

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP  
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO – FEEC  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA – DEB

**EA- 997 Introdução à Engenharia Biomédica**  
(Notas de aula – JWM Bassani)

**Janeiro de 2007**

# 1. INTRODUÇÃO

Definição de Engenharia Biomédica, Sub-dren. Perfil dos profissionais. Centros de formação. Campo de trabalho. Perspectivas.

A Engenharia Biomédica <sup>(EB)</sup> é um ramo da Engenharia caracterizado pelo emprego de métodos e técnicas das ciências exatas, em particular das engenharias, no tratamento de problemas médicos e biológicos. Devido ao seu caráter multidisciplinar a EB possui vasto campo de atuação. As atividades típicas desempenhadas por engenheiros biomédicos são: a) estudo quantitativo de fenômenos e sistemas biológicos; b) desenvolvimento de produtos e métodos que auxiliam na pesquisa biomédica e no atendimento médico-hospitalar; c) processamento de sinais e imagens biomédicas; d) produção de dispositivos e equipamentos e amparo técnico-científico na aquisição, instalação e manutenção de tecnologia para a saúde.

São exemplos de contribuições feitas por engenheiros biomédicos: a) o estudo do controle neuromuscular com a teoria de sistemas; b) estudo da transmissão e processamento de sinais neuroelétricos com a teoria de comunicações; c) desenvolvimento e produção de marcapassos cardíacos e de órgãos e membros artificiais; d) análise automatizada do eletrocardiograma e do eletroencefalograma; e) processamento de raios-X e ultra-som; f) tomografia computadorizada.

A tabela 2 ilustra a condição atual da EB no Brasil. Os centros formadores são principalmente <sup>as</sup> universidades.

Tabela 2. Situação atual da Engenharia Biomédica no Brasil

Categoria	Brasil (2003)
Nº de profissionais	< 300
Centros de formação	8
Bacharelis/ano	0 *
Masteris/ano	20
Doutores/ano	10

SÃO DOMINGOS

\* Até 2003 não havia formação em nível de pós-graduação em Engenharia Biomédica.

1 1

Defendemos a sub-divisão da EB em algumas sub-áreas para facilitar, didaticamente, a explicação do tipo de atuação. Não adotamos imprudentemente esta sub-divisão e certamente não recomendamos a criação de um grande número de sub-áreas que acabam por se confundir com linhas ou até com projetos de pesquisa. Para nós as seguintes sub-áreas são convenientes:

- a) Engenharia Médica e Biológica - trata-se da sub-área que concentra a maior parte do pessoal e consiste no desenvolvimento de instrumentos e dispositivos para finalidade médica (diagnóstica ou terapêutica) ou para aplicações em ensino ou pesquisa médico-biológica. Estão também nesta sub-divisão os trabalhos de processamento de sinais e imagens biomédicas;
- b) Engenharia de Reabilitação - nesta sub-área as atividades são parecidas com as do item (a), mas o foco principal é a melhoria das condições de vida de indivíduos portadores de deficiências;
- c) Bioengenharia - neste caso a preocupação é com o entendimento do sistema biológico. É bastante comum que a atividade de uma área seja <sup>mais</sup> orientada ao problema. Métodos e conceitos de Engenharia são usados para desenvolver novas técnicas de abordagem dos sistemas biológicos;
- d) Engenharia Clínica - nesta sub-área a preocupação é o hospital propriamente dito. Preocupa-se com o gerenciamento da tecnologia médica desde sua aquisição, passando pela instalação e manutenção até sua desativação e substituição.

Consideramos fundamental que o perfil do profissional da área inclua uma sólida formação básica nas áreas das ciências exatas e/ou engenharias. Seria o ideal que a formação se iniciasse em cursos técnicos, passasse por uma formação universitária de boa qualidade em engenharia (preferencialmente elétrica/eletrônica) e continuasse em nível de especialização, principalmente no caso da Engenharia Clínica e pós-graduação tanto em nível mestrado quanto doutoral. A adaptação de profissionais de outras áreas à EB vem sendo tentada com critérios diferentes. Na nossa opinião, o melhor processo para isto é ainda controverso.

O perfil ideal do EB deve portanto incluir boa base de Engenharia elétrica, física e conhecimentos práticos de ferramentaria mecânica. É imprescindível bom treinamento em fisiologia e em biofísica. Para atuação em Engenharia Clínica é necessária especialização, em particular para obtenção de conhecimentos de gerenciamento de equipamentos para saúde, (Biot), conhecimentos de computação e de processamento de sinais e imagens certamente é muito importante.

O campo de trabalho vem se expandindo. Dos mais de 200 especialistas em Engenharia Clínica, formados pelo programa da UNICAMP, não se tem notícia de desempregados. Os locais de trabalho são os hospitais de médio e grande porte (mais de 100 leitos) que somam milhares, no Brasil. Há <sup>em</sup> menos de 10% destes, alguma equipe de profissionais e curiosamente, no Estado de São Paulo, já há engenheiros clínicos em cerca de 40% das instituições de saúde de médio e grande portes. Os profissionais mais devotados às outras sub-áreas tem como principais locais de trabalho as universidades, grandes centros de saúde e instituições de pesquisa. Há engenheiros biomédicos realizando experimentos fisiológicos e há vários atuando na área de processamento de imagens, visando diagnóstico. Há um discreto mas crescente interesse de empresas por engenheiros biomédicos. As grandes multinacionais precisam de pessoal qualificado para facilitar intercâmbios ou mesmo a comunicação com a matriz no exterior. Empresas brasileiras tem visto nos engenheiros biomédicos a possibilidade de iniciar setor de desenvolvimento e algumas tem começado a ver a importância do conhecimento específico ~~em~~ <sup>de</sup> algum sistema fisiológico para melhoria do atendimento aos clientes. Assim, o campo de trabalho vem se tornando cada vez maior e mais variado. Não se pode esquecer que a tendência é aumentar muito a atuação de engenheiros com conhecimentos de engenharia clínica, tanto em vista as ações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária <sup>(ANVISA)</sup> e do próprio Ministério de Saúde, exigindo maior clareza dos critérios para gerenciamento de tecnologia.

1 / 1

nos hospitais e a recente implementação do programa de Tecnovigilância da ANVISA.

Grupos de Pesquisa em Engenharia Biomédica

Ao consultar os chamados grupos de pesquisa do CNPq pode-se encontrar informações sobre as instituições e cursos de pós-graduação e ao mesmo tempo já ter acesso ao tipo de produção do grupo acessado.

Sugerimos que os estudantes procurem o Diretório dos Grupos de Pesquisa do CNPq para acesso aos grupos existentes, na área. Há registro de 40 grupos de pesquisa em EB (até 8/3/2005). Isto corresponde a 0,3% do número total de grupos de pesquisa do país. A Engenharia Elétrica, por exemplo, atinge 2,4% do total e Medicina é o maior com 6,3%.

Na UNICAMP a nossa área possui dois grupos cadastrados e credenciados junto à Instituição e ao CNPq:

- Engenharia Biomédica e
- Engenharia Biomédica e Física Médica

---



---



---



---



---

As perspectivas futuras são de melhoria do campo de trabalho, não só pela necessidade dos hospitais, o que afeta mais diretamente a Engenharia Clínica, mas também pela tendência internacional de programas multidisciplinares de pesquisa, ensino e de desenvolvimento tecnológico. Intrinsecamente a Engenharia Biomédica já carrega experiência antiga na atuação multidisciplinar. A atuação multidisciplinar eficaz não é tão simples quanto pode parecer. No nosso caso, por exemplo, costumamos dizer que EB não é igual à soma de Engenheiros com Médicos ou Biólogos. O nosso engenheiro é um profissional diferente e preparado para trabalhar de modo orientado pelas ferramentas (e.g. profissionais que desenvolvem técnicas e métodos de ultra-som, <sup>laser, etc.</sup> e posteriormente os aplicam no desenvolvimento de instrumentos para finalidade diagnóstica ou terapêutica) ou orientado por problemas (e.g. para estudo de um sistema fisiológico com o objetivo de melhor entendê-lo são aplicados <sup>e desenvolvidos</sup> métodos quantitativos novos, gerando conhecimentos para novas pesquisas e/ou para novos desenvolvimentos tecnológicos).

A EB existe como área de pesquisa em vários centros de formação de grande renome nos países descritos. Seguem alguns "links" para

Exemplos de alguns centros que atuam na área de Engenharia Biomédica. Sugerimos aos estudantes que usem o Google, tecendo Biomedical Engineering e naveguem por algumas das páginas de centenas de locais interessantes.

Veja por exemplo um Centro de Engenharia Biomédica:

<http://web.mit.edu/cbe/www>

Estes são universidades tradicionais na área:

<https://engineering.purdue.edu/BME/>

<http://www.bme.umich.edu>

Uma questão importante que nem sendo colocada em pauta hoje em dia é qual deve ser o currículo de Engenharia Clínica. Acusado que a questão deva ser colocada em maior amplitude: Qual deve ser o currículo e qual deve ser o nível de formação? É evidente que o País necessita de pessoal técnico com boa formação e precisa aumentar o número de vagas nas universidades públicas. Não se pode contudo fazê-lo em detrimento da qualidade e usando de táticas para aumentar o número de "clientes". Um artifício é começar a renomear a Engenharia Biomédica como um "balcão de gases" onde todos podem entrar. Neste caso o resultado é a criação de reprovação em massa ou a produção de profissionais totalmente incompetentes. O ponto deve estar em assumir que, no mínimo, o Engenheiro Biomédico seja um engenheiro. Diversificar e complementar sua atividade é que consiste no nosso desafio. Isso poderá implicar em formar <sup>nesta</sup> apenas em nível de pós-graduação, a partir de engenheiros bem qualificados. Por outro lado, profissionais de áreas como a Física podem, com relativa facilidade, se adaptar em atividades de Engenharia e se tornarem excelentes profissionais. Qual é o equilíbrio? A questão está aberta e é nossa obrigação atuar no encaminhamento da sua solução. Acusado que a solução esteja em um programa multidisciplinar, multi-unidades, multinível onde os títulos conseguidos dependam da competência e desempenho de cada estudante.

## Leis Físicas e Químicas associadas aos processos fisiológicos!

- Lei de Ohm - Fluxo sanguíneo e pressão; corrente iônica, capacitância de membranas.
- Lei de Boyle e os gases ideais - respiração
- Gravidade - fluxo sanguíneo; hidrostática no **SEW**
- Energias cinética e potencial - contração muscular, movimentos do tórax na **expiração**
- Inércia, momento, viscosidade e arrasto - locomoção animal
- Princípio de Bernoulli e Equação de Poiseuille - hemodinâmica (Mecânica de Fluidos)
- Energia livre de Gibbs - metabolismo e produção de energia bioquímica
- Teoria de controle e realimentação - Regulação e controle fisiológicos
- Circuitos elétricos - excitação e condução em tecidos excitáveis
- Casamento de impedância e ressonância - sistema auditivo

etc, etc, etc...



2. Anatomia funcional do organismo humano. A célula. Organização dos tecidos e sistemas orgânicos.

### INTRODUÇÃO

Os seres vivos são adaptados anatomicamente e funcionalmente para as atividades que eles desempenham. Se adaptam, por exemplo, para a manutenção da própria vida.

Nos seres humanos certas atividades são bastante conhecidas, como a respiração, a digestão, audição, tato, visão e reprodução. Sabe-se do cotidiano que para a execução destas funções conta-se com sistemas especializados, como por exemplo, o sistema nervoso, o sistema respiratório, sistema auditivo e outros. Sabe-se ainda que cada ~~um desses~~ <sup>estes</sup> sistemas são compostos por sub-sistemas ou "órgãos" que, trabalhando em conjunto, compõem a tarefa mais geral que o sistema deve executar. Por exemplo, no sistema respiratório, a boca, o nariz, os "canais" que conduzem o ar para dentro e para fora dos pulmões e os próprios pulmões constituem órgãos do sistema respiratório, cada um com sua função mais específica.

O trabalho harmonioso de todos os sistemas compõe as atividades de um organismo vivo. Contudo, não são os órgãos as unidades funcionais básicas dos organismos, mas, <sup>sim</sup> diminutas (microscópicas) compartimentos capazes de executar uma série de microfunções. Estes compartimentos são denominados células. As células se agregam formando o que denominamos tecidos. Estes, por sua vez, fazem parte da constituição dos órgãos (o coração, por exemplo é uma bomba muscular mas inclui tecidos de outras naturezas como tecido conjuntivo e nervos na sua estrutura).

### AS CÉLULAS EXCITÁVEIS

Suponha que um tomate fosse arremessado na direção da cabeça de um homem (por exemplo seu professor pediatra) e que ele tenha a possibilidade de se esquivar. Suas reações iriam envolver um grande número

de células do seu corpo. Primeiro a presença e o movimento do objeto vermelho seriam registradas pelas células sensoriais visuais e elas, em seguida, excitariam células do cérebro através do nervo óptico. Um grande número de atividades seria se desenvolver numa variedade de células nervosas do cérebro e após um curto tempo, impulsos nervosos chegariam a músculos da face e, indiretamente, a músculos do pescoço, pernas e braços. As células musculares, por sua vez, seriam excitadas e iriam se contrair para movimentar o corpo e impedir que o tomate tivesse o destino desejado pelo arremessador (obviamente nenhum dos alunos de EA997 ou IA744).

O movimento iria resultar na excitação de numerosas terminações sensoriais nos músculos e nas juntas do corpo e nos órgãos de equilíbrio do ouvido interno. A atividade sensorial iria causar maior atividade no cérebro e na medula espinhal, provavelmente levando a uma atividade muscular extra.

Uma cadeia de eventos deste tipo envolve a atividade de vários tipos celulares que descreveremos como "células excitáveis", uma ampla categoria que inclui células nervosas e musculares. Uma célula excitável é, por definição, aquela que prontamente e rapidamente responde a um estímulo adequado com uma variação do potencial transmembrana.

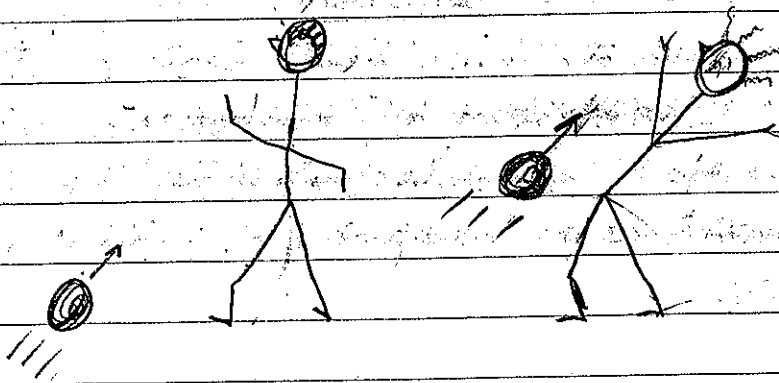


Fig. 1. Reflexo de esquivar de um objeto preferir a aproximação de objeto arremessado por alguém(a) f<sup>o</sup>.

AS CÉLULAS

Os organismos vivos são formados por células e todas as células são geradas a partir de outra célula. Esta afirmação constitui a chamada teoria celular. É uma questão interessante questionar se isto é um dogma da Biologia, mas este assunto não faz parte deste curso.

As células são delimitadas por uma membrana. No seu interior o citoplasma constitui um sistema altamente organizado e é sede da atividade da célula. Além do citoplasma, compartimentalizada por um envoltório, encontra-se no exterior das células o <sup>seu</sup> núcleo.

Para manter a organização interna, responder a estímulos e alterar o meio a célula requer um contínuo suprimento energético. Esta energia é, em última análise, obtida do ambiente, normalmente sob a forma de energia química tal como a extraída pela célula das moléculas de glicose.

Aparentamos a seguir, de modo resumido, as principais estruturas celulares das chamadas células eucariotas (eu-cariotas, cario-núcleos) nas quais um núcleo "verdadero" se encontra bem individualizado. A denominação se contrapõe a procarionte (pro-primeiro, cario-núcleos) classe de células nas quais os cromossomos não estão separados do citoplasma.

ULTRAESTRUTURACITOPLASMA

O citoplasma contém as organelas (e.g. mitocôndrias, retículo endoplasmático, lisossomas) e depósitos de substâncias (e.g. gotas pequenas de lipídeos, grânulos de glicogénio). O espaço que envolve estas estruturas é preenchido pela matriz citoplasmática ou citosol. Esta matriz inclui proteínas, íons e estruturas proteicas monoméricas que ao se polimerizarem podem dar origem a microtúbulos e microfilamentos. A polimerização parece ser reversível o que confere à matriz celular a capacidade de se modificar de sol para gel e vice-versa.

Ultrastructure of Cells Pag. 75-90

Cap 5,

Donald G. Ferguson in

Cell Physiology, 2<sup>nd</sup> ed, Acad. Press, New York

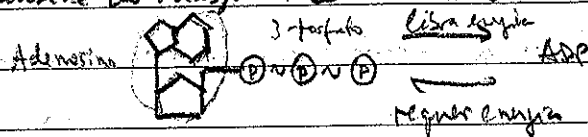
SÃO DOMINGOS  
Nichols Sperleles (ed.), 1998.

### NÚCLEO

O núcleo é uma estrutura intracelular, de forma variável e bem individualizada por meio de duas membranas denominadas de envoltório nuclear, há poros na membrana que permitem a troca de macromoléculas com o citosol. A membrana externa contém ribossomos e se apresenta contínua com o retículo endoplasmático rugoso do citoplasma. O núcleo contém a cromatina que é constituída por DNA (ácido desoxirribonucleico) associado a proteínas. Há no interior do núcleo uma estrutura em geral esférica que por sua vez contém RNA (ácido ribonucleico) e proteínas básicas, <sup>chamado</sup> o nucleolo. Esta estrutura só é visível no núcleo interfásico, ou seja, aquele que não está em mitose. O núcleo é a sede do material genético das células.

### Mitocôndrias

Corpúsculos esféricos ou mais frequentemente alongados, intracelulares, com duas membranas, sendo a mais interna pregueada, formando dobras como protuberâncias. A mitocôndria é a sede da respiração celular. Sua principal função é produzir energia a partir de ácidos graxos e glicose, color. A energia é disponibilizada para todas as atividades celulares na forma de moléculas de ATP (tri-fosfato de adenosina). As mitocôndrias participam também de outros processos metabólicos e inclusive do transporte celular de ions  $Ca^{2+}$ .



### Retículo endoplasmático (RE)

Rede de vesículas achatadas e túbulos que se intercomunicam. Há dois tipos básicos o retículo liso e o rugoso ou granular. Este último é assim denominado por conter em sua superfície partículas "densas", os ribossomos. O ribossomas tem um diâmetro de cerca de 15nm e juntos com polirribosomos de RNA tem um papel fundamental na síntese de proteínas.

O retículo liso é uma rede muito desenvolvida em determinados tipos celulares, tais como as que secretam hormônios esteroides, células hepáticas e no músculo estriado (retículo sarcoplasmático - principal estoque de  $Ca^{2+}$ ).

Enzimas E<sub>2</sub>  
↓ → solubilizado → secreta bile  
↑ bilirubina insolúvel → icterícia

( 12 )

usado na contração). Há no RS uma ATPase de Ca<sup>2+</sup> que transporta Ca<sup>2+</sup> para dentro de organelas e é a principal responsável pela redução de Ca<sup>2+</sup> para o relaxamento do músculo estriado (esquelético e cardíaco).

Barbitúricos promovem aumento acentuado do REL em células hepáticas. Há grande aumento da atividade de enzimas que metabolizam barbitúricos e outros compostos tóxicos e que atuam na parede do REL. Portanto o REL protege o organismo de efeitos tóxicos de certas drogas. No REL do fígado que o pigmento de bile (bilirubina) é solubilizado, na forma colúvel e secretado. Se a enzima que atua, neste caso, é deficiente há acúmulo de bilirubina insolúvel no sangue → icterícia

### APARELHO DE GOLGI

Também contida como complexo de Golgi. Formado por um número variável de vesículas achatadas e esféricas de diversos tamanhos, sendo que estas últimas parecem brotar das primeiras. Proteínas que são sintetizadas no RE passam no GOLGI por transformações (chamadas pós-traducionais). Nesta organela são também empacotadas e enlucradas produtos de secreção.

### LISOSOMAS

São organelas de tamanho entre 0,5 e 3,0 µm de diâmetro que contêm diversas enzimas hidrolíticas com atividade máxima em pH ácido. Deste modo atuam digerindo partículas fagocitadas pelas células ou suas próprias organelas. A "renovação" de organelas é um processo fisiológico que permite que sua operação se mantenha em bom desempenho tanto por eliminar componentes defeituosos como por regular sua quantidade de acordo com a necessidade.

### PEROXISSOMAS

São organelas caracterizadas pela presença de enzimas oxidativas. Contêm catalase celular, enzima que converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio. Dentre outras funções os peroxissomas animais têm papel na desintoxicação. Cerca de metade do etanol consumido por uma pessoa é oxidado pelos.

peroxisomas principalmente os hepáticos e os renais:

### Citoesqueleto

Tendo em vista a localização extremamente constante de vários componentes celulares e a forma extremamente regular de determinadas células, como os neurônios com seus axônios extremamente longos, postulou-se a existência do citoesqueleto. Aparentemente o papel do citoesqueleto é bem mais amplo que apenas estrutural. Além de estabelecer e manter a forma das células e responsável pelos movimentos celulares como a contração e deslocamento intracelular de organelas, cromossomos, vesículas, etc. Os principais componentes do citoesqueleto são os microtúbulos, microfilamentos de actina e outros filamentos.

### Depósitos citoplasmáticos

Além dos depósitos de gorduras e glicogênio, não raramente estão presentes os depósitos de pigmentos como por exemplo a melanina. Estes depósitos tem importância em biologia geral uma vez que acabam por ser responsáveis pela cor dos seres vivos e consequentes mecanismos de defesa (e.g. mimetismo), comportamento sexual e proteção contra radiação ultravioleta. Nos mamíferos a melanina protege o DNA da epiderme dos raios ultravioletas e consequentemente pode reduzir a incidência de cânceres de pele.

### MEMBRANA PLASMÁTICA

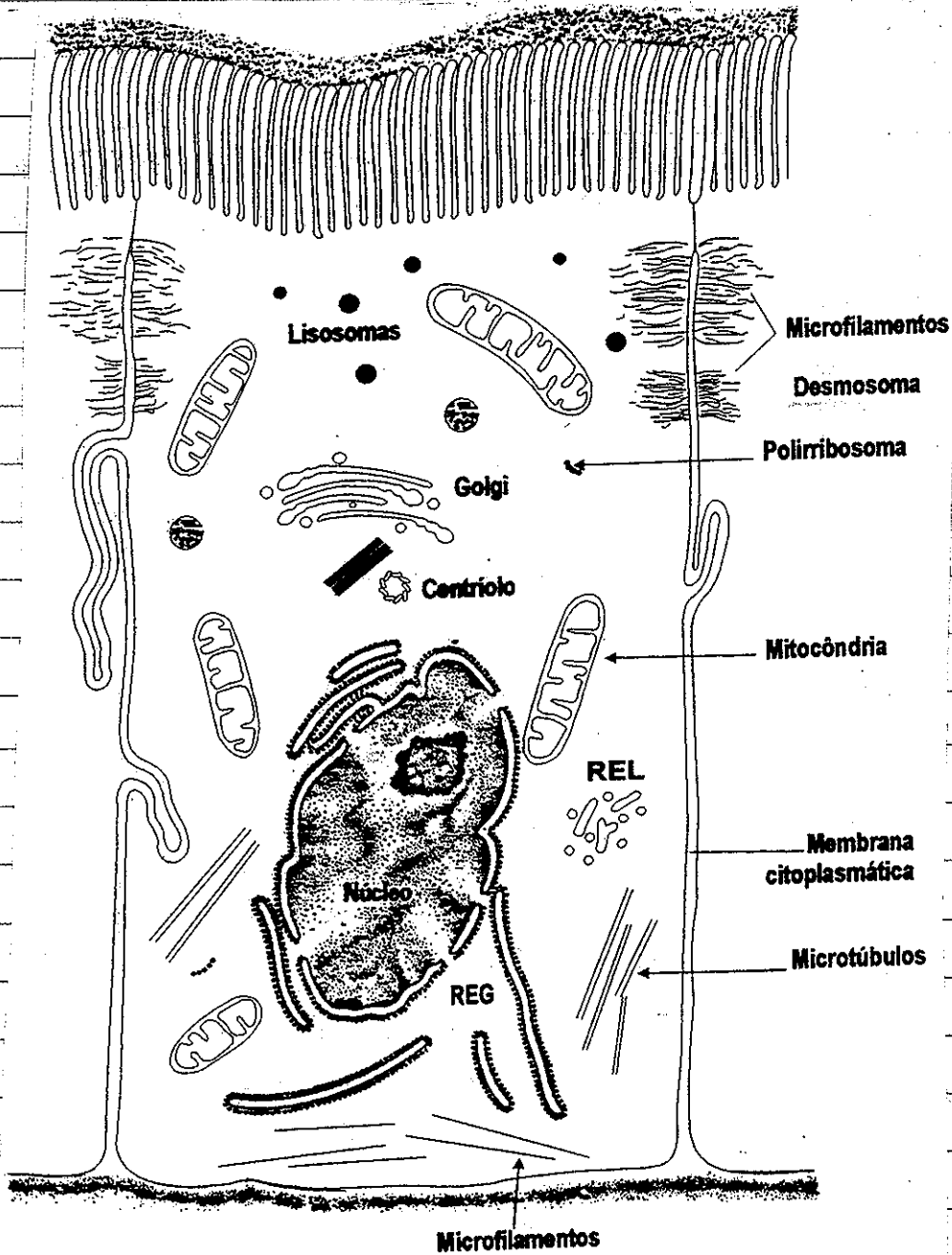
Todas as organelas, o citosol, o núcleo e outras estruturas chamadas intracelulares, estão acondicionadas por uma membrana que se é denominada membrana plasmática ou membrana celular. É esta membrana que individualiza cada célula. Trata-se de uma estrutura lipoprotéica de 7 a 10 nm de espessura correspondente a (70 a 100 Å).

$$1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$$

( 14 )

praticamente dois fosfolípidos. A membrana é a sede da interação físico-química da célula com o ambiente e com as outras células. Partículas de dimensões diferentes podem ser transportadas ou podem fluir passivamente através das membranas celulares. A membrana plasmática é o local da atividade elétrica celular.

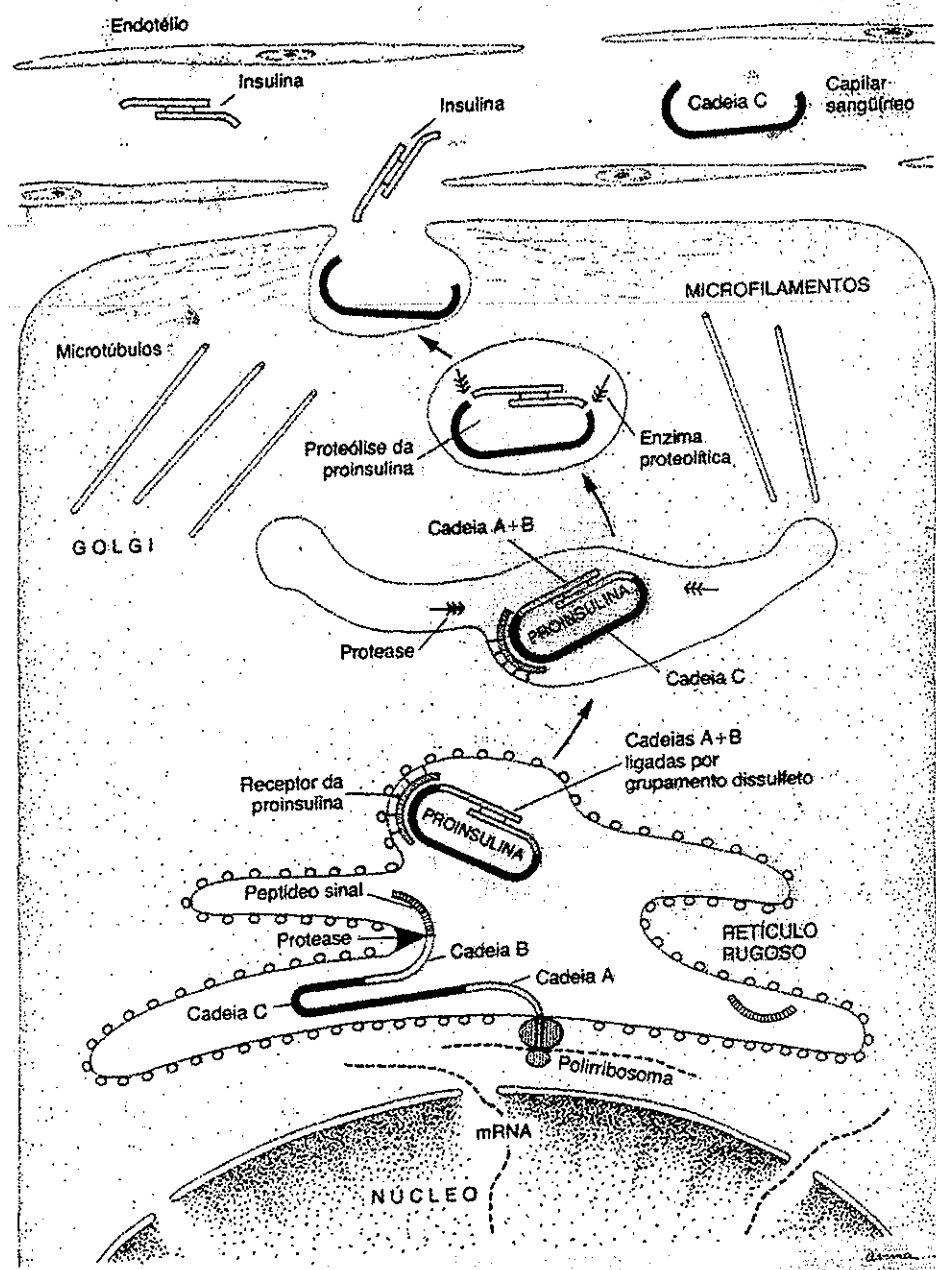
### A célula



Para que a glicose seja polimerizada  
 para Cadeia C (parte da proteína)

Polimerizar e abrir DNA para cópia !!

