

3

Canais Iônicos Clássicos

São proteínas que agem como um poro na membrana celular e permitem a passagem seletiva de íons (como íons de Potássio, os íons de Sódio e íons de Cálcio), por meio do qual passa a corrente elétrica dentro e fora da célula. Estas proteínas são chamadas canais iônicos e podem possuir mais duas características importantes: (i) seletividade a um determinado tipo de íon; (ii) responsividade a sinais elétricos, mecânicos ou químicos (Mal04).

Canais iônicos são encontrados em grande variedade na membrana celular. São proteínas que se estendem transversalmente de um lado a outro da membrana, ou seja, são poros macromoleculares. Sua função consiste em facilitar a passagem de determinados íons através da membrana (Eis98).

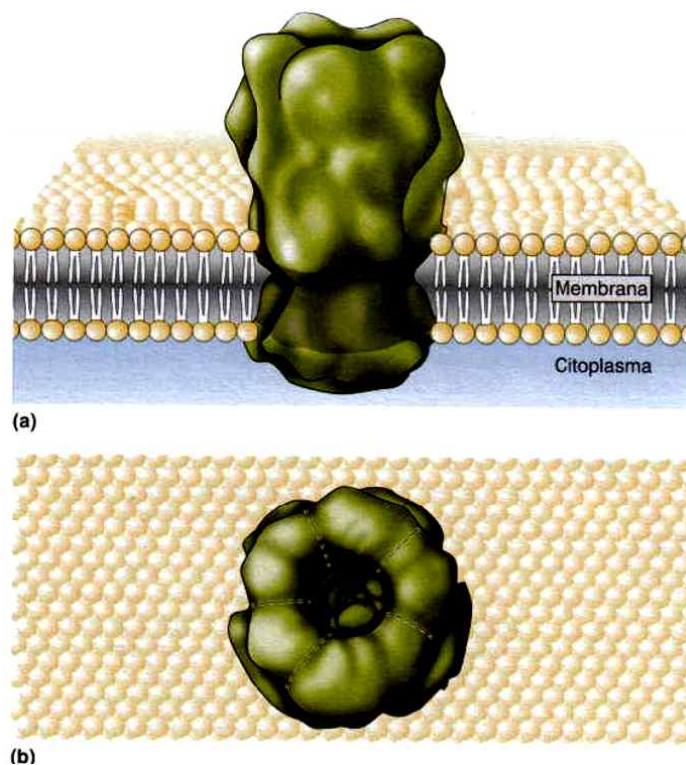


Figura 3.1: (a) Canal iônico ligando o meio interno e externo da célula; (b) Canal iônico através de uma visão transversal.

No que se refere ao mecanismo de transporte através da membrana

celular, este pode ser dividido em dois tipos: transporte através de carregadores ou transporte através de poros.

Os carregadores podem ser entendidos como uma espécie de rebocador onde as moléculas engatadas em sítios específicos são rebocadas de um lado à outro da membrana celular, enquanto os canais iônicos são entendidos como túneis ligando o meio extracelular com o intracelular (Hod52).

Sendo assim, neste capítulo apresentamos os canais iônicos, suas características morfológicas e sua importância na fisiologia celular, como também, funções biofísicas exploradas pelos experimentos realizados por Hodgkin através da técnica do voltage clamp que veremos a seguir (Hod52).

3.1

A Técnica Voltage-Clamp

A técnica denominada voltage-clamp, que foi desenvolvida por (Col49), (Mar49) e (Hod52), trouxe novas informações sobre as correntes da membrana e reforçou os argumentos da teoria que atribui ao Sódio e ao Potássio a protagonização no processo de determinação do potencial da membrana. Essa técnica é um dos experimentos pioneiros no estudo de canais iônicos e vem a mais de 50 anos produzindo uma grande riqueza de detalhes sobre o funcionamento e funções dos canais. Assim, biofísicos e fisiologistas vêm elaborando modelos empíricos para descrever e catalogar este vasto conjunto de informações e o primeiro modelo é atribuído a Hodgkin e Huxley.

