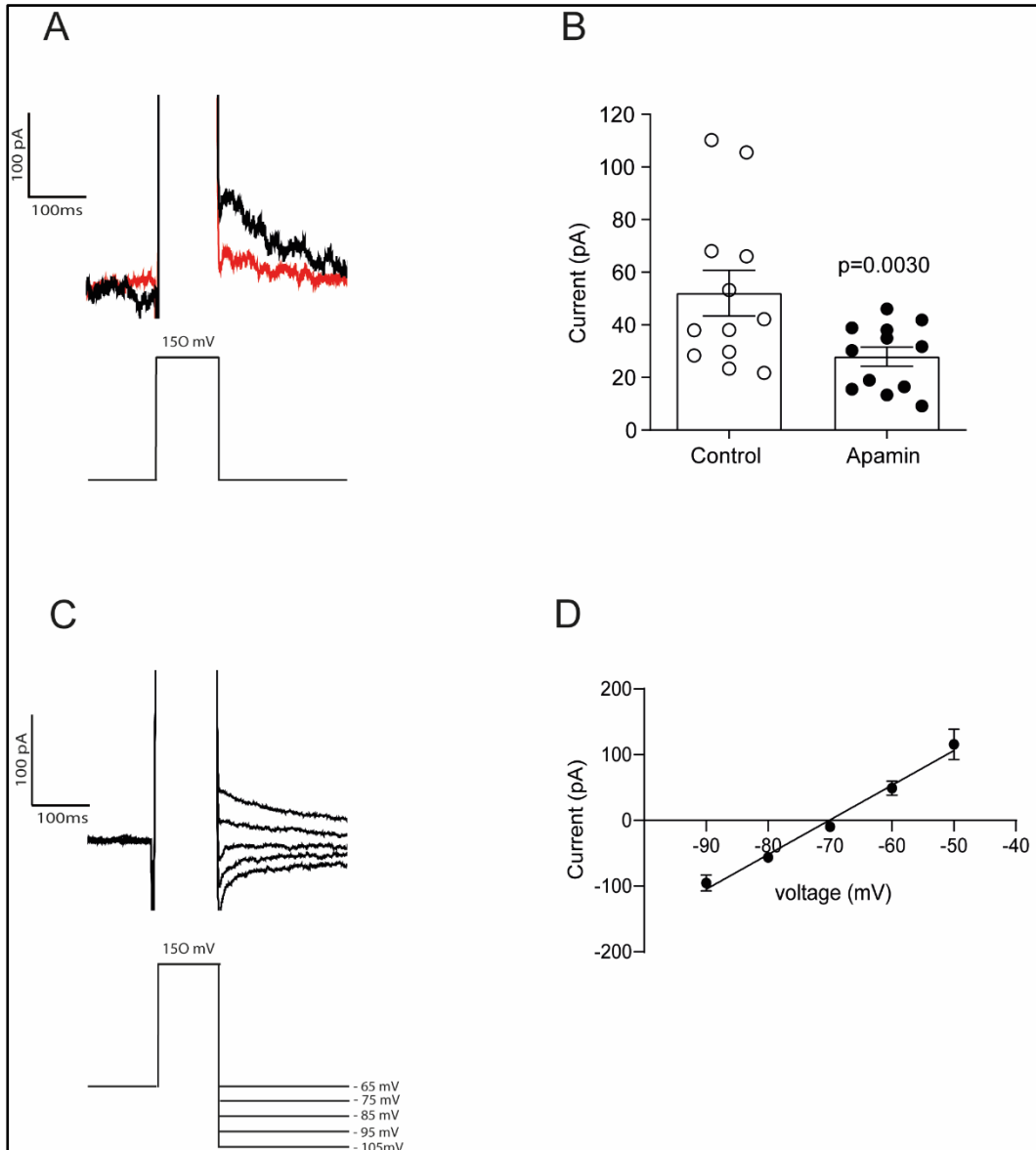


**Figura 18. Efeito da IBTX na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das sEPSCs de um MNPR do DMV de rato antes (Ai) e após (Aii) a superfusão de IBTX (50 nM). Dados agrupados da frequência (B) e da amplitude (C) das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de IBTX.  $n=23$  células de 11 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico t de *Student* em C e D.



#### 4.14. Correntes de K<sup>+</sup> mediadas por canais SK nos MNPRs do DMV de ratos.

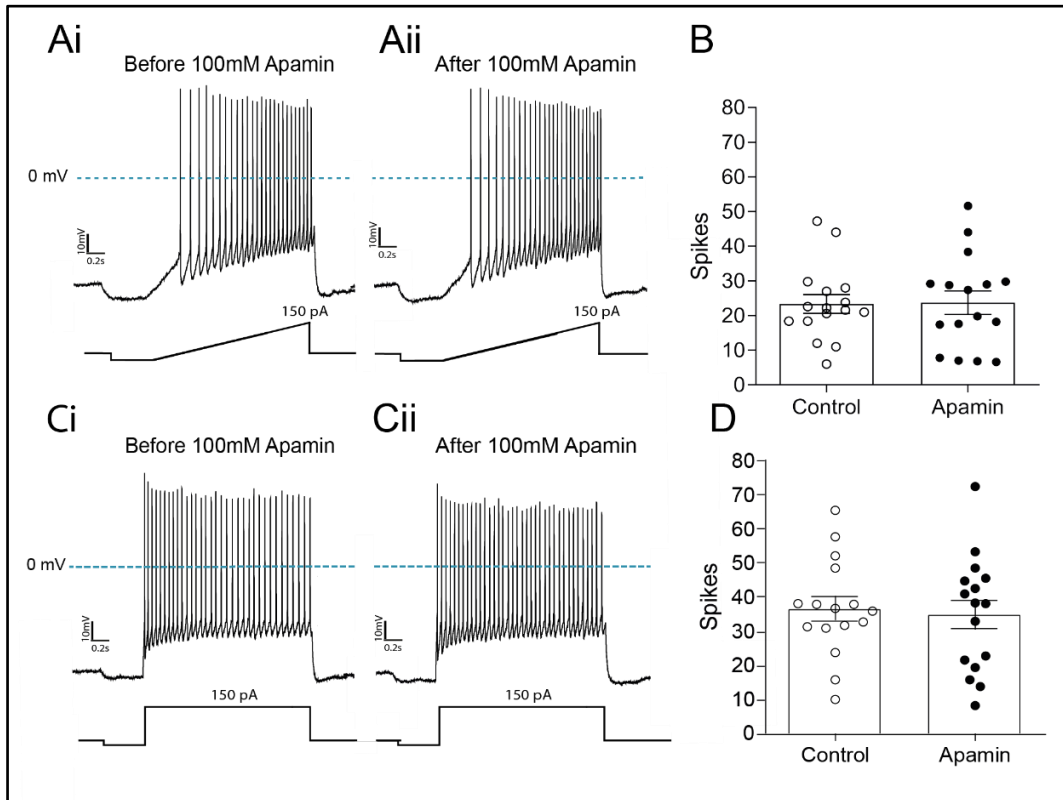
As correntes de K<sup>+</sup> mediadas por canais SK foram registradas, no modo *voltage clamp*, nos MNPRs do DMV com pulsos de voltagem despolarizantes de - 60 a 10 mV com duração de 0.1 segundo (Figura 19, painel A). A superfusão de apamina (100 mM) foi capaz de reduzir significativamente a corrente de saída de K<sup>+</sup> nos MNPRs do DMV de ratos (antes:  $52.01 \pm 8.70$  pA; apamina:  $27.93 \pm 3.63$  pA;  $p=0.003$ , Figura 19, painel B). Já para a análise do potencial de reversão, pulsos de voltagem despolarizantes de - 60 a 10 mV, também com duração de 0.1 segundo, seguidos por pulsos de voltagens de - 105 até - 65 mV, em intervalos de 10 mV e duração de 3 segundos, foram aplicados para medir o valor de voltagem o qual a corrente é nula, e compararmos com o potencial de equilíbrio do K<sup>+</sup> calculado pela equação de *Nerst* (ver métodos) (Figura 19, painel C). A relação corrente por voltagem demonstrou que o potencial de reversão da corrente registrada nos MNPRs do DMV foi de  $- 82.2 \pm 0.24$  mV (Figura 19, painel D). Tendo em vista que os valores do potencial de reversão se aproximam do potencial de equilíbrio do K<sup>+</sup> calculado ( $- 91.62$  mV), é possível inferir que a corrente registrada é de K<sup>+</sup>. Esses dados demonstram que as correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais SK sensíveis a apamina estão presentes nos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 19. Correntes de saída de  $K^+$  mediadas pelos canais SK sensíveis a apamina nos MNPRs do DMV de ratos. (A)** Traçados representativos das correntes de saída de  $K^+$  de um MNPR do DMV de rato, registradas na configuração *voltage clamp*, antes (preto) e após (vermelho) a superfusão de apamina (100 mM). **(B)** Dados agrupados da corrente de saída de  $K^+$  nos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de apamina. **(C)** Traçados representativos das correntes de  $K^+$  obtidas pelo protocolo para obtenção do potencial de reversão das correntes mediadas pelos canais SK nos MNPRs do DMV de ratos. **(D)** Dados agrupados das correntes de  $K^+$  mediadas por canais SK medidas no protocolo para análise do potencial de reversão (quando a corrente foi zero) nos MNPRs do DMV de ratos.  $n=12$  de 9 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de Student em B.