45



Junqueira & Carneiro, 91  
 Fig. 10.7

Sequência de eventos na síntese e secreção de uma proteína (insulina). No retículo rugoso se processa a síntese da pré-proinsulina (cadeias A, B e C). No RER ocorre a perda da parte de sinal e dobramento (3<sup>da</sup> dia). No Golgi inicia-se a proteólise da proinsulina que se processa nos grânulos de secreção formando a insulina. Os grânulos migram-se até a membrana e produzem a secreção.



3. Origem dos biopotenciais. Registos de biopotenciais. O potencial de repouso. Potenciais graduados e potenciais propagáveis. Distribuição iônica celular. Equilíbrio de Donnan e osmótico. Equação de Nernst. Bomba de  $Na^+/K^+$ . Eletrodo de KCl. Equação de Goldman-Hodgkin-Katz.

Cronologia de acontecimentos ligados ao desenvolvimento do conhecimento na área da bioeletricidade e fenômenos elétricos de membrana.

Data	Nome	Acontecimento
4000 AC	Hieróglifo Egípcio	Peixe elétrico usado para estimulação em humanos
46	Scribonius Largus (Grego)	Prescreveu estimulação de humanos com peixe elétrico para tratar dores de cabeça e artrite.
1664	Jan Swamerdamm (Alemão)	Usou estimulação bimetálica em experimentos. Mostrou que não havia um fluido do nervo que se movia para o músculo gerando a contração.
1781	Luigi Galvani (Italiano)	Afirmou que a corrente elétrica podia disparar contração e que o músculo podia gerar corrente elétrica. Foi criticado por A. Volta.
1838	Carlo Matteucci (Italiano)	Primeira medição da atividade elétrica muscular. É possível que Emil du Bois Reymond tenha medido antes a atividade neural em rã.
1850	Emil du Bois Reymond (Alemão)	Mostrou que Galvani estava correto.
Segunda metade do século XIX (XIX)	Schleiden & Schwann	Teoria celular. Todo ser é formado por células e estas só podem ser geradas a partir de outra célula.
idem	Ramón y Cajal (Espanhol)	Mostrou que o sistema nervoso é composto por células individuais. Cresce o interesse pelas propriedades elétricas das células vivas. Nobel.
1889	Walther Hermann Nernst (Alemão)	Desenvolvimento da chamada Equação de Nernst com base no transporte de partículas através de membranas semi-permeáveis. Nobel.
1864	James C. Maxwell (Inglês)	Desenvolvimento das famosas equações de Maxwell.
1887	Augustus Weller (Inglês)	Primeiras medições do ECG
1902	Julius Bernstein (Alemão)	Investigação sistemática das respostas de nervos e músculos à estimulação elétrica. Primeira interpretação físico-química da célula com uma membrana semi-permeável envolvendo um eletrólito. Considerou existência de ddp através da membrana e que esta poderia variar pela estimulação.
1913	Willem Eithoven (Holandes)	Padronização do ECG e estudo de mecanismo.
1921	Johnson (EUA)	Desenvolvimento do tubo de raios catódicos. Western Electric Co.
1922	Erlanger & Gasser (EUA)	Medições da atividade elétrica neuronal usando o TRC. Mostraram que a velocidade aumenta com o diâmetro da fibra. Nobel.
1925	Gorter & Grandel	Mostraram que a membrana deveria ser uma bicamada.

1932	Adrian, ED & Sherrington, C. (Ingleses)	Descobertas importantes sobre a função dos neurônios. <b>Nobel.</b>
1936	Curtis & Cole (EUA)	Medição de impedância da membrana celular
1939	Ragnar-Granit (Finlandes)	Registro intracelular de potencial de membrana. Grande contribuição no estudo do sistema visual. 1900 a 1991 e foi <b>Nobel.</b>
1940	Ruska E.	Microscópio Eletrônico
1950	Robertson JD	Idéia da membrana unitária. Trilaminar (10 nm), usando microscopia eletrônica.
1941	Curtis & Cole (EUA)	Mediram potencial de membrana durante a passagem de corrente. Idéia do controle da tensão para medir a corrente no Voltage-Clamp.
1943	Davson & Daniele	Bicamada de fosfolípides com a parte polar para a superfície aquosa e apolar uma voltada para a outra. Fina camada de proteínas deveria estabilizar a membrana.
1947	Beck	Desfibrilação de coração humano.
1952	Hodgkin, AL & Huxley, AF (Ingleses)	Teoria iônica da condução nervosa. O Potencial de membrana ultrapassa o zero e portanto o íon Na <sup>+</sup> teria participação na geração do potencial de ação. <b>Nobel.</b>
1972	Singer & Nicholson	Teoria do Mosaico fluido. A membrana celular teria proteínas integrais atravessando a bicamada e possuindo certa mobilidade.
1976	Sackmann & Neher (Alemães)	Aplicação de <i>patch-clamp</i> para estudo de canais unitários. <b>Nobel.</b>
1980	Wikswa	Medição de "impulso" magnético em nervo de rã.

400?  
1972

## A MEMBRANA CELULAR EM REPOUSO

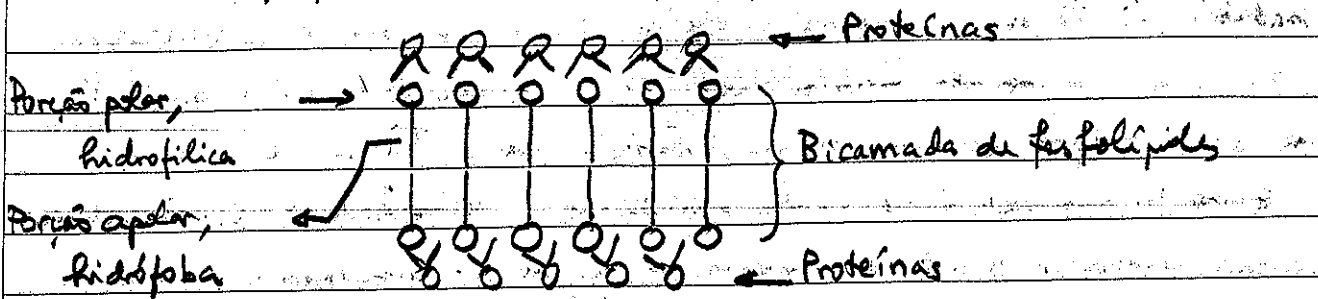
Se um microeletrodo é inserido em uma célula muscular ou nervosa, verifica-se uma grande diferença de potencial, da ordem de 100 milivolts, negativo dentro com relação ao meio externo. Esta diferença de potencial é estável e está presente <sup>mesmo</sup> com a célula em repouso e perfeita e denominada de Potencial de Repouso. A membrana celular é fundamentalmente responsável por este potencial. Vamos agora apresentar propriedades da membrana celular que ajudem entender a origem do potencial de repouso.

## A ESTRUTURA DA MEMBRANA CELULAR

Em 1925, Gorter e Grendel propuseram a possibilidade de que a membrana celular fosse arranjada em uma camada com duas moléculas. Para isto realizaram um experimento muito original e aparentemente simples. Quando lípidos são dispersos em água, a parte polar <sup>(hidrofílica)</sup> da molécula se posiciona em contato com a superfície da água e as cadeias hidrocarbonadas, apolares, ficam orientadas aproximadamente em ângulo reto com relação à superfície. A monocamada que se forma pode ser comprimida lateralmente de modo que as moléculas fiquem umas em contato com as outras. Deste modo pode-se avaliar a superfície total de moléculas. Gorter e Grendel mediram a área mínima em preparações com fosfolípidos extraídos de células vermelhas do sangue e compararam a área da superfície da membrana das células. Os autores encontraram uma área de monocamada cerca do dobro da área da membrana superficial das células. Deste experimento puderam postular que na membrana celular as moléculas estariam arranjadas em uma camada dupla.

Mais tarde, Davson e Danielli (1930) estudando o comportamento de fosfolípidos em água concluíram que a configuração energeticamente mais estável seria a bicamada com as terminações polares voltadas para a superfície da água e as partes não-polares das moléculas voltadas umas para as outras. Tal configuração faria célula impermeável à

água e a peritricales carregados como os íons. Na proposta de Davson e Danielli, adicionalmente, uma fina camada de proteínas estabilizaria a bicamada fosfolipídica como no esquema abaixo:



Deu força a este tipo de estrutura o fato de substâncias lipossolúveis atravessarem muito mais rapidamente a membrana do que as não lipossolúveis.

Em torno de 1940 foi possível obter bom rendimento para a invenção de Ruska, E. que lhe conferiu o prêmio Nobel: o microscópio eletrônico. Constituinte grande evolução, desde as primeiras observações de Hooke em meados do século XVII, no entrosamento das estruturas componentes das células. Estava, a partir do microscópio eletrônico, inaugurada a era do estudo da ultraestrutura celular.

Em meados do século XX J. D. Robertson pôde definir o que se denomina de membrana unitária. Ao microscópio eletrônico a membrana se apresenta como uma estrutura trilaminar de aproximadamente 70 Å (7 nm), sendo duas linhas escuras separadas por uma clara. A ideia da bicamada lipídica com cobertura de proteínas evoluiu para o chamado modelo do mosaico fluido de Singer e Nicholson (1972) no qual há a existência de proteínas integrais (intrínsecas) e periféricas (extrínsecas) na membrana. As proteínas periféricas estão associadas às faces interna e externa da membrana mas não se encontram ancoradas a ela. As proteínas integrais são embudadas na membrana podendo penetrar ou não toda sua espessura. O modelo do mosaico fluido passou a ser um modelo mais condizente com estudos funcionais.

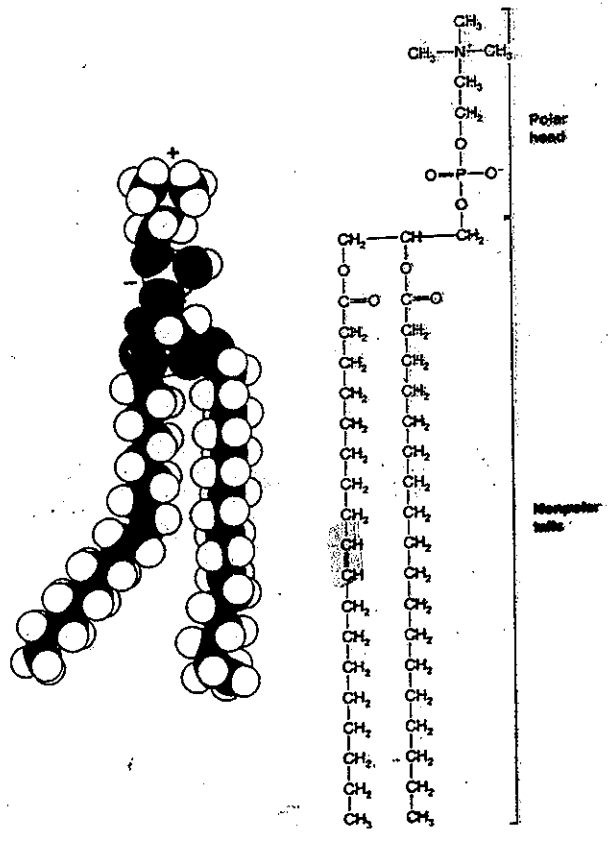
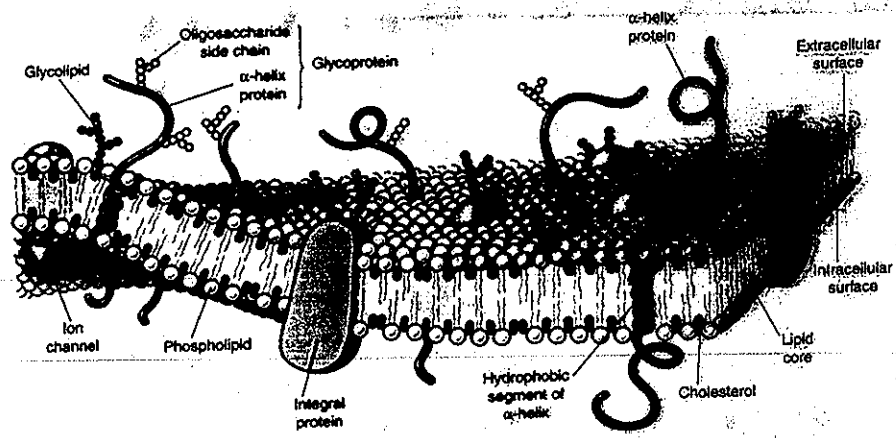
que mostraram, mais tarde, que a membrana seria semi-permeável ao invés de impermeável. As proteínas integrais podem incluir canais iônicos que agem como poros de baixa resistência e bombas ativas (que requerem energia metabólica). Ficou mais fácil de explicar também os fluxos iônicos de modo geral através das membranas e o estabelecimento de gradientes de concentrações transmembranar. De este modo o modelo do mosaico fluido tornou-se universalmente aceito. Um resumo das principais estruturas da membrana celular encontra-se na Figura 3.1 que inclui a fórmula de alguns lipídeos de membrana e dos fosfolipídios da bicamada. Um outro conceito que tem consequências sobre o aspecto funcional da membrana está na sua assimetria. Nem todos os tipos de proteínas periféricas se apresentam nas duas faces interna e externa. Em eritrócitos, por exemplo, a camada lipídica externa é rica em fosfatidilcolina enquanto que a camada em contato com o meio intracelular apresenta maior predominância de lecitina (fosfatidiletanolamina) e fosfatidilserina, esta última carregada negativamente contribuindo para assimetria de cargas fixas dos dois lados da bicamada. Os glicolipídios e glicoproteínas (associação de carboidratos com lipídios ou proteínas, respectivamente) são exclusivos da face externa da bicamada contribuindo também para a assimetria e formação de chamada <sup>gliscidéria</sup> ~~gliscidéria~~. É digno de nota que proteínas periféricas da face interna podem se apresentar ancoradas a filamentos de actina e microtúbulos podendo se locomover pelo mosaico.

As proteínas integrais constituem cerca de 70% das proteínas da membrana plasmática e incluem a maioria das enzimas de membrana, as glicoproteínas responsáveis pelas grupos ABO, Rh e M-N, transportadores, receptores para hormônios e outras moléculas, etc.

[ Análise em Fig 5.3 Janguam + Grenin e Figs 3.1, 3.2 e 3.3 Airdley ]

Ver pag 59 JTC

Fig 3.1



ALGUMAS PROPRIEDADES DA MEMBRANA CELULAR

- Espessura:  $\approx 100 \text{ \AA} = 10 \text{ nm}$
- Resistência:  $1 - 8 \text{ k}\Omega/\text{cm}$
- Capacitância:  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$
- Poros permanentes ou temporários
- Comporta-se como semi-permeável
- Pode ser atravessada por íons e moléculas passivamente ou por transporte ativo
- Constante dielétrica: 5
- Rigidez dielétrica:  $20 \times 10^6 \text{ V/m}$  ( $200.000 \text{ V/cm}$ ) Assumindo espessura da membrana =  $10 \text{ nm}$  e uma ddp de  $100 \text{ mV}$  através da membrana a intensidade do campo elétrico estabelecido seria de

Papel :  $14 \times 10^6 \text{ V/m}$   
 Vácuo :  $\infty$   
 Ar :  $0,2 \times 10^6 \text{ V/m}$   
 Teflon :  $60 \times 10^6 \text{ V/m}$

membrana =  $10 \text{ nm}$  e uma ddp de  $100 \text{ mV}$  através da membrana a intensidade do campo elétrico estabelecido seria de  $10.000.000 \text{ V/m} = 10 \times 10^6 \text{ V/m}$

$1 \text{ V/m} = 1 \text{ V}/100 \text{ cm} = 0,01 \text{ V/cm} \Rightarrow 100 \times 10^3 \text{ V/cm}$

$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$   
 $10 \text{ nm} = 10^{-8} \text{ m}$   
 $\frac{100 \text{ mV}}{10 \text{ nm}} = \frac{0,1 \text{ V}}{10^{-8} \text{ m}} = 10^7 \text{ V/m}$   
 $10.000.000 \text{ V/m}$

O BIOPOTENCIAL

A Fig. 3.2 ilustra o que acontece quando o potencial transmembrana é monitorado com o uso de microeletrodos, em células excitáveis. A referência usada na medição é o meio extracelular. Em to o potencial medido é de zero mV. Em to quando o eletrodo penetra a célula uma ddp através da membrana é registrada. Esta ddp é da ordem de  $100 \text{ mV}$ , negativo dentro com relação ao meio externo. Este potencial é estável e é em repouso, denominado de potencial de repouso. Este é o chamado BIOPOTENCIAL!

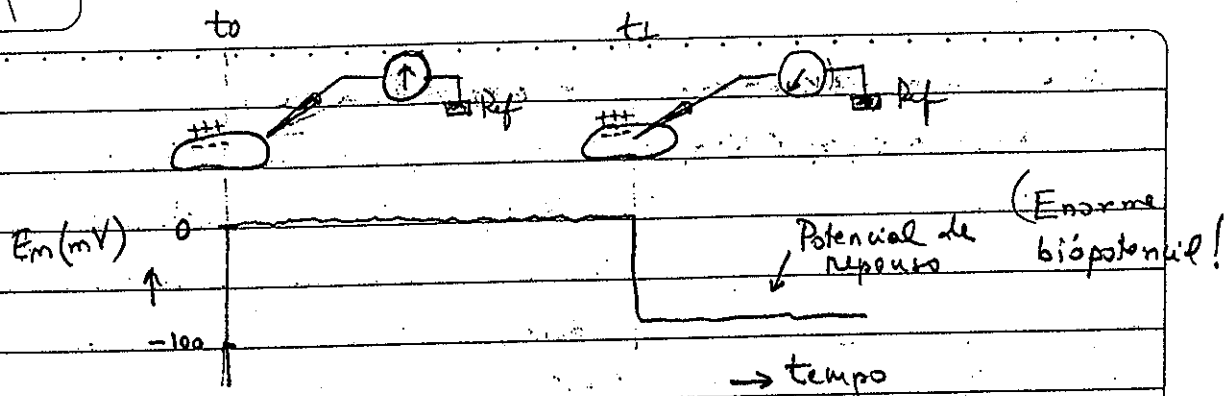


Figura 3.2. Potencial de membrana em repouso. Um microeletrodo usado para medir potenciais da ordem de milivolts é introduzido na célula, através da membrana no instante  $t_1$ . A referência para medição é o meio externo que banha a célula.

Conhecendo a existência deste potencial, de algumas características da membrana celular e sabendo-se que há distribuição assimétrica de íons nos compartimentos intra e extracelular (vide Tabelas 1 e 2), vamos analisar modelos simplificados que possam dar conta da existência do biopotencial.

Tabela 1. Concentrações iônicas nas fibras musculares de rã e no plasma destes animais. Segundo Conway, 1957 como apontado em Aidley, 1997.

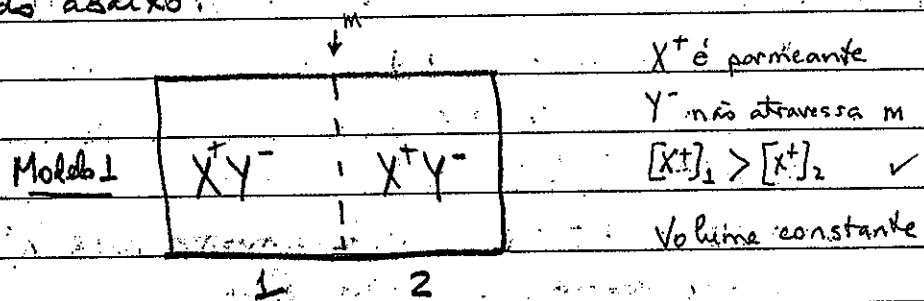
	Concentração no interior das células (mM)	Concentração Plasmática (mM)
$K^+$	124.0	2.25
$Na^+$	10.4	109.0
$Cl^-$	1.5	77.5
$Ca^{2+}$	4.9	2.1
$Mg^{2+}$	14.0	1.25
$HCO_3^-$	12.4	26.6
Anions Orgânicos	ca. 74	ca. 1.3



Tabela 2. Concentrações iônicas no axoplasma de lula e no sangue (simplificado de Hodgkin, 1958 como em Aidley, 1997)

	Concentração no Axoplasma (mM)	Concentração no sangue (mM)
$K^+$	400	20
$Na^+$	50	440
$Cl^-$	40-150	560
$Ca^{2+}$	0,4	10
$Mg^{2+}$	10	54
Isethionate <sup>-</sup>	250	-
Outros ácidos orgânicos	ca. 170	-

Vamos inicialmente considerar o seguinte sistema como descrito abaixo:



Dois compartimentos iguais, com volumes constantes, contendo soluções aquosas de um eletrólito XY em concentrações diferentes. Os compartimentos estão separados por uma membrana semi-permeável que é permeável ao cátion  $X^+$ , mas não, ao ânion  $Y^-$ . A concentração no lado 1 é maior que a concentração do lado 2. Deste modo  $X^+$  tenderá a mover-se a favor do gradiente de concentração de modo que alguma quantidade de  $X^+$  se moverá para o compartimento 2, carregando carga positiva. O movimento de cargas causará uma ddp entre os dois compartimentos.

Equilíbrio será atingido quando o gradiente elétrico (tendendo a mover  $X^+$  de 2 para 1) contra balancear o gradiente de concentração (tendendo mover  $X^+$  de 1  $\rightarrow$  2). A ddp no equilíbrio resulta da diferença de concentração de  $X^+$  e é chamada de potencial de equilíbrio de  $X^+$ .

Vamos agora aplicar a termodinâmica clássica para analisar o fenômeno. Suponha que  $\Delta n$  moles de  $X^+$  estejam para se mover através da membrana contra o gradiente de concentração (ou seja de 2 para 1). Da termodinâmica o trabalho requerido para mover estes  $\Delta n$  moles,  $\Delta W_c$  é dado por:

$$\Delta W_c = \Delta n \cdot RT \ln \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2}$$

onde  $R$  é a constante universal dos gases ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta ( $^{\circ}\text{K}$ ) e  $[ ]$  é a concentração molar de  $X^+$  no lado correspondente. Seria mais correto ~~usar~~ usar a atividade dos íons dos dois lados. Esta simplificação é válida assumindo-se que o coeficiente de atividade seja o mesmo para  $X^+$  em 1 e 2.

Agora considere o trabalho elétrico.  $\Delta W_e$  requerido para que  $\Delta n$  moles de  $X^+$  se movam contra o gradiente elétrico, i.e., de 1 para 2. Isto é dado por

$$\Delta W_e = \Delta n \cdot z F E$$

onde  $z$  é a valência de  $X$ ,  $F$  é a constante de Faraday ( $96500 \text{ C/mol}$ ) e  $E$  é a ddp em volts entre os dois compartimentos (potencial em 2 com relação a 1). No equilíbrio o fluxo resultante é nulo e então:

$$\Delta W_e = \Delta W_c$$

ou

$$\cancel{z} \cdot z \cdot F \cdot E = \cancel{z} \cdot R \cdot T \cdot \ln \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2} \quad \text{e daí!}$$

$$E = \frac{RT}{z \cdot F} \ln \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2} \quad \text{Volts}$$

A equação 1 é conhecida como EQUAÇÃO DE NERNST e é importante para nos ajudar a entender a origem dos biopotenciais em células excitáveis. O potencial E é chamado de potencial de equilíbrio de X<sup>+</sup> (E<sub>X<sup>+</sup></sub>) e pode ser entendido como sendo o potencial (ou ddp) para o qual a membrana vai (ou que se estabelece através da membrana) se esta for permeável apenas a este íon.

Frequentemente, utiliza-se à 18°C a simplificação para log<sub>10</sub> da equação:

$$E = \frac{58}{z} \log_{10} \frac{[X]_1}{[X]_2} \quad \text{com E em milivolts.}$$

QUESTÃO

Se no modelo estribado  $[X]_1 = 10 \times [X]_2$  quais seriam os potenciais de equilíbrio se  $X = K^+$  ou se  $X = Ca^{2+}$ ? E se a membrana fosse permeável ao Y ao invés do X, ou seja, ao Cl<sup>-</sup> no caso do KCl e ao SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> em outro sal?

$E = \frac{58}{z} \log_{10} \frac{10 \times 2}{2} = \frac{58}{z} \text{ mV}$  Para o K<sup>+</sup>, E<sub>K</sub> = 58 mV. No caso da Ca<sup>2+</sup>, com z=2, E<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> =  $\frac{58}{2} = 29 \text{ mV}$ .

Se Y = Cl<sup>-</sup> ⇒ E<sub>Cl<sup>-</sup></sub> =  $\frac{58}{-1} = -58 \text{ mV}$  e Y = SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ⇒ E<sub>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></sub> =  $\frac{58}{-2} = -29 \text{ mV}$ .

0,79x

$8,6 \times 10^3 \mu m^2 \rightarrow$

$1 \mu m \rightarrow 10^{-3} mm \rightarrow 10^{-6} m$  27

$\rightarrow 10^{-4} cm \quad 10^{-4} \times 10^{-4} = 10^{-8} m^2$



$1 \mu m^2 = 1 \mu m \times 1 \mu m$

Uma pergunta importante a ser feita em seguida é: quantos íons precisam atravessar a membrana para que um determinado potencial se estabeleça? A resposta depende da valência do íon, do valor do potencial e da capacitância da membrana.

Vamos considerar que a membrana tenha a capacitância típica, como vimos anteriormente, de  $1 \mu F/cm^2$  e que a ddp seja de 70 mV. Deste modo a carga em  $1 cm^2$  é dada por:

$Q = CV$

$V = \frac{F}{C} \frac{CV}{ZF} \frac{z}{F} \frac{mol}{cm^2}$

onde Q é medido em Coulombs, C em Farad e V em Volts. O nº de moles de X que se moverá através da membrana será

$CV / zF$

1 mol de cargas eliminadas...  $6,22 \times 10^{23} \times 1,6 \times 10^{19} = 10^{43} \text{ C/mol}$  (parton ou ion monovalente  $1e, 1e$ )

Veja Fator 4

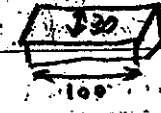
onde z é a valência do íon e F a constante de Faraday. Neste caso se X é monovalente

$\frac{C}{1 \mu F} \frac{V}{70 mV}$

$\frac{CV}{zF} = \frac{10^{-6} \times 7 \times 10^{-2}}{(1) \times 96500 C/mol} = 6,8 \times 10^{-13} \text{ moles/cm}^2$   
 $\approx 0,7 \text{ pmol/cm}^2$

Esta é uma quantidade bastante pequena. Este dado será muito útil para entendimento posterior, da teoria iônica e geração do chamado potencial de ação.

Exercício: 1) Calcule a quantidade de íons de  $Na^+$  que entram em uma célula cardíaca durante o PA. ← Para mais tarde!!

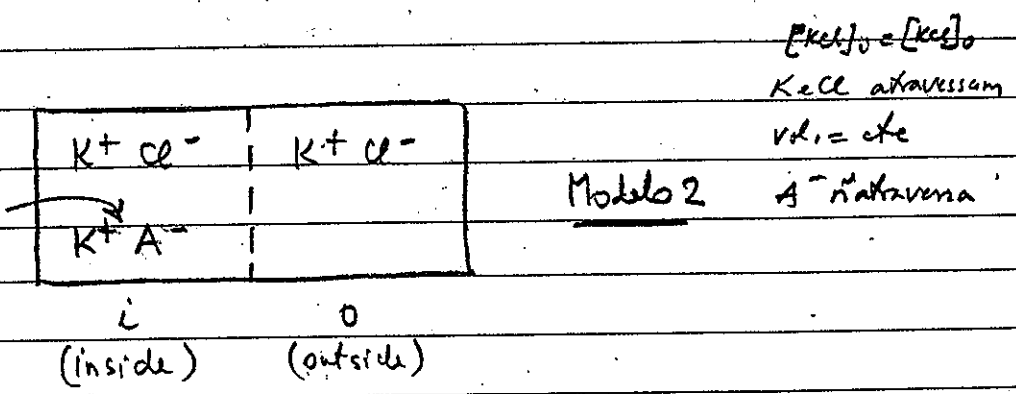
2) Calcule a quantidade de íons  $Na^+$  para que 70 mV se estabeleçam em uma célula cardíaca (considere a célula como membrana semi-permeável com a seguinte geometria:  e dimensões em  $\mu m$ ).

109  
105

Como vimos anteriormente (Tabelas 1 e 2) há assimetria de concentrações de íons individuais através da membrana das células nervosas e musculares. Estes dados foram obtidos por fotometria ou com o uso de métodos radioativos em meados de século XX. Vamos tentar evoluir, agora, para um modelo que pudesse dar conta da ddps através da membrana das células. Vamos nos deparar com a necessidade de explicar, em algum momento, como estas diferenças de concentrações se estabelecem e são mantidas. Já que mesmo com um modelo simples, como analisado até agora, poderíamos calcular ddps geradas por espécies iônicas como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e outras.

MODELO EM EQUILÍBRIO DE DONNAN

Pensemos em um sistema que se aproxime mais um pouco das células vivas. Neste caso, vamos usar a informações das concentrações iônicas e considerar o conjunto de dois compartimentos como a seguir:



Admissões e condições iniciais

1. KCl se encontra na mesma concentração nos volumes em  $i$  e  $o$ ;
2.  $K^+$  e  $Cl^-$  podem atravessar a membrana;
3. O sistema mantém volume constante, não havendo portanto fluxo de água entre os compartimentos;

A partir destas condições uma certa quantidade de um sal  $K^+ A^-$  é adicionada do lado  $i$  (dentro). Adiciona-se uma premissa  
4.  $A^-$  não atravessa a membrana (a membrana é impermeável a  $A^-$ ).

e portanto é uma membrana semi-permeável como anteriormente.

