

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**USO DA SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO POTENCIAL DE
AÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS NAV'S DOS
NEURONIOS DO GANGLIO DA RAIZ DORSAL DE CAMUNDONGOS.**

**Jeremias Martins Gonçalves¹; Luana Evely Bezerra de Moraes²; Christopher
Kushmerick³; José Henrique Leal Cardoso⁴; Francisco Walber Ferreira da Silva⁵**

¹Física, CCET, UEVA, Email: jeremiasmartins092@gmail.com

²Enfermagem, CCS, UECE, Email: evely.bezerra@aluno.uece.br

³ELETROCELL, UFMG, Email: c.kushmerick@gmail.com

⁴Laboratório de eletrofisiologia, LEF, UECE, Email: lealcar@gmail.com

⁵Engenharia Civil, CCET, UEVA, Email: walberferreira@gmail.com

Resumo: O gânglio da raiz dorsal é um aglomerado heterogêneo de corpos celulares que podem expressar diferentes isoformas de canais de Na⁺ que são essenciais para geração do potencial de ação. Nesses neurônios podemos encontrar as isoformas 1.1, 1.2, 1.6, 1.7, 1.8 e 1.9. Portanto, esse trabalho objetivou modelar os potenciais de ação experimentais de neurônios isolados e identificar a expressão das isoformas de canais de Na⁺ 1.7 e 1.8. Foram encontrados dois padrões de células classificados como A₀ e A_{inf}. Os potenciais de ação do tipo A_{inf} expressaram $33,33 \pm 4,41$ mS/cm² e $2,38 \pm 0,69$ mS/cm² das isoformas 1.7 e 1.8 respectivamente e no tipo A₀ $115,00 \pm 38,32$ mS/cm² e $0,36 \pm 0,18$ mS/cm². A simulação respondeu aos dados experimentais de forma parcial e encontramos que células do tipo A_{inf} possuem uma maior expressão da isoforma 1.8.

Palavras-chave: Gânglio da Raiz Dorsal, Potencial de Ação, isoformas, simulação.

1. INTRODUÇÃO

O gânglio da raiz dorsal (GRD) é um aglomerado de células nervosas responsável por encaminhar informações periféricas em direção ao sistema nervoso central (SNC) (DEVOR, 1999). O GRD possui uma grande diversidade de canais iônicos e uma característica que diferencia os neurônios são as expressões dos canais de sódio dependentes de voltagem (NaV), que são essenciais para deflagrar um potencial de ação (PA) (KRISHNAM et al., 2009). Nos neurônios do GRD estão presentes os NaV's 1.1, 1.2, 1.6, 1.7, 1.8 e 1.9 (GONÇALVES et al., 2018; JI, 2017) e com essas diferenças entre os neurônios, pesquisas buscaram classifica-los de diferentes formas. Uma dessas classificações relacionou o formato do PA e a velocidade de condução. Foram encontrados grupos de PA's com diferentes formatos e de maiores e menores

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

velocidades de condução nervosa e associados a eles informações levadas para o SNC, como mecanoceção, proprioceção e nociceção (HARPER; LAWSON, 1985b,a). A literatura descreve que os PA's enviados ao SNC para sinalizar informações mecanoceptivas e proprioceptivas possuem uma maior velocidade de condução e um PA de curta duração ($< 2,0$ ms). Em contrapartida, os neurônios nociceptivos possuem uma menor velocidade de condução e uma maior duração do PA ($> 2,0$ ms). Outro método de classificação de diferentes PA's é usando a 1ª e 2ª derivada do sinal, recentemente proposto por (Silva-Alves et al, 2023).

Com o avanço da tecnologia computacional, as linguagens de programação vêm sendo bastante utilizadas nos diferentes ramos da ciência, pois os modelos computacionais permitem coletar dados de forma rápida e com baixo custo. Com isso, novas pesquisas com base no modelo matemático descrito por Hodgkin e Huxley (1952) (modelo H-H) usado para simular o potencial de ação que se propaga no axônio gigante de lula, buscam criar modelos matemáticos para simular PA's e correntes iônicas de neurônios de diferentes tecidos. Sacchi et al., (1998) e Parul Verma et al. (2019) com base no modelo H-H escreveram um modelo matemático de PA de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) e GRD respectivamente.

