



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
CAMPUS SOBRAL – CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**UTILIZAÇÃO DO ANÁLOGO ELÉTRICO DE MEMBRANA PARA
CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL
SUPERIOR DE RATOS**

LEONARDO FÉLIX DE FREITAS

SOBRAL

2022

LEONARDO FÉLIX DE FREITAS

**UTILIZAÇÃO DO ANÁLOGO ELÉTRICO DE MEMBRANA PARA
CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL
SUPERIOR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Ceará,
como requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Neurociências;

Orientador: Prof.^a Dr. Francisco
Walber Ferreira da Silva.
Co-orientadora: Prof.^a Dra. Hellíada
Vasconcelos Chaves.

SOBRAL

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F936u Freitas, Leonardo Félix de.
Utilização do análogo elétrico de membrana para classificação dos neurônios do gânglio cervical superior de ratos. / Leonardo Félix de Freitas. – 2022.
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva.
Coorientação: Profa. Dra. Helliada Vasconcelos Chaves.
1. Gânglio Cervical Superior. 2. Canais Iônicos. 3. Análogo Elétrico. 4. Potencial de Repouso. I. Título.
CDD 660.6
-

UTILIZAÇÃO DO ANÁLOGO ELÉTRICO DE MEMBRANA PARA CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Aprovado em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^o Dr. José Henrique Leal Cardoso (membro externo 1)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof.^a Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (membro suplente interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Kerly Shamyra da Silva Alves (membro suplente externo)
Universidade Federal do Ceará (UECE)

À Deus por me dar o dom da vida em tempos de pandemia.

Aos meus pais, Francisco e Angelúcia, a quem eu devo por tudo que sou.

Ao meu filho, Miguel, por quem eu tento ser melhor a cada dia.

A minha esposa, Viviane, por acreditar em mim e não permitir que eu desistisse.

AGRADECIMENTOS

Ao meu estimado professor Francisco Walber Ferreira da Silva pelo apoio e confiança depositados.

À professora Hellíada Chaves pela atenção e preocupação prestadas.

Ao Jessé pela disponibilidade e gentileza de sempre.

À minha sogra, Dona Vera Cunha, por me emprestar seu computador, sem o qual eu não teria meios para produção desta obra.

“Eu sou apenas um rapaz latino-americano sem dinheiro no banco, sem parentes importantes e vindo do interior.” (BELCHIOR, 1976)

RESUMO

O gânglio cervical superior (GCS) é uma estrutura do sistema nervoso autonômico simpático, que contém os neurônios que inervam o pescoço e a face, mas também fornece inervação simpática para o coração e para a glândula pineal. A membrana desses neurônios pode ser modelada por um análogo elétrico, em que os canais iônicos são representados por condutâncias, a força motante dos íons por baterias e a membrana plasmática por um capacitor. O uso desse análogo elétrico de membrana possibilita estudar as propriedades elétricas da membrana neuronal e auxiliar na classificação celular por meio das propriedades passivas das membranas. O objetivo desse trabalho foi investigar por meio da utilização do análogo elétrico de membrana as propriedades elétricas passivas e suas influências no funcionamento dos neurônios do gânglio cervical superior de ratos. Os dados desse trabalho são provenientes do projeto submetido ao CEUA/UECE, que recebeu aprovação sob número 4695010/2016. Inicialmente foi feito um programa em linguagem C que modelava a membrana dos neurônios do GCS utilizando as equações de um circuito resistor-capacitor simples. Depois, foram analisados os dados experimentais de corrente-voltagem (IxV) dos neurônios do GCS, e os parâmetros eletrofisiológicos potencial de repouso (E_m), resistência de entrada (R_{in}) e tempo de decaimento da voltagem (τ_m) foram inseridos no programa para obtenção das curvas IxV simuladas e de dados da membrana neuronal. Com os dados experimentais e simulados das curvas IxV, foi realizada a subtração dos dois sinais e analisada as respostas. Ao todo foram utilizados 8 animais, obtidos 77 células para os dados eletrofisiológicos, e os resultados estão expressos como média \pm E.P.M, em que o número entre parênteses representa o número de neurônios. Para comparação entre os grupos, o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste Holm-Sidak foi utilizado, e os grupos apresentaram diferença estatística quando o valor de p para ocorrência da hipótese nula foi menor ou igual a 0,05. Na inspeção visual das curvas IxV, alguns neurônios apresentavam uma retificação da voltagem quando aplicado um pulso hiperpolarizante de 500 pA. Assim, classificamos, inicialmente, os neurônios em sem retificação (SR) e com retificação despolarizante (CRD). Quando obtivemos as subtrações da IxV experimental e simulada, verificamos outro grupo neuronal, que apresentava uma deflexão negativa no sinal subtraído. Dessa forma, obtivemos três grupos neuronais: SR, CRD e com retificação hiperpolarizante (CRH). Entre os grupos, não houve diferença estatística nos parâmetros E_m e R_{in} . Houve diferença estatística ($p < 0,05$ seguido por Holm-Sidak) na τ_m e o valor para o grupo SR, CRD e CRH foi $13,2 \pm 1,0$ (n = 50), $6,7 \pm 0,8$ (n = 17) e $13,2 \pm 0,8$ ms (n = 10), respectivamente. Nos parâmetros ativos, a reobase não apresentou diferença estatística entre os grupos, mas todos os parâmetros do potencial de ação (PA) apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA seguido por Holm-Sidak) entre o grupo SR e CRD. A amplitude do PA dos grupos SR, CRD e CRH foi $76,4 \pm 1,6$ (n = 50), $67,1 \pm 3,8$ (n = 17) e $80,2 \pm 2,7$ mV (n = 10) e houve diferença estatística entre os grupos. Da mesma forma, os grupos SR, CRD e CRH apresentaram diferença estatística entre si na

inclinação máxima ascendente do PA e seus valores foram $78,8 \pm 4,3$ (n = 50), $58,6 \pm 6,1$ (n = 17) e $87,4 \pm 8,2$ V/s (n = 10), respectivamente. A utilização do análogo elétrico de membrana permitiu classificar os neurônios do gânglio cervical superior em grupos com propriedades eletrofisiológicas diferentes. Essa abordagem pode ser utilizada para melhorar a classificação dos neurônios do GCS tanto em situações fisiológicas como patológicas.

Palavras-chave: gânglio cervical superior; canais iônicos; análogo elétrico; potencial de repouso.

ABSTRACT

The superior cervical ganglion (SCG) is a structure of the sympathetic autonomic nervous system, which contains the neurons that innervate the neck and face, but also provides sympathetic innervation to the heart and pineal gland. The membrane of these neurons can be modeled by an electrical analogue, in which the ion channels are represented by conductances, the moving force of ions by batteries and the plasma membrane by a capacitor. The use of this membrane electrical analogue makes it possible to study the electrical properties of the neuronal membrane and assist in cell classification through the passive properties of membranes. The objective of this work was to investigate, through the use of the membrane electrical analogue, the passive electrical properties and their influence on the functioning of neurons in the superior cervical ganglion of rats. The data for this work come from the project submitted to the CEUA/UECE, which received approval under number 4695010/2016. Initially, a program was made in C language that modeled the membrane of GCS neurons using the equations of a simple resistor-capacitor circuit. Then, the experimental data of current-voltage (IxV) of the neurons of the GCS were analyzed, and the electrophysiological parameters resting potential (E_m), input resistance (R_{in}) and voltage decay time (τ_m) were entered into the program to obtaining simulated IxV curves and neuronal membrane data. With the experimental and simulated data from the IxV curves, the two signals were subtracted and the responses analyzed. In all, 8 animals were used, 77 cells were obtained for electrophysiological data, and the results are expressed as mean \pm E.P.M, where the number in parentheses represents the number of neurons. For comparison between groups, the one-way ANOVA test followed by the Holm-Sidak post-test was used, and the groups showed statistical difference when the p-value for the occurrence of the null hypothesis was less than or equal to 0.05. On visual inspection of the IxV curves, some neurons showed voltage rectification when a hyperpolarizing pulse of 500 pA was applied. Thus, we initially classified neurons as non-rectified (SR) and depolarizing rectified (CRD). When we obtained the experimental and simulated IxV subtractions, we verified another neuronal group, which presented a negative deflection in the subtracted signal. Thus, we obtained three neuronal groups: SR, CRD and with hyperpolarizing rectification (CRH). Between the groups, there was no statistical difference in the parameters E_m and R_{in} . There was a statistical difference ($p < 0.05$ followed by Holm-Sidak) in τ_m and the value for the SR, CRD and CRH group was 13.2 ± 1.0 ($n = 50$), 6.7 ± 0.8 ($n = 17$) and 13.2 ± 0.8 ms ($n = 10$), respectively. In active parameters, rheobase showed no statistical difference between groups, but all action potential (AP) parameters showed statistical difference ($p < 0.05$, ANOVA followed by Holm-Sidak) between the SR and CRD groups. The PA

amplitude of the SR, CRD and CRH groups was 76.4 ± 1.6 (n = 50), 67.1 ± 3.8 (n = 17) and 80.2 ± 2.7 mV (n = 10) and there was a statistical difference between the groups. Likewise, the SR, CRD and CRH groups showed a statistical difference between themselves in the maximum ascending slope of the AP and their values were 78.8 ± 4.3 (n = 50), 58.6 ± 6.1 (n = 17) and 87.4 ± 8.2 V/s (n = 10), respectively. The use of the membrane electrical analogue allowed the classification of superior cervical ganglion neurons into groups with different electrophysiological properties. This approach can be used to improve the classification of GCS neurons in both physiological and pathological situations.

Keywords: superior cervical ganglion; ion channels; electrical analogue; resting potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Divisões morfológicas do neurônio	pág 22
Figura 2: Gânglios na cadeia simpática cervical	pág 24
Figura 3: Representação de uma secção da membrana celular.....	pág 25
Figura 4: O excedente de cargas, positivas ou negativas em torno da membrana celular	pág 29
Figura 5: Esquema da membrana celular com um canal iônico de potássio que a atravessa.....	pág 30
Figura 6: O potencial de ação.....	pág 31
Figura 7: Esquema do aparato utilizado para realizar o experimento de fixação de voltagem ..	pág 32
Figura 8: Modelagem do análogo elétrico de membrana.....	pág 40
Figura 9: Potenciais de Nernst para os íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	pág 42
Figura 10: Traçados representativos das respostas passivas dos neurônios.....	pág 45
Figura 11: Traçados representativos das respostas ativas dos neurônios	pág 53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Potencial de repouso	pág 46
Gráfico 2: Resistência.....	pág 47
Gráfico 3: Constante de decaimento.....	pág 47
Gráfico 4: Área de Superfície	pág 48
Gráfico 5: Condutância	pág 48
Gráfico 6: Capacitância	pág 49
Gráfico 7: Reobase.....	pág 50
Gráfico 8: Amplitude do Potencial de Ação	pág 51
Gráfico 9: Duração em 50% da amplitude do PA.....	pág 51
Gráfico 10: Inclinação Máxima Ascendente.....	pág 52
Gráfico 11: Inclinação Máxima Descendente	pág 52
Gráfico 12: Amplitude do PA subtraído... ..	pág 54
Gráfico 13: Duração em 50% da amplitude subtraído.....	pág 55
Gráfico 14: Inclinação Máxima Ascendente subtraído.....	pág 55
Gráfico 15: Inclinação Máxima Descendente subtraído.....	pág 56
Gráfico 16: Duração do PA na base subtraído.....	pág 56
Gráfico 17: Amplitude da Hiperpolarização.....	pág 57
Gráfico 18: Potencial Limiar	pág 57
Gráfico 19: Pico da Hiperpolarização.....	pág 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: concentrações dos íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ no fluido extracelular e intracelular.....	pág 42
Tabela 2: Valores dos potenciais de Nernst para os íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ na temperatura de 24 °C.....	pág 44
Tabela 3: Estatísticas dos parâmetros passivos dos neurônios do gânglio cervical superior	pág 49
Tabela 4: Estatísticas dos parâmetros ativos dos neurônios do gânglio cervical superior.....	pág 52
Tabela 5: Estatísticas dos parâmetros ativos dos neurônios do gânglio cervical superior com a subtração do sinal pelo circuito RC.....	pág 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GCS	Gânglio Cervical Superior
PA	Potencial de Ação
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
Na ⁺	Sódio
K ⁺	Potássio
Cl ⁻	Cloreto
RC	Circuito Resistor-Capacitor
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
GN	Gânglio Nodoso
TSC	Tronco simpático cervical
NaCl	Cloreto de Sódio
KCl	Cloreto de Potássio
TTX	Tetrodoxina
TEA	Toxina Tetraetilamônio
Ca ⁺²	Cálcio
A ⁻	Ânions Orgânicos
<i>V_m</i>	Potencial de Membrana
<i>V_{intra}</i>	Potencial no Meio Intracelular
<i>V_{extra}</i>	Potencial no Meio Extracelular
<i>T</i>	Temperatura absoluta
<i>Z</i>	Valência do Íon
<i>F</i>	Constante de Faraday
<i>CE</i>	Concentrações Externa do Íon
<i>CI</i>	Concentrações Interna do Íon
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
<i>IM</i>	Corrente Total da Membrana
<i>IC</i>	Corrente Capacitiva
<i>I_i</i>	Corrente Iônica
<i>CM</i>	Capacitância da Membrana
<i>dV_M / dt</i>	Taxa de variação do potencial elétrico em

relação ao tempo.

G_i

Condutância da membrana

V

Voltagem

V_{clamp}

Potencial Elétrico Fixo

I_m

Corrente Elétrica

E_m

Potencial de repouso

R_{in}

Resistência de entrada

τ_m

Tempo de decaimento da voltagem

mV

Milivolts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	As células nervosas	22
2.1.1	<i>O gânglio cervical superior</i>	<i>23</i>
2.2	A membrana plasmática e os sinais elétricos das células nervosas	25
2.3	Canais iônicos.....	25
2.4	Os potenciais de membrana.....	28
2.4.1	<i>Geração do potencial de repouso</i>	<i>28</i>
2.4.2	<i>Geração do potencial de ação</i>	<i>30</i>
2.5	Análogo elétrico de membrana.....	31
2.6	Classificação de células neuronais ganglionares.....	33
3	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	35
4	OBJETIVOS	37
4.1	Geral.....	37
4.2	Específicos.....	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	Procedimento experimental:	38
5.2	Obtenção dos dados eletrofisiológicos:	38
5.3	Simulação das propriedades passivas da membrana	40
5.4	Análise estatística.....	40
6	RESULTADOS.....	42
6.1	Potencial de Nernst para os íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	42
6.2	Análise das propriedades passivas dos neurônios do GCS.....	44
6.3	Análise das propriedades ativas dos neurônios do GCS.....	50

6.4 Análise das propriedades ativas utilizando a subtração do sinal.....	53
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As células de todos os organismos vivos precisam estar definidas e separadas do meio externo por algum tipo de estrutura isolante, algo que seja capaz de separar os meios intra e extracelular e assim proteger e definir seus limites. A membrana plasmática desempenha esse papel, além de funcionar como componente estrutural e protetor, sua constituição físico-química permite um funcionamento sofisticado, sendo ao mesmo tempo um meio para a difusão tridimensional de substâncias e de informações funcionando assim como uma barreira seletiva (CORREALE, 2017).

A membrana celular consiste em uma dupla camada de lipídios na qual diversas proteínas estão inseridas em sua parede. Devido à sua constituição química, essa camada possui permeabilidade seletiva: permite a passagem de algumas substâncias, sendo impermeável para muitas outras, provendo assim um elevado grau de isolamento e proteção, porém sendo necessário algum mecanismo adicional para permitir a troca de moléculas e a comunicação entre os meios interno e externo. Os canais iônicos constituem um desses mecanismos (LEWIS; RAFF; ROBERTS, 2002).

Canais iônicos são proteínas transmembrana que têm a capacidade de permitir, seja de forma contínua ou em resposta a estímulos (elétricos, químicos ou mecânicos), a passagem de íons de modo seletivo. Os canais que deixam passar os íons continuamente são chamados canais abertos e os que só abrem em respostas a estímulos específicos, como os elétricos, são chamados de canais controlados por voltagem. Destes, podemos citar os canais para cátions, como o sódio (Na^+) e potássio (K^+), e canais para ânions, como o cloreto (Cl^-). Estes canais são abertos por alterações de voltagem que existe naturalmente na membrana entre o interior e o exterior de células do sistema nervoso por exemplo. (GUSMÃO; LOPES; MAGINI, 2005).

Diversos tipos de células possuem mecanismos de troca local de informação, entretanto, as altamente especializadas, como as células neurais, permitem a transmissão de impulsos por longas distâncias, carregando informação com confiabilidade (MARIN, 2007).

A polaridade da membrana plasmática do neurônio é distinta entre o meio intra e extracelular. Essa propriedade é importante para permitir o surgimento de uma diferença no potencial elétrico entre esses compartimentos, gerando assim os sinais elétricos de comunicação

entre neurônios (MIRANDA, 2019).

As células do sistema nervoso, como as que encontramos no gânglio da cervical superior (GCS), apresentam uma característica peculiar, que é a de responder a estímulos com alterações transitórias e rápidas do potencial de membrana. Quando esses estímulos fornecem, a essas células, a energia suficiente para que elas atinjam um certo valor energético crítico - o limiar de excitabilidade - as alterações do potencial de membrana propagam-se por toda membrana da célula, recebendo, esse fenômeno, a denominação de potencial de ação. Esse potencial de ação é resultado do processo cinético de abertura e fechamento dos canais iônicos. Quando as células são eletricamente excitáveis, alterações do campo elétrico no interior das suas membranas promovem modificações nas suas permeabilidades (NOGUEIRA, 1997) .

A simulação computacional do funcionamento neuronal é uma ferramenta importante para a compreensão da fisiologia das células nervosas. Para que essa simulação ocorra, é preciso ter um modelo que descreva de forma satisfatória o fenômeno que se deseja entender. Assim, uma vez que o modelo análogo elétrico da membrana neuronal esteja construído, é possível determinar as equações matemáticas que regem a sua dinâmica e, com essas equações, é possível utilizar simulações numéricas para a resolução das equações, seja em situações estáticas ou dinâmicas (FERREIRA-DA-SILVA, 2019) .

Vários modelos matemáticos surgiram com o objetivo de explicar fenômenos que muitas vezes se mostravam complexos para um entendimento quantitativo. Estes tipos de estudos têm grande importância, pois geram maior clareza sobre o funcionamento dos sistemas modelados. Esta é uma área da ciência básica que vem crescendo e ganhando respeito dos pesquisadores que se utilizam dos resultados gerados para trabalhos posteriores (GUSMÃO; LOPES; MAGINI, 2005)

O paralelo que fazemos com a neurofisiologia neste presente estudo é que o circuito Resistor-Capacitor (RC) representa a membrana de uma célula. Uma vez que a membrana neuronal é formada por duas camadas de lipídios que separam os meios condutores intra e extracelular por uma fina camada isolante, ela irá atuar como um capacitor; os canais iônicos que cruzam a membrana de um neurônio atuam como poros, por onde a corrente elétrica (íons) pode passar. Cada canal iônico (seletivo a uma dada espécie iônica) pode ser modelado por um resistor R colocado em paralelo com o capacitor que representa a membrana.