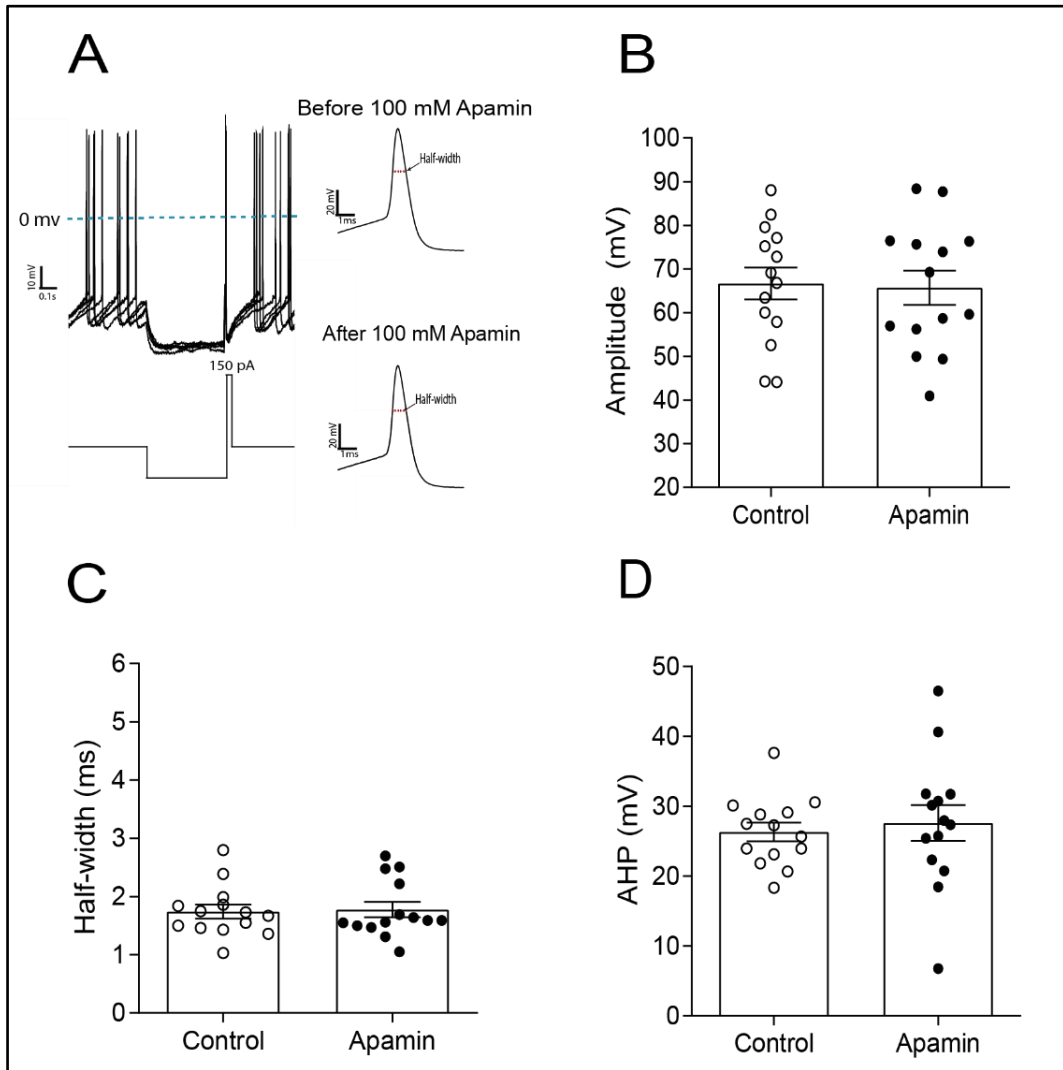
#### **4.15. Participação dos canais SK sensíveis a apamina no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

Com o objetivo de analisar a contribuição dos canais SK no controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos, foram realizados dois protocolos experimentais distintos, como descrito na seção 4.4, antes e após a superfusão de apamina (Figura 20, painéis Ai, Aii, Ci e Cii). Na Figura 20, painel B, é possível observar os dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de rampa despolarizante. Os valores de excitabilidade foram de  $23.35 \pm 2.67$  antes e  $23.71 \pm 3.40$  potenciais de ação após apamina ( $p=0.79$ ). Já no painel D da Figura 20, observamos os dados agrupados do número de potenciais de ação evocados no protocolo de pulso quadrado de corrente despolarizante. Os valores de excitabilidade foram de  $36.74 \pm 3.58$  antes e  $34.99 \pm 4.27$  potenciais de ação após apamina ( $p=0.53$ ). Sendo assim, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número de potenciais de ação evocados em ambos os protocolos, o que demonstra que os canais SK sensíveis a apamina não participam do controle da excitabilidade nos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 20. Efeito da apamina na excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos de um MNPR do DMV de rato em resposta a um protocolo de rampa de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de apamina (100 mM). (**B**) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta à rampa de corrente despolarizante antes e após a superfusão de apamina. Traçados representativos de um MNPR em resposta à aplicação de um protocolo de pulso de corrente despolarizante de 150 pA durante 2 segundos antes (**Ci**) e após (**Cii**) a superfusão de apamina. (**D**) Dados agrupados do número de potenciais de ação evocados em resposta ao pulso de corrente despolarizante antes e após a superfusão de apamina. n=16 células de 9 ratos em ambos os protocolos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e D.

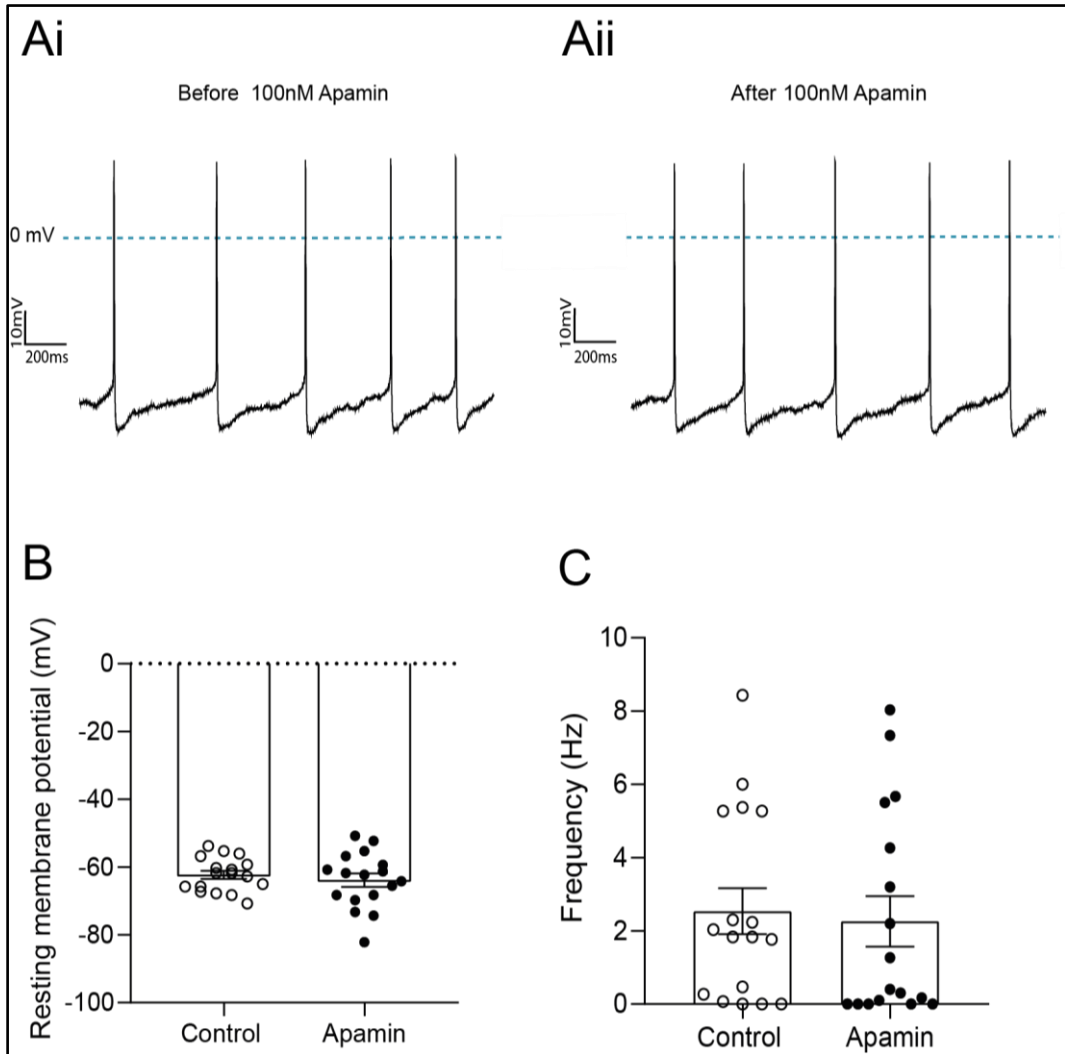
A análise da participação dos canais SK sensíveis a apamina no controle da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV foi feita, como descrito na seção 4.4, antes e após a superfusão de apamina (Figura 21, painel A). Analisamos a amplitude e largura do potencial de ação, assim como a amplitude da HPP. Não houve alterações significativas na largura do potencial de ação (antes:  $1.74 \pm 0.11$  ms; após apamina:  $1.77 \pm 0.13$  ms;  $p=0.33$ ; Figura 21, painel C), na amplitude do potencial de ação (antes:  $66.68 \pm 3.66$  mV; após apamina:  $65.69 \pm 3.91$  mV;  $p=0.42$ ; Figura 21, painel D) e na amplitude da HPP (antes:  $26.31 \pm 1.31$  mV; após apamina:  $27.58 \pm 2.54$  mV;  $p=0.55$ ; Figura 21, painel E) após superfusão de apamina. Sendo assim, os canais SK sensíveis a apamina não contribuem para a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos



**Figura 21. Efeito da apamina na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. (A)** Traçados representativos de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato evocados por pulsos de corrente despolarizante de 150 pA antes e após a superfusão de apamina (100 mM). **Dados agrupados da amplitude do potencial de ação (B), da largura do potencial de ação (C) e da amplitude da HPP (D) dos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de apamina. n=14 células de 9 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de Student em B, C e D.**

#### **4.16. Contribuição dos canais SK sensíveis a apamina no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

A avaliação da contribuição dos canais SK sensíveis a apamina no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos foi feita como descrito na seção 4.5, antes e após a superfusão de apamina (Figura 22, painéis Ai e Aii). O potencial de membrana em repouso foi considerado o valor de voltagem no qual as células passaram a maior parte do tempo calculado por meio do histograma de amplitude. Nossos resultados demonstram que o potencial de membrana em repouso não foi alterado pela apamina e apresentam uma voltagem de  $-62.28 \pm 1.21$  mV antes e  $-63.88 \pm 1.99$  mV após apamina ( $p=0.26$ ; Figura 22, painel B). Já em relação a frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos, na Figura 22 painel D é possível observar a ausência de alterações da frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV após a superfusão de apamina ( $2.53 \pm 0.62$  Hz antes;  $2.26 \pm 0.68$  Hz após apamina;  $p=0.29$ ; Figura 22, painel D). Portanto, os canais SK sensíveis a apamina não participam do controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos.

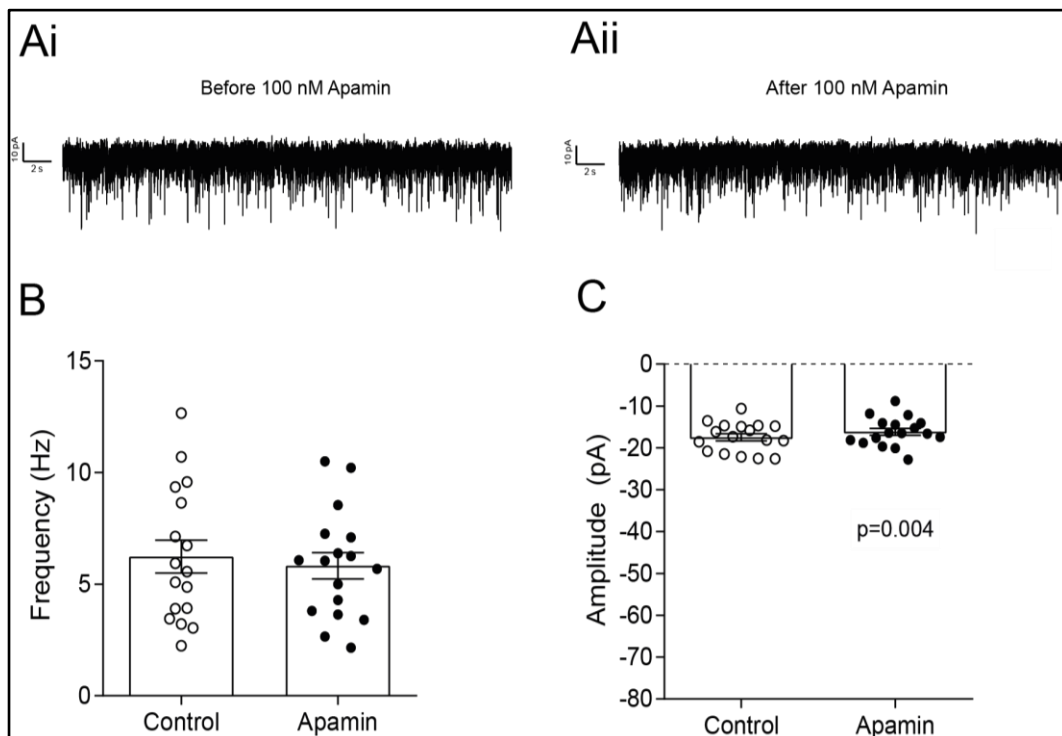


**Figura 22. Efeito da apamina no potencial de membrana em repouso e na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um MNPR do DMV de rato antes (**Ai**) e após (**Aii**) a superfusão de apamina (100 mM). (**B**) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos MNPRs antes e após a superfusão de apamina. (**C**) Dados agrupados da frequência de potenciais de ação dos MNPRs antes e após a superfusão de apamina. n=17 células de 7 ratos. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student* em B e o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon* em C.



#### 4.17. Contribuição dos canais SK sensíveis a apamina no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

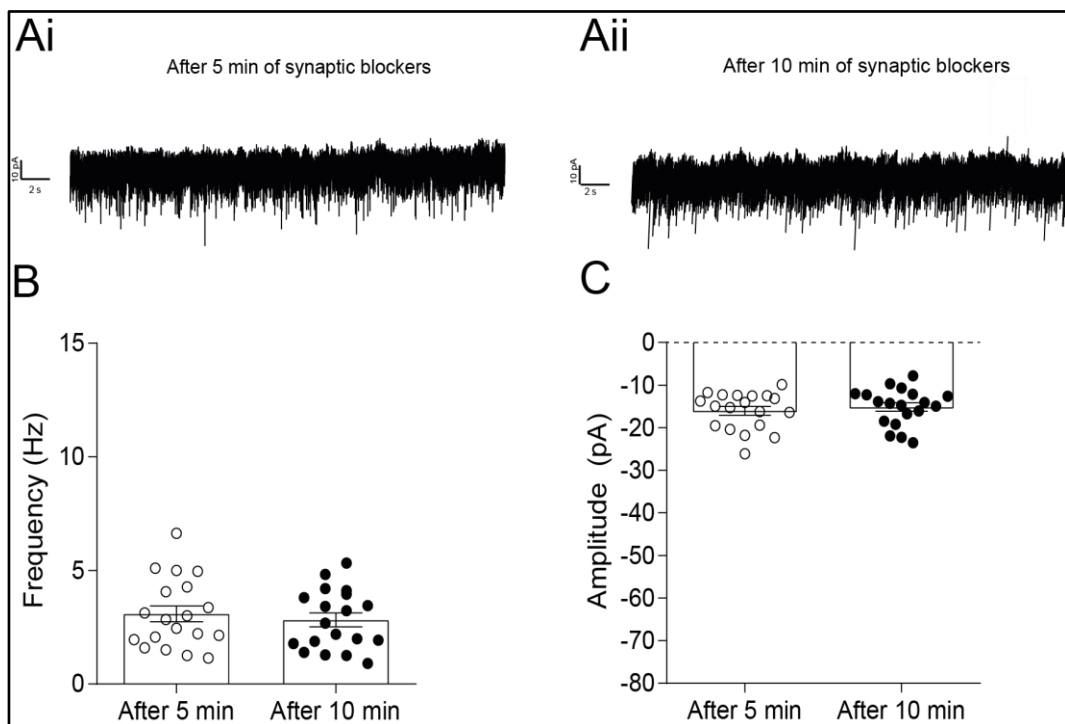
A fim de compreender a contribuição dos canais SK sensíveis a apamina no controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos, registramos as sEPSCs, na configuração *voltage clamp* (-70 mV), antes e após a superfusão de apamina (Figura 23, painel Ai, Aii). Analisamos a amplitude e a frequência das sEPSCs. Nossos resultados demonstram que após a superfusão de apamina não houve alterações significativas na frequência das sEPSCs (antes:  $6.23 \pm 0.73$  Hz; após apamina:  $5.82 \pm 0.58$  Hz;  $p=0.3$ , Figura 23, painel C), porém uma redução significativa da amplitude das sEPSC foi observada (antes:  $17.47 \pm 0.85$  pA; após apamina:  $16.16 \pm 0.83$  pA;  $p=0.004$ , Figura 23, painel D). Portanto, os canais SK sensíveis à apamina participam do controle da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.



**Figura 23. Efeito da apamina na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das sEPSCs de um MNPRs do DMV de rato antes (Ai) e após (Aii) a superfusão de apamina (100 nM). Dados agrupados da frequência (B) e da amplitude (C) das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos antes e após a superfusão de apamina.  $n=17$  células de 7 ratos para ambas as análises. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de Student em C e D.

#### 4.18. Efeito do tempo na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

A fim de corroborarmos os efeitos da IBTX e da apamina na transmissão sináptica excitatória, registramos as sEPSCs em um intervalo de tempo similar aos dos protocolos das seções 4.13 e 4.17 somente em condições basais, ou seja, apenas na presença dos bloqueadores da transmissão sináptica inibitória (Figura 24, painéis Ai e Aii). Analisamos a amplitude e a frequência das sEPSCs. Nossos resultados demonstram que não houve alterações significativas na frequência (antes:  $3.08 \pm 0.35$  Hz; após:  $2.81 \pm 0.30$  Hz;  $p=0.16$ , Figura 24, painel C) e na amplitude (antes:  $16.04 \pm 1.00$  pA; após:  $15.12 \pm 0.99$  pA;  $p=0.07$ , Figura 24, painel D) das sEPSCs 10 minutos após o início da superfusão dos bloqueadores da transmissão sináptica inibitória.



