

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

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE VAZAMENTO PARA  $K^+$  NA  
SENSIBILIDADE À ACIDOSE DOS MOTONEURÔNIOS  
RESPIRATÓRIOS DO NÚCLEO MOTOR DORSAL DO VAGO DE  
RATOS.**

Daniel Phelipe de Souza

Ribeirão Preto

2020

**DANIEL PHELIPE DE SOUZA**

Versão Corrigida

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE VAZAMENTO PARA K<sup>+</sup> NA  
SENSIBILIDADE À ACIDOSE DOS MOTONEURÔNIOS  
RESPIRATÓRIOS DO NÚCLEO MOTOR DORSAL DO VAGO DE  
RATOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São  
Paulo, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

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

**Ribeirão Preto**

**2020**

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

### Ficha Catalográfica

Souza, Daniel Phelipe

Participação dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> na sensibilidade à acidose dos motoneurônios respiratórios do núcleo motor dorsal do vago de ratos. Ribeirão Preto – São Paulo, 2020.

77 f. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Moraes, Davi J. A.

1. Núcleo Motor Dorsal do Vago, 2. Canais de vazamento para K<sup>+</sup>, 3. Hipercapnia/acidose, 4. TASK-1 e TASK-3, 5. vias aéreas respiratórias.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar a minha gratidão. Por ter tido a oportunidade de desenvolver esta dissertação, e por todos os momentos que passei ao lado de pessoas incríveis. Foi uma trajetória de muita experiência pessoal e profissional, no qual, me proporcionou evoluir e me tornar um ser humano melhor. Diante disto, algumas pessoas marcaram esta trajetória e gostaria de agradecer-las:

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por iluminar meu caminho durante minha trajetória para finalizar este trabalho.

A minha mãe, Andreia de Fátima de Brito, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, sempre esteve ao meu lado durante o Mestrado. Mesmo distante, você sempre esteve presente de todas as formas. Você para mim, é minha maior inspiração e devo tudo a você. Te amo, minha rainha.

Ao meu irmão, Rafael Henrique Brito de Souza, você sempre esteve ao meu lado, me aconselhando e apoiando, fazendo um papel não só de irmão, mas também de amigo. Obrigado por tudo, te amo.

Ao meu companheiro Jonathan Fernando Bento, pois, sempre esteve ao meu lado desde o início, me apoiando, incentivando, aconselhando e principalmente dando forças para conseguir seguir em frente. Sou muito grato a você por tudo. Te amo.

Aos meus amigos e amigas, que o Mestrado me proporcionou, Amanda Barboza, Beatriz Oliveira, Cláudia Souza, Henrique Morgan, Júlio Lima, Thaís Marques, Nikolas Benites, Viviane Felintro. Vocês foram essenciais nesta minha trajetória. Vocês estavam sempre ao meu lado, compartilhando momentos bons e ruins. Obrigado por demonstrar o real sentido da amizade.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Karolyne Magalhães, Viviane Felintro, Pedro Spiller, Melina Moraes e Mariulza Rocha, obrigado por todos os momentos que passamos juntos no laboratório, sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e ensinando, compartilhando momentos felizes e engraçados. Tenho um carinho especial por vocês.

Agradeço 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.

Em especial, ao meu orientador Davi J. A. Moraes, obrigado pela oportunidade que me proporcionou para poder desenvolver este trabalho. Além

disto, você demonstrou e demonstra o que realmente é ser um orientador. Agradeço a todos os conselhos acadêmicos e pessoais. Sou imensamente grato a você.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de  
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de  
Financiamento 001  
e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -  
(134638/2018-2)**

## RESUMO

SOUZA, D. P. **Participação dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> na sensibilidade à acidose dos motoneurônios respiratórios do núcleo motor dorsal do vago de ratos**. 77 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2020.

A inervação eferente parassimpática para o sistema respiratório tem como função controlar a contração da musculatura lisa (broncoconstrição) e secreção mucosa das vias aéreas respiratórias. Sabe-se que os corpos celulares dos motoneurônios pré-ganglionares parassimpáticos que se projetam para as vias aéreas respiratórias de ratos se encontram no bulbo, especificamente no Núcleo Ambíguo (NA) e no Núcleo Motor Dorsal do Vago (DMV). Entretanto, a caracterização eletrofisiológica e funcional dos motoneurônios respiratórios do DMV que se projetam para as vias aéreas respiratórias não está totalmente clara. Canais de vazamento para K<sup>+</sup>, inibidos pela acidose, da subfamília “*TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel*” (TASK-1 e TASK-3) são expressos no DMV de ratos e condições de hipercapnia/acidose aumentam as respostas parassimpáticas para as vias aéreas respiratórias, produzindo assim broncoconstrição e a secreção mucosa. Diante disto, na presente dissertação de Mestrado levantamos a seguinte hipótese: os canais de vazamento para K<sup>+</sup> (TASK-1 e TASK-3) determinam o potencial de membrana em repouso e a sensibilidade à acidose dos motoneurônios parassimpáticos do DMV que se projetam para as vias aéreas respiratórias de ratos. Para testarmos esta hipótese, utilizamos a técnica de *whole cell patch clamp* em fatias do tronco encefálico de ratos e a marcação retrógrada e avaliamos: I) as características eletrofisiológicas dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV, com ênfase no controle do potencial de membrana em repouso e da condutância de vazamento; II) os efeitos da hipercapnia/acidose na condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos; III) a participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos, e; IV) a identidade molecular dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. A condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos é mediada principalmente pelo K<sup>+</sup>, e

a mesma foi reduzida significativamente frente à acidificação do meio extracelular. A acidificação do meio extracelular levou a despolarização do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. Além disto, observamos, por meio da farmacologia, a não contribuição dos canais TASK-1 e TASK-3 na gênese do potencial de membrana em repouso e na sensibilidade à acidose destes motoneurônios. Estes dados foram confirmados, por meio da técnica RT-qPCR de um único motoneurônio, pela ausência da expressão do mRNA destes canais nos motoneurônios respiratórios do DMV. Por fim, verificamos que a hipercapnia/acidose foi capaz de produzir alterações semelhantes às aquelas observadas quando da acidose sem alteração do CO<sub>2</sub> na condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. Portanto, os dados demonstram que a corrente de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV é mediada por canais para K<sup>+</sup>, e que estes canais determinam a sensibilidade à hipercapnia/acidose dos motoneurônios respiratórios.

**Palavras-chaves:** Núcleo Motor Dorsal do Vago, Canais de vazamento para K<sup>+</sup>, Hipercapnia/acidose, TASK-1 e TASK-3, vias aéreas respiratórias.



## ABSTRACT

SOUZA, D. P. **The role of K<sup>+</sup> leak channels on the acidosis sensitivity of the respiratory motoneurons in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus of rats.** 77 p. Dissertation (Masters) – School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2020.

The parasympathetic efferent innervation to the respiratory system has the function of controlling smooth muscle contraction (bronchoconstriction) and mucous secretion in the respiratory airways. It is known that the cell bodies of the parasympathetic pre-ganglion motoneurons that project to the respiratory airways of rats are found in the medulla, specifically in the Nucleus Ambiguus (NA) and in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus (DMV). However, the electrophysiological and functional characterization of DMV respiratory motoneurons that project to the respiratory airways is not entirely clear. K<sup>+</sup> leak channels, inhibited by acidosis, of the subfamily TWIK – related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel (TASK-1 and TASK-3) are expressed in the DMV of rats and conditions of hypercapnia/acidosis increases the parasympathetic responses to the respiratory airways, producing bronchoconstriction and mucous secretion. In the present Master's thesis, we hypothesized that the K<sup>+</sup> leak channels (TASK-1 and TASK-3) determine the resting membrane potential and the sensitivity to acidosis of the DMV parasympathetic motoneurons that project to the respiratory airways of rats. To test this hypothesis, we used the whole cell patch clamp technique on brainstem slices of rats and retrograde labeling to evaluate: I) the electrophysiological properties of the DMV parasympathetic respiratory motoneurons, with emphasis on the resting membrane potential and leak conductance; II) the effects of hypercapnia/acidosis on the leak conductance and the resting membrane potential of DMV parasympathetic respiratory motoneurons of rats; III) the involvement of TASK-1 and TASK-3 channels in the sensitivity to acidosis of the resting membrane potential of the DMV parasympathetic respiratory motoneurons of rats, and; IV) the molecular identity of the K<sup>+</sup> leak channels of the DMV respiratory motoneurons of rats. The leak conductance of the DMV respiratory motoneurons of rats is mediated mainly by K<sup>+</sup>, and it was significantly reduced in response to extracellular acidification. Extracellular acidification also produced depolarization of the resting membrane potential of DMV respiratory motoneurons. In addition, we observed using pharmacology the absence of the contribution of the TASK-1 and TASK-3

channels in the genesis of the resting membrane potential and in the sensitivity to acidosis of these motoneurons. These data were confirmed, using RT-qPCR technique of a single motoneuron, by the absence of the expression of the mRNA of these channels in the DMV respiratory motoneurons. Finally, we found that hypercapnia/acidosis was able to produce changes in the leak conductance and in the resting membrane potential of DMV respiratory motoneurons similar to those observed when acidosis used without changing CO<sub>2</sub>. Therefore, the data demonstrate that the DMV respiratory motoneurons leak current is mediated by K<sup>+</sup> channels, and that these channels determine the sensitivity to hypercapnia/acidosis of these respiratory motoneurons in rats.

**Keywords:** Dorsal Motor Nucleus of the Vagus, K<sup>+</sup> leak channels, Hypercapnia/acidosis, TASK-1 and TASK-3, respiratory airways.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visualização do DMV na fatia coronal do bulbo e marcação dos motoneurônios respiratórios.....	13
Figura 2. Capacitância dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.....	21
Figura 3. Fenótipo motor dos motoneurônios respiratórios registrados no DMV.....	22
Figura 4. Potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	23
Figura 5. Ri dos motoneurônios respiratórios do DMV.....	24
Figura 6. Condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV ....	25
Figura 7. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrado .....	26
Figura 8. Sensibilidade à acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.....	27
Figura 9. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.....	28
Figura 10. Sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	29
Figura 11. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.....	30
Figura 12. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.	32

Figura 13. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.....	33
Figura 14. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	34
Figura 15. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.....	35
Figura 16. Sensibilidade à hipercapnia/acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	36
Figura 17. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.....	37
Figura 18. Sensibilidade à hipercapnia/acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	38
Figura 19. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão dos canais de vazamento para K <sup>+</sup> (TASK-1 e TASK-3) nos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	40
Tabela 2. Expressão dos canais de vazamento para K <sup>+</sup> (THIK-1, THIK-2, TREK-1 e TREK-2) nos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	40

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2. <b>OBJETIVOS</b> .....	9
2.1. Objetivo geral .....	9
2.2. Objetivos específicos .....	9
3. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
3.1. Animais .....	11
3.2. Identificação dos motoneurônios respiratórios do DMV .....	11
3.3. Experimentos com os motoneurônios respiratórios do DMV.....	11
3.4. Imunofluorescência .....	14
3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) de um único motoneurônio .....	14
3.6. Protocolos experimentais .....	15
3.6.1. Propriedades passivas da membrana dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.....	15
3.6.2. Condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. ....	16
3.6.3. Efeitos da acidose na condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.....	17
3.6.4. Efeitos da acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. ....	17
3.6.5. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.....	18
3.6.6. Efeitos da hipercapnia/acidose na condutância de vazamento dos motoneurônios brônquicos do DMV de ratos. ....	18
3.6.7. Efeitos da hipercapnia/acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. ....	18
3.7. Análises estatísticas.....	19

<b>4. RESULTADOS</b> .....	21
4.1. Potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.22	
4.2. $R_i$ dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	23
4.3. Condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV....	24
4.4. Sensibilidade à acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	26
4.5. Sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	28
4.6. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.30	
4.7. Sensibilidade à hipercapnia/acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	35
4.8. Sensibilidade à hipercapnia/acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	37
4.9. Expressão dos canais de vazamento para $K^+$ ( $K_{2p}$ ) nos motoneurônios respiratórios do DMV. ....	39
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	51
<b>8. APÊNDICE</b> .....	63
8.5. Apêndice 1 .....	63
8.6. Apêndice 2 .....	64
8.7. Apêndice 3 .....	65
8.8. Apêndice 4 .....	66

## ***Introdução***



## 1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso autônomo desempenha um papel importante na regulação da função das vias aéreas respiratórias. Sabe-se que as células efetoras das vias aéreas respiratórias (músculo liso e glândulas mucosas) são densamente inervadas pelo sistema nervoso autônomo, predominantemente pelo sistema nervoso parassimpático (MAZZONE, 2002) o qual determina a contração da musculatura lisa (broncoconstrição) e secreção de muco (MYERS, 2007). De acordo com os autores anteriores, as fibras parassimpáticas colinérgicas eferentes fazem sinapse em pequenos gânglios, ao longo das vias aéreas respiratórias, ativando os neurônios pós-ganglionares via receptores nicotínicos. As fibras pós-ganglionares liberam acetilcolina que interage com receptores muscarínicos diretamente na musculatura lisa e glândulas mucosas das vias aéreas respiratórias, desempenhando assim um papel central na regulação do fluxo de ar para os pulmões, por meio do controle da broncoconstrição e secreção mucosa (LEE; PISARRI, 2001; WEIGAND; MYERS, 2010).

A atividade parassimpática para as vias aéreas respiratórias também é modulada por neurônios sensoriais. O ar que respiramos não é constante nem homogêneo. A temperatura, a osmolaridade, o pH e a composição do gás podem mudar com os ambientes em mudança. Além disso, pode haver diferenças substanciais na quantidade e no tipo de material particulado e irritantes ambientais no ar que respiramos. Para detectar essas diferenças, as vias aéreas respiratórias utilizam uma inervação aferente densa que é derivada principalmente dos neurônios nos gânglios sensitivos vagais (LEE; YU, 2014).

Os neurônios sensoriais que inervam as vias aéreas respiratórias, se encontram especificamente em dois gânglios, sendo eles, o gânglio nodoso (gânglio inferior) e o gânglio jugular (gânglio superior) (MAZZONE; UNDEM, 2016). As aferências vagais broncopulmonares são ligadas principalmente com dois tipos de receptores ou sensores: mecanorreceptores e sensores químicos. Tais aferências são os principais meios de transmissão de informações relativas às alterações das condições físicas e químicas dos tecidos das vias aéreas respiratórias e dos pulmões para o sistema nervoso central (COLERIDGE; COLERIDGE, 2011). Esta comunicação auxilia no ajuste fino da função pulmonar, que é a troca gasosa e, talvez mais importante, fornece um mecanismo crítico de

defesa destinado a manter a integridade das vias aéreas respiratórias. Sendo assim, as fibras aferentes vagais podem ser divididas em duas classificações gerais que são as fibras A e C (CARR; UNDEM, 2003). As fibras A broncopulmonares englobam as fibras de estiramento de adaptação rápida (RARs) e as fibras de estiramento de adaptação lenta (SARs).

As fibras SARs são mielinizadas localizadas na musculatura lisa das vias aéreas respiratórias, sua distribuição é restrita contendo uma anatomia terminal complexa. Essas fibras têm como função informar os neurônios respiratórios no tronco encefálico o grau de insuflação pulmonar (LEE; YU, 2014; MAZZONE; UNDEM, 2016). Sua ativação inibe a inspiração para o controle do volume corrente e da frequência respiratória (também chamado de reflexo de insuflação de *Hering-Breuer*) (GRUNSTEIN; YOUNES; MILIC-EMILI, 1973), e promove o relaxamento do músculo liso das vias aéreas respiratórias, por meio da redução da atividade parassimpática (COLERIDGE; COLERIDGE, 2011). Já as fibras RARs são mecanossensores mielinizados distribuídos ao longo das vias aéreas respiratórias, com uma densidade elevada nas vias aéreas de maior calibre (SANT'AMBROGIO; WIDDICOMBE, 2001). São sensíveis a estímulos mecânicos, tais como inflação e deflação do pulmão (McALEXANDER; MYERS; UNDEM, 1999). Ao serem ativadas levam ao aumento do esforço inspiratório, da frequência respiratória e da atividade parassimpática para as vias aéreas respiratórias (KC; MARTIN, 2010).

As fibras C são de condução lenta e não mielinizadas, amplamente distribuídas pelos pulmões e vias aéreas respiratórias (COLERIDGE, 1994). Os receptores de fibra C são excitados por deformações mecânicas, estímulos químicos, aumento do volume de líquido intersticial (edema pulmonar – que pode acompanhar a doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC) ou pelo aumento da temperatura (LEE; PISARRI, 2001). A estimulação das fibras C induz respiração rápida, superficial, broncoconstrição e secreção aumentada de muco para as vias aéreas, atuando como mecanismos de proteção. Estas fibras vagais também são responsáveis pelo reflexo da tosse (UNDEM; CARR, 2010).

Em condições patológicas, este sistema sensorial pode se desregular. Isso pode levar a reflexos autonômicos (broncoespasmo e secreções), desejo de tosse e dispneia que estão desequilibrados e exagerados em relação ao estímulo sensorial ativado. Isso parece ser especialmente óbvio para os distúrbios que

envolvem inflamação, incluindo rinite, bronquite, asma e DPOC (CARR; UNDEM, 2003). Essas aferências sensoriais são de grande importância para a geração de respostas motoras para as vias aéreas respiratórias, pois são essas aferências sensoriais os principais meios de transmissão de informações para o sistema nervoso central em relação às condições presentes nas vias aéreas respiratórias. Entretanto, o que sabemos sobre a localização dos corpos celulares dos motoneurônios pré-ganglionares parassimpáticos que controlam as atividades das vias aéreas respiratórias?