Em 1976 Erwin Neher e Bert Sakmann desenvolveram a técnica de patch-clamp que permite medir correntes iônicas através de um canal iônico, mas também permite a medida do potencial de membrana neuronal e suas variações, como o PA em neurônios isolados. Dessa forma, com os PA's possíveis de serem obtidos pela técnica experimental e por modelos matemáticos, podemos analisar semelhanças e divergências entre os métodos, de modo a simular com boa aproximação os dados experimentais e investigar o potencial de ação e as correntes iônicas de uma única vez. Com isso, reduzimos o número de experimentos realizados que, conseqüentemente, reduz o número de animais experimentais utilizados para investigar propriedades elétricas dos neurônios. Além disso, a utilização dessas simulações pode auxiliar na previsão do que pode ser encontrado nos experimentos eletrofisiológicos e no comportamento neuronal.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo utilizar a simulação computacional para descrever o PA de neurônios do GRD de camundongos e quantificar a expressão das isoformas de Nav's 1.7 e 1.8, além de outras condutâncias envolvidas na gênese do PA.

3. METODOLOGIA

Utilizamos duas abordagens para obtenção dos dados desse trabalho: uma experimental, com a coleta de dados eletrofisiológicos dos neurônios e outra teórica/computacional, com o uso de um modelo análogo elétrico de membrana e simulação dos potenciais de ação. Para a obtenção dos dados eletrofisiológicos, foram utilizados camundongos machos da linhagem

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Swiss provenientes do biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará (ISCB-UECE) e o projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da UECE, recebendo o número de protocolo 080921131/2020 (CEUA-UECE). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os GRD's foram dissecados e acondicionados em solução de Tyrode. Para obtenção de células isoladas os tecidos passaram por um processo de dissociação. Após a dissecação os GRD's foram lavados com solução de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) adicionado 1% de antibiótico (ANT-B), após a lavagem os tecidos ganglionares foram submetidos a duas soluções enzimáticas (Tripsina e Colagenase tipo1) em banho maria a 37°C. Após o processo enzimático os tecidos foram desbastados até que a solução ficasse a mais homogênea possível. Em seguida, os neurônios dissociados foram plaqueados em lâminulas tratadas com poli-d-lisina e levadas para incubadora ajustada para a temperatura de 37°C à 5,0% de CO₂ e os experimentos de patch-clamp foram realizados entre 8 e 48 horas. Os experimentos eletrofisiológicos foram feitos em um setup de patch-clamp, composto por um microscópio ocular, amplificador (axopatch 200B) parcialmente controlado pelo programa de computador Clampex (versão 10.2) e uma Digidata1440A para aquisição, filtro do sinal e conversor do sinal analógico em sinal digital, e por fim um computador para armazenar os registros. Foram utilizados protocolos de corrente para deflagrar o PA dos neurônios e seus dados registrados para posterior análise.

Na abordagem teórico/computacional, foi utilizada uma simulação computacional feita na linguagem C/C++ com equações descritas no artigo de Parul Verma et al. (2019) e, com alterações nas condutâncias dos NaV's 1.7 e 1.8 e das condutâncias ao potássio (K⁺), fizemos aproximações do traçado do PA obtido pela simulação com o traçado experimental. Os modelos matemáticos são baseados em equações físicas para medições de correntes (Lei de Ohm) e diferenças de potenciais (DDP) através da membrana plasmática (análogo a um circuito resistor-capacitor), onde as correntes iônicas em termos matemáticos possuem variáveis adimensionais responsáveis pela dinâmica dos canais iônicos e a DDP é basicamente a razão entre o somatório das diferentes correntes iônicas e a capacitância de membrana.

Para análise dos dados experimentais e computacionais utilizamos o clampfit (versão 10.7), onde os neurônios foram separados no grupo A₀ e A_{inf}, diferenciados pela primeira derivada do sinal.

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

4. RESULTADOS

Inicialmente, os dados eletrofisiológicos experimentais foram analisados e alguns parâmetros eletrofisiológicos foram coletados, como, amplitude do PA, duração, reobase, inclinação ascendente, inclinação descendente e amplitude do anti-pico.

Tabela 1: Dados eletrofisiológicos experimentais e computacionais dos grupos de células encontradas no GRD.