O presente estudo, portanto, visa buscar uma nova abordagem de classificação dos neurônios do gânglio cervical superior com base nas suas propriedades eletrofisiológicas utilizando o modelo do análogo elétrico de membrana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As células nervosas

Os neurônios, apesar de apresentarem uma grande variedade de formas e tamanhos, possuem alguns aspectos em comum. A célula nervosa é formada por um corpo celular que contém o núcleo e um grande número de fibras finas denominados dendritos que se prolongam a partir desse corpo (Figura 1). Cada neurônio geralmente tem uma única fibra longa (o axônio) e um grande número de fibras mais curtas (dendritos), que são intensamente ramificados e, na maioria das vezes, possuem menos de 1mm de comprimento (KANDEL *et al.*, 1991; LEVITAN & KACZMARECK, 1997; SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

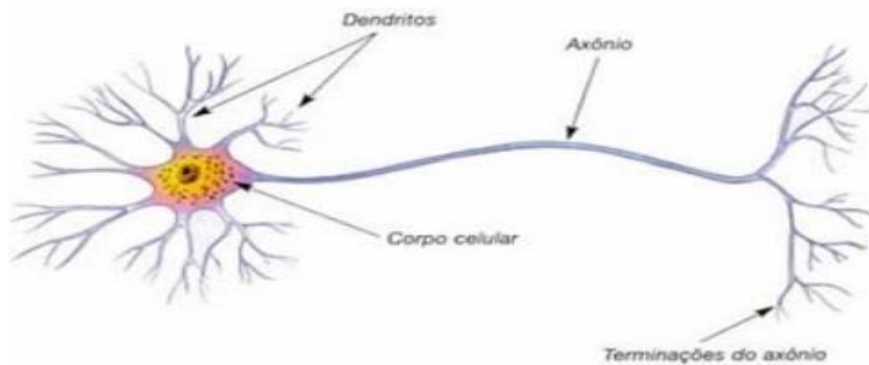


Figura 1: Divisões morfológicas do neurônio. Da esquerda para direita: Dendritos, corpo celular, axônio e terminações do axônio. Adaptado de <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/nervoso2.php>.

Os neurônios são completamente revestidos por uma membrana plasmática que separa o meio intracelular do extracelular. A membrana plasmática dos neurônios é semipermeável, composta por uma bicamada lipídica, proteínas, glicídios e canais iônicos. A polaridade da membrana plasmática do neurônio é diferente entre o meio intra e extracelular. Essa propriedade é importante para permitir o surgimento de uma diferença no potencial elétrico entre os meios, gerando assim os sinais elétricos de comunicação entre células nervosas (LENT, 2008).

A membrana dos neurônios não é idêntica em toda a extensão da célula e nem entre diferentes neurônios. A composição de proteínas inseridas na membrana varia e são fundamentais para as propriedades de circuito e de comunicação de cada neurônio. As proteínas dispersas na bicamada lipídica são constituintes dos canais iônicos, receptores e transportadores moleculares, moléculas de adesão celular e enzimas (LENT, 2008)

2.1.1 O gânglio cervical superior

O gânglio cervical superior (GCS) faz parte da divisão simpática do sistema nervoso autônomo (SNA) e é responsável pela inervação das estruturas cervical, facial e intracraniana, glândula pineal, eminência pituitária e medial, corpo carotídeo, glândulas tireoide e paratireoides, íris e pálpebras (CAVALLOTTI *et al.*, 2005; SAVASTANO *et al.*, 2010). Além disso, o GCS contém corpo celular de neurônio pós-ganglionares responsáveis pela inervação do coração (SAVASTANO *et al.*, 2010; WEHRWEIN *et al.*, 2016).

Em seres humanos, o GCS é o maior dos três gânglios que existem em cada lado do pescoço. O GCS consiste nos quatro primeiros gânglios paravertebrais e encontra-se ao nível dos processos transversos da segunda e terceira vértebras cervicais; entretanto, pode atingir até a margem superior da quarta vértebra cervical. O GCS é um gânglio longo com corpo fusiforme localizado na face anterior dos músculos longos do pescoço e na face posterior da artéria carótida interna e sua bainha carotídea. Está conectado ao gânglio cervical médio inferiormente pelo tronco simpático. Devido ao seu tamanho, o GCS é um marco para o tronco simpático. Esse gânglio fornece ramos para os nervos carotídeo interno e jugular; conecta os ramos comunicantes cinzentos ao segundo, terceiro e, em alguns casos, ao quarto nervo somático cervical e contribui para o nervo cardíaco cervical superior (FAZLIOGULLARI *et al.*, 2016)

As conexões entre o GCS e outros sistemas nervosos cervicais são estabelecidas por numerosos pequenos ramos e filamentos nervosos provenientes do gânglio nodoso (GN), nervo vago e plexo cervical (FIORETTO *et al.*, 2007 ; JANES *et al.*, 1986 ; MITSUOKA, KIKUTANI, SATO, 2017; NOURINEZHAD, MAZAHARI e BIGLARI, 2015). Essas conexões carregam fibras simpáticas pré-ganglionares, bem como um pequeno suprimento sensorial originário dos nervos vago, glossofaríngeo e cervical superior (TSENG, LUE , LEE, WEN, e SHIEH , 2001; ZAIDI e MATTHEWS, 2013).

Esta estrutura neuronal está localizado na extremidade rostral da cadeia simpática paravertebral e contém uma mistura de fenótipos neuronais que inervam seletivamente diferentes órgãos-alvo (GIBBINS 2004). Esses grupos neuronais incluem células que controlam leitos vasculares especializados no cérebro, músculos, pele e glândulas, bem como pelos piloerectores, glândulas salivares, íris e glândula pineal (ARBAB *et al.*, 1986; BOWERS *et al.*, 1984; FLETT e BELL, 1991; GIBBINS, 1991; GIBBINS *et al.* 1996; MORRIS *et al.*, 1999; REUSS e MOORE, 1989; UDDMAN *et al.*, 1989; VOYVODIC, 1989).

O GCS de animais de pequeno porte, como os camundongos, possui organização relativamente simples (ROIIVAINEN e KOISTINAHO, 1996), apresentando, também, arquitetura

tecidual bem definida. Seus componentes incluem neurônios, interneurônios, também classificados como células pequenas intensamente fluorescentes, e células da glia satélites que envolvem os neurônios e suas ramificações (CHIBA e WILLIAMS, 1975; HEDGER e WEBBER, 1976; MADARIAGA-DOMICCH e TAXI, 1986).

No rato, três troncos primários conectam-se ao GCS: o tronco simpático cervical (TSC, principalmente um tronco pré-gangliônico), o nervo carotídeo interno (um tronco pós-gangliônico) e o nervo carotídeo externo (um tronco pós-gangliônico). Neurônios do GCS recebem suas entradas sinápticas pré-ganglionares do TSC, e o GCS rostral envia axônios pós-ganglionares através do nervo carotídeo interno, enquanto o GCS caudal envia axônios lateralmente através do nervo carotídeo externo (BOWERS e ZIGMOND, 1979).

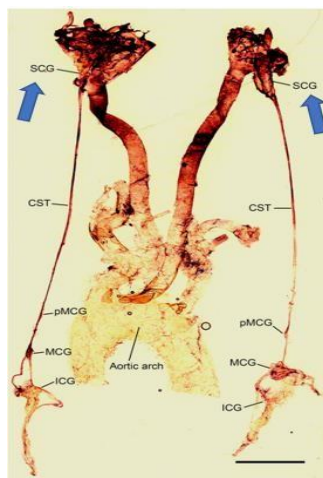


Figura 2: Gânglios na cadeia simpática cervical. Após a injeção de WGA-HRP no GCS, os neurônios pós-ganglionares foram marcados em todo o tronco simpático cervical ipsilateral distal, gânglio cervical médio e gânglio cervical inferior. O gânglio cervical pré-médio reside rostralmente e próximo ao gânglio cervical médio. O GCS aparece destacado pelas setas. Adaptado de WANG *et al.*, 2018.

O rato é um modelo animal atraente porque sua genética agora está bem definida (GIBBS *et al.*, 2004), seus nervos são grandes o suficiente para manipular, e o gânglio é pequeno o suficiente para gerar imagens de neurônios individuais sob óptica composta.

A morfologia do GCS é alterada frente a estímulos fisiológicos, ao dano e ao envelhecimento (ANDREWS, THRASIVOULOU *et al.*, 1996). Além disso, esse gânglio mantém transmissão sináptica e alta taxa metabólica durante incubações *in vitro* (ROIVAINEN e KOISTINAHO, 1996). Sendo assim, os neurônios isolados destes gânglios se aplicam a estudos *in vitro* que visam compreender aspectos de sua estrutura e função (ARANTES, LOURENSSEN *et al.* 2000; ARANTES e ANDREWS, 2006).

2.2 A membrana plasmática e os sinais elétricos das células nervosas

A membrana celular dos neurônios, em sua composição estrutural básica, não é diferente de qualquer outra célula biológica, sendo composta por uma bicamada de fosfolípidios (gorduras) que isola (cargas elétricas) o conteúdo intracelular do meio extracelular. Esta membrana tem tipicamente uma espessura de 3 a 6 nm e possui também diversas proteínas imersas que a atravessam, formando um mosaico de lipídios e proteínas, conforme mostrado na Figura 3 (MAZUR, 2006).

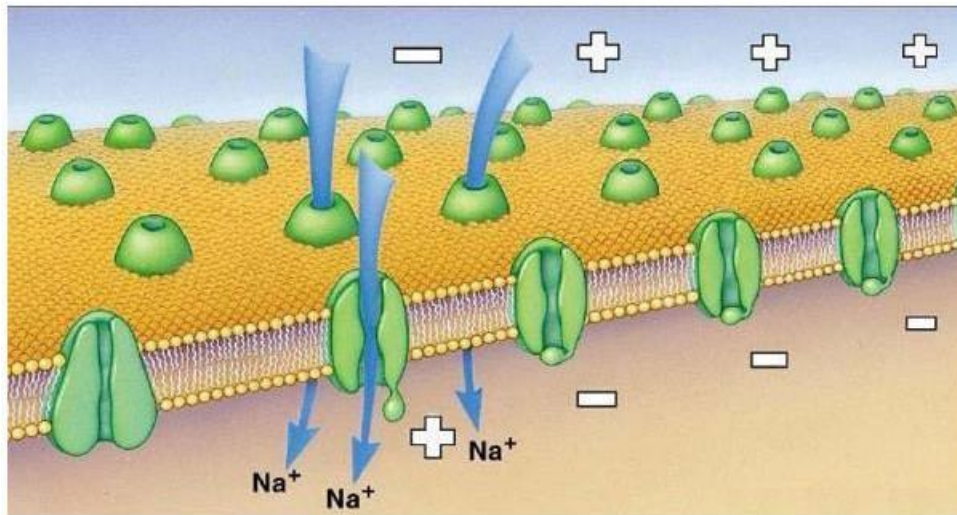


Figura 3: Representação de uma secção da membrana celular onde estão imersos os canais iônicos, poros que permitem a passagem seletiva de íons através da membrana dependendo do valor do potencial de membrana (PAULO; MAZUR, 2006).

Ambos os meios intracelular e extracelular são soluções aquosas compostas por sais dissolvidos, principalmente NaCl e KCl, os quais se dissociam em íons Na^+ , K^+ e Cl^- . A bicamada fosfolipídica age como uma barreira ao livre fluxo desses íons, mantendo assim uma diferença de concentração entre os meios (OTAVIANO CAMPOS, 2008).

A membrana plasmática dos neurônios apresenta uma propriedade peculiar que a diferencia da maioria das células do organismo. Essa propriedade – excitabilidade – permite que o neurônio produza, conduza e transmita a outros neurônios os sinais elétricos em códigos que constituem a linguagem do sistema nervoso (GUSMÃO; LOPES; MAGINI, 2005).

2.3 Canais iônicos

Os canais iônicos podem ser ditos como espécies de poros presentes na membrana plasmática de uma célula (HILLE, 2001). Estes são formados por proteínas, que se encaixam na membrana permitindo o fluxo de substâncias (normalmente íons ou pequenas moléculas hidrofílicas) de um lado para o outro. Um canal iônico possui duas características principais: ser seletivo, o que significa que permite a passagem de uma substância específica, mas não permite a passagem de outras

(ou, quando isso ocorre, a permeabilidade é bastante inferior para outros tipos de íons) (KEW; DAVIES, 2010; STERRATT et al., 2011; BEAR et al., 2007). Para a substância para a que o canal tem máxima seletividade, a taxa de difusão é muito elevada, próximo do que seria possível com uma membrana permeável à substância ou ao íon em questão.

Outra característica é que os canais iônicos funcionam sem a necessidade de consumo de ATP, ou seja, eles atuam aproveitando a energia potencial acumulada nos gradientes de concentração ou diferença de potencial elétrico da membrana. O fluxo de íons ocorre de acordo com duas forças: a difusão e a atração elétrica. Dessa forma, os canais não precisam de energia para o seu funcionamento, uma vez que o fluxo dos íons ocorre de forma natural, no sentido do restabelecimento do equilíbrio (STERRATT et al., 2011; HILLE, 2001).

A maioria dos canais iônicos possui meios de abertura e fechamento, mediante condições específicas. Contudo, deve-se ressaltar que isso não ocorre sempre, e muitos canais podem ficar constantemente no estado aberto ou fechado. Por exemplo, nas membranas dos neurônios, alguns canais de potássio ficam constantemente abertos, dando origem a uma pequena corrente elétrica chamada de corrente de vazamento. Esses canais permanecem sempre no estado aberto e afetam a tensão de repouso da membrana celular (ALBERTS et al., 2008).

Nos neurônios, os canais iônicos desempenham um papel fundamental, trabalhando não só na geração e propagação do potencial de ação, mas também permitindo o funcionamento das sinapses. A grande variedade de tipos de canais iônicos gera uma grande variedade de comportamentos da tensão das membranas, o que, por sua vez, gera diferentes tipos de funcionamento celular e variações nas suas características essenciais, como a excitabilidade (BEAR et al., 2007).

Os canais iônicos trabalham em conjunto com as bombas, porém de forma distinta. Ambos trabalham com o transporte de íons através da membrana, porém as bombas necessitam de alguma forma de energia para o seu funcionamento, por isso o fluxo dos íons através dessas bombas é mais lento em comparação ao fluxo dos canais iônicos. Já os canais iônicos, por não necessitarem do consumo direto de energia, tendem a ser mais rápidos. Entretanto, é preciso haver um gradiente de concentração pré-estabelecido para que os íons atravessem os canais. Esse gradiente é construído essencialmente pelo contínuo trabalho das bombas, que fazem com que os íons se acumulem contra o sentido energeticamente mais favorável (BEAR et al., 2007; KANDEL et al., 2012; ALBERTS et al., 2008).

Dessa forma, pode-se sumarizar o funcionamento dos canais iônicos e das bombas como um comportamento complementar: enquanto os canais iônicos, devido ao seu funcionamento rápido, permitem que a membrana sofra uma rápida alteração de tensão, as bombas lentamente tentam

restabelecer a situação inicial de repouso da célula, acumulando energia potencial e permitindo que novas alterações de tensão ocorram no futuro. Temporariamente, um neurônio pode funcionar sem suas bombas, desde que a sua condição inicial possua as diferenças adequadas na concentração de íons dentro e fora da célula. Porém, conforme um neurônio interage com outras células ao seu redor (especialmente outros neurônios) e com o meio, se dá a abertura dos canais. Quando os canais se abrem, ocorre a troca de íons entre o interior e o exterior do neurônio, de forma que as diferenças de concentração iônicas inicialmente estabelecidas vão sendo lentamente alteradas, e, sem o contínuo funcionamento das bombas reestabelecendo as concentrações iniciais, os meios interno e externo dos neurônios entram em uma situação de equilíbrio, fazendo assim com que o neurônio não seja mais capaz de funcionar e disparar o potencial de ação (ALBERTS et al., 2008; BEAR et al., 2007).

A movimentação intercelular dos canais iônicos é controlada por um conjunto de cargas elétricas dos resíduos de aminoácidos das proteínas formadoras desses canais. Esse fenômeno, denominado de “*gating*”, é responsável pelas alterações na permeabilidade das membranas das células excitáveis. Apesar de essas correntes de “*gating*” terem sido identificadas só a partir da década de 70, Hodgkin e Huxley, em 1952, já haviam postulado que as alterações das permeabilidades da membrana do axônio eram controladas pelo movimento de partículas carregadas no interior da membrana, que eles denominaram de partículas *n*, *m* e *h*. O modelo proposto por estes cientistas (modelo H-H) descreve quantitativamente as alterações de permeabilidade (condutâncias) da membrana aos íons sódio e potássio durante a excitabilidade; as correntes de membrana durante a excitabilidade celular e o potencial de ação propagado (NOGUEIRA, 1997).

Nas décadas de 60 e 70, experimentos farmacológicos com drogas e toxinas como a tetrodoxina (TTX), que bloqueia seletivamente os canais de Na^+ deixando os canais de K^+ e outras espécies iônicas intactos, e a toxina tetraetilamônio (TEA), que bloqueia os canais de K^+ dependentes de voltagem, mas não os de Na^+ , ajudaram a identificar os canais iônicos e a mostrar que eles são entidades individuais discretas. Esses experimentos ajudaram a consolidar o conceito de que existem canais iônicos independentes de Na^+ e K^+ . Os canais iônicos sensíveis a voltagem são proteínas grandes capazes de ultrapassar a espessura de 6-8 μm da membrana celular e são tipicamente formados por subunidades. Esses canais formam estruturas aproximadamente cilíndricas que rodeiam um poro central aquoso, o qual permite a passagem de apenas alguns tipos de íons entre o interior e o exterior da célula, sendo que esses íons podem passar por um canal dependendo do tamanho, da carga e do grau de hidratação (ROQUE, 2021).

Nos neurônios, os canais iônicos desempenham um papel fundamental: eles possibilitam

a geração do potencial de ação, que, por sua vez, permite a comunicação entre as diversas células do sistema nervoso (ALBERTS et al., 2008; BEAR et al., 2007; KANDEL et al., 2012). Mais especificamente nos axônios, os canais iônicos permitem que o potencial de ação seja gerado e se propague de forma confiável por distâncias que podem chegar a mais de um metro (BEAR et al., 2007; STERRATT et al., 2011)

2.4 Os potenciais de membrana

2.4.1 Geração do potencial de repouso

A maioria das membranas dos organismos vivos possui uma tensão de repouso diferente de zero, o que significa que existe uma diferença de potencial entre o interior e o exterior da célula (ALBERTS et al., 2008; BEAR et al., 2007; KANDEL et al., 2012). Normalmente essa diferença é negativa, e é originada pelo acúmulo de ânions negativamente carregados dentro da célula. Já os cátions, que inicialmente acompanhavam essas moléculas, são normalmente íons simples de menor tamanho que podem trafegar pelos canais de um lado para outro da célula (CORREALE, 2017).

Há também um mecanismo conhecido como bomba de sódio e potássio, que mantém concentrações fixas dos íons Na^+ e K^+ no meio intracelular, de modo que entre as faces de uma membrana em repouso há naturalmente uma diferença de potencial. A este potencial, damos o nome de potencial de repouso (MARIN, 2007).

O potencial de repouso é produzido por uma distribuição desigual de íons dentro e fora das células: dos tipos de íons mais abundantes encontrados em ambos os lados da membrana, sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e cálcio (Ca^{+2}) são encontrados em maior concentração no meio extracelular, enquanto que potássio (K^+) e ânions orgânicos (A^-) são encontrados em maior concentração no meio intracelular (MAZUR, 2006)

Quando há um desequilíbrio de cargas dentro e fora da célula, seu excedente rapidamente se acumula no entorno da membrana, dando origem a uma diferença de potencial chamada potencial de membrana (Fig 4), sendo V_m o potencial de membrana, V_{intra} o potencial no meio intracelular, e V_{extra} o potencial no meio extracelular.

$$V_m = V_{intra} - V_{extra} \quad (1)$$

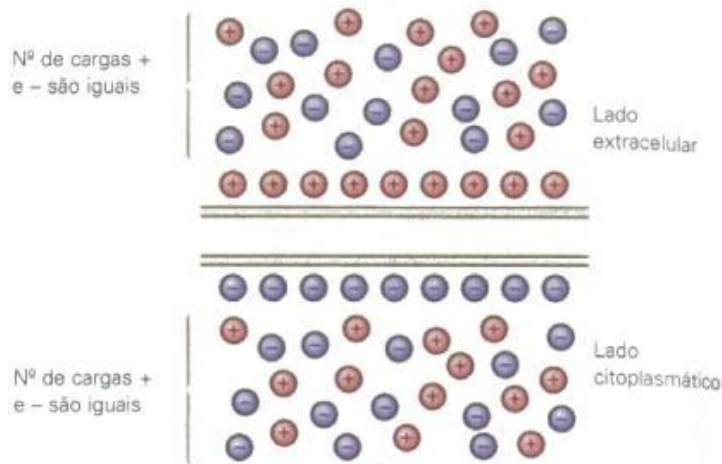


Figura 4: O excedente de cargas, positivas ou negativas, se acumula em torno da membrana celular. Extraído de (KANDEL *et al.*, 1991).