Sabe-se que os corpos celulares dos motoneurônios pré-ganglionares parassimpáticos, que se projetam as vias aéreas respiratórias, se encontram no bulbo, especificamente no Núcleo Ambíguo (NA) e no Núcleo Motor Dorsal do Vago (DMV). Kalia & Mesulam (1980) ao avaliarem a distribuição dos motoneurônios no bulbo que se projetam para traquéia, brônquios e parênquima pulmonar de gatos, utilizando o transportador retrógrado de peroxidase de rábano, propuseram que o DMV tem uma maior participação no controle dos músculos lisos e glândulas brônquicas das vias aéreas respiratórias do que o NA. Por outro lado, Lama, Delpierre & Jammes (1988) propuseram que a broncoconstrição em gatos é mediada por axônios mielinizados dos motoneurônios do NA. Já em ratos, os motoneurônios do NA, e alguns na região rostral do DMV, se projetam para o parênquima pulmonar (HAXHIU et al., 1993). Hadziefendic & Haxhiu (1999) injetaram o traçador retrógrado *cholera toxin B-subunit* (CT-b), tanto no parênquima pulmonar quanto no esôfago de ratos, e verificaram que houve marcação no NA e DMV. (FONTÁN; DIEC; VELLOFF, 2000) utilizaram dois marcadores retrógrados diferentes, os quais o CT-b foi injetado no lúmen traqueal, enquanto o *FluoroGold* foi injetado no parênquima pulmonar de ratos, e verificaram ambas marcações no NA e DMV. Além disso, os autores também encontraram motoneurônios na mesma região com ambas as marcações, indicando que um mesmo motoneurônio inerva as vias aéreas respiratórias e o parênquima pulmonar.

Sabendo que estes motoneurônios se projetam para as vias aéreas respiratórias e parênquima pulmonar, quais as suas funções fisiológicas ao serem estimulados? Haselton et al. (1992) realizaram estimulações do NA e DMV com ácido DL-homocisteico em cães e verificaram aumentos da pressão traqueal apenas quando estimulavam o NA. Sendo assim, concluíram que os

motoneurônios vagais do DMV não contribuíam com o controle das vias aéreas respiratórias, enquanto que os motoneurônios no NA teria uma participação na broncoconstrição. Sabe-se também que os motoneurônios do NA e DMV apresentam características eletrofisiológicas distintas. Ford et al. (1990) registraram 39 motoneurônios do DMV de gatos que se projetavam para as vias aéreas respiratórias, e somente 20 apresentaram atividade espontânea com uma baixa velocidade de condução, associadas a fibras não mielinizadas. Sendo assim, os autores sugeriram que os axônios mielinizados derivem de motoneurônios do NA, enquanto axônios não mielinizados derivem de motoneurônios do DMV. Por outro lado, McAllen & Spyer (1978) descreveram algumas propriedades eletrofisiológicas de 10 motoneurônios do NA que se projetavam para as vias aéreas respiratórias de gatos. Os autores demonstraram que estes motoneurônios do NA aumentam a sua frequência de potenciais de ação durante a fase inspiratória, sugerindo a presença de broncoconstrição nesta fase do ciclo respiratório.

Diante disto, a caracterização eletrofisiológica e funcional dos motoneurônios do DMV que se projetam para as vias aéreas respiratórias não está totalmente clara. Um dos principais fatores que determina as propriedades eletrofisiológicas dos motoneurônios é o seu potencial de repouso (WRIGHT, 2004). De acordo com o mesmo autor, sabe-se que o potencial de repouso é mantido pelo gradiente eletroquímico. O seu valor mais hiperpolarizado em motoneurônios deve-se à maior permeabilidade da membrana ao íon  $K^+$ , mediada principalmente pelos canais de vazamento para o  $K^+$  (KOIZUMI et al., 2008, 2010). Estes canais de vazamento medeiam as principais correntes de vazamento de motoneurônios, e nos últimos anos uma família inteira de genes tem sido descrita. Estes genes diferenciam de outros genes de canais para  $K^+$  em sua estrutura de subunidade, a qual os canais de vazamento para  $K^+$  apresentam em cada subunidade dois *loops* de formação de poro (domínios P) (GOLDSTEIN et al., 2001; LESAGE et al., 1996), formando a classe de canais para  $K^+$  de vazamento KNCK ou  $K_{2p}$  (*Two P loop domain potassium*) com 2P/4 TM (segmentos transmembranares) por subunidade (GOLDSTEIN et al., 2001).

Os canais  $K_{2p}$  apresentam uma particularidade pelo fato de serem regulados por diversos fatores físico-químicos, neuroquímicos endógenos, vias de sinalização e fármacos (BAYLISS; BARRETT, 2008). Estão abertos nos valores de

potencial de membrana em repouso e exibem uma cinética muito rápida de ativação e desativação, e nenhuma inativação (LESAGE et al., 2000), e também podem estar envolvidos em funções mais específicas, como transporte epitelial de  $K^+$  e regulação da excitabilidade neuronal e muscular (GOLDSTEIN et al., 2001).

Os canais  $K_{2p}$  são divididos em 6 subfamílias: TWIK (*tandem of P domains in a weak inwardly-rectifying  $K^+$  channel*), THIK (*TWIK – related halothane-inhibited  $K^+$  channel*), TREK (*TWIK – related K channel*), TASK (*TWIK –related acid-sensitive  $K^+$  channel*), TALK (*TWIK – related alkaline pH activated  $K^+$  channel*) e TRESK (*TWIK – related spinal cord  $K^+$  channel*) (ALLER; WISDEN, 2008). Em diversas regiões do cérebro, a família de canais  $K_{2p}$  determina o potencial de membrana em repouso, a resistência de entrada ( $R_i$ ) e a excitabilidade dos neurônios (ALLER; WISDEN, 2008; BERG, 2004; KINDLER; et al., 2002). Os canais TASK-1, TASK-2 e TASK-3 são sensíveis às alterações do pH extracelular (NIEMEYER et al., 2010; RAJAN et al., 2000), e em condições de acidose ocorre uma diminuição da condutância destes canais causando despolarização das células (KOIZUMI et al., 2010; LARKMAN; PERKINS, 2005). Estes canais apresentam resíduos de aminoácidos em sua estrutura que são os sensores de pH. Os canais TASK-1 e TASK-3, por pertencerem ao mesmo ramo da superfamília, compartilham um resíduo de histidina (H98), enquanto o canal TASK-2 apresenta o resíduo de arginina (R224), localizados na extremidade extracelular TM4 (ZÚÑIGA et al., 2011). Os canais TREK-1 (COHEN et al., 2008; LENGYEL; CZIRJÁK; ENYEDI, 2016; YARISHKIN; PHUONG; KRIŽAJ, 2019; ZÚÑIGA et al., 2011), TWIK-1 (MA et al., 2012) e TRESK (HUANG; YU; FAN, 2008; SANO et al., 2003) também são inibidos por acidificação do meio extracelular, porém o sensor de pH é o resíduo de histidina (H141).

Diversos estudos demonstram a ampla expressão de TASK-1, TASK-2, TASK-3, TREK-1, TWIK-1 e TRESK no sistema nervoso central, gânglios da raiz dorsal e tecidos periféricos (ENYEDI; BRAUN; CZIRJÁK, 2012; HUANG; YU; FAN, 2008; LESAGE et al., 1997; MEDHURST et al., 2001; TALLEY et al., 2001). Alguns autores mencionam a expressão destes canais em regiões envolvidas no controle da respiração, como a expressão de TASK-1 em núcleos motores do tronco encefálico [Núcleo Motor Facial, Núcleo Motor do Hipoglosso (HN), NA, Núcleo Motor do Trigêmeo e o DMV] (BAYLISS et al., 2001), TASK-2 em

neurônios do Núcleo Retrotrapezóide (NIEMEYER et al., 2010), TASK-3 no DMV, HN e *Locus Coeruleus* (BERG, 2004; MARINC et al., 2012) e TREK-1 em neurônios do Núcleo do trato solitário (NTS) e motoneurônios do HN (TALLEY et al., 2001). Por outro lado, os canais TWIK-1 e TRESK são expressos em outras regiões do tronco encefálico que não estão necessariamente envolvidos no controle da respiração (ENYEDI; BRAUN; CZIRJÁK, 2012; HUANG; YU; FAN, 2008; LESAGE et al., 1997).

Sabemos então que os canais de vazamento  $K_{2p}$  (TASK-1 e TASK-3) são inibidos frente à redução do pH extracelular e são expressos no DMV. Diante disto, condições de hipercapnia/acidose podem levar ao aumento das respostas parassimpáticas para as vias aéreas respiratórias, por meio da despolarização dos motoneurônios parassimpáticos do DMV, afetando o tônus da musculatura lisa (broncoconstrição) e a secreção mucosa (CYPHERT; et al., 2009). É provável que em alguns casos os sintomas de doenças das vias aéreas respiratórias sejam secundários a atividades inapropriadas dentro do sistema nervoso aferente e eferente (PAN et al., 2009). Sendo assim, o aumento das respostas parassimpáticas para as vias aéreas respiratórias pode contribuir no desenvolvimento de doenças respiratórias comuns como infecções virais do trato respiratório, rinite, bronquite, asma, DPOC e tosse crônica (MAZZONE; UNDEM, 2016). Diante disto, nossa compreensão permanece vaga de como os motoneurônios parassimpáticos do DMV participam do controle das vias aéreas respiratórias, quais as suas propriedades eletrofisiológicas e também como as mesmas são afetadas frente a fatores que estão envolvidos em condições patológicas, como reduções do pH. Para a melhor compreensão dos mecanismos centrais celulares envolvidos nestas condições patológicas, é necessário primeiramente entender como os motoneurônios no tronco encefálico participam no controle das respostas motoras vagais broncoconstritoras em condições fisiológicas. Neste sentido, na presente dissertação de Mestrado levantamos a seguinte hipótese: os canais de vazamento  $K_{2p}$  (TASK-1 e TASK-3) determinam o potencial de membrana em repouso e a sensibilidade à acidose dos motoneurônios parassimpáticos do DMV que se projetam para as vias aéreas respiratórias de ratos. Para testarmos esta hipótese, utilizamos a técnica de *whole cell patch clamp* em fatias do tronco encefálico de ratos e a marcação retrógrada e avaliamos: 1) as características eletrofisiológicas dos motoneurônios respiratórios

parassimpáticos do DMV, com ênfase no controle do potencial de membrana em repouso e da condutância de vazamento; II) os efeitos da hipercapnia/acidose na condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos; III) a participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos, e; IV) a identidade molecular dos canais de vazamento para  $K^+$  dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. A elucidação desses fenômenos eletrofisiológicos pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na geração central da atividade parassimpática para as vias aéreas respiratórias em condições fisiológicas e patológicas, bem como no desenvolvimento de possíveis terapias voltadas para o tratamento de patologias associadas às disfunções no controle aferente sensorial e eferente vagal das vias áreas respiratórias.

## ***Objetivos***



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação dos canais de vazamento  $K_{2p}$  (TASK-1 e TASK-3) na gênese do potencial de membrana em repouso e na sensibilidade à acidose dos motoneurônios parassimpáticos do DMV que se projetam para as vias aéreas respiratórias de ratos.

### 2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar as propriedades eletrofisiológicas passivas de membrana dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- b) Caracterizar a condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- c) Avaliar o efeito da acidose na condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- d) Avaliar o efeito da acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- e) Avaliar a participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- f) Avaliar o efeito da hipercapnia/acidose na condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- g) Avaliar o efeito da hipercapnia/acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.
- h) Avaliar a identidade molecular dos canais de vazamento para  $K^+$  dos motoneurônios respiratórios parassimpáticos do DMV de ratos.

## ***Materiais e Métodos***

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (protocolo #87/2019). Utilizamos ratos Wistar (60-70 g) provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados com ciclo de claro/escuro de 12 h a uma temperatura constante ( $23 \pm 1$  °C) com acesso à comida de rato padrão e água *ad libitum*.

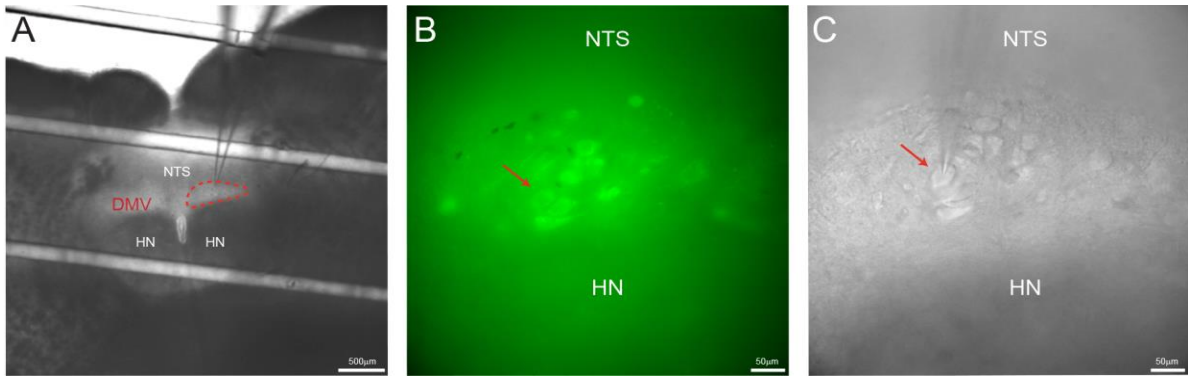
#### 3.2. Identificação dos motoneurônios respiratórios do DMV

Os motoneurônios respiratórios do DMV foram marcados com o traçador retrógrado fluorescente *FluoroGold* (Fluorochrome, UK). O *FluoroGold* é absorvido nas terminações sinápticas dos neurônios, onde é transportado ativamente ou por difusão pelo citoplasma até o corpo celular neuronal sem causar alterações nas propriedades eletrofisiológicas das células (FALGAIROLLE; O'DONOVAN, 2015). Os animais foram anestesiados com a injeção intraperitoneal de mistura cloridrato de cetamina (75 mg/Kg – Agener União, Brasil) + cloridrato de xilasina (5 mg/Kg – Hertape Calier, Brasil). Os animais foram então intubados e o *FluoroGold* (3.5 µl; 5%) foi aplicado topicamente na superfície das vias aéreas respiratórias, onde os gânglios parassimpáticos estão localizados (COLERIDGE, 1994), por meio de um cateter de polietileno (7 cm; PE-10; Clay Adams, EUA). Os animais foram mantidos em caixas com ração e água *ad libitum* para recuperação por 4 dias.

#### 3.3. Experimentos com os motoneurônios respiratórios do DMV

Após quatro dias de recuperação, os animais foram profundamente anestesiados com halotano (100%; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) e decapitados com guilhotina. O tronco encefálico foi rapidamente exposto, removido e imerso em solução gelada (~ 0° C) de fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF) contendo (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; CaCl<sub>2</sub>, 2; osmolalidade entre 300 e 310 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O; continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) para oxigenação e manutenção do pH em 7.4. Fatias coronais (250 µm) do bulbo

contendo o DMV, o NTS e o trato solitário foram obtidas utilizando-se um vibrátomo (Leica VT 1200S, Alemanha). As fatias foram incubadas em aCSF à 33°C durante 30 minutos e após esse período permaneceram à 23°C até o término dos experimentos. Durante os experimentos, as fatias foram transferidas para uma câmara de registro (70 µl) e continuamente superfundidas (2 ml/minuto) com aCSF contendo (em mM): NaCl, 121; KCl, 4; MgCl<sub>2</sub>, 1; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glicose, 10; CaCl<sub>2</sub>, 2; osmolalidade entre 293 a 297 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O; borbulhada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>). As fatias foram imobilizadas na câmara de registro por meio de uma rede de fios de *nylon* montada sobre uma armação de platina e os motoneurônios foram visualizados por meio de um microscópio (BX-51, Olympus, Japão), equipado com óptica de contraste de interferência diferencial e infravermelho (DIC-IR), acoplado a uma câmera sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho (C11440 – Flash 4.0 LT, Japão), a qual estava conectada a um monitor de vídeo. Inicialmente foi feita a identificação dos motoneurônios viáveis na região do DMV presentes na superfície da fatia sob a óptica DIC-IR, e posteriormente, os mesmos motoneurônios foram analisados com o auxílio de um sistema de LED (X-cite 120 LEDBoost, Canadá) sob microscopia de fluorescência para a identificação da presença da marcação fluorescente do traçador *FluoroGold* (excitação em 340 nm e emissão 430 nm) no corpo celular dos mesmos. Somente os motoneurônios que apresentaram marcação para o *FluoroGold*, ou seja, motoneurônios do DMV que se projetam para as vias aéreas respiratórias, foram utilizados durante os experimentos (Figura 1). As correntes e o potencial de membrana foram registrados por meio da técnica de *whole cell patch clamp* (SAKMANN; NEHER, 1984). Eletrodos 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 solução contendo (em mM): gluconato de potássio, 135; KCl, 10; Mg-ATP, 2; Na-GTP, 0.25; ethyleneglycol-bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid (EGTA), 1; *N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid* (HEPES), 10; MgCl<sub>2</sub>, 1 ; CaCl<sub>2</sub>, 0.3; pH 7.4 ajustado com KOH; osmolalidade entre 290 a 295 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O; resistência de ponta entre 4 e 5 MΩ.



**Figura 1. Visualização do DMV na fatia coronal do bulbo e marcação dos motoneurônios respiratórios.** (A) Fatia coronal, sob a óptica DIC-IR, do bulbo de um rato na câmara de registro contendo a região do DMV [circulada em vermelho entre o Núcleo do Trato Solitário (NTS) e o Núcleo Motor do Hipoglossos (HN)] em aumento de 5x. Motoneurônios do DMV, da mesma fatia coronal, sob microscopia de fluorescência (B) e sob a óptica DIC-IR (C) em aumento de 40x. Note a marcação do motoneurônio respiratório do DVM (seta vermelha), após a aplicação do traçador topicamente na superfície das vias aéreas respiratórias, selecionado para o registro eletrofisiológico pela técnica de *whole cell patch clamp*.

Pressão positiva e constante foi aplicada na luz do eletrodo de registro, durante o tempo entre a aproximação do eletrodo e o motoneurônio, com o objetivo de evitar a adesão de impurezas na ponta do mesmo e para afastar qualquer partícula ao redor do motoneurônio que poderia dificultar o contato com a membrana celular. Após a ponta do eletrodo encostar na membrana, a pressão positiva foi interrompida e pressão negativa foi aplicada até o estabelecimento da configuração *cell-attached*, que é caracterizada pela resistência entre o eletrodo e a membrana celular maior do que 1 GΩ. Posteriormente, mediante aplicação adicional de pressão negativa ao eletrodo, a configuração *whole cell* foi obtida, a qual é caracterizada pelo aparecimento das correntes capacitivas da membrana neuronal. Os motoneurônios foram mantidos em um potencial de membrana em repouso de -70 mV e os registros foram efetuados somente após um período de estabilização de 5 minutos depois da obtenção da configuração *whole cell*. Todos os registros foram feitos após compensação da resistência em série (< 20 MΩ) e da capacitância dos motoneurônios. A capacitância celular foi determinada a partir da correção manual dos transientes capacitivos durante o registro em *whole cell patch clamp*. Os sinais foram adquiridos (10 KHz; 2 KHz *low pass*) utilizando-se um amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, EUA) conectado a um computador via a interface A/D (DIGIDATA 1440, Molecular Devices). O software pClamp 10 (Molecular Devices) foi utilizado para a aquisição dos sinais e análise *off-line* dos resultados, como também o software OriginPro 8 (OriginLab Corporation, EUA).