Deste modo teríamos:

$$[K^+]_i > [K^+]_o$$

e  $K^+$  iria se mover de  $i$  para  $o$ . O nº de cargas positivas e negativas seria igual em  $i$  e  $o$  (neutralidade elétrica), íons cloreto iriam se

mover de  $i \rightarrow o$  mantendo a neutralidade. Agora, desde que:

$[K^+]_i \neq [K^+]_o$  e  $[Cl^-]_i \neq [Cl^-]_o$  aparecerá uma ddp entre os compartimentos e pela equação de Nernst:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

$$E_{Cl} = \frac{RT}{-F} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

onde  $E_K$  e  $E_{Cl}$  são os potenciais de equilíbrio das ions  $K^+$  e  $Cl^-$ , respectivamente. Na condição de equilíbrio do sistema:

$$E_K = E_{Cl}$$

$$\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = \frac{RT}{-F} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

$$\ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = - \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

$$\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o}$$

ou seja

$$[K^+]_i \times [Cl^-]_i = [K^+]_o \times [Cl^-]_o$$

Esta igualdade é conhecida como regra de DONNAN que diz: "O produto das concentrações dos íons difusíveis num compartimento é igual ao produto das concentrações dos íons difusíveis no outro compartimento, na condição de equilíbrio"

Desta forma, a existência de íons não permeantes de um lado (i) resulta em desigualdade nos íons difusíveis  $K^+$  e  $Cl^-$  (no caso).

Aplicando a condição de neutralidade elétrica em cada compartimento resultaria:

$$[K^+]_o = [Cl^-]_o$$

e

$$[K^+]_i > [Cl^-]_i$$

mas

$$[K^+]_i \times [Cl^-]_i = [K^+]_o \times [Cl^-]_o$$

então

$$[K^+]_i + [Cl^-]_i > [K^+]_o + [Cl^-]_o$$

$$[K^+]_i + [Cl^-]_i + [A^-]_i > [K^+]_o + [Cl^-]_o$$

Definitivamente a concentração em i é maior que em o. Se a restrição de volume constante fosse retirada, água iria se mover de o para i até que  $[A^-]$  fosse infinitesimal,  $KCl$  iria se mover de o para i, o equilíbrio de Donnan seria perturbado e no final as concentrações se igualariam em todo o sistema levando à dissipação da  $\Delta\psi$ . Em outras palavras este sistema não se aplica às células para as quais a condição de volume constante é muito forte. Este sistema não estaria, como as células, em equilíbrio osmótico mesmo sem a condição de volume constante.

↑  
aparentemente

As ser retirada a condição de volume constante o sistema tenderia ao equilíbrio osmótico em detrimento do equilíbrio de Donnan e dissipação das diferenças de concentração dos íons permeantes.

Consideremos agora um sistema semelhante ao anterior, no qual a membrana seja impermeável ao íon  $\text{Na}^+$  e resta  $\text{NaCl}$  e é adicionado do lado externo (compartimento 0). Potássio e cloreto irão se mover até que o equilíbrio de Donnan seja estabelecido, i.e., até que:

$$[\text{K}^+]_i \times [\text{Cl}^-]_i = [\text{K}^+]_o \times [\text{Cl}^-]_o$$

$\text{K}^+ \text{Cl}^-$	$\text{K}^+ \text{Cl}^-$
$\text{K}^+ \text{A}^-$	$\text{Na}^+ \text{Cl}^-$
i	o

Modelo 3.

Nesta configuração

$$[\text{K}^+]_o < [\text{Cl}^-]_o$$

assim, sem a restrição de volume <sup>constante</sup>, para quantidade adequada de  $\text{NaCl}$ , é possível que o sistema se estabilize em equilíbrio de Donnan e equilíbrio osmótico ao mesmo tempo. O aspecto osmótico do ânion não difusível é contrabalaneado pelo íon não difusível ( $\text{Na}^+$ ) do lado o.

Um sistema como este poderia dar conta de explicar as desigualdades iônicas vistas em células nervosas e musculares. maior  $[\text{K}^+]_i$  e maior  $[\text{Na}^+]_o$ . Se o que foi assumido no desenvolvimento do modelo for correto deveria ser possível demonstrar que  $[\text{K}^+] \times [\text{Cl}^-]$  é igual dentro e fora de células após equilíbrio em várias condições de concentração dos íons. Isto foi feito por Boyle e Conway (1942) colocando células de músculo de rã em solução com várias concentrações de  $\text{KCl}$  por 24 horas, determinando depois  $[\text{K}^+]_i$  e  $[\text{Cl}^-]_i$  como apresentado na Tabela 3 onde se exprimem também os produtos  $[\text{K}^+]_i \cdot [\text{Cl}^-]_i$ .



Tabela 3: Concentrações intracelulares de  $K^+$  e  $Cl^-$  no músculo de rã após equilíbrio por 24 horas, a  $2-3^\circ C$ , com soluções de KCl de diferentes concentrações. (Boyle e Conway, 1942)

$[K]_o$	$[Cl]_o$	$[K]_i$	$[Cl]_i$	$[K]_o \times [Cl]_o$	$[K]_i \times [Cl]_i$	$\frac{[K]_o \times [Cl]_o}{[K]_i \times [Cl]_i}$
(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	$10^{-3}$	$10^{-3}$	
3	179	91	7.2	0.24	0.68	0.36
6	82	92	7.2	0.49	0.66	0.74
12	88	101	9.9	1.05	1.00	1.05
18	94	107	16.1	1.69	1.72	0.98
30	106	120	24.9	3.18	2.99	1.06
60	136	142	60.6	8.16	8.61	0.94
90	166	184	86.0	14.9	15.8	0.94
120	196	212	144.2	23.5	24.2	0.97
150	226	240	143.1	33.9	34.4	0.99
210	286	282	186.7	60.0	52.8	1.14
300	376	353	308	112.8	118.7	1.05

Média 1.01

É evidente que em média os experimentos confirmam a hipótese do equilíbrio de Donnan, mas não para concentrações abaixo de 10 mM. É importante ressaltar que as condições estabelecidas para o Modelo 3 colocam o sistema em equilíbrio de Donnan e Osmótico e assim, retirada a condição forte de volume constante ainda dá conta de replicar as concentrações nas células. Voltaremos na questão do teste da condição de Donnan para concentrações menores que 10 mM mais tarde.

A questão que devemos apresentar agora é quanto a <sup>nova</sup> premissa de que a célula seja impermeável ao íon  $Na^+$ . Há  $Na^+$  nas células (Tabela 2 e 3). Curiosamente a concentração é cerca de 10 vezes menor dentro do que fora das células, então se as células de alguma forma captam  $Na^+$  por outro lado, de algum modo mantém a concentração interna baixa <sup>devido a atividade</sup> em relação ao meio externo. Isto requer o transporte do  $Na^+$  contra

Um grande gradiente de concentração e portanto requer <sup>o gasto</sup> energia metabólica. Deve haver alguma espécie de bomba de  $\text{Na}^+$  que em meados do século XXI precisava ser provada existir nas membranas de células nervosas e musculares.

TRANSPORTE ATIVO DE ÍONS

SÓDIO

Vamos analisar experimentos realizados por Hodgkin e Keynes em 1955 sobre a extrusão de sódio no axônio gigante de lula. A Figura 3.3 ilustra a montagem experimental usada pelos pesquisadores

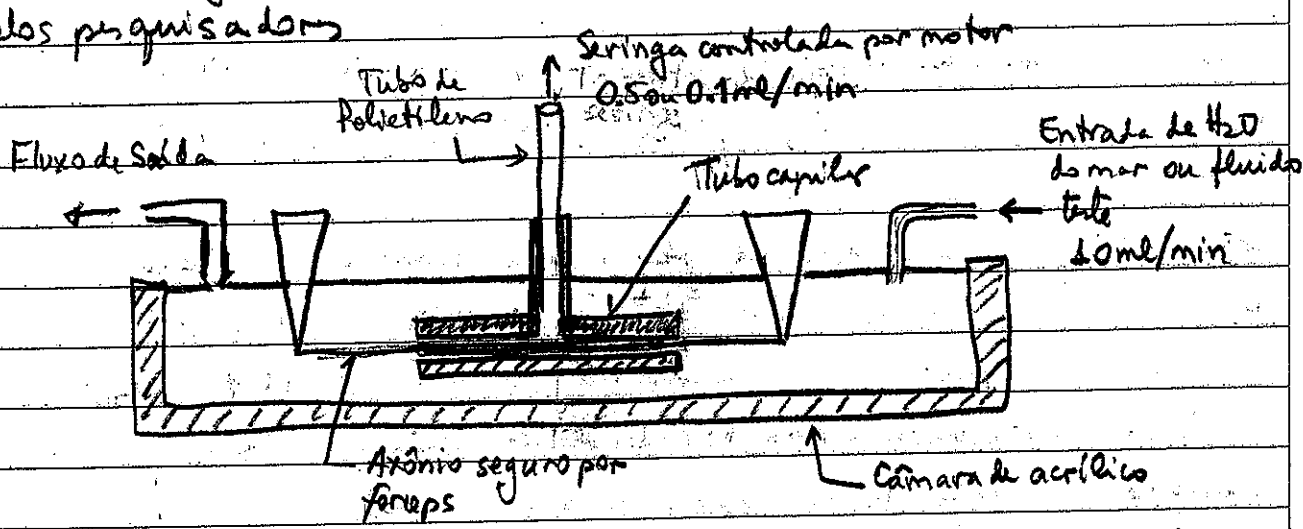


Figura 3.3 Aparato usado para medir efluxo de  $\text{Na}^+$  relativo de axônio gigante de Sepia (Hodgkin e Keynes, 1955).

Um axônio era colocado em água do mar contendo um isótopo radioativo de sódio ( $^{24}\text{Na}^+$ ) e estimulado repetitivamente por algum tempo para, <sup>superfornar</sup> se carregar com  $^{24}\text{Na}^+$ . Em seguida o axônio era colocado no tubo capilar como mostrado na figura 3.3, perfundido por água do mar com  $^{24}\text{Na}^+$ . Em instantes pré-definidos amostras eram retiradas por meio da sucção no tubo de polietileno controlada por motor. Destas amostras foram medidas as contagens por minuto e construído o gráfico da Figura 3.4. Em certa fase dos experimentos o inibidor metabólico Dinitrofenil (DNP) foi administrado

x falar sobre a lula.

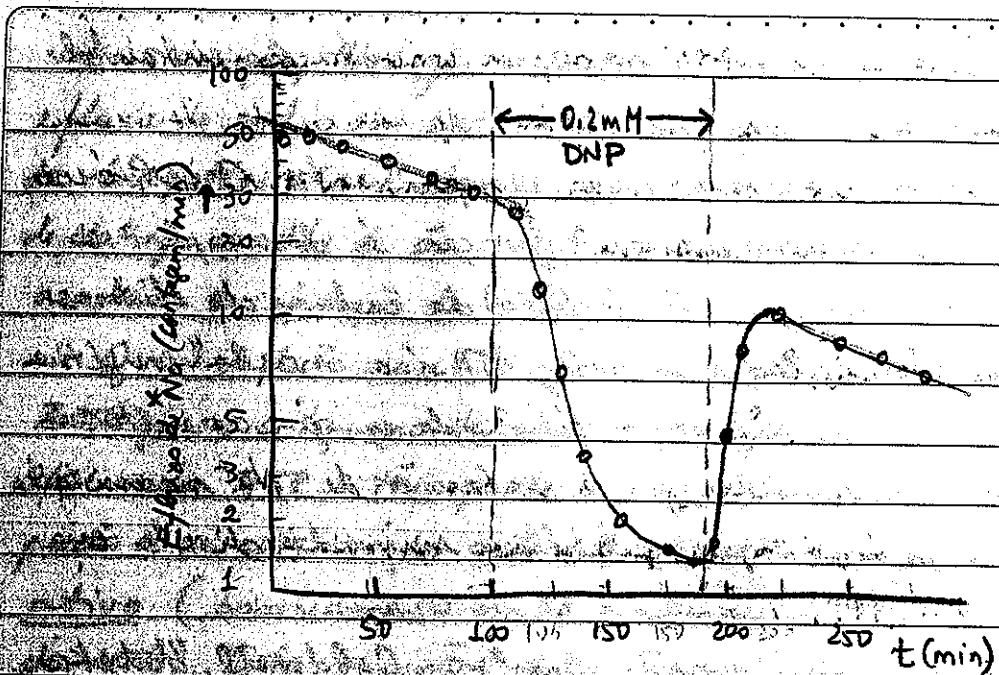


Figura 3.4. Efeito do inibidor metabólico, 2,4-dinitrofenol (DNP) sobre o efluxo de sódio radioativo do axônio gigante de Sepia. (Hodgkin + Keynes, 1955).

... e posteriormente lavado da preparação. O primeiro resultado interessante é que o axônio captou eficientemente  $^{22}Na^+$  com a estimulação. O efluxo é registrado pela queda progressiva e exponencial (linear em escala semi-log) da contagem, como acontece até cerca de 100 minutos.  $^{22}Na^+$  (e conseqüentemente  $Na^+$  está sendo transferido para fora contra gradiente de concentração!). Quando o inibidor metabólico DNP é colocado, o efluxo cai dramaticamente ( $Na^+$  parece não ser transferido para fora e portanto não é encontrado na amostra). Ao ser lavado o inibidor, o efluxo é retomado na mesma taxa anterior. A carga de sódio será tratada mais adiante, mas já é possível adiantar que a atividade produzida pela estimulação implica na entrada do íon. É interessante pensar neste ponto a estabilidade osmótica fica comprometida com o movimento de íons para dentro da célula, mas não parece haver mecanismos de antídoto pelos telômeros 1 e 2 de que outra hipótese seria possível neste papel. Fica por enquanto a questão: como a natureza fez para usar o NaCl externo como estabilizador osmótico e eventualmente permitir que  $Na^+$  entre nas células e

as mesmo tempo fica 10 vezes menor a concentração intracelular que a extracelular deste íon?

Por hora vamos continuar com os experimentos. O DNP é um inibidor metabólico e sua principal função é desacoplar a formação de ATP (Adenosina Tri-fosfato) da cadeia de elétrons na respiração aeróbica. Como se sabe, ATP é a "moeda" energética das células e portanto ao privar a célula de energia a extrusão foi inibida, assim indicando que a extrusão de  $\text{Na}^+$  necessitaria ou seria dependente de energia metabólica suprida direta ou indiretamente pelo ATP.

Para ir mais a fundo neste questiono Caldwell, Hodgkin, Keynes e Shaw (1960) mostraram que a injeção na célula de compostos fosfatados, ATP, fosfato de arginina, etc produziam um aumento transiente do efluxo de sódio (Figura 3.5) em axônios.

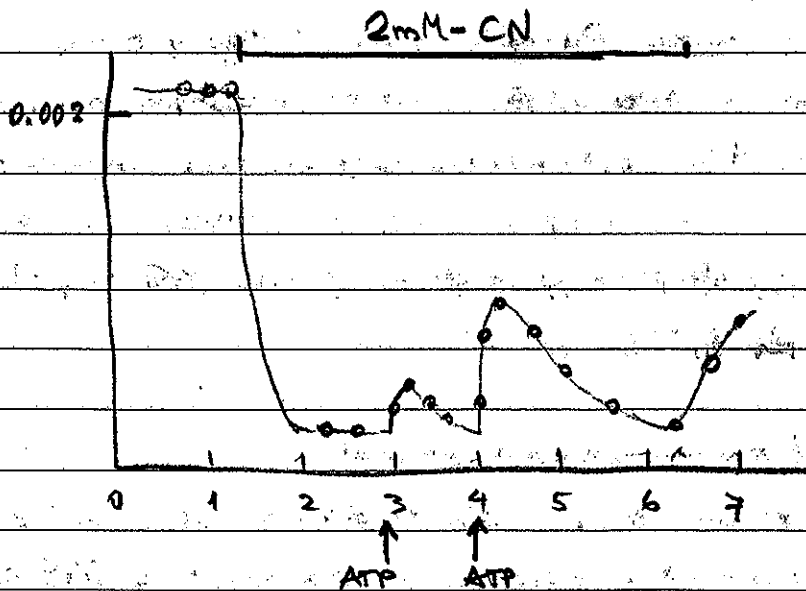


Figura 3.5 Efeito da injeção de ATP sobre o efluxo de  $\text{Na}^+$  em axônios de *Sepia* envenenados com cianeto (CN). Mais ATP foi introduzido com a segunda injeção, comparado à primeira (Caldwell et al., 1960).

Em adição, Hodgkin & Keynes ( ) mostraram também que o efluxo de  $\text{Na}^+$  em axônios é dependente da concentração externa de íons potássio ( $\text{K}^+$ ). Uma solução externa sem  $\text{K}^+$  reduziu o efluxo de  $\text{Na}^+$  para 1/3 de seu valor. — A estrutura ativa de  $\text{Na}^+$  estaria acoplada a captação de  $\text{K}^+$  —

O CN depleta irreversivelmente a energia metabólica, falta ATP para o transporte e portanto efluxo de  $\text{Na}^+$  cai drasticamente. Operando ATP o transporte é recuperado, mostrando a sua participação e caracterizando o transporte como um possível bombeamento ativo (bombeamento contra gradiente de concentração usando energia do ATP). Este transporte ativo foi postulada ser uma ATPase de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ . Uma bomba,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase foi isolada por Skou (1957).

A ouabaina, um glicosídeo retirado de plantas, é usado como veneno em regiões da África. Este glicosídeo bloqueia a ação da bomba de  $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$ . Utilizando ouabaina marcada e assumindo ligação 1:1 com a bomba, Baker & Willis (1972) estimaram que existam de 1000 a 5000 sítios (bombas)/ $\text{cm}^2$  de membrana e Richie & Straub (1975) estimaram que no nervo olfatório do tubarão existam 350 sítios/ $\mu\text{m}^2$ . Estas bombas, como a maioria das estruturas de transporte de membrana são em princípio proteínas integrais da bicamada.

### NATUREZA ELETROGÊNICA DA BOMBA DE $\text{Na}^+$

Se o movimento de um íon não estiver acoplado a um contra-íon haverá produção de corrente e o transporte é denominado de transporte eletrogênico. Thomas (1969) desenvolveu uma técnica para avaliação da eletrogenicidade da bomba em células nervosas. O pesquisador injetou  $\text{Na}^+$  dentro do corpo celular de neurônios, utilizando um par de eletrodos, um deles preenchido com uma solução de acetato de  $\text{Na}^+$ . Os íons migraram de um eletrodo

para o outro, dentro da célula, pela passagem de corrente elétrica (carga iônica) e assim carregando a célula. Um tucuro microeletrodo registrava o potencial de membrana. A injeção de  $Na^+$  produziu uma variação do potencial de membrana para valores mais negativos (Figura 3.6) de cerca de 15 mV, após o que o potencial de membrana retornava para o valor de repouso (em cerca de 10 minutos). Quando a injeção foi feita após

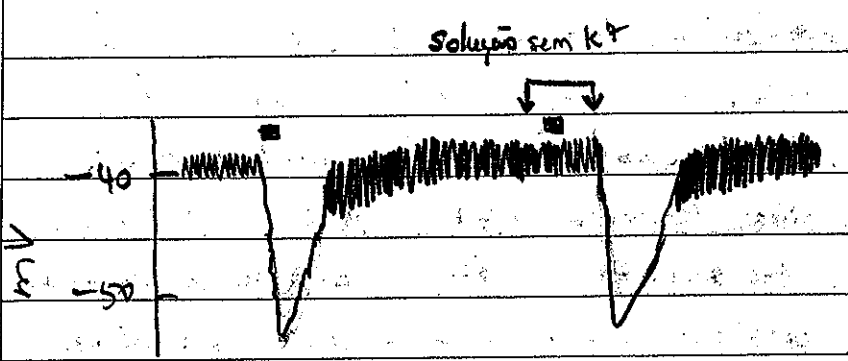
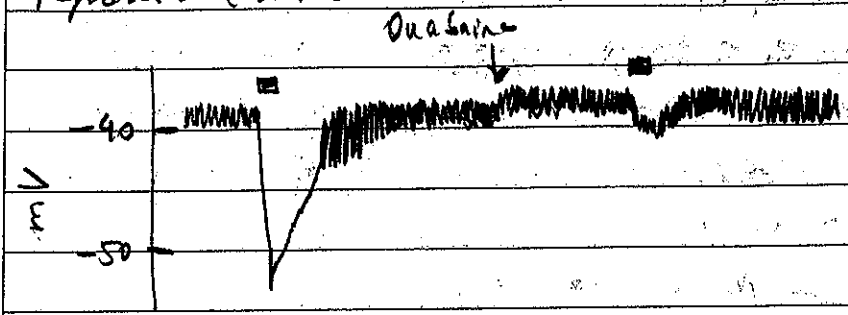


Figura 3.6 Respostas de neurônio de snail à injeções de íons  $Na^+$  demonstrando a natureza eletrogênica da bomba, a inibição com o inibidor de ATPase ouabaina e a dependência da existência de  $K^+$  no banho externo para o bombeamento.

tratamento com ouabaina (traço superior, seta e segunda barra) não houve modificação de  $E_m$ . No traço inferior após injeção controlada, nova injeção é feita na ausência de  $K^+$  no meio externo. Neste caso também não houve resposta mostrando que a variação do potencial estava acoplada ao transporte de  $K^+$  para dentro da célula. 0.

retorno da relação com  $K^+$  possibilitou a ocorrência da variação de  $E_m$  como no caso controle. A questão que se apresenta é então quantos íons são transportados. Se a variação para potenciais mais negativos de  $E_m$  for causada pela saída de  $Na^+$  acoplada a entrada de  $K^+$  então deveria sair mais  $Na^+$  do que entrar  $K^+$ . Mais tarde, utilizando a técnica denominada de fixação de tensão (ou voltage clamp) Thomas integrou a corrente em relação ao tempo e estimou a quantidade de carga transferida. O autor verificou ainda que a carga medida era muito menor que a quantidade de  $Na^+$  injetada e que todo sódio injetado era transferido para fora (medido com eletrodo sensível a íon. Estes produzem tensão proporcional a concentração do íon medido). Isto indicou que o efluxo de  $Na^+$  era parcialmente contrabalanceado pelo influxo de outro cátion, o  $K^+$ . Nos experimentos de Thomas a injeção de  $Na^+$  mostrava uma corrente de saída que durava cerca de 10 minutos para voltar a zero. Esta foi a corrente integrada pelo pesquisador nos experimentos de voltage-clamp que veremos mais tarde permitir medidas precisas da corrente que flui através de toda a célula para um pré-fixador de potencial. Os cálculos de Thomas levaram a estimativa de que o fluxo resultante no bombeamento de 27% de transferência de  $Na^+$ , ou seja, cerca de 3  $Na^+$  para cada 2  $K^+$ .

CLORETO

Verificou-se também (Keynes, 1963) que além do fluxo de  $Na^+$  acoplado ao  $K^+$ , no axônio de Lula deveria existir um bombeamento ativo de cloreto ( $Cl^-$ ). Sabendo-se que

$$E_{Cl} = \frac{RT}{-F} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i} \text{ e que } E_m \approx -60 \text{ mV no}$$

axônio isolado poderíamos calcular  $[Cl^-]_i$  como:

$$-60 = -58 \log_{10} \frac{560}{[Cl^-]_i} \Rightarrow [Cl^-]_i = 55 \text{ mM}$$

Contudo, o valor medido foi de 108 mM que é aproximadamente o dobro do previsto pela equação de Nernst. Duas hipóteses podem ser levantadas: 1)  $\text{Cl}^-$  em contra-se ligada dentro das células ou 2)  $\text{K}^+$  bombeamento ativo de  $\text{Cl}^-$ . Medidas da atividade do  $\text{Cl}^-$  (com eletrodos sensíveis a íons) mostraram que o coeficiente de atividade do  $\text{Cl}^-$  é igual dentro e fora da célula. Isto indica que pouco  $\text{Cl}^-$  passa estar ligada no meio intracelular. Além disso o influxo de  $\text{Cl}^-$  é reduzido à metade na presença de DNP mostrando a ideia de captação ativa.

## Cálcio

A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no axoplasma é baixa, cerca de 400  $\mu\text{M}$ . Ao contrário do  $\text{K}^+$ , uma grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  encontra-se ligada a diversos sítios de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  na forma, portanto, não-iônica (Baker e Crawford, 1972). Usando como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteína avarina, que emite luz na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , foi possível mostrar que a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é da ordem de 100 nM. O gradiente para entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  é bastante grande ( $[\text{Ca}^{2+}]_o \approx 10.000 \times [\text{Ca}^{2+}]_i$ ). O influxo seria balanceado com a extrusão ativa do íon (Baker, 1976). Há também bombeamento similar de  $\text{Mg}^{2+}$ . Já se chamara a atenção para o fato de que a baixa concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e a capacidade da célula animal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  caracterizaria o íon com um importante "trigger" fisiológico. A liberação de apenas 1% do  $\text{Ca}^{2+}$  ligada no axoplasma de lula, iria aumentar  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de 40 vezes, ou seja de 0,1 para 4  $\mu\text{M}$ . Veremos mais tarde que este trigger é de fundamental importância.



para a liberação de substâncias neurotransmissoras na sinapse (ligação entre células nervosas) e no início da contração muscular. Mais tarde se explicou melhor o grande papel do íon na contração muscular cardíaca e esquelética desde a atividade elétrica até o controle da geração de força e durante o processo de acoplamento excitação-contracção. Não só se confirmou a existência de uma ATPase de  $Ca^{2+}$  de membrana para extrusão de  $Ca^{2+}$  como também a existência de outros tipos de transportadores (e.g. mecanismo de troca  $Na/Ca$  cuja função no músculo cardíaco é de grande importância no processo de relaxamento).

A Figura 3.7 mostra um resumo de alguns transportadores iônicos de membrana que correspondem a transportes ativos.

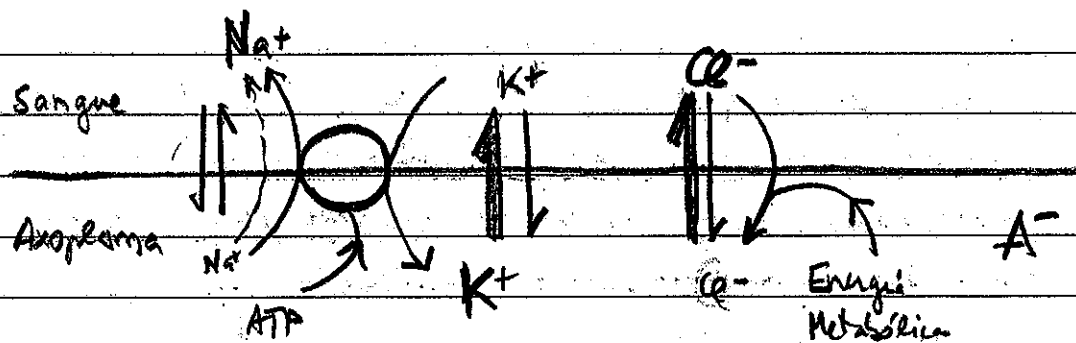


Figura 3.7 Representação esquemática do movimento dos principais íons monovalentes através da membrana de axônio gigante de squid, na condição de repouso. Linhas cheias <sup>retas</sup> representam fluxos passivos e as curvas são transportes ativos. Tamanho dos símbolos lembram as concentrações relativas (Katz, 1975).

## O POTENCIAL DE REPOUSO ( $E_R$ )

Vimos que a célula pode exibir uma  $\Delta\psi$  através da membrana gerada pelos íons difusíveis e calculada pela equação de Nernst (pelo menos quando se pensa em cada íon separadamente). Se  $\text{Na}^+$  não entra na célula o sistema, com as diferenças de concentrações apresentadas (Tabela 1 e 2) fica em equilíbrio de Donnan e Osmótico. Sabemos que  $\text{Na}^+$  entra nas células, mas o transporte ativo der conta de manter  $[\text{Na}^+]_i$  tão baixo quanto necessário, então tudo estaria resolvido. Isso implica que a membrana deve ser praticamente impermeável ao  $\text{Na}^+$  no repouso, mudar esta permeabilidade durante a atividade, período em que a bomba deria conta de jogar para fora o  $\text{Na}^+$  que entrou, e pronto. Como agora entender o nível do potencial de membrana em repouso? Vamos primeiro, calcular o potencial de equilíbrio de alguns íons, rever o conceito de potencial de equilíbrio e daí buscar uma explicação.

$$E_{\text{Na}^+} = 58 \log \frac{109.0}{10.4} = 59.2 \text{ mV}$$

$$E_{\text{K}^+} = 58 \log \frac{2.5}{124} = -98.3 \text{ mV}$$

$$E_{\text{Cl}^-} = -58 \log \frac{77.5}{1.5} = -99.4 \text{ mV}$$

Sabendo-se que  $E_m$  fica, em repouso por volta de  $-60 \text{ mV}$  a pergunta é: Qual íon deve influenciar mais para o estabelecimento de  $E_R$ ? Qual a razão da pergunta?

A razão desta questão está no conceito de potencial de equilíbrio: é o potencial para o qual a membrana não se for permeável ao íon em

questão. Para vários íons, se considerarmos o comportamento dos íons como independentes, o potencial de Nernst pode ser calculado para cada íon e o potencial de membrana ficará mais próximo do potencial de equilíbrio do íon ao qual a membrana for mais permeável.

Muito bem, o potencial de repouso está próximo ao potencial de equilíbrio das ions  $K^+$  e  $Cl^-$ . Qual seria então o principal determinante de  $E_R$ ?