**Figura 24. Efeito do tempo na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.** Traçados representativos das sEPSCs de um MNPR do DMV de rato após 5 (Ai) e 10 minutos (Aii) da superfusão com os bloqueadores da transmissão sináptica inibitória. Dados agrupados da frequência (B) e da amplitude (C) das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos após 5 e 10 minutos da superfusão com os bloqueadores da transmissão sináptica inibitória.  $n=19$  células de 8 ratos para ambas as análises. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de Student em C e D.

***DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Os MNPRs do DMV se projetam para as vias aéreas inferiores e podem contribuir para o controle do tônus da musculatura lisa brônquica, secreção de muco e conseqüentemente para o controle do fluxo de ar (MAZZONE; CANNING, 2013). Sabemos que os canais Kv, Cav,  $KCa^{2+}$  participam do controle da cinética do potencial de ação, da excitabilidade neuronal e da transmissão sináptica, além de serem amplamente distribuídos nos diversos neurônios do SNC, inclusive nos motoneurônios do DMV (COOPER *et al.*, 2015; DALLAS *et al.*, 2008; DE VRIND *et al.*, 2016; FABER; DELANEY; SAH, 2005; FABER; SAH, 2003; HU *et al.*, 2001; LASSER-KATZ *et al.*, 2017; PEDARZANI *et al.*, 2000; SAH, 1995; SAH; MCLACHLAN, 1991; 1992). Portanto, nós acreditamos que esses canais possam contribuir para a geração da broncoconstrição e/ou secreção de muco por meio do controle da excitabilidade, cinética do potencial de ação e transmissão sináptica nos MNPRs do DMV. Desta forma, é de suma importância descrever as características eletrofisiológicas dos MNPRs do DMV e a contribuição dos canais Kv, Cav e  $KCa^{2+}$  no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

Os resultados obtidos nesse estudo contribuem para melhorar a compreensão das características eletrofisiológicas dos MNPRs do DMV, enfatizando a participação dos canais Kv, Cav do tipo L, BK e SK, e trazem novas perspectivas para a implicação dos MNPRs do DMV no controle da atividade parassimpática para as vias áreas inferiores, que ainda é pouco compreendida. A redução das correntes de  $K^+$  após a superfusão do TEA, da IBTX e da apamina, bem como a redução das correntes de  $Ca^{2+}$  após a superfusão do  $CdCl_2$  e da nifedipina, indicam que os canais Kv, BK, SK e Cav do tipo L, estão fundamentalmente presentes nos MNPRs do DMV. Observamos que a cinética do potencial de ação é modulada pelos canais Kv e BK, visto que a superfusão do TEA e da IBTX aumentaram a largura do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. Em relação a frequência de potenciais de ação espontâneos, nossos dados demonstram que, apenas os canais Kv entre os canais estudados contribuem para esse fenômeno. O potencial de membrana em repouso não é controlado por nenhum dos canais aqui estudados presentes nos MNPRs do DMV. Em contrapartida, os canais Kv e Cav do tipo L regulam a excitabilidade neuronal dos MNPRs do DMV. Por fim, analisamos a transmissão sináptica excitatória e observamos que os canais BK e SK participam de forma distinta no controle das sEPSCs nos MNPRs: enquanto

o bloqueio dos canais BK reduziu a frequência e a amplitude das sEPSCs, o bloqueio dos canais SK reduziu apenas a amplitude das sEPSCs. Coletivamente, esses dados demonstram claramente que os diversos canais aqui estudados desempenham papéis importantes na regulação da cinética do potencial de ação, da excitabilidade e também da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

### **5.1. Propriedades passivas e o fenótipo motor dos MNPRs do DMV de ratos.**

A contribuição dos MNPRs do DMV para a resposta broncoconstritora e secreção de muco tem sido associada a estudos anatômicos e poucos experimentos funcionais. A estimulação química do DMV em cães não afetou a resistência intrapulmonar (HASELTON *et al.*, 1992), sugerindo que os motoneurônios pré-ganglionares parassimpáticos do DMV não são importantes para regular a resistência das vias aéreas inferiores. No entanto, as funções dos MNPRs do DMV ainda não são claras. Utilizando marcação retrógrada, demonstramos que os MNPRs do DMV se projetam para as vias aéreas inferiores, corroborando com trabalhos anteriores em diferentes espécies, como ratos, cães e gatos (HADZIEFENDIC; HAXHIU, 1999; HASELTON *et al.*, 1992; KALIA; MESULAM, 1980).

Adicionalmente, verificamos que os MNPRs do DMV de ratos apresentam valores de capacitância, que é uma característica eletrofisiológica passiva, semelhantes aqueles reportados por outros estudos avaliando uma população heterogênea de motoneurônios do DMV de ratos (PEDARZANI *et al.*, 2000). Utilizando a técnica de imunofluorescência demonstramos que os MNPRs são imunorreativos para ChaT, isto é, apresentam fenótipo motor, o que corrobora com a literatura de que os motoneurônios do DMV são colinérgicos (GOLDBERG *et al.*, 2012). Por fim, demonstramos que o potencial de membrana em repouso é semelhante aos valores reportados previamente em nosso laboratório (SOUZA, 2020). Portanto, os MNPRs de ratos possuem características eletrofisiológicas e fenótipo que vão de acordo com o esperado para motoneurônios do DMV. Na sequência, estudamos a contribuição dos canais Kv no controle da cinética do potencial de ação, excitabilidade, potencial de membrana em repouso e frequência de potenciais de ação dos MNPRs de ratos.

## **5.2. Contribuição dos canais Kv no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

Sabe-se que os canais Kv desempenham um papel fundamental no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação de diferentes neurônios (DALLAS *et al.*, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que os canais Kv são expressos nos motoneurônios do DMV de ratos (COOPER; *et al.*, 2015; LASSER-KATZ *et al.*, 2017). Sendo assim, tendo em vista a contribuição fisiológica desses canais em diferentes neurônios, bem como a sua expressão nos motoneurônios do DMV, levantamos a hipótese de que os canais Kv controlam o potencial de membrana em repouso, a frequência de potenciais de ação, a excitabilidade e a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

Primeiramente, procuramos descrever as correntes de K<sup>+</sup> mediadas pelos canais Kv sensíveis ao TEA nos MNPRs do DMV de ratos. O TEA é um clássico e potente bloqueador dos canais para K<sup>+</sup>, sobretudo para os canais Kv3 (BEAN, 2007). Nossos resultados demonstram que a corrente de saída de K<sup>+</sup> dos MNPRS do DMV de ratos reduziu significativamente após superfusão com TEA, corroborando com estudos da literatura utilizando motoneurônios com projeções não identificadas do DMV (SAH; MCLACHLAN, 1992).

Os canais Kv desempenham um papel fundamental no controle da excitabilidade e da cinética do potencial de ação de diferentes neurônios, como supracitado anteriormente (DALLAS *et al.*, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 2012). Avaliamos então o efeito do bloqueio farmacológico dos canais Kv com TEA na cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. Sendo assim, observamos que o TEA gerou um aumento significativo da largura do potencial de ação, sem alterar a amplitude do potencial de ação e a HPP. Em motoneurônios do DMV de camundongos, a aplicação do TEA foi capaz de aumentar a duração do potencial de ação em aproximadamente 50% (GOLDBERG *et al.*, 2012). Estudos com motoneurônios do DMV utilizando a “*blood depressing substance*” (BDS), para bloquear as subunidades Kv3.4, demonstraram que esta substância também produziu um aumento da duração do potencial de ação (DALLAS *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos prévios demonstraram que a subunidade Kv3.4 é a única subunidade da subfamília Kv3 presente nos motoneurônios do DMV (BROOKE *et al.*, 2006; DALLAS *et al.*, 2005;

WEISER *et al.*, 1994). Sendo assim, acreditamos que os canais Kv, em especial os canais Kv3, estão envolvidos nas alterações observadas da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos após a superfusão do TEA.

Em seguida, observamos que a frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV reduziu após a superfusão do TEA. Cooper *et al.*, (2015) demonstraram que o TEA também foi capaz de reduzir a frequência de potenciais de ação espontâneos dos motoneurônios com projeções não identificadas do DMV. Em outros motoneurônios respiratórios, o TEA também foi capaz de reduzir a frequência de potenciais de ação espontâneos (DA SILVA *et al.*, 2019). Contudo, não observamos alterações significativas do potencial de membrana em repouso dos MNPRs após a superfusão do TEA. Isso demonstra que os canais Kv não controlam essa propriedade eletrofisiológica passiva dos MNPRs do DMV de ratos. Portanto, concluímos que os canais Kv participam do controle da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos, provavelmente por meio do controle da largura do potencial de ação, sem afetar o potencial de membrana em repouso dos mesmos.