### 3.4. Imunofluorescência

Em alguns experimentos, utilizamos o traçador neuronal biocitina (Molecular Probes, EUA) na solução de pipeta para a marcação dos motoneurônios registrados e análise do seu fenótipo motor. Após o término dos registros eletrofisiológicos, as fatias foram coletadas e armazenadas durante 24 horas em paraformaldeído (4%) e, em seguida, mantidas em solução anticongelante [0.1 M de salina tamponada com fosfato (PBS); 30% de etilenoglicol; 20% de glicerol] (SILVA et al., 2015) à 4° C. A imunofluorescência foi realizada com as fatias flutuantes. Após três lavagens com PBS (0.1 M), as fatias foram bloqueadas e permeabilizadas em PBS contendo soro fetal bovino (10%) e Triton X-100 (0.1%) durante 1 hora à temperatura ambiente. As fatias foram então incubadas em anticorpo primário anti-colina acetiltransferase de cabra (ChaT; 1:500) *over-night*. Após três lavagens com PBS, as fatias foram incubadas em anticorpos secundários: estreptavidina conjugada com Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes) e Alexa 647 anti-cabra de camundongo (1:500; Molecular Probes) por 3 h à temperatura ambiente. As fatias foram lavadas três vezes em PBS e montadas em Fluoromount (Sigma-Aldrich, EUA). As imagens foram coletadas em um microscópio confocal Leica (SP5) com comprimentos de *lasers* 488 e 633 nm e detecção de comprimento de emissão ajustável (MORAES; MACHADO, 2015).

### 3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) de um único motoneurônio

Para a realização do RT-qPCR de um único motoneurônio, o citoplasma de cada motoneurônio registrado foi aspirado para o interior do eletrodo de registro e expelido em um eppendorf. Posteriormente foi submetido à análise quantitativa da expressão dos mRNAs de interesse, para determinar assim a identidade molecular dos canais  $K_{2p}$ . O material passou pela transcrição reversa (RT), que consistiu na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de um molde mRNA. Esta reação foi realizada em um termociclador (*ProFlex™ 3x32-Well PCR System*; ThermoFisher Scientific, EUA) utilizando-se um kit próprio para a RT com hexanucleotídeos randômicos (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Life Technologies Corporation, EUA), seguindo o protocolo

recomendado pelo fabricante. Após a conversão do mRNA para cDNA, o material foi submetido a uma pré-amplificação. Para tal, utilizamos um kit destinado para isso (TaqMan PreAmp Master Mix Kit; Life Technologies Corporation) e as seguintes sondas de hidrólise TaqMan:

I – Canais  $K_{2p}$ : KCNK3 (TASK-1; Rn00583727); KCNK9 (TASK-3; Rn00755967\_m1); KCNK13 – (THIK-1; Rn00755451\_m1), KCNK12 (THIK-2; Rn02132664\_s1), KCNK2 (TREK-1 Rn00597042\_m1) e KCNK10 (TREK-2; Rn00576558\_m1).

II – Gene de referência, controle positivo das reações: Nm\_0311442 ( $\beta$ -Actina).

As reações foram executadas em um termociclador (*ProFlex™ 3x32-Well PCR System*), seguindo as recomendações fornecidas pelo fabricante do kit para 14 ciclos de reação. A reação de RT-qPCR foi realizada em um termociclador com detector de fluorescência modelo *StepOne Plus* (Life Technologies Corporation) com suporte para placas de 96 poços de reação. Cada reação foi feita em *singleplex* e em triplicata, sendo utilizadas as mesmas sondas de hidrólise mencionadas anteriormente e o kit para PCR *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Life Technologies Corporation).

A quantificação relativa foi determinada pelo ciclo do limiar (Ct) para cada canal iônico em cada motoneurônio e normalizada pelo Ct da  $\beta$ -actina ( $\Delta Ct = Ct$  do canal iônico – Ct do gene de referência) (SILVA et al., 2019).

### **3.6. Protocolos experimentais**

#### **3.6.1. Propriedades passivas da membrana dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, analisamos o valor da capacitância dos motoneurônios. Em modo *current clamp*, registramos o valor do potencial de membrana em repouso e injetamos correntes hiperpolarizantes (-10 a -190 pA, intervalos de -10 pA) durante 2000 ms e registramos os valores do potencial de membrana. Determinamos a relação entre a injeção das correntes hiperpolarizantes e os valores do potencial de membrana utilizando uma regressão linear. O valor do coeficiente angular da regressão correspondeu ao valor da  $R_i$  ou *input resistance*.

Para a análise do potencial de membrana em repouso antes do bloqueio da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem (ver abaixo), construímos histogramas de amplitude com largura de caixa (*bin*) de 0.5 segundos de todos os pontos dos 30 segundos finais dos registros. O potencial de membrana em repouso foi considerado o valor de voltagem o qual as células passaram a maior parte do tempo, ou seja, o pico da distribuição nos histogramas (SILVA; VENTURA; VARANDA, 2013). Após o bloqueio da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem, realizamos uma média dos valores do potencial de membrana nos 30 segundos finais dos registros. O bloqueio da transmissão sináptica rápida foi realizado com a superfusão dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos e AMPA e NMDA glutamatérgicos: picrotoxina (30 mM; Sigma-Aldrich), estricnina (10 mM; Sigma-Aldrich), CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; 10 mM; Sigma-Aldrich) e AP-5 (2R-amino-5-fosfonopentanoato; 20 mM; Sigma-Aldrich), respectivamente. Além disso, utilizamos a tetrodotoxina (TTX: 0.5 $\mu\text{M}$ ; Tocris, UK) para bloquear os canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem.

### **3.6.2. Condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, no modo *voltage clamp*, aplicamos rampas de voltagem despolarizantes (30 mV/s; -120 mV a -40 mV). As correntes de vazamento foram isoladas farmacologicamente usando bloqueadores de canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem (TTX), canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (cloreto de cádmio: 200 $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich) e canais para  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem (tetraetilamônio: 5 mM; 4-aminopiridina: 5 mM; Sigma-Aldrich), bem como os que medeiam as correntes catiônicas não seletivas - Ih (cloreto de cério: 3 mM, Sigma-Aldrich) e canais para  $\text{K}^+$  retificadores de entrada (cloreto de bário: 200 $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich). Todos os experimentos também foram feitos na presença dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos e AMPA e NMDA glutamatérgicos. Para análise da condutância de vazamento, uma regressão linear foi construída entre os valores de voltagem de -110 a -90 mV, e o valor do coeficiente angular da regressão correspondeu à condutância de vazamento. O potencial de reversão da corrente



de vazamento foi determinado no valor de voltagem no qual a corrente revertia (igual à zero).

### **3.6.3. Efeitos da acidose na condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, no modo *voltage clamp*, inicialmente aplicamos rampas de voltagem despolarizantes, como na seção 3.4.2, em motoneurônios superfundidos com aCSF em pH 7.4 e, posteriormente, com aCSF em pH ácido. Para isso, reduzimos a concentração de  $\text{NaHCO}_3$  para 7.2 mM, aumentamos a de NaCl para 139 mM e mantivemos a concentração de  $\text{CO}_2$  em 5%. Com base na Equação de *Henderson-Hasselbalch* ( $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$ ;  $\text{pK}_a$ : constante de dissociação;  $\text{A}^-$ : concentração da base;  $\text{HA}$ : concentração do ácido), obtivemos então aCSF em pH de ~ 6.9 (ver Apêndice 1). As correntes de vazamento foram isoladas farmacologicamente, como descrito na seção 3.6.2, e todos os experimentos também foram feitos na presença dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos e AMPA e NMDA glutamatérgicos. As análises da condutância de vazamento e do potencial de reversão da corrente de vazamento foram realizadas como descritas na seção 3.6.2.

### **3.6.4. Efeitos da acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, no modo *current clamp* registramos o potencial de membrana em repouso dos motoneurônios superfundidos com aCSF em pH 7.4 e em pH 6.9. Todos os experimentos também foram feitos na presença de TTX e dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos, AMPA e NMDA glutamatérgicos. A análise do potencial de membrana em repouso foi realizada como descrito na seção 3.6.1.

### **3.6.5. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, no modo *current clamp* registramos o potencial de membrana em repouso dos motoneurônios com aCSF em pH 7.4 e em pH 6.9, na presença da quinidina (50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M; Tocris), um bloqueador dos canais TASK-1 e TASK-3 (HAN et al., 2002; KIM, 2005; KIM; BANG; KIM, 2000; MEADOWS; RANDALL, 2001). Todos os experimentos também foram feitos na presença de TTX e dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos, AMPA e NMDA glutamatérgicos. A análise do potencial de membrana em repouso foi realizada como descrito na seção 3.6.1.

### **3.6.6. Efeitos da hipercapnia/acidose na condutância de vazamento dos motoneurônios brônquicos do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, no modo *voltage clamp* aplicamos rampas de voltagem despolarizantes, como na seção 3.6.2. Inicialmente, utilizamos uma mistura carbogênica com 5% de CO<sub>2</sub> para a obtenção de aCSF em pH 7.4 e outra mistura com 15% de CO<sub>2</sub>, com o auxílio de um misturador de gases (Gas Mixer 4000, Columbus Instruments, EUA), para obtenção de aCSF em pH de ~ 6.9, com base na Equação de *Henderson-Hasselbalch* descrita na seção 3.6.3, mantendo a concentração de NaHCO<sub>3</sub> em 26 mM (ver Apêndice 2). As correntes de vazamento foram isoladas farmacologicamente, como descrito na seção 3.6.2, e todos os experimentos também foram realizados na presença dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos e AMPA e NMDA glutamatérgicos. As análises da condutância de vazamento e do potencial de reversão da corrente de vazamento foram realizadas como descritas na seção 3.6.2.

### **3.6.7. Efeitos da hipercapnia/acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.**

Após a obtenção da configuração *whole cell patch clamp*, no modo *current clamp* registramos o potencial de membrana em repouso dos motoneurônios superfundidos com aCSF com 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.4) e com 15% de CO<sub>2</sub> (pH 6.9),

com base na Equação de *Henderson-Hasselbalch* descrita na seção 3.6.3, mantendo a concentração de NaHCO<sub>3</sub> em 26 mM. Todos os experimentos também foram realizados na presença de TTX e dos antagonistas dos receptores GABAA, glicinérgicos, AMPA e NMDA glutamatérgicos. A análise do potencial de membrana em repouso foi realizada como descrito na seção 3.6.1.

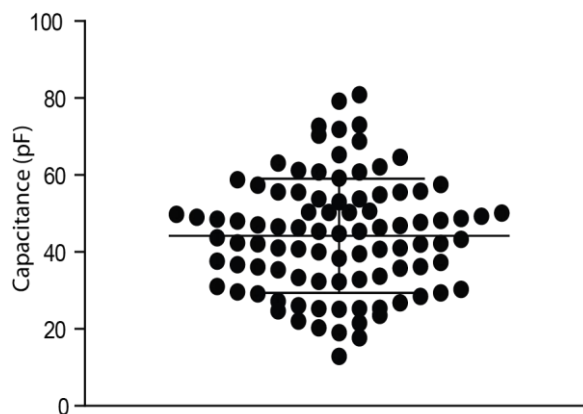
### **3.7. Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e todas as análises foram feitas no software *Prism 5* (GraphPad Software, EUA). Antes das análises, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de *Kolmogorov - Smirnov*. Utilizamos o teste pareado paramétrico *t* de *Student*, pareado não paramétrico de *Wilcoxon*, *One-way ANOVA*, com pós-teste de *Bonferroni* (paramétrico) ou de *Dunn* (não paramétrico), com medidas repetidas, de acordo com o protocolo experimental. O nível de significância assumido foi de  $p < 0.05$ .

## ***Resultados***

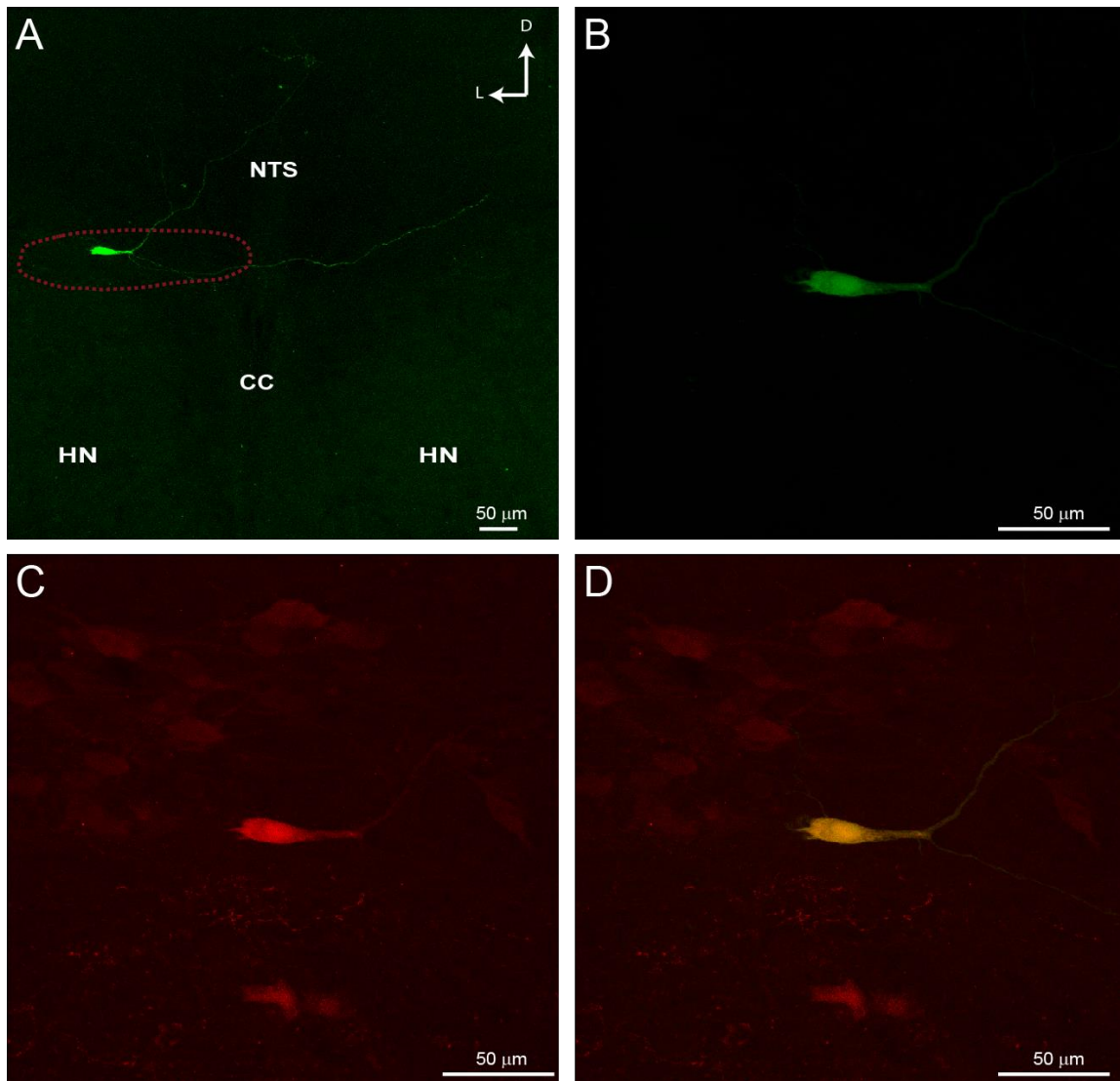
#### 4. RESULTADOS

Registramos 90 motoneurônios localizados no DMV, em 41 ratos, que se projetaram para as vias aéreas respiratórias. Os motoneurônios registrados, nos diferentes protocolos experimentais, apresentaram valores médios de capacitância de  $44.41 \pm 15.36$  pF (Figura 2).



**Figura 2. Capacitância dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.** Dados dispersos dos valores da capacitância de todos os motoneurônios registrados que se projetaram para as vias aéreas respiratórias localizados no DMV de ratos.

Analisamos também o fenótipo motor de quatro motoneurônios registrados no DMV, que se projetaram para as vias aéreas respiratórias, por meio da imunofluorescência, após os registros eletrofisiológicos. A Figura 3, painéis A e B, apresenta uma marcação com biocitina (verde), representativa do grupo, de um motoneurônio registrado na região do DMV que se projetava para as vias aéreas respiratórias. Realizamos também a marcação para ChaT (vermelho) para análise dos motoneurônios do DMV (Figura 3, painel C). Note na Figura 3, painel D, que o motoneurônio registrado na região do DMV apresentava a marcação para ChaT (amarelo), demonstrando assim o fenótipo motor do mesmo.