A concentração intracelular de cloreto é baixa. Sendo assim, pequenas variações poderiam alterar o potencial de repouso, o que não aconteceria no caso do íon  $K^+$ . De modo,  $K^+$  parecia ser o candidato mais forte. No entanto, era preciso mostrar de algum modo que  $E_R$  "seguiria" a  $E_K$  ou  $E_{Cl}$ . A figura 3.8 ilustra experimentos realizados com variação de cerca de 4x na concentração extracelular de  $K^+$  ou  $Cl^-$  em fibra muscular isolada de  $Ra$ .

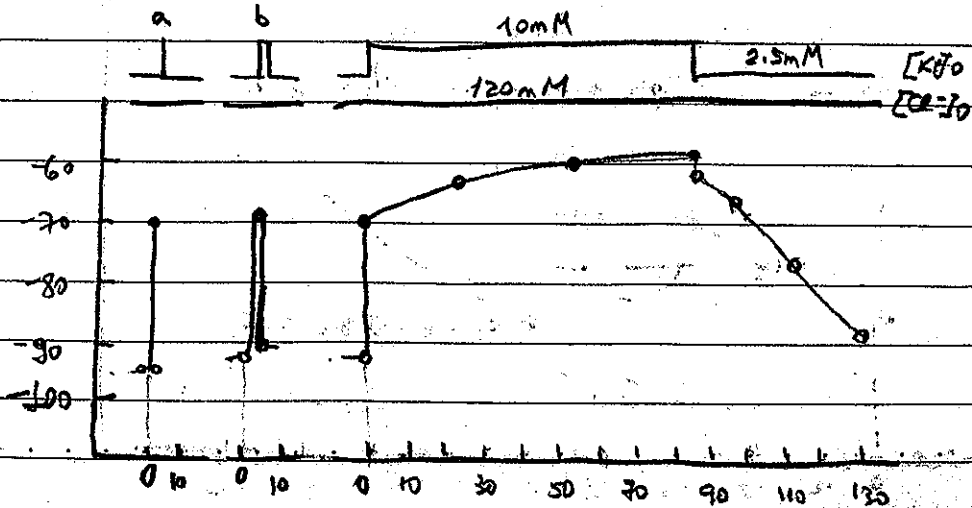
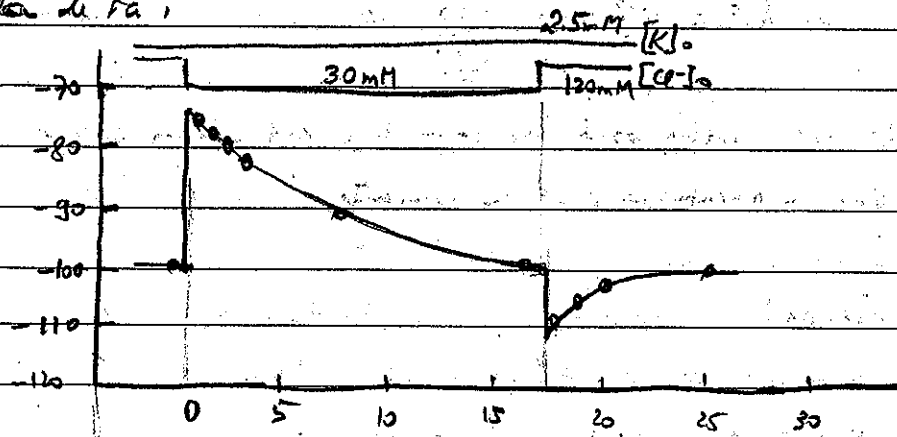


Figura 3.8. Efeito da redução rápida de  $[Cl^-]_o$  e de mudanças na  $[K^+]_o$  sobre o potencial de membrana de fibra muscular isolada de rã (Hodgkin + Horowitz, 1959).

A primeira coisa a ser notada destes experimentos é que a mudança na concentração externa dos íons efetivamente faz variar  $E_m$ . Contudo, o mais importante é a natureza da resposta. No caso do  $Cl^-$  a resposta ao degrau é transitória. Mantido o novo nível de  $[Cl^-]_o$ ,  $E_m$  retorna para os valores iniciais, antes da mudança. No caso do  $K^+$  a resposta de  $E_m$  é bem diferente. Variações rápidas de  $E_m$  são registradas para variações rápidas de  $[K^+]_o$ . A resposta a uma variação mantida de  $[K^+]_o$  é uma variação de  $E_m$  que se mantém até que  $[K^+]_o$  retorne aos níveis iniciais.

Os resultados destes experimentos indicam claramente que o íon  $K^+$  esteja mais diretamente ligado ao estabelecimento de  $E_m$ . Deste modo, a 18°C,

$$E_m = 58 \log \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

O melhor método para testar esta hipótese é variar  $[K^+]_o$  e observar as mudanças do potencial de membrana. Se a concentração interna de  $K^+$  não se alterar, o potencial variará com  $\log \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$  conforme uma reta com inclinação 58 mV/unidade de aumento de  $\log_{10} [K^+]_o$ . Considera-se como premissa que o potencial de  $Cl^-$  não esteja influenciado. Isto pode ser conseguido eliminando o  $Cl^-$ , trocado por sulfatos. A Figura 3.9 mostra as variações de  $E_m$  causadas por mudanças em  $[K^+]_o$  em músculo sartório de rã. Este experimento caracteriza o que se denomina eletrodo de  $K^+$ .

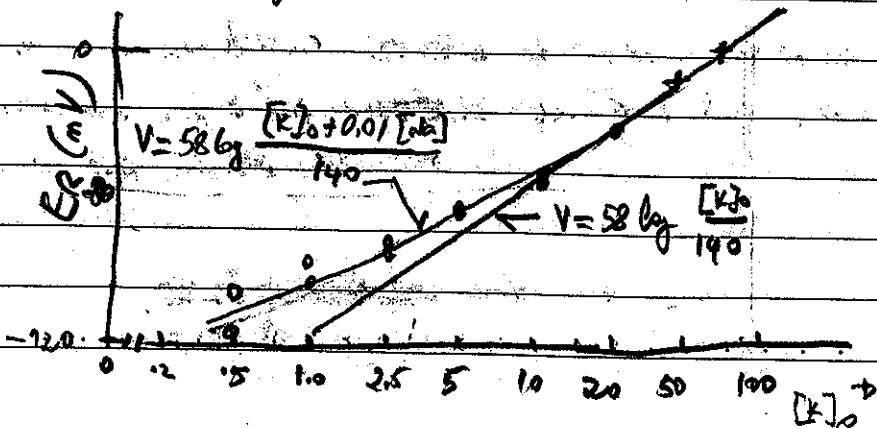


Figura 3.9 Efeito da concentração externa de K sobre o potencial de membrana de fibras musculares isoladas de rã. A solução interna não contém  $Cl^-$  que foi substituído por sulfato (Hodgkin + Horowitz, 1959).

Os dados experimentais confirmam o modelo teórico para  $[K]_o$  maiores que 10 mM. Abaixo deste valor  $E_m$  é menor (menos negativo) que o esperado. Qual seria a razão para este fato? A membrana não é totalmente impermeável aos íons  $Na^+$  e deste modo  $Na^+$  participa da geração de  $E_m$ . Uma abordagem conhecida por teoria do campo constante foi desenvolvida anteriormente por Goldman (1943). Nesta teoria assume-se que íons se movem através da membrana sob a influência de dois gradientes, o elétrico e o de concentração. O gradiente através da membrana seria constante. A partir destas premissas foi possível mostrar (Hodgkin + Katz, 1949) que, quando não há fluxo resultante de corrente na membrana, o potencial de membrana é dado por:

$$E = \frac{RT}{F} \log \frac{P_K [K]_o + P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o}$$

onde  $P_K, P_{Na}$  e  $P_{Cl}$  são os coeficientes de permeabilidade da membrana aos íons, respectivos. Estes coeficientes são medidos em cm/s e definidos como

$$\mu \beta RT / a F$$

onde,  $\beta$  é o coeficiente de partição entre a membrana e a solução aquecida.

$\mu$  é a mobilidade do íon na membrana,  $a$  é a espessura da membrana,  $R, T$  e  $F$  as constantes já definidas anteriormente.

Se os íons cloreto forem eliminados ou se for assumido que  $E_{Cl}$  é igual ao  $E_m$  então:

$$E = \frac{RT}{F} \log \frac{[K]_o + \alpha [Na]_o}{[K]_i + \alpha [Na]_i}$$

onde  $d = \frac{P_{Na}}{P_K}$ . Na Figura 3, 9 a equação acima é plotada

com  $d = 0.01$  e neste caso ajusta-se bem aos dados experimentais. Isto significa que o íon Na<sup>+</sup> tem uma pequena participação, mas esta é maior quando a  $E_{Na}$  é pequena e deste modo uma tendência a potenciais mais positivos se faz presente e justifica o desvio dos dados para menores valores de  $E_R$ .

Muito bem! Vamos agora resumir o que vimos neste Item 3 cujo objetivo principal era apresentar conceitos e evidências para explicar a origem dos bio-potenciais.

### RESUMO

1. As células excitáveis exibem uma diferença de potencial através da membrana, negativo dentro em relação ao meio externo, da ordem de 100 mV. Este potencial é denominado de potencial de membrana ( $E_m$ ) e em repouso, de potencial de repouso ( $E_R$ ).
2.  $E_R$  é gerado pelo estabelecimento de concentrações <sup>de íons</sup> assimétricas dos dois lados intra e extracelular separadas por uma membrana que existe permeabilidade seletiva aos íons. No repouso, maior ao íon  $K^+$ .
3. As concentrações são mantidas a partir de assimetrias geradas pelo equilíbrio de Donnan e reposição das condições iniciais nas perturbações e em equilíbrio pelo bombeamento ativo de íons, em especial pela  $Na^+/K^+$  bomba.
4. Aparentemente o  $E_m$  é estabelecido de acordo com os valores dos potenciais de equilíbrio dos íons (definidos pelas suas diferenças de

concentrações e calcular os pela equação de Nernst) e pela permeabilidade relativa da membrana aos iões.

5. O Em tenderá ao  $E_x$  (onde  $x$  é o ión em questão) se a membrana for mais permeável a esta espécie que a outras.

### CONSELHO

1. Não deixe de saber o conceito de potencial de equilíbrio;
2. Memorize e saiba obter por dedução a equação de Nernst, na forma geral e na forma simplificada a  $18^\circ\text{C}$
3. Saiba como a ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foi estudada para se determinar sua natureza eletrogénica. Saiba o papel desta bomba na manutenção de ER.

4. Bases iônicas do Potencial de Ação (PA). Teoria da Nat para o PA. Técnica de voltage-clamp. Medição de correntes iônicas em células nervosas. Modelo de Hodgkin + Huxley do PA reverso. Canais iônicos. Elementos do PA cardíaco.

Vamos iniciar esta parte do nosso estudo com a observação de registros eletrofisiológicos em células nervosas ou musculares isoladas. Neste tipo de estudo, os resultados são obtidos de preparações mais simplificadas e controláveis experimentalmente. Assim os resultados são mais facilmente analisados e entendidos. Grande parte do nosso conhecimento sobre o comportamento elétrico do músculo e do nervo vem de experimentos desta natureza.

#### 4.1. Preparação fisiológica

Hoje em dia, células individuais isoladas podem ser obtidas de grande número de tecidos fazendo-se uso da chamada digestão enzimática. Tipicamente a enzima colagenase é adicionada em alguma perfuração ou suspensão do tecido de interesse e com isso a "digestão" do colágeno que une as células permite a obtenção de uma suspensão de células vivas para estudos de diversas naturezas. Vamos nos concentrar em experimentos realizados há pelo menos 50 anos atrás. Na ocasião preparações semelhantes foram buscadas e uma das mais utilizadas foi a preparação do axônio gigante de lula. A Figura 4.1 ilustra esquemas gerais de medição de atividade elétrica em axônio gigante de lula. Em (a) um capilar de vidro (50  $\mu\text{m}$  de diâmetro) é inserido longitudinalmente na célula <sup>(cilindrica)</sup> cujo diâmetro varia de 500 a 700  $\mu\text{m}$ ). Outra configuração consiste na produção de microeletrodos de cerca de 0,5  $\mu\text{m}$  de ponta para atravessar transversalmente a membrana. Os eletrodos são normalmente preenchidos com solução fisiológica isotônica no caso da junção de grande diâmetro e com KCl 5M os microeletrodos. A Figura 4.2 mostra uma fotografia em luz polarizada de um axônio gigante de lula com um eletrodo duplo, espiral, inserido no seu interior.



1 1

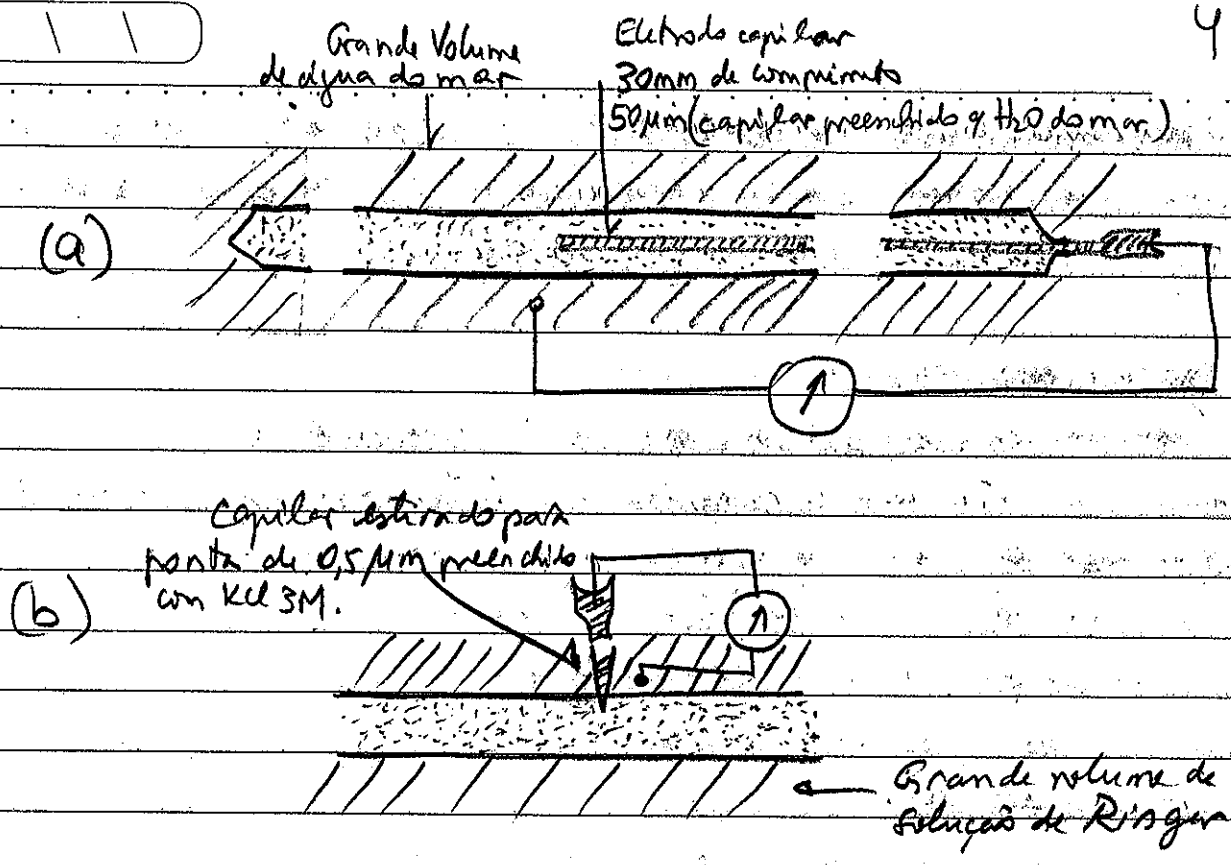


Figura 4.1 Métodos de medição de valores absolutos do potencial de membrana e potencial de ação. (a) inserção longitudinal de eletrodo de 50µm de diâmetro em axônio gigante de lula. (b) inserção transversal de eletrodo de 0,5µm de diâmetro usado para registros a partir de fibras musculares e outras células (Hodgkin, 1952)

Observe a dimensão do axônio como única solução para a necessidade, na época, de inserção de mais que um tipo de eletrodo

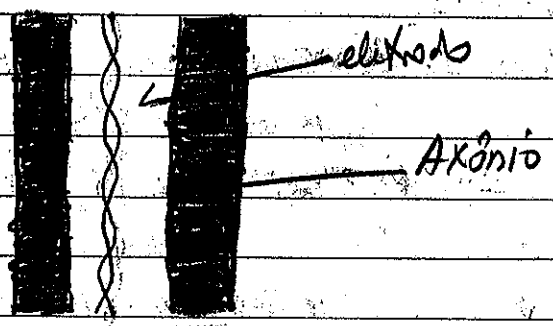


Figura 4.2 Axônio de lula no qual um eletrodo espiral, duplo foi inserido. Fotografia sob luz polarizada. Diâmetro: 700µm.

As preparações, nestes casos, estavam em banhos com solução fisiológica, tipicamente a solução de Ringer (115 mM NaCl, 2 mM KCl e 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>) para o músculo ou a própria água do mar para o nervo.

### 4.2. Registo e estimulação

Ao registar biopotenciais é preciso se preocupar com os chamados potenciais de contato ou de junção líquida. Estes potenciais originados da polarização de metais em soluções devido a passagem de corrente através dos eletrodos. Uma boa solução quando se deseja medir potenciais constantes é usar eletrodos chamados mercúrios dos grãos o mais simples é o eletrodo de prata coberto com uma fina camada de cloreto de prata. Isto pode ser obtido eletroliticamente pela passagem de corrente em eletrodo de prata imerso em solução de KCl + HCl ou mesmo pela simples imersão por cerca de 15 min, de um fio de prata em solução de hipoclorito de sódio (Água Sanitária). Para registos mais precisos recomenda-se as meia-células de calomel (mercúrio/mercúrio-cl<sup>-</sup>).

Para registos intra-celulares o eletrodo deve ser muito bem isolado exceto na ponta e tão fino cuja penetração na célula cause o mínimo de lesão não ocasionando fuga de corrente. A Figura 4.3 ilustra a montagem experimental com axônio e os registos obtidos

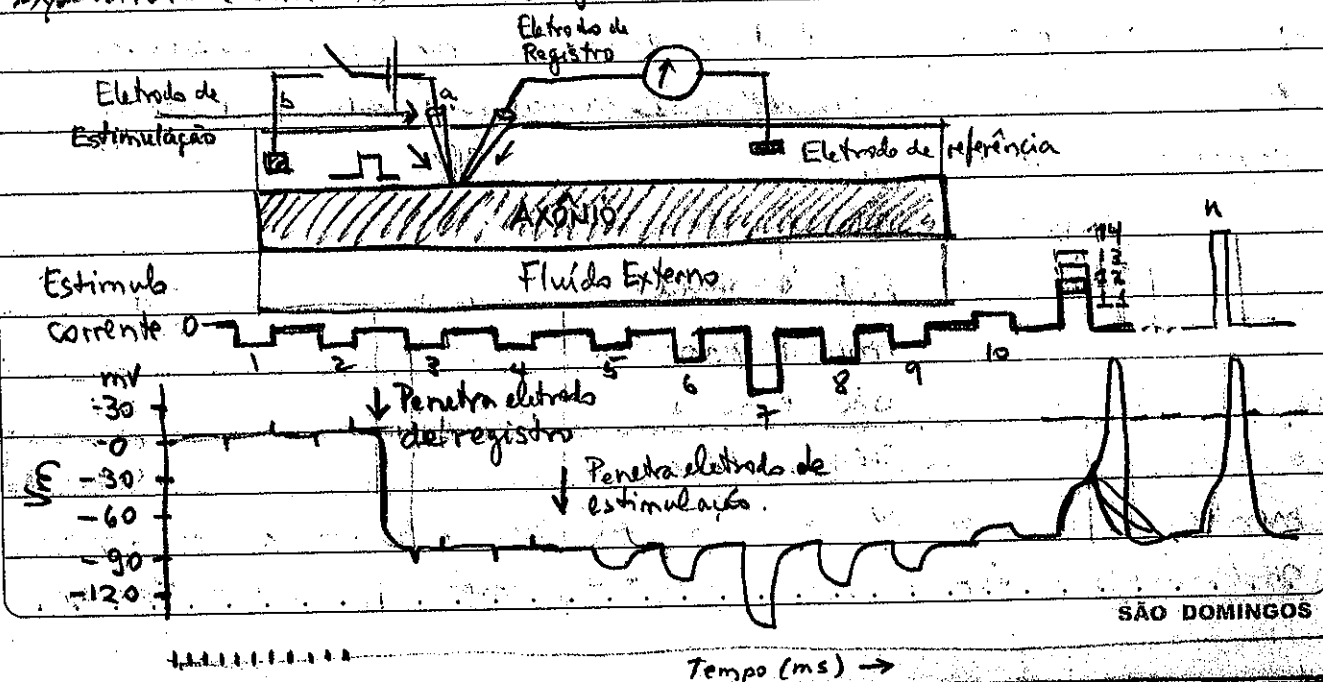
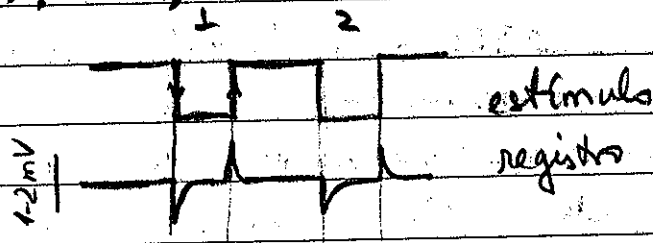


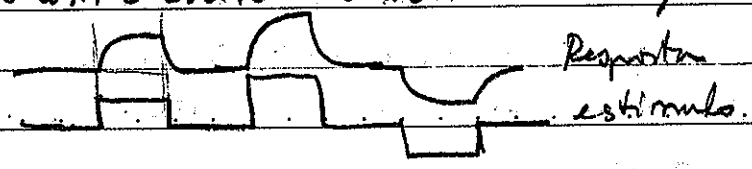
Figura 4.3 Montagem experimental com o axônio gigante de lula e registros de potenciais graduados e potenciais de ação (Katz, 1966).

Inicialmente, ambos os eletrodos estão próximos à membrana, próximos um do outro ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ) e fora da célula. A linha superior do gráfico (Fig 4.3) mostra o protocolo de estimulação elétrica com pulsos de corrente. Pulsos negativos correspondem a injeção de corrente e o contrário drenagem de corrente. Veja o que está sendo captado nos eletrodos de registro. Como você explicaria a resposta aos dois primeiros pulsos? O esquema abaixo é uma amplificação dos pulsos de n. 1 e 2.



Será que este registro corresponde à reação celular à estimulação? O pesquisador experiente sempre desconfia do que vê! Os eletrodos não estão dentro da célula. Será que existe alguma razão para, dada a passagem de corrente entre a e b, existir a resposta observada? Ao olhar com cuidado (e em especial com olhos de engenheiros biomédicos) a resposta, vemos que esta é do tipo capacitiva (uma pequena resposta capacitiva): o potencial vai para valores mais negativos rapidamente (na borda de descida do pulso estimulatório), retornando exponencialmente na borda de subida. Há alguma razão para que esta resposta seja uma resposta capacitiva do sistema eletrodos-solução-registro? A resposta a este question é SIM! Há capacitâncias parásitas que perfeitamente dão conta da geração deste sinal. A própria junção H<sub>2</sub>O - água faz surgir capacitores. Apenas para garantir que

estes não são respostas de célula basta tirar o axônio e as  
 sinais continuam da realidade isto é mesmo um ruído gerado pela  
 estimulação e não uma resposta da célula. Mas, o que acontece nos pulsos  
 3 e 4? Bom, em primeiro lugar observe o que aconteceu entre 2 e 3.  
 O eletrodo de registro foi introduzido na célula. Agora o que está sendo  
 medido é o potencial através da membrana e o que se apresenta  
 é uma "enorme" diferença de potencial, dentro negativo com relação  
 ao lado externo, cerca de  $-100\text{ mV}$ . Para o engenho, potenciais  
 de alguns poucos milivolts são mesmo grandes, fáceis de trabalhar  
 do ponto de vista de captação, amplificação e processamento. Este  
 potencial registrado ( $-90\text{ mV}$ ) é estável e corresponde ao registro  
 elétrico do potencial de repouso, ER. O ruído persiste e é razoável  
 imaginar que seja a mesma resposta capacitiva de capacitâncias  
 parasitas. O eletrodo de estimulação continua fora de célula. Entre  
 os pulsos 4 e 5 o eletrodo de estímulo é penetrado na célula. Agora,  
 como pode ser visto para os pulsos estimulatórios de 5 a 9 a passa-  
 gem de corrente através da membrana celular provoca uma  
 variação de  $E_m$  (a célula parece estar sofrendo estimulação em  
 estar sendo excitada).  $E_m$  vai para valores <sup>cada vez</sup> mais negativos à medi-  
 da que os estímulos têm sua amplitude aumentada. A resposta  
 se inverte quando no pulso 10 a direção da corrente é invertida  
 (ao decair corrente de célula  $E_m$  vai para valores mais positivos).  
 Veja que os estímulos 5 e 10 são iguais em amplitude, mas opostos  
 em polaridade. Nestes casos a resposta segue a polaridade e ampli-  
 tude dos estímulos. O que realmente estamos vendo? A membrana  
 responde linearmente aos estímulos? Estímulo dobrado resposta  
 dobrada, estímulo invertido resposta invertida... A membrana se  
 comporta como um circuito RC como no esquema abaixo?



cujas forma e amplitudes são as mesmas, independentemente da amplitude do estímulo limiar (veja tamanho das artifações), aparecem no eletrodo à distância, com as mesmas características morfológicas que apareceriam no eletrodo próximo (Fig 4.3). Há um certo tempo, finito, entre o estímulo e o aparecimento da resposta, chamado de tempo de latência.

É muito importante ver que a variação de  $E_m$  apresentada em resposta a estímulos graduados, oriundos quando o eletrodo de registro estava posicionado próximo aos de estimulação (Figs. 4.3 e 4.4) não são mais detectadas à distância (traçado inferior fig. 4.4 e ampliado na figura 4.5). As variações (deslocamentos) de  $E_m$  graduados, não foram capazes de atingir nível crítico tal que disparassem um PA e por isso são chamadas de sublimiares. Observe que  $E_m$  pode, por influência do estímulo, ir para valores mais negativos do que o nível em que se encontra (neste caso  $E_R$ ). Nesses casos ditos que o estímulo foi hiperpolarizante, a membrana sofreu uma hiperpolarização. (A expressão vem do entendimento de que a membrana em repouso encontra-se "polarizada" em um nível negativo). Ao contrário, existem estímulos despolarizantes ou de-polarizantes com os quais a membrana tende a ser de-polarizada, ou seja,  $E_m$  vai para valores menos negativos, na direção do zero.

Nesses experimentos apresentados (Figs 4.3 a 4.5) os PAs surgiram sempre a partir de despolarizações. Este é o caso típico, ou seja, quando eletrodos intracelulares drenam corrente fazendo com que  $E_m$  fique menos negativo, mais rapidamente a condição limiar é atingida.

Prefero me referir a algo como condição limiar do que a potencial limiar por que este potencial no qual um PA seria disparado é diferente se a duração do estímulo ou a sua forma de aplicação (rampa ou degrau) forem alteradas. Estas informações, de caráter puramente fenomenológico tem hoje bastante embasamento teórico e experimental. Para o engenheiro biomédico são fundamentais e serão explicadas em tópicos a parte quando for conveniente, melhor

Figura 4.4. Montagem experimental para registro de bio-potenciais em axônios. Eletrodos de registro colocados vários milímetros de distância dos eletrodos de estimulação visando investigar a propagação do potencial. (Adaptado de Katz, 1966).