Parâmetros	Experimental		Modelagem	
	A _{inf} (n=3)	A ₀ (n=4)	A _{inf} (n=3)	A ₀ (n=4)
Reobase (pA)	433,33 ± 145,3	1025 ± 221,3	433,33 ± 145,3	1025 ± 221,3
Amplitude (mV)	81,34 ± 3,27	79,79 ± 8,32	82,03 ± 3,62	80,015 ± 8,50
dV/dt _{asc} (Vs ⁻¹)	74,62 ± 3,98	62,98 ± 17,34	69,23 ± 8,20	100,88 ± 31,48
dV/dt _{desc} (Vs ⁻¹)	-32,18 ± 4,07	-75,63 ± 22,90	-21,85 ± 2,38	-36,77 ± 5,78
Duração	3,88 ± 0,41	3,31 ± 1,58	4,30 ± 0,72	2,19 ± 0,24
Amp.ant-pico (mV)	-2,58 ± 5,72	12,80 ± 6,89	5,67 ± 1,45	8,85 ± 2,27

Após a utilização do análogo elétrico de membrana, criamos um modelo computacional de acordo com as equações do artigo de Parul Verma et al. (2019) baseadas no formalismo de Hodgkin e Huxley. Uma vez com o modelo que simulava o PA dos neurônios do GRD, foram feitas alterações no modelo de modo que o traçado simulado se tornasse o mais próximo possível do traçado experimental em termos dos parâmetros eletrofisiológicos analisados. Dos experimentos, e de acordo com a classificação proposta por Silva-Alves et al., (2023), dois grupos de células foram identificados: A₀, que são neurônios sem inflexão na parte descendente do PA e A_{inf}, no qual apresenta a inflexão. Os traçados representativos desses neurônios estão mostrados na figura 1. Foram obtidos para as células A₀ n = 4 e A_{inf} n = 3. A capacitância média do grupo A₀ a A_{inf} foi 35,30 ± 8,89 pF e 32,88 ± 7,06 pF, respectivamente, e os dados eletrofisiológicos dos dados experimentais e simulados estão mostrados na tabela 1.

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

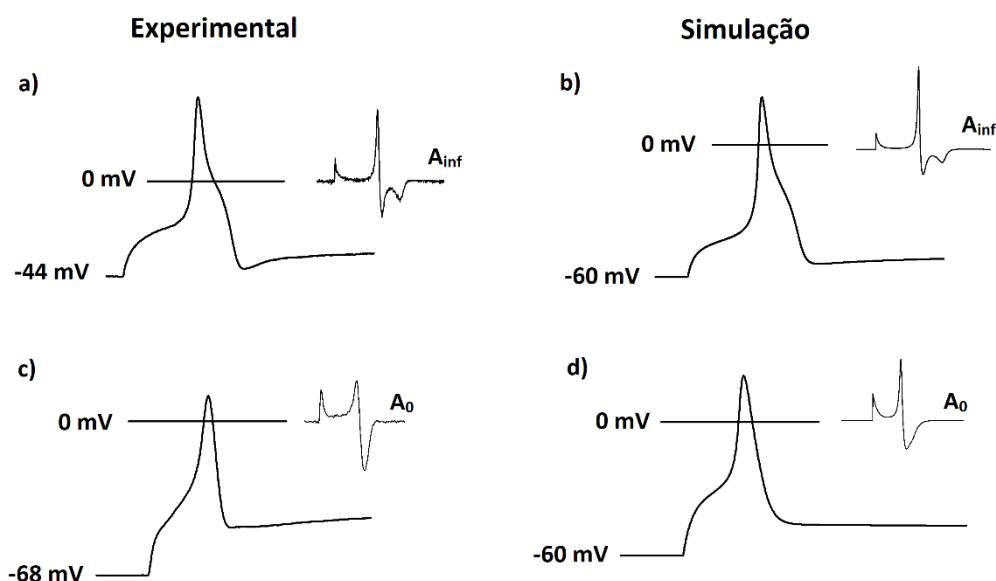


Figura 1: Traçados representativos experimentais e simulados dos formatos de PA dos grupos A_{inf} e A_0 e as curvas que representam a primeira derivada do PA.

Na figura 1, temos uma representação de dados experimentais e simulados dos grupos de células A_0 e A_{inf} , onde foi feito o traçado que representa a curva reproduzida por pontos de tangência do PA, ou seja, a curva que representa a primeira derivada dos traçados experimentais. Conforme visto, o formato do PA simulado tanto para o grupo A_0 quanto A_{inf} (painéis b e d) possuem bastante semelhança com os dados experimentais (painéis a e c). Com relação aos dados eletrofisiológicos da tabela 1, vemos que os parâmetros reobase e amplitude do PA são bastante próximos tanto no grupo A_0 e A_{inf} . Já os outros parâmetros apresentam valores próximos, como a duração e a dV/dt_{asc} . Os parâmetros que mais se distanciaram entre os dados simulados e experimentais foram a dV/dt_{desc} e a amplitude do anti-pico.