As diferenças nas concentrações fazem com que os íons se movam no sentido contrário ao dado pelo gradiente de concentração. De forma contrária, a força do campo elétrico gerada pela diferença de potencial entre os meios intra e extracelular irá dirigir os íons no sentido oposto ao movimento de difusão. Um equilíbrio será alcançado quando o fluxo dos íons - devido à diferença de concentração - se igualar ao fluxo devido à diferença de potencial. O valor do potencial transmembrânico para um fluxo nulo, ou seja, de equilíbrio para um determinado íon é dado pela equação de Nernst onde R é a constante dos gases (8,314 J/Kmol), T é a temperatura absoluta, Z é a valência do íon, F é a constante de Faraday (9,648x10⁴ C/mol), C_E e C_I denotam as concentrações externa e interna do íon (OTAVIANO CAMPOS, 2008).

$$v_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{c_e}{c_i} \right) \quad (2)$$

Essa diferença de concentrações dos dois lados da membrana dá origem a um potencial difusivo diferente para cada tipo de íon presente nos meios intra e extracelulares. A Figura 5 mostra um esquema de como uma membrana celular com um canal iônico de potássio pode ser modelada por um circuito composto por um capacitor (modelando a membrana celular), ligado em paralelo com um resistor (canal iônico) em série com uma bateria (potencial difusivo devido a diferença de concentração dos dois lados da membrana) (CARELLI, 2008).

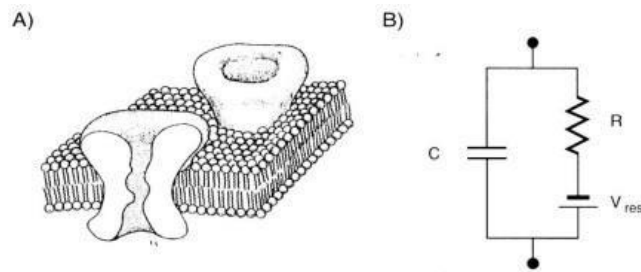


Figura 5: (A) Esquema da membrana celular com um canal iônico de potássio que a atravessa. (B) Circuito equivalente, onde a membrana é representada por um capacitor, ligado em paralelo com um resistor e uma bateria, que representam respectivamente o canal iônico de potássio, e o potencial de Nernst para o mesmo íon. Extraído de (KOCH, 1999).

No repouso, uma célula nervosa tem um excesso de cargas negativas no lado interno. Essa separação de cargas é mantida porque a bicamada lipídica da membrana bloqueia a difusão de íons. A separação de cargas origina uma diferença de potencial elétrico denominado potencial de membrana. O valor deste potencial, em seres humanos, fica entre -40 mV e -80 mV e é mantido pelas concentrações de íons principalmente de sódio (Na^+), de potássio (K^+), de cloro (Cl^-) e anions orgânicos (A^-) (BEAR et al., 2002).

Quando há mais íons presentes, com diferentes gradientes de concentração através da membrana e vários tipos de canais iônicos seletivos a esses íons, o potencial de equilíbrio depende das permeabilidades relativas da membrana a esses íons. Neste caso, o potencial de equilíbrio é dado pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK). Para uma célula permeável a K^+ , Na^+ e Cl^- a equação de GHK se apresenta conforme equação abaixo (GIOLO, 2006).

$$V = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{fora}} + (P_{\text{Na}}/P_K)[Na^+]_{\text{fora}} + (P_{\text{Cl}}/P_K)[Cl^-]_{\text{dentro}}}{[K^+]_{\text{dentro}} + (P_{\text{Na}}/P_K)[Na^+]_{\text{dentro}} + (P_{\text{Cl}}/P_K)[Cl^-]_{\text{fora}}} \quad (3)$$

Se, por algum motivo, o interior da célula nervosa se tornar mais positivo, o potencial medido entre os meios intra e extracelular pode atingir o limiar de disparo do potencial de ação. Quando isso ocorre, há uma repentina variação do potencial de membrana, que pode chegar a +40 mV. A esse fenômeno damos o nome de potencial de ação (KANDEL et al., 2000).

2.4.2 Geração do potencial de ação

O potencial de ação é iniciado com um estímulo de despolarização que precisa atingir o limiar de excitação do neurônio. Com os canais de sódio e com o aumento da permeabilidade da membrana ao sódio, seu papel no potencial de repouso irá mudar. Inicia-se, então, um grande fluxo de sódio para dentro da célula, causando sua despolarização. Depois que a célula foi despolarizada, os canais de sódio voltagem-dependentes se fecham, dando início à fase de repolarização da célula, que começa com a abertura dos canais de potássio. Com o aumento da permeabilidade ao potássio,

uma grande quantidade desses íons flui para dentro da célula. Durante esse influxo de potássio, o neurônio não pode se despolarizar de novo, estando em período refratário. Como os canais de potássio permanecem abertos por um período de tempo maior que o necessário para repolarizar a membrana até seu nível de repouso, acaba ocorrendo uma hiperpolarização. Ela fica mais negativa que o normal. Com o tempo, devido à permeabilidade natural ao potássio e à bomba de sódio-potássio, a membrana voltará ao potencial de repouso, mas, até lá, ela será mais dificilmente excitada, estando em período refratário relativo (NOGUEIRA, 1997).

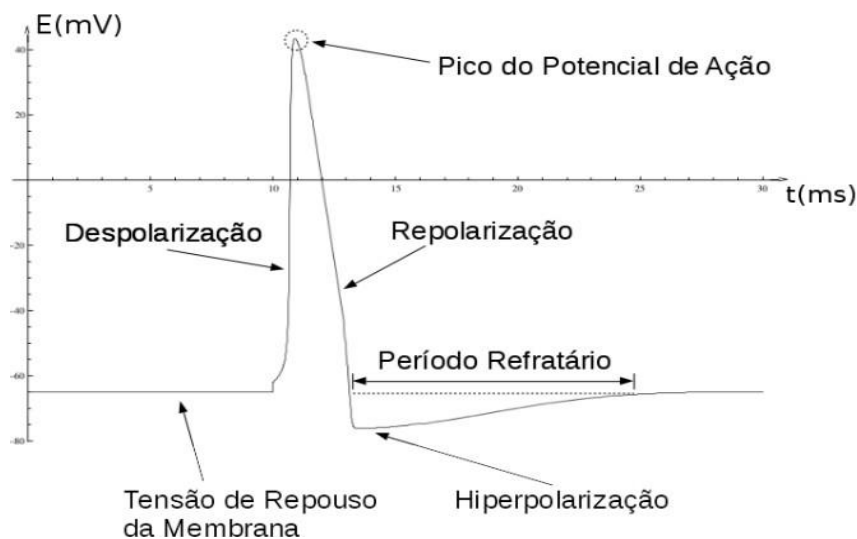


Figura 6 : O potencial de ação. No eixo das ordenadas tem-se a tensão do trecho de membrana, em milivolts, e no eixo das abscissas tem-se o tempo, em milissegundos (CORREALE, 2017)

2.5 Análogo elétrico de membrana

Experiências realizadas anteriormente já tinham mostrado que as membranas biológicas se comportavam semelhante a circuitos RC em paralelo, portanto, a corrente elétrica se deveria tanto a uma corrente iônica como capacitiva:

$$I_M = I_C + I_i = C_M \frac{dV_M}{dt} + I_i \quad (4)$$

Onde I_M é a corrente total através da membrana; I_C é corrente capacitiva; I_i é a corrente iônica; C_M é a capacitância da membrana e dV_M / dt é a taxa de variação do potencial elétrico em relação ao tempo.

A corrente iônica (I_i) pode ser expressa como se segue :

$$I_i = G_i \times V \quad (5)$$

Onde G_i é condutância da membrana a uma certa espécie iônica e V é a voltagem (NOGUEIRA, 1997).

De acordo com KANDEL *et al.*, 2000, a intensidade e a duração de estímulos sensoriais são traduzidas em potenciais de ação da seguinte maneira: quanto maior a intensidade do estímulo maior será a frequência de geração dos potenciais de ação, e quanto maior a duração do estímulo maior será a duração do trem de potenciais de ação. No entanto, a forma e a amplitude dos potenciais de ação são preservadas, independente da intensidade e duração do estímulo.

O primeiro modelo capaz de explicar como um neurônio produz um impulso nervoso foi desenvolvido por Hodgkin e Huxley (1952). Os experimentos que levaram à criação deste modelo foram feitos com o axônio gigante da lula, estrutura esta de grandes dimensões (para uma fibra nervosa), com aproximadamente meio milímetro de diâmetro. Para eliminar a complexidade introduzida pela distribuição espacial dos canais iônicos, um fio axial condutor foi introduzido no axônio e utilizado para manter fixo o potencial elétrico através da membrana axonal, técnica esta que ficou conhecida como “space clamp” pois elimina a dependência da posição onde é medido o potencial da membrana. Assim, o axônio se comporta como um capacitor, isopotencial em toda sua extensão. Hodgkin e Huxley (ano) também usaram uma técnica que ficou conhecida como “voltage-clamp”, em que a membrana do axônio é submetida a um potencial elétrico fixo (*Vclamp*), e a corrente elétrica (*I_m*) necessária para manter este potencial é medida. Desta forma, variando *Vclamp*, é possível construir uma curva *I_m X Vclamp* como é normalmente feito para descobrir as características de componentes elétricos (MAZUR, 2006).

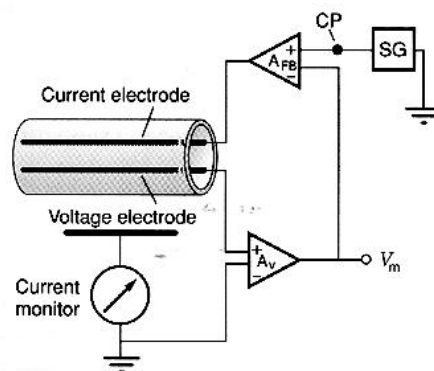


Figura 7: Esquema do aparato utilizado para realizar o experimento de fixação de voltagem (“voltage clamp”) em um axônio, onde são introduzidos dois eletrodos, um responsável por medir o potencial interno e o outro por injetar a corrente elétrica. O potencial de membrana é medido pelo amplificador de voltagem (AV) que é conectado ao eletrodo intracelular e ao terra do sistema, conectado ao banho (meio externo). O sinal do potencial de membrana (V_m) é mostrado no osciloscópio e é alimentado no terminal do amplificador de retorno (AFB). Este amplificador tem duas entradas, uma para o potencial de membrana e o outro para o potencial de comando (CP), que é um sinal elétrico escolhido pelo experimentador e que pode ter qualquer amplitude ou formato. O amplificador de retorno subtrai o potencial de membrana do potencial de comando e amplifica esta diferença, injetando uma corrente no eletrodo de corrente, mantendo o potencial interno sempre muito próximo a CP (Kandel *et al.*, 1991).

2.6 Classificação de células neuronais ganglionares

As inúmeras funções dos diferentes gânglios que compoem o sistema nervoso se refletem na eletrofisiologia celular de seus neurônios. Existem diferenças significativas, tanto nas propriedades eletrofisiológicas intrínsecas quanto na natureza das entradas sinápticas para os neurônios nos gânglios pré e paravertebrais que contribuem diretamente para seus diferentes papéis funcionais dentro do sistema nervoso simpático periférico. Dois tipos eletrofisiológicos básicos de neurônios simpáticos podem ser identificados: neurônios que respondem com rajadas transitórias de potenciais de ação (neurônios fásicos) ou neurônios que disparam continuamente (neurônios tônicos) em resposta a um estímulo despolarizante mantido. Este achado básico foi repetido em várias espécies diferentes de mamíferos e parece ser um fenômeno geral (WEEMS e SZURSZEWSKI, 1978; GRIFFITH, GALLAGHER e SHINNICK-GALLAGHER, 1980; DECKTOR e WEEMS, 1981, 1983; JULE e SZURSZEWSKI, 1983; KING e SZURSZEWSKI, 1984, 1988; CASSELL, CLARK e MCLACHLAN, 1986).

Os neurônios nos gânglios paravertebrais, pelo menos nos gânglios cervicais superiores e nos gânglios lombares caudais, são quase exclusivamente fásicos, enquanto os dos gânglios pré-vertebrais são uma mistura de fásicos e tônicos (WEEMS e SZURSZEWSKI, 1978; GALVAN e SEDLMEIR, 1984; CASSELL & McLACHLAN, 1986). Este simples esquema de classificação fásico/tônico de duas classes pode explicar grande parte dos dados experimentais, embora existam outras diferenças eletrofisiológicas mais sutis que sugerem a existência de subpopulações de neurônios dentro desta classificação (CASSELL e MCLACHLAN, 1987; KING e SZURSZEWSKI, 1988).

A pesquisa de BOYD et al. (1996) procurou identificar se a morfologia e as dimensões estruturais diferiam entre os neurônios simpáticos que foram caracterizados em outros estudos levando em conta as propriedades eletrofisiológicas e a análise das características estruturais dos neurônios pós-ganglionares simpáticos de cobaias. O estudo forneceu evidências de que as três classes de células (fásico, tônico, e pós-hiperpolarização longa) que foram distinguidas eletrofisiologicamente com base na expressão de seus canais de potássio e consequentes diferenças na excitabilidade também apresentaram características morfológicas diferentes.

Para os gânglios da raiz dorsal (GRD), por exemplo, vários trabalhos já descreveram como sendo uma estrutura com várias populações neuronais (HARPER e LAWSON, 1985, SILVA-ALVES *et al.* 2013). Uma classificação, baseada na fase de repolarização do potencial de ação, divide os neurônios do GRD em dois tipos: sem e com inflexão na fase de repolarização do potencial de ação (OLIVEIRA-ABREU *et al.*, 2019).

Na pesquisa de (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2020), em que se investigou as alterações nas propriedades eletrofisiológicas e na atividade da bomba de $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$ em neurônios do GCS de ratos diabéticos, os neurônios foram classificados em 3 tipos conforme o padrão dos disparos dos potenciais de ação: alguns neurônios disparavam um único PA, sendo chamado assim de fásico de disparo único (SFP), enquanto outros disparavam alguns PAs por isso chamados de fásico de disparo múltiplo (MFP). Um terceiro tipo disparou PAs durante mais de 80% da duração do estímulo, e assim foi classificado como do tipo tônico (TL) (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2020).

Os neurônios do GCS com propriedades de disparo distintas podem ser classificados em neurônios tônicos, fásicos-1 e fásicos-2 (JIA *et al.*, 2008). Classificações com base no padrão de disparo do potencial de ação em resposta a um pulso de corrente despolarizante, bem como outras formas de classificação, já são convenções adotadas por vários outros pesquisadores (BOYD et al., 1996; CASSELL et al., 1986 ; JIA et al., 2008a; KEAST et al., 1993; MCLACHLAN e MECKLER, 1989; WANG e MCKINNON, 1995).

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Modelos de neurônios, construídos a partir de dados eletrofisiológicos, não são apenas úteis para testar hipóteses sobre os processos que geram um comportamento particular observado experimentalmente, mas também podem ser usados para fazer previsões e orientar o pesquisador a fazer experimentos que revelem novas propriedades dos neurônios ou das redes neurais como um todo (MARDER, 1998; DAYAN e ABBOTT, 2001).

Este ciclo de troca de informações entre experimentos e modelos pode atingir níveis muito interessantes quando consideramos a possibilidade de interagir, em tempo real, com modelos computacionais e tecido vivo para construir sistemas híbridos (SZÜCS et al., 2000; PINTO et al., 2000; PRINZ, 2004) e tentar entender melhor como redes vivas operam (SELVERSTON et al., 2000), para recuperar propriedades de sistemas neurais danificados (SZÜCS et al., 2000), construir circuitos com propriedades novas (AYERS, 2004) e até mesmo alimentar uma rede neural viva com dados sensoriais vindos de dispositivos artificiais ou controlar dispositivos como interfaces cérebro máquina (CARMENA et al., 2003).

Desde o trabalho pioneiro introduzindo o método *voltage-clamp* e a modelagem matemática da atividade do axônio gigante da lula (HODGKIN e HUXLEY, 1952), modelos determinísticos do comportamento das condutâncias iônicas têm sido adotados por neurofisiologistas como o principal paradigma do comportamento elétrico macroscópico de membranas nervosas.

A razão principal para o sucesso destes modelos é que eles são capazes de explicar a maior parte do comportamento elétrico de células nervosas, incluindo o potencial de ação, usando uma estrutura matemática rigorosa. Como a maioria dos parâmetros do modelo podem ser inferidos quase diretamente de experimentos de *voltage-clamp* (HODGKIN e HUXLEY, 1952; KANDEL et al., 1991), onde as contribuições de cada corrente iônica da membrana podem ser separadas e estudadas em detalhes, os modelos determinísticos se tornaram muito populares entre os pesquisadores (KANDEL et al., 1991; DAYAN e ABBOTT, 2001). Esses modelos são chamados determinísticos porque, uma vez especificadas as condições iniciais, a integração no tempo de um conjunto de equações diferenciais determina uma única solução que representa a evolução temporal do potencial de membrana.

Modelar a dinâmica de neurônios é, portanto, algo bastante relevante no ramo da neurociência. O comportamento dos neurônios do gânglio cervical superior têm sido estudado há muito tempo e existe uma grande quantidade de dados experimentais de *voltage-clamp*, além de modelos detalhados construídos a partir desses dados. Sendo assim é inquietante investigar por meio da utilização do análogo elétrico de membrana as propriedades elétricas dos neurônios do gânglio

cervical superior de ratos.

Diante do exposto, a realização deste trabalho justifica-se, pois as descobertas encontradas podem esclarecer melhor os dados até aqui existentes na literatura sobre as formas de classificação neuronal, além de permitir no futuro uma comparação da integração neuronal em diferentes modalidades simpáticas, pois não há na literatura uma convenção deste tipo de classificação.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Investigar por meio da utilização do análogo elétrico de membrana as propriedades elétricas passivas e suas influências no funcionamento dos neurônios do gânglio cervical superior de ratos.

4.2 Específicos

- Estudar o análogo elétrico de membrana para os neurônios do GCS;
- Analisar a influência das propriedades elétricas passivas nos dados eletrofisiológicos experimentais dos neurônios do GCS;
- Simular os potenciais de membrana do análogo elétrico de membrana dos neurônios do GCS;
- Comparar os dados simulados com os dados experimentais dos neurônios do GCS;
- Classificar os neurônios do GCS com base na repercussão das respostas passivas da membrana em voltagens negativas em relação aos potencial de repouso;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Procedimento experimental:

Ratos Wistar foram obtidos do Instituto Superior de Biomedicina Ciências, Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram mantidos sob 12 h: ciclo claro/escuro de 12 h à temperatura ambiente (22–24 °C) com acesso a comida e água *ad libitum*.

5.2 Obtenção dos dados eletrofisiológicos:

O registro das propriedades elétricas dos neurônios do GCS foi realizado conforme descrito por Ferreira-Da-Silva *et al.* (2009) e Oliveira-Abreu *et al.* (2018). O GCS foi dissecado e imediatamente colocado em solução de Locke modificada.

Tecidos conjuntivos aderentes adjacentes ao gânglio foram cuidadosamente removidos. Posteriormente, o GCS foi fixado em uma câmara de registro de acrílico com fundo Sylgard®, utilizando-se uma lupa (modelo COLLEGE STEREO, MLW Intermed, Schöneiche, Alemanha), com aumento de 20×. Os tecidos foram perfundidos por fluxo gravitacional (1–1,5 mL/min) em uma câmara com volume de 200 µL. Para minimizar os efeitos da capacitância do eletrodo, o nível de líquido da câmara foi ajustado para a menor altura possível acima da superfície do gânglio. Os microeletrodos foram fabricados usando vidro borossilicato (1,0 mm OD, 0,6 mm ID, Sutter Instrument, Novato, CA, EUA) e um extrator de micropipeta (modelo P-97, Sutter Instrument).