A Figura 4.5 busca realçar observações importantes e iniciar a definição de parâmetros e conceitos relativos à produção de potenciais de ação. Veja, por exemplo, que o ruído gerado

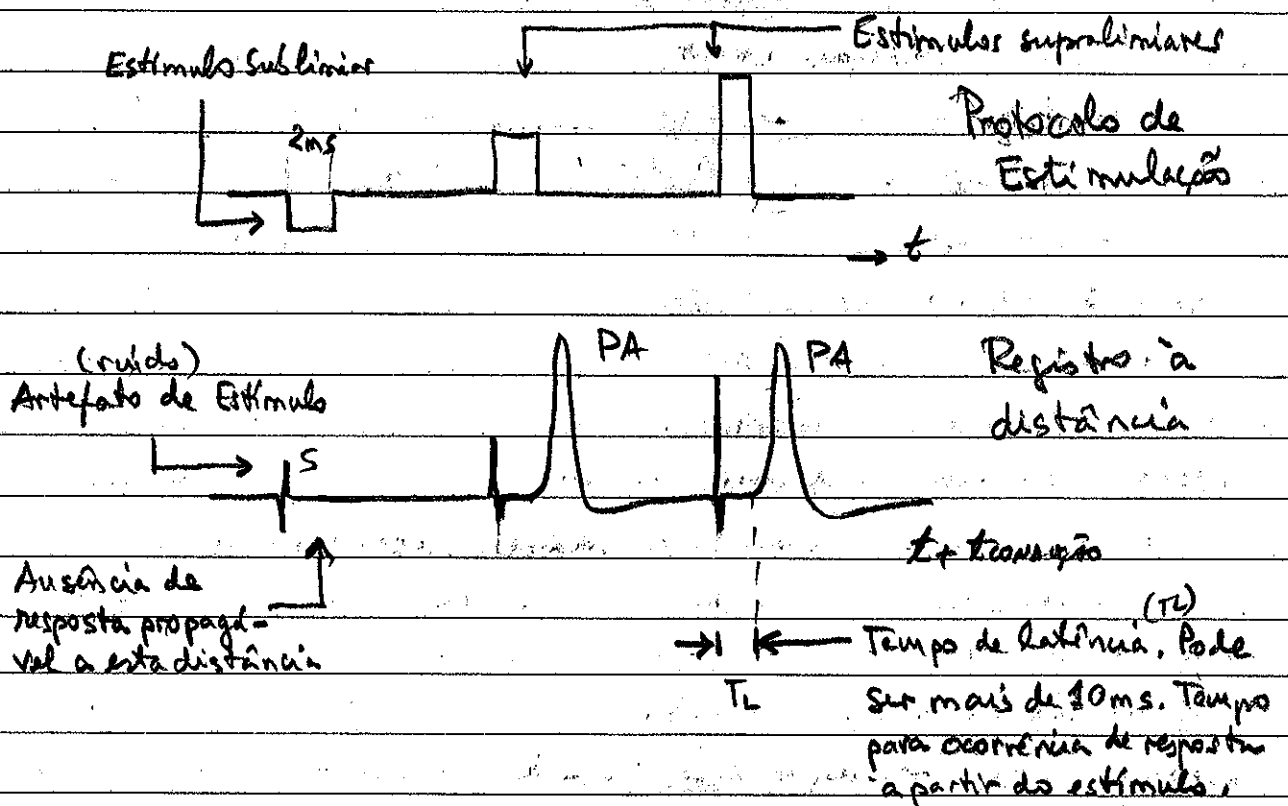


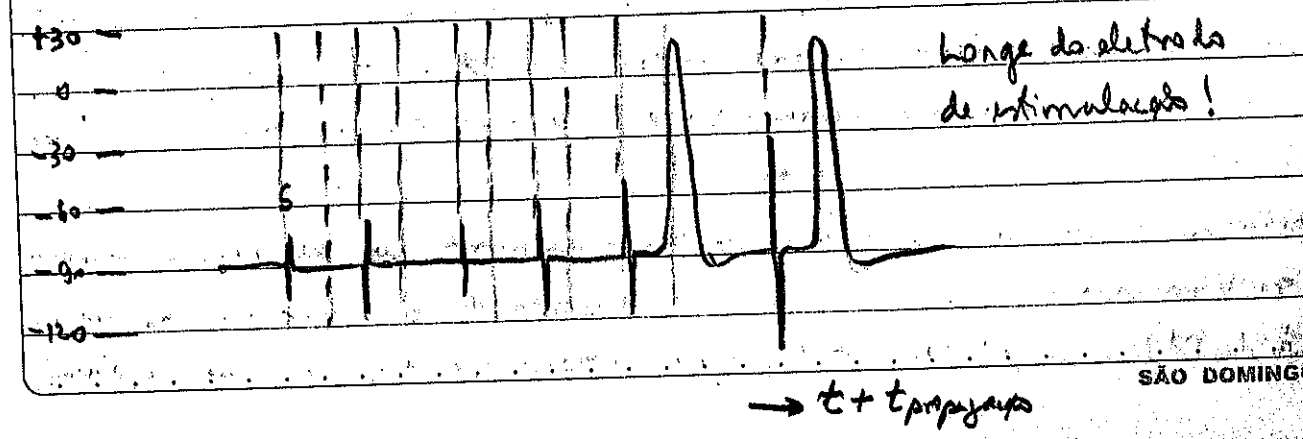
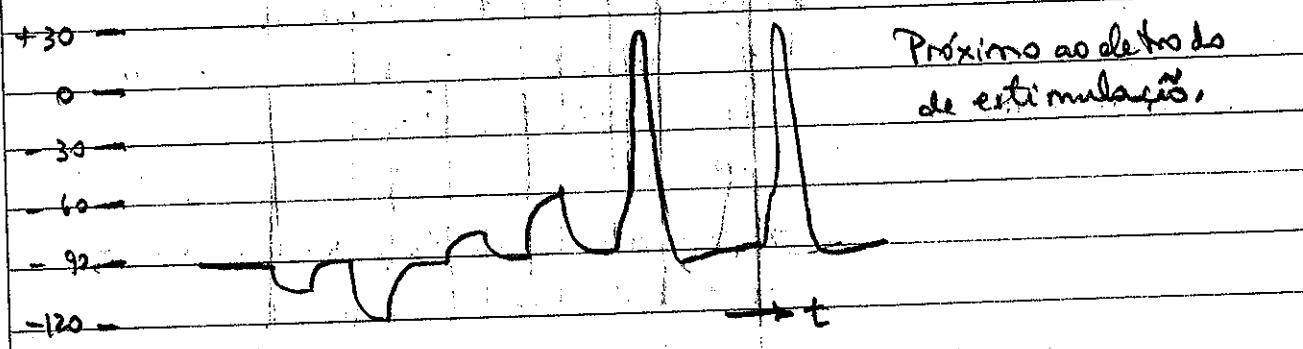
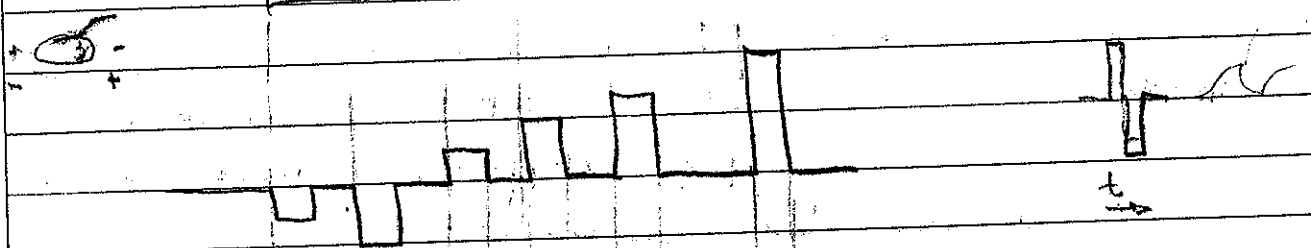
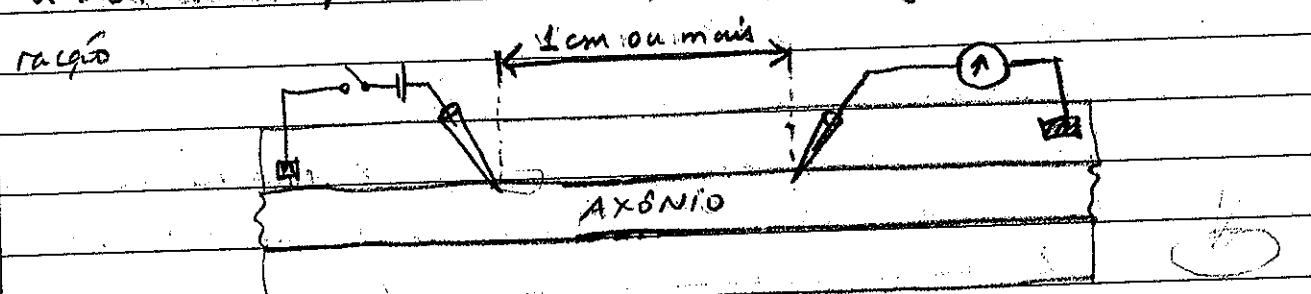
Fig 4.5 Esquema amplificado para ilustrar a propagação de potenciais em experimentos semelhantes ao da figura 4.4. PA = potencial de ação,  $T_L$  = tempo de latência, S = estímulo elétrico, linha superior; protocolo de estimulação.

pelo estímulo surge quase que instantaneamente nos eletrodos de captação. Veja também que a resposta graduada (subliminar para ocorrência de PA) não foi detectada nos eletrodos de registro e que os PAs

natureza. São as respostas graduadas e os PAs os sinais que são transmitidos pelos nervos para levar informação? A que distância os potenciais são transmitidos? O que aconteceu na membrana que possibilitou a ocorrência do PA?

4.3. Características importantes dos potenciais bioelétricos

No mesmo tipo de experimento da figura 4.3 vamos registrar Em à distância do ponto de estimulação. Veja na Figura 4.4 a nova configuração



A resposta para todas estas questões é a seguinte: Para pequenas perturbações, introduzidas pelo estímulo a membrana se comporta como um circuito RC (um resistor em paralelo com um capacitor) e neste a resposta aos estímulos é realmente linear, previsível e graduada. Estas variações de  $E_m$  são chamadas de respostas graduadas ou potenciais graduados ou ainda potenciais elétricos. Já vimos que a capacitância da membrana é da ordem de  $1 \mu F/cm^2$  e a sua resistência elétrica varia no intervalo de  $1$  a  $8 (K\Omega/cm^2)$ . As respostas graduadas são suportadas passivas da membrana "funcionando" como circuito RC.

Olhe, contudo, o que acontece nos estímulos de 11 a 14. Inicialmente, para os estímulos menores (e agora estímulos que provocam variações de  $E_m$  para valores mais positivos) já começam surgir pequenas não-linearidades até que no estímulo 13 a resposta muda drasticamente. Uma variação brusca de  $E_m$  atinge um nível bem acima de zero ( $+40 mV$ ) e independentemente do terminal do pulso estimulatório atinge o nível máximo e retorna ao  $E_r$ . Em outras palavras esta variação de  $E_m$  não é mais controlada pelo estímulo e como pode ser visto pelo pulso n, de maior amplitude, é do tipo tudo ou nada. O nível máximo não mais depende do estímulo. Uma vez deslocado para um certo nível limiar,  $E_m$  se desdobra na forma desta brusca variação que se denomina de potencial de ação (PA). Ao contrário das respostas graduadas o PA exibe comportamento altamente não-linear e não pode ser replicado apenas pela análise da resposta passiva da membrana aos estímulos. Muito bem. Estamos procurando estudar os biopotenciais. Já sabemos sua origem e agora sabemos que  $E_m$  pode variar e atingir níveis elevados de potencial em valores positivos, revertendo a polarização inicial ( $E_r \approx -100 mV$ ,  $E_m (PA) \geq 0$ ). O PA é agora a grande presunção. Que tipo de resposta é esta e qual a sua



O potencial de ação é formado mediante o processo de estimulação elétrica de tecidos isolados, nervos e musculares.

Vamos agora explicitar características básicas das PA's nervos como descrito na Figura 4.6. Deve-se notar que o PA é uma varia-

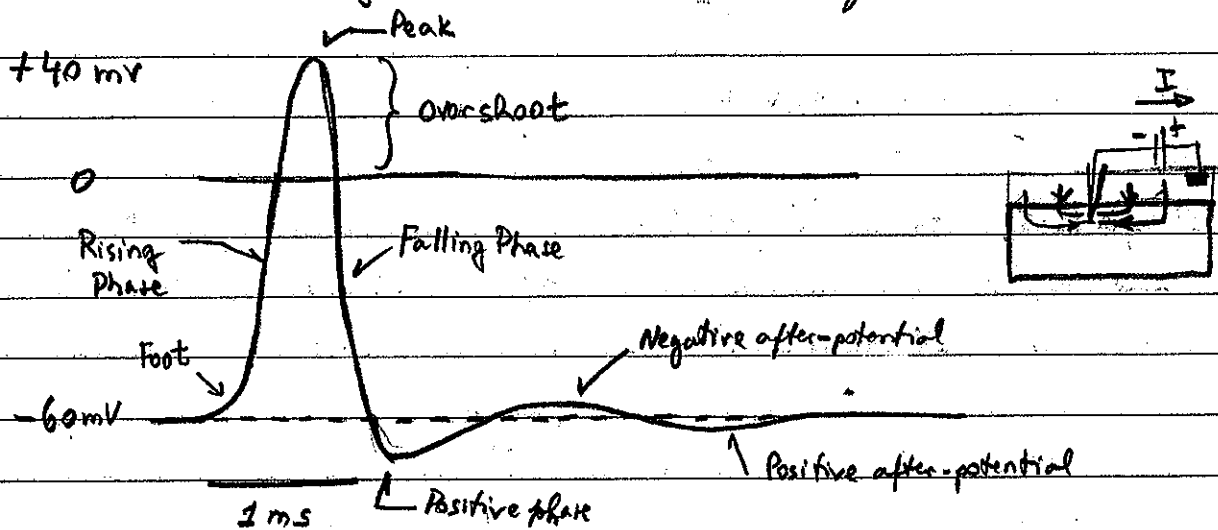


Figura 4.6 Diagrama da nomenclatura aplicada ao potencial de ação e pós-potenciais.

ção rápida de Em que produz um overshoot (ultrapassa para milivolts) mesmo após o estímulo supraliminar já ter sido desligado (Fig 4.5, traçado inferior). É uma resposta altamente não-linear e não mais controlada pelo estímulo (veja Fig. 4.5, aumento da intensidade do estímulo não leva a aumento do PA). Outra característica também identificada nos experimentos é que o PA transita pelo neurônio sem alteração de forma ou amplitude (o mesmo sinal gerado próximo aos eletrodos de estímulo atinge a mais de 1cm os eletrodos de registro). Isso se deve à natureza auto-regenerativa do PA que estudaremos melhor com a análise do modelo do núcleo condutor. O PA é fundamentalmente um fenômeno tipo tudo-ou-nada, uma vez ultrapassado o limiar o PA atinge "sempre" a mesma amplitude e se desenvolve completamente após ter sido desligado o estímulo.

Antes de analisar o fenômeno do PA vamos antecipar outras características e aspectos gerais do processo de estimulação elétrica celular.

#### 4.4. Parâmetros de estimulação elétrica

##### Relação intensidade - duração (curva intensidade - duração)

Se um axônio ou fibra muscular é estimulado por meio de eletrodo intracelular, por um pulso retangular, verifica-se que a intensidade limiar depende da duração do pulso estimulatório (Figura 4.7).

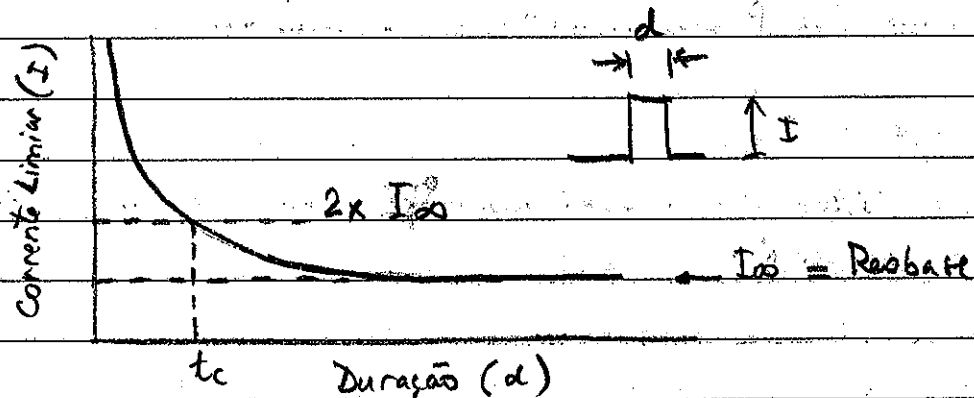


Figura 4.7. Curva Intensidade - Duração ( $I \times d$ ) em neurônios.  $I$  = corrente limiar,  $I_{00}$  corrente para  $d = \infty$  também denominada de resgate. O valor da duração para pulsos de intensidade iguais ao dobro de  $I_{00}$  é denominado de tempo de cronaxia ( $t_c$ ).

Como pode ser visto, quanto menor a duração do pulso estimulatório maior deve ser a corrente para produzir um AP. O tempo de cronaxia (duração que precisa o dobro do valor mínimo de corrente para geração de PAs) é bastante característico das preparações e é indubitavelmente usado com finalidade diagnóstica. A relação empírica da Figura 4.7 pode ser ajustada por uma relação tal que:

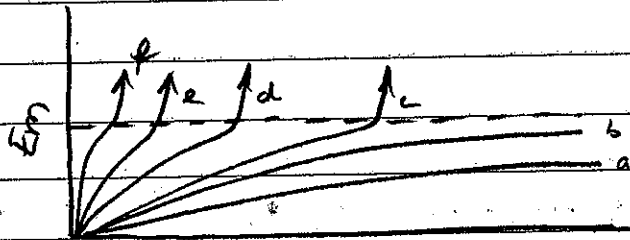
$$\frac{I}{I_{00}} = \frac{1}{1 - e^{-t/k}}$$

onde  $I$  é a intensidade do pulso estimulatório,  $t$  é a largura do pulso  $I_{00}$  é a intensidade limiar quando  $t$  é muito grande (valor robástico) e  $K$  é uma constante (Lapicque, 1907, Hill, 1936). Esta expressão é denominada de equação de Lapicque e já foi associada a queda de tensão em um circuito RC paralelo, mas hoje já se sabe que o fenômeno é mais complexo.

Aparentemente correntes de curta duração e alta amplitude produziram menor "espalhamento" pelo neurônio e parece ser necessário que uma certa área ativa seja atingida para iniciar a resposta auto-regenerativa. A quantificação exata deste fenômeno é bastante complexa (veja Noble + Stein, 1966 - J. Physiol., Lond., 187:129-162).

### Latência

Reverso melhor este conceito podemos dizer que o tempo da borda de subida do estímulo, até o pico do PA é definido como latência da resposta. A latência diminui para estímulos de maior intensidade (Fig 4.8)



Tempo após subida da corrente estimulatória.

Figura 4.8 Efeito de correntes despolarizantes sobre o PA em axônio. A intensidade da corrente aumenta de a para f. Respostas c e a f elevaram a excitação com produção de PA.

### Adição latente

Se um estímulo despolarizante sub-limiar é aplicado à membrana ela permanece por um certo período, mais "próximo" do limiar. Neste

caso, um novo estímulo também subliminar a partir do repouso pode provocar um PA (Figura 4.9). De modo inverso se o primeiro estímulo for hiperpolarizante pode ser necessário um estímulo maior que um já supra-limiar na condição de repouso para disparar um PA.

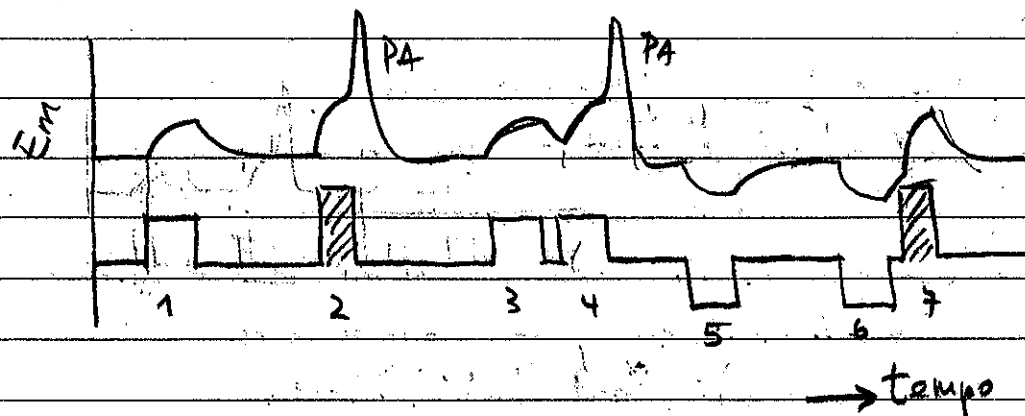


Figura 4.9 Adaptação latente. Estímulos subliminares podem causar Em mais próximos da condição limiar. Estímulos de repouso são supra-liminares a partir do repouso (2 e 7). Estímulo 5 é hiperpolarizante e apresentado antes do estímulo 7 impede a geração de PA. O estímulo sub-limiar 3 favorece o aparecimento de PA gerado pelo estímulo 4.

### Adaptação

O limiar muda durante a aplicação do pulso estimulatório. Se um pulso despolarizante é mantido o limiar tende a subir e ao contrário durante um pulso hiperpolarizante (há queda de limiar). Este fenômeno é denominado de adaptação. Como consequência da adaptação um outro fenômeno pode ser identificada: estimulação por quebra de anodo - anode break excitation - A redução do limiar durante um pulso hiperpolarizante pode ser tal que no retorno do pulso ao valor inicial Em ultrapassa o limiar e um PA é disparado. Outra consequência é o fato de que um PA pode ser gerado com uma variação de Em que corresponde a um valor bem acima

de um valor limiar obtido com estímulos na forma de pulsos retangulares se a corrente for aplicada na forma de rampa (Figura 4.10)

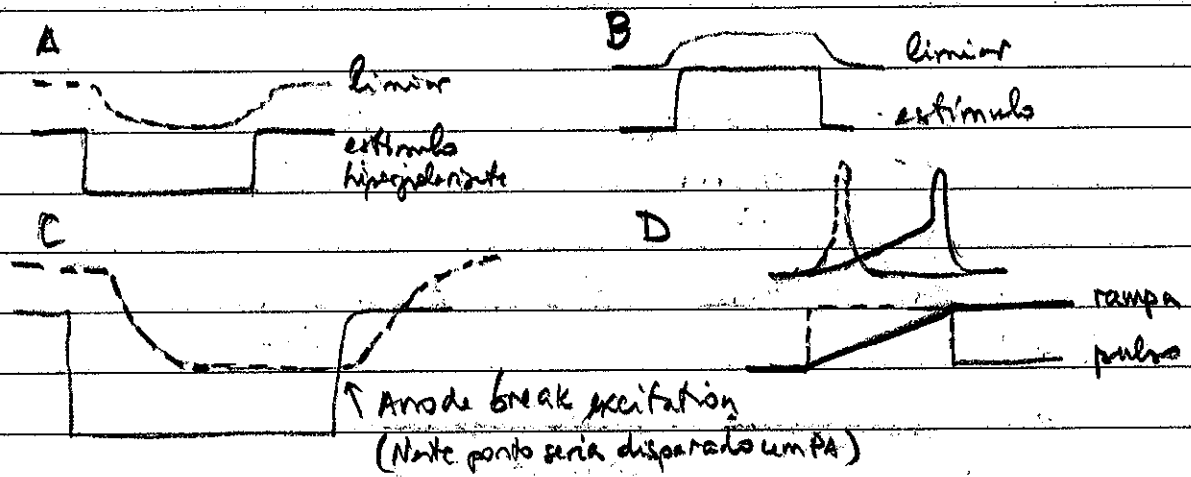


Figura 4.10 Fenômeno da acomodação do limiar. Estímulo hiperpolarizante tende a reduzir (A) e despolarizante aumentar (B) o limiar. Hiperpolarização de longa duração tende a reduzir muito o limiar. No retorno do pulso pode haver estimulação por quebra de anodo (C). A aplicação de estímulos na forma de uma rampa pode levar em para valores bem acima de  $E_m$  limiar para a estimulação em deflexão em pulso (D).

### Refratariedade

A membrana celular sofre um período de refratariedade à produção de novo PA. Isto significa que o número de PAs emitidos por unidade de tempo é limitado. É uma limitação em frequência. A refratariedade é total ou absoluta durante os  $2/3$  de duração de um PA, começando a se reduzir (talvez um estímulo de maior intensidade possa reativar a célula nos últimos terços de duração de um PA) entrando em um período de refratariedade relativa até o retorno à condição normal de excitabilidade. Não é incomum que se caracterize a "positive phase" como um período de sub-

normalidade para excitação e a fase de pós-potencial negativo (Negative after-potential) como uma fase super-normal de excitabilidade. A Figura 4.11 ilustra a estimulação com pulsos pareados, ambos supra-limiares.

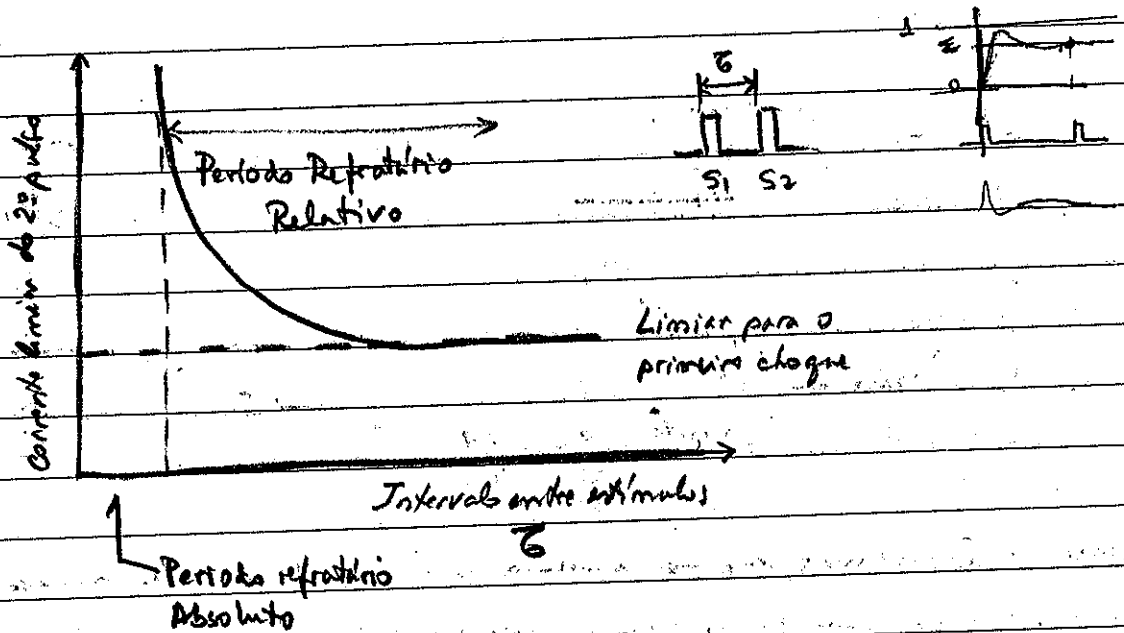


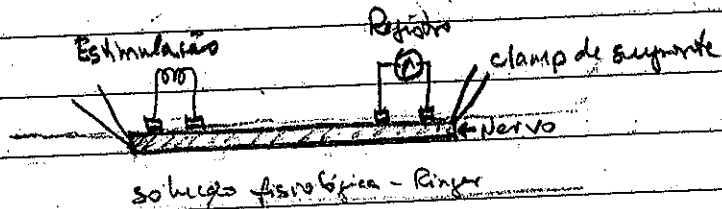
Figura 4.11 Refratariedade celular. O período refratário absoluto equivale aproximadamente ao tempo de duração dos primeiros 2/3 do PA. A curva indica que no período refratário relativo, S<sub>2</sub> <sup>(limiar)</sup> precisa ser maior que S<sub>1</sub>, ambos limiares, para gerar PA. T é o intervalo entre estímulos.

### Estimulação extracelular

Vamos ver agora o que acontece quando estimulamos células e conjuntos de células (tecidos) isolados com eletrodos externos. Um pouco de entendimento do que ocorre é importante porque tem aplicação prática. Nos exames eletromiográficos e neuromiográficos, estímulos são aplicados a nervos e músculos por meio de agulhas inseridas no tecido (portanto extracelular) ou eletrodos superficiais e respostas correspondentes a ativação elétrica dos nervos ou músculos são registrados superficialmente. A estimulação elétrica é também utilizada para finalidade terapêutica como nos manuparvos, na estimulação para controle de dor ou mesmo na estimulação funcional visando a produção de movimentos corporais, ou controle de funcionamento de órgãos (e.g. bexiga urinária).

## Potencial de ação composto

O esquema abaixo ilustra uma montagem para trabalho com nervo ciático de rato. O nervo é colocado em solução de Ringer, solução na qual sobreviverá por muitas horas e até mesmo dias. O nervo é suspenso até a superfície do líquido



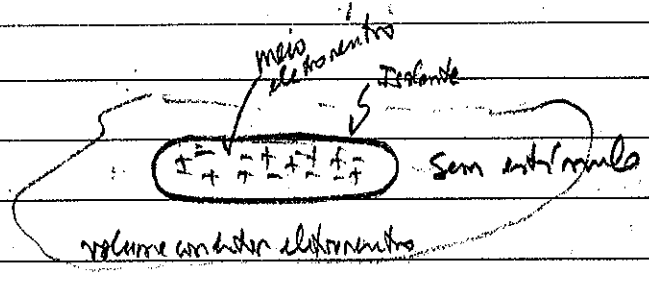
de modo que apenas uma fina camada de solução cubra a superfície do tecido e sirva de interface elétrica para os eletrodos. Ambos pares de eletrodos (de estimulação e de registro) são extracelulares. O nervo ciático é um feixe com cerca de 3 mil neurônios. Deste modo e nesta condição vamos ver o que acontece. Iniciamos o experimento aplicando estímulos de baixa intensidade e no equipamento de registro observamos apenas os artefatos de estímulo, como nos dois traços abaixo (1 e 2). A partir de uma intensidade "limiar" uma resposta começa a se ritualizar e a partir de uma certa amplitude o nível aumenta para um nível limite.

É interessante notar o comportamento semelhante ao do PA, contudo a partir do aparecimento da 1ª resposta foi possível aumentar a resposta pelo aumento do estímulo. O que acontece entre 4 e 5? Este sinal é denominado de Potencial de Ação Composto (PAC) e é formado pela composição das atividades das células (axônios) individuais do nervo. É uma soma temporal (composição) das contribuições (PAs) das células que acabaram sob os estímulos. Veja que em 3 o sinal do PAC é menor por que nem todas as células haviam sido estimuladas. Os eletrodos estão a distâncias diferentes para o conjunto das células e, além disso, o limiar estimulatório não é igual para todos os axônios (os axônios de maior diâmetro são excitados mais facilmente!). Se nós (dissecássemos) uma célula (axônio) deste nervo

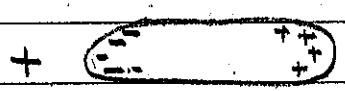
Se a estimulassemos individualmente a amplitude captada externamente seria extremamente pequena para este caso de eletrodos intracelulares. A resposta máxima como visto no traço do 5 anterior pode ficar entre 15 e 20 mV ao contrário dos mais de 200 mV vistos no registro intracelular. É claro, não há sanduí de de graça! Tudo o que queremos é registrar o mais distante da fonte possível para não serem invasivos, mas quanto mais longe menor o sinal. É nestas condições que nós argentinos bionômicos queremos interpretar o que está ocorrendo com a fonte. Em outras palavras, queremos medir o PFC e poder dizer que a sua forma (ou outra característica) indica que apenas os axônios, por exemplo, caracterizados como de diâmetros d<sub>1</sub>, estão caracterizados ou inoperantes. Queremos mais ainda! Que tal registrar um eletroencefalograma e dizer que as células caracterizadas por L01 e L02 do lobo occipital estão hiperativas? Infelizmente estamos longe disto!