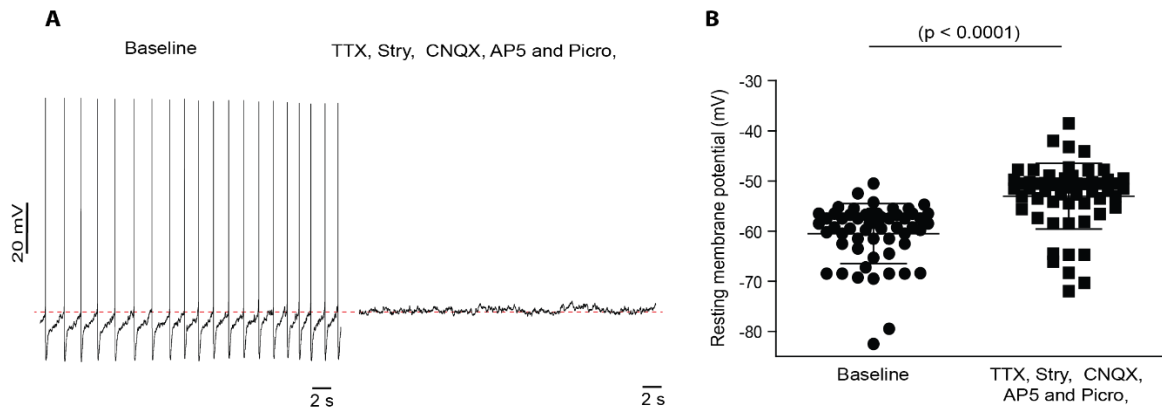


**Figura 3. Fenótipo motor dos motoneurônios respiratórios registrados no DMV.** (A) Corte coronal do bulbo de um rato, representativo do grupo, mostrando a localização de um motoneurônio respiratório registrado, marcado com biocitina (verde), na região do DMV (círculo vermelho). (B) Magnificação do motoneurônio marcado com biocitina em A. (C) Marcação dos motoneurônios do DMV ChaT-positivos (vermelho). (D) Co-localização de ambas as marcações em B e C. Note o fenótipo motor do motoneurônio registrado (amarelo). HN: Núcleo Motor do Hipoglossos; NTS: Núcleo do Trato Solitário; CC: Canal Central; L: Lateral; D: Dorsal.

#### 4.1. Potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.

O potencial de membrana em repouso foi analisado em 57 motoneurônios respiratórios do DMV de 26 ratos no modo *current clamp*. Primeiramente, o potencial de membrana em repouso apresentou uma voltagem de  $-60.49 \pm 5.97$  mV, antes do bloqueio da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. Após a adição destes bloqueadores na solução de superfusão, o potencial de membrana em repouso apresentou uma

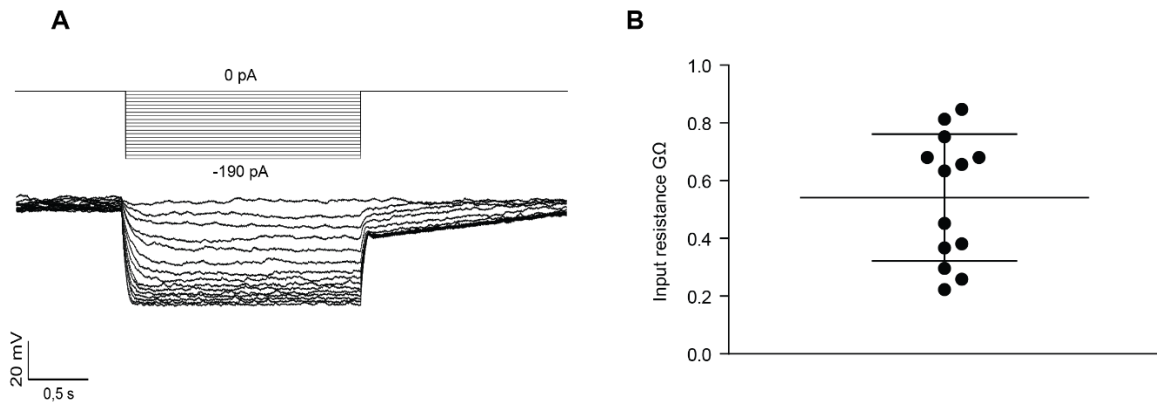
despolarização significativa para  $-53.03 \pm 6.57$  mV;  $p < 0.0001$ ; (Figura 4, painéis A e B).



**Figura 4. Potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registro representativo do potencial de membrana em repouso e da frequência de potenciais de ação de um motoneurônio respiratório do DMV antes e após o bloqueio da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. (B). Dados agrupados do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos antes e após a adição dos bloqueadores na solução de superfusão. Aplicamos o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon*, visto que os dados não apresentaram distribuição dentro da normalidade. TTX: Tetrodotoxina; Stry: Estricnina; Picro: Picrotoxina; CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; AP5: 2R -amino-5-fosfonopentanoato.

#### 4.2. $R_i$ dos motoneurônios respiratórios do DMV.

A  $R_i$  foi analisada em 13 motoneurônios respiratórios do DMV de 8 ratos, no modo *current clamp*, após o bloqueio da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. Foi aplicado pulsos crescentes de correntes hiperpolarizantes (-10 pA, -20pA, -30pA até -190 pA; Figura 5, painel A). Foi determinada então a relação entre a injeção das correntes hiperpolarizantes e os valores do potencial de membrana registrados utilizando uma regressão linear. O valor do coeficiente angular da regressão linear correspondeu ao valor da  $R_i$ , com média de  $0.54 \pm 0.21$  G $\Omega$  (Figura 5, painel B).



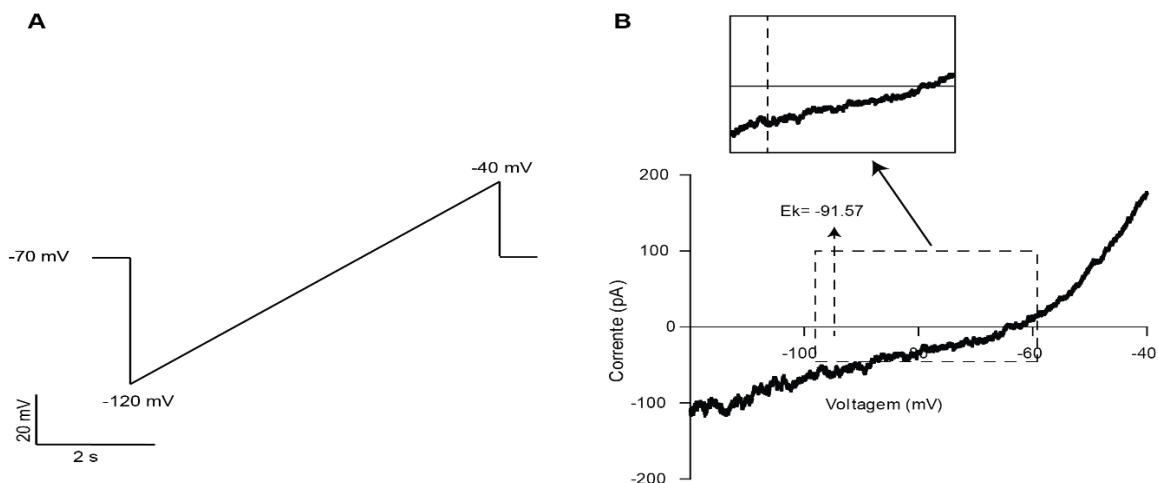
**Figura 5. Ri dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registro representativo de um motoneurônio respiratório do DVM de um rato em resposta à aplicação de pulsos crescentes de correntes hiperpolarizantes utilizados para o cálculo da Ri. (B) Dados agrupados da Ri dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.

### 4.3. Condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.

Para a análise da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV, utilizamos bloqueadores dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem (TTX), canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (cloreto de cádmio), canais para  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem (tetraetilamônio e 4-aminopiridina), canais para  $\text{K}^+$  retificadores de entrada (cloreto de bário), canais que medeiam a corrente Ih (cloreto de céσιο), e, por fim, bloqueadores da transmissão sináptica rápida.

Utilizamos o modo *voltage clamp* para aplicação de rampas de voltagem despolarizantes de -120 mV a -40 mV (30 mV/s; Figura 6, painel A). No total foram analisados 12 motoneurônios de 4 ratos. Verificamos que a média da condutância de vazamento foi de  $1.80 \pm 0.55$  nS (Figura 6, painel B). Outro parâmetro analisado foi o ponto de reversão da corrente de vazamento (valor de voltagem o qual a corrente é 0). A média observada foi de  $-64.74 \pm 5.98$  mV (Figura 6, painel B).

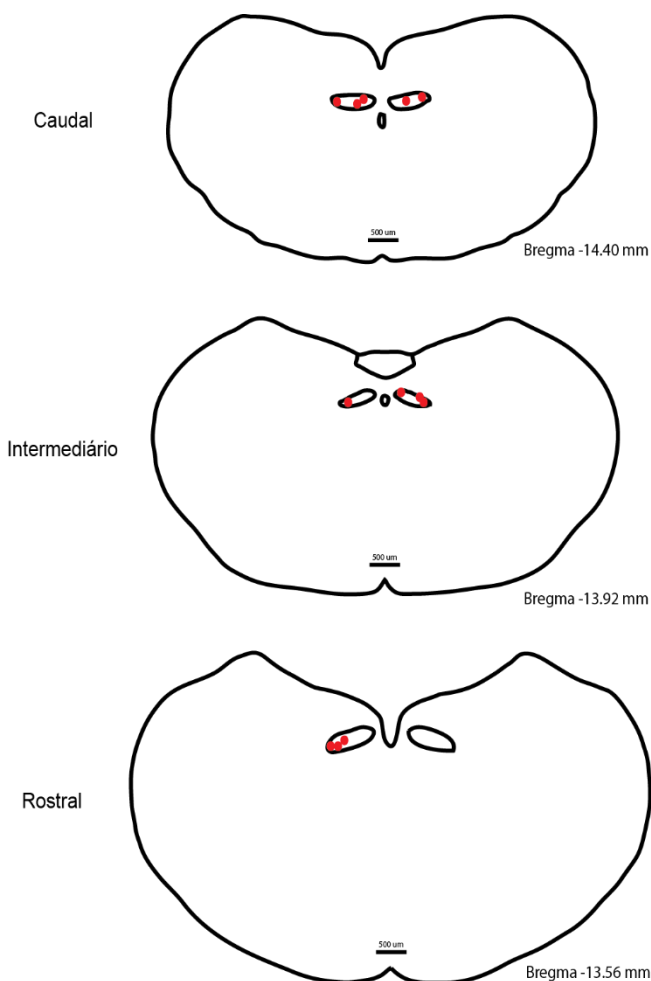




**Figura 6. Condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Protocolo de rampa de voltagem despolarizante para a análise da corrente de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV. (B) Registro representativo da corrente de vazamento de um motoneurônio respiratório do DMV de rato.  $E_k$ : potencial de equilíbrio do  $K^+$ .

Além disto, calculamos o potencial de equilíbrio do  $K^+$  e do  $Na^+$  utilizando a *Equação de Nernst* ( $V_{Eq} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right)$ ); R: é a constante universal de gás igual a  $8.314 \text{ JK}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; T: é a temperatura em Kelvin; z: é a valência das espécies iônicas; F: é a constante de Faraday igual a  $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;  $[X]_{out}$ : é a concentração da espécie iônica no fluido extracelular;  $[X]_{in}$  é a concentração da espécie iônica no fluido intracelular). O potencial de equilíbrio tem como princípio demonstrar qual é a voltagem que o movimento iônico é equilibrado, pela diferença do potencial químico e elétrico, e, portanto, não há corrente resultante. Neste caso o valor do potencial de equilíbrio do  $K^+$  foi de  $-91.57 \text{ mV}$  e o potencial de equilíbrio do  $Na^+$  foi de  $106.57 \text{ mV}$  (ver Apêndices 3 e 4). Sendo assim, o potencial de reversão da corrente de vazamento é mais próximo do potencial de equilíbrio do  $K^+$ . Conseqüentemente, é uma corrente mediada principalmente pelo íon  $K^+$ .

Na figura 7 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal no protocolo experimental da análise da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



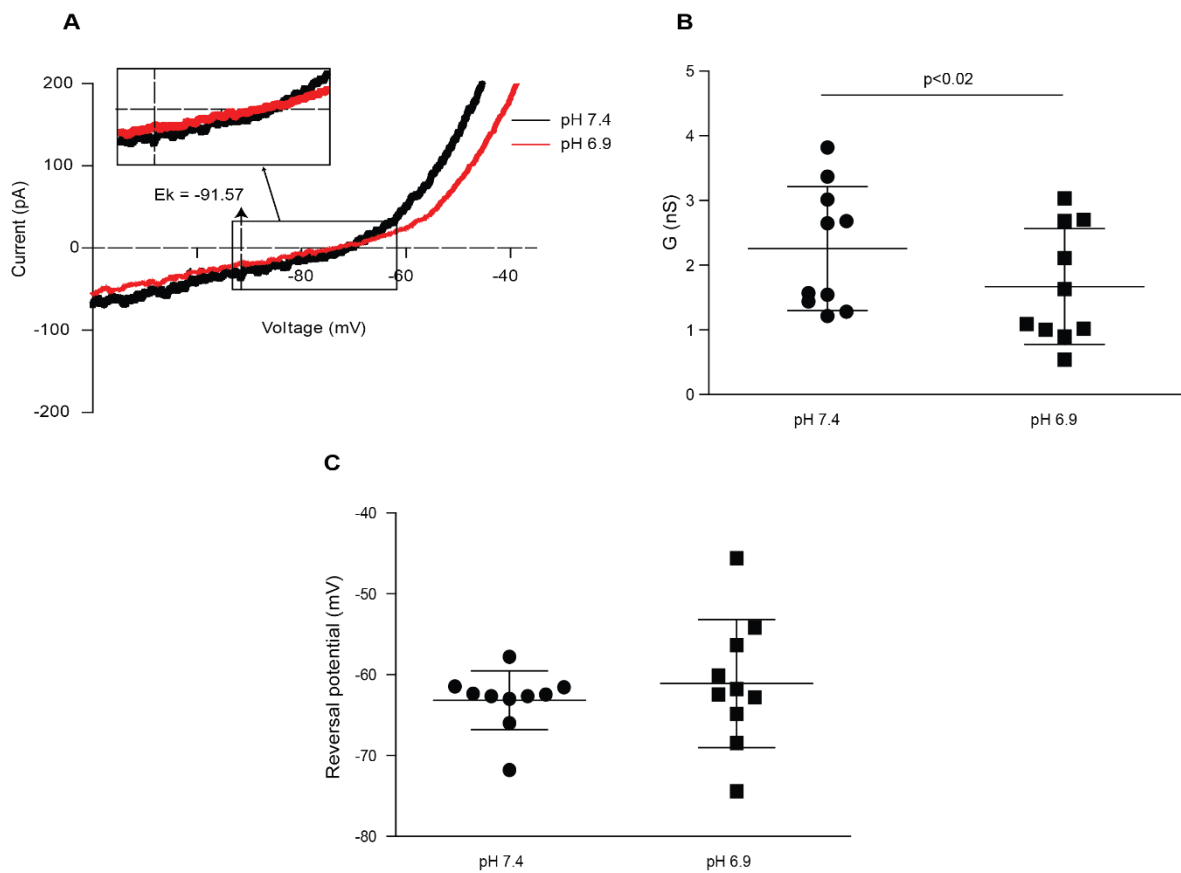
**Figura 7. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados no protocolo experimental da análise da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.

#### **4.4. Sensibilidade à acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.**

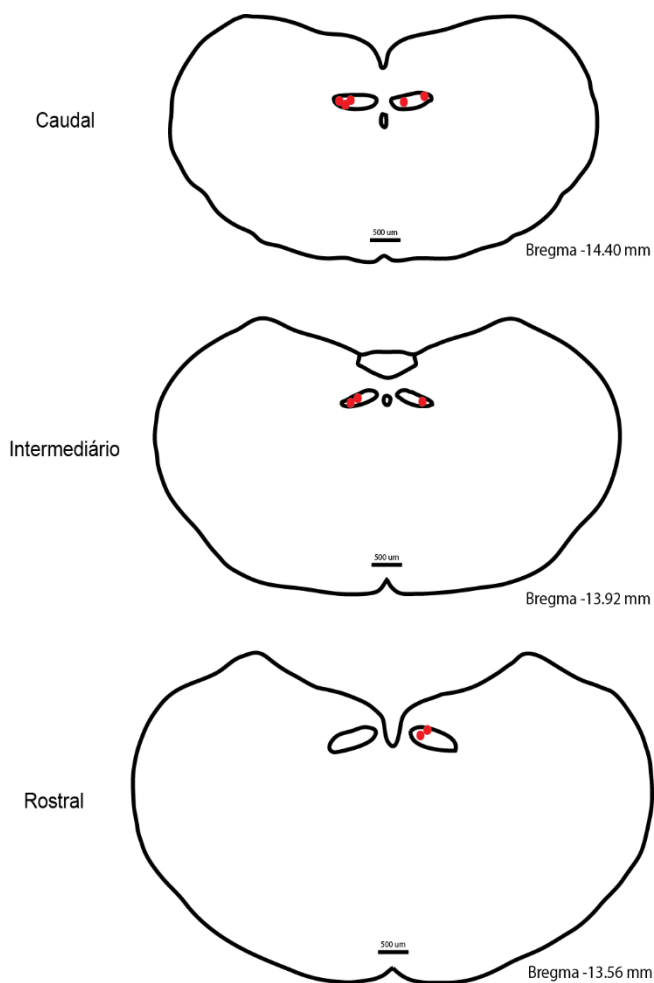
Neste protocolo experimental, realizamos novamente a análise da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV, porém utilizando aCSF em pH 6.9. Utilizamos um pH ácido, visto que a corrente de vazamento dos motoneurônios respiratórios é mediada principalmente pelo íon  $K^+$ , e que canais de vazamento para  $K^+$  sensíveis ao pH ácido estão expressos no DMV (BAYLISS et al., 2001; MARINC et al., 2012). No total foram analisados 10 motoneurônios em 5 ratos. A média da condutância de vazamento de vazamento foi de  $2.25 \pm 0.95$  nS em pH 7.4 e a acidificação do meio extracelular

reduziu a condutância para  $1.67 \pm 0.89$  nS ( $p < 0.02$ ; Figura 8, painéis A e B). Não foi observada alterações significativas no potencial de reversão das correntes de vazamento registradas nos diferentes valores de pH ( $-63.16 \pm 3.6$  vs  $-61.09 \pm 7.9$  mV;  $p = 0.62$ ; Figura 8, painel C).

Na figura 9 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal no protocolo experimental da análise da sensibilidade ao ácido da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



**Figura 8. Sensibilidade à acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registros representativos da corrente de vazamento de um motoneurônio respiratório do DMV de rato em pH 7.4 (linha preta) e 6.9 (linha vermelha).  $E_K$ : potencial de equilíbrio do  $K^+$ . (B) Dados agrupados da condutância de vazamento de cada motoneurônio registrado com os dois valores de pH utilizados. Aplicamos o teste pareado paramétrico t de *Student*, visto que os dados apresentaram distribuição dentro da normalidade. (C) Dados agrupados do potencial de reversão da corrente de vazamento de cada motoneurônio registrado com os dois valores de pH utilizados. Aplicamos o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon*, visto que os dados não apresentaram distribuição dentro da normalidade.



