

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

Notas de Aula - Prof. José W. M. Bassini

EA - 997 Introdução à Engenharia Biomédica

(Atualização por Dr. Marlon Rodrigues Garcia)

Janeiro de 2023

SUMÁRIO

Capítulo 1	4
Capítulo 2	8
2.1. Introdução	8
2.2. As Células Excitáveis	8
2.3. As Células	9
2.4. Ultraestrutura	9
2.4.1. Citoplasma	9
2.4.2. Núcleo	10
2.4.3. Mitocôndrias	10
2.4.4. Retículo Endoplasmático (RE)	10
2.4.5. Aparelho de Golgi	11
2.4.6. Lisossomas	11
2.4.7. Peroxisomas	11
2.4.8. Citoesqueleto	11
2.4.9. Depósitos Citoplasmáticos	12
2.4.10. Membrana Plasmática	12
Capítulo 3	13
3.1. A Membrana Celular em Repouso	13
3.2. A Estrutura da Membrana Celular	13
3.3. Algumas Propriedades da Membrana Celular	15
3.4. O Biopotencial	15
3.4.1. Primeiro Modelo	17
3.4.2. Modelo em Equilíbrio de Donnan	19
3.4.3. Modelo em Equilíbrio de Donnan e Equilíbrio Osmótico	21
3.5. Transporte Ativo de Íons	23
3.5.1. Sódio	23
3.5.2. Natureza Eletrogênica da Bomba de Na ⁺	25
3.5.3. Cloreto	27
3.5.4. Cálcio	27
3.5. O Potencial de Repouso (ER)	28
3.6. Resumo	31
3.7. Conselho	31
Capítulo 4	32
4.1. Preparação Fisiológica	32
4.2. Registro e Estimulação	33
4.3. Características Importantes dos Potenciais Bioelétricos	36
4.4. Parâmetros de Estimulação Elétrica	38
4.4.1. Relação Intensidade-Duração ou Curva Intensidade-Duração	38
4.4.2. Latência	39
4.4.3. Adição Latente	40

4.4.4. Acomodação	40
4.4.5. Refratariedade	41
4.4.6. Estimulação Extracelular	42
4.4.7. Potencial de Ação Composto	42
4.5. Teoria Iônica de Condução Nervosa	45
4.6. Voltage-Clamp	49
4.7. Modelo Conceitual para as Variações de Condutância	55
4.8. Cálculo da Forma do PA	57
4.9. Canais Iônicos	60
4.10. O Potencial de Ação Cardíaco - Elementos	65
4.11. Despolarizações Precoces e Tardias	67
Capítulo 5	69
5.1. Modelo do Núcleo Condutor	74
5.2. Consequências do Modelo de Núcleo Condutor	77
5.2.1. Fluxo de Corrente Durante o PA - Teorema dos Circuitos Locais	77
5.2.2. Velocidade de Condução de Axônio não Mielinizado	79
Capítulo 6	82
6.1. Sistema Cardiovascular	82
6.1.1. O Coração	82
6.1.2. Vasos Sanguíneos	83
6.1.3. Circulação Sistêmica e Pulmonar	83
6.1.4. Composição Tecidual dos Vasos Sanguíneos	83
6.1.5. Mecanismos de Regulação da Pressão Arterial	84
6.1.6. Curva Pressão-Volume	85
6.1.7. Ciclo Cardíaco	85
6.1.8. Referências	86
6.2. Sistema Nervoso	86
6.2.1. Os Neurônios	87
6.2.2. O Reflexo Miotático	87
6.3. Sistema Auditivo Periférico	88
6.3.1. A Transdução Mecano-Elétrica	89
6.4. Sistema Visual Periférico	89
6.4.1. A Transdução do Sinal Luminoso	90
6.4.2. As Cores	90
Capítulo 7	91
7.1. Hidrodinâmica e Engenharia Biomédica	91
7.2. Equação da Continuidade	91
7.3. Equação de Bernoulli	92
7.4. Medidas de Pressão no Leito Vascular	94
7.5. Viscosidade	95
7.6. Lei de Hagen-Poiseuille	96
7.7. Fluxo Turbulento - Relação de Reynolds	97
7.8. Referências	98

Capítulo 1

Descrição: Introdução, definição de Engenharia Biomédica, sub-áreas, perfil dos profissionais, centros de formação, campos de trabalho e perspectivas.

A Engenharia Biomédica (EB) 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 um vasto campo de atuação. As atividades típicas desempenhadas por engenheiros biomédicos são

- estudo quantitativo de fenômenos e sistemas biológicos;
- desenvolvimento de produtos e métodos que auxiliam na pesquisa biomédica e no atendimento médico-hospitalar;
- processamento de sinais e imagens biomédicas;
- produção de dispositivos e equipamentos e assessoramento técnico-científico na aquisição, instalação e manutenção de tecnologia para a saúde;

São exemplos de contribuições feitas por engenheiros biomédicos:

- o estudo do controle neuromuscular com a teoria de sistemas;
- estudo da transmissão e processamento de sinais neuroelétricos com a teoria de comunicações;
- desenvolvimento e produção de marcapassos cardíacos e de órgãos e membros artificiais;
- análise automatizada do eletrocardiograma e do eletroencefalograma;
- processamento de raios-X e ultra-som;
- tomografia computadorizada.