Os microeletrodos foram preenchidos com solução de KCl 3 M para obter resistência de ponta entre 40 e 90 MΩ. Os microeletrodos foram montados em um pré-amplificador, conectado a um eletrômetro (modelo AXOCLAMP 900A, Axon CNS, Molecular Devices, Foster City, CA, EUA). A movimentação dos microeletrodos e o empalamento das células foram realizados com um micromanipulador elétrico (modelo MS 314, Märzhäuser Wetzlar, Alemanha).

As propriedades de membrana elétrica passiva e ativa dos neurônios GCS foram registradas no modo *current-clamp*, no qual o valor da corrente a ser injetada é controlado, a fim de evocar o tipo apropriado de resposta de voltagem do neurônio empalado. As saídas de corrente e tensão foram amostradas a 50 kHz, e a aquisição de

dados, monitoramento e armazenamento on-line foram realizados usando hardware de aquisição de computador (DIGIDATA modelo 1440A, Molecular Devices, EUA).

Os registros eletrofisiológicos foram adquiridos por meio de software (CLAMPEX, versão 10.4), e os dados armazenados em computador para posterior análise. Neurônios do grupo controle foram considerados aceitáveis para o estudo quando o potencial de membrana de repouso era mais negativo que -45 mV e tinha APs overshooting. As seguintes propriedades da membrana foram medidas: potencial de membrana em repouso (E_m), resistência de entrada (R_{in}), reobase, limiar de voltagem, amplitude, duração, taxa máxima de ascensão [ascendente, $dV/dt(asc)$] e taxa máxima de queda de AP [inclinações descendentes, $dV/dt(desc)$].

A amplitude do pico pós-hiperpolarização (AHP) também foi medida. O limiar de tensão do PA foi medido com o gráfico do plano de fase do dV/dt (ordenada) versus tensão (abscissa) do AP. O limiar de tensão foi a tensão na qual o dV/dt se inclinou abruptamente para cima na fase inicial com o início da fase de despolarização do AP. A amplitude do AP foi considerada a diferença de voltagem entre o pico de voltagem de despolarização e o RMP. A duração do PA foi medida na metade da amplitude máxima. A amplitude do AHP foi considerada a diferença de voltagem entre o RMP e o pico de voltagem de hiperpolarização. A duração do AHP foi medida em 50% (AHPd50) de sua amplitude máxima.

O R_{in} foi medido dividindo a resposta de voltagem máxima a um pequeno pulso de corrente hiperpolarizante pela corrente do pulso. Para a medição precisa do R_{in} , especialmente quando ocorreram pequenas mudanças na resistência do eletrodo durante um experimento, dois tipos de medições foram usados: modo ponte e o modo de pinça de corrente descontínua (DCC). Esses dois modos apresentam diferentes fontes de erro que influenciam na medição do R_{in} . No modo ponte, a medição precisa depende da compensação completa da resistência do microeletrodo, enquanto no modo DCC sua precisão depende da frequência de amostragem e da capacitância da membrana e não da resistência do microeletrodo. Uma medida de R_{in} foi aceita como correta se os dois valores, colhidos pelo dois métodos concordassem, apresentando diferença menor que 5% (AXON, 2012).

5.3 Simulação das propriedades passivas da membrana

Para análise dos dados usamos um programa em C para calcular as equações do circuito RC, mas com os dados experimentais. Assim, geramos as curvas tanto experimentais quando simuladas do potencial de membrana quando estimulado o neurônio com pulsos negativos, obtendo assim as respostas passivas. Depois, subtraímos os sinais para verificar se a célula apresentava retificação ou não ou se apresentava deflexão negativa.

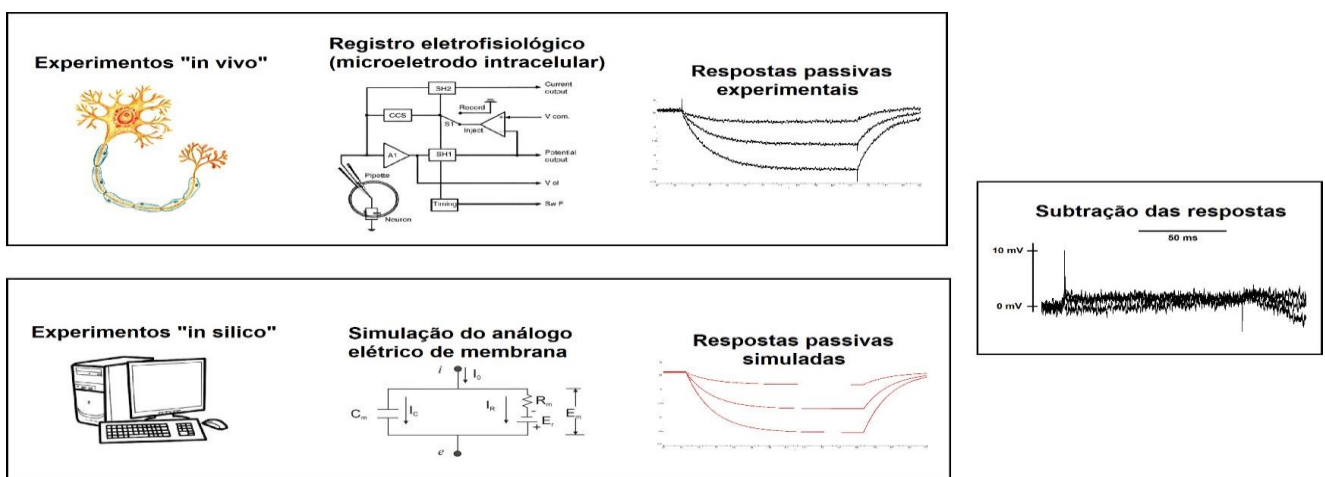


Figura 8: modelagem do análogo elétrico de membrana

Os dados desse trabalho são provenientes do projeto submetido ao CEUA/UECE, que recebeu aprovação sob número 4695010/2016. Inicialmente foi feito um programa em linguagem C que modelava a membrana dos neurônios do GCS utilizando as equações de um circuito resistor-capacitor simples. Depois, foram analisados os dados experimentais de corrente-voltagem (I_xV) dos neurônios do GCS e os parâmetros eletrofisiológicos potencial de repouso (E_m), resistência de entrada (R_{in}) e tempo de decaimento da voltagem (τ_m) foram inseridos no programa para obtenção das curvas I_xV simuladas e de dados da membrana neuronal.

5.4 Análise estatística

Ao todo foram utilizados 8 animais, obtidos 77 células para os dados eletrofisiológicos (procedimento experimental) e os resultados estão expressos como média

± E.P.M, em que o número entre parênteses representa o número de neurônios. Para comparação entre os grupos, o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste Holm-Sidak foi utilizado e os grupos apresentaram diferença estatística quando o valor de p para ocorrência da hipótese nula foi menor ou igual a 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 Potencial de Nernst para os íons Na^+ , K^+ e Cl^-

Primeiramente, pesquisamos na literatura as concentrações dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- para o GCS, já que as concentrações desses íons em solução de Locke é conhecida. Utilizamos as concentrações intracelulares descritas nos trabalhos (BALLANYI et al., 1984) e os valores das concentrações iônicas descritas na tabela 1.

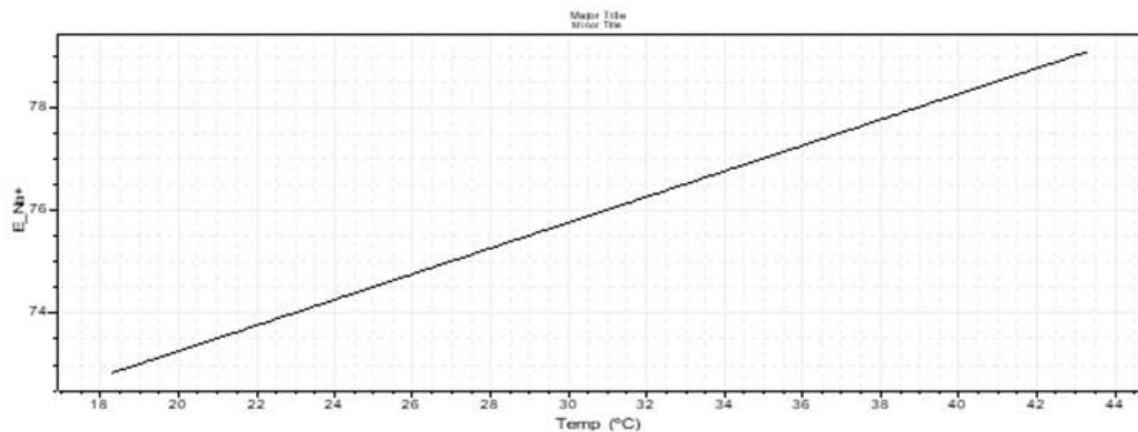
Tabela 1: concentrações dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- no fluido extracelular e intracelular.

Íon	$[X]_{\text{extracelular}} \text{ (mM)}^*$	$[X]_{\text{intracelular}} \text{ (mM)}$
Na^+	140	$7,7 \pm 3,3$
K^+	5,6	$129,7 \pm 12,9$
Cl^-	152,4	$40,4 \pm 6,0$

*: as concentrações dos íons são as descritas na solução de Locke modificada.

Para a determinação dos potencial de Nernst para os íons Na^+ , K^+ e Cl^- , utilizamos a equação 2 anteriormente citada em outra sessão deste trabalho (ver página 27). Além disso, fizemos a variação da temperatura dentro do valor fisiológico (GUYTON, 2006) de $18,3^\circ\text{C}$ a $43,3^\circ\text{C}$. Os valores dos potenciais de Nernst para os íons Na^+ , K^+ e Cl^- na faixa de temperaturas descrita estão mostrados na figura 9, painéis A a C.

A



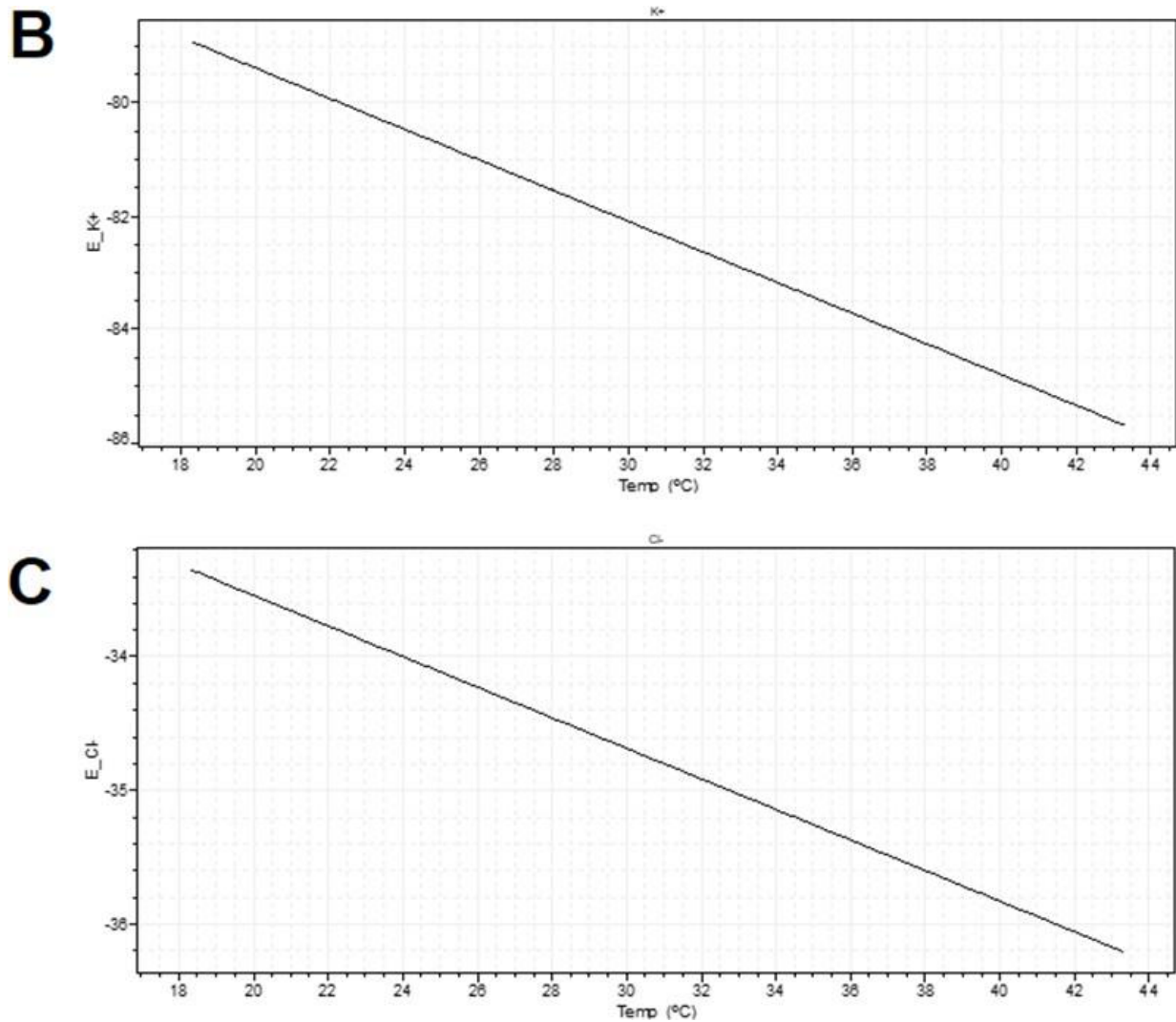


Figura 9: Potencias de Nernst para os íons Na^+ (painel A), K^+ (painel B) e Cl^- (painel C) na faixa de temperaturas de 18,3 a 43,3 °C.

Conforme visto na figura, o potencial de Nernst cresce/desce conforme uma reta nas faixas de temperatura. Para o íon Na^+ , a reta é crescente com o aumento da temperatura, enquanto para os íons K^+ e Cl^- a reta é decrescente. Além disso, a variação do potencial de Nernst entre temperatura mais baixa (18,3 °C) e a temperatura mais alta (43,3 °C) foi de 72.85 mV a 79.09 mV, -78.92 mV a -85.69 mV e -33.35 mV a -36.21 mV para os íons Na^+ , K^+ e Cl^- respectivamente. Os dados eletrofisiológicos experimentais analisados nesse trabalho foram obtidos na situação de temperatura controlada entre 22°C e 26 °C e, dessa forma, utilizamos o ponto médio de 24° C para realizar o cálculo dos potenciais de Nernst para os íons uma vez ser esta a temperatura ambiente no laboratório. Os valores desses potenciais estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Valores dos potenciais de Nernst para os íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ na temperatura de 24 °C.

<i>Íon</i>	<i>[X]extracelular (mM)</i>	<i>[X]intracelular (mM)</i>	<i>E[X] a 24 °C (mV)</i>
Na ⁺	140	7,7 ± 3,3	74,3
K ⁺	5,6	129,7 ± 12,9	-80,5
Cl ⁻	152,4	40,4 ± 6,0	-34,0

6.2 Análise das propriedades passivas dos neurônios do GCS.

Em seguida, analisamos os registros eletrofisiológicos dos neurônios do GCS obtidos com a técnica do microeletrodo intracelular. Foram analisadas 77 células, e observamos a resposta desses neurônios a um pulso hiperpolarizante de grande amplitude (-0,5 nA).

Em uma análise inicial, observamos dois tipos de neurônios. Um grupo apresentava uma retificação do valor do potencial de membrana quando aplicado um pulso de corrente de grande amplitude e outro grupo que não apresentava essa retificação. Ao grupo que não apresentava essa retificação, nomeamos grupo SEM retificação. Para as células que apresentavam essa retificação, nomeamos de grupo COM retificação. Dessa forma, procedemos com as análises dos parâmetros quando a célula era estimulada com uma onda quadrada de amplitude -0,5 nA e duração de 100 ms. Após as análises iniciais, esses dados experimentais foram inseridos no programa que utiliza as equações do análogo elétrico de membrana para determinar a área da membrana, a condutância de entrada (G_m) e a capacitância de membrana (C_m).

Com a utilização do circuito análogo elétrico de membrana e da subtração dos traçados experimentais com os simulados, percebemos o aparecimento de um terceiro grupo de neurônios derivado das células sem retificação. Nesse terceiro grupo, quando efetuado a simulação e posteriormente a subtração entre sinais, percebeu-se que o resultado era de uma propagação de sinal acentuadamente “para baixo”, no sentido negativo (hiperpolarizado) da voltagem, fato este não percebido nos dois primeiros grupos de células. Vale ressaltar que o comportamento em questão se deu inicialmente dentro do grupo das células sem retificação de sinal e, devido à evidência deste comportamento tão distinto das demais células analisadas, resolvemos separá-lo em outro grupo. Dessa forma, nomeamos assim três grupos de neurônios: sem retificação, com retificação despolarizante e com retificação hiperpolarizante. A figura 10 mostra os traçados representativos das respostas passivas desses três grupos.

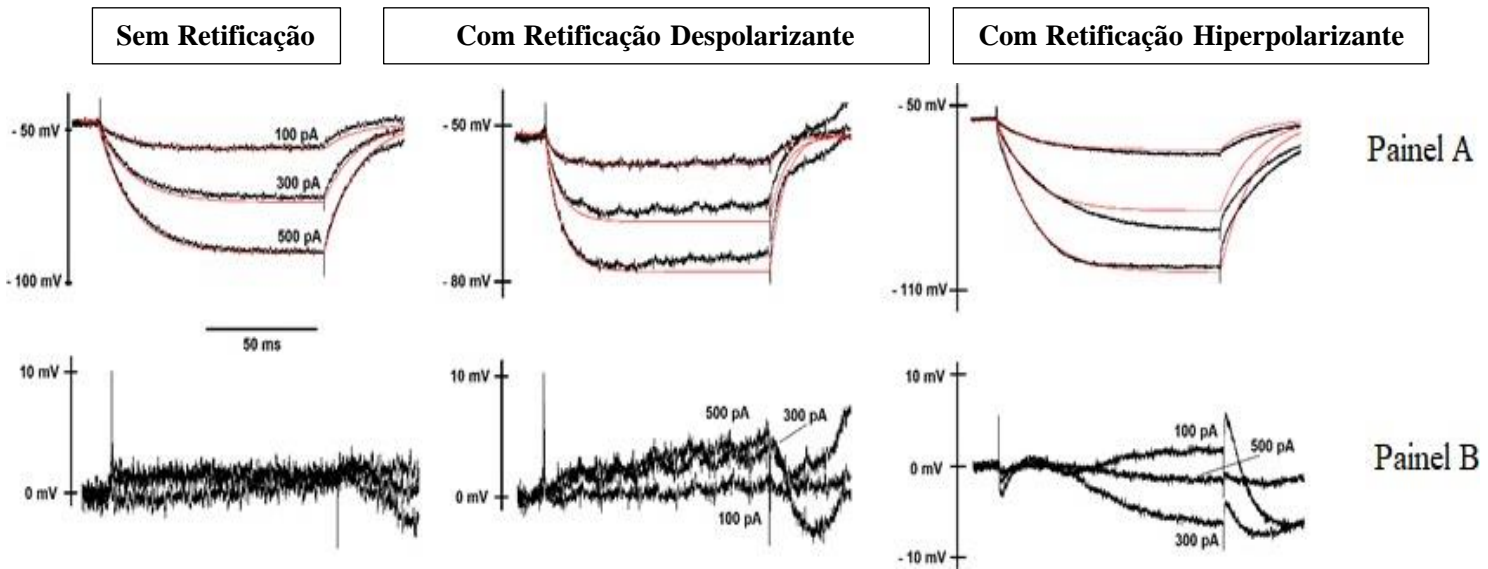


Figura 10: traçados representativos das respostas passivas dos neurônios do gânglio cervical superior.