Para as simulações, utilizamos os valores iniciais de condutâncias descritas no modelo de (Parul Verma et al., 2019), que usou condutâncias dos NaV 's 1.7 e 1.8 iguais a 18,0 e 7,0 mS/cm^2 , respectivamente, e condutâncias máxima ao potássio (GK_{max}) igual a 13,11 mS/cm^2 , além da condutância de vazamento igual a 0,0575 mS/cm^2 . Conforme citado anteriormente, realizamos ajustes nesses valores para aproximar o dado simulado ao dado experimental e a tabela 2 apresenta os ajustes médios das condutâncias para os grupos A_0 e A_{inf} .

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Tabela 2: Dados de condutâncias médias usadas nas simulações para aproximação do potencial de ação experimental.

Parâmetros	A_{inf} (n=3)	A_0 (n=4)
$G_{Na1.7}$ (mS/cm ²)	33,33 ± 4,41	115,00 ± 38,32
$G_{Na1.8}$ (mS/cm ²)	2,38 ± 0,69	0,36 ± 0,18
G_K (mS/cm ²)	2,38 ± 0,62	0,90 ± 1,20
G_{Ia} (mS/cm ²)	7,33 ± 1,53	6,33 ± 2,0
$G_{vazamento}$ (mS/cm ²)	0,87 ± 0,37	0,56 ± 0,12

Como visto na tabela 2, as células do tipo A_{inf} tiveram uma condutância máxima ao Na^+ ($G_{Na^+_{max}}$) igual a $37,71 \pm 4,29$ mS/cm² onde 93,33% é de NaV 1.7 e 6,66% NaV 1.8. Enquanto as células do tipo A_0 alcançaram uma $G_{Na^+_{max}}$ de $115,36 \pm 38,5$ mS/cm², expressando 99,68% de NaV 1.7 e 0,31% de NaV 1.8. Podemos perceber que ambos tipos de células têm a o NaV_{1.7} como majoritário. No entanto, as células do tipo A_0 expressam uma menor $G_{Na^+_{max}}$ e a condutância ao NaV_{1.8} mínima (< 1% de $G_{Na^+_{max}}$), enquanto células do tipo A_{inf} expressaram uma $G_{Na^+_{max}}$ menor e o NaV_{1.8} foi expresso em uma quantidade significativa (>5% de $G_{Na^+_{max}}$). Para as demais condutâncias, podemos notar que estão todas reduzidas nas células do tipo A_0 , em destaque as condutâncias ao potássio que contribuem para a fase de hiperpolarização do PA.

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, utilizamos um modelo que descreve o PA dos neurônios do GRD de roedores e comparamos os parâmetros desse modelo com dados obtidos experimentalmente. Encontramos que a simulação descreveu os dados experimentais de forma razoável, pois alguns parâmetros tiveram uma aproximação muito boa (amplitude e reobase), enquanto outras nem tanto, vide dV/dt_{desc} . De acordo com Ferreira-da-Silva et al (2013) e Leal-Cardoso (2010) os PA's do GRD de ratos tiveram dV/dt_{asc} média maior que 100 V/s e na tabela 1, podemos ver que a dV/dt_{asc} média é menor que 100 V/s. No entanto, podemos notar que o número de experimentos realizados nesse trabalho foi de $n = 7$, mas vejamos que os dados possuem uma tendência a se aproximar dos dados encontrados na literatura. Na figura 1, observamos uma semelhança entre os traçados experimentais e simulados quando comparamos os painéis (a e c) e (b e d). Em contrapartida, os potenciais de repouso usados nas simulações que melhor representaram os PA's experimentais foi de -60,0 mV. A figura 1, baseada na figura desenvolvida por Silva-Alves (2023) mostra além dos PA's experimentais e simulados, o modelo das curvas produzidas pelos pontos de tangencia que possuem dois diferentes formatos, semelhante ao que Silva-Alves (2023) propõe para células do tipo A_0 e A_{inf} .