Defendemos a subdivisão da EB em algumas subáreas para facilitar, didaticamente, a explicação do tipo de atuação. Não achamos imprescindível essa subdivisão, e certamente não recomendamos a criação de um grande nome/ramo de subáreas que acabam por se confundir com linhas de pesquisa, ou até com projetos de pesquisa. São elas:

- Engenharia Médica e Biológica:** trata-se da subárea que concentra a maior parte do pessoal, e consiste no desenvolvimento de instrumentos e dispositivos com a finalidade médica (diagnóstico e terapia), ou com finalidade de aplicação em ensino ou pesquisa médico-biológica. Estão também nesta divisão os trabalhos de processamento de sinais e imagens médicas e biológicas;
- Engenharia de Reabilitação:** nesta subárea, 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, como a criação de exoesqueletos, ou dispositivos que auxiliem a reabilitação por fisioterapeuta;
- Bioengenharia:** área dedicada ao entendimento de sistemas biológicos, e no desenvolvimento de metodologias baseadas em engenharia para a solução de

problemas relacionados a sistemas biológicos. Tem abordagem mais orientada ao problema. Como exemplo, o estudo de hortas verticais com iluminação em comprimentos de onda que aumentem o nível de nutrientes.

- D. **Engenharia Clínica:** nesta subárea, a preocupação são os hospitais e ambulatorios propriamente ditos. Preocupa-se com o gerenciamento da tecnologia médica desde sua aquisição, instalação, manutenção, e até a sua desativação ou substituição.

Consideramos fundamental que o perfil dos profissionais da área inclua uma sólida formação básica nas áreas de 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 (principalmente elétrica/eletrônica), e continuasse em nível de especialização, principalmente no caso da Engenharia Clínica, como em cursos de pós-graduação tanto em nível profissional, quanto *stricto sensu*. A adaptação de profissionais de outras áreas à EB vem sendo tentada com diferentes critérios. Na nossa opinião, o melhor processo para isto ainda não é bem estabelecido.

O perfil ideal do EB deve, portanto, incluir boa base de Engenharia Elétrica, Física e conhecimento prático de instrumentos da área. É imprescindível um bom treinamento em fisiologia e em biofísica. Para atuação em Engenharia Clínica, é necessária especialização, em particular para a obtenção de conhecimentos de gerenciamento de equipamentos para a saúde. Um bom conhecimento 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 até 2003, não se tem notícia de desempregados. Os locais de trabalho são os hospitais de médio e grande porte (mais de 100 centros) que somam milhares no Brasil. Há, em menos de 10% destes, alguma espécie de profissional. E, curiosamente, no estado de São Paulo, já há engenheiros clínicos em cerca de 40% das instituições de saúde de médio e grande porte. Os profissionais mais devotados às outras subáreas têm 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 intercâmbio, ou mesmo a comunicação com a matriz no exterior. Empresas brasileiras têm visto nos engenheiros biomédicos a possibilidade de iniciar setor de desenvolvimento, e algumas têm começado a ver a importância do conhecimento específico de algum sistema fisiológico para melhoria do atendimento aos clientes. Assim, o campo de trabalho vem se tornando cada vez maior e mais versátil. Não se pode esquecer que a tendência é aumentar muito a atração de engenheiros com conhecimento de engenharia clínica, tendo em vista as ações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e do próprio Ministério da Saúde, exigindo maior clareza dos critérios para gerenciamento de tecnologia nos hospitais, e a recente implementação do programa de Tecnovigilância da ANVISA.

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 se ter acesso ao tipo de produção do grupo acessado. Sugerimos que os estudantes procure o Diretório dos Grupos de Pesquisa do CNPq, para o acesso aos grupos existentes na área. Há registro de

40 grupos de pesquisa em EB (até 08/03/2005). 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 a 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 principalmente 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 à ferramentas (e.g. profissionais que desenvolvem técnicas e métodos de ultra-som, laser, etc., e posteriormente se aplicam no desenvolvimento de instrumentos para finalidade diagnóstica ou terapêutica), ou orientado à problemas (e.g. para estudo de um sistema fisiológico com o objetivo de melhor entendê-lo, são aplicados e desenvolvidos métodos quantitativos novos, gerando conhecimento 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 desenvolvidos. Seguem alguns “links”. Para exemplos de alguns centros que atuam na área de Engenharia Biomédica, sugerimos aos estudantes que usem o Google, teclando *Biomedical Engineering*, e naveguem por algumas das páginas de centenas de locais interessantes. Veja, por exemplo, alguns centros de Engenharia Biomédica: <http://web.mit.edu/cbe/www>, <https://engineering.purdue.edu/BME/> e <http://www.bme.umich.edu>.

Uma questão importante que vem sendo colocada em pauta hoje em dia é qual deve ser o currículo de Engenharia Clínica. Acredito 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 que 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 ver a Engenharia Biomédica como um “balaio de gatos”, onde todos podem entrar. Neste caso, o resultado é a geração de reprovação em massa, ou a produção de profissionais totalmente incompetentes. O ponto chave está em assumir que, no mínimo, o engenheiro biomédico seja um engenheiro. Diversificar e complementar sua atividade é que consistem no nosso desafio. Isso poderá implicar em formar pessoal, apenas em nível de pós-graduação, a partir de engenheiros bem qualificados. Por outro lado, profissionais de áreas como 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. Acredito que a solução esteja em um programa multidisciplinar, multi-unidades, multinível, onde os títulos conseguidos dependem da competência e desempenho de cada estudante.

Leis Físicas e Químicas associadas aos processos fisiológicos:

- Lei de Ohm - Fluxos sanguíneos e pressão; corrente iônica, capacitância de membranas.

- Lei de Boyle e os gases ideais - respiração.
- Gravidade - fluxo sanguíneo, hidrostática no SEV.
- Energias cinética e potencial - contração muscular; movimentos do tórax na expiração.
- Inércia, movimento, velocidade e atraso - locomoção animal
- Princípio de Bernoulli e Equação de Poiseuille - Hemodinâmica (Mecânica dos 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 impedâncias e ressonância - Sistema auditivo.
- Entre outros.