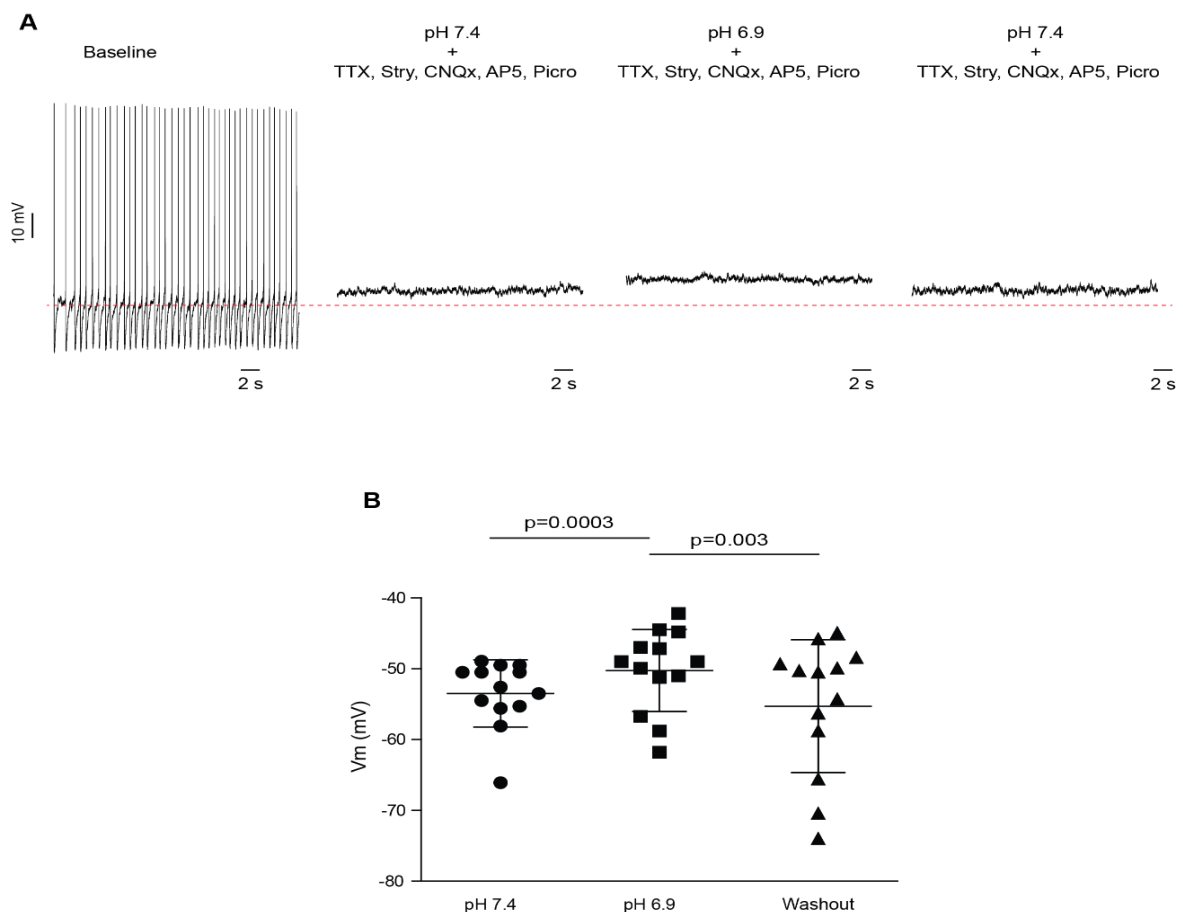
**Figura 9. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados no protocolo experimental da análise da sensibilidade à acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.

#### **4.5. Sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.**

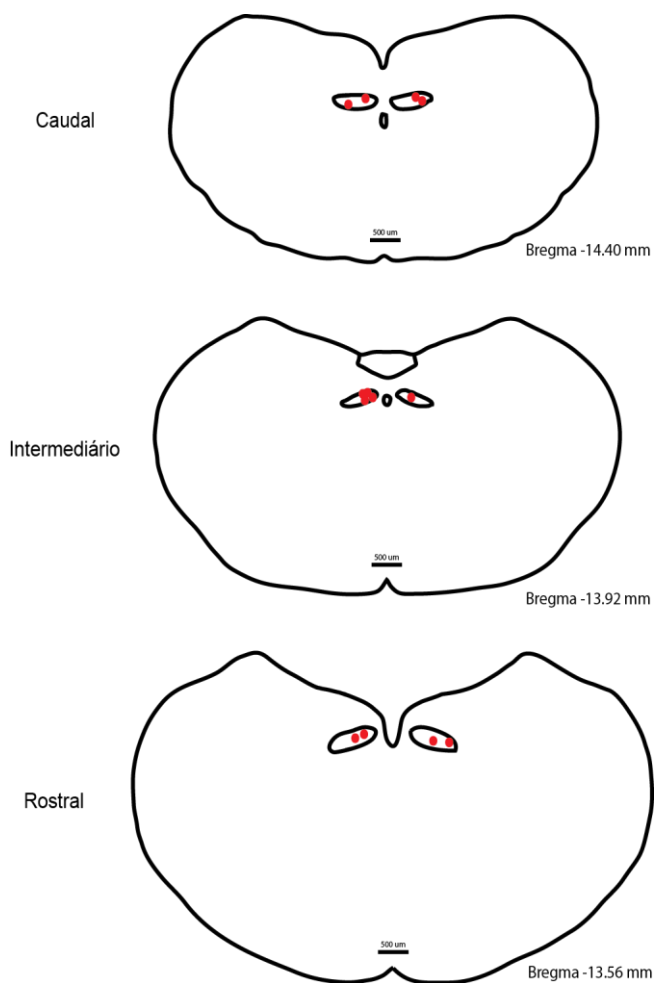
Neste protocolo experimental, propusemos investigar o efeito do pH ácido no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV, considerando a redução significativa da condutância de vazamento dos mesmos quando expostos à acidose. Os motoneurônios registrados foram submetidos a diferentes soluções de aCSF em pH 7.4 e pH 6.9 na presença dos bloqueadores da transmissão sináptica rápida e bloqueador de canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. Registramos 13 motoneurônios de 8 ratos. Inicialmente, o potencial de membrana em repouso estava em  $-59.32 \pm 4.48$  mV com aCSF em pH 7.4. Ao

superfundimos os mesmos com aCSF em pH 7.4 contendo os bloqueadores citados acima, o potencial de membrana em repouso se alterou para  $-56.47 \pm 5.44$  mV. O aCSF em pH 6.9, contendo os bloqueadores descritos acima, despolarizou significativamente o potencial de membrana para  $-50.23 \pm 5.77$  mV ( $p=0.0003$ ). Por fim, voltamos para as condições iniciais com aCSF em pH 7.4, contendo os bloqueadores, e observamos o retorno do potencial de membrana em repouso para  $-55.27 \pm 9.38$  mV (Figura 10, painéis A e B).

Na figura 11 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal no protocolo experimental da análise do potencial de membrana em repouso e da sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



**Figura 10. Sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registros representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um motoneurônio respiratório do DMV de rato em condições basais (pH 7.4), em pH 7.4 com os bloqueadores da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem, em pH 6.9 com os mesmos bloqueadores e em pH 7.4 novamente com os mesmos bloqueadores (*washout*). (B) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso de cada motoneurônio registrado nas diferentes condições experimentais descritas acima. Aplicamos o teste *One-way ANOVA* paramétrico com medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*, visto que os dados apresentaram distribuição dentro da normalidade.



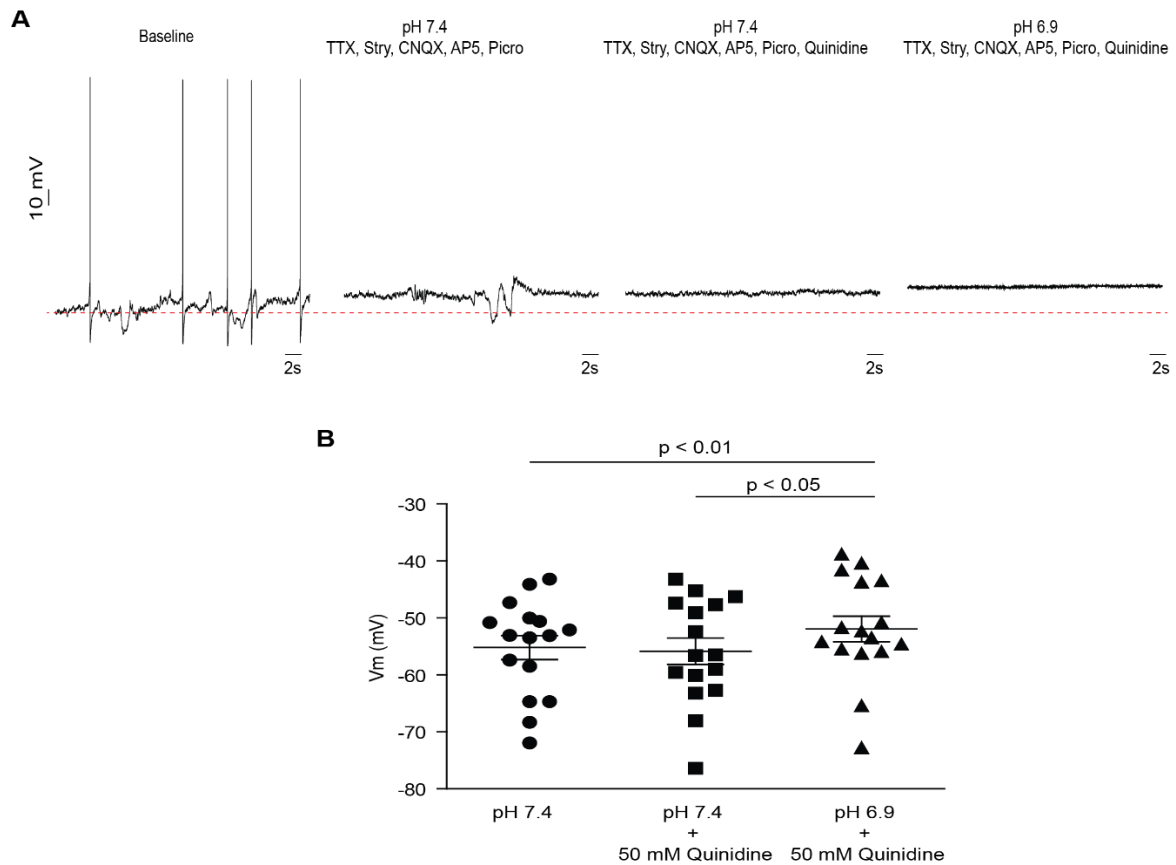
**Figura 11. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados nos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.

#### **4.6. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.**

Neste protocolo experimental, utilizamos a quinidina, como bloqueador de canais TASK-1 e TASK-3, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , para verificarmos a contribuição destes canais na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. Analisamos 14 motoneurônios de 5 ratos. Inicialmente, o potencial de membrana em repouso foi de  $-61.14 \pm 5.38$  mV com aCSF em pH 7.4. Assim como descrito acima, a superfusão de aCSF em pH 7.4 com bloqueadores da transmissão sináptica

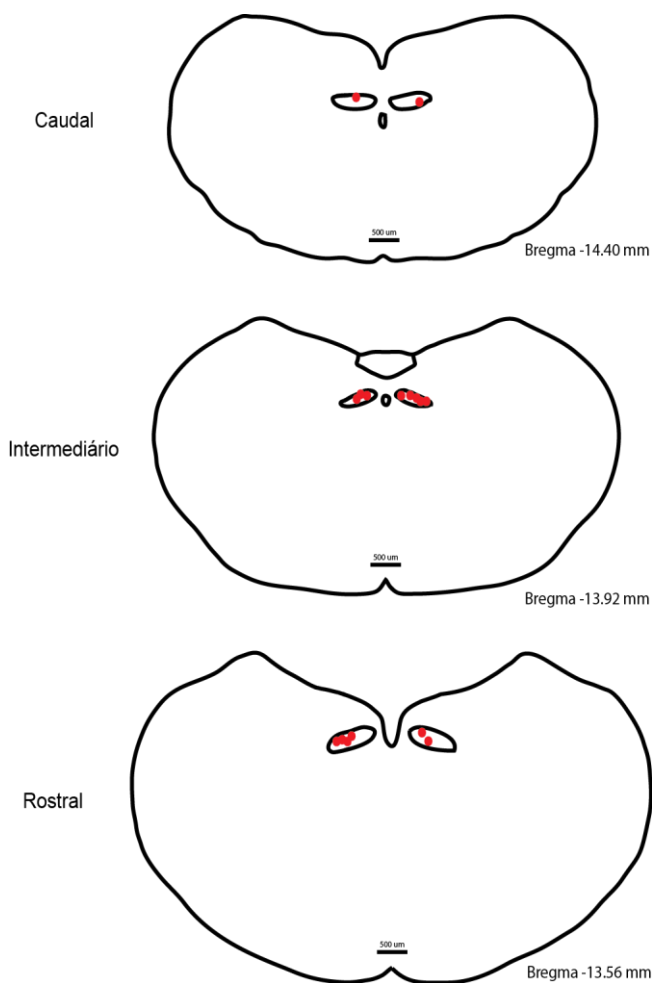
rápida e dos canais para Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem promoveu uma alteração do potencial de membrana em repouso para  $-56.14 \pm 8.61$  mV. A superfusão dos motoneurônios com aCSF em pH 7.4, com os bloqueadores mencionados anteriormente mais a quinidina, não promoveu alterações significativas no potencial de membrana em repouso ( $-55.13 \pm 7.51$  mV;  $p= 0.38$ ). Por fim, utilizamos aCSF em pH 6.9, com os bloqueadores descritos acima e a quinidina, e verificamos que a acidose ainda foi capaz de despolarizar significativamente o potencial de membrana em repouso para  $-51.03 \pm 7.42$  mV ( $p < 0.05$ ; Figura 12, painéis A e B).

Na figura 13 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal nos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da participação dos canais TASK-1 e TASK-3 (50  $\mu$ M quinidina) na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



**Figura 12. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registros representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um motoneurônio respiratório do DMV de rato em condições basais (pH 7.4), em pH 7.4 com os bloqueadores da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem e a quinidina (50  $\mu\text{M}$ ) e em pH 6.9 com os mesmos bloqueadores. (B) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso de cada motoneurônio registrado nas diferentes condições experimentais descritas acima. Aplicamos o teste *One-way ANOVA* paramétrico com medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*, visto que os dados apresentaram distribuição dentro da normalidade.



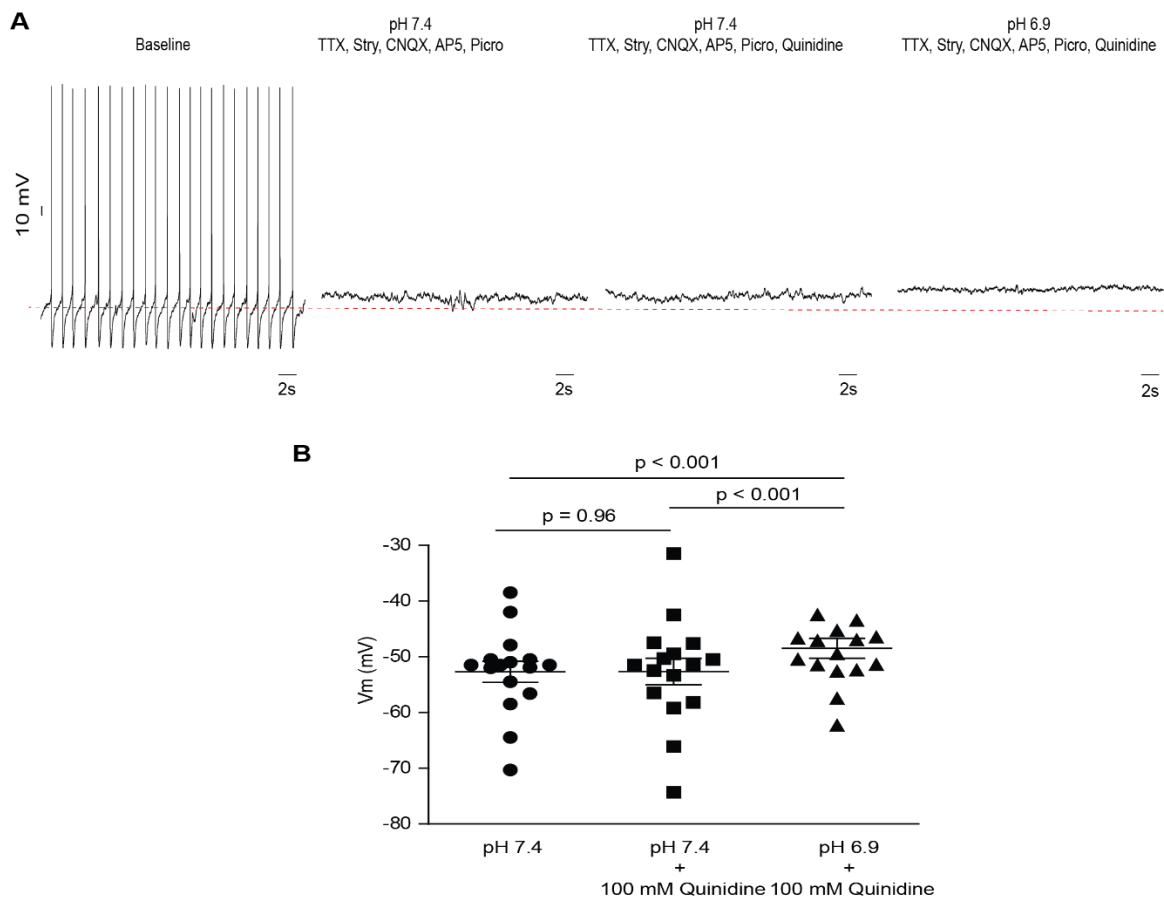


**Figura 13. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados nos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da participação dos canais TASK-1 e TASK-3 (50  $\mu$ M quinidina) na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.