Os traçados mostrados no painel A acima evidenciam o comportamento experimental bem como o comportamento simulado das células neuronais em 3 situações de corrente (100 pA, 300 pA e 500 pA). O dado experimental aparece em preto e o dado simulado em vermelho, ambos apresentados sobrepostos para permitir uma constatação visual e assim poder demonstrar como os dados se comportam. Nas células sem retificação, os dois traçados se propagam praticamente juntos, sem grandes divergências mesmo com a mudança de correntes de 100 pA a 500 pA, porém nas células com retificação despolarizante é evidente que os traçados destoam já próximo do final do pulso, sendo essa diferença mais nítida nos pulsos de 300 pA e 500 pA com um comportamento “para cima”, ou seja, apresentando um comportamento positivo e ao mesmo tempo denotando uma retificação de sinal significativa. Nesse grupo, a amplitude da retificação ao final do pulso de 100 ms, apresentou valor médio de $3,5 \pm 0,9$ mV.

Entretanto, no grupo de células que chamamos “com retificação hiperpolarizante”, os traçados iniciam sua separação já no início do pulso, principalmente no pulso de 300 pA onde aqui o traçado se apresenta “para baixo” deixando claro o comportamento negativo da retificação (deflexão) hiperpolarizante do pulso, comportamento este que deu nome ao grupo de células em questão.

No painel B ainda da figura 10 acima, temos o comportamento das células após realizadas a subtração dos sinais experimentais e simulado. Isto deixa ainda mais claro a presença de 3 grupos de células neuronais uma vez que na 1ª subtração vemos as 3 linhas se comportarem praticamente da mesma forma, ainda que com uma mínima variação, porém todas permanecem quase que exclusivamente na escala de 0 mV. Na subtração das células com retificação despolarizante percebemos uma deflexão para cima (positiva) e na última subtração (células com retificação hiperpolarizante) resta evidenciado uma deflexão para baixo (negativa) no pulso de 300 pA e um mais para cima (no pulso de 100 pA).

Com relação às propriedades passivas dos neurônios, o gráfico 1 mostra o potencial de repouso dos grupos analisados. A média do potencial de repouso dos grupos de células sem e com retificação mostraram valores bem próximos ($-50,0 \pm 0,7$ mV e $-49,4 \pm 1,7$ mV, respectivamente). Entretanto, mesmo não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, Holm-Sidak), o 3º grupo de células apresentou um potencial de repouso mais negativo $-54,2 \pm 1,4$ mV, o que já nos mostra um comportamento diferente neste grupo de células que é o estado de hiperpolarização.

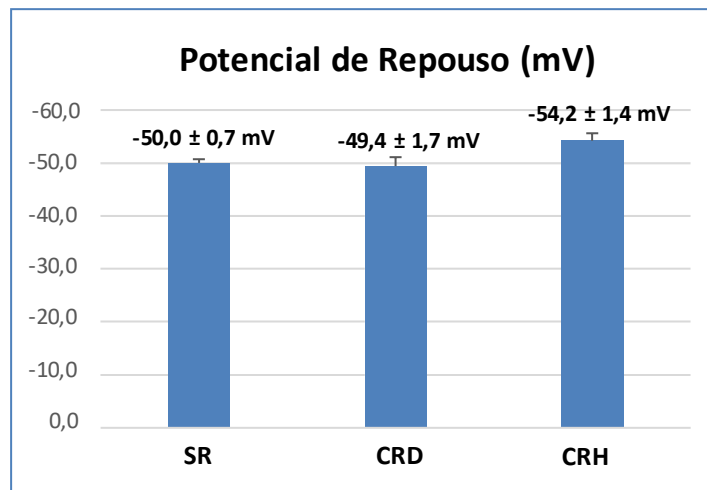


Gráfico 1: Potencial de repouso dos grupos SR, CRD e CRH

Na análise da resistência, o grupo de células com menor valor foram as células com retificação despolarizante, com valores médios de $64,9 \pm 10,1$ M Ω . As células com valores maiores deste parâmetro foram as células do grupo com retificação hiperpolarizante, com valores médios de $104,5 \pm 4,4$ M Ω enquanto as células sem retificação tiveram valor médio de $94,2 \pm 8,9$ M Ω . Para esse parâmetro, não houve diferença estatística significativa entre os grupos celulares ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, Holm-Sidak). O gráfico2 mostra os dados descritos acima.

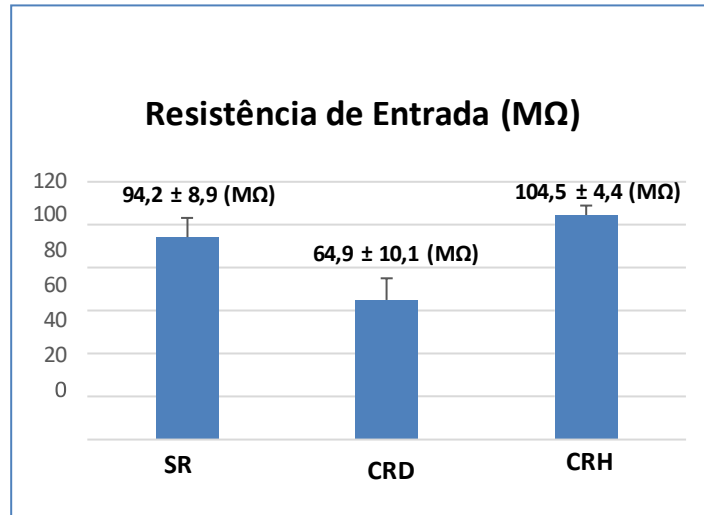


Gráfico 2: Resistência de entrada dos grupos SR, CRD e CRH

Quanto à constante de decaimento, o gráfico 3 mostra que houve diferença significativa entre as células sem retificação e com retificação hiperpolarizante ($p < 0,05$, ANOVA seguido por Holm-Sidak) em relação ao grupo CRD, uma vez que aqueles apresentaram valores 2 vezes maiores (média de $13,2 \pm 1,0$ ms para as células sem retificação e $13,2 \pm 0,8$ ms para as células do grupo com retificação hiperpolarizante).

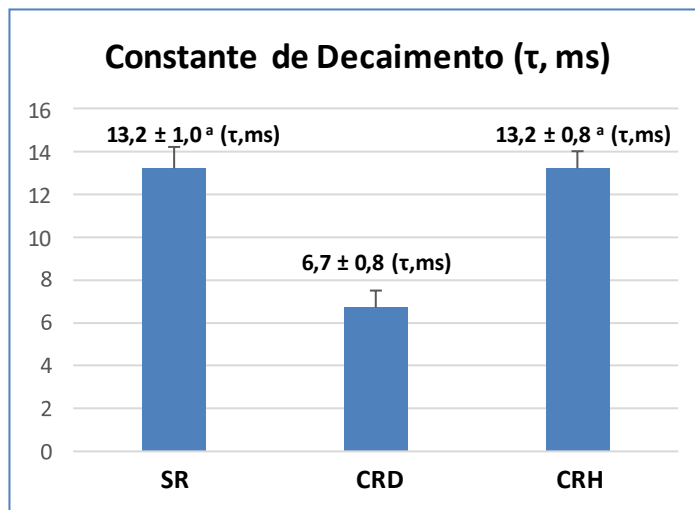


Gráfico 3: Constante de decaimento dos grupos SR, CRD e CRH

A maior área de superfície celular entre os grupos estudados ficou evidenciado nas células sem retificação, como mostra o gráfico 4, com valor médio de $16085,9 \pm 695,4 \mu\text{m}^2$, com demais grupos apresentando valores médios de $11533,8 \pm 951,0 \mu\text{m}^2$ para as células CRD e $13081,1 \pm 945,0 \mu\text{m}^2$ para as células CRH.

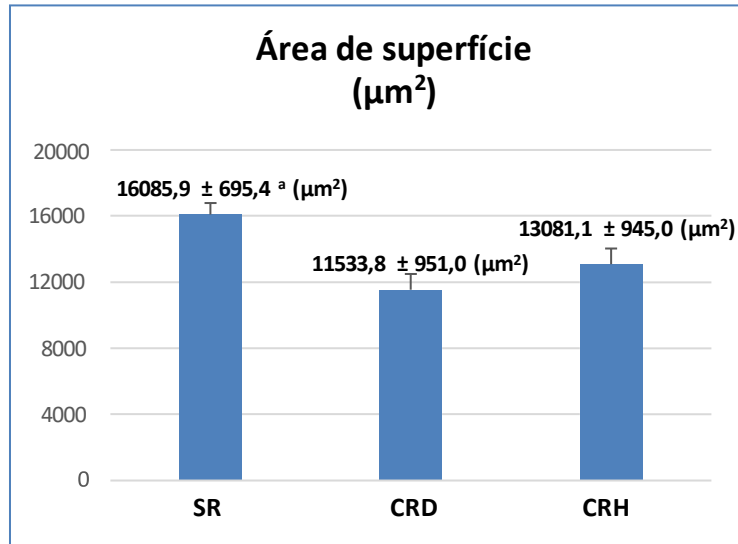


Gráfico 4: Área de superfície celular dos grupos SR, CRD e CRH

Já no que diz respeito ao parâmetro condutância, o maior valor médio ficou por conta do grupo de células com retificação despolarizante ($19,6 \pm 2,0$ nS). Neste parâmetro as células sem retificação apresentaram valores de $15,3 \pm 1,2$ nS e CRH $9,9 \pm 0,4$ nS. Dados estes mostrados no gráfico 5.

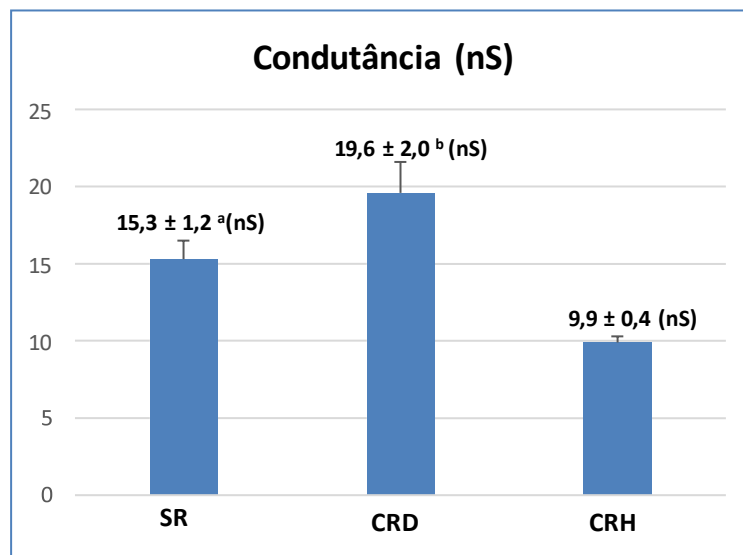


Gráfico 5: Condutância dos grupos SR, CRD e CRH

Comparando a capacitância dos 3 grupos, as células sem retificação apresentaram valores médios de $160,9 \pm 7,0$ pF, enquanto os outros grupos de células mostraram valores de $115,3 \pm 9,5$ pF e $130,8 \pm 9,5$ pF (CRD e CRH, respectivamente), apresentando diferença estatística entre o grupo CRD em relação ao grupo sem retificação ($p < 0,05$, ANOVA).

seguido por Holm-Sidak).

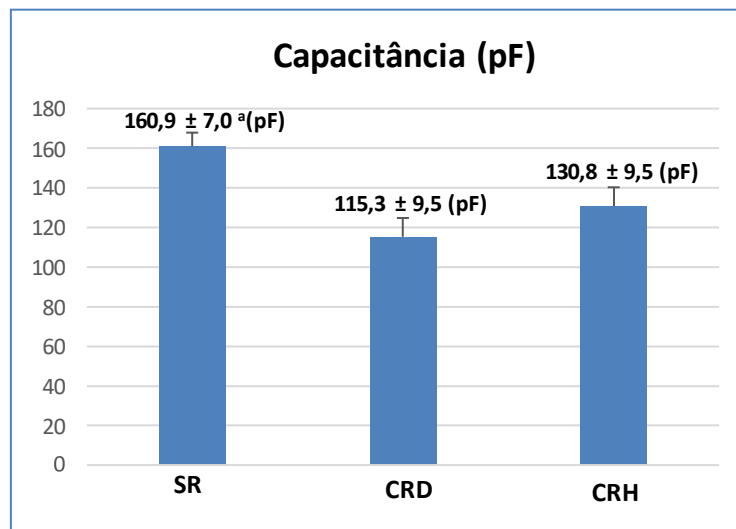


Gráfico 6: Capacitância dos grupos SR, CRD e CRH

A tabela 3 traz as informações referentes às análises realizadas quanto a propriedades passivas dos neurônios do gânglio cervical superior.

Tabela 3 : Estatísticas dos parâmetros passivos dos neurônios do gânglio cervical superior

Parâmetro	Todas as células (n = 77)	Sem retificação (n = 50)	Com retificação Despolarizante (n = 17)	Com retificação Hiperpolarizante (n = 10)
Potencial repouso (E_m , mV)	de $-50,4 \pm 0,6$	$-50,0 \pm 0,7$	$-49,4 \pm 1,7$	$-54,2 \pm 1,4$
Resistência entrada (R_{in} , M Ω)	de $89,1 \pm 6,4$	$94,2 \pm 8,9$	$64,9 \pm 10,1$	$104,5 \pm 4,4$
Constante decaimento (τ , ms)	de $11,8 \pm 0,8$	$13,2 \pm 1,0^a$	$6,7 \pm 0,8$	$13,2 \pm 0,8^a$
Área de superfície (A_{sup} , μm^2)	$14690,6 \pm 555,2$	$16085,9 \pm 695,4^a$	$11533,8 \pm 951,0$	$13081,1 \pm 945,0$
Condutância entrada (G_{in} , nS)	de $15,6 \pm 0,9$	$15,3 \pm 1,2^a$	$19,6 \pm 2,0^b$	$9,9 \pm 0,4$
Capacitância (C, pF)	$146,9 \pm 5,6$	$160,9 \pm 7,0^a$	$115,3 \pm 9,5$	$130,8 \pm 9,5$
Amplitude de retificação (Amp. Ret., mV)	da -	-	$3,5 \pm 0,9$	-

^a, diferença estatística significativa em relação ao grupo COM RETIFICAÇÃO DESPOLARIZANTE ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

^b, diferença estatística significativa em relação ao grupo COM RETIFICAÇÃO HIPERPOLARIZANTE ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

6.3 Análise das propriedades ativas dos neurônios do GCS.

Neste estudo foram também analisadas as propriedades ativas dos neurônios do GCS. Continuamos a utilizar a classificação dos neurônios de acordo com as respostas passivas e, dessa forma, analisamos os parâmetros ativos das células dentro dos grupos SR, CRD e CRH. Os parâmetros ativos analisados foram a reobase, a amplitude do potencial de ação (PA), a duração do PA em 50 % da amplitude e as inclinações máxima ascendente ($dv/dt_{\text{ascendente}}$) e descendente ($dv/dt_{\text{descendente}}$) do PA.

O gráfico 7 mostra que a maior média de reobase evidenciada pertenceu ao grupo de células SR ($213,0 \pm 22,4$ pA) sendo o menor valor para este parâmetro pertencente as células CRH ($135,0 \pm 10,7$ pA). Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, Holm-Sidak).

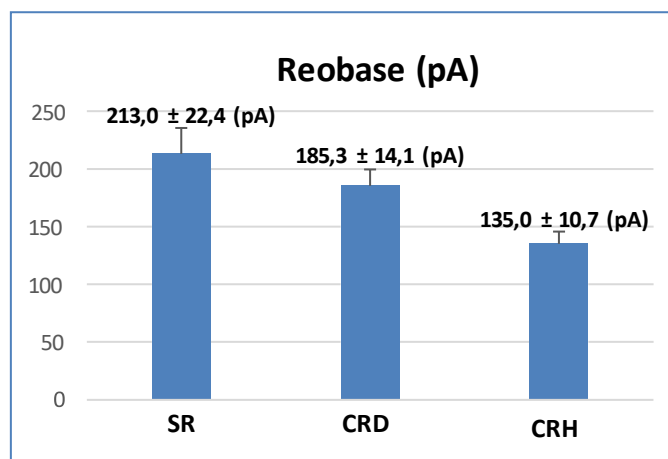


Gráfico 7: Reobase dos grupos SR, CRD e CRH

Na análise da amplitude do potencial de ação, o grupo de células com menor valor foram as células CRD, com valores médios de $67,1 \pm 3,8$ mV. As células com valores maiores deste parâmetro foram as células do grupo CRH, com valores médios de $80,2 \pm 2,7$ mV.

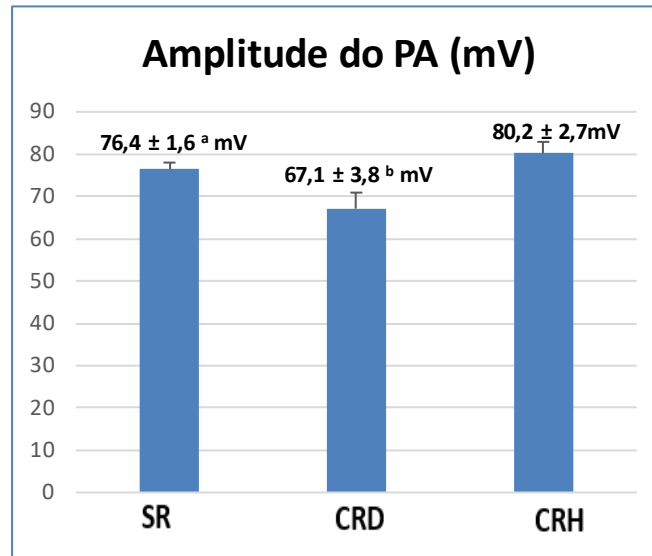


Gráfico 8: Amplitude do potencial de ação dos grupos SR, CRD e CRH

Quanto à duração da amplitude em 50% houve diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak) entre os grupos SR em relação ao CRD sendo os valores para este grupos $3,0 \pm 0,1$ ms e $3,6 \pm 0,3$ ms, respectivamente. O grupo CRH apresentou valor médio de $2,8 \pm 0,2$ ms não sendo relevante significativamente ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, Holm-Sidak).

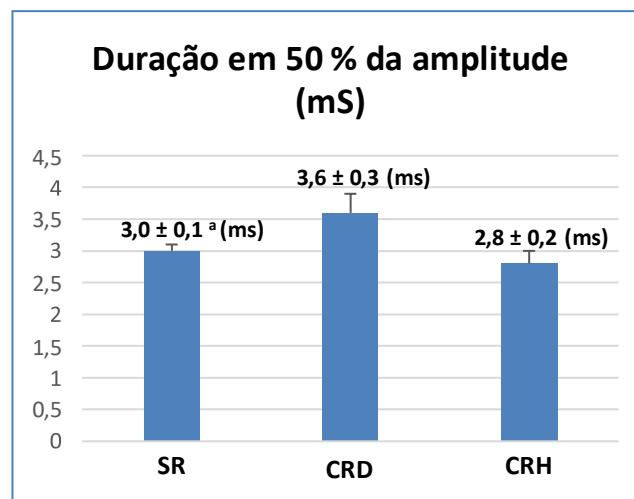


Gráfico 9: Duração em 50% da amplitude do PA nos grupos SR, CRD e CRH

A maior inclinação máxima ascendente entre os grupos estudados ficou evidenciado nas células CRH, com valor médio de $87,4 \pm 8,2$ V/s, já no que diz respeito ao parâmetro inclinação máxima descendente o valor médio ficou por conta do grupo de células SR ($-52,9 \pm 2,0$ V/s). Os dados mencionados são mostrados nos gráficos 10 e 11.