Capítulo 2

Descrição: Anatomia Funcional do Organismo Humano, A Célula, Organização dos tecidos e sistemas orgânicos.

2.1. 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 respiração, 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, o sistema auditivo, entre outros. Sabe-se ainda que estes sistemas são compostos por subsistemas, os “órgãos”, que trabalhando em conjunto, compõem uma tarefa mais geral a ser executada pelo organismo. Por exemplo, para a respiração, o sistema respiratório utiliza a boca, o nariz, a faringe e a traquéia para conduzir o ar para dentro e fora dos pulmões, e os próprios pulmões proporcionam as trocas gasosas com o ar ambiente.

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 sim diminutos (microscópicos) compartimentos capazes de executar uma série de microfunções. Estes compartimentos são denominados de células. As células se agrupam, formando o que denominamos tecidos. Estes, por sua vez, fazem parte da constituição de órgãos (o coração, por exemplo, é uma bomba muscular, mas inclui tecidos de outras naturezas, como tecido conjuntivo e nervoso, na sua estrutura).

2.2. As Células Excitáveis

Suponha que um tomate fosse arremessado na direção da cabeça de um homem (por exemplo, seu professor predileto), 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 registrados pelas células sensoriais visuais e elas, em seguida, excitaram células do cérebro através do nervo óptico. Um grande número de atividades iria se desencadear numa variedade de células nervosas do cérebro, e após um curto período de 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 neurais e

musculares. Uma célula excitável é, por definição, aquela que, pronta e rapidamente responde a um estímulo adequado, com variação do seu potencial transmembrana. De forma mais formal, células excitáveis são aquelas capazes de serem excitadas eletricamente, resultando na geração de potenciais de ação. São exemplos de células excitáveis: neurônios, células musculares, algumas células endócrinas, entre outras.

Fig. 1 - Reação de esquivar de um dado professor à aproximação de um objeto arremessado por aluno(a) fã.

2.3. As Células

Os organismos vivos são formados por células, e todas as células são geradas a partir de outras células. 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 diária celular. Além do citoplasma, compartimentado por um envoltório, encontra-se no interior das células o seu 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.

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

2.4. Ultraestrutura

A ultraestrutura celular são os constituintes celulares, revelados ao se visualizar a célula em altas magnificações ópticas em um microscópio. A exemplo, temos o núcleo (em células eucariontes), e as organelas envoltas pelo citoplasma. Esta seção é dedicada ao estudo desses constituintes.

2.4.1. Citoplasma

O citoplasma contém as organelas (e.g. mitocôndrias, retículo endoplasmático, lisossomas), e é depósito de substâncias (e.g. gotas pequenas de lípidos, grânulos de glicogênio). O espaço que envolve estas estruturas é preenchido pela matriz citoplasmática com citosol. Esta matriz inclui proteínas, íons e diversas estruturas proteicas monoméricas que, ao se polimerizarem, podem dar origem a microtúbulos e microfilamentos. Essa polimerização parece ser reversível, o que confere à matriz celular a capacidade de se modificar de sol para gel e vice-versa. (pg. 75, cap. 5, Ferguson, Donald G. "Ultrastructure of cells." Cell Physiology Source Book. Academic Press, 1995. 45-60)

2.4.2. 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 ribossomas 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 o RNA (ácido ribonucleico) e proteínas básicas, o chamado nucléolo. 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.

2.4.3. Mitocôndrias

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

(Pequeno desenho mostrando o ADP e ATP)

2.4.4. Retículo Endoplasmático (RE)

Rede de vesículas achatadas e túbulos que se intercomunicam (RE, abreviadamente). Há dois tipos básicos, o retículo liso (REL) e o rugoso, ou granular (RER). Este último é assim denominado, por conter, em sua superfície, partículas “densas”, os ribossomas. Os ribossomos têm um diâmetro de cerca de 15 nm, e juntos com filamentos de RNA, têm o papel fundamental na síntese de proteínas. O RE aumenta a superfície interna celular, o que favorece atividades enzimáticas e facilita a ocorrência de reações químicas necessárias ao metabolismo celular. Sua principal função é a síntese de proteínas e lipídios, promovendo também o armazenamento, transporte e desintoxicação celular.

O retículo liso é uma rede muito desenvolvida em determinados tipos celulares, tais como as que secretam hormônios esteróides, células hepáticas e no músculo estriado (retículo sarcoplasmático - principal estoque de Ca^{2+} usado na contração). Há, no retículo sarcoplasmático, uma ATPase de Ca^{2+} , que transporta Ca^{2+} para dentro da organela, e é a principal responsável pela redução de Ca^{2+} para relaxamento do músculo estriado (esquelético e cardíaco).

Barbitúricos promovem aumento acentuado do REL em células hepáticas. Há grande aumento de atividade de enzimas que metabolizam barbitúricos e outros compostos tóxicos, e que estão na parede do REL. Portanto, o REL protege o organismo do efeito tóxico de certas drogas. No REL do fígado que o pigmento da bile (bilirrubina) é

solubilizado, em sua forma solúvel ou secretada. Se a enzima que atua, neste caso, é deficiente há acúmulo de bilirrubina insolúvel no sangue (icterícia).

2.4.5. Aparelho de Golgi

Também conhecido como complexo de golgiense, o aparelho de Golgi é 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 por transformações neste complexo, chamadas pós-traducionais (tradução seria o processo de formação de uma proteína a partir dos transcritos de RNA mensageiro, o mRNA). Nesta organela são também empacotados e endereçados produtos a serem secretados pela célula (são importantes em células secretoras, como do pâncreas e do fígado, órgãos do sistema digestório).