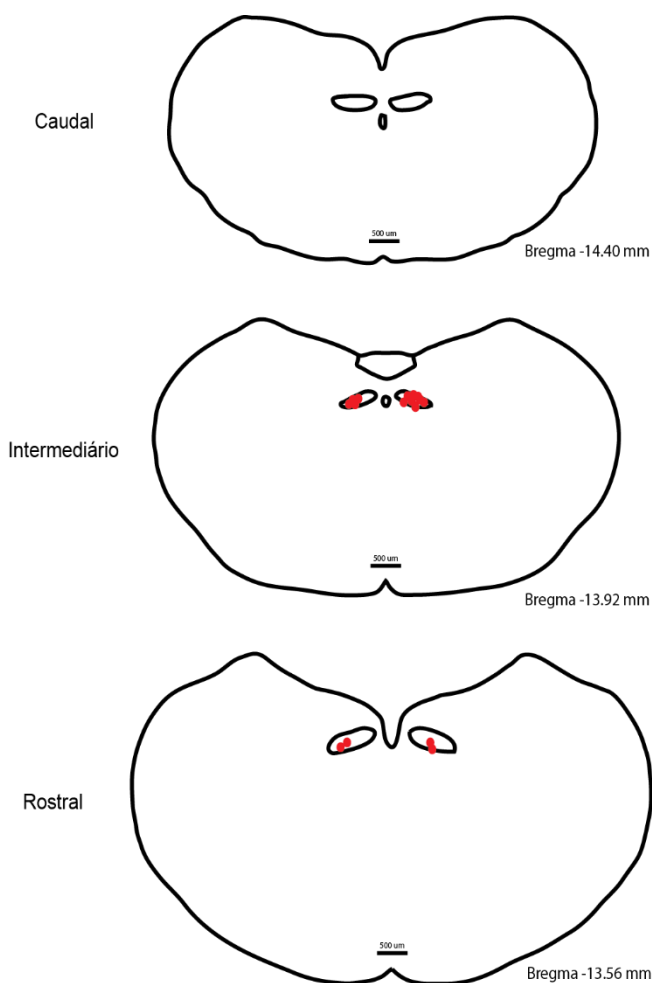
Posteriormente, repetimos o protocolo anterior, aumentando a concentração do bloqueador dos canais TASK-1 e TASK-3 para 100  $\mu$ M (HAN et al., 2002; KIM, 2005; KIM; BANG; KIM, 2000; MEADOWS; RANDALL, 2001) considerando a ausência de efeitos da concentração anterior no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. Analisamos 16 motoneurônios de 5 ratos. O potencial de membrana em repouso estava em  $-62.75 \pm 8.29$  mV com aCSF em pH 7.4 na ausência dos bloqueadores da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. A superfusão com aCSF em pH 7.4, contendo bloqueadores descritos acima, promoveu alteração do potencial de membrana em repouso para  $-52.70 \pm 7.56$

mV. Assim como na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , a superfusão de quinidina 100  $\mu\text{M}$  com aCSF em pH 7.4, contendo os mesmos bloqueadores descritos acima, não alterou o potencial de membrana em repouso ( $-52.66 \pm 9.53$  mV;  $p = 0.96$ ). Por fim, a superfusão com aCSF em pH 6.9, contendo bloqueadores descritos acima e a quinidina 100  $\mu\text{M}$ , foi capaz de despolarizar o potencial de membrana em repouso para  $-48.49 \pm 7.16$  mV ( $p < 0.001$ ; Figura 14, painéis A e B).

Na figura 15 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal nos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da participação dos canais TASK-1 e TASK-3 (100  $\mu\text{M}$  quinidina) na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



**Figura 14. Participação dos canais TASK-1 e TASK-3 na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registros representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um motoneurônio respiratório do DMV de rato em condições basais (pH 7.4), em pH 7.4 com os bloqueadores da transmissão sináptica rápida e dos canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem e a quinidina (100  $\mu\text{M}$ ) e em pH 6.9 com os mesmos bloqueadores. (B) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso de cada motoneurônio registrado nas diferentes condições experimentais descritas acima. Aplicamos o teste *One-way ANOVA* não paramétrico com medidas repetidas com pós-teste de *Dunn*, visto que os dados não apresentaram distribuição dentro da normalidade.



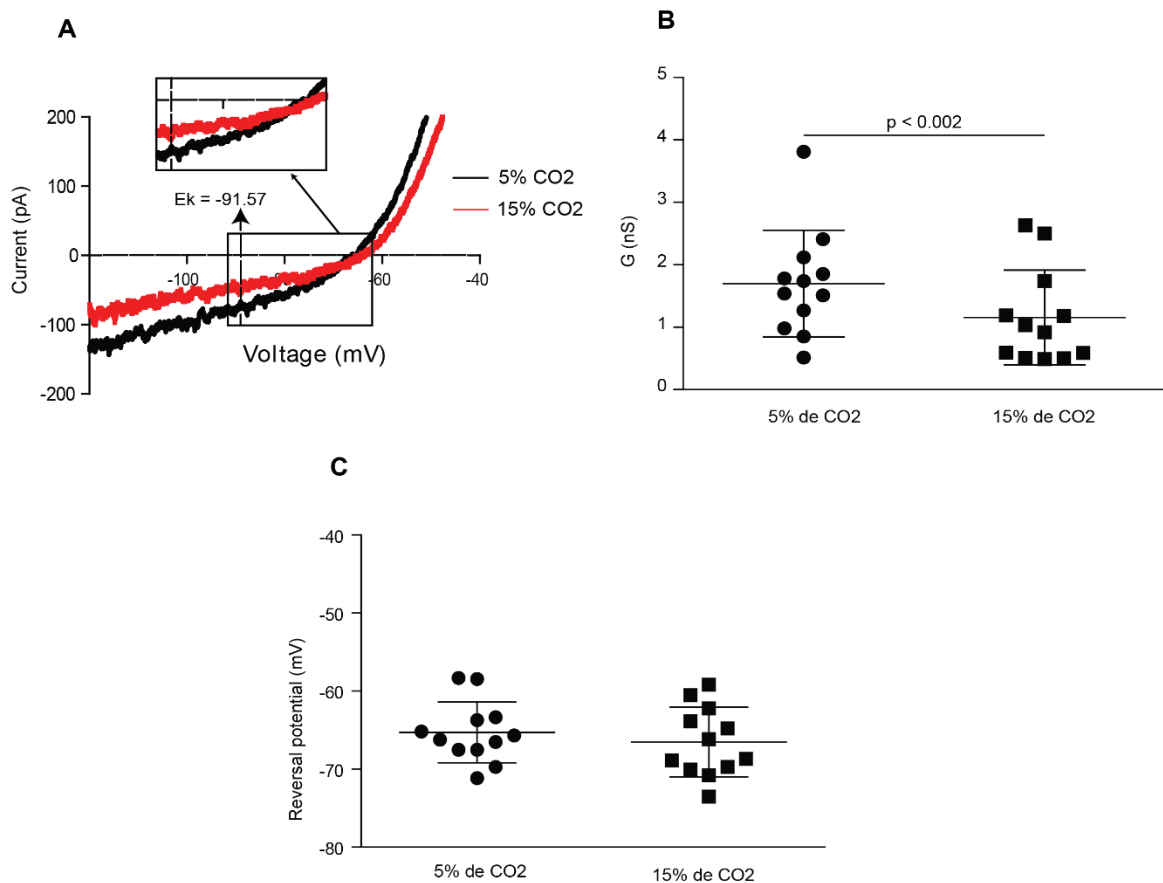
**Figura 15. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados dos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da participação dos canais TASK-1 e TASK-3 (100  $\mu$ M quinidina) na sensibilidade à acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.

#### **4.7. Sensibilidade à hipercapnia/acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.**

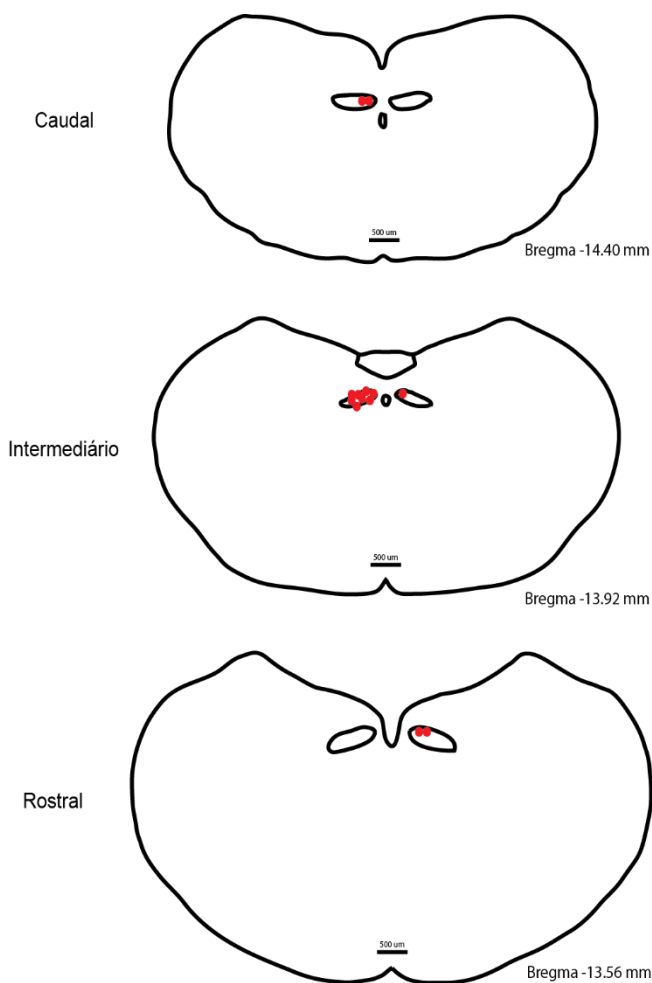
Neste protocolo experimental, utilizamos uma condição de hipercapnia/acidose, aumentando a concentração de  $\text{CO}_2$ , para verificar se este estímulo também seria capaz de reduzir a condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. No total foram analisados 12 motoneurônios de 7 ratos. Os registros da corrente de vazamento foram realizados como descritos na seção 4.3. Verificamos que a média da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV em 5% de

CO<sub>2</sub> (pH 7.4) foi de  $1.69 \pm 0.85$  nS. A hipercapnia/acidose, com 15% de CO<sub>2</sub> (pH 6.9), reduziu significativamente a condutância de vazamento para  $1.15 \pm 0.75$  nS ( $p < 0.002$ ; Figura 16, painéis A e B). Por outro lado, não observamos alterações significativas no potencial de reversão da corrente de vazamento ( $-65.28 \pm 3.91$  mV vs  $-66.52 \pm 4.45$  mV;  $p = 0.35$ ; Figura 11, painel C).

Na figura 17 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal no protocolo experimental da análise da sensibilidade à hipercapnia/acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



**Figura 16. Sensibilidade à hipercapnia/acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registros representativos da corrente de vazamento de um motoneurônio respiratório do DMV de rato em 5% de CO<sub>2</sub> [pH 7.4 (linha preta)] e 15% de CO<sub>2</sub> [pH 6.9 (linha vermelha)]. E<sub>K</sub>: potencial de equilíbrio do K<sup>+</sup>. (B) Dados agrupados da condutância de vazamento de cada motoneurônio registrado com as duas concentrações de CO<sub>2</sub> utilizadas. Aplicamos o teste pareado paramétrico t de *Student*, visto que os dados apresentaram distribuição dentro da normalidade. (C) Dados agrupados do potencial de reversão da corrente de vazamento de cada motoneurônio registrado com as duas concentrações de CO<sub>2</sub> utilizadas. Aplicamos o teste pareado paramétrico t de *Student*, visto que os dados apresentaram distribuição dentro da normalidade.



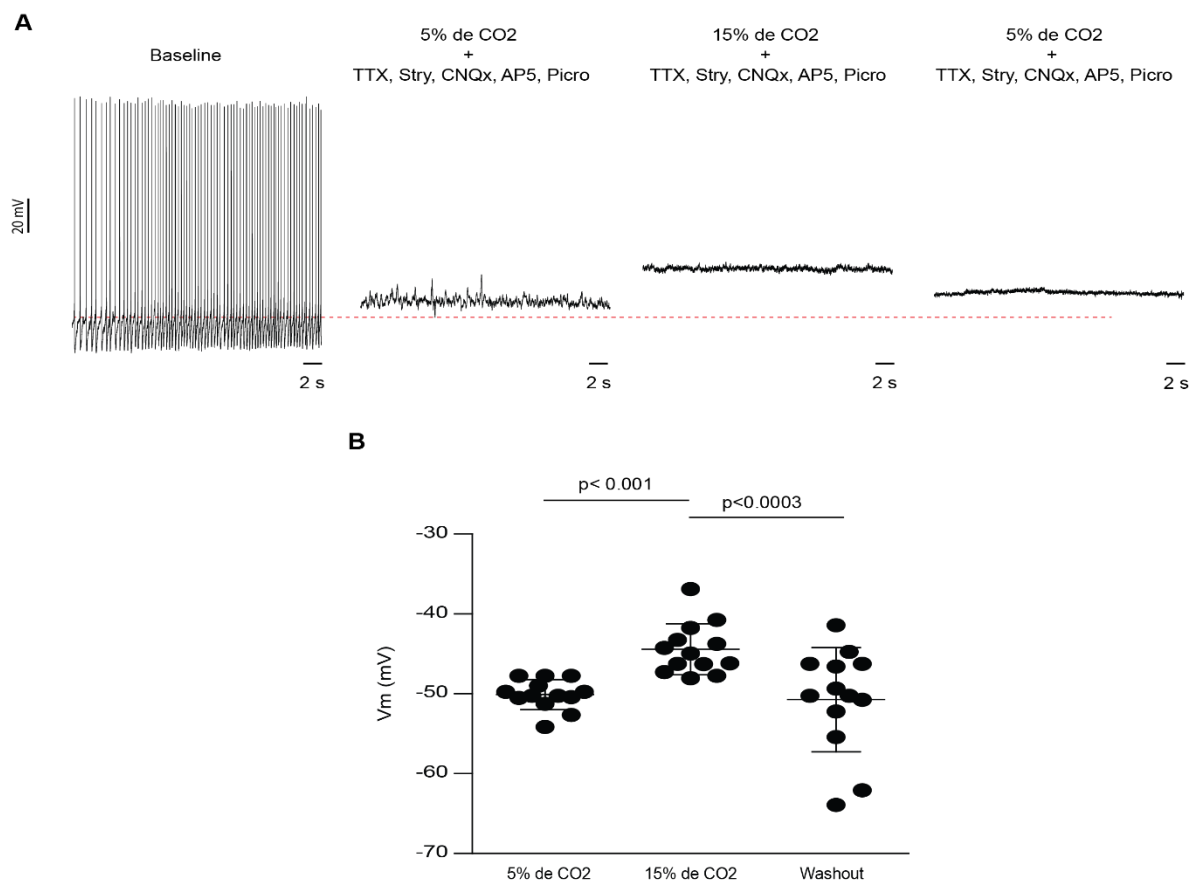
**Figura 17. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados no protocolo experimental da análise da sensibilidade à hipercapnia/acidose da condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV.

#### **4.8. Sensibilidade à hipercapnia/acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.**

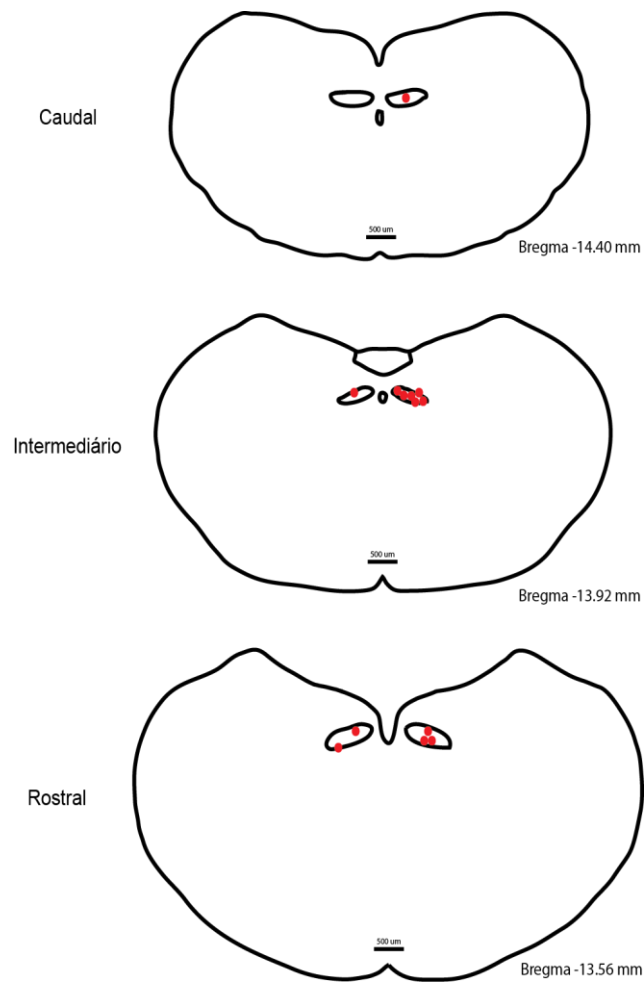
Neste protocolo experimental, propusemos investigar o efeito da hipercapnia/acidose no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV, considerando a redução significativa da condutância de vazamento dos mesmos quando expostos a esta condição experimental. Registramos 13 motoneurônios de 7 ratos. Inicialmente, o potencial de membrana em repouso estava em  $-60.25 \pm 1.97$  mV com aCSF em 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.4). Ao superfundimos os mesmos com aCSF em 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.4), contendo os bloqueadores da transmissão sináptica rápida e dos canais para

Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem, o potencial de membrana em repouso se alterou para  $-54.14 \pm 1.88$  mV. O aCSF em 15% de CO<sub>2</sub> (pH 6.9), contendo os bloqueadores descritos acima, despolarizou significativamente o potencial de membrana em repouso para  $-48.04 \pm 3.18$  mV ( $p < 0.001$ ). Por fim, voltamos para as condições iniciais com aCSF em 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.4), contendo os bloqueadores descritos acima, e observamos o retorno do potencial de membrana em repouso para  $-55.73 \pm 6.51$  mV (Figura 18, painéis A e B).

Na figura 19 está demonstrada a distribuição anatômica rostro-caudal nos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da sensibilidade à hipercapnia/acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos registrados.