Esses modelos empíricos não explicam fisicamente o mecanismo de abertura dos canais, porém são mais acessíveis do que os modelos matemáticos analíticos dada a complexidade inerente ao sistema físico ao qual pertencem os canais iônicos. Para se estudar com mais detalhes o mecanismo de abertura dos canais são utilizados modelos estatísticos mais acessíveis que os modelos analíticos e com a vantagem de propiciar interpretações físicas acerca de variáveis presentes nos modelos fenomenológicos (Cru79).

A técnica de voltage-clamp consiste em inserir dois eletrodos finos ao longo do axônio gigante da lula. Esses eletrodos são conectados a um gerador de corrente, um controlador e um registrador como ilustrado na Fig.(3.2). Todos os pontos do axônio têm o mesmo potencial elétrico, pois considera-se que a resistência dos eletrodos é baixa o suficiente. Assim, o potencial elétrico varia apenas com o tempo e permanece fixo no espaço, semelhante a uma célula pontual.

O próximo passo é colocar um dos eletrodos emparelhados com outro que encontra-se fora do axônio, medindo assim, a diferença de voltagem V através da membrana celular. O segundo eletrodo injeta ou retira corrente da

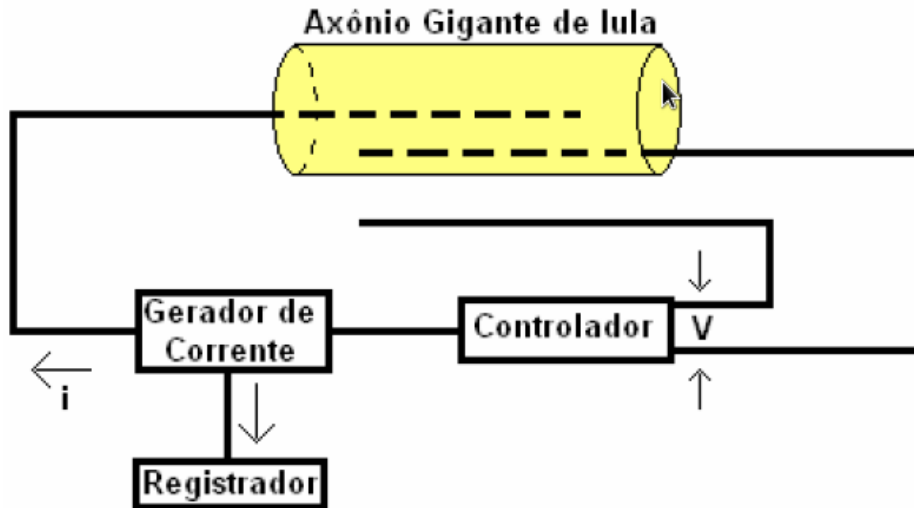


Figura 3.2: A técnica de voltage-clamp representada por um arranjo experimental. Figura extraída da referência (Cru79).

célula, na quantidade necessária para manter a diferença de potencial entre as faces da membrana em dado valor escolhido. Essa corrente permite que o cálculo da condutância (g) da membrana através da 1ª lei de Ohm ($i = gV$) seja realizado.

O aparato experimental demonstrado na Fig.(3.2), assim como, o procedimento experimental descrito anteriormente, caracterizam a técnica de fixação de voltagem ou voltage-clamp.

3.2

A Técnica Patch-Clamp

A técnica patch-clamp é aplicada no estudo eletrofisiológico de canais iônicos. Com essa técnica é possível estudar a atividade de poucos canais e até mesmo de um único canal. Ela é usada em muitas áreas de pesquisa biológica como a neurologia, farmacologia e biologia molecular. Foi desenvolvida por Erwin Neher e Bert Sakmann em 1976 e pode ser vista como um refinamento da técnica de voltage-clamp (Bea06). Essa técnica é composta por uma micropipeta que possui em seu interior um eletrodo (ver Fig.(3.3)). Seleciona-se uma pequena parte da membrana celular, seguindo a mesma técnica do voltage-clamp. A diferença entre os dois experimentos está na área celular estudada e no número de canais considerados (Mol02).