2.4.6. Lisossomas

São organelas de tamanho entre 0,5 e 3,0 µm de diâmetro que contém diversas enzimas hidrolíticas com atividade máxima em pH ácido. Deste modo, atuam na digestão de 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 tácito por eliminar componentes defeituosos, como por regular sua quantidade de acordo com a necessidade.

2.4.7. Peroxisomas

São organelas caracterizadas pela presença de enzimas oxidativas. Contém catalase celular, enzima que converte H₂O₂ 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 peroxissomas, principalmente os hepáticos e os renais.

2.4.8. 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, é 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.

2.4.9. Depósitos Citoplasmáticos

Além do depósito de gorduras e glicogênio, não raramente estão presentes os depósitos de pigmentos como, por exemplo, a melanina. Estes depósitos têm importância em biologia geral, uma vez que acabam por ser responsáveis pela cor dos seres vivos, e conseqüentemente, 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 conseqüentemente pode reduzir a incidência de câncer de pele.

2.4.10. Membrana Plasmática

Todas as organelas, o citosol, o núcleo, e outras estruturas chamadas intracelulares estão acondicionadas por uma membrana que 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 praticamente dois fosfolipídios. A membrana é a sede da interação físico-química entre a célula e o ambiente, assim como 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.

Fig. 2 - Sequência de eventos na síntese e secreção de uma proteína (insulina). No retículo rugoso se processa a síntese da pré-pró-insulina (cadeias A, B e C). No RER ocorre a perda da ponte de sinal e do fragmento (terciária). No Golgi inicia-se a proteólise da pronsulina, que se processa nos grânulos de secreção formando a insulina. O grânulo migra-se para a superfície, e procede à exocitose.

Capítulo 3

Descrição: Origem dos biopotenciais, registro 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 K^+ , Equação de Goldman-Hodgkin-Katz.

Tabela 1 - Tabela com o desenvolvimento do conhecimento na área da bioeletricidade e fenômenos elétricos de membrana.

3.1. 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, mesmo com a célula em repouso, por isso é denominada de Potencial de Repouso (PR). O principal responsável por esse potencial, relativamente alto, é a membrana celular (mas não exclusivamente). Vamos, agora, apresentar propriedades da membrana celular que ajudem a entender a origem do potencial de repouso.

3.2. A Estrutura da Membrana Celular

Em 1925, Gorter e Grandel propuseram a possibilidade de que a membrana celular fosse arranjada em uma camada com duas moléculas. Para isto realizaram um experimento muito criativo e aparentemente simples. Quando lípides são dispersos em água, a parte polar (hidrofílica) da molécula se posiciona em contato com a superfície da água, e as cadeias hidrocarbônicas, 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 Grandel mediram a área mínima em preparações com fosfolípidos extraídos de células vermelhas do sangue, e compararam a área de superfície da membrana das células. Os autores encontraram uma área de monocamada cerca do dobro 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 Daniele (1930) estudando o comportamento de fosfolípidos em água concluíram que a configuração energeticamente mais estável seria uma bicamada com as terminações polares voltadas para a superfície da água e as porções não-polares das moléculas voltadas umas para as outras. Tal configuração faria a célula impermeável à água e a partículas carregadas, como os íons. Na proposição de Davson e Daniele, adicionalmente, uma fina camada de proteínas estabilizaria a bicamada fosfolipídica como no esquema abaixo.

Fig. 3 - Fina camada de proteínas estabilizando a bicamada fosfolipídica proposta pela pesquisa de Davson e Daniele (1930).

Deu força a este tipo de estrutura, o fato das substâncias lipossolúveis atravessarem muito mais rapidamente a membrana do que as não lipo-solúveis. 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 entendimento 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 angstroms (7 nm), sendo duas linhas escuras separadas por uma clara. A idéia de bicamada lipídica com cobertura de proteínas evoluiu agora ao chamado modelo de mosaico fluido de Singer e Nicholson (1972), no qual há a existência de proteínas integrais (intrínsecas) e periféricas (extrínsecas) à membrana. As proteínas periféricas estão associadas às faces internas e externas da membrana, mas não se encontram ancoradas a ela (por isso integrais). As proteínas integrais são embebidas na membrana podendo percorrer ou não toda sua espessura. O modelo mosaico fluido passou a ser um modelo mais condizente com estudos funcionais que mostraram, mais tarde, que a membrana seria semipermeável, em vez de impermeável. As proteínas integrais podem incluir canais iônicos, que agem como poros de baixa resistência, e bombas ativas (que requerem energia metabólica para funcionarem). Ficou mais fácil de explicar também os fluxos iônicos através das membranas, de modo geral, e o estabelecimento de gradientes de concentração transmembranar. Deste 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 lípides de membrana e dos fosfolipídios da bicamada. Um dado concreto 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, contribui para assimetria de cargas fixas dos dois lados da bicamada. Os glicolipídeos e glicoproteínas (associação de carboidratos com lípidos ou proteínas, respectivamente) são exclusivos da face externa da bicamada, contribuindo também para a assimetria, e formação da chamada glicocálice.

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 da membrana, as glicoproteínas, responsáveis pelos grupos ABO, Rh e M-N, transportadores, receptores para hormônios e outras moléculas, etc.

Fig 3.1 - Fig 5.3 Junqueira e Figs 3.1, 3.2 e 3.3 Aidly, ver pág. 59 J e C.