É evidente que a mesma limitação em frequência dos axônios está presente nos neurós. A capacidade de enviar sinais a pontos distantes do organismo é restrita a uma série de pulsos livres de frequência limitada.

O processo de estimulação em si não é objeto deste texto. Apenas para iniciar o entendimento veja no esquema abaixo uma membrana elétrica para explicar o processo.



Com estimulação



As cargas se rearranjam de modo que a eletroneutralidade se mantenha.

Do lado do polo negativo (catodo) se acumulam internamente e próximo a membrana, cargas positivas. As cargas positivas anulam cargas negativas.



fixas da membrana. Estas cargas com origem em proteínas intrínsecas e extrínsecas são assimétricas gerando o chamado campo constante através da bicamada. A relação deste campo com o potencial da membrana do qual falamos até agora está apresentada na Figura 5.1. A adição de cargas positivas do lado externo por exemplo

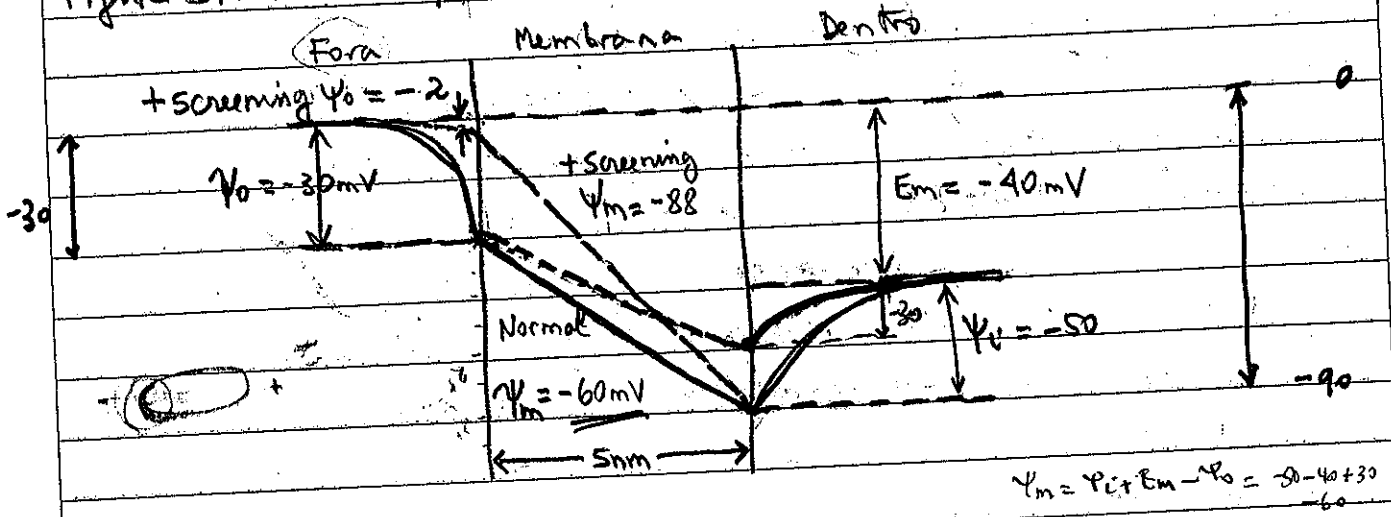


Figura 4.12 Campo através da membrana. Efeito de anulação de cargas (charge screening) por alta concentração de cátions divalentes no meio externo. Screening reduz  $\psi_0$  de -30 para -2 mV fazendo  $\psi_m$  mais negativo para o mesmo  $E_m$ .  $\psi_m = -90$  (dentro) - (-30) de fora = -60. Agora  $\psi_m = -90 + 2 = -88$  mV. (Modificado de Bers, 2004).

por aumento de concentração externa de  $Ca^{2+}$  anula cargas da superfície externa, torna  $\psi_0$  menos aumentando  $\psi_m$ , ou seja, fazendo  $\psi_m$  mais negativo. Neste caso a membrana fica mais longe do limiar e portanto menos excitável. Se a estimulação provoca movimento de cargas positivas para próximo da face interna da membrana do lado do polo negativo, então  $\psi_i$  (Fig 5.1) tenderá a ser reduzido, vindo para valores menos negativos (digamos para -30 mV),  $\psi_m$  irá para  $-70 - (-30) = -40$  mV nível de potencial próximo do ideal para disparar um AP. Isto poderia ser melhor entendido quando se entender o...

processo de ativação de canais iônicos de membrana. Apenas para não deixar muito vago, o campo na membrana vai ser estímulo definitivo para muitos canais controlados por Em. Variações de Em levam a variações no campo que ativam a abertura, por exemplo de canais de  $\text{Na}^+$  (lembre-se que  $\text{Na}^+$  é abundante no meio extracelular) que irá se mover a favor de seu gradiente eletroquímico e com isto (se foi entendido o potencial de equilíbrio de Nernst) "leva" o Em para valores ainda mais positivos ativando ainda mais canais, culminando eventualmente com o disparo de um PA:

Vamos começar a estudar a teoria iônica do PA antes mesmo de estudar mais em detalhe as propriedades passivas da membrana e da condução de biopotenciais. Isto é conveniente neste ponto para caracterizar mais definitivamente o PA e com isto poder usar alguns dos conceitos quando formos estudar a teoria do núcleo condutor para explicar a condução regenerativa de PAs e a chamada teoria dos circuitos locais para a propagação. Neste ponto resumamos também as propriedades do axônio como cabo condutor.

#### 4.5. Teoria Iônica da condução nervosa

A questão que apresentamos agora é a seguinte: o que está acontecendo na membrana durante a passagem de um PA? A Figura 4.13 corresponde a um dos clássicos da literatura, mostrando variações da impedância elétrica de membrana durante a passagem de um PA. Esta é a primeira demonstração "direta" de modificação na permeabilidade iônica de membrana como um todo. Os autores, Cole & Curtis, foram respaldados também pelo desenvolvimento

do primeiro aparato para controlar a tensão e medir corrente através de membrana, o chamado Voltage-Clamp que veremos mais tarde.

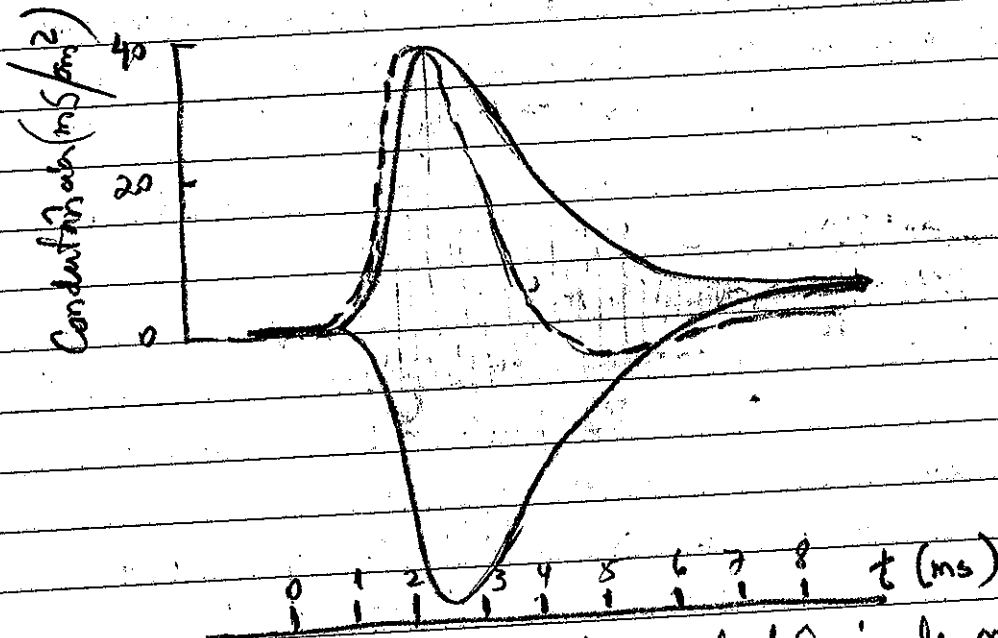


Figura 4.13. Curso temporal da condutância de membrana em axônios de lula. A condutância cresce durante o PA voltando aos valores de repouso lentamente. A medição foi feita pelo desbalanceamento de uma ponte de Wheatstone aplicada através do axônio de alta frequência (Cole and Curtis, 1938)

Born, em 1902 Julius <sup>considerado o fundador de teoria de membranas</sup> Bernstein havia proposto que no repouso a permeabilidade da membrana era maior aos íon potássio; O PA seria devido a uma "quebra" desta permeabilidade (Quase que por romper o dielétrico, transitoriamente) aos íon, levando Em para zero. Na ocasião, só foi possível para o pesquisador mostrar que, Em atingia zero e retornava ao valor de ER, apenas de uma estímulo.

Tendo em vista o experimento da Figura 4.13 não parecia razoável a hipótese de uma "quebra" de permeabilidade. A condutância de membrana variava continuamente e cerca de 40 vezes o nível inicial durante a passagem de um PA. Era preciso fazer alguma coisa!

Pela primeira vez Hodgkin & Huxley (1939, 1945) e Curtis & Cole (1940, 1942) mediram um PA completo no axônio, usando microeletrodos. A grande surpresa da medição mais acurada foi o fato de Em não atingir o nível zero apenas. Em era revertido para valores positivos por mais de uma dezena de milivolts! Este problema teve sua solução adiada pela 2ª Guerra Mundial. Apenas em 1946 a ideia final foi realmente considerada; a membrana deveria ser seletivamente permeável aos Ions Na<sup>+</sup>. Se isto ocorresse a entrada de Na<sup>+</sup> levaria Em para próximo do <sup>seu</sup> potencial de equilíbrio (Eva) que está próximo de +60mV. — Viu como é importante saber a equação de Nernst e entender o significado do potencial de equilíbrio dos Ions? —

Após a guerra ficou claro que o potencial de membrana ultrapassava o valor zero durante um PA. Leon Hodgkin & Katz (1949) sugeriram que o processo era uma rápida e específico aumento de permeabilidade da membrana aos Ions Na<sup>+</sup>. Para testar a validade desta ideia, contida como teoria do sódio, Hodgkin & Katz mediram a amplitude de PAs de axônios colocados em soluções com diferentes concentrações de Na<sup>+</sup>. Na ausência do Ion não foi possível a produção de PAs. Se a concentração externa era reduzida, a amplitude dos PAs era diminuída. Mais ainda, a inclinação da curva relacionando o valor de pico do PA com o  $\log [Na^+]_o$  era próxima de +58mV como se deveria esperar para a equação de Nernst aplicada ao Na<sup>+</sup>.

A batalha para medir o movimento de Ions Na<sup>+</sup> como sempre sempre foi difícil. Vamos ver aqui apenas um conjunto de experimentos realizados por Keynes em 1951 sobre o movimento de Na<sup>+</sup> & K<sup>+</sup> radioativos em axônios. De modo semelhante aos experimentos mostrados na figura 3.3 (estudo de APPare Na/K) o axônio, preso por dois pares de forquês podia ser mergulhado em água do mar com o isótopo radioativo, carregado como ele é transferido para contagem de radiação para a câmara de proporção.

A Figura 4.14 ilustra o experimento com  $^{42}\text{K}$ . Após 15 min de carga, o axônio foi transferido para a câmara de medição e a radioatividade monitorada nos próximos 40 min. Quando apresentada em escala logarítmica, encontram-se uma reta. O valor inicial, assim que o axônio foi transferido para a câmara de medição, foi estimado por extrapolação.

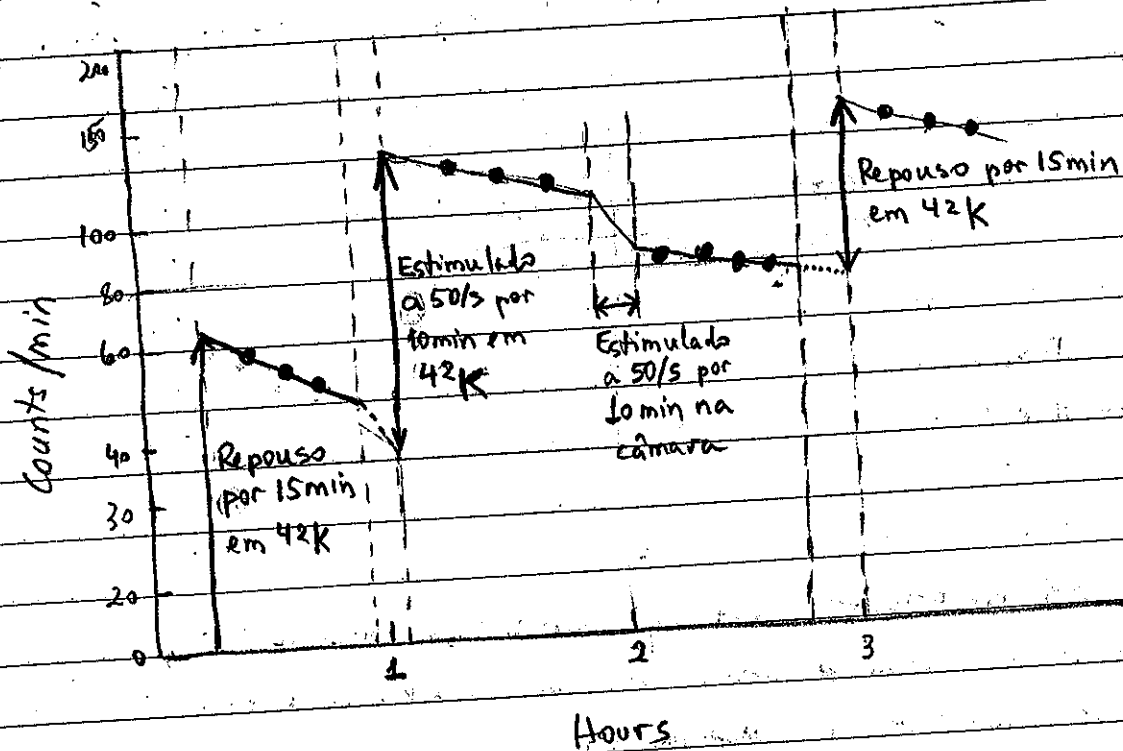


Figura 4.14. Resultados de experimentos para ver o movimento de  $^{42}\text{K}$  no axônio gigante de Sepia (Kuyres, 1952)

laços. A partir deste valor, conhecendo  $[\text{K}]$  na água do mar e sua atividade específica, a taxa de entrada de  $\text{K}^+$  pode ser calculada. Em seguida o axônio foi para a água do mar com  $^{42}\text{K}$  para ser estimulado por 10 min. Retornando à câmara de conta um a nível de radioatividade dele pôde ser calculado, a partir do qual o influxo extra causado pela estimulação foi determinado. Partindo de algumas premissas, como a  $[\text{K}^+]_i$ , os dados puderam ser transformados em valores absolutos para o efluxo de potássio. Experimentos semelhantes foram feitos para encontrar números sobre o transporte

do íon  $\text{Na}^+$  no axônio. O resultado principal está apresentado na Figura 4.15.

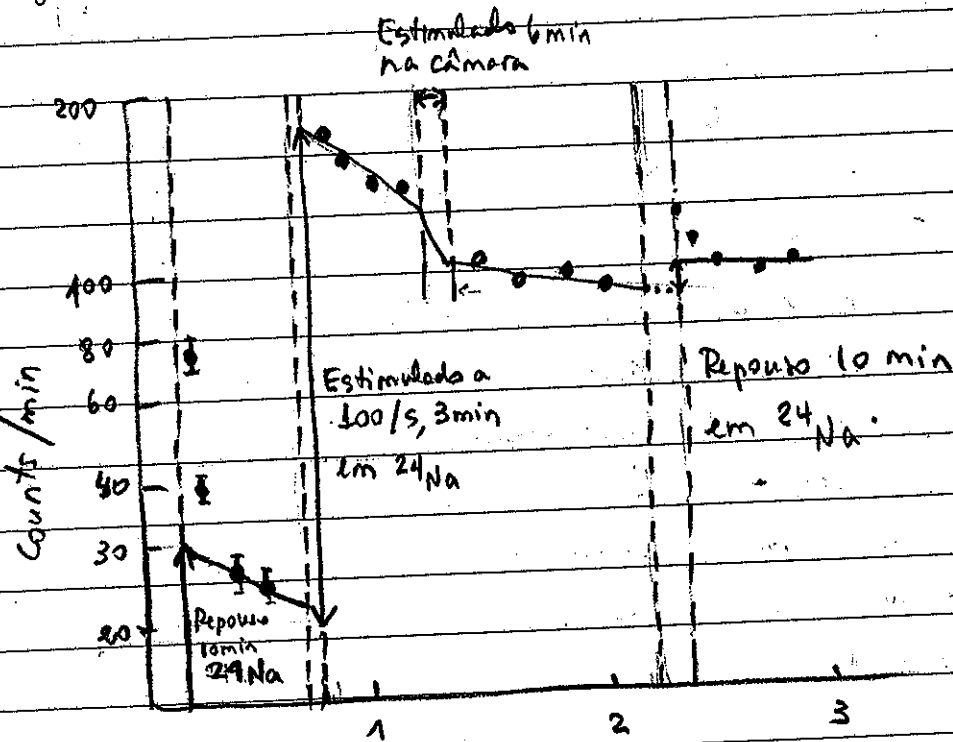


Figura 4.15. Resultados de um experimento para determinar o movimento de íons  $\text{Na}^+$  em axônio gigante de *Sepia*. Os valores registados imediatamente após o período de imersão em água do mar radioativa provavelmente incluem radioatividade carregada do meio externo. As linhas retas são, portanto, traçadas com os pontos posteriores, apenas (Keynes, 1951).

Um resumo dos principais resultados está apresentado na Figura 4.16

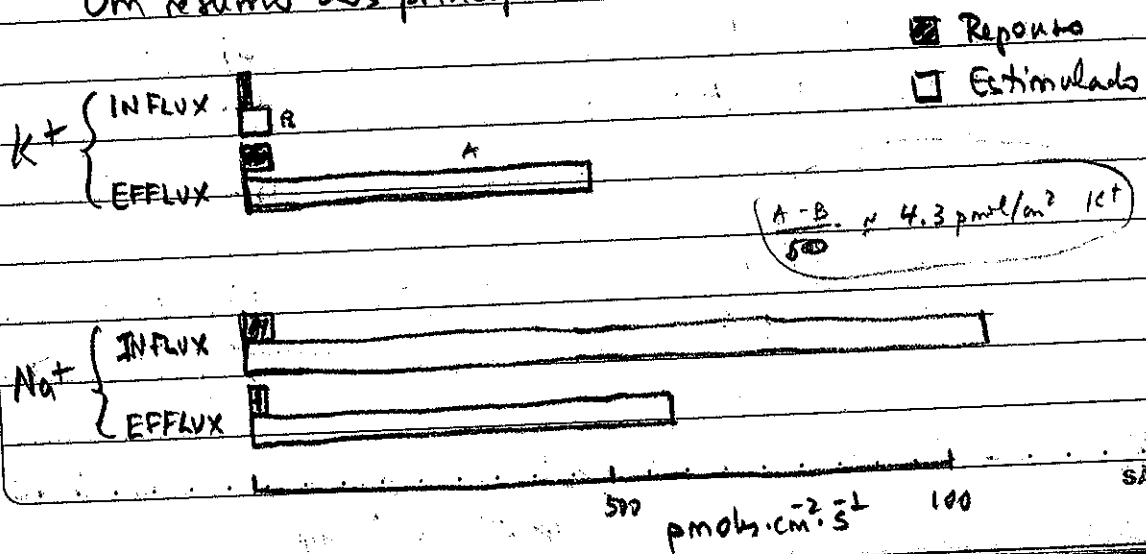


Figura 4-16. Fluxos dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em axônio gigante de *Sepia*.  
 Hachurado: repouso; Branco: estimulada a 100/s (Keynes, 1951).

O efeito resultante de cada PA é produzir uma entrada resultante de  $3,7 \text{ pmol/cm}^2$  de  $\text{Na}^+$  e uma saída de  $4,3 \text{ pmol/cm}^2$  de  $\text{K}^+$ . A entrada de  $\text{Na}^+$  iria fazer o potencial de membrana mais positivo e a saída de  $\text{K}^+$  iria fazer o oposto (tornar  $E_m$  mais negativo). Assim, a partir destes experimentos de Keynes tornou-se razoável dizer que a fase de subida do PA é devido a entrada de sódio e a descida causada por saída de potássio.

Se esta sugestão é correta, deve ser possível mostrar que a quantidade de íons  $\text{Na}^+$  que entra no axônio é suficiente para causar as variações de  $E_m$ . A carga  $Q$  (em Coulomb) em um capacitor  $C$  (em Farad) é dada por:

$$Q = CV \quad (\text{como descrito no item 3})$$

onde  $V$  é a tensão através do capacitor. Se esta carga é produzida por uma íon monovalente, o no de moles do íon movido de um lado para outro do capacitor é dado por

$$n = \frac{CV}{F} \quad z = 1$$

onde  $F$  é a cte de Faraday. No caso do axônio  $C = 1 \mu\text{F/cm}^2$  e  $V$  (no pico do PA) é de 110 mV. Assim

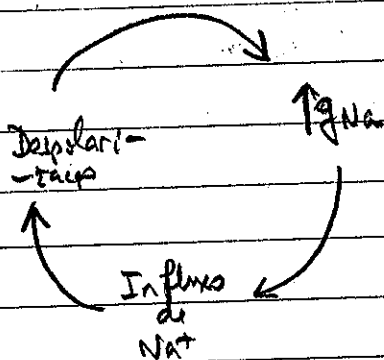
$$n = \frac{10^{-6} \times 0,11}{10^5} \text{ moles/cm}^2 = \underline{\underline{1,1 \text{ pmol/cm}^2}}$$

Segue que o fluxo resultante de ions  $\text{Na}^+$  é mais que suficiente para dar conta da mudança de  $E_m$  durante um PA (Keynes estimou  $3,7 \text{ pA}/\text{cm}^2$ ).

Uma maneira mais direta e precisa de medir os movimentos iônicos foi feita por medições elétricas e serão consideradas a seguir:

### VOLTAGE CLAMP

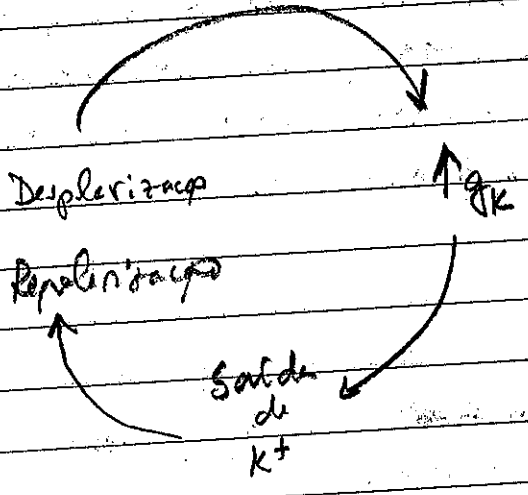
Com base na teoria do sódio, a despolarização inicial que produz um PA deve resultar de um aumento da condutância ao íon sódio. Este aumento da condutância ao  $\text{Na}^+$  produziria deslocamento de  $E_m$  para valores mais positivos e com isto, aumento de condutância. Assim teríamos para a condutância ao  $\text{Na}^+$  ( $g_{\text{Na}}$ ) uma realimentação positiva como mostrado abaixo



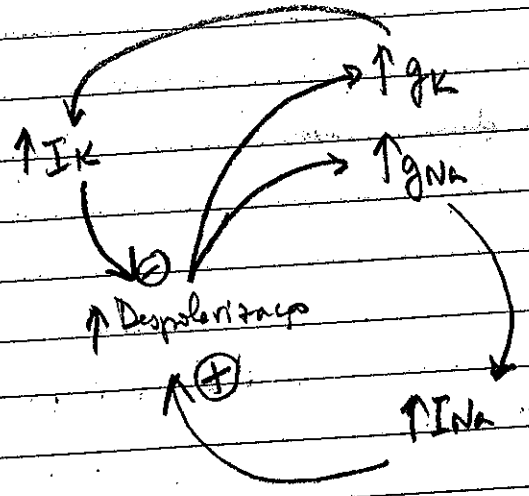
Se isto é verdade definitivamente se constitui em um "loop" de realimentação positiva e portanto um sistema como este seria instável e aumento indefinido de  $E_m$  que sabemos não ocorrer. Onde então, portanto, a realimentação negativa para estabilizar o sistema. Esta se encontra em outro "loop" de controle de  $E_m$  que "antagoniza" o efeito do íon  $\text{Na}^+$ . É constituído pelo controle do íon  $\text{K}^+$ . O esquema a seguir ilustra o efeito da despolarização sobre a



condutância aos íons  $K^+$



Esta forma seria assim:



A estabilidade se dá pela realimentação negativa da saída do  $K^+$ , mas vamos ver que há outros efeitos importantes da despolarização sobre o controle de permeabilidade aos íons.

Sistemas como estes são muito difíceis de se analisar. As dificuldades foram tremendamente minimizadas pelo uso de uma técnica denominada de método da fixação de voltagem ou "Voltage-clamp". Nesta técnica, corrente é drenada em injetada

ua célula para fixar em um valor desejado o potencial de membrana. Esta técnica foi desenvolvida por Cole & Curtis (1936) e foi brilhantemente aplicada por Hodgkin & Huxley e Katz em 1952 e Hodgkin & Huxley em 1952 para estudo do PA do axônio gigante de lula. A Figura 4.17 ilustra o esquema básico do sistema de voltaje-clamp. Dois fios de prata a e b são inseridos no

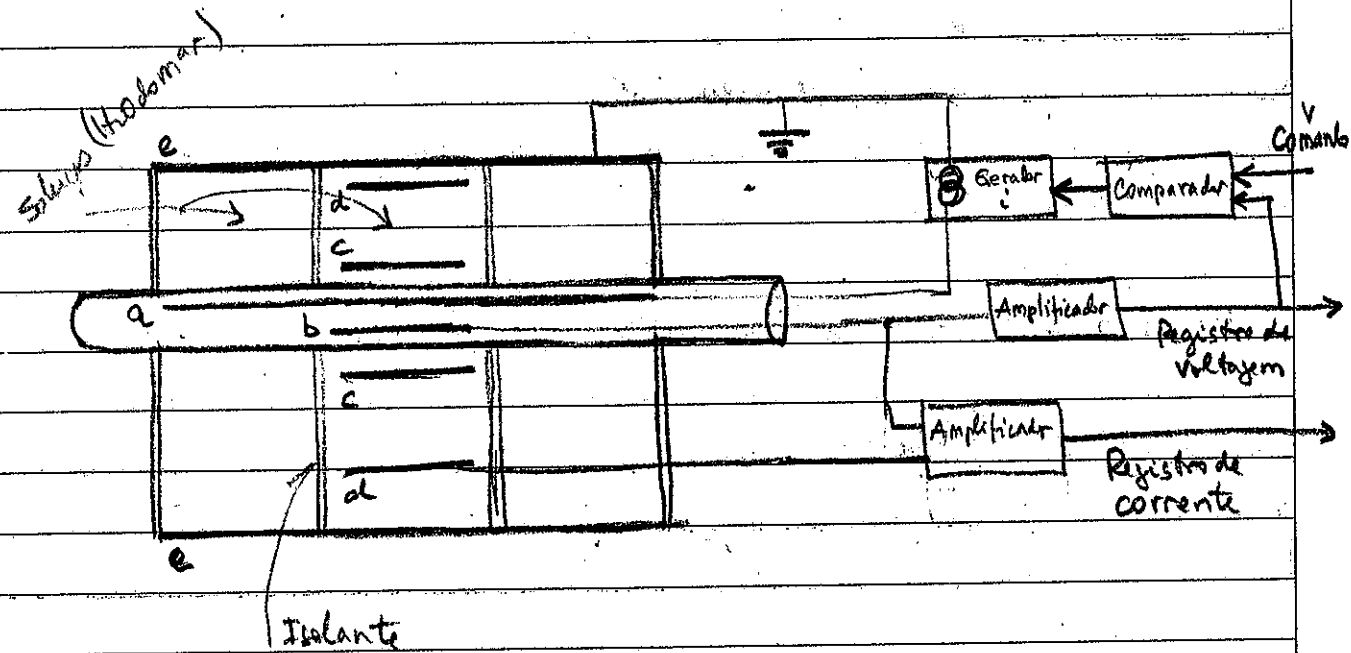


Figura 4.17 Diagrama esquemático do método usado para medir correntes de membrana em axônio de lula sob clamp de tensão (Hodgkin, Huxley e Katz, 1952)

interior do axônio. Do lado de fora um eletrodo e ligado ao terra. Corrente  $i$  passa de através da membrana do axônio por meio de um gerador conectado aos eletrodos a e e. Em uma porção central da câmara encontram-se vários eletrodos separados por duas paredes isolantes e água do mar. Na parte mais interna da câmara corrente deve fluir através da resistência fornecida pela água do mar, entre os eletrodos c e d. Assim aplicando-se a lei de Ohm sabe-se que a tensão entre c e d é proporcional a

a corrente que atravessa a membrana. A tensão através desta região da câmara é registrada por meio dos eletrodos c e b, sendo este último um dos eletrodos internos. Esta tensão, após amplificação, é alimentada a um comparador que também recebe uma outra entrada que constitui a tensão de referência para "clamping". A saída do comparador é colocada como entrada para o gerador de corrente de modo a aumentar ou diminuir a corrente que flui através da membrana e faz com que a tensão através da membrana fique igual ao sinal de tensão de referência. Este arranjo constitui-se num sistema de controle com realimentação negativa no qual a tensão através da membrana é determinada pelo sinal externo de tensão usado como comando.