Durante o processo de medição, percebe-se que a corrente que flui através da micropipeta é a mesma que flui através da membrana e assim, uma tensão conhecida é aplicada através da membrana, permitindo que se faça medições da corrente (Mol02).

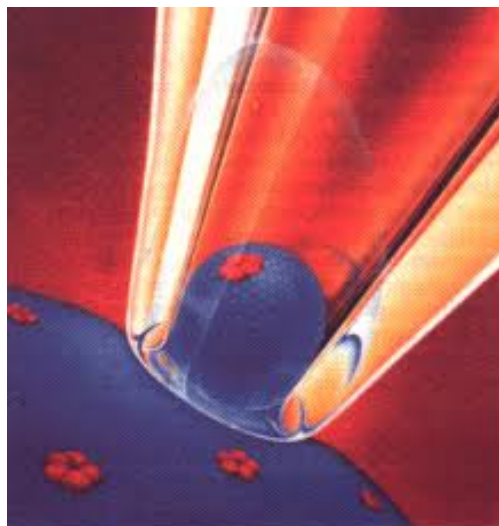


Figura 3.3: A técnica de patch-clamp representada com uma micropipeta.

No que se refere a uma abordagem estatística verifica-se experimentalmente que os canais apresentam comportamento típico de um sistema de estados discretos markovianos. Observações experimentais mostram ainda mudanças aleatórias entre os estados condutivo e não-condutivo de um canal. Essas medições estatística da abertura e fechamento num determinado período de tempo, permitem que sejam calculadas as probabilidades de um canal estar em determinado estado num determinado momento (Kam92).

É importante observar que ambas as técnicas eletrofisiológicas (voltage-clamp e patch-clamp) medem a corrente iônica através dos canais, enquanto o potencial na membrana é mantido constante.

3.3

Canal de Potássio

Os Canais de Potássio são os mais abundantes na membrana plasmática e os que possuem a maior diversidade entre os canais iônicos. Os Canais de Potássio foram descobertos em 1902 por Julius Bernstein, fisiologista alemão, que propôs a “Teoria da Membrana” (teoria do potencial elétrico em tecidos e células). Essa teoria foi considerada a primeira explicação físico-química dos eventos bioelétricos. Segundo Bernstein, as células excitáveis eram cercadas por uma membrana seletivamente permeável a íons de Potássio K^+ no estado de repouso e, durante a excitação, a permeabilidade da membrana a outros íons aumentava (Doy98).

3.3.1

Corrente de Potássio

Os pesquisadores Hodgkin e Huxley modelaram a corrente de potássio da seguinte forma:

$$I_K = g_K^{max} n^4 (V - E_K), \quad (3-1)$$

onde n , segundo Hodgkin e Huxley, é uma grandeza adimensional que assume valores entre 0 e 1 e que descreve o estado da partícula de ativação, já g_K^{max} é a condutância máxima atribuída ao íon de Potássio.

Um modo intuitivo de entender o significado de n é considerá-lo como a probabilidade de encontrar uma partícula de ativação no estado aberto, em que os íons podem passar de uma probabilidade $1 - n$ de encontrá-la no estado fechado. Ao assumir que apenas estes dois estados existem para uma única partícula e que a transição de um para outro é governada por uma cinética de primeira ordem, então ela deve obedecer a equação Eq.(2-18).

O Canal Iônico de Potássio é uma proteína formada por quatro sub-unidades idênticas, as quais precisam estar abertas para permitir o fluxo de íons, justificando assim, o expoente de n^4 ao qual Hodgkin e Huxley chegaram, utilizando ajustes a dados experimentais (Kee98).

A parte mais árdua do trabalho de Hodgkin e Huxley foi descrever quantitativamente a dependência do potencial V com as taxas de transição, mesmo já tido formulado o modelo usando as taxas de transição α_n e β_n . Uma maneira alternativa que tem uma interpretação física mais simples é reescrever a equação diferencial para n em termos de $\tau_n(V)$ (uma constante de tempo dependente da voltagem) e de $n_\infty(V)$ (o valor assintótico de n). O valor que n assumiria para $t \rightarrow \infty$ mantendo-se V constante,

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_\infty - n}{\tau_n} \quad (3-2)$$

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (3-3)$$

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (3-4)$$

onde, n decai exponencialmente a n_∞ com constante de tempo τ_n , as descrições, em termos de taxas de transição α_n e β_n ou em termos de τ_n e n_∞ , são equivalentes.