3.3. Algumas Propriedades da Membrana Celular

- Espessura: $\sim 100 \text{ \AA} = 10 \text{ nm}$;
- Capacitância: $1 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (relativamente grande);
- Resistência: $1\text{-}8 \text{ k}\Omega/\text{cm}$ (média-baixa em eletrônica);
- Poros permanentes ou temporários;
- Comporta-se como semi-permeável, ou seletivamente permeável;
- Pode ser atravessada por íons e moléculas, passivamente ou por transporte ativo;
- Constante dielétrica: 5;
- Rigidez dielétrica: $20 \times 10^6 \text{ V/m}$ (200000 V/cm):
 - Assumindo-se espessura da membrana = 10 nm , e uma d.d.p. de 100 mV através da membrana, a intensidade do campo elétrico estabelecido seria da metade disso, ou $10.000.000 \text{ V/m} = 10 \times 10^6 \text{ V/m}$;
- Rigidez dielétrica de outros materiais, para comparação:
 - Papel: $14 \times 10^6 \text{ V/m}$;
 - Vácuo: infinito;
 - Ar: $0,8 \times 10^6 \text{ V/m}$;
 - Teflon: $60 \times 10^6 \text{ V/m}$;

3.4. O Biopotencial

A Fig. 3.2 ilustra o que acontece quando o potencial transmembranar (ou potencial de membrana, E_m) é monitorado com o uso de microeletrodos em células excitáveis. A referência usada na medição é o meio extracelular. Em t_0 o potencial medido é de 0 mV . Em t_1 , quando o eletrodo penetra a célula, uma d.d.p. é registrada através da membrana. Esta d.d.p. é da ordem de 100 mV , negativa dentro com relação ao meio externo. Este potencial é estável e, em repouso, é denominado de potencial de repouso (E_R). Este é o chamado Biopotencial!

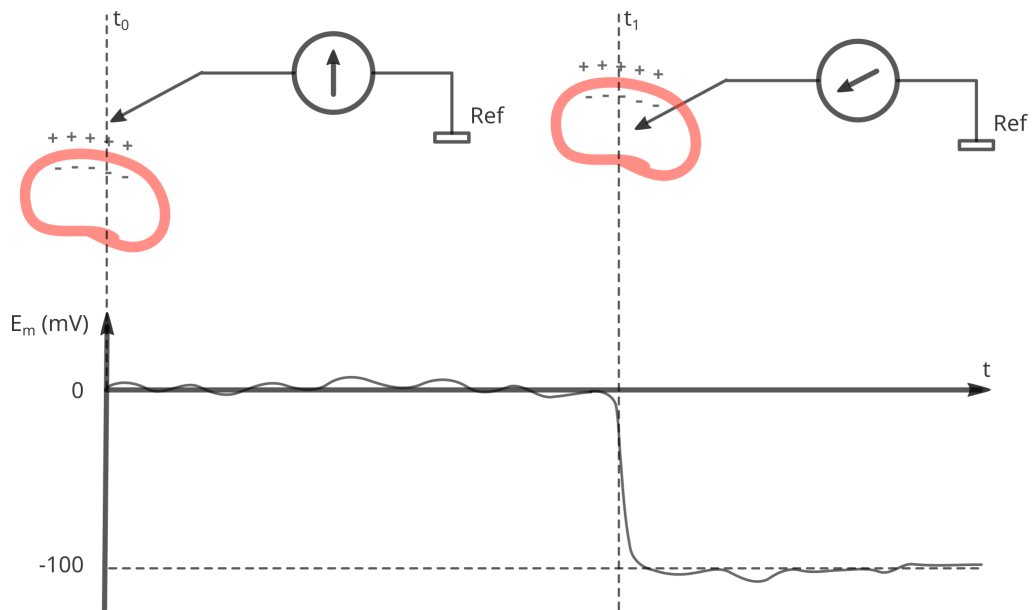


Figura 3.3 - Potencial de membrana em repouso. Um microeletrodo usado para medir potenciais da ordem de milivolts é introduzido na célula, através da membrana, no instante t_1 . A referência para medição é o meio extracelular que banha a célula.

Tabela 3.2 - Concentrações iônicas nas fibras musculares de rã, e no plasma destes animais (Segundo Conway, 1957, como apresentado em Aidley, 1997).

	Concentrações 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
Ânions Orgânicos	ca 74	ca 13

Tabela 3.3 - Concentrações iônicas no axoplasma de lula e no sangue (Segundo Hodgkin, 1958, como apresentado em Aidley, 1997).

	Concentrações no interior das células (mM)	Concentração plasmática (mM)
K^+	400	20
Na^+	50	440

Cl ⁻	40-150	560
Ca ²⁺	0,4	10
Mg ²⁺	10	54
Isethionate ⁻	250	-
Outros ácidos orgânicos	ca 110	-

3.4.1. Primeiro Modelo

Vamos inicialmente considerar o seguinte sistema, conforme desenhado na Fig. 3.4. 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 no lado 2. Deste modo X⁺ tenderá a se mover a favor do gradiente de concentração, de modo que pequena quantidade de X⁺ se moverá para o compartimento 2, levando sua carga positiva. O movimento de cargas causará uma d.d.p. entre os dois compartimentos.

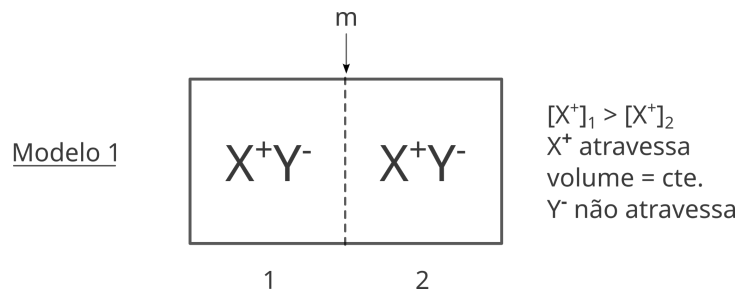


Figura 3.4 - Modelo 1: X⁺ é permeante, Y⁻ não atravessa m, [X⁺]₁ > [X⁺]₂, e o volume é constante.