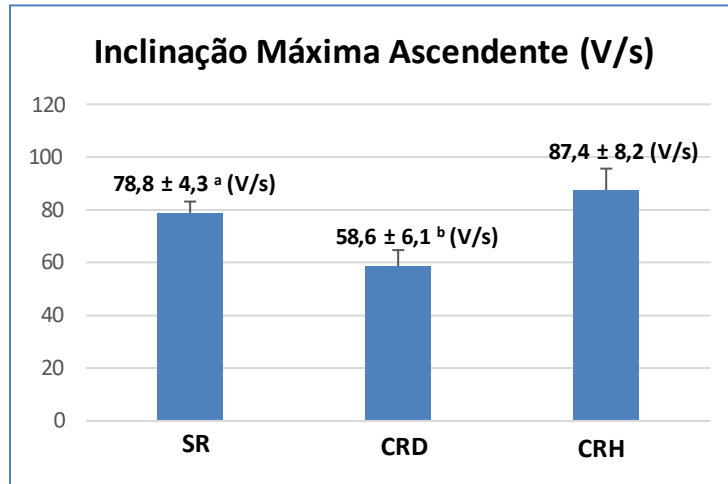


Gráfico 10: Inclinação Máxima Ascendente nos grupos SR, CRD e CRH

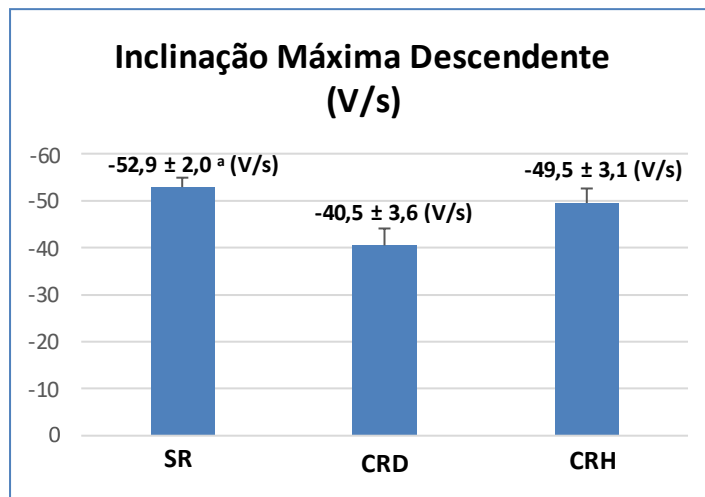


Gráfico 11: Inclinação Máxima Descendente nos grupos SR, CRD e CRH

A tabela 4 abaixo traz as todas as informações referentes às análises realizadas quanto aos parâmetros ativos dos neurônios do gânglio cervical superior.

Tabela 4: Estatísticas dos parâmetros ativos dos neurônios do gânglio cervical superior.

Parâmetro	Todas as células (n = 77)	Sem retificação (n = 50)	Com retificação Despolarizante (n = 17)	Com retificação Hiperpolarizante (n = 10)
Reobase (I, pA)	196,8 ± 15,2	213,0 ± 22,4	185,3 ± 14,1	135,0 ± 10,7
Amplitude do PA (mV)	74,9 ± 1,4	76,4 ± 1,6 ^a	67,1 ± 3,8 ^b	80,2 ± 2,7

Duração em 50 % da amplitude (ms)	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,3	2,8 ± 0,2
Inclinação máxima ascendente (V/s)	75,5 ± 3,4	78,8 ± 4,3 ^a	58,6 ± 6,1 ^b	87,4 ± 8,2
Inclinação máxima descendente (V/s)	-49,7 ± 1,7	-52,9 ± 2,0 ^a	-40,5 ± 3,6	-49,5 ± 3,1

^a, diferença estatística significativa em relação ao grupo COM RETIFICAÇÃO DESPOLARIZANTE ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

^b, diferença estatística significativa em relação ao grupo COM RETIFICAÇÃO HIPERPOLARIZANTE ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

6.4 Análise das propriedades ativas utilizando a subtração do sinal.

Após realizar as análises das propriedades passivas e ativas dos sinais, procedeu-se com a simulação da resposta do análogo elétrico de membrana à rebase das células. Essa abordagem gerou as respostas passivas dos neurônios à corrente positiva, como pode ser visto na figura 11, nos traçados em vermelho. Uma vez com a simulação, realizamos a subtração entre o dado experimental e o dado simulado do circuito RC e daí foram também feitas as análises das propriedades ativas desse sinal subtraído. Os parâmetros analisados foram a amplitude do PA, a duração do PA em 50 % da amplitude e as inclinações máximas dos ramos ascendente e descendente do PA. Contudo, a comparação do dado experimental do PA e do circuito RC simulado permitiu outras análises, e a figura abaixo demonstra os traçados representativos dos PAs nos três grupos neuronais (em preto), os dados simulados (em vermelho) e a subtração do dado experimental com a simulação (em cinza).



Figura 11: traçados representativos das respostas ativas dos neurônios do gânglio cervical superior.

Na figura 11 vemos o comportamento do potencial de ação dos 3 grupos de células.

Percebe-se a existência de 3 traçados para cada tipo de célula: o potencial de ação original (em preto), a resposta simples do circuito RC sem os elementos do PA (em vermelho) e a subtração dos traçados anteriormente citado (em cinza). Para esses resultados aplicamos os mesmos dados experimentais do circuito RC colocando apenas uma corrente para ser a parte positiva do circuito e assim poder-se analisar, também, o potencial limiar que deflagra o PA, a duração na base do PA, o anti-pico do PA e a amplitude da AHP.

Na análise da amplitude do potencial de ação subtraído, o grupo de células com menor valor foram as células CRD, com valores médios de $56,8 \pm 3,4$ mV. As células com valores maiores deste parâmetro foram também as células do grupo CRH, com valores médios de $67,1 \pm 2,2$ mV.

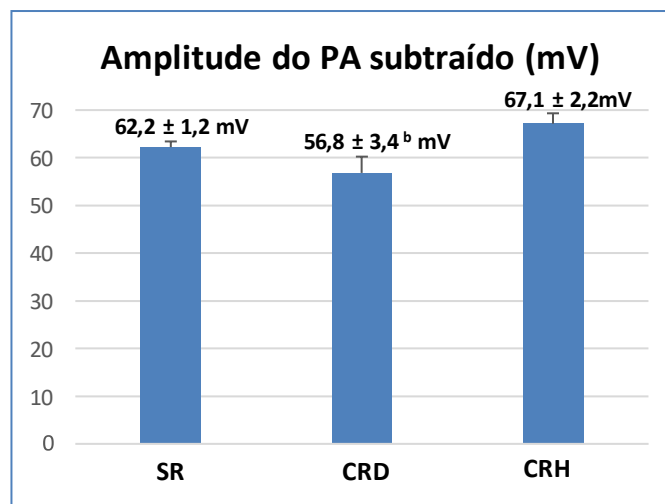


Gráfico 12: Amplitude do PA subtraído nos grupos SR, CRD e CRH

Quanto à duração da amplitude em 50% o grupo de células com valores maiores foram as células CRD ($3,1 \pm 0,2$ ms), já os outros dois grupos apresentaram valores bem próximos ($2,6 \pm 0,1$ e $2,4 \pm 0,2$ para os grupos SR e CRH, respectivamente).

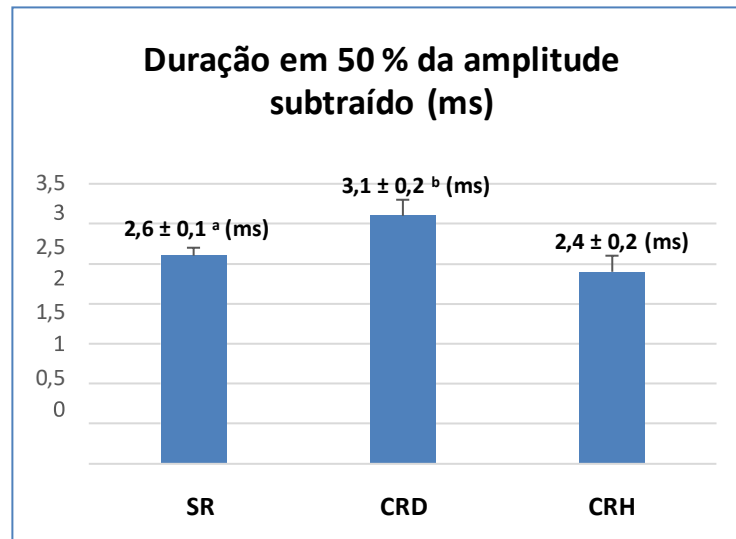


Gráfico 13: Amplitude do PA subtraído nos grupos SR, CRD e CRH

A maior inclinação máxima ascendente entre os grupos estudados ficou evidenciado também nas células CRH, com valor médio de $87,4 \pm 8,2$ V/s, já no que diz respeito ao parâmetro inclinação máxima descendente o valor médio mais negativo ficou por conta do grupo de células SR ($-52,6 \pm 2,0$ V/s). Percebe-se aqui que tanto na análise do dado experimental quanto na subtração estes grupos de células apresentaram o mesmo comportamento.

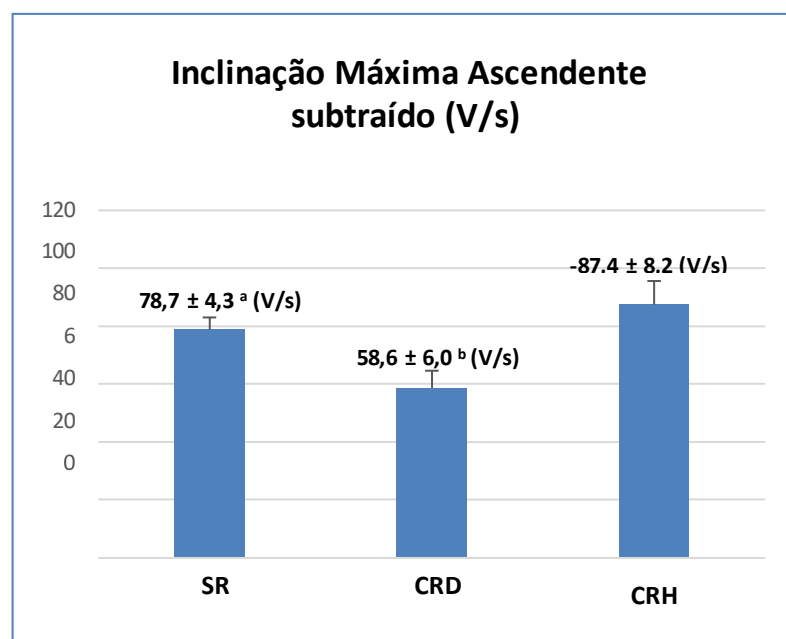


Gráfico 14: Inclinação Máxima Ascendente subtraído nos grupos SR, CRD e CRH

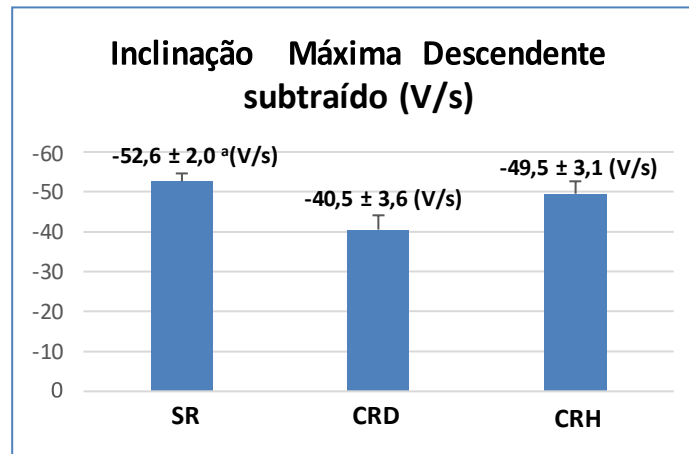


Gráfico 15: Inclinação Máxima Descendente subtraído nos grupos SR, CRD e CRH

Nessa etapa de análise foram ainda explorados alguns outros parâmetros, tais como: Duração do PA na base (ms), Amplitude da hiperpolarização (mV), Potencial limiar (mV) e o Pico da hiperpolarização (mV). Conforme mostra o gráfico 16 abaixo, entre os grupos neuronais, não houve uma diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA de uma via) na duração do potencial de ação na base restando o maior tempo ($20,6 \pm 2,1$ ms) para as células CRD.

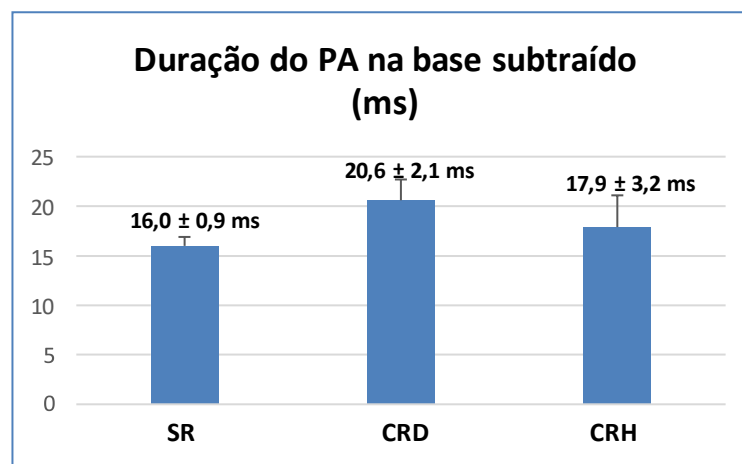


Gráfico 16: Duração do PA na base subtraído nos grupos SR, CRD e CRH

No tocante à amplitude da hiperpolarização, as células CRD foram as que apresentaram menor valor médio ($-20,6 \pm 1,0$ mV), com os demais grupos apresentando valores bem próximos ($-25,6 \pm 0,7$ mV e $-26,4 \pm 1,1$ mV para as células SR e CRH, respectivamente). Já quanto ao potencial limiar de disparo do PA, todas as células apresentaram valores bem próximos ($-43,9 \pm 1,0$ mV; $-41,6 \pm 1,7$ mV; $-42,7 \pm 1,4$ mV, para as células SR, CRD e CRH, respectivamente). Os dados descritos são evidenciados nos

gráficos 17 e 18 abaixo.

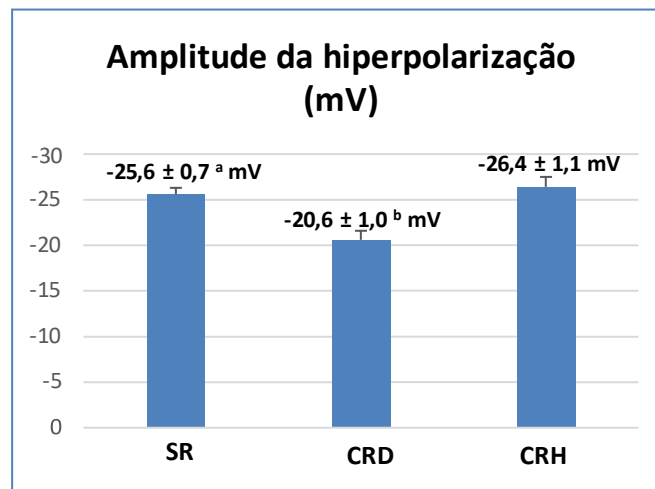


Gráfico 17: Amplitude da hiperpolarização nos grupos SR, CRD e CRH

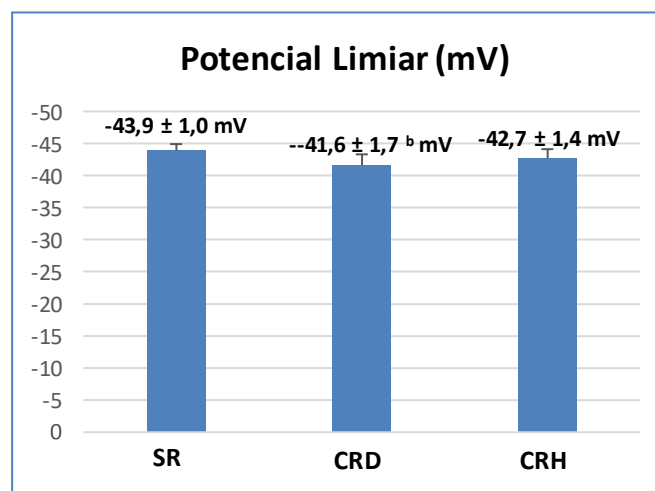


Gráfico 18: Potencial Limiar nos grupos SR, CRD e CRH

Por fim, como mostrado no gráfico 19, quanto ao pico de hiperpolarização, restou bem evidenciado que as células do conjunto CRH apresentaram maior média dessa propriedade uma vez que apresentaram valores em torno de $-80,6 \pm 1,6$ mV contra apenas $-64,5 \pm 1,9$ mV e $-70,1 \pm 2,1$ mV para os grupos SR e CRD, respectivamente.

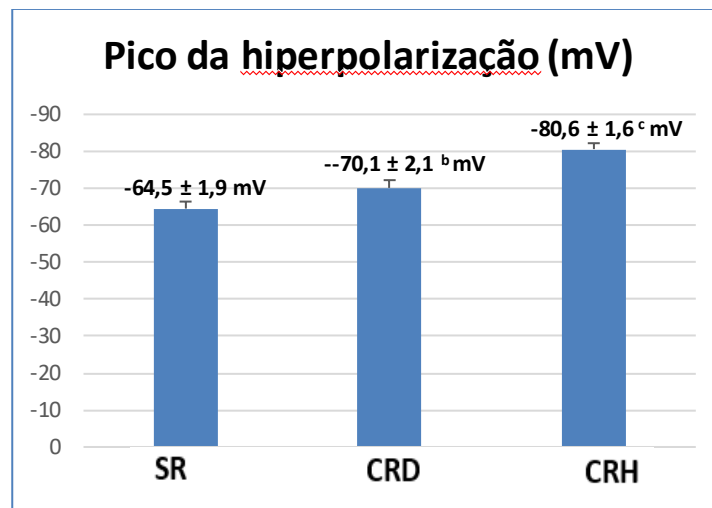


Gráfico 19: Pico da hiperpolarização nos grupos SR, CRD e CRH

Os dados dos parâmetros ativos dos neurônios do GCS com a subtração do sinal pelo circuito RC encontram-se sumarizados na tabela abaixo.

Tabela 5: Estatísticas dos parâmetros ativos dos neurônios do gânglio cervical superior com a subtração do sinal pelo circuito RC.

Parâmetro	Todas as células (n = 77)	Sem retificação (n = 50)	Com retificação Despolarizante (n = 17)	Com retificação Hiperpolarizante (n = 10)
Amplitude do PA (mV)	$61,6 \pm 1,2$	$62,2 \pm 1,2$	$56,8 \pm 3,4$ ^b	$67,1 \pm 2,2$
Duração em 50 % da amplitude (ms)	$2,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$ ^a	$3,1 \pm 0,2$ ^b	$2,4 \pm 0,2$
Inclinação máxima ascendente (V/s)	$75,4 \pm 3,4$	$78,7 \pm 4,3$ ^a	$58,6 \pm 6,0$ ^b	$87,4 \pm 8,2$
Inclinação máxima descendente (V/s)	$-49,5 \pm 1,6$	$-52,6 \pm 2,0$ ^a	$-40,5 \pm 3,6$	$-49,5 \pm 3,1$
Duração do PA na base (ms)	$17,2 \pm 0,9$	$16,0 \pm 0,9$	$20,6 \pm 2,1$	$17,9 \pm 3,2$
Amplitude da hiperpolarização (mV)	$-24,6 \pm 0,6$	$-25,6 \pm 0,7$ ^a	$-20,6 \pm 1,0$ ^b	$-26,4 \pm 1,1$
Potencial limiar (mV)	$-43,2 \pm 0,8$	$-43,9 \pm 1,0$	$-41,6 \pm 1,7$ ^b	$-42,7 \pm 1,4$
Pico da hiperpolarização (mV)	$-67,8 \pm 1,4$	$-64,5 \pm 1,9$	$-70,1 \pm 2,1$ ^b	$-80,6 \pm 1,6$ ^c

^a, diferença estatística significativa em relação ao grupo COM RETIFICAÇÃO DESPOLARIZANTE ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

^b, diferença estatística significativa em relação ao grupo COM RETIFICAÇÃO HIPERPOLARIZANTE ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

^c, diferença estatística significativa em relação ao grupo SEM RETIFICAÇÃO ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste Holm-Sidak);

7 DISCUSSÃO

Nosso principal achado é que a utilização do análogo elétrico de membrana por meio das análises das propriedades passivas dos neurônios do GCS permitiu sua classificação em três grupos neuronais distintos: sem retificação, com retificação despolarizante e com retificação hiperpolarizante. Com base no que pesquisamos na literatura, essa abordagem ainda não havia sido utilizada e demonstra a utilização das propriedades passivas desses neurônios para a classificação neuronal.