O fio interno tem um papel importante, curto-circuitando as "resistências" internas o que leva a condição de "space-clamp" (clamp espacial de tensão). Neste caso não há propagação. Vamos em mais tarde, com o estudo do modelo do núcleo condutor que:

$$r_c = \sqrt{\frac{K a}{2\rho_i}}$$

Eq. 4.1

onde  $r_c$  é a relevância de condução de PA's no axônio,  $K$  é uma constante,  $a$  é o raio do axônio e  $\rho_i$  é a resistividade interna do axônio dada por:

$$\rho_i = r_i R' a^2$$

Eq. 4.2

No space-clamp  $r_i$  tende a zero por causa do curto circuito gerado pelo eletrodo interno. Assim  $\rho_i \rightarrow 0$  e  $r_c \rightarrow \infty$ . Assim  $r_c$  é a mesma em toda o axônio. Significa que nesta condição não há propagação. Dois eletrodos em pontos superficiais distantes, no axônio, "veriam" o mesmo Em durante um PA.

Assume-se que a corrente que flui através da membrana do axônio seja formada por dois componentes: uma corrente

capacitiva (causada por mudançãs na densidade de cargas dos dois lados da membrana) e uma corrente iônica (causada pela passagem de íons através da membrana). Assim, a corrente total é dada por:

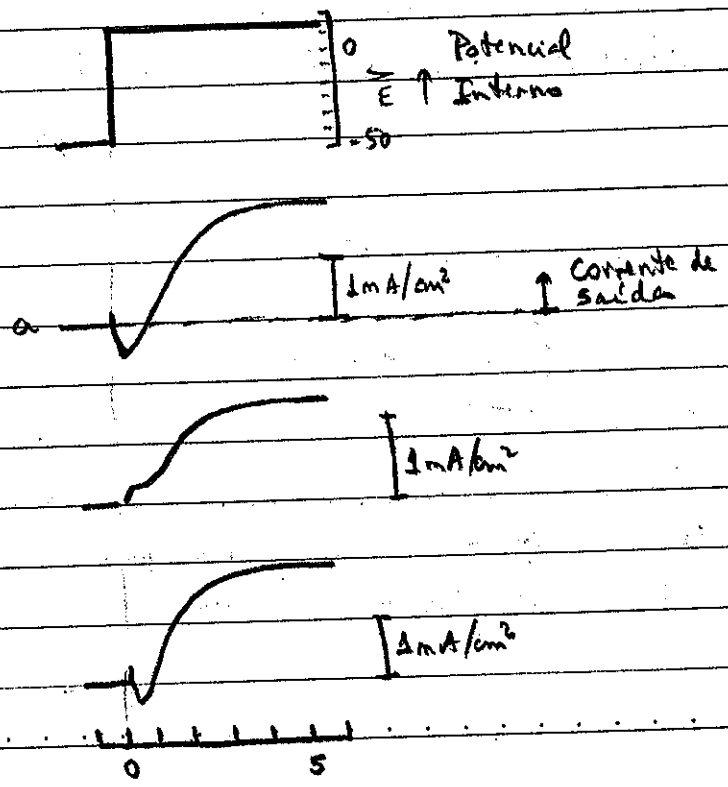
$$I = C_m \cdot \frac{dE_m}{dt} + I_i \quad \text{Eq. 4.3}$$

onde  $C_m$  é a capacitância da membrana,  $E_m$  o potencial de membrana e  $I_i$  a corrente iônica. Assim, quando  $E_m$  é mantida constante

no clamp  $\frac{dE_m}{dt} = 0$  Eq. 4.4

e o registro de fluxo de corrente é a medição direta da corrente iônica que atravessa a membrana ( $I_i$ ).

A Figura 4.18 ilustra medições feitas em 1952 por Hodgkin & Huxley.



11

Figura 4.18 Registros típicos de corrente transmembrana durante um degran de voltagem-clamp. a e c: na água do mar, b: solução sem NaCl que foi substituído por cloreto de colina (Hodgkin, 1958 a partir de Hodgkin & Huxley, 1952a)

O registro da figura 4.18 mostra 3 componentes: primeiro há uma rápida e pequena corrente de saída. Esta é causada pela descarga do capacitor de membrana (corrente capacitiva), logo após, a corrente é registrada no sentido de entrada e dura cerca de 1 ms, e finalmente a corrente se torna de saída e vai para um valor estável onde permanece enquanto o degran de tensão perdurar.

Se neste momento lembrarmos da teoria do sódio para o PA esperaríamos que a corrente de entrada inicial fosse causada por entrada de Na<sup>+</sup>. Deste modo ao retirar o íon do meio esta corrente deveria desaparecer. Isto de fato acontece como pode ser visto na figura 4.18 (condição b), ficando apenas, ao ser retirado o Na<sup>+</sup>, uma corrente de saída.

O que aconteceria se o potencial de clamp fosse posicionado mais negativo e mais positivo, passando pelo potencial de equilíbrio do Na<sup>+</sup> (E<sub>Na</sub>)? Vamos observar os dados da Figura 4.19 visando esclarecer estas questões.

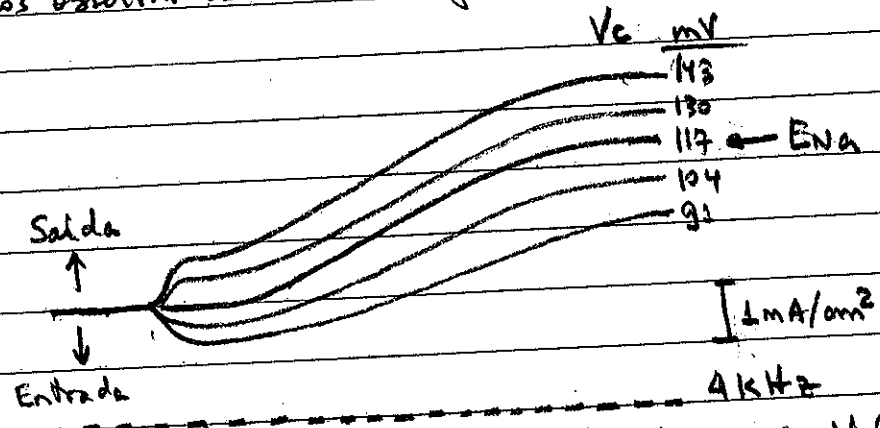


Figura 4.19 Correntes de membrana em grandes despolarizações. Valores de tensão de clamp estão à direita dos traçados. (Hodgkin, Huxley & Katz, 1952)

(16)  
 Como era de se esperar, quando o clamp é feito em  $E_{Na}$ , a corrente de  $Na^+$  desaparece ficando apenas a corrente de saída. Para  $V_c < E_{Na}$  tudo se comporta como no caso típico, ou seja, corrente de entrada seguida por corrente de saída. Para  $V_c > E_{Na}$  não há corrente de entrada e se observado atentamente o registro inclui uma corrente adicional de saída no lugar da corrente de entrada. Ora, se a <sup>corrente de</sup> entrada é devida ao  $Na^+$  para  $V_c$  mais positivo que  $E_{Na}$  a tendência seria a saída do íon para levar  $E_m$  para  $E_{Na}$  <sup>(hiperpolarização)</sup> durante aumento de permeabilidade ao  $Na^+$ .

Estes resultados indicam fortemente que o fluxo inicial de corrente nas condições de clamp se deve ao movimento de  $Na^+$ . A corrente lenta de saída é muito pouco afetada pela variação da concentração externa de  $Na^+$  e é todavia causada por movimento de outro íon, provavelmente o potássio. Uma evidência direta de que é isto que ocorre foi obtida nos experimentos com  $^{42}K$  da região do catodo (Hodgkin + Huxley, 1953). O aumento de efluxo de  $K^+$  foi linearmente proporcional à densidade de corrente com inclinação igual a constante de Faraday. Assim a corrente de saída foi mesmo estabelecida como devida a íons  $K^+$ .

A partir destes dados e da engenhosidade da montagem experimental foi possível dissociar a corrente que atravessa a membrana do axônio em dois componentes: uma corrente de saída de  $K^+$ , obtida pela remoção de 98% do  $Na^+$  externo e com clamp em  $E_{K^+}$ , e uma corrente de entrada, descrevendo no início, que é a diferença entre a corrente total e a corrente de  $K^+$ . A Figura 4.20 ilustra esquematicamente a separação das correntes de  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) e de  $K^+$  ( $I_K$ ).

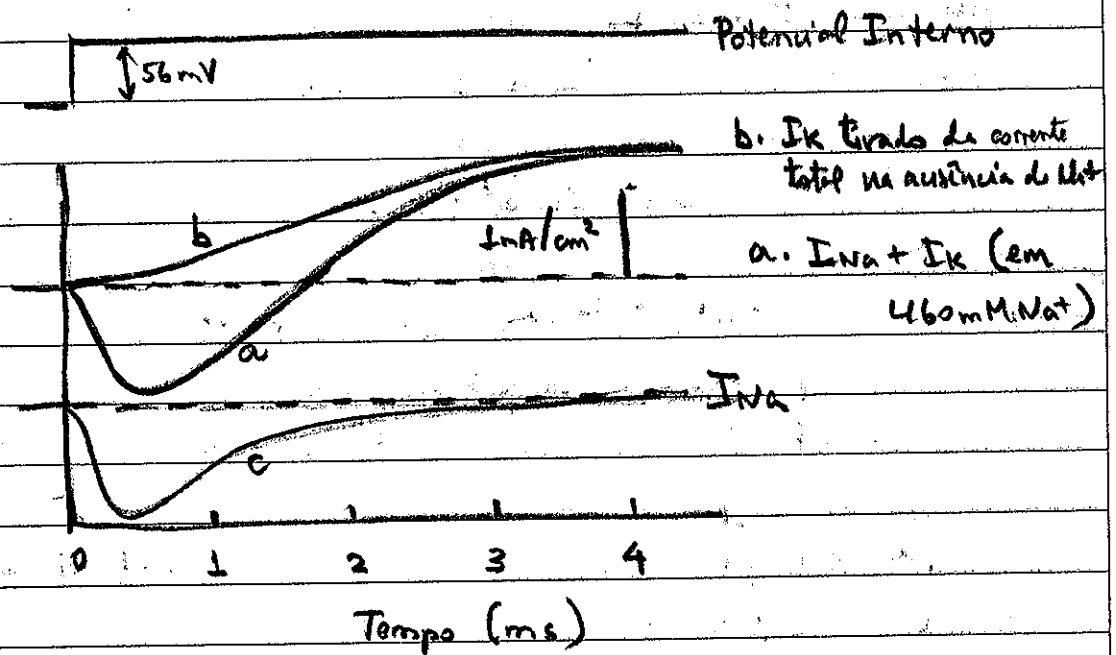


Figura 4.20 Separação das correntes de  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) e  $K^+$  ( $I_K$ ). Da corrente total (a) é subtraída a corrente  $I_K$  obtida na ausência de  $Na^+$  externa (b) para obtenção da corrente de  $Na^+$  (c).

A idéia geral estava pronta: a permeabilidade (ou condutância) ao  $Na^+$  deveria aumentar à medida que  $E_m$  fosse para valores despolarizantes, com isto geraria  $I_{Na}$  que era seguida de aumento da condutância ao íon  $K^+$  gerando  $I_K$ . Faltava agora determinar as condutâncias aos íons e estabelecer as variáveis de controle. Do que dependeriam as condutâncias? O que nestas condutâncias poderia explicar o comportamento das correntes? Pico transitório de  $I_{Na}$  e estabilização de  $I_K$  em um valor

constante, monotonicamente. Aplicando a lei de Ohm:

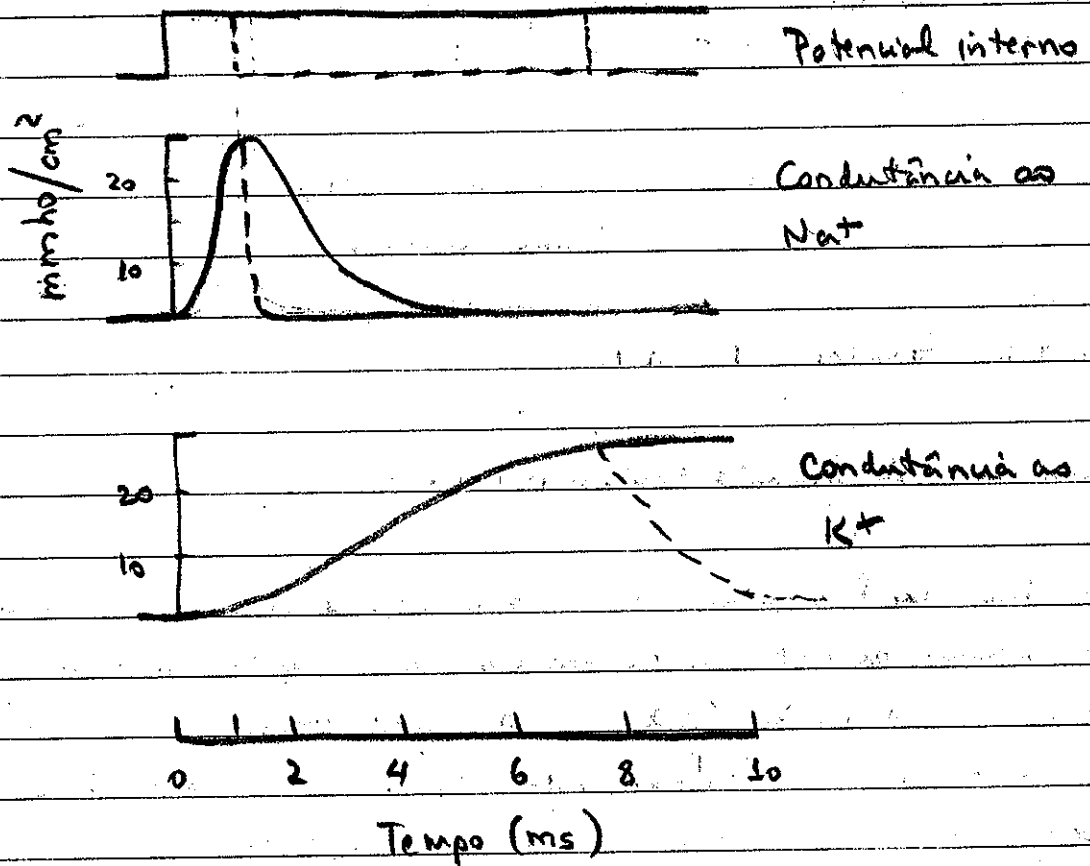
$$I_{Na} = g_{Na} (E_m - E_{Na})$$

$$= g_{Na} (V - V_{Na})$$

Deste modo, a partir do traçado a da Figura 4.20 fica fácil calcular  $g_{Na}$  conhecendo-se  $V_{Na}$ . De maneira similar a condutância ao  $K^+$  pode ser calculada do traçado b (Fig. 4.20):

$$I_K = g_K (V - V_K)$$

O resultado está apresentado no esquema abaixo:





Na Figura 4.2b estão apresentadas as células das condutâncias para diferentes níveis de potenciais, a partir da importante contribuição de Hodgkin & Huxley (1952d).

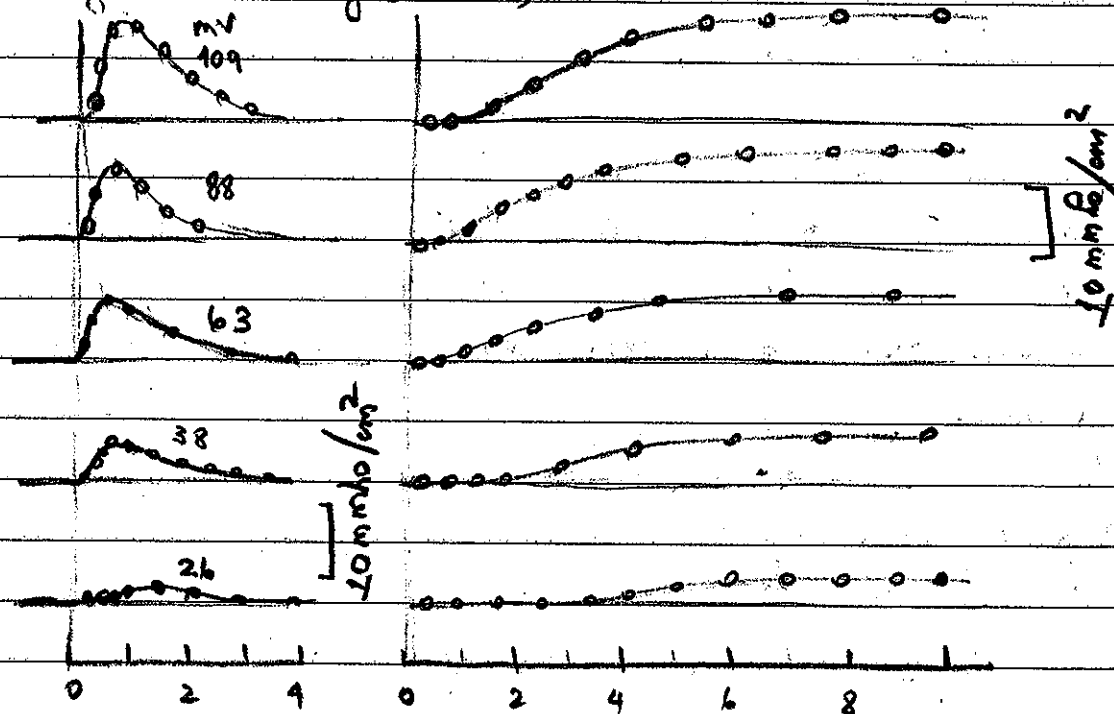


Figura 4.2b Mudanças de condutância aos íons causadas por despolarizações de diferentes níveis. Pontos são dados experimentais e as curvas são ajustadas de acordo com equações para descrever as condutâncias (Hodgkin & Huxley, 1952d).

Resumindo: A despolarização produz 3 efeitos sobre a condutância iônica: 1) aumento rápido de  $g_{Na}$  seguido por 2) lento declínio de  $g_{Na}$  (conhecido por inativação de  $g_{Na}$ ) e 3) um aumento lento da condutância ao potássio. As variações de condutância dependem do deslocamento de  $V$ . Se  $V$  é levado ao valor de repouso as mudanças nas condutâncias são revertidas. Veja que, se  $V$  é mantido  $g_{Na}$  retorna ao nível inicial. Isto significa uma dependência pura do tempo que será mais tarde esclarecida como uma inativação tempo-dependente.

## Modelo conceitual para as variações de condutância

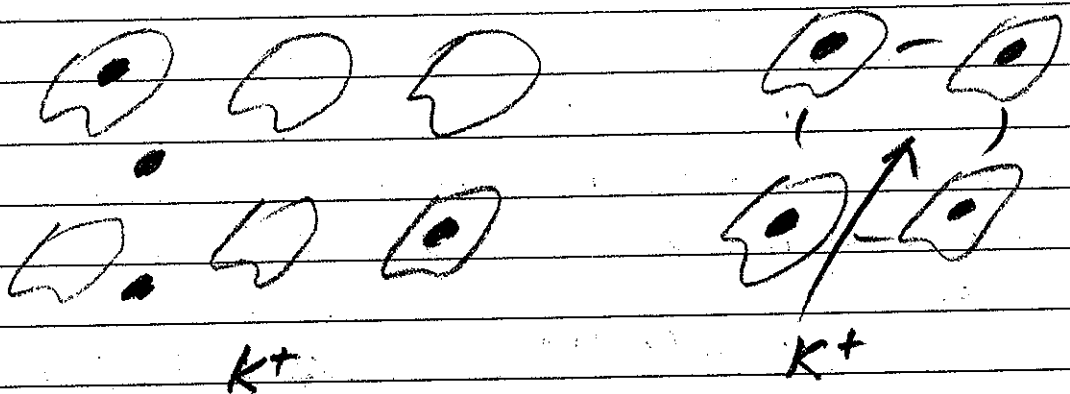
A interpretação física conceitual pode ser estudada pela observação da ideia das mudanças de  $g_{K^+}$  (mais simples).

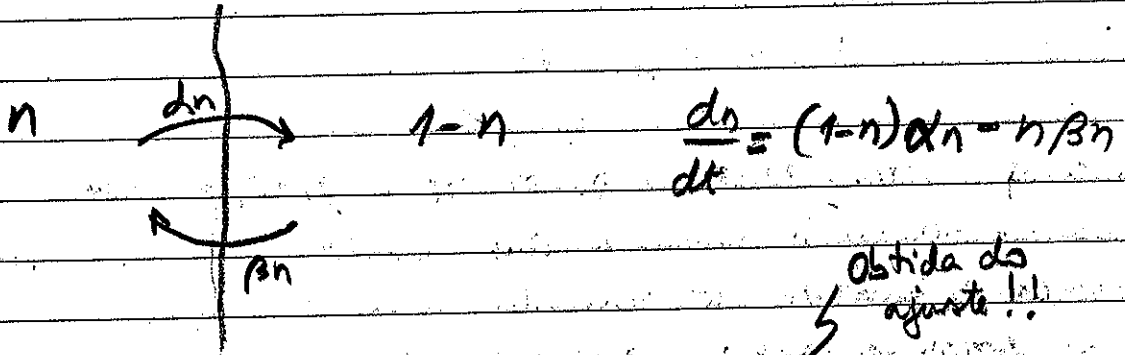
1. "Partículas" dentro ou na membrana controlam a passagem de íons  $K^+$ ;
2. Um certo número de partículas ocupam certos "lugares" na membrana;
3. Controle Probabilístico

$$\text{Prob ["Partícula" estar no lugar]} = n$$

$$\text{Prob ["Partícula" não estar no lugar]} = 1 - n$$

4. As "partículas" são independentes;
5. As "partículas" não ficam permanentemente no "lugar".



No lugarFora do lugar

Fenomenologicamente descrita:  $g_k = \bar{g}_k \cdot n^4$  Eq 4.5

A equação 4.5 foi obtida empiricamente das mudanças de condutância e ajuste de equações polinomiais.  $\bar{g}_k$  seria a máxima condutância ao  $K^+$ . A ideia, então é que os íons  $K^+$  podem atravessar a membrana quando 4 "partículas" carregadas se movem para uma certa região da membrana sob influência do campo elétrico e a variável  $n$  seria a probabilidade de que uma destas partículas estivesse no "lugar". Como descrito acima, a variação de  $n$  com o tempo seria

$$\frac{dn}{dt} = (1-n)\alpha n - n\beta n$$

equação tirada dos modelos de 2 compartimentos. As constantes  $\alpha$  e  $\beta$  são constantes de variação que a  $6^\circ C$  mudam com  $V$  de acordo com:

$$\alpha_n = \frac{0.01 (v+10)}{\exp[(v+10)/10] - 1} \quad \beta_n = 0.125 \exp(v/80)$$

(OBS.: É um bom exercício verificar na literatura como as constantes  $\alpha$  e  $\beta$  são determinados experimentalmente.)

Usando raciocínio semelhante, a condutância  $g_{Na}$  é dada por:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} \cdot m^3 \cdot R$$

onde  $\bar{g}_{Na}$  é uma constante que representa o máximo valor de  $g_{Na}$ . A equação é baseada na hipótese de que a condutância ao sódio seria controlada por 3 "partículas" cada uma com probabilidade  $m$  de estar no "lugar" certo, produzindo ativação de  $I_{Na}$  ( $m$  = variável de ativação do íon  $Na^+$ ) e o processo é inativado por um evento de probabilidade  $(1-h)$ . A variável  $m$  é dada por:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha m (1-m) - \beta m^2$$

onde, a  $6^\circ C$

$$\alpha m = \frac{0.1 (V+2.5)}{\exp[(V+2.5)/10] + 1}, \quad \beta m = 4 \exp(V/18)$$

e  $h$ , a  $6^\circ C$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha h (1-h) - \beta h^2$$

$$\alpha h = 0.07 \exp(V/20), \quad \beta h = \frac{1}{\exp[(V+20)/10] + 1}$$

A corrente total de membrana,  $I$  é então dada por:

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + \overbrace{I_C + I_{Na} + I_e}^{I_{tot}}$$

$$= C_m \frac{dV}{dt} + g_K (V - V_K) + g_{Na} (V - V_{Na}) + g_e (V - V_e)$$

$$= C_m \frac{dV}{dt} + \bar{g}_K \cdot n^4 (V - V_K) + \bar{g}_{Na} \cdot m^3 \cdot R (V - V_{Na}) + g_e (V - V_e) \quad Eq. 4.6$$

## Cálculo DA FORMA DO PA

Agora, se o modo concentric está correto e possível na equn. 4.6 tem o valor de  $V$  a partir do conhecimento de  $I$ .  $V$  pode ser obtido por integração numérica. Uma solução simples é obtida quando uma porção significativa da membrana é excitada por um eletrodo interno. Neste caso não há propagação e o fluxo de corrente resultante através da membrana é zero. A corrente iônica será igual ao negativo da corrente capacitiva. Isto é conhecido como potencial de ação não-propagado. Se a propagação for permitida novos termos devem ser considerados (obtidos da equação do núcleo condutor que veremos mais tarde):

$$I = \frac{a}{2R\theta^2} \frac{d^2V}{dt^2}$$

onde  $a$  é o raio do axônio,  $R$  a resistência do axoplasma e  $\theta$  a velocidade de condução. O valor exato de  $\theta$  tem que ser encontrado por tentativa e erro - aqui valores incorretos podem levar  $V$  ao infinito.

Tomando-se os valores numéricos para as constantes  $E_k$ ,  $E_{Na}$ ,  $E_c$ ,  $R_e$  e  $C_m$  e as equações obtidas para  $g_{Na}$  e  $g_k$  a forma do PA pode ser calculada.

A partir dos experimentos de temp H-H foram capazes de determinar como  $g_k$  e  $g_{Na}$  dependem de  $V$  e do tempo. Vamos agora falar que

$$g = f(E_m, t)$$

$$V \text{ varia } E_m$$

$$V_x = E_x \begin{matrix} \rightarrow E_{Na} \\ \rightarrow E_c \end{matrix}$$

A Figura 4.22 ilustra potencial de ação calculado e sua comparação a um PA medido.

(Huxley calculou tudo por integração numérica com calculadora manual!!)

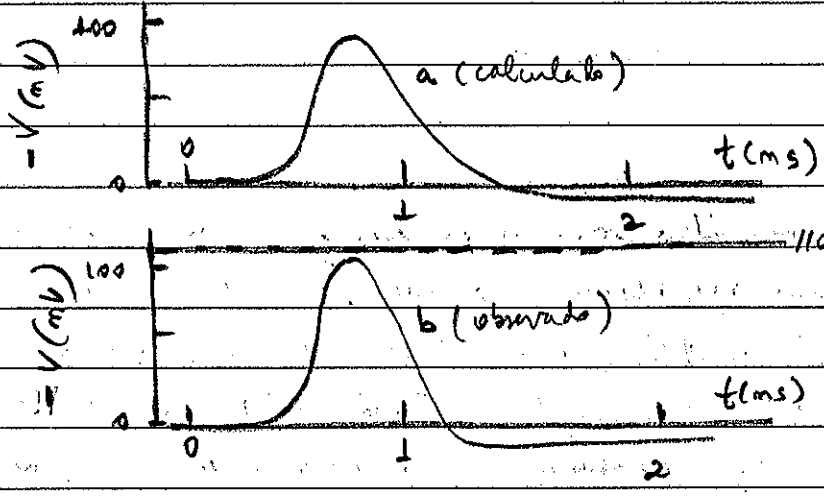


Figura 4.22. Comparação de PA<sub>s</sub> <sup>propagadas</sup> calculada (a) e medida (b) em axônio de Lula, a 18°C. A velocidade de condução calculada foi de 18.8 m/s. A velocidade observada foi de 21.2 m/s (Hodgkin + Huxley, 1952 d).

A Figura 4.23 a seguir é uma figura clássica muito usada para mostrar um PA propagado e as respectivas mudanças nas condutâncias iônicas.

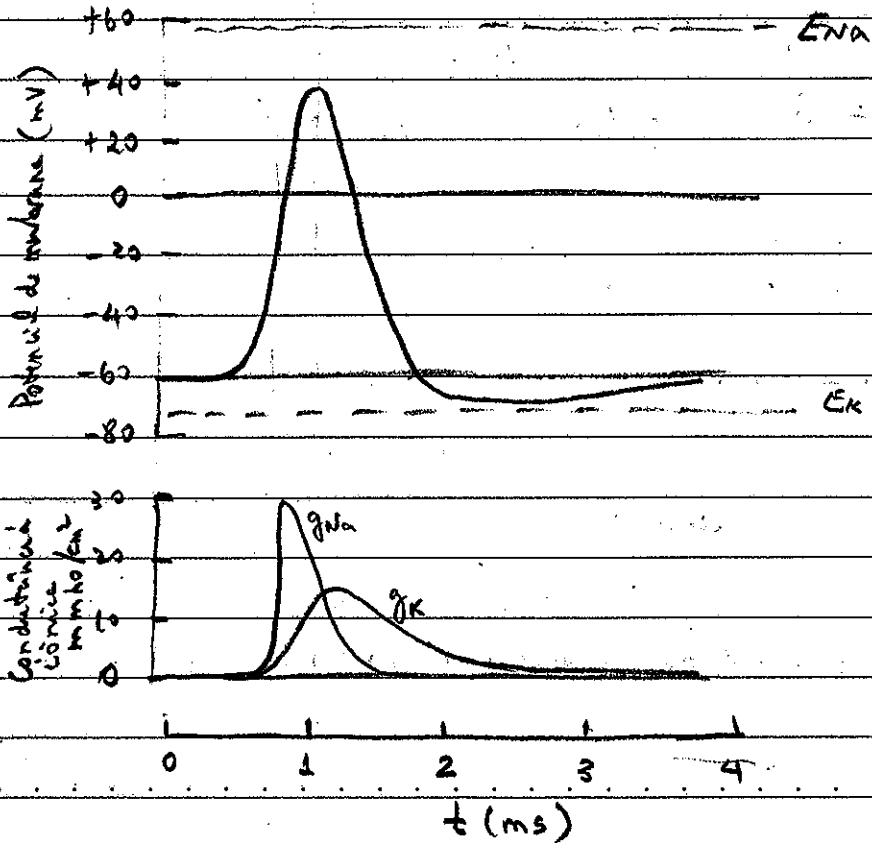


Figura 4.23 Cálculo das mudanças de  $g_K$  e  $g_{Na}$  durante um Pt propagado (curva superior). Originalmente calculado de modo mais preciso por Hodgkin & Huxley, 1952d.