O equilíbrio será atingido quando o gradiente elétrico (tendendo a mover X⁺ de 2 para 1) contrabalancear o gradiente de concentração (tentando mover X⁺ de 1 para 2). A d.d.p. 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 δn mols 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 δn mols, δW_c , é dado por:

$$\delta W_c^{2 \rightarrow 1} = \delta n \cdot RT \ln \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2},$$

onde R é a constante universal dos gases (8.314 J/g.mol), T é a temperatura absoluta (K) e $[X^+]_L$ é a concentração molar de X⁺ no lado L (neste caso, 1 ou 2). Seria mais correto usar a atividade dos íons dos dois lados, igualando-as. Esta simplificação é válida, assumindo-se que o coeficiente de atividade será igual de X⁺ de 1 para 2 e de 2 para 1.

Agora, considere o trabalho elétrico δW_e requerido para que δn mols de X^+ se movam contra o gradiente elétrico, i.e., de 1 para 2, é dado por:

$$\delta W_e^{1 \rightarrow 2} = \delta n \cdot zFE,$$

onde z é a valência de X^+ , F é a constante de Faraday (96500 C/mol) e E é a d.d.p., em volts, do compartimento 2 com relação ao 1 (é a tensão que o soluto “venceu”, portanto, de 2 para 1). No equilíbrio o fluxo resultante de X^+ é nulo, e então:

$$\delta W_e = \delta W_c,$$

ou,

$$\delta n \cdot z \cdot F \cdot E = \delta n \cdot R \cdot T \cdot \ln \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2},$$

e daí

$$E = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2} \text{ [V]}$$

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 elétrico resultante, E , é chamado de potencial de equilíbrio de X^+ (E_{X^+}) e pode ser entendido como sendo o potencial (ou a d.d.p.) para o qual a membrana vai (ou que se estabelece através da membrana), se esta for permeável apenas a este íon.

Frequentemente, utiliza-se a simplificação da equação para \log_{10} e $T = 18^\circ\text{C}$:

$$E = \frac{58}{z} \cdot \log_{10} \frac{[X^+]_1}{[X^+]_2} \text{ [mV]}.$$

Questão

Se no modelo estudado $[X]_1 = 10 [X]_2$, quais seriam os potenciais de equilíbrio se $X = K^+$ ou se $X = Ca^{2+}$? E se a membrana fosse permeável ao Y^- em vez de X , ou seja, ao Cl^- no caso do KCl e ao SO_4^{2-} em outro sal?

$$E = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[X]_1}{[X]_2} \text{ [V]} \Rightarrow K^+: E = \frac{58}{z} \cdot \log \frac{[K^+]_1}{[K^+]_2} = 58 \text{ mV} \text{ e } Ca^{2+}: E = \frac{58}{2} \cdot \log \frac{[Ca^{2+}]_1}{[Ca^{2+}]_2} = 29 \text{ mV}$$

$$\Rightarrow Cl^-: E = \frac{58}{-1} \cdot \log \frac{[Cl^-]_1}{[Cl^-]_2} = -58 \text{ mV} \text{ e } SO_4^{2-}: E = \frac{58}{-2} \cdot \log \frac{[SO_4^{2-}]_1}{[SO_4^{2-}]_2} = -29 \text{ mV}$$

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 $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ e que a d.d.p. seja de 70 mV . Deste modo a carga em 1 cm^2 é dada por:

$$Q = CV \text{ [coulomb]},.$$

onde Q é medido em coulombs, C em Farads e V em volts. O número de mols de X que se moverá através da membrana será:

$$n = \frac{\text{Carga elétrica desse número de mols}}{\text{Carga elétrica de um desses íons}} = \frac{Q}{q_e N_A z} = \frac{CV}{zF} \text{ [mols]},$$

onde q_e é a carga eletrônica (carga de um elétron), N_A é o constante de Avogadro, e F é a constante de Faraday, que é igual à carga eletrônica vezes a constante de Avogadro. Neste caso, se X é monovalente:

$$n = \frac{CV}{zF} = \frac{1.10^{-6} [\mu\text{F}/\text{cm}^2] \cdot 70.10^{-3} [\text{V}]}{96485 [\text{C}/\text{mol}]} = 7,25.10^{-13} \approx 725 \text{ [fmol}/\text{cm}^2].$$

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 de Na^+ para que 70 mV se estabeleça em uma célula cardíaca (considerar a célula como membrana semipermeável com a seguinte geometria: $100 \times 30 \times 10$ dimensões em micrómetro).

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

3.4.2. Modelo em Equilíbrio de Donnan

Pensemos em um sistema que se aproxime mais um pouco das células vivas. Neste caso, vamos usar as informações das concentrações iônicas, e compor o conjunto de dois compartimentos, como mostrado na Fig. 3.5.

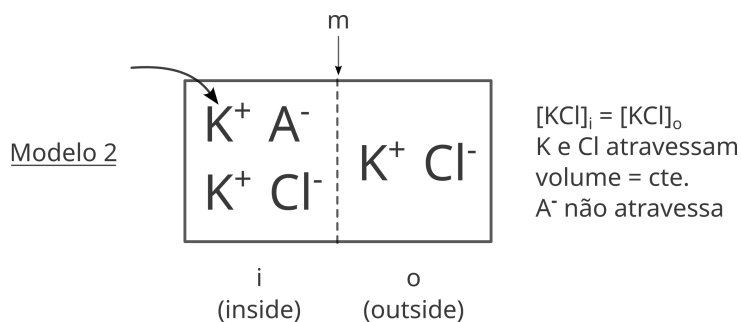


Figura 3.5 - Modelo 2, K^+ e Cl^- são permeantes, o ânion A^- não atravessa m , $[KCl]_i = [KCl]_o$, e o volume é constante nos dois compartimentos.