Estudando o comportamento das condutâncias individuais, Hodgkin e Huxley perceberam que a relação entre a condutância e o potencial de membrana apresenta uma transição brusca. Assim, eles assumiram que as taxas de transição deviam reproduzir a responsividade dos canais ao potencial de membrana, e ajustaram as funções aos dados experimentais,

$$\alpha_n(V) = \frac{10 - V}{100 \exp\left(\frac{10-V}{10} - 1\right)} \quad (3-5)$$

$$\beta_n(V) = 0.125 \exp\left(\frac{-V}{80}\right) \quad (3-6)$$

onde V é a diferença entre o potencial de membrana e o potencial de repouso em mV.

3.4

Canal de Sódio

Os Canais de Sódio participam da geração e propagação do potencial de ação em neurônios e da maioria de células excitáveis presentes em diferentes tecidos de vários organismos. Quando a membrana celular é despolarizada por poucos milivolts, Canais de Sódio se ativam e inativam dentro de poucos milissegundos (Cat00).

3.4.1

Corrente de Sódio

Hodgkin e Huxley perceberam que a dinâmica da corrente de Sódio era mais complexa que a do Potássio. Quando uma voltagem era estabelecida na membrana usando voltage-clamp, a corrente de Sódio aumentava com o passar do tempo e atingia um valor máximo, mas ao invés de se estabilizar como acontecia com a corrente de Potássio, ela diminuía até parar de fluir completamente. Então, para ajustar este comportamento, Hodgkin e Huxley postularam além da existência de uma partícula de ativação m para o Sódio, uma partícula de inativação h ,

$$I_{Na} = g_{Na}^{max} m^3 h (V - E_{Na}), \quad (3-7)$$

onde m e h são variáveis adimensionais relacionadas com o processo de ativação e inativação do canal, respectivamente, essas variáveis podem tomar valores entre 0 e 1, já g_{Na}^{max} é a condutância máxima do Sódio.

A amplitude da corrente de Sódio é determinada pelo estado de quatro

partículas hipotéticas e suas transições entre os estados aberto ou fechado. Como as partículas são independentes, a probabilidade de encontrar três partículas m e uma h aberta é m^3h . Mesmo sem nenhuma informação sobre a estrutura dos Canais Iônicos de Sódio, Hodgkin e Huxley acertaram o número de subunidades de ativação e inativação que compõem um Canal de Sódio (Izh07).

Hodgkin e Huxley modelaram a dinâmica das partículas m e h através de duas equações diferenciais de primeira ordem,

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1 - m) - \beta_m(V)m \quad (3-8)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1 - h) - \beta_h(V)h \quad (3-9)$$

As taxas de transição α e β são obtidas de forma empírica como segue:

$$\alpha_m(V) = \frac{25 - V}{10(\exp(\frac{25-V}{10}) - 1)} \quad (3-10)$$

$$\beta_m(V) = 4 \exp\left(\frac{-V}{18}\right) \quad (3-11)$$

$$\alpha_h(V) = 0.07 \exp\left(\frac{-V}{20}\right) \quad (3-12)$$

$$\beta_h(V) = \frac{1}{\exp(\frac{30-V}{10}) + 1} \quad (3-13)$$

As constantes de tempo τ_m e τ_h e os valores das variáveis de ativação e inativação m_∞ e h_∞ em função de V estão mostrados na Fig.(3.4), τ_m e τ_h possuem o formato de seno, característico destas constantes de tempo, m_∞ cresce monotonicamente com V , característica das partículas de ativação enquanto h_∞ decresce monotonicamente, como deve ocorrer para partículas de inativação. Já τ_n e n_∞ em função de V onde, τ_n apresenta valores máximos nas proximidades do potencial de repouso que é mais rápido quando nos afastamos de $V = 0$ e n_∞ apresenta um crescimento monotônico com V . A curva que relaciona a condutância do Potássio g_K com o potencial elétrico V apresenta uma transição ainda mais rápida, por causa do expoente n^4 (Kee98).