Várias classes neuronais foram relatadas em gânglios do SNA e sistema nervoso periférico (BOYD et al., 1996; JIA et al., 2008a; KEAST et al., 1993; MCLACHLAN e MECKLER, 1989; OLIVEIRA-ABREU et al., 2019, 2018; SILVA-ALVES et al., 2013; WANG E MCKINNON, 1995).

No nosso estudo várias foram os achados dos parâmetros (passivos e ativos) com relevância significativa. Quanto aos potenciais de repouso entre os 3 grupos de células, não houve diferença significativa entre os grupos. Apesar disso, os valores para o potencial de repouso destes grupos de células se mostraram próximo àquele calculado anteriormente neste estudo pela equação de GHK para o potencial de repouso de células nervosas do GCS de ratos que foi de -57mV . Outra propriedade passiva analisada e que também não apresentou diferença significativa foi a resistência de entrada. Alguns estudos apresentaram dados semelhantes ao nosso tanto para o potencial de repouso quanto para a resistência, havendo para este alguns achados divergentes.

Dados semelhantes do potencial de repouso são relatados para neurônios simpáticos de ratos ($-54.9 \pm 4.6 \text{ mV}$; SCHOFIELD e IKEDA, 1989), neurônios cardíacos parassimpáticos de rãs ($-55.4 \pm 1 \text{ mV}$; CLARK *et al.* 1990) e neurônios intracardíacos cultivados de cobaias (-45 a -76 mV ; ALLEN e BURNSTOCK, 1987). Para entender melhor as relações entre as propriedades morfológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas dos neurônios pós-ganglionares simpáticos, um estudo usou técnicas de registro elétrico para investigar neurônios nas regiões cervical superior, torácica e gânglios celíacos de camundongos adultos. Para os neurônios do GCS, no tocante as propriedades eletrofisiológicas, estas células apresentaram o seguintes resultados: Potencial de repouso $-49,7 \text{ mV} \pm 0,8$; Resistência de Entrada $109,7 \text{ M}\Omega \pm 5,7$; (JOBBLING; GIBBINS, 1999)

No estudo de (LI *et al.*, 2021) o potencial de membrana em repouso de neurônios atrasados (glutamatérgicos) não diferiu daqueles de neurônios tônicos (GABAérgicos) (atrasados: $-56,83 \pm 11,31$ mV, $n = 42$ vs. tônico: $-55,68 \pm 9,12$ mV, $n = 39$). Na pesquisa de MORITA e SUZUKI (2001) onde foi avaliado as propriedades passivas e ativas da membrana pós-sináptica no neurônio salivatório contido no GCS, o potencial de membrana em repouso e a resistência de entrada de membrana foram $-49,2 \pm 7,6$ mV ($n=102$) e $52,9 \pm 23,6$ M Ω ($n=71$), respectivamente.

Durante avaliação das propriedades eletrofisiológicas de neurônios agudamente dissociados do gânglio pélvico de ratos, os potenciais de repouso apresentaram médias de -56 e -54 mV e resistências de entrada médias de 626 e 681 M Ω , não sendo, assim como no presente estudo, significativamente diferentes nas duas populações de neurônios estudadas (YOSHIMURA; DE GROAT, 1996).

No estudo de Sterratt *et al.* 2011, considerando os valores das concentrações referentes ao axônio gigante de lula (para K^+ : concentração interna 400 mM / concentração externa 20 mM e potencial de equilíbrio -72 mV; para Na^+ : concentração interna 50 mM / concentração externa 440 mM e potencial de equilíbrio 52 mV; para Cl^- : concentração interna 40 mM / concentração externa 560 mM e potencial de equilíbrio -64 mV) e levando em conta ainda que as permeabilidades relativas do K^+ , Na^+ e Cl^- são de $1,0$, $0,03$ e $0,1$, a tensão de equilíbrio obtida pela mesma equação (GHK) foi de aproximadamente $-60,0$ mV (STERRATT *et al.* 2011).

Propriedades elétricas passivas e ativas de neurônios cardíacos isolados foram examinadas sob clampeamento de corrente e usadas para comparação com registros convencionais de microeletrodos de outras células ganglionares autônomas. As células ganglionares cardíacas tinham potenciais de membrana de repouso variando de -45 mV a -65 mV ($-52 \pm 2,1$ mV, $n = 26$) e uma resistência de entrada média de 850 ± 23 M Ω ($n = 24$) (ADAMS, 1992). As divergências de resistência nas pesquisas citadas até aqui com o presente estudo podem estar associadas à técnica utilizada (*patch-clamp*).

Pesquisa que objetivou investigar a atividade bioelétrica anormal que ocorre no GCS afetado pelo vírus da pseudo-raiva (PRV), se compararam as propriedades eletrofisiológicas das membranas neuronais infectadas e não infectadas, e mostraram os seguintes resultados: Células do grupo controle ($n=11$) (não-infectadas) mostraram potencial de repouso de $-58,8 \pm 2,1$ mV; resistência

de entrada $44.68 \pm 6.83 \text{ M}\Omega$; capacitância de membrana de $1.85 \pm 0.31 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ e reobase de $0.18 \pm 0.06 \text{ nA}$. Já para um grupo de células infectadas ($n=7$) os resultados foram: potencial de repouso de $-58.1 \pm 2.1 \text{ mV}$; resistência de entrada $44.84 \pm 3.41 \text{ M}\Omega$; capacitância de membrana de $1.58 \pm 0.21 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ e reobase de $0.17 \pm 0.08 \text{ nA}$ (KIRALY; DOLIVO, 1982).

Na pesquisa de SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2019, os valores da resistência de entrada no grupo controle para neurônios SFP e MFP foram respectivamente $91,0 \text{ M}\Omega$ e $168,5 \text{ M}\Omega$ (no nosso estudo foram de $94,2 \pm 8,9 \text{ M}\Omega$ para SR e $104,5 \pm 4,4 \text{ M}\Omega$ para CRH), porém esses valores diferiram significativamente entre si. O diabetes alterou significativamente a R_{in} de neurônios MFP, mas não de neurônios SFP, e esses valores foram, respectivamente, $82,7 \text{ M}\Omega$ e $81,7 \text{ M}\Omega$ (SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2020). Estes valores revelam proximidade com os dados mostrados na presente pesquisa para o parâmetro em questão.

Estudo em que se investigou as alterações induzidas pelo diabetes mellitus (DM) nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios do GCS foi evidenciado que o potencial de membrana de repouso e a resistência de entrada de neurônios SCG, medidos em ratos controle e DM, mostraram valores de potencial de membrana de repouso (controle) para neurônios fásicos de disparo único e fásicos de disparo múltiplo de $-52,7 \text{ mV}$ e $-52,6 \text{ mV}$, respectivamente, sendo que esses valores não diferiram significativamente, o que corrobora com nossa pesquisa. Entretanto, o DM alterou significativamente o potencial de repouso dos neurônios fásicos de disparo único para $-48,0 \text{ mV}$, mas não dos neurônios fásicos de disparo múltiplo, em que o valor médio foi de $-52,9 \text{ mV}$ (SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2020).

Estudo que teve como objetivo verificar a utilização de ratos como controle experimentais para estudos *in vitro* com tecido hipocampal humano, onde foram avaliadas as propriedades passivas (potencial de membrana, resistência de entrada, constante de tempo) antes e depois da perfusão com o Ringer O-Mg²⁺, revelou que a análise entre o grupo controle ($n=40$) e modelo da policarpina ($n=22$) não demonstrou diferenças significativas nas propriedades. Entre o grupo controle e tecido hipocampal humano ($n=30$) também não foram observadas diferenças significativas nas propriedades intrínsecas passivas. A análise entre ET e tecido hipocampal humano não revelou diferença no potencial de membrana e resistência de entrada, porém a constante de tempo antes da perfusão com o Ringer O-Mg²⁺ apresentou diferença (TAVARES *et al.*, 2002).

Entre as propriedades passivas, os parâmetros analisados por meio da utilização do

análogo elétrico de membrana neste estudo que apresentaram diferenças significativas entre os grupos de células foram: a constante de decaimento, tamanho da área de superfície celular, condutância e capacitância.

Quanto à constante de decaimento, houve diferença estatística significativa dos grupos SR (n = 50) e DN (n = 10) em relação ao grupo CR (n = 17). No que diz respeito ao tamanho da área de superfície celular, a diferença significativa se deu entre os dois primeiros grupos de células (SR e CR), não havendo diferença relevante para as células DN.

Com relação ao parâmetro capacitância, tivemos diferença significativa entre os grupos de células SR e CRD, não havendo diferença relevante deste parâmetro para as células do 3º grupo (CRH). No presente estudo, quanto à condutância, os dados estatísticos nos mostram um comportamento pertinente, uma vez que a diferença significativa se deu entre os grupos de células SR (n = 50) para com as células CRD (n = 17) e deste para com o grupo CRH (n = 10).

Alguns dados encontrados na literatura estão divergentes com nossos achados, como é o caso do estudo de Amarante (2015) em que se objetivou avaliar se as propriedades passivas intrínsecas da membrana dos neurônios pré-motores simpáticos seriam ou não afetadas pela exposição à hipóxia aguda, para este estudo a capacitância foi de $32,64 \pm 0,51$ pF.

Medições de capacitância de membrana tiveram médias de 21,6 e 23,6 pF produzindo capacitâncias de membrana específicas calculadas próximas a outras capacitâncias de membrana biológica ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) (YOSHIMURA; DE GROAT, 1996). Em estudo recente em que foram realizadas gravações por *patch-clamp* de células inteiras em fatias da medula espinhal de ratos, após a injeção de uma série de correntes negativas, os neurônios classificados como “atrasados” (glutamatérgicos) e “tônicos” (GABAérgicos) não apresentaram diferenças importantes na capacitância entre os tipos de neurônios (atrasado: $23,97 \pm 7,03$ pF, n = 42 vs. tônico: $24,56 \pm 7,87$ pF, n = 39) (LI *et al.*, 2021).

Entretanto, em outras pesquisas, os dados para capacitância e constante de decaimento foram semelhantes, como é o caso do estudo que foi analisado as propriedades gerais da membrana pós-sináptica no neurônio salivatório contido no GCS. Neste, a constante de tempo de membrana e a capacitância de entrada foram os seguintes: $8,0 \pm 3,4$ ms (n=71) e 147 ± 50 pF (n=71) (MORITA;

SUZUKI, 2001). Assim como no estudo de JOBLING e GIBBINS (1999) que apresentaram valores para o Tau de $11,7 \pm 0,8$ ms e para capacitancia de membrana de $106,4 \pm 4,7$ pF (JOBLING; GIBBINS, 1999).

Dos parâmetros ativos analisados no presente estudo somente a reobase não apresentou diferença estatística entre os grupos, mas todos os demais parâmetros do potencial de ação (PA) apresentaram diferença estatística entre os grupos SR e CRD. As evidências em relação às propriedades ativas no nosso estudo, restou evidenciado informações significativas quanto à amplitude do PA, a duração em 50% da amplitude, a inclinação máxima ascendente do PA e inclinação máxima descendente, assim também evidenciado nas pesquisas de outros autores.

Nossos achados são semelhantes ao estudo de OLIVEIRA-ABREU *et al.* (2019) que teve como objetivo investigar os efeitos da melatonina na população neuronal de dois grupos de neurônios (neurônios sem e com inflexão na fase de repolarização do potencial de ação) do GRD de ratos. Foram utilizadas 109 células, sendo estas divididas em sensíveis (EMS) e não-sensíveis (EMNS) ao efeito da melatonina. Os achados foram os seguintes: Reobase (nA) $1,5 \pm 0,14$ (EMS) e $1,6 \pm 0,10$ (EMNS); Amplitude (mV) $80,8 \pm 2,13$ (EMS) e $78,6 \pm 1,34$ (EMNS); Duração (ms) $1,9 \pm 0,16$ (EMS) e $2,1 \pm 0,19$ (EMNS); $dV/dtasc$ (V/s) $115,7 \pm 5,85$ (EMS) e $110,6 \pm 5,47$ (EMNS); $dV/dtdesc$ (V/s) $-54,1 \pm 2,69$ (EMS) e $-58,4 \pm 2,56$ (EMNS).

Neurônios de 79 ratos Sprague-Dawley foram registrados e categorizados por respostas funcionais a estímulos aferentes da raiz dorsal. Os neurônios foram classificados em grupos de células denominados células de limiar baixo (LT) (n=18), neurônios com ampla faixa dinâmica (WDR) (n=20) e neurônios de limiar alto (HT) (n=29). Os dados eletrofisiológicos ativos para estes grupos de células foram os seguintes: LT – Reobase $46,2 \pm 20$ nA; Potencial Limiar $-32,5 \pm 2,5$ mV e duração do PA $5,0 \pm 0,68$ ms; WDR – Reobase $35,0 \pm 10,7$ nA; Potencial Limiar $-31,7 \pm 2,9$ mV e duração do PA $4,3 \pm 0,50$ ms; HT- 9,5; Reobase $34,8 \pm 3,9$ nA; Potencial Limiar $-32,0 \pm 2,4$ mV e duração do PA $6,6 \pm 0,16$ ms (DOUGHERTY; CHEN, 2016)

Na pesquisa de LI *et al.*, (2021), para o potencial de ação do sinal evocado, não foram observadas diferenças significativas na amplitude (atrasado: $64,02 \pm 12,79$ mV, n = 42 vs. tônico $61,33 \pm 10,64$ mV, n = 39), tempo de meia largura (atrasado: $0,57 \pm 0,22$ ms, n = 42 vs. tônico: $0,54 \pm 0,18$ ms, n= 39), reobase (atrasado: $124,39 \pm 19,78$ pA, n = 42 vs. tônico: $111,07 \pm 13,75$ pA, n = 39) e potencial de limiar (atrasado: $-37,92 \pm 8,88$ mV, n = 42 vs. tônica: $-37,36 \pm 7,67$ mV, n = 39).

No nosso estudo a amplitude do PA dos grupos SR, CN e DN foram $76,4 \pm 1,6$ (n = 50), $67,1 \pm 3,8$ (n = 17) e $80,2 \pm 2,7$ mV (n = 10) respectivamente e houve diferença estatística entre os grupos. Quanto à duração em 50% da amplitude, houve diferença entre os grupos SR e CRD com

valores respectivos de $3,0 \pm 0,1$ e $3,6 \pm 0,3$. Os grupos SR, CRD e CRH apresentaram diferença estatística entre si na inclinação máxima ascendente do PA e seus valores foram $78,8 \pm 4,3$ ($n = 50$), $58,6 \pm 6,1$ ($n = 17$) e $87,4 \pm 8,2$ V/s ($n = 10$), respectivamente. Já a inclinação máxima descendente apresentou diferença estatística significativa entre os grupos SR e CR ($-52,9 \pm 2,0$ e $-40,5 \pm 3,6$, respectivamente).

No estudo de JOBLING e GIBBINS (1999) para os parâmetros ativos os resultados encontrados foram: Amplitude $89,5\text{mV} \pm 1,4$; Meia largura $1,35\text{ms} \pm 0,04$; Amplitude $-21,3\text{mV} \pm 0,6$; Duração $341,5\text{ms} \pm 11,2$.

Em pesquisa onde foram submetidas células nervosas à estresse por hipóxia aguda (HA) e a bloqueio sináptico (BS), as características ativas dos potenciais de ação não foram afetadas pelo estresse: amplitude [BS: $82,57 \pm 6,86$ mV vs HA: $76,10 \pm 9,98$ mV, ($n=3$); teste t pareado, $p > 0,05$], meia-largura [BS: $1,02 \pm 0,22$ ms vs HA: $1,52 \pm 0,48$ ms, ($n= 3$); teste t pareado, $p > 0,05$]; tempo de decaimento [BS: $1,54 \pm 0,33$ ms vs HA: $1,68 \pm 0,65$ ms, ($n=3$); teste t pareado, $p > 0,05$]; tempo de subida [BS: $1,03 \pm 0,47$ ms vs HA: $1,02 \pm 0,43$ ms, ($n=3$); teste t pareado, $p > 0,05$] Tau [BS: $0,06 \pm 0,01$ ms vs HA: $0,05 \pm 0,01$ ms, ($n=3$); teste t pareado, $p > 0,05$] (AMARANTE, 2015).

No estudo de ADAMS (1992), embora os neurônios cultivados não fossem espontaneamente ativos, pulsos de corrente despolarizante aplicados (> 40 pA) evocaram potenciais de ação que tinham um limiar de cerca de -45 mV e uma amplitude de pico maior que 80 mV.

Após a comparação do dado experimental do PA e do circuito RC simulado procedeu-se com a subtração do dado experimental com a simulação e assim pode-se analisar a amplitude da AHP, a duração na base do PA, potencial limiar que deflagra o PA e o anti-pico do PA. Nesta situação todos os parâmetros apresentaram diferença significativa com exceção da duração do PA na base (SR $16,0 \pm 0,9$; CR $20,6 \pm 2,1$; DN $17,9 \pm 3,2$). Quanto à amplitude de hiperpolarização houve diferença significativa tanto entre os grupos SR para com o CR e entre este para com o grupo DN (SR $-25,6 \pm 0,7$; CR $-20,6 \pm 1,0$; DN $-26,4 \pm 1,1$). Quanto ao potencial limiar, houve diferença significativa apenas entre os grupo CR para com o grupo DN (CR $-41,6\text{mV} \pm 1,7$; DN $-42,7\text{mV} \pm 1,4$). Quanto ao Pico da hiperpolarização houve diferença significativa entre os grupos CR em relação ao DN, mas também mostrou um comportamento estatístico que nenhum outro havia evidenciado até então, que foi a diferença significativa do grupo DN em relação ao grupo SR (SR $-64,5 \pm 1,9$; CR $-70,1 \pm 2,1$; DN $-80,6 \pm 1,6$).

No estudo de YOSHIMURA; DE GROAT (1996), neurônios agudamente dissociados do gânglio pélvico principal de ratos (GPP) que inervam a bexiga urinária foram marcados por métodos de rastreamento axonal retrógrado com o uso de um corante fluorescente, Fast Blue (FB), e

identificado com um microscópio. Propriedades como a duração dos potenciais de ação, limiares para ativação de pico ou duração após hiperpolarização em neurônios GPP não identificados com corante foram comparáveis às de neurônios marcados. Durante o registro sob condições de clampeamento de corrente, a aplicação de pulsos de corrente despolarizante (40-100 pA, duração 10-20 ms) no potencial de repouso induziu potenciais de ação em limiares que variaram de -25 a -35 mV. Os potenciais de ação exibiram *overshoots* para +30 mV e geralmente tinham durações de 3 a 3,5 ms na amplitude de pico semi-máxima. Os potenciais de ação em ambos os neurônios (marcados e não marcados) foram seguidos por uma pós-hiperpolarização variando de 60 a 200 ms de duração (média de 118 e 125 ms) (YOSHIMURA e GROAT, 1996).