Premissas e condições iniciais:

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

A partir destas condições, uma certa quantidade de um sol K^+A^- é adicionada ao lado i (dentro). Adiciona-se então nova premissa:

4. A^- não atravessa a membrana (a membrana é impermeável à A^-), e portanto é uma membrana semipermeável, como dito anteriormente.

Deste modo, teremos:

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

e K^+ iria se mover de i para o , a favor de seu gradiente de concentração. Para que o número de cargas positivas e negativas sejam iguais em i e em o (neutralidade elétrica), íons cloreto atravessam de i para o , mantendo a neutralidade. Agora, sendo $[K^+]_i \neq [K^+]_o$ e $[Cl^-]_i \neq [Cl^-]_o$, aparecerá uma d.d.p. entre os compartimentos. Pela equação de Nernst, é possível se calcular esta d.d.p.:

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

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

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

$$E_K = E_{Cl}$$

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

ou seja

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

Esta igualdade é conhecida como regra de Donnan, e diz que: “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 permanentes em um dos lados (*i*, por exemplo), resulta na desigualdade nos íons difusíveis K^+ e Cl^- (neste caso).

Aplicando a condição de neutralidade elétrica em cada compartimento resultaria:

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

e

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

mas

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

então

$$[K^+]_i + [Cl^-]_i > [K^+]_o + [Cl^-]_o \text{ e}$$

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

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

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

3.4.3. Modelo em Equilíbrio de Donnan e Equilíbrio Osmótico

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

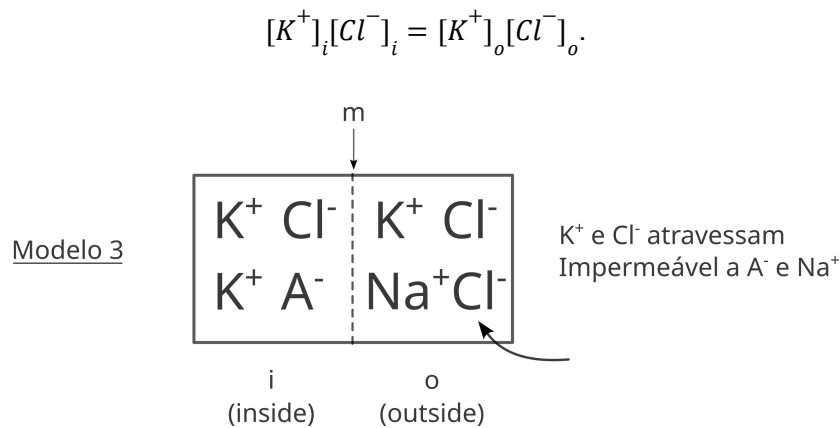


Figura 3.6 - Modelo 3, K^+ e Cl^- são permeantes, A^- e Na^+ não atravessam m . O volume não é mais necessariamente constante.

Nesta configuração:

$$[K^+]_o < [Cl^-]_o,$$

assim, sem a restrição de volume constante, para quantidade adequada de NaCl, é possível que o sistema se estabilize em equilíbrio de Donnan e em equilíbrio osmótico, ao mesmo tempo. O efeito osmótico do ânion não difusível é contrabalanceado pelo cátion não difusível do lado o (Na^+).

Um sistema como este poderia dar conta de explicar as desigualdades iônicas vistas em células nervosas e musculares, maior $[K^+]_i$ e maior $[Na^+]_o$. Se o que foi assumido no desenvolvimento do modelo for correto, deveria ser possível demonstrar que $[K^+] \times [Cl^-]$ é igual dentro e fora de células após equilíbrio, em várias condições de concentração dos íons. Isto foi feito por Boyle e Conway (1941), colocando células de músculo de rã por 24 horas em soluções com várias concentrações de KCl, determinando depois $[K^+]_i$ e $[Cl^-]_i$, como apresentado na Tabela 3, na qual se expressam também os produtos $[K][Cl]$.

Tabela 3.4 - Concentração intracelular de K^+ e Cl^- no músculo de rã após equilíbrio por 24 horas, a 2-3°C, com soluções de KCl de diferentes concentrações (Boyle e Conway, 1941).

$[K]_o$ (mM)	$[Cl]_o$ (mM)	$[K]_i$ (mM)	$[Cl]_i$ (mM)	$[K]_o \times [Cl]_o \cdot 10^{-3}$	$[K]_i \times [Cl]_i \cdot 10^{-3}$	$[K]_o [Cl]_o / [K]_i [Cl]_i$
3	79	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	221	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 confirmaram a hipótese do equilíbrio de Donnan, mas não para concentrações abaixo de 10mM. É importante ressaltar que as condições estabelecidas para o Modelo 3 colocam o sistema em equilíbrio de Donnan e em equilíbrio osmótico, e assim, retirada a condição forte de volume constante, ainda se pode explicar as concentrações nas células. Voltaremos na questão do teste de condição de Donnan para concentrações menores que 10 mM mais tarde.

A questão que devemos apresentar agora é quanto à nova premissa de que a célula seja impermeável ao íon Na^+ . Há Na^+ nas células (Tabelas 1 e 2). Mas, curiosamente, a concentração dentro é cerca de 10 vezes menor do que a fora das células, então se as células captam Na^+ , de alguma forma, devido às suas atividades, por outro lado, de algum modo, também mantém a concentração interna bem mais baixa do que a do meio externo. Isto requer o transporte desse íon contra um grande gradiente de concentração, e portanto requer o gasto de energia metabólica. Deve haver alguma espécie de bombeamento ativo de Na^+ , que em meados do século XX ainda precisava ser provada, como nas membranas de células nervosas e musculares.