No modelo completo de Hodgkin e Huxley para uma seção da membrana

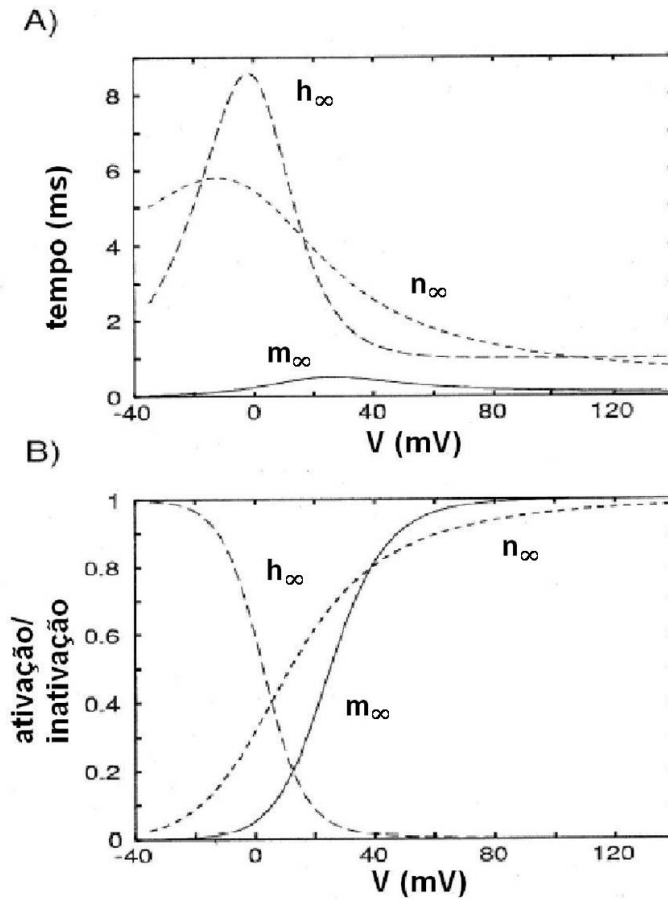


Figura 3.4: A figura mostra: (A) Constantes de tempo e (B) ativação e inativação do estado estacionário em função do potencial de membrana relativo a V para a ativação do Sódio m , linha contínua, inativação do Sódio Na^+ h , linha tracejada e ativação do Potássio n , linha pontilhada (Mal04).

do axônio gigante da lula, o axônio apresenta uma condutância de fuga g_m , constante no tempo e independente do potencial V . O valor medido por Hodgkin e Huxley foi: $g_m = 0.3 \frac{mS}{cm^2}$. Essa condutância passiva também tem um potencial reverso (E_r) associado a ela. Mas, Hodgkin e Huxley não mediram explicitamente E_r , mas ajustaram-no para que a corrente total fosse nula para $V = 0$. Assim, o valor $E_r = 10.6mV$ foi obtido por,

$$g_{Na}(0)E_{NA} + g_K(0)E_K + g_m E_r = 0 \quad (3-14)$$

Como já observamos na Sec.(2.2) podemos escrever uma única equação para as correntes que fluem através de uma seção da membrana axonal da seguinte forma,

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C_m} (g_{Na}(E_{Na} - V_{Na})m^3h) + g_k(E_K - V_k)n^4 + g_m(E_R - V)) + I_{ext}(t) \quad (3-15)$$

onde $I_{ext}(t)$ é uma corrente externa, injetada por um eletrodo inserido no axônio, C_m ; é a capacitância da membrana para o axônio gigante, vale $1\mu Fcm^{-2}$ e a resistência efetiva da membrana, no potencial de repouso devida a condutância de fuga e à pequena condutância ao Sódio é $857\Omega cm^{-2}$.

A Eq.(3-15) uma equação diferencial não-linear, mais as três equações diferenciais lineares de primeira ordem que especificam a evolução das taxas de transição e sua dependência em V já demonstradas anteriormente constituem o modelo clássico quadridimensional de Hodgkin e Huxley para uma seção do axônio gigante da lula.