### **5.3. Contribuição dos canais Cav do tipo L no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade e da cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.**

A fim de isolar as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  nos MNPRs do DMV de ratos, bloqueamos de maneira inespecífica os canais Cav. Nós observamos que o  $\text{CdCl}_2$  foi capaz de reduzir as correntes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nos MNPRs do DMV de ratos e que o pico da corrente macroscópica foi em torno de - 20 mV. Os motoneurônios do DMV de ratos expressam pelo menos 3 subtipos de canais Cav, sendo eles: canais Cav do tipo L, canais Cav do tipo N e canais Cav do tipo R (COOPER *et al.*, 2015). Esses canais apresentam propriedades biofísicas distintas, sendo que os canais Cav do tipo L apresentam o pico da corrente macroscópica em aproximadamente - 10 mV (LIPSCOMBE; HELTON; XU, 2004). Sendo assim, os nossos dados demonstram que as correntes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav sensíveis ao  $\text{CdCl}_2$  nos MNPRs é compatível com as correntes mediadas pelos canais Cav do tipo L.

Avaliamos então a presença dos canais Cav do tipo L nos MNPRs do DMV de ratos. Para tanto, utilizamos a nifedipina para isolar especificamente as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L. Nossos resultados demonstram que as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas pelos canais Cav do tipo L sensíveis a nifedipina apresentam o seu pico em torno de - 10 mV, o que também foi observado em outros neurônios do SNC (COOPER *et al.*, 2015; LIPSCOMBE; HELTON; XU, 2004; TRIGGLE, 2006). Sabe-se que os motoneurônios do DMV de ratos expressam diferentes subunidades dos canais Cav do tipo L, sendo eles: os Cav1.2 e Cav1.3 (COOPER *et al.*, 2015). Os canais Cav1.2 tem o pico de corrente macroscópica em aproximadamente 0 mV, enquanto os canais Cav1.3 tem o pico de corrente macroscópica em aproximadamente - 20 mV (HELTON; XU; LIPSCOMBE, 2005). De acordo com Cooper *et al.* (2015) os motoneurônios do DMV de ratos apresentam maior expressão dos canais Cav1.2. Portanto, é possível que este subtipo dos canais Cav do tipo L esteja mediando as correntes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  registradas nos MNPRs do DMV de ratos.

Após verificar que os canais Cav do tipo L estão presentes nos MNPRs do DMV de ratos, resolvemos testar a hipótese de que estes canais contribuem para o controle da cinética do potencial de ação, da frequência de potenciais de ação espontâneos, do potencial de membrana em repouso e da excitabilidade dos MNPRs. A superfusão de nifedipina não foi capaz de suscitar alterações significativas na largura, na amplitude do potencial de ação e da HPP dos MNPRs. Diferentemente dos nossos resultados, Goldberg *et al.* (2012) demonstraram que a superfusão de nifedipina reduziu significativamente a IHPP dos motoneurônios do DMV de ratos. Durante o potencial de ação ocorre o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular (SIMMS; ZAMPONI, 2014). Em diferentes neurônios do SNC, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa canais  $\text{KCa}^{2+}$ , que em última análise contribuem para o controle da HPP (COOPER *et al.*, 2015; DE VRIND *et al.*, 2016; LASSER-KATZ *et al.*, 2017; LORENZO-CEBALLOS *et al.*, 2019; SAH, 1995; SAH; MCLACHLAN, 1991). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais Cav do tipo L provavelmente não foi suficiente para ativar os canais de  $\text{KCa}^{2+}$  e com isso não observamos alterações na HPP dos MNPRs do DMV de ratos após a superfusão de nifedipina. Ademais, o bloqueio dos canais Cav do tipo L com a nifedipina também não foi capaz de alterar a frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos, o que vai de encontro com dados prévios utilizando motoneurônios



do DMV com projeções não identificadas (GOLDBERG *et al.*, 2012). Em contrapartida, a nifedipina reduziu a excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos. Tendo em vista que a superfusão com nifedipina não foi capaz de alterar a frequência de potenciais de ação espontâneos e nem a cinética do potencial de ação dos MNPRs, porém diminuiu a excitabilidade, é provável que os canais Cav do tipo L sejam importantes quando os motoneurônios precisam gerar potenciais de ação em alta frequência.

#### **5.4. Contribuição dos canais BK no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade, da cinética do potencial de ação e da transmissão sináptica nos MNPRs do DMV de ratos.**

Os canais BK são expressos em quase todas as células excitáveis e sua ativação depende tanto da voltagem quanto da  $[Ca^{2+}]$  intracelular (GHATTA *et al.*, 2006). A ativação dos canais BK serve como um “*feedback* negativo”, que tende a repolarizar a membrana durante a despolarização celular. Estudos anteriores já demonstraram a presença dos canais BK sensíveis a IBTX em motoneurônios do DMV (PEDARZANI *et al.*, 2000; SAH, 1992; 1995). Nós demonstramos por meio de registros eletrofisiológicos e ferramentas farmacológicas que as correntes de saída de  $K^+$  nos MNPRs do DMV são significativamente reduzidas após o bloqueio dos canais BK com IBTX. Desta forma, podemos concluir que, os MNPRs do DMV de ratos expressam os canais BK sensíveis a IBTX, o que é consistente com estudos anteriores que registraram motoneurônios do DMV com projeções não identificadas (PEDARZANI *et al.*, 2000; SAH, 1992; 1995).

Com base na contribuição dos canais  $KCa^{2+}$  no controle da cinética do potencial de ação em diferentes neurônios do SNC (COOPER *et al.*, 2015; DALLAS *et al.*, 2008; FABER; SAH, 2003; GU; VERVAEKE; STORM, 2007; LASSER-KATZ *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2014; PEDARZANI *et al.*, 2000), testamos a hipótese de que os canais BK controlam a cinética do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos. Pedarzani *et al.* (2000) demonstraram que o bloqueio dos canais BK com IBTX produziu um aumento na largura do potencial de ação sem alterar a amplitude da HPP nos motoneurônios do DMV. Nossos dados estão de acordo com os dados

supracitados, os quais observamos que a superfusão da IBTX foi capaz de aumentar a largura do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos.

Diferentemente do que observamos em relação aos canais Kv, o bloqueio dos canais BK com a IBTX não foi capaz de alterar a frequência de potenciais de ação espontâneos, nem o potencial de membrana em repouso, dos MNPRs do DMV de ratos, o que está de acordo com estudos anteriores analisando motoneurônios desta região sem projeções identificadas (PEDARZANI *et al.*, 2000). A frequência de potenciais de ação espontâneos pode ser modulada por uma série de condutâncias, como por exemplo a mediada pelos canais  $KCa^{2+}$ . A descoberta de que a frequência dos potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV não é regulada pelos canais BK sugere que a despolarização e o consequente influxo de  $Ca^{2+}$  nesses motoneurônios não é suficiente para desencadear a ativação dos canais BK.

Observamos também que os canais BK não modulam a excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos. Bock e Stuart (2016) demonstraram que o bloqueio dos canais BK aumentou a largura dos potenciais de ação dos neurônios piramidais do córtex somatossensorial primário, mas não foi suficiente para afetar o número de potenciais de ação evocados por injeções de corrente despolarizante, mesmo nas maiores intensidades. Os canais BK são caracterizados por uma subunidade  $\alpha$  e podem estar associados a subunidades  $\beta$  acessórias. Atualmente, quatro subunidades  $\beta$  foram identificadas ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ ) e cada subunidade tem uma distribuição tecidual específica, modificando a cinética dos canais BK, bem como suas propriedades farmacológicas e sensibilidade ao  $Ca^{2+}$ . Sendo assim, é possível que os MNPRs do DMV de ratos expressem a subunidade  $\beta 4$ , que é a subunidade regulatória menos sensível a IBTX (MEERA; WALLNER; TORO, 2000). A presença desta subunidade pode explicar a ausência de efeitos da IBTX na excitabilidade dos MNPRs, apesar do pequeno aumento da largura do potencial de ação.

Outra importante questão que avaliamos nesse trabalho foi a contribuição dos canais BK na transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos. Diversos estudos já demonstraram a contribuição dos canais BK no controle da transmissão sináptica excitatória em diferentes neurônios do SNC. A superfusão de IBTX reduziu a frequência e a amplitude das sEPSCs nos MNPRs do DMV, indicando uma ação pré-sináptica e pós-sináptica dos canais BK. Diferentemente dos nossos resultados, o bloqueio dos canais BK com IBTX ou paxilina aumentou a probabilidade de liberação

de glutamato nas sinapses dos neurônios piramidais da região CA3, produzindo aumentos na frequência das sEPSCs (RAFFAELLI *et al.*, 2004). Da mesma forma, a IBTX também aumentou a frequência das sEPSCs em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (FURUKAWA *et al.*, 2008). Os canais BK são expressos nas terminações pré e pós-sinápticas de diferentes neurônios (BERKEFELD *et al.*, 2006). Nas terminações pré-sinápticas, seu acoplamento com canais Cav em zonas ativas os tornam particularmente adequados para regular a entrada de  $Ca^{2+}$  e a liberação de neurotransmissores (BERKEFELD *et al.*, 2006). Liu e Savtchouk (2012) demonstraram que o bloqueio dos canais BK foi capaz de promover um aumento na largura do potencial de ação e da expressão da subunidade GluR2 dos receptores AMPA. A incorporação da subunidade GluR2 na membrana reduz a permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  (LIU; ZUKIN, 2007). Portanto, a redução da amplitude das sEPSCs após o bloqueio dos canais BK com IBTX nos MNPRs do DMV pode ocorrer devido uma maior expressão da subunidade GluR2 e conseqüente redução da permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  pelos receptores AMPA, enquanto que a redução da frequência das sEPSCs pode ocorrer devido a redução da probabilidade de liberação de glutamato pela terminação pré-sináptica. Sendo assim, novos experimentos são necessários para investigar essas suposições.