**Figura 18. Sensibilidade à hipercapnia/acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.** (A) Registros representativos do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação de um motoneurônio respiratório do DMV de rato em condições basais (5% de CO<sub>2</sub>; pH 7.4), em 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.4) com os bloqueadores da transmissão sináptica rápida e dos canais para Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem, em 15% de CO<sub>2</sub> (pH 6.9) com os mesmos bloqueadores e em 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.4) novamente com os mesmos bloqueadores (washout). (B) Dados agrupados do potencial de membrana em repouso de cada motoneurônio registrado nas diferentes condições experimentais descritas acima. Aplicamos o teste One-way ANOVA paramétrico com medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni, visto que os dados apresentaram distribuição dentro da normalidade.



**Figura 19. Distribuição rostro-caudal dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados.** Representação esquemática de cortes coronais da região do bulbo de rato mostrando a distribuição dos motoneurônios registrados nos protocolos experimentais da análise do potencial de membrana em repouso e da sensibilidade à hipercapnia/acidose do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV.

#### **4.9. Expressão dos canais de vazamento para $K^+$ ( $K_{2p}$ ) nos motoneurônios respiratórios do DMV.**

Analizamos a expressão do mRNA dos canais TASK-1 e TASK-3 em 13 motoneurônios respiratórios do DMV de 6 ratos. Não detectamos a expressão do mRNA para os canais TASK-1 e TASK-3 em nove motoneurônios analisados, enquanto 4 motoneurônios não amplificaram o controle endógeno (Tabela 1). Posteriormente, analisamos a expressão do mRNA para os canais THIK-1, THIK-2, TREK-1 e TREK-2 nos mesmos 13 motoneurônios registrados. Não detectamos a expressão do mRNA dos canais THIK-1, TREK 1 e TREK 2,

porém, houve a expressão em 8 motoneurônios do mRNA do canal THIK-2. Por outro lado, 4 motoneurônios não expressaram o controle endógeno e 1 motoneurônio não expressou o mRNA do canal THIK-2, apesar da expressão do mRNA do controle endógeno (Tabela 2).

SONDAS	Células												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TASK-1 (KCNK3)	NF	-	-	-	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	-
TASK-3 (KCNK9)	NF	-	-	-	-	-	-	NF	NF	NF	-	-	-

**Tabela 1. Expressão dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> (TASK-1 e TASK-3) nos motoneurônios respiratórios do DMV.** Expressão do mRNA dos canais TASK-1 e TASK-3 em 13 motoneurônios respiratórios do DMV de ratos, analisada por meio da técnica de RT-qPCR de um único motoneurônio. NF: Não amplificou o controle endógeno; - : Não houve a detecção da expressão do mRNA dos canais avaliados.

SONDAS	Células												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
THIK-1 (KCNK13)	NF	-	-	-	-	NF	-	NF	-	-	NF	-	-
THIK-2 (KCNK12)	NF	-1,50	-7,23	-1,42	-	NF	-1,49	NF	-1,85	-1,21	NF	-6,16	-8,49
TREK-1 (KCNK2)	NF	-	-	-	-	NF	-	NF	-	-	NF	-	-
TREK-2 (KCNK10)	NF	-	-	-	-	NF	-	NF	-	-	NF	-	-

**Tabela 2. Expressão dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> (THIK-1, THIK-2, TREK-1 e TREK-2) nos motoneurônios respiratórios do DMV.** Expressão do mRNA dos canais (THIK-1, THIK-2, TREK-1 e TREK-2) em 13 motoneurônios respiratórios do DMV de ratos, analisada por meio da técnica de RT-qPCR de um único motoneurônio. Os valores representados se referem ao  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct$  do canal iônico –  $Ct$  do gene de referência); NF: Não amplificou o controle endógeno; - : Não houve a detecção da expressão do mRNA dos canais avaliados.



## ***Discussão***

## 5. DISCUSSÃO

A inervação eferente parassimpática tem como função controlar a contração da musculatura lisa e secreção mucosa nas vias aéreas respiratórias (MAZZONE, 2002; MYERS, 2007). Os motoneurônios pré-ganglionares parassimpáticos que se encontram no DMV se projetam para as vias aéreas respiratórias (FONTÁN; DIEC; VELLOFF, 2000; HADZIEFENDIC; HAXHIU, 1999; HAXHIU et al., 1993; KALIA; MESULAM, 1980). Sabe-se que em diferentes patologias do sistema respiratório ocorre a redução do pH arterial e aumento da PaCO<sub>2</sub> (ARAUJO et al., 2008; CABRAL; MUELLER, 2010; VENKATARAMAN et al., 2020). Além disso, canais de vazamento K<sub>2P</sub>, especificamente canais do tipo TASK-1 e TASK-3, são altamente expressos no DMV e também são sensíveis às alterações no pH extracelular (BAYLISS et al., 2001; BERG, 2004; MARINC et al., 2012; NIEMEYER et al., 2010; RAJAN et al., 2000). Em contrapartida, a contribuição desses motoneurônios para a broncoconstrição e secreção de muco em ratos ainda não foi completamente estabelecida. Desta forma, é de suma importância descrever as características eletrofisiológicas dos motoneurônios respiratórios do DMV, a participação dos canais de vazamento para K<sup>+</sup> na gênese do potencial de membrana em repouso e na sensibilidade à hipercapnia/acidose.

Inicialmente, buscamos descrever as características eletrofisiológicas dos motoneurônios respiratórios do DMV, com ênfase na compreensão da gênese do potencial de membrana em repouso dos mesmos. Observamos que a condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV é mediada principalmente pelo K<sup>+</sup>, e que a mesma é reduzida frente à acidificação do meio extracelular. Observamos também, que a acidificação do meio extracelular levou a despolarização do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. Além disto, descrevemos, por meio da farmacologia, a não contribuição dos canais TASK-1 e TASK-3 na gênese do potencial de membrana em repouso e na sensibilidade à acidose destes motoneurônios. Estes dados foram confirmados, por meio da técnica RT-qPCR de um único motoneurônio, pela ausência da expressão do mRNA destes canais nos motoneurônios respiratórios do DMV. Por fim, verificamos que a hipercapnia/acidose foi capaz de produzir alterações semelhantes àsquelas observadas quando da acidose sem alteração do CO<sub>2</sub> na condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso dos

motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. Portanto, os dados demonstram que a corrente de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV é mediada por canais para  $K^+$ , e que estes canais determinam a sensibilidade à hipercapnia/acidose dos motoneurônios respiratórios.

Os motoneurônios respiratórios do DMV registrados apresentaram características eletrofisiológicas passivas (capacitância, potencial de membrana em repouso e  $R_i$ ) semelhantes a outros motoneurônios parassimpáticos do DMV e NA (BROWNING; RENEHAN; TRAVAGLI, 1999; LIVINGSTON; BERGER, 1993; MORAES; MACHADO, 2015; SAH, 1992; SAH; MCLACHLAN, 1993; WANG; BIEGER; NEUMAN, 1991). Além disso, demonstramos por meio de técnica de imunofluorescência, que os motoneurônios que se projetam para as vias áreas respiratórias apresentaram marcação para ChaT (GOULD; WOOLF; BUTCHER, 1991). Desta forma, os motoneurônios registrados apresentaram características eletrofisiológicas de motoneurônios e fenótipo motor.

A partir da descrição das características eletrofisiológicas passivas, propusemos investigar a condutância de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos, pois se sabe que este é um fator importante para determinar o potencial de membrana em repouso dos mesmos (NIEMEYER et al., 2016). Sabe-se que tais canais de vazamento são pouco modulados por voltagem e apresentam ausência de cinética muito rápida de ativação e desativação, e nenhuma inativação (LESAGE et al., 2000). Demonstramos que a corrente de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos reverte próximo ao  $E_k$ , corroborando com os dados encontrados na literatura referentes à motoneurônios de outras regiões do tronco encefálico, tais como do Núcleo Motor Facial e do HN, nos quais os canais de vazamento para  $K^+$  desempenham um papel importante na condutância de vazamento dos mesmos (LARKMAN; PERKINS, 2005; XU et al., 2009). Entretanto, verificamos que a corrente de vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV registrados está consideravelmente despolarizada ao  $E_k$ . Diante disto, acreditamos que esta despolarização decorra de uma condutância catiônica relativamente pequena, aberta e não seletiva dos canais de vazamento para  $Na^+$  (NALCN) que apresentam potencial de reversão entre -10 e 0 mV (LU et al., 2007; REN, 2011; SHI et al., 2016). Sendo assim, nossos resultados demonstram que a corrente de

vazamento dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos é principalmente mediada pelo íon  $K^+$ .

Ao verificarmos que a corrente de vazamento é principalmente mediada pelo íon  $K^+$ , consideramos então a participação dos canais de vazamento  $K_{2p}$ , da subfamília TASK que são expressos no sistema nervoso central (KANG; HAN; KIM, 2006; MEDHURST et al., 2001; TALLEY et al., 2001), principalmente TASK-1 e TASK-3 que são expressos no DMV (BAYLISS et al., 2001; MARINC et al., 2012), e que estes canais apresentam sensibilidade às alterações no pH extracelular (BROWN, 2000; NIEMEYER et al., 2010; RAJAN et al., 2000; SIROIS et al., 2000; TALLEY et al., 2000). Vale destacar que utilizamos aCSF em pH muito baixo (pH 6.9), para maximizar as respostas da condutância de vazamento e do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. Diante disto, verificamos que houve uma redução significativa da condutância de vazamento dos mesmos. Os nossos dados estão de acordo com os descritos por Koizumi et al. (2010); Larkman & Perkins (2005) e XU et al. (2009), os quais utilizaram aCSF em pH 6.0-6.8 e verificaram uma redução significativa da condutância de vazamento mediada pelo  $K^+$  nos motoneurônios do Núcleo Motor Facial e do HN e nos neurônios inspiratórios do Complexo pré-Bötzinger. Observamos também que a acidificação do meio extracelular provocou uma despolarização do potencial de membrana em repouso (5 mV) dos motoneurônios respiratórios do DMV semelhante àquela observada nos neurônios inspiratórios do Complexo pré-Bötzinger (KOIZUMI et al., 2010). Acreditamos que em condições patológicas esta despolarização do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV, mediada pela acidificação do meio extracelular, possa gerar alterações motoras na atividade parassimpática para as vias aéreas respiratórias. Sendo assim, considerando a expressão dos canais TASK-1 e TASK-3 no DMV e sua sensibilidade às alterações do pH extracelular, sugerimos que a redução da condutância de vazamento e a despolarização do potencial de membrana em repouso fosse mediada pela inibição destes canais de vazamento.

Utilizamos então a quinidina, nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M, como bloqueador dos canais TASK-1 e TASK-3 (HAN et al., 2002; KIM, 2005; KIM; BANG; KIM, 2000; MEADOWS; RANDALL, 2001) para estudar a contribuição

dos mesmos na gênese do potencial de membrana em repouso e a sensibilidade à acidose dos motoneurônios respiratórios do DMV. Primeiramente, verificamos que as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quinidina não promovem alterações significativas no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV. Além disso, observamos que mesmo na presença da quinidina o aCSF em pH 6.9 ainda foi capaz de produzir uma despolarização significativa do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios brônquicos do DMV. Confirmamos por meio da técnica de RT-qPCR que os motoneurônios respiratórios do DMV registrados não expressavam o mRNA para os canais TASK-1 e TASK-3. Diante disto, concluímos que os canais de vazamento para  $\text{K}^+$  (TASK-1 e TASK-3) não participam da gênese do potencial de membrana em repouso e na sensibilidade à acidose dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.

Observamos, por meio da técnica de RT-qPCR, a expressão do canal THIK-2 em 8 de 9 motoneurônios respiratórios do DMV analisados. Este canal é expresso na maioria das regiões do sistema nervoso central e apresenta de 25 a 35% de homologia com outros canais  $\text{K}_{2\text{p}}$  (RAJAN et al., 2000). Além disso, o canal THIK-2 está localizado principalmente no retículo endoplasmático, apresentando uma baixa condutância e atividade intrínseca (BLIN et al., 2014; CHATELAIN et al., 2013; RAJAN et al., 2001; RENIGUNTA et al., 2014). Chatelain et al. (2013) demonstraram que a retenção do canal THIK-2 ao retículo endoplasmático se deve pela presença de cinco resíduos de arginina na posição 11 e 16 (RRXRRR) localizados na porção N-terminal do canal THIK-2. Estes mesmos autores também demonstraram a presença de um resíduo de serina na posição 13 (RRS<sub>13</sub>RRR), o qual é um local de fosforilação pela proteína quinase A (PKA). Diante disto, sugere-se que o canal THIK-2 possa exigir uma subunidade acessória (combinação com o canal THIK-1) ou a fosforilação da S<sub>13</sub> para sua saída do retículo endoplasmático até a membrana plasmática para regular o potencial de membrana em repouso e a excitabilidade neuronal (CHATELAIN et al., 2013; RAJAN et al., 2001). Entretanto, apesar da expressão do mRNA destes canais, acreditamos que os mesmos não contribuam significativamente para as correntes de vazamentos registradas nos motoneurônios respiratórios do DMV, pois sua expressão na membrana é baixa

em condições fisiológicas e necessitem de subunidade acessória (THIK-1) e ligantes intracelulares.

É importante destacar que outros canais sensíveis às alterações do pH extracelular poderiam participar da despolarização do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios brônquicos do DMV, como os canais ASIC (*Acid-sensing ion channels*) (LILLEY; LETISSIER; ROBBINS, 2004; NAKAMURA; JANG, 2014; SONG et al., 2016; TAN et al., 2015). De acordo com Song et al. (2016), os canais ASIC são canais catiônicos não seletivos, estão expressos na região dorsal do bulbo e apresentam corrente de entrada quando expostas à acidificação do meio extracelular. Há também os canais TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid receptor-1*), que são canais catiônicos não seletivos (BANTIKYAN et al., 2009) sensíveis à alterações do pH extracelular (CHUNG et al., 2011) e expressos em várias regiões do sistema nervo central, como no tronco encefálico (NTS, DMV e HN) (SZALLASI et al., 1995). Porém, vale destacar a ausência da alteração do potencial de reversão da corrente de vazamento registrada nos motoneurônios respiratórios do DMV quando da acidificação do meio extracelular, sugerindo que outras condutâncias não foram ativadas nesta condição experimental.

Utilizamos também no presente estudo uma condição de hipercapnia/acidose, por meio do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> em solução contendo o tampão HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pois se sabe que em diversas patologias do sistema respiratório como DPOC, asma crônica, síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS), dentre outras, apresentam um quadro de hipercapnia, isto, conseqüentemente, acarretando a uma acidose respiratória (CABRAL; MUELLER, 2010; SILVA, 2008; VENKATARAMAN et al., 2020). Diante disto, nossos resultados demonstraram que a hipercapnia/acidose promoveu uma redução da condutância de vazamento e despolarização do potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos. Além disso, o potencial de reversão da corrente de vazamento não foi afetado pela hipercapnia/acidose. Esta condição experimental produziu alterações na condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso semelhantes àquelas observadas durante a superfusão com aCSF em pH 6.9 e normocapnia (5% de CO<sub>2</sub>). Sendo assim, observamos que a condição de hipercapnia/acidose não foi capaz de causar um efeito aditivo nas alterações da

condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.

Um ou mais canais de vazamento para  $K^+$  sensíveis às alterações do pH extracelular e expressos no tronco encefálico, como TASK-2 e TREK-1, (COHEN et al., 2008; MEADOWS et al., 2000; MEDHURST et al., 2001; NIEMEYER et al., 2010; TALLEY et al., 2001; YARISHKIN; PHUONG; KRIŽAJ, 2019; ZÚÑIGA et al., 2011), possam ser os responsáveis pelos efeitos observados na condutância de vazamento e no potencial de membrana em repouso dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos quando expostos à hipercapnia/acidose. Estudos realizados por Gestreau et al. (2010) e Wang et al. (2013) demonstraram que a sensibilidade à hipercapnia/acidose dos quimiorreceptores centrais localizados no Núcleo Retrotrapezóide é mediada parcialmente pelos canais TASK-2. Além disso, os efeitos das alterações na concentração de  $CO_2$  nos canais TASK-2 são de fato determinados pela concentração extracelular de  $H^+$  (BAYLISS; et al., 2015; GUYENET et al., 2016; MULKEY et al., 2004; WANG et al., 2013). Por outro lado, apesar da sensibilidade à acidose dos canais TWIK-1 e TRESK (ENYEDI; BRAUN; CZIRJÁK, 2012; HUANG; YU; FAN, 2008; LESAGE et al., 1997; MEDHURST et al., 2001; TALLEY et al., 2001), não há relatos da expressão dos mesmos no bulbo de ratos até o presente momento. É importante destacar que novos experimentos são necessários para revelar a identidade molecular da subfamília de canais de vazamento para  $K^+$  envolvida na gênese do potencial de membrana em repouso, na condutância de vazamento e na sensibilidade à hipercapnia/acidose dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.

## ***Conclusão***



## 6. CONCLUSÃO

Os canais de vazamento para  $K^+$  desempenham um papel importante na gênese do potencial de membrana em repouso e na modulação quimiossensorial à hipercapnia/acidose dos motoneurônios respiratórios do DMV de ratos.

## ***Referências***

## 7. REFERENCIAS

ALLER, M. I.; WISDEN, W. Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 1154–1172, fev. 2008.

ARAUJO, B. B. et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 1, p. 61–69, 5 mar. 2008.

BANTIKYAN, A. et al. Intrinsic and Synaptic Long-Term Depression of NTS Relay of Nociceptin- and Capsaicin-Sensitive Cardiopulmonary Afferents Hyperactivity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, fev. 2009.

BAYLISS, D. A. et al. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2015.

BAYLISS, D. A. et al. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K<sup>+</sup> channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respiration Physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 159–174, dez. 2001.

BAYLISS, D. A.; BARRETT, P. Q. Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 11, p. 566–575, nov. 2008.

BERG, A. P. Motoneurons Express Heteromeric TWIK-Related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> (TASK) Channels Containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) Subunits. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 30, p. 6693–6702, 28 jul. 2004.

BLIN, S. et al. Tandem Pore Domain Halothane-inhibited K<sup>+</sup> Channel Subunits THIK1 and THIK2 Assemble and Form Active Channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 41, p. 28202–28212, 10 out. 2014.

BROWN, D. A. Neurobiology: The acid test for resting potassium channels. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. R456–R459, jun. 2000.