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Na tabela 2, observamos que os neurônios do tipo A_{inf} que apresentam PA's com inflexão na fase descendente e expressaram uma maior condutância ao $NaV_{1.8}$. Logo, podemos associar essa inflexão encontrada em células do tipo A_{inf} e não foi encontrada em células do tipo A_0 à essa diferença de condutâncias do $NaV_{1.8}$, que corrobora com a pesquisa realizada por (BLAIR; BEAN, 2003) que associaram essa inflexão a expressão do $NaV_{1.8}$ e a canais de cálcio dependentes de voltagem. Ferreira-da-Silva e colaboradores (2009) estudando as alterações dos parâmetros eletrofisiológicos de neurônios do GCS causados pela exposição ao 1,8 cineol, terpeno presente em óleos essenciais de várias plantas (SANTOS & RAO, 1997), mostrou que o 1,8 cineol é capaz de bloquear o PA desses neurônios.

6. CONCLUSÃO

As equações matemáticas utilizadas para gerar um PA de neurônios do GRD com alterações dos valores das condutâncias ao Na^+ , K^+ e vazamento descreveram parcialmente os dados experimentais, com boa aproximação de alguns parâmetros e outros não. No entanto, com o modelo analisado, quando o resultado da simulação foi o mais próximo possível do dado experimental, conseguimos de forma determinística mostrar que células com inflexão na fase descendente do PA possuem uma maior condutância do $NaV_{1.8}$ e a na literatura há indícios que confirmam esse resultado. Portanto, por mais que o modelo não tenha respondido perfeitamente ao dado experimental, o que já era esperado, pois estamos tratando de um sistema biológico altamente complexo, ele é útil para descrição do PA desses neurônios e pode ser utilizado para previsão do comportamento neuronal.

7. AGRADECIMENTOS

FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento, ao Pedro Militão de Albuquerque Neto e aos integrantes do laboratório de eletrofisiologia (LEF), pelo apoio técnico/científico.

8. BIBLIOGRAFIA

BELLUZZI, O. SACCHI, O. A five-conductance model of the action potential in the rat sympathetic neurone. *Proo. Biophys. molec. Biol.*, Vol. 55, pp. 1-30, 1991

BLAIR, N. T.; BEAN, B. P. Role of tetrodotoxin-resistant Na^+ current slow inactivation in adaptation of action potential firing in small-diameter dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience*, v. 23, n. 32, p. 10338–10350, 12 nov. 2003.

XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVIII ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*, v. Suppl 6, p. 27–35, 1999.

Ferreira-da-Silva, F.W., Barbosa, R., Moreira-Júnior, L., dos Santos-Nascimento, T., de Oliveira-Martins, M.D., Coelho-de-Souza, A.N., et al., 2009. Effects of 1, 8-cineole on electrophysiological parameters of neurons of the rat superior cervical ganglion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1068–1073.

Ferreira-da-Silva, F. W., da Silva-Alves, K. S., Lemos-Dos-Santos, M., de Oliveira, K. A., Joca, H. C., do Vale, O. C., Coelho-de-Souza, A. N., & Leal-Cardoso, J. H. (2013). n5-STZ diabetic model develops alterations in sciatic nerve and dorsal root ganglia neurons of Wistar rats. *ISRN Endocrinol.*, 2013, 638028. <https://doi.org/10.1155/2013/638028>

GONÇALVES, T. C. et al. The NaV1.7 channel subtype as an antinociceptive target for spider toxins in adult dorsal root ganglia neurons. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 1000, 2018.

HARPER, A. A.; LAWSON, S. N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology*, 1985a.

HARPER, A. A.; LAWSON, S. N. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *The Journal of physiology*, p. 47–63, 1985b.

HODGKIN, A. L., HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, vol. 117, pág. 500-544, 1952

J. H. Leal-Cardoso, K. S. da Silva-Alves, F. W. Ferreira-da-Silva et al., “Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na⁺ current in dissociated dorsal root ganglia neurons” *European Journal of Pharmacology*, vol. 645, no. 1-3, pp. 86–93, 2010.

Parul Verma. et al. Using Bifurcation Theory for Exploring Pain. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2020 59 (6), 2524-2535 DOI: 10.1021/acs.iecr.9b04495

SANTOS, F. A., RAO, V. S. N. Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1,8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. *European Journal of Pharmacology*, vol. 331, pág. 253–258, 1997

SILVA-DOS-SANTOS, N. et al. Diabetes mellitus alters electrophysiological properties in neurons of superior cervical ganglion of rats. *Brain Research*. v. 1729, p. 1-28. February 2020.

Silva-Alves, K. S et al. Diabetes mellitus differently affects electrical membrane properties of vagal afferent neurons of rats. *Physiological Reports*. v. 11, February 2023 <https://doi.org/10.14814/phy2.15605>.