#### **5.5. Contribuição dos canais SK no controle do potencial de membrana em repouso, da frequência de potenciais de ação, da excitabilidade, da cinética do potencial de ação e da transmissão sináptica nos MNPRs do DMV de ratos.**

Os mecanismos pelos quais os canais SK modulam os diferentes aspectos biofísicos em alguns neurônios do SNC já está bem elucidado. Todavia, não se sabe se as correntes de saída de  $K^+$  mediadas pelos canais SK contribuem de maneira substancial para a atividade dos MNPRs do DMV de ratos. Os canais SK participam como reguladores da excitabilidade celular em diferentes tipos neuronais, haja vista que a ativação desses canais causa hiperpolarização da membrana pelo aumento da corrente de saída de  $K^+$  em motoneurônios do DMV (SAH, 1995; SAH; MCLACHLAN, 1991; 1992). Diferentemente dos canais BK, a probabilidade de abertura dos canais SK depende restritamente de alterações na  $[Ca^{2+}]$  intracelular (KÖHLER *et al.*, 1996;

XIA *et al.*, 1998). Como esses canais são amplamente distribuídos por todo o SNC (ADELMAN; MAYLIE; SAH, 2012), inclusive no DMV (PEDARZANI *et al.*, 2000), é possível que eles contribuam para o processo de broncoconstrição e secreção de muco por meio do controle da excitabilidade, da cinética do potencial de ação ou da transmissão sináptica nos MNPRs do DMV.

Nossos resultados demonstram que os canais SK não participam do controle de nenhum componente da cinética do potencial de ação. Pedarzani *et al.* (2000) demonstraram que os canais SK não participam do controle da largura do potencial, mas modulam a HPP, dos motoneurônios do DMV de ratos. Utilizando outro modelo animal, Sah *et al.* (1992) concluíram que os canais SK participam do controle da fHPP nos motoneurônios do DMV. Nossos resultados podem parecer inesperados, tendo em vista a ideia generalizada de que uma das principais funções dos canais SK em diversos neurônios é o controle da HPP (FABER; SAH, 2003; SAH; MCLACHLAN, 1991). Essa divergência pode ser explicada da seguinte forma: é possível que o influxo de  $Ca^{2+}$  no nosso protocolo de análise de cinética de potencial de ação, ou mesmo durante a geração de potenciais de ação espontâneos, não seja suficiente para aumentar a probabilidade de abertura dos canais SK e com isso afetar a HPP dos MNPRs do DMV de ratos

Analizamos também a contribuição dos canais SK no controle do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação espontâneos. Nossos dados demonstram que os canais SK, sensíveis a apamina, não participam do controle da frequência de potenciais de ação espontâneos e do potencial de ação em repouso dos MNPRs do DMV de ratos. Em motoneurônios do DMV de ratos, sem as projeções identificadas, a apamina também não foi capaz de promover alterações significativas no potencial de membrana em repouso, mas afetou a frequência de potenciais de ação espontâneos de ratos (PEDARZANI *et al.*, 2000; SAH; MCLACHLAN, 1992). Sabe-se que a expressão das diferentes subunidades dos canais SK (SK1, SK2, SK3) pode variar de acordo com a população neuronal estudada. Em motoneurônios na adjacência do Núcleo Motor do Hipoglosso, a expressão de mRNA para a subunidade SK2 é alta enquanto as subunidades SK1 e SK3 não são presentes. Em contrapartida, nos motoneurônios do DMV foi observado maiores níveis de expressão de mRNA para a subunidade SK3. É importante salientar que, apesar da apamina ser um bloqueador altamente específico para os canais SK,

sua sensibilidade pode variar de acordo com a subunidade do canal expresso. A subunidade SK1 em humanos são as menos sensíveis, as subunidades SK2 são as mais sensíveis em diferentes espécies (humanos, ratos e camundongos), enquanto a subunidade SK3 apresenta sensibilidade intermediária a apamina (PEDARZANI *et al.*, 2000). Sendo assim, é possível que a ausência de alterações na frequência de potenciais de ação dos MNPRs do DMV de ratos após o bloqueio dos canais SK com apamina seja devido a expressão específica de alguma subunidade destes canais. Vale destacar que a superfusão da apamina reduziu a corrente de  $K^+$  significativamente, porém não foi totalmente eliminada. É possível que a subunidade expressa nos MNPRs do DMV de ratos seja a menos sensível a apamina. Contudo, uma limitação do nosso trabalho é que não avaliamos a expressão do mRNA para as diferentes subunidades dos canais SK. Sendo assim, mais experimentos são necessários para analisar a expressão gênica das subunidades dos canais SK nos MNPRs do DMV de ratos.

Nossos resultados demonstram que os canais SK não participam do controle da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos. Nas células piramidais da região CA1 do hipocampo, o bloqueio dos canais SK com apamina não alterou a excitabilidade (CHEN; BENNINGER; YAARI, 2014; GU *et al.*, 2008). Recentemente foi sugerido que os canais SK desempenham um papel importante na regulação da excitabilidade celular somente quando a função dos canais  $Kv7$  for comprometida (CHEN; BENNINGER; YAARI, 2014). Sendo assim, os canais SK não participam da regulação da excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos em condições fisiológicas.

Tendo em vista a contribuição dos canais SK na modulação da transmissão sináptica excitatória (FABER; DELANEY; SAH, 2005), propusemos que os canais SK modulam as sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos. Ao bloquearmos os canais SK com apamina, não observamos alterações na frequência das sEPSCs, porém a amplitude reduziu. Alterações na amplitude das sEPSCs condiz com alterações pós-sinápticas. Em neurônios da amígdala lateral a apamina foi capaz de aumentar a amplitude das sEPSCs (FABER; DELANEY; SAH, 2005). Considerando nossos resultados, nós sugerimos que o bloqueio dos canais SK com apamina também é capaz afetar a expressão da subunidade GluR2 dos receptores AMPA, e conseqüentemente reduzir a amplitude das sEPSCs nos MNPRs do DMV de ratos, por meio da redução da permeabilidade ao  $Ca^{2+}$ .

**CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na presente Tese de Doutorado, podemos concluir que:

- i) os canais Kv e BK participam do controle da largura do potencial de ação dos MNPRs do DMV de ratos;
- ii) os canais Kv participam do controle da frequência de potenciais de ação espontâneos dos MNPRs do DMV de ratos;
- iii) os canais Kv e Cav do tipo L controlam a excitabilidade dos MNPRs do DMV de ratos, e;
- iv) os canais BK participam do controle da frequência e da amplitude das sEPSCs, enquanto que os canais SK participam do controle da amplitude das sEPSCs, nos MNPRs do DMV de ratos.

Sendo assim, os canais Kv, Cav, BK e SK contribuem de maneira distinta para o controle da cinética do potencial de ação, da frequência de potenciais de ação espontâneos, da excitabilidade e da transmissão sináptica excitatória nos MNPRs do DMV de ratos.

***REFERÊNCIAS***



## 7. REFERÊNCIAS

ADELMAN, J. P.; MAYLIE, J.; SAH, P. Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: form and function. **Annu Rev Physiol**, 74, p. 245-269, 2012.

ARMSTRONG, C. M.; MATTESON, D. R. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. **Science**, 227, n. 4682, p. 65-67, Jan 04 1985.

BEAN, B. P. The action potential in mammalian central neurons. **Nat Rev Neurosci**, 8, n. 6, p. 451-465, Jun 2007.

BENDA, J.; HERZ, A. V. A universal model for spike-frequency adaptation. **Neural Comput**, 15, n. 11, p. 2523-2564, Nov 2003.

BENNETT, J. A.; KIDD, C.; LATIF, A. B.; MCWILLIAM, P. N. A horseradish peroxidase study of vagal motoneurons with axons in cardiac and pulmonary branches of the cat and dog. **Q J Exp Physiol**, 66, n. 2, p. 145-154, Apr 1981.

BERKEFELD, H.; SAILER, C. A.; BILDL, W.; ROHDE, V. *et al.* BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> signaling. **Science**, 314, n. 5799, p. 615-620, Oct 27 2006.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Auton Neurosci**, 85, n. 1-3, p. 1-17, Dec 2000.

BOCK, T.; STUART, G. J. The Impact of BK Channels on Cellular Excitability Depends on their Subcellular Location. **Front Cell Neurosci**, 10, p. 206, 2016.

BROOKE, R. E.; ATKINSON, L.; EDWARDS, I.; PARSON, S. H. *et al.* Immunohistochemical localisation of the voltage gated potassium ion channel subunit Kv3.3 in the rat medulla oblongata and thoracic spinal cord. **Brain Res**, 1070, n. 1, p. 101-115, Jan 27 2006.

CALIN-JAGEMAN, I.; LEE, A. Ca(v)1 L-type Ca<sup>2+</sup> channel signaling complexes in neurons. **J Neurochem**, 105, n. 3, p. 573-583, May 2008.

CANNING, B. J. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. **J Appl Physiol (1985)**, 101, n. 3, p. 971-985, Sep 2006.

CANNING, B. J.; MORI, N.; MAZZONE, S. B. Vagal afferent nerves regulating the cough reflex. **Respir Physiol Neurobiol**, 152, n. 3, p. 223-242, Jul 2006.

CATTERALL, W. A. The molecular basis of neuronal excitability. **Science**, 223, n. 4637, p. 653-661, Feb 17 1984.