BROWNING, K. N.; RENEHAN, W. E.; TRAVAGLI, R. A. Electrophysiological and morphological heterogeneity of rat dorsal vagal neurones which project to specific areas of the gastrointestinal tract. **The Journal of Physiology**, v. 517, n. 2, p. 521–532, jun. 1999.

CABRAL, M. M.; MUELLER, P. DE T. Sono e doenças pulmonares crônicas: pneumopatias intersticiais difusas, asma brônquica e DPOC. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. suppl 2, p. 53–56, jun. 2010.

CARR, M. J.; UNDEM, B. J. Bronchopulmonary afferent nerves. **Respirology**, v. 8, n. 3, p. 291–301, set. 2003.

CHATELAIN, F. C. et al. Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K<sup>+</sup> Channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35081–35092, 2013.

CHUNG, S. et al. Intracellular acidification evoked by moderate extracellular acidosis attenuates transient receptor potential V1 (TRPV1) channel activity in rat dorsal root ganglion neurons. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 12, p. 1270–1281, dez. 2011.

COHEN, A. et al. A Novel Mechanism for Human K2P 2.1 Channel Gating. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, fev. 2008.

COLERIDGE, H. Pulmonary Reflexes: Neural Mechanisms of Pulmonary Defense. **Annual Review of Physiology**, v. 56, n. 1, p. 69–91, 1 jan. 1994.

COLERIDGE, H. M.; COLERIDGE, J. C. G. Reflexes Evoked from Tracheobronchial Tree and Lungs. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

CYPHERT, J. M. et al. Confocal Imaging–Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, fev. 2009.

ENYEDI, P.; BRAUN, G.; CZIRJÁK, G. TRESK: The lone ranger of two-pore domain potassium channels. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 353, n. 1–2, p. 75–81, abr. 2012.

FALGAIROLLE, M.; O'DONOVAN, M. J. Pharmacological Investigation of Fluoro-Gold Entry into Spinal Neurons. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0131430, 23 jun. 2015.

FONTÁN, J. J. P.; DIEC, C. T.; VELLOFF, C. R. Bilateral distribution of vagal motor and sensory nerve fibers in the rat's lungs and airways. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 2, p. R713–R728, 1 ago. 2000.

FORD, T. et al. Neurones in the dorsal motor vagal nucleus of the cat with non-myelinated axons projecting to the heart and lungs. **Experimental Physiology**, v. 75, n. 4, p. 459–473, 1 jul. 1990.

GESTREAU, C. et al. Task2 potassium channels set central respiratory CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2325–2330, 2 fev. 2010.

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

GOULD, E.; WOOLF, N. J.; BUTCHER, L. L. Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. **Brain Research Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 767–789, dez. 1991.

GRUNSTEIN, M. M.; YOUNES, M.; MILIC-EMILI, J. Control of tidal volume and respiratory frequency in anesthetized cats. **Journal of Applied Physiology**, v. 35, n. 4, p. 463–476, out. 1973.

GUYENET, P. G. et al. Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1529–1551, 15 mar. 2016.

HADZIEFENDIC, S.; HAXHIU, M. A. CNS innervation of vagal preganglionic neurons controlling peripheral airways: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 76, n. 2–3, p. 135–145, maio 1999.

HAN, J. et al. Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. **The Journal of Physiology**, v. 542, n. 2, p. 431–444, jul. 2002.

HASELTON, J. R. et al. Bronchomotor vagal preganglionic cell bodies in the dog: an anatomic and functional study. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, n. 3, p. 1122–1129, 1 set. 1992.

HAXHIU, M. A. et al. CNS innervation of airway-related parasympathetic preganglionic neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. **Brain Research**, v. 618, n. 1, p. 115–134, jul. 1993.

HUANG, D.-Y.; YU, B.-W.; FAN, Q.-W. Roles of TREK, a novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, in pain pathway and general anesthesia. **Neuroscience Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 166–172, 19 jun. 2008.

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. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 193, n. 2, p. 467–508, 15 set. 1980.

KANG, D.; HAN, J.; KIM, D. Mechanism of inhibition of TREK-2 (K 2P 10.1) by the G<sub>q</sub>-coupled M<sub>3</sub> muscarinic receptor. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 291, n. 4, p. C649–C656, out. 2006.

KC, P.; MARTIN, R. J. Role of central neurotransmission and chemoreception on airway control. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 213–222, out. 2010.

KIM, D. Physiology and Pharmacology of Two-Pore Domain Potassium Channels. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 21, p. 2717–2736, 1 ago. 2005.

KIM, Y.; BANG, H.; KIM, D. TASK-3, a New Member of the Tandem Pore K<sup>+</sup> Channel Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9340–9347, 31 mar. 2000.

KINDLER, C. H. et al. Localization of the tandem pore domain K<sup>+</sup> channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 98, n. 1–2, p. 153–163, jan. 2002.

KOIZUMI, H. et al. Functional Imaging, Spatial Reconstruction, and Biophysical Analysis of a Respiratory Motor Circuit Isolated In Vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2353–2365, 5 mar. 2008.

KOIZUMI, H. et al. TASK Channels Contribute to the K<sup>+</sup>-Dominated Leak Current Regulating Respiratory Rhythm Generation In Vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 12, p. 4273–4284, 24 mar. 2010.

LAMA, A.; DELPIERRE, S.; JAMMES, Y. The effects of electrical stimulation of myelinated and non-myelinated vagal motor fibres on airway tone in the rabbit and the cat. **Respiration Physiology**, v. 74, n. 3, p. 265–274, dez. 1988.

LARKMAN, P. M.; PERKINS, E. M. A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak' K<sup>+</sup> conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro.

**European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 679–691, 25 fev. 2005.

LEE, L.-Y.; PISARRI, T. E. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. **Respiration Physiology**, v. 125, n. 1–2, p. 47–65, mar. 2001.

LEE, L.-Y.; YU, J. Sensory Nerves in Lung and Airways. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. v. 4p. 287–324.

LENGYEL, M.; CZIRJÁK, G.; ENYEDI, P. Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 26, p. 13649–13661, 24 jun. 2016.

LESAGE, F. et al. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 5, p. 1004–1011, 1996.

LESAGE, F. et al. The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K<sup>+</sup> channel. **FEBS Letters**, v. 402, n. 1, p. 28–32, 3 fev. 1997.

LESAGE, F. et al. Human TREK2, a 2P Domain Mechano-sensitive K<sup>+</sup> Channel with Multiple Regulations by Polyunsaturated Fatty Acids, Lysophospholipids, and G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, and G<sub>q</sub> Protein-coupled Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28398–28405, 15 set. 2000.

LILLEY, S.; LETISSIER, P.; ROBBINS, J. The Discovery and Characterization of a Proton-Gated Sodium Current in Rat Retinal Ganglion Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, fev. 2004.

LIVINGSTON, C. A.; BERGER, A. J. Response of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus to thyrotropin-releasing hormone. **Brain Research**, v. 621, n. 1, p. 97–105, set. 1993.

LU, B. et al. The Neuronal Channel NALCN Contributes Resting Sodium



Permeability and Is Required for Normal Respiratory Rhythm. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 371–383, abr. 2007.

MA, L. et al. Acid-sensitive TWIK and TASK two-pore domain potassium channels change ion selectivity and become permeable to sodium in extracellular acidification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 44, p. 37145–37153, 2012.

MARINC, C. et al. Immunocytochemical Localization of TASK-3 Channels in Rat Motor Neurons. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 2, p. 309–318, 20 mar. 2012.

MAZZONE, S. Central nervous system control of the airways: pharmacological implications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 220–228, 1 jun. 2002.

MAZZONE, S. B.; UNDEM, B. J. Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 3, p. 975–1024, jul. 2016.

MCALEXANDER, M. A.; MYERS, A. C.; UNDEM, B. J. Adaptation of guinea-pig vagal airway afferent neurones to mechanical stimulation. **The Journal of Physiology**, v. 521, n. 1, p. 239–247, nov. 1999.

MCALLEN, R. M.; SPYER, K. M. Two types of vagal preganglionic motoneurons projecting to the heart and lungs. **The Journal of Physiology**, v. 282, n. 1, p. 353–364, 1 set. 1978.

MEADOWS, H. J. et al. Cloning, localisation and functional expression of the human orthologue of the TREK-1 potassium channel. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 439, n. 6, p. 714–722, 23 mar. 2000.

MEADOWS, H. J.; RANDALL, A. D. Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 4, p. 551–559, mar. 2001.

MEDHURST, A. D. et al. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. **Molecular Brain Research**, v. 86, n. 1–2, p. 101–114, 2001.

MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 3, p. 619–634, 1 fev. 2015.

MULKEY, D. K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 1360–1369, 21 dez. 2004.

MYERS, A. C. Electrophysiology of Airway Nerves. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 1–27, dez. 2007.

NAKAMURA, M.; JANG, I.-S. Characterization of proton-induced currents in rat trigeminal mesencephalic nucleus neurons. **Brain Research**, v. 1583, n. 1, p. 12–22, out. 2014.

NIEMEYER, M. I. et al. Separate Gating Mechanisms Mediate the Regulation of K<sub>2P</sub> Potassium Channel TASK-2 by Intra- and Extracellular pH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16467–16475, 28 maio 2010.

NIEMEYER, M. I. et al. Gating, Regulation, and Structure in K<sub>2P</sub> K<sup>+</sup> Channels: In Varietate Concordia? **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 3, p. 309–317, set. 2016.

PAN, J. et al. Neurotransmitters in Airway Parasympathetic Neurons Altered by Neurotrophin-3 and Repeated Allergen Challenge. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 43, n. 4, p. 452–457, out. 2009.

RAJAN, S. et al. TASK-3, a Novel Tandem Pore Domain Acid-sensitive K<sup>+</sup> Channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 22, p. 16650–16657, 2 jun. 2000.

RAJAN, S. et al. THIK-1 and THIK-2, a Novel Subfamily of Tandem Pore Domain K<sup>+</sup> Channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7302–7311, 2001.

REN, D. Sodium Leak Channels in Neuronal Excitability and Rhythmic Behaviors. **Neuron**, v. 72, n. 6, p. 899–911, dez. 2011.

RENIGUNTA, V. et al. Breaking the silence: Functional expression of the two-pore-domain potassium channel THIK-2. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1735–1745, 2014.

SAH, P. Role of calcium influx and buffering in the kinetics of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in rat vagal motoneurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 68, n. 6, p. 2237–2247, 1 dez. 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. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 42, n. 2, p. 89–98, fev. 1993.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. **Annual Review of Physiology**, v. 46, n. 1, p. 455–472, out. 1984.

SANO, Y. et al. A Novel Two-pore Domain K<sup>+</sup> Channel, TRESK, Is Localized in the Spinal Cord. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27406–27412, 25 jul. 2003.

SANT'AMBROGIO, G.; WIDDICOMBE, J. Reflexes from airway rapidly adapting receptors. **Respiration Physiology**, v. 125, n. 1–2, p. 33–45, mar. 2001.

SHI, Y. et al. Nalcx Is a “Leak” Sodium Channel That Regulates Excitability of Brainstem Chemosensory Neurons and Breathing. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 31, p. 8174–8187, 3 ago. 2016.

SILVA, E. C. DE F. Asma Rônquica. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, 2008.

SILVA, M. P. et al. In vitro differentiation between oxytocin- and vasopressin-secreting magnocellular neurons requires more than one experimental criterion. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 400, p. 102–111, jan. 2015.

SILVA, M. P. et al. Hyperexcitability and plasticity induced by sustained hypoxia on rectus abdominis motoneurons. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 7, p. 1935–1956, 28 abr. 2019.

SILVA, M. P.; VENTURA, R. R.; VARANDA, W. A. Hypertonicity increases NO production to modulate the firing rate of magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats. **Neuroscience**, v. 250, p. 70–79, out. 2013.

SIROIS, J. E. et al. The TASK-1 Two-Pore Domain K<sup>+</sup> Channel Is a Molecular Substrate for Neuronal Effects of Inhalation Anesthetics. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 17, p. 6347–6354, 1 set. 2000.

SONG, N. et al. Acid-sensing ion channels are expressed in the ventrolateral medulla and contribute to central chemoreception. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38777, 9 dez. 2016.

SZALLASI, A. et al. Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. **Brain Research**, v. 703, n. 1–2, p. 175–183, dez. 1995.

TALLEY, E. M. et al. TASK-1, a Two-Pore Domain K<sup>+</sup> Channel, Is Modulated by Multiple Neurotransmitters in Motoneurons. **Neuron**, v. 25, n. 2, p. 399–410, fev. 2000.

TALLEY, E. M. et al. CNS Distribution of Members of the Two-Pore-Domain

(KCNK) Potassium Channel Family. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 19, p. 7491–7505, 1 out. 2001.

TAN, Z.-Y.; et al. Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation and overexpression of ASIC and TASK channels prior to hypertension in SHR. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, fev. 2015.

UNDEM, B. J.; CARR, M. J. Targeting Primary Afferent Nerves for Novel Antitussive Therapy. **Chest**, v. 137, n. 1, p. 177–184, jan. 2010.

VENKATARAMAN, S. et al. Sleep Apnea, Hypertension and the Sympathetic Nervous System in the Adult Population. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 591, 21 fev. 2020.

WANG, S. et al. TASK-2 Channels Contribute to pH Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptor Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 41, p. 16033–16044, 9 out. 2013.

WANG, Y. T.; BIEGER, D.; NEUMAN, R. S. Activation of NMDA receptors in necessary for fast information transfer at brainstem vagal motoneurons. **Brain Research**, v. 567, n. 2, p. 260–266, dez. 1991.

WEIGAND, L. A.; MYERS, A. C. Synaptic and membrane properties of parasympathetic ganglionic neurons innervating mouse trachea and bronchi. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, n. 4, p. L593–L599, abr. 2010.

WRIGHT, S. H. Generation of resting membrane potential. **Advances in Physiology Education**, v. 28, n. 4, p. 139–142, dez. 2004.

XU, X. F. et al. Modulation of leak K(+) channel in hypoglossal motoneurons of rats by serotonin and/or variation of pH value. **Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]**, v. 61, n. 4, p. 305–316, 2009.

YARISHKIN, O.; PHUONG, T. T. T.; KRIŽAJ, D. Trabecular Meshwork TREK-1 Channels Function as Polymodal Integrators of Pressure and pH. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 60, n. 6, p. 2294, 22 maio 2019.

ZÚÑIGA, L. et al. Gating of a pH-Sensitive K2P Potassium Channel by an Electrostatic Effect of Basic Sensor Residues on the Selectivity Filter. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16141, 25 jan. 2011.

## 8. APÊNDICE

### 8.1. Apêndice 1

#### Equação de Henderson-Hasselbalch

$$(pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]})$$

pKa: constante de dissociação;

A<sup>-</sup>: concentração da base;

HA: concentração do ácido).

$$PCO_2 = PA \times FCO_2$$

$$PCO_2 = 760 \times 0.05$$

$$PCO_2 = 38 \text{ mmHg}$$

$$(pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]})$$

$$6.9 = 6.1 + \log \left( \frac{A^-}{0.03 \times 38} \right)$$

$$6.9 = 6.1 + \log \left( \frac{A^-}{1.14} \right)$$

$$0.8 = \log \left( \frac{A^-}{1.14} \right)$$

$$6,30 = \left( \frac{A^-}{1.14} \right)$$

$$A^- = 1.14 \times 6.30$$

$$A^- = 7.18 \text{ mM}$$

## 8.2. Apêndice 2

### Equação de Henderson-Hasselbalch

$$(pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]})$$

pKa: constante de dissociação;

A<sup>-</sup>: concentração da base;

HA: concentração do ácido).

$$PCO_2 = PA \times FCO_2$$

$$PCO_2 = \frac{760 \text{ mmHg} \times 15\%}{100}$$

$$PCO_2 = 0.03 \times 114 \text{ mmHg}$$

$$PCO_2 = 3.42$$

$$\begin{aligned} 26 \text{ mM de NaHCO}_3 \text{ (base)} - 3.42 \text{ de CO}_2 \text{ (ácido)} \\ = 22.58 \text{ mM} \end{aligned}$$

$$(pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]})$$

$$pH = 6.1 + \log \left( \frac{22.58}{3.42} \right)$$

$$pH = 6.1 + \log (6.6)$$

$$pH = 6.1 + 0.819$$

$$pH = 6.9 \text{ com } 15\% \text{ de CO}_2$$



### 8.3. Apêndice 3

#### *Equação de Nernst*

$$V_{Eq} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right)$$

R: é a constante universal de gás igual a  $8.314 \text{ JK}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;

T: é a temperatura em Kelvin;

z: é a valência das espécies iônicas;

F: é a constante de Faraday igual a  $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;

$[X]_{out}$ : é a concentração da espécie iônica no fluido extracelular;

$[X]_{in}$  é a concentração da espécie iônica no fluido intracelular.

$$V_{EqK^+} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right)$$

$$V_{EqK^+} = \frac{8.314 \times 296.15}{1 \times 96485} \ln \left( \frac{4}{145} \right)$$

$$V_{EqK^+} = \frac{2462.19}{96485} \ln (0,02758)$$

$$V_{EqK^+} = 0.0255 \times -3.59066$$

$$V_{EqK^+} = -0.0915619$$

$$V_{EqK^+} = -0.0915619 \times 1000$$

$$V_{EqK^+} = -91,57 \text{ mV}$$

#### 8.4. Apêndice 4

##### *Equação de Nernst*

$$V_{Eq} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right)$$

R: é a constante universal de gás igual a  $8.314 \text{ JK}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;

T: é a temperatura em Kelvin;

z: é a valência das espécies iônicas;

F: é a constante de Faraday igual a  $96.485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;

$[X]_{out}$ : é a concentração da espécie iônica no fluido extracelular;

$[X]_{in}$  é a concentração da espécie iônica no fluido intracelular.

$$V_{EqNa^+} = \frac{RT}{zF} \log \left( \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right)$$

$$V_{EqNa^+} = \frac{8.314 \times 296.15}{1 \times 96485} \log \left( \frac{147}{2,25} \right)$$

$$V_{EqNa^+} = \frac{2462.19}{96485} \log(65,333)$$

$$V_{EqNa^+} = 0.0255 \times 4.1795$$

$$V_{EqNa^+} = 0.10657$$

$$V_{EqNa^+} = 0.10657 \times 1000$$

$$V_{EqNa^+} + 106.57 \text{ mV}$$


---