Na pesquisa de SILVA-DOS-SANTOS *et al.* (2019) as amplitudes do AHP foram -15,3 mV e -16,8 mV, para os grupos controle SFP e MFP, respectivamente; esses valores não diferiram significativamente. No grupo DM em neurônios SFP e MFP, os valores foram -14,1 mV e -11,9 mV, respectivamente, e houve diferença significativa entre os grupos CT e DM apenas para MFP neurônios. Os valores de controle para o parâmetro AHPd50 nos neurônios SFP e MFP foram 91,6 ms e 72,0 ms, respectivamente; O DM reduziu esses valores para 54,9 ms e 48,7 ms, respectivamente. A comparação dos controles AHPd50 (controle SFP vs controle MFP) não mostrou diferença significativa. Também não foi observada diferença para AHPd50 de MFP no controle vs AHPd50 de MFP no DM; no entanto, o valor de controle DM AHPd50 vs AHPd50 para neurônios SFP mostrou diferença significativa.

No nosso estudo houve diferença significativa quanto à amplitude do PA entre os grupos CRD $56,8 \pm 3,4$ (n = 17) e CRH $67,1 \pm 2,2$ (n = 10). No aspecto duração em 50% da amplitude subtraído e inclinação máxima ascendente subtraído, ambos apresentaram diferença significante. tanto entre os grupos SR para com o CRD e entre este para com o grupo CRH (SR $2,6 \pm 0,1$; CRD $3,1 \pm 0,2$; CRH $2,4 \pm 0,2$ e SR $78,7 \pm 4,3$; CRD $58,6 \pm 6,0$; CRH $87,4 \pm 8,2$;). Houve diferença estatística significante em relação ao grupo com retificação quanto ao parâmetro Inclinação máxima descendente (SR $-52,6 \pm 2,0$ e CRD $-40,5 \pm 3,6$).

A utilização do análogo elétrico da forma como proposto neste estudo trouxe algumas questões interessante: há ativação de uma corrente de K^+ em potenciais próximo ao potencial de equilíbrio para o K^+ ? Estaríamos diante de uma nova forma de classificar células neuronais? Comportamentos eletrofisiológicos semelhantes aos vistos aqui seriam também possíveis de serem evidenciados em simulações de células nervosas lesadas? Novas investigações serão necessárias para responder a estas e outras perguntas. Acreditamos que a presente investigação fornece novos caminhos para o entendimento dos diversos comportamentos eletrofisiológicos de células nervosas bem como de

novos meios de classificação aumentando ainda mais o entendimento sobre a gama de células já relatadas na literatura atual.

8 CONCLUSÃO

Demonstramos, através dos neurônios do GCS de ratos, que a utilização do análogo elétrico de membrana permitiu uma nova possibilidade para classificação de células neuronais. Em um estágio inicial, analisamos os registros eletrofisiológicos dos neurônios do GCS obtidos com a técnica do microeletrodo intracelular o que nos levou a identificar dois tipos de neurônios (grupo sem retificação e com retificação do valor do potencial de membrana). Procedemos com as análises dos parâmetros passivos, o que permitiu visualizar, após as análises iniciais, com a utilização do circuito análogo elétrico de membrana e da subtração dos traçados experimentais com os simulados, o aparecimento de um terceiro grupo (CRH) de neurônios derivado das células sem retificação .

Dessa forma a presente pesquisa se configura como um estudo preliminar de grande valor por levantar possibilidade de identificação e início de caracterização de ativação de correntes iônicas em potenciais transmembrana negativos ao potencial de repouso, bem como se mostrou ser um modelo muito útil para ensino dos aspectos eletrofisiológicos de células neuronais.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, L.F.; REGEHR, W.G. **Synaptic computation.** *Nature*, v. 431, n. 7010, p. 796–803, 2004. ADAMS, D. J. *Medicine*, Miami, p. 405–424, 1992.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell.** New York: Garland Science, 2008

AMARANTE, M.K. **Efeitos da hipóxia tecidual aguda sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente.** Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2015.

ANDREWS, T. J., C. THRASIVOULOU, et al. (1996). **"Target-specific differences in the dendritic morphology and neuropeptide content of neurons in the rat SCG during development and aging."** *The Journal of comparative neurology* 368(1): 33-44.

ARANTES, R. M. e N. W. ANDREWS (2006). **"A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons."** *J Neurosci* 26(17): 4630-4637.

ARANTES, R. M., S. LOURENSSEN, et al. (2000). **"Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro."** *Neuroreport* 11(1): 177-181.

ARBAB MA, WIKLUND L, AND SVENDGAARD NA. **Origin and distribution of cerebral vascular innervation from superior cervical, trigeminal and spinal ganglia investigated with retrograde and anterograde WGA-HRP tracing in the rat.** *Neuroscience* 19: 695–708, 1986.

- AYERS, J. (2004). **Underwater walking. Arthropod structure & development**, 33:347360
- BALLANYI, K. et al. **Different types of potassium transport linked to carbachol and γ -aminobutyric acid actions in rat sympathetic neurons.** Neuroscience, v. 12, n. 3, p. 917–927, 1984.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience.** Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007
- BEAR MARK F., CONNORS BARRY W. e PARADISO MICHAEL A. (2002). **Neurociência - Desvendando o Sistema Nervoso [Livro].** - São Paulo : ARTMED, 2002. ISBN - 0-683-30596-4.
- BOYD, H. D. et al. **Three electrophysiological classes of guinea pig sympathetic postganglionic neurone have distinct morphologies.** Journal of Comparative Neurology, v. 369, n. 3, p. 372–387, 1996.
- CARELLI, P. V., REYES, M. B., SARTORELLI, J. C. e PINTO, R. D. (2005 – 2008*): **Whole cell stochastic model reproduces the irregularities found in the membrane potential of bursting neurons,** J. Neurophysiol. 94, 1169-1179.
- CARDOSO, K.V., MOREIRA-JÚNIOR, L., OQUENDO, M.B., OLIVEIRA-ABREU, K., ALBUQUERQUE, A.A.C., COELHODE-SOUZA, A.N., LEAL-CARDOSO, J.H., 2013. **Estragole blocks neuronal excitability by direct inhibition of Na⁺ channels.** Brazilian J. Med. Biol. Res. 46, 1056–1063.
- CARMENA, J. M., LEBEDEV, M. A., CRIST, R. E., O'DOHERTY, J. E., SANTUCCI, D. M., DIMITROV, D. F., PATIL, P. G., HENRIQUEZ, C. S., e NICOLELIS, M. A. L. (2003). **Learning to Control a Brain Machine Interface for Reaching and Grasping by Primates.**

PLoS Biol, 1(2):193208.

CASSELL, JF, AL CLARK e EM MCLACHLAN. 1986. **Características das células ganglionares simpáticas fásicas e tônicas da cobaia.** J. Fisiol. 372 :457-483.

CASSELL, J. F., CLARK, A. L. & McLACHLAN, E. M. (1986). **Characteristics of phasic and tonic sympathetic ganglion cells of the guinea-pig.** Journal of Physiology 372, 457-483.

CASSELL, J. F. & McLACHLAN, E. M. (1986). **The effect of a transient outward current (IA) on synaptic potentials in sympathetic ganglion cells of the guinea-pig.** Journal of Physiology 374, 273-288.

CASSELL, J. F. & McLACHLAN, E. M. (1987). **Two calcium-activated potassium conductances in a subpopulation of coeliac neurones of guinea-pig and rabbit.** Journal of Physiology 394, 331-349.

CORREALE, T. G. **A Membrana e seus Canais : Um Modelo Computacional de Neurônio**
A Membrana e seus Canais : Um Modelo Computacional de Neurônio. 2017.

DAYAN, P. e ABBOTT, L. F. (2001). **Theoretical Neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems.**

DECKTOR, DL e WA WEEMS. 1983. **Uma caracterização intracelular de neurônios e conexões neurais dentro do gânglio celíaco esquerdo de gatos.** J. Fisiol. 341 :197-211

DECKTOR, D. L. e WEEMS, W. A. (1981). **A study of renal-efferent neurones and their neural connexions within cat renal ganglia using intracellular electrodes.** Journal of Physiology 321, 611- 626.

DOUGHERTY, P. M.; CHEN, J. **Relationship of membrane properties, spike burst responses, laminar location, and functional class of dorsal horn neurons recorded in**

vitro. Journal of Neurophysiology, v. 116, n. 3, p. 1137–1151, 2016.

FAZLIOGULLARI, Z. et al. A morphometric analysis of the superior cervical ganglion and its surrounding structures. Surgical and Radiologic Anatomy, v. 38, n. 3, p. 299–302, 2016.

FENG-BIN WANG, PU-MING CHENG, HSIAO-CHUN CHI, CHIH-KUAN KAO, YI-HAN LIAO. **Axons of Passage and Inputs to Superior Cervical Ganglion in Rat**. The anatomical record(2018).DOI: 10.1002/ar.23953 Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

GALVAN, M. & SEDLMEIR, C. (1984). **Outward currents in voltageclamped rat sympathetic neurones**. Journal of Physiology 356, 115-133.

GIBBINS I. Peripheral autonomic pathways. In: The Human Nervous System (2nd ed.), edited by Paxinos G and Mai J. Oxford: Elsevier Academic, 2004, p. 134 –189.

GIOLO, C. Circuitos Elétricos: Simulação de uma Membrana Neuronal. Tópicos de Ensino de Física I. Professor José J. Lunazzi. Instituto de Física Gleb Wataghin. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Junho de 2013.

GRIFFITH, W. H., GALLAGHER, J. P. & SHINNICK-GALLAGHER, P. (1980). **An intracellular investigation of cat vesical pelvic ganglia**. Journal of Neurophysiology 43, 343-354.

GUSMÃO, T. C.; LOPES, T. F.; MAGINI, M. **Modelo Simplificado para estudar o comportamento dos canais de sódio e potássio em neurônios**. p. 109–111, 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Ed. Elsevier: Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

HARPER A., LAWSON S. **Propriedades elétricas de neurônios do gânglio da raiz dorsal do rato com diferentes velocidades de condução do nervo periférico.** J. Fisiol. 1985:47-63. doi: 10.1113/jphysiol.1985.sp015574.

HILLE, B. **Ionic Channels of Excitable Membranes.** 3rd ed., Sinaur, Sunderland. MA. 2001

HODGKIN, A. L. e HUXLEY, A. F. (1952). **A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.** J. Physiol., 117(4):500544.

JIA, Z., BEI, J., RODAT-DESPOIX, L., LIU, B., JIA, Q., DELMAS, P., ZHANG, H., 2008a. **NGF inhibits M/KCNQ currents and selectively alters neuronal excitability in subsets of sympathetic neurons depending on their M/KCNQ current background.** J. Gen. Physiol. 131, 575–587. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709924>.

J., LEAL-CARDOSO, J.H., 2018. **Melatonin decreases neuronal excitability in a sub-population of dorsal root ganglion neurons.** Brain Res. 1692, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.027>.

JULE, Y. e SZURSZEWski, J. H. (1983). **Electrophysiology of neurones of the inferior mesenteric ganglion of the cat.** Journal of Physiology 344, 277-292.

JOBLING P e GIBBINS IL. **Electrophysiological and morphological diversity of mouse sympathetic neurons.** J Neurophysiol 82: 2747–2764, 1999.

KANDEL E.R., SCHWARTZ J.H., e JESSEL T.M. (1991): **Principles of Neural Science**, 3rd ed., Appleton & Lange, Connecticut.

KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H. e JESSEL T. M. (2000). **Princípios da Neurociência** [Livro]. - São Paulo : Manole, 2000.

KEW, J.N.C.; DAVIES, C.H. **Ion Channels: From Structure to Function**. Oxford: Oxford University Press, 2010.

KEAST, J.R., MCLACHLAN, E.M., MECKLER, R.L., 1993. **Relation between electrophysiological class and neuropeptide content of guinea pig sympathetic prevertebral neurons**. *J. Neurophysiol*, 69.

KING, B. F. e SZURSZEWSKI, J. H. (1984). **An electrophysiological study of inferior mesenteric ganglion of the dog**. *Journal of Neurophysiology* 51, 607-615.

KING, B. F. & SZURSZEWSKI, J. H. (1988). **Electrotonic characteristics and membrane properties of neurons in the inferior mesenteric ganglion in guinea-pig**. *Journal of the Autonomic Nervous System* 23, 229-239.

KIRALY M, DOLIVO M. 1982. **Alteration of the electrophysiological activity in sympathetic ganglia infected with a neurotropic virus. I. Presynaptic origin of the spontaneous bioelectric activity**. *Brain Res* 240:43–54.

KOCH, C. (1999). **Biophysics of computation : information processing in single neurons**. Oxford University Press, New York, New York.

LENT, R. (2008). **Neurociência da Mente e do Comportamento**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

LI, Y. et al. **Electrophysiological Properties of Substantia Gelatinosa Neurons in the Preparation of a Slice of Middle-Aged Rat Spinal Cord**. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 13, n. March, p. 1–9, 2021.

LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. **Molecular Biology of the Cell (4th Ed)**. *Journal of Biological Education*, v. 37, n. 1, p. 45–47, 2002.

LEVITAN, I.B., KACZMARECK, L.K. (1997): **The Neuron: cell and molecular biology**, OxfordUniversity Press.

MARDER, E. (1998). **From biophysics to models of network function**. *Annu. Rev. Neurosci.*,21:2545.

MARIN, T. T. B. **Dinâmica estocástica em neurônios**. p. 1–12, 2007.

MAZUR, R. **Implementação de um protocolo dynamic clamp em sistema linux em tempo real para a produção de condutâncias artificiais em neurônios biológicos e eletrônicos**. Instituto de Física. Universidade de São Paulo, 2006.

MIRANDA, L. DA S. **Investigação do papel da apolipoproteína-e no crescimento neurítico em culturas primárias do gânglio cervical superior de camundongos**. 2019.

MORITA, M.; SUZUKI, T. **The identification of the sympathetic neurons innervating the hamster submandibular gland and their electrophysiological membrane properties**. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, v. 42, n. 1, p. 15–33, 2001

NOGUEIRA, R. **Simulação do Potencial de Ação no Neurônio**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 5, n. 2, p. 135–142, dez. 1997.

OLIVEIRA-ABREU, K., FERREIRA-DA-SILVA, F.W., DA SILVA-ALVES, K.S., SILVA-DOS-SANTOS, N.M., CARDOSO-TEIXEIRA, A.C., AMARAL, F.G., DO CIPOLLA-NETO, PINTO, R. D., VARONA, P., VOLKOVSKII, A. R., SZÜCS, A., ABARBANEL, I., H. D., e RABINOVICH, M.I. (2000). **Synchronous behavior of two coupled electronic neurons**. *Phys. Rev. E*, 62(2):26442656.

OTAVIANO CAMPOS, F. **Modelagem Computacional Da Eletrofisiologia Cardíaca: O Desenvolvimento De Um Novo Modelo Para Células De Camundongos E a Avaliação De**

Novos Esquemas Numéricos. Programa de Mestrado em Modelagem Computacional. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, Minas Gerais, 2008.

PRINZ, A., RAMIREZ, J., BUZSAKI, G., e K.J., S. (2004). **How dynamic interactions of intrinsic bursting and synaptic properties shape network functions.** Soc Neurosci Abstr, 813.

QUINAUD, J.T. **Modelo matemático da dinâmica iônica durante um potencial pré-sináptico em célula neural.** Centro Tecnológico Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Programa De Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/Sc 2011.

REUSS S e MOORE RY. **Neuropeptide Y-containing neurons in the rat superior cervical ganglion: projections to the pineal gland.** J Pineal Res 6: 307–316, 1989.

ROIVAINEN, R. e J. KOISTINAHO (1996). **"Histochemical detection of age- and injury- related changes in signal transduction in the superior cervical ganglion."** Microsc Res Tech 35(1): 20-31

ROQUE, A. **Canais Iônicos.** p. 1–44, 2021.

SAVASTANO, L.E., CASTRO, A.E., FITT, M.R., RATH, M.F., ROMEO, H.E., MUÑOZ, E.M., 2010. **A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy.** J. Neurosci.Methods 192, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.007>.

SCHMIDT-NIELSEN K. (1996): **Fisiologia animal**, 5a ed., Santos Editora, São Paulo.

SILVA-DOS-SANTOS, N.M. OLIVEIRA-ABREU, K. MOREIRA-JUNIOR, L. SANTOS- NASCIMENTO, T. SILVA-ALVES, K.S. COELHO-DE-SOUZA, A.N.

FERREIRA-DA-SILVA, F.W. LEAL-CARDOSO, J.H. **Diabetes mellitus alters electrophysiological properties in neurons of superior cervical ganglion of rats.** Brain Research 1729 (2020) 146599. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146599>

SILVA, F. W. F. DA. **Investigação das alterações na excitabilidade neuronal promovidas pelo Diabetes Melito experimental devido a mudanças na expressão e/ou função de canais iônicos utilizando simulação computacional.**, 2019.

SELVERSTON, A. I., RABINOVICH, M. I., ABARBANEL, H. D. I., ELSON, R., SZUCS, A., PINTO, R. D., HUERTA, R., e VARONA, P. (2000). **Reliable circuits from irregular neurons: A dynamical approach to understanding central pattern generators.** J. Physiol. (Paris), 94:357374.

STERRATT, D.; GRAHAM, B.; GILLIES, A.; WILLSHAW, D. **Principles of Computational Modelling in Neuroscience.** Cambridge: Cambridge University Press, 2011.

SZÜCS, A., VARONA, P., VOLKOVSKII, A. R., ABARBANEL, H. D. I., RABINOVICH, M. I., e SELVERSTON, A. I. (2000). **Interacting biological and electronic neurons generate realistic oscillatory rhythms.** Neuroreport, 11:563569.

TAVARES, A.L.A. COSTA, J.C. SALAMONI, S.D. FONSECA, G.F. SIMÃO, F. BREDÁ, R.V. PAGLIOLI-NETO, E. AZAMBUJA, N. PALMINI, A. **Electrophysiological study of the intrinsic passive properties neurons of the CA1 in slices hippocampal rats and hippocampal human tissue.** J. epilepsy clin. neurophysiol ; 8(4): 229-234, Dez. 2002.

TSENG CY, LUE JH, LEE SH, WEN CY, & SHIEH JY (2001). **Evidence of neuroanatomical connection between the superior cervical ganglion and hypoglossal nerve in the hamster as revealed by tract tracing and degeneration methods.** J Anat, 198(Pt 4), 407–421. [PubMed: 11327203]

UDDMAN R, HARA H, e EDVINSSON L. **Neuronal pathways to the rat middle meningeal artery revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry.** J Auton Nerv Syst 26: 69–75,1989.

VOYVODIC JT. **Peripheral target regulation of dendritic geometry in the rat superior cervical ganglion.** J Neurosci 9: 1997–2010, 1989

WANG, H.S., MCKINNON, D., 1995. **Potassium currents in rat prevertebral and paravertebral sympathetic neurons - control of firing properties.** J. Physiol. 485, 319–335.

WEEMS, W. A. & SZURSZEWSKI, J. H. (1978). **An intracellular analysis of some intrinsic factors controlling neural output from inferior mesenteric ganglion of guinea pigs.** Journal of Neurophysiology 41, 305-321.

WEHRWEIN, E.A., ORER, H.S., BARMAN, S.M., 2016. **Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system.** Compr. Physiol. 6, 1239–1278. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150037>.

YOSHIMURA, N. e GROAT, W.C. **Characterization of Voltage-Sensitive Na⁺ and K⁺ Currents Recorded From Acutely Dissociated Pelvic Ganglion Neurons of the Adult Rat.** Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania 15261; and Section of Electrophysiology, Laboratory of Physiologic and Pharmacologic Studies, National Institute on Alcohol and Alcoholism, Rockville, Maryland 20892. JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY Vol. 76, No. 4, October 1996. Printed in U.S.A.

YOSHIMURA, M., e NISHI, S. (1993). **Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents.** Neuroscience 53:519

ZAIDI ZF, & MATTHEWS MR (2013). Source and origin of nerve fibres immunoreactive for substance P and calcitonin gene-related peptide in the normal and chronically denervated superior cervical sympathetic ganglion of the rat. Auton Neurosci, 173(1–2), 28–38.10.1016/j.autneu.2012.11.002 [PubMed: 23167990]