CHEN, C. Y.; BONHAM, A. C.; SCHELEGLE, E. S.; GERSHWIN, L. J. *et al.* Extended allergen exposure in asthmatic monkeys induces neuroplasticity in nucleus tractus solitarius. **J Allergy Clin Immunol**, 108, n. 4, p. 557-562, Oct 2001.

CHEN, S.; BENNINGER, F.; YAARI, Y. Role of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in controlling CA1 pyramidal cell excitability. **J Neurosci**, 34, n. 24, p. 8219-8230, Jun 11 2014.

COLERIDGE, H. M.; COLERIDGE, J. C. Neural regulation of bronchial blood flow. **Respir Physiol**, 98, n. 1, p. 1-13, Sep 1994a.

COLERIDGE, H. M.; COLERIDGE, J. C. Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense. **Annu Rev Physiol**, 56, p. 69-91, 1994b.

COOPER, G.; LASSER-KATZ, E.; SIMCHOVITZ, A.; SHARON, R. *et al.* Functional segregation of voltage-activated calcium channels in motoneurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. **J Neurophysiol**, 114, n. 3, p. 1513-1520, Sep 2015.

DA SILVA, M. P.; MORAES, D. J. A.; BONAGAMBA, L. G. H.; MECAWI, A. S. *et al.* Hyperexcitability and plasticity induced by sustained hypoxia on rectus abdominis motoneurons. **J Physiol**, 597, n. 7, p. 1935-1956, Apr 2019.

DALLAS, M. L.; ATKINSON, L.; MILLIGAN, C. J.; MORRIS, N. P. *et al.* Localization and function of the Kv3.1b subunit in the rat medulla oblongata: focus on the nucleus tractus solitarii. **J Physiol**, 562, n. Pt 3, p. 655-672, Feb 01 2005.

DALLAS, M. L.; MORRIS, N. P.; LEWIS, D. I.; DEUCHARS, S. A. *et al.* Voltage-gated potassium currents within the dorsal vagal nucleus: inhibition by BDS toxin. **Brain Res**, 1189, p. 51-57, Jan 16 2008.

DE VRIND, V.; SCUVÉE-MOREAU, J.; DRION, G.; HMAIED, C. *et al.* Interactions between calcium channels and SK channels in midbrain dopamine neurons and their impact on pacemaker regularity: Contrasting roles of N- and L-type channels. **Eur J Pharmacol**, 788, p. 274-279, Oct 2016.

FABER, E. S.; DELANEY, A. J.; SAH, P. SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. **Nat Neurosci**, 8, n. 5, p. 635-641, May 2005.

FABER, E. S.; SAH, P. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel inactivation contributes to spike broadening during repetitive firing in the rat lateral amygdala. **J Physiol**, 552, n. Pt 2, p. 483-497, Oct 2003.

FALGAIROLLE, M.; O'DONOVAN, M. J. Pharmacological Investigation of Fluoro-Gold Entry into Spinal Neurons. **PLoS One**, 10, n. 6, p. e0131430, 2015.

FORD, T. W.; BENNETT, J. A.; KIDD, C.; MCWILLIAM, P. N. Neurones in the dorsal motor vagal nucleus of the cat with non-myelinated axons projecting to the heart and lungs. **Exp Physiol**, 75, n. 4, p. 459-473, Jul 1990.

FURUKAWA, N.; TAKASUSUKI, T.; FUKUSHIMA, T.; HORI, Y. Presynaptic large-conductance calcium-activated potassium channels control synaptic transmission in the superficial dorsal horn of the mouse. **Neurosci Lett**, 444, n. 1, p. 79-82, Oct 17 2008.

GHATTA, S.; NIMMAGADDA, D.; XU, X.; O'ROURKE, S. T. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. **Pharmacol Ther**, 110, n. 1, p. 103-116, Apr 2006.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; HANSEN, M. K.; ANDERSON, K. *et al.* Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Auton Neurosci**, 85, n. 1-3, p. 49-59, Dec 2000.

GOLDBERG, J. A.; GUZMAN, J. N.; ESTEP, C. M.; ILIJIC, E. *et al.* Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, 15, n. 10, p. 1414-1421, Oct 2012.

GONZÁLEZ, C.; BAEZ-NIETO, D.; VALENCIA, I.; OYARZÚN, I. *et al.* K(+) channels: function-structural overview. **Compr Physiol**, 2, n. 3, p. 2087-2149, Jul 2012.

GOULD, E.; WOOLF, N. J.; BUTCHER, L. L. Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. **Brain Res Bull**, 27, n. 6, p. 767-789, Dec 1991.

GU, N.; HU, H.; VERVAEKE, K.; STORM, J. F. SK (KCa<sub>2</sub>) channels do not control somatic excitability in CA1 pyramidal neurons but can be activated by dendritic excitatory synapses and regulate their impact. **J Neurophysiol**, 100, n. 5, p. 2589-2604, Nov 2008.

GU, N.; VERVAEKE, K.; STORM, J. F. BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. **J Physiol**, 580, n. Pt.3, p. 859-882, May 2007.

HADZIEFENDIC, S.; HAXHIU, M. A. CNS innervation of vagal preganglionic neurons controlling peripheral airways: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. **J Auton Nerv Syst**, 76, n. 2-3, p. 135-145, May 1999.

HASELTON, J. R.; SOLOMON, I. C.; MOTEKAITIS, A. M.; KAUFMAN, M. P. Bronchomotor vagal preganglionic cell bodies in the dog: an anatomic and functional study. **J Appl Physiol** (1985), 73, n. 3, p. 1122-1129, Sep 1992.

HAXHIU, M. A.; KC, P.; MOORE, C. T.; ACQUAH, S. S. *et al.* Brain stem excitatory and inhibitory signaling pathways regulating bronchoconstrictive responses. **J Appl Physiol** (1985), 98, n. 6, p. 1961-1982, Jun 2005.

HELTON, T. D.; XU, W.; LIPSCOMBE, D. Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly. **J Neurosci**, 25, n. 44, p. 10247-10251, Nov 02 2005.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. Third edition. ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2001. xviii, 814 pages, 818 unnumbered pages of plates : illustrations (some colour) p. 9780878933211

0878933212.

HU, H.; SHAO, L. R.; CHAVOSHY, S.; GU, N. *et al.* Presynaptic Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. **J Neurosci**, 21, n. 24, p. 9585-9597, Dec 2001.

JENSEN, B. S.; STROBAEK, D.; CHRISTOPHERSEN, P.; JORGENSEN, T. D. *et al.* Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. **Am J Physiol**, 275, n. 3, p. C848-856, 09 1998.

JUDGE, S. I.; SMITH, P. J.; STEWART, P. E.; BEVER, C. T. Potassium channel blockers and openers as CNS neurologic therapeutic agents. **Recent Pat CNS Drug Discov**, 2, n. 3, p. 200-228, Nov 2007.

KALIA, M.; MESULAM, M. M. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. **J Comp Neurol**, 193, n. 2, p. 467-508, Sep 1980.

KISTEMAKER, L. E.; OENEMA, T. A.; MEURS, H.; GOSENS, R. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. **Life Sci**, 91, n. 21-22, p. 1126-1133, Nov 2012.

KSHATRI, A. S.; GONZALEZ-HERNANDEZ, A.; GIRALDEZ, T. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca. **Front Mol Neurosci**, 11, p. 258, 2018.

KUME, H.; TAKAI, A.; TOKUNO, H.; TOMITA, T. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. **Nature**, 341, n. 6238, p. 152-154, Sep 1989.

KÖHLER, M.; HIRSCHBERG, B.; BOND, C. T.; KINZIE, J. M. *et al.* Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. **Science**, 273, n. 5282, p. 1709-1714, Sep 1996.

LASSER-KATZ, E.; SIMCHOVITZ, A.; CHIU, W. H.; OERTEL, W. H. *et al.* Mutant  $\alpha$ -Synuclein Overexpression Induces Stressless Pacemaking in Vagal Motoneurons at Risk in Parkinson's Disease. **J Neurosci**, 37, n. 1, p. 47-57, 01 2017.

LATORRE, R.; MORERA, F. J.; ZAELZER, C. Allosteric interactions and the modular nature of the voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated (BK) channel. **J Physiol**, 588, n. Pt 17, p. 3141-3148, Sep 2010.

LEE, L. Y.; YU, J. Sensory nerves in lung and airways. **Compr Physiol**, 4, n. 1, p. 287-324, Jan 2014.

LI, B. Y.; GLAZEBROOK, P.; KUNZE, D. L.; SCHILD, J. H. KCa1.1 channel contributes to cell excitability in unmyelinated but not myelinated rat vagal afferents. **Am J Physiol Cell Physiol**, 300, n. 6, p. C1393-1403, Jun 2011.

LIANG, L.; LI, X.; MOUTTON, S.; SCHRIER VERGANO, S. A. *et al.* De novo loss-of-function KCNMA1 variants are associated with a new multiple malformation syndrome and a broad spectrum of developmental and neurological phenotypes. **Hum Mol Genet**, Jun 2019.

LIN, M.; HATCHER, J. T.; CHEN, Q. H.; WURSTER, R. D. *et al.* Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels regulate firing properties and excitability in parasympathetic cardiac motoneurons in the nucleus ambiguus. **Am J Physiol Cell Physiol**, 299, n. 6, p. C1285-1298, Dec 2010.

LIN, M.; HATCHER, J. T.; WURSTER, R. D.; CHEN, Q. H. *et al.* Characteristics of single large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and their regulation of action potentials and excitability in parasympathetic cardiac motoneurons in the nucleus ambiguus. **Am J Physiol Cell Physiol**, 306, n. 2, p. C152-166, Jan 2014.