Agora sim vamos apresentar uma "colher de chá" aos engenheiros elétricos. Uma boa síntese das ideias do modelo de H-H pode ser feita utilizando um modelo elétrico da membrana com as respectivas condutâncias. Esta síntese está apresentada na Figura 4.24 na qual  $E$  é o potencial de membrana (ddp dentro em relação ao meio externo) e as resistências  $R$  invertem las condutâncias.  $C_m$  é a capacitância da membrana.  $I_e$  é um ramalhido de corrente (leak) talvez devido a passagem mais livre de íons cloreto através da bicamada.

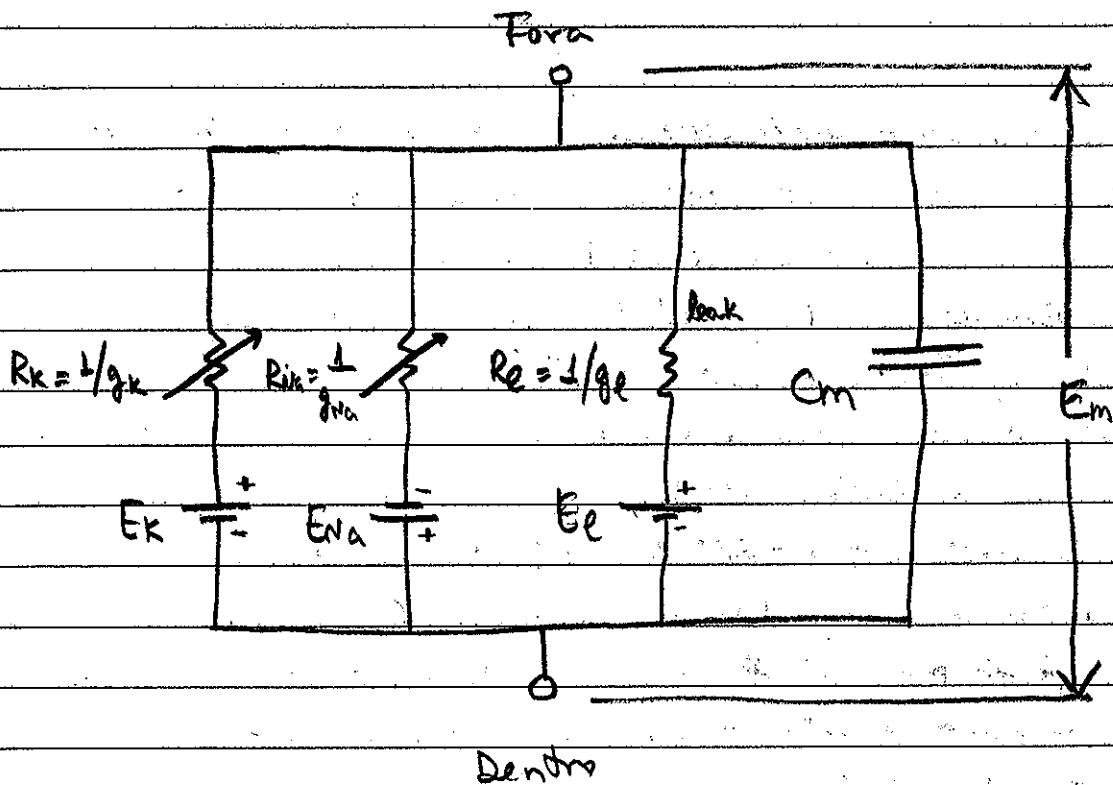


Figura 4.24 Modelo conceitual de um "patch" (pedaço) de membrana excitável. Veja que os potenciais de equilíbrio são baterias "constantes".

Neste modelo vamos assumir que o gradiente de concentração de um certo íon atua como uma bateria, cuja força eletromotriz seja dada pela equação de Nernst. Por exemplo, há uma "bateria de  $K^+$ ",  $E_K$ , cuja força eletromotriz é dada por:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \log_e \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

No axônio de lula,  $E_K \approx -70 \text{ mV}$  (negativo dentro!). De modo similar

$$E_{Na} = \frac{RT}{zF} \log_e \frac{[Na]_o}{[Na]_i}$$

e  $E_{Na}$  é tipicamente  $+55 \text{ mV}$ . Os outros íons, los mais  $Cl^-$  seria o mais expressivo, contribuem com uma terceira bateria  $E_{Cl}$  que pode produzir uma "corrente de fuga". O valor de  $E_{Cl}$  está próximo de  $-55 \text{ mV}$ . Em série as baterias estão as condutâncias variáveis  $g_{Na}$  e  $g_K$  e uma constante  $g_{Cl}$ . Estas representam, então, a facilidade com que os íons atravessam a membrana. Estes 3 "canais" "iônicos" estão ligados em paralelo e são assumidos independentes. As correntes que fluem por estes canais são  $I_{Na}$ ,  $I_K$  e  $I_{Cl}$ . O efeito capacitivo está representado por  $C_m$ .

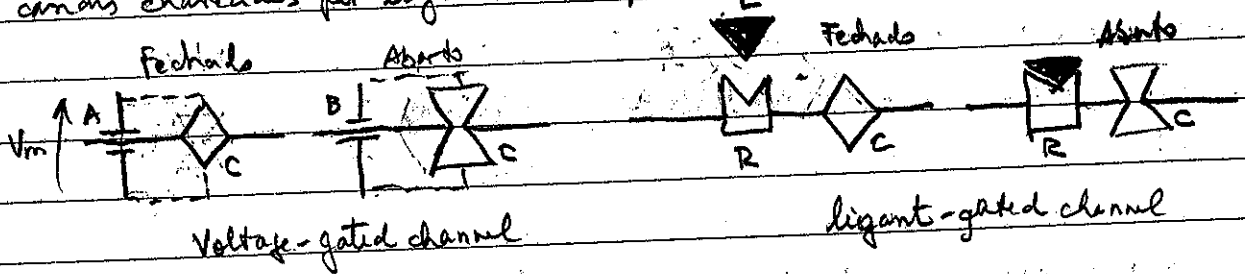
Resumo. Em repouso,  $E$  depende das condutâncias relativas e neste caso  $g_K \gg g_{Na}, g_{Cl}$ , assim  $E_m$  tenderá a  $E_K$  — diz-se que  $E_R$  é próximo de  $E_K$  — Quando a membrana é excitada (deslocamento de  $E_m$  para  $E_m$  positivo)  $g_{Na}$  aumenta e então  $E_m \rightarrow E_{Na}$ .  $g_{Na}$  atinge um máximo e depois de modo tempo dependente,  $E_m$  segue  $g_K$  aumenta tendendo a levar  $E_m$  para  $E_K$  e um íto o curto tempo. O dia PA é justificado.

— "Elétricos" pensam nisso!! —



## 4.6. Canais Iônicos

Com o trabalho de H-H ficou claro que as condutâncias dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  variam com o potencial de membrana. Na verdade as condutâncias são chamadas para, ativadas, pelo  $E_m$ . Do mesmo modo, canais seletivos aos respectivos íons são ativados por  $E_m$ . A abertura ou fechamento de milhares destas unidades é que confere à membrana maior ou menor permeabilidade ao íon. Vamos ver que os canais de membrana se dividem em duas grandes categorias: os canais voltagem-dependentes ou canais chamados por tensão e os canais chamados por ligantes. O esquema abaixo ilustra os dois tipos



de canais. No caso à esquerda, quando  $V_m$  através da membrana muda, da condicão A para B o canal C se abre. À direita, quando o ligante L se acopla a um receptor <sup>seletivo</sup> de membrana o canal C se abre.

Vamos agora falar dos canais ativados por tensão. Dentre o canal de  $\text{Na}^+$  é um dos que se tem maior grau de conservação, em seja, é "o mesmo" em todos os tipos celulares e espécies. Os estudos de voltage-clamp de H-H dão informações gerais sobre o comportamento dos canais, mas não pode informar sobre a atividade individual de um canal específico. O método mais adequado para isto é o chamado de patch-clamp (patch = pedaço). Nesta técnica uma área muito pequena de membrana pode ser submetida a clamp de tensão e os canais, que podem ser em número muito pequeno ou apenas um, do patch estudados. As primeiras medições desta natureza foram feitas por Neher e Sakmann (1976), estudando os canais de acetilcolina em músculos denervados. A Figura 4.25 ilustra a técnica. Um micro-eletrodo de vidro é construído, a partir do aquecimento e estiramento de um capilar de borossilicato (vidro) de modo a se obter uma ponta de 1-2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A ponta deve ser polida e eventualmente tratada com oxirina para reduzir

a condutância e capacitância do vidro, além de conferir a ponta um formato adequado, normalmente em forma de bala (bullet shape). Este microeletrodo é preenchido com solução fisiológica cuja composição depende do que se deseja para o caso específico. Em princípio deve ser isotônico com relação ao meio intracelular. O eletrodo é conduzido por um micromanipulador até tocar a membrana da célula (a). Neste momento há a formação de um selo de baixa resistência entre o vidro e a membrana. A resistência entre o meio interno do eletrodo e o banho cresce para cerca de 500 MΩ. Pequena corrente negativa é aplicada ao eletrodo (por sucção) de modo que a membrana seja puxada para dentro do eletrodo, aumentando a área de contato eletrodo - membrana e a força de contato. Isto estimula uma "reação" da membrana com o vidro que culmina com a formação de um selo de alta impedância, o chamado tight-seal ou giga-seal (selo de  $\geq 1 \text{ G}\Omega$ ). Neste momento é estabelecida a configuração denominada cell attached (célula ligada).

A partir desta configuração, outras 3 podem ser atingidas com os puxos mostrados na figura.

Assim pode-se trabalhar em cell-attached,

Inside-out, outside-out e whole-cell.

No caso whole-cell (célula toda) os registros são semelhantes ao que foi feito por H-H.

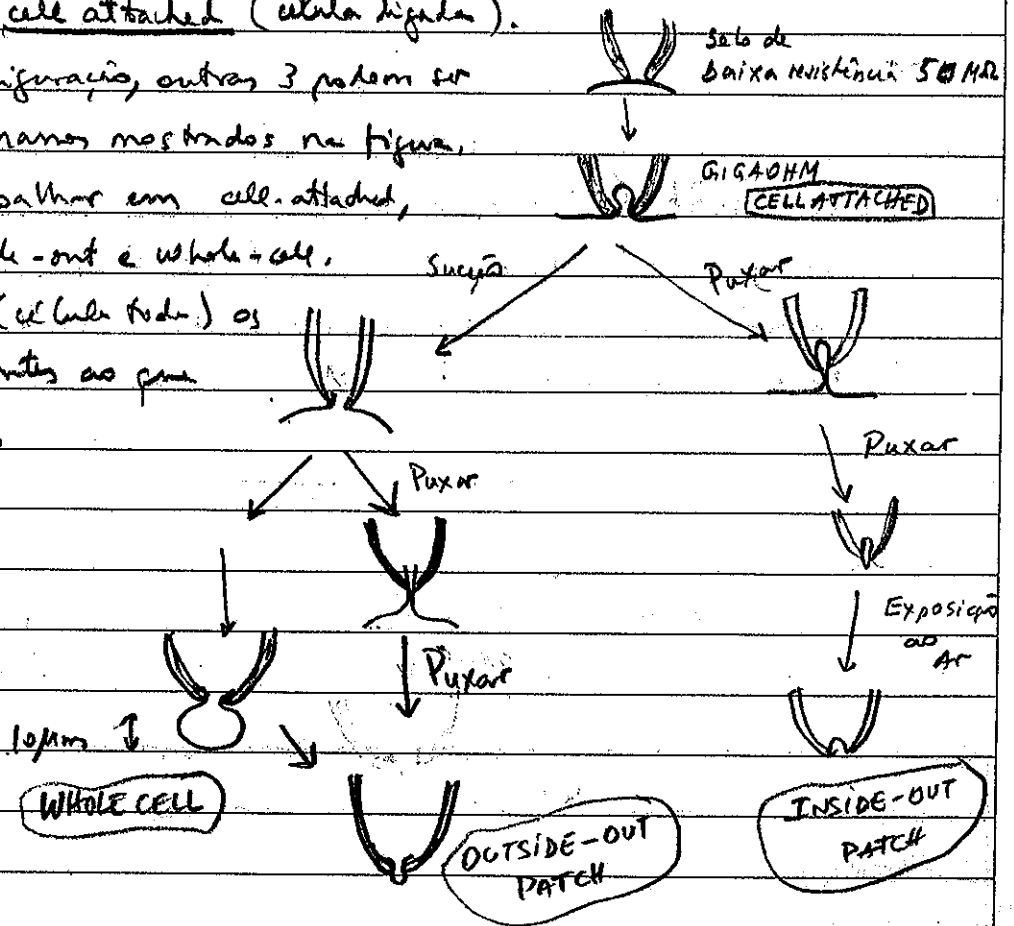
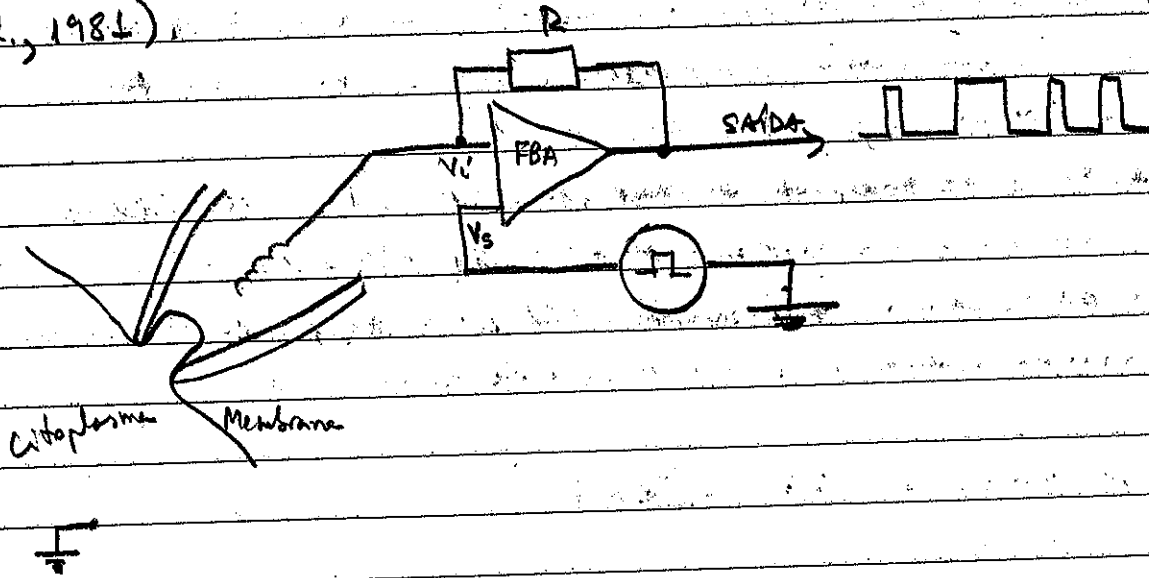


Figura 4.25 Configurações de patch-clamp

O circuito de Voltage-clamp consiste de um amplificador de alto ganho no qual a saída é realimentada através do resistor  $R$  à entrada. Isto garante que a tensão  $V$  seja mantida próxima ao sinal de comando  $V_s$ . A saída é proporcional a corrente que flui através do patch em contato com o eletrodo. Esquema geral do patch clamp (Hamill et al., 1981).



A Figura 4.26 ilustra o primeiro experimento no qual se registram correntes iônicas com a técnica de patch-clamp. Os pesquisadores, interessados em medir canais de sódio em myoblasts que são células esféricas em cultura, usaram TEA para bloquear canais de  $K^+$ .

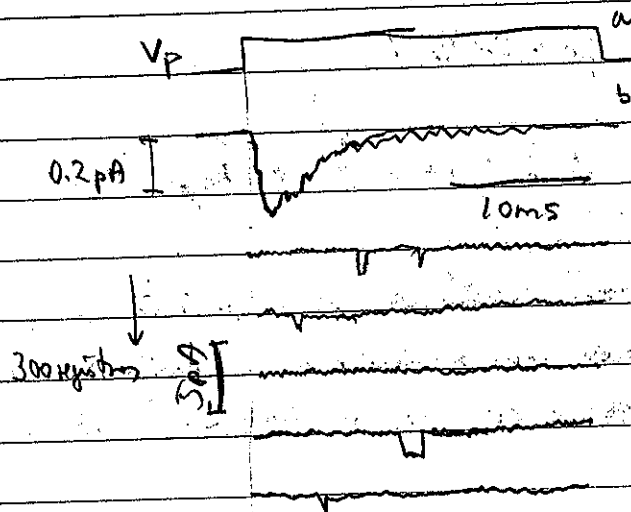


Figura 4.26 Correntes de canal iônico de Na em célula muscular de rato, em cultura.  $V = -30mV$   $V=0$  e o potencial de repouso (Sigworth and Neher, 1980).

→ 1.2  
0.24

Note que cada registro pode conter ou não variações de corrente que correspondem a aberturas de um canal. A despolarização aumenta a probabilidade de abertura dos canais e assim a corrente total que flui pela membrana. O traço do b corresponde a somatória de todas as respostas individuais pelo mesmo pulso de clamp. O canal existente se abre distribuído no tempo de modo estocástico. Esta forma + soma temporal se comporta como se vários canais fossem sendo ativados pelo mesmo pulso. Observe o nível de corrente que flui por um canal ( $n \pm 5 pA$ ).

A dinâmica de transporte de íons por canais pode ser obtida das equações de H-H. Para um pulso de clamp de  $-50$  para  $-10$  mV para patches de  $n=1$  no qual a corrente média foi de  $1.6 pA$  como na figura anterior podemos calcular o número de íons  $Na^+$  que transitam:

$$N^{\circ} \text{ de íons/s} = \frac{1.6 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{23}}{9.6 \times 10^4} = \frac{10^7 \text{ íons}}{5}$$

$$\left( \frac{\text{corrente em A} \times \text{n}^{\circ} \text{ de Avogadro}}{\text{Constante de Faraday}} \right)$$

O tempo médio de abertura dos canais foi de  $0,7$  ms, portanto uma média de  $7000$  íons passam em cada canal antes que ele se feche. A condutância do canal aberto,  $g$ , pode ser obtida:

$$i = g(V - V_{Na}) \quad -50 \text{ a } +40$$

$$g = 1.6 pA / 0.09V = 18 pS$$

Note como não vamos nos aprofundar sobre o tema canais, contudo é importante que uma ideia do modelo mais comumente usado para explicar seu funcionamento seja dada. A figura 4.27 ilustra os componentes básicos do canal de sódio. Este...

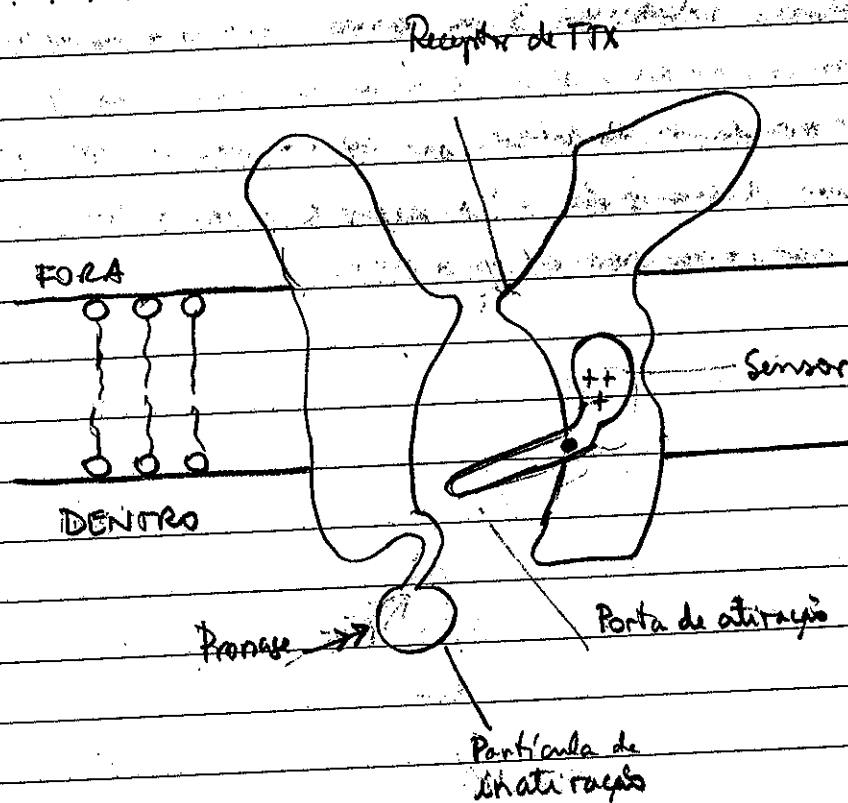


Figura 4.27 Desenho esquemático para mostrar as principais características do canal de sódio (Baseado parcialmente em diagramas por Armstrong, 1981 e Hille, 1984 in Aidley, 1989)

O movimento de cargas (veja sensor de voltagem) na membrana é muito menor e antecede a corrente capacitiva e a corrente iônica. Este transporte de cargas é denominado de "gating currents" (correntes de chaveamento). Bloqueando o canal com Tetrodotoxina e eliminando-se eletronicamente a corrente capacitiva (simétrica) pode-se medir as correntes de chaveamento.

Pode-se remover metabolicamente a inativação do canal por perfuração interna com a enzima, significando que a parte da molécula do canal responsável pela inativação deve ser mais acessível ao citoplasma. A ideia sugerida pelo esquema é que mesmo com o canal aberto a partícula de inativação se move na direção do poro e impede a passagem do íon.

Há bloqueadores seletivos do canal de sódio, como a tetrodotoxina.

e a saxotexina. Alguns anestésicos locais como Procaina e Lidocaína agem bloqueando canais de  $Na^+$ . O sítio de ligação para estes bloqueadores parece se localizar no filtro de seleção já no interior da membrana.

Há inúmeras classes de canais de  $K^+$  e diferentes tipos de canais de  $Ca^{2+}$  e de outros íons que não iremos abordar neste curso.

4.7. Potencial de ação cardíaco (Elementos)

O evento que inicia o processo de acoplamento ~~em~~ ~~três~~ ~~contrações~~ nos músculos cardíacos é o potencial de ação (PA). Como já definido para o caso do nervo, o PA é uma variação característica do potencial de membrana (Em) que depende da complexa atuação de muitos canais iônicos e transportadores, e neste caso das mesmas variáveis intracelulares de concentração de cálcio iniciadas pelo PA. As mudanças de Em durante o PA definirão a força eletromotriz que influencia muitos canais e transportadores. O PA é o sinal que se propaga por todas as células do coração de modo que a seu tempo cada uma (e todas na forma de uma rede conexa) seja ativada e produza sua atividade contrátil em maior ou menor grau. Vamos encontrar outra atuação no PA ventricular, passando rapidamente pela morfologia dos PAs nos diversos regiões do coração com uma pequena atenção às fontes geradoras da atividade de marcapasso.

A Figura 4.28 ilustra as variações regionais do PA no coração de mamíferos.

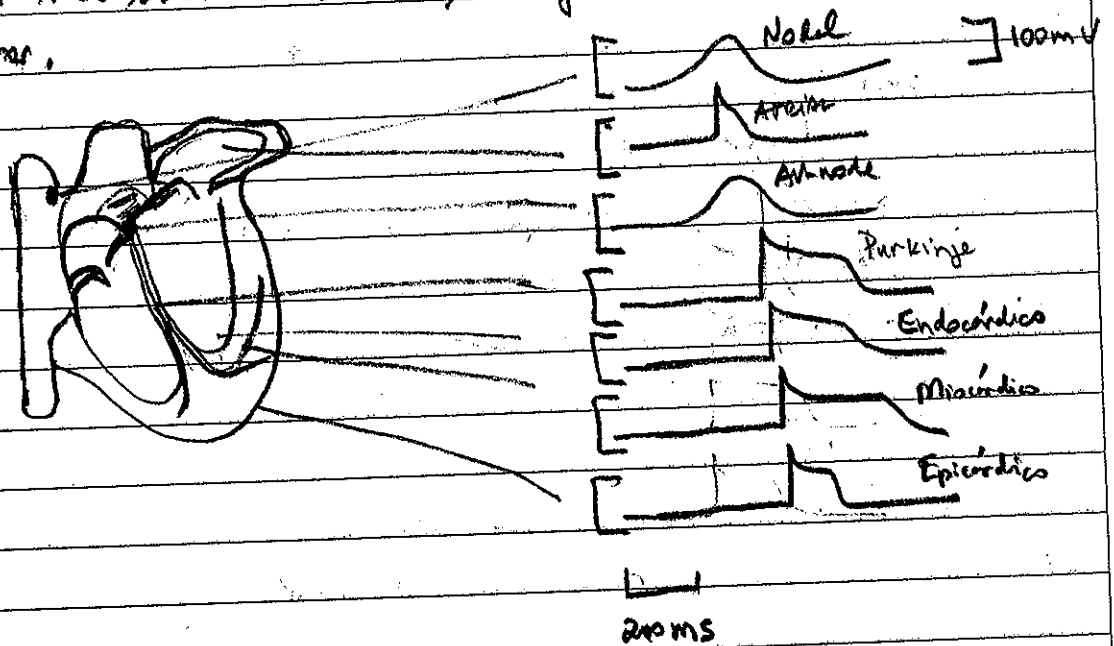


Figura 4.28. Variações regionais do curso temporal dos PA. A partir da.

pico dos PAs caracteriza aproximadamente os atrasos de ocorrência nas diversas regiões. Por exemplo o atraso entre o pico atrial e de Purkinje corresponde ao intervalo P-R do eletrocardiograma - será visto mais adiante -

O potencial de repouso das células do coração também apresenta diferenças regionais. Nas células ventriculares, PR fica em torno de  $-80mV$  e no nódo sinusal entre  $-60$  e  $-50mV$ . A Figura 4.29 mostra um PA típico de células ventriculares de coelho (PA calculado pelo modelo de Luo & Rudy, 1991 por meio do programa LabHeart desenvolvido por J. Puglisi & D.M. Bers).

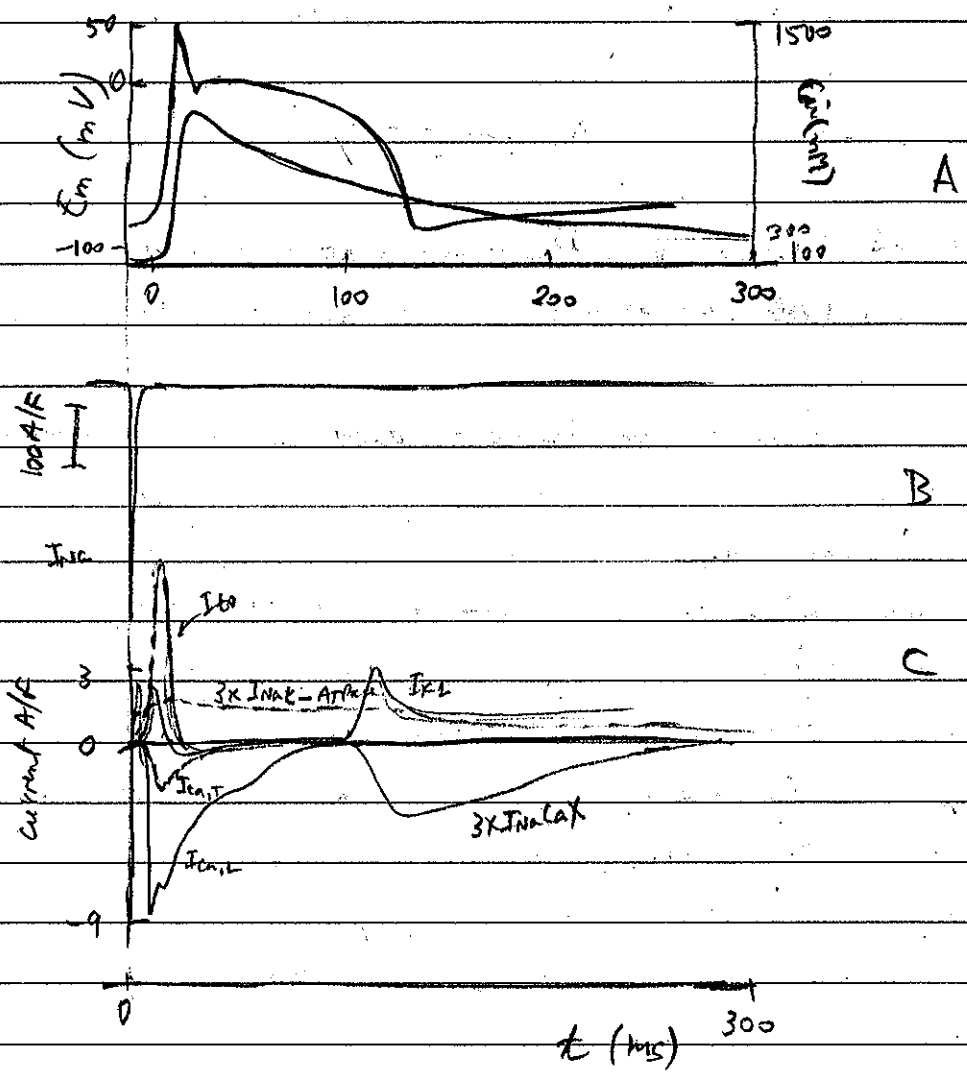


Figura 4.29. Curso temporal do PA ventricular de coelho superimposto ao