LIPSCOMBE, D.; HELTON, T. D.; XU, W. L-type calcium channels: the low down. **J Neurophysiol**, 92, n. 5, p. 2633-2641, Nov 2004.

LIU, N. N.; XIE, H.; XIANG-WEI, W. S.; GAO, K. *et al.* The absence of NIPA2 enhances neural excitability through BK (big potassium) channels. **CNS Neurosci Ther**, 25, n. 8, p. 865-875, Aug 2019.

LIU, S. J.; SAVTCHOUK, I. Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptors switch allegiances: mechanisms and consequences. **J Physiol**, 590, n. 1, p. 13-20, Jan 01 2012.

LIU, S. J.; ZUKIN, R. S. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. **Trends Neurosci**, 30, n. 3, p. 126-134, Mar 2007.

LORENZO-CEBALLOS, Y.; CARRASQUEL-URSULAEZ, W.; CASTILLO, K.; ALVAREZ, O. *et al.* Calcium-driven regulation of voltage-sensing domains in BK channels. **Elife**, 8, 09 2019.

MAHROUS, A. A.; ELBASIOUNY, S. M. SK channel inhibition mediates the initiation and amplitude modulation of synchronized burst firing in the spinal cord. **J Neurophysiol**, 118, n. 1, p. 161-175, 07 2017.

MARTIN, S.; LAZZARINI, M.; DULLIN, C.; BALAKRISHNAN, S. *et al.* SK3 Channel Overexpression in Mice Causes Hippocampal Shrinkage Associated with Cognitive Impairments. **Mol Neurobiol**, 54, n. 2, p. 1078-1091, 03 2017.

MAZZONE, S. B.; CANNING, B. J. Central nervous system control of the airways: pharmacological implications. **Curr Opin Pharmacol**, 2, n. 3, p. 220-228, Jun 2002.

MAZZONE, S. B.; CANNING, B. J. Autonomic neural control of the airways. **Handb Clin Neurol**, 117, p. 215-228, 2013.

MAZZONE, S. B.; UNDEM, B. J. Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. **Physiol Rev**, 96, n. 3, p. 975-1024, 07 2016.

MCALLEN, R. M.; SPYER, K. M. Two types of vagal preganglionic motoneurons projecting to the heart and lungs. **J Physiol**, 282, p. 353-364, Sep 1978.

MEERA, P.; WALLNER, M.; TORO, L. A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 10, p. 5562-5567, May 09 2000.

MORAES, D. J.; MACHADO, B. H. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **J Physiol**, 593, n. 3, p. 619-634, Feb 2015.

MORAES, D. J. A.; DA SILVA, M. P.; DE SOUZA, D. P.; FELINTRO, V. *et al.* Heightened respiratory-parasympathetic coupling to airways in the spontaneously hypertensive rat. **J Physiol**, 599, n. 12, p. 3237-3252, 06 2021.

PARTRIDGE, L. D.; STEVENS, C. F. A mechanism for spike frequency adaptation. **J Physiol**, 256, n. 2, p. 315-332, Apr 1976.

PEDARZANI, P.; KULIK, A.; MULLER, M.; BALLANYI, K. *et al.* Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel function in rat dorsal vagal neurones. **J Physiol**, 527 Pt 2, p. 283-290, Sep 2000.

PEDARZANI, P.; STOCKER, M. Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. **Cell Mol Life Sci**, 65, n. 20, p. 3196-3217, Oct 2008.

PÉREZ FONTÁN, J. J.; VELLOFF, C. R. Neuroanatomic organization of the parasympathetic bronchomotor system in developing sheep. **Am J Physiol**, 273, n. 1 Pt 2, p. R121-133, Jul 1997.

RAFFAELLI, G.; SAVIANE, C.; MOHAJERANI, M. H.; PEDARZANI, P. *et al.* BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. **J Physiol**, 557, n. Pt 1, p. 147-157, May 15 2004.

RANDALL, A.; TSIEN, R. W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. **J Neurosci**, 15, n. 4, p. 2995-3012, Apr 1995.

RAPH, S. M.; BHATNAGAR, A.; NYSTORIAK, M. A. Biochemical and physiological properties of K. **Chem Biol Interact**, 305, p. 21-27, May 25 2019.

REINHART, P. H.; CHUNG, S.; LEVITAN, I. B. A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. **Neuron**, 2, n. 1, p. 1031-1041, Jan 1989.

RICCIO, M. M.; MYERS, A. C.; UNDEM, B. J. Immunomodulation of afferent neurons in guinea-pig isolated airway. **J Physiol**, 491 ( Pt 2), p. 499-509, Mar 1996.

SAH, P. Role of calcium influx and buffering in the kinetics of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> current in rat vagal motoneurons. **J Neurophysiol**, 68, n. 6, p. 2237-2247, Dec 1992.

SAH, P. Different calcium channels are coupled to potassium channels with distinct physiological roles in vagal neurons. **Proc Biol Sci**, 260, n. 1357, p. 105-111, Apr 1995.

SAH, P.; MCLACHLAN, E. M. Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca(2+)-activated Ca<sup>2+</sup> release. **Neuron**, 7, n. 2, p. 257-264, Aug 1991.

SAH, P.; MCLACHLAN, E. M. Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. **J Neurophysiol**, 68, n. 5, p. 1834-1841, Nov 1992.

SAH, P.; MCLACHLAN, E. M. Differences in electrophysiological properties between neurones of the dorsal motor nucleus of the vagus in rat and guinea pig. **J Auton Nerv Syst**, 42, n. 2, p. 89-98, Feb 1993.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annu Rev Physiol**, 46, p. 455-472, 1984.

SAUSBIER, M.; HU, H.; ARNTZ, C.; FEIL, S. *et al.* Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 25, p. 9474-9478, Jun 2004.

SCHOLL, E. S.; PIRONE, A.; COX, D. H.; DUNCAN, R. K. *et al.* Alternative splice isoforms of small conductance calcium-activated SK2 channels differ in molecular interactions and surface levels. **Channels (Austin)**, 8, n. 1, p. 62-75, 2014.

SCHUMACHER, M. A.; RIVARD, A. F.; BÄCHINGER, H. P.; ADELMAN, J. P. Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. **Nature**, 410, n. 6832, p. 1120-1124, Apr 2001.

SEIBOLD, M. A.; WANG, B.; ENG, C.; KUMAR, G. *et al.* An african-specific functional polymorphism in KCNMB1 shows sex-specific association with asthma severity. **Hum Mol Genet**, 17, n. 17, p. 2681-2690, Sep 2008.

SEMENOV, I.; WANG, B.; HERLIHY, J. T.; BRENNER, R. BK channel beta1-subunit regulation of calcium handling and constriction in tracheal smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 291, n. 4, p. L802-810, Oct 2006.

SHIPSTON, M. J. Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular excitability. **Trends Cell Biol**, 11, n. 9, p. 353-358, Sep 2001.

SIMMS, B. A.; ZAMPONI, G. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. **Neuron**, 82, n. 1, p. 24-45, Apr 02 2014.

SOUZA, D. P. **Participação dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> na sensibilidade à acidose dos motoneurônios respiratórios do Núcleo Motor Dorsal do Dago de ratos.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p.77. 2020.

TRIGGLE, D. J. L-type calcium channels. **Curr Pharm Des**, 12, n. 4, p. 443-457, 2006.

UNDEM, B. J.; HUNTER, D. D.; LIU, M.; HAAK-FRENDSCHO, M. *et al.* Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. **Int Arch Allergy Immunol**, 118, n. 2-4, p. 150-153, 1999 Feb-Apr 1999.

UNDEM, B. J.; TAYLOR-CLARK, T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. **J Allergy Clin Immunol**, 133, n. 6, p. 1521-1534, Jun 2014.

VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N. V.; ADELMAN, J. P. Calcium-activated potassium channels. **Curr Opin Neurobiol**, 8, n. 3, p. 321-329, Jun 1998.

WEISER, M.; VEGA-SAENZ DE MIERA, E.; KENTROS, C.; MORENO, H. *et al.* Differential expression of Shaw-related K<sup>+</sup> channels in the rat central nervous system. **J Neurosci**, 14, n. 3 Pt 1, p. 949-972, Mar 1994.

WINE, J. J. Parasympathetic control of airway submucosal glands: central reflexes and the airway intrinsic nervous system. **Auton Neurosci**, 133, n. 1, p. 35-54, Apr 2007.

WU, Z. X.; BARKER, J. S.; BATCHELOR, T. P.; DEY, R. D. Interleukin (IL)-1 regulates ozone-enhanced tracheal smooth muscle responsiveness by increasing substance P (SP) production in intrinsic airway neurons of ferret. **Respir Physiol Neurobiol**, 164, n. 3, p. 300-311, Dec 2008.

WU, Z. X.; SATTERFIELD, B. E.; FEDAN, J. S.; DEY, R. D. Interleukin-1beta-induced airway hyperresponsiveness enhances substance P in intrinsic neurons of ferret airway. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 283, n. 5, p. L909-917, Nov 2002.

XIA, X. M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; WAYMAN, G. *et al.* Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, 395, n. 6701, p. 503-507, Oct 1998.

YU, J. A historical perspective of pulmonary rapidly adapting receptors. **Respir Physiol Neurobiol**, 287, p. 103595, 05 2021.