3.5. Transporte Ativo de Íons

3.5.1. Sódio

Vamos analisar os experimentos realizados por Hodgkin e Keynes em 1955, sobre a extrusão de sódio no axônio gigante de lula. A Figura 3.7 ilustra a montagem experimental usada pelos pesquisadores.

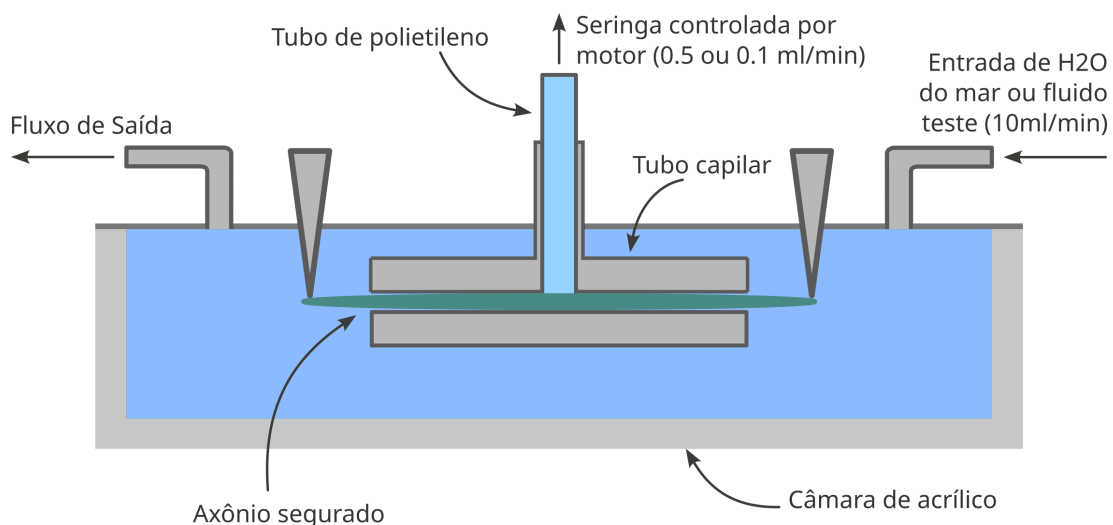


Figura 3.6 - Aparato usado para se medir o efluxo de Na^+ radioativo em axônio gigante de Sépia (Hodgkin e Keynes, 1955).

Um axônio era colocado em água do mar contendo um isótopo radioativo de sódio ($^{*}\text{Na}^{+}$), e repetitivamente estimulado para se carregar com $^{*}\text{Na}^{+}$, de tempo em tempo. Em seguida, o axônio era colocado em um tubo capilar, como mostrado na Fig. 3.6, e perfundido por água do mar sem $^{*}\text{Na}^{+}$. Em instantes pré-definidos, as amostras eram retiradas por meio da secção no tubo de polietileno, com uma seringa controlada por motor. Destas amostras, foram medidas as contagens radioativas por minuto, construindo-se o gráfico da Fig. 3.7. Em certa fase do experimento, o inibidor metabólico Dinitrofenol (DNP) era adicionado, e posteriormente lavado da preparação.

O primeiro resultado interessante é que o axônio captou efetivamente $^{*}\text{Na}^{+}$ com a estimulação. O efeito é registrado pela queda progressiva e exponencial da contagem radioativa (linear, em escala semi-log), como acontece até cerca de 100 minutos. $^{*}\text{Na}^{+}$ (e consequentemente Na^{+} , está sendo transferido para fora da célula, contra gradiente de concentração!). Quando o inibidor metabólico DNP é colocado, o efluxo cai dramaticamente ($^{*}\text{Na}^{+}$ para de ser transferido para fora, e portanto não é mais encontrado na amostra). Ao ser lavado o inibidor, o efluxo é retomado, na mesma taxa que anteriormente.

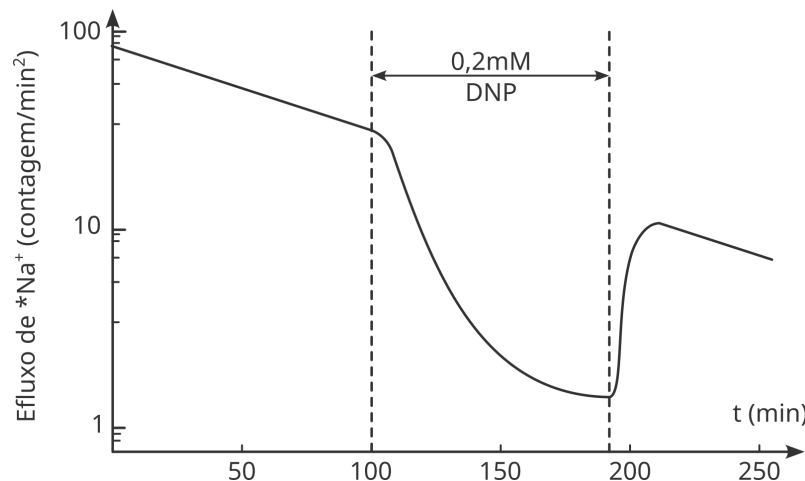


Figura 3.7 - Efeito inibidor metabólico 2,4-dinitrofenol sobre o efluxo de Na^{+} radioativo do axônio gigante de Sépia (Hodgkin e Keynes, 1955).

A fenomenologia do sódio será tratada mais adiante, mas já é possível adiantar que a atividade produzida pela estimulação implica na entrada do íon. É interessante se pensar em até qual ponto a estabilidade osmótica fica comprometida com o movimento de íons Na^{+} para dentro da célula, mas não parece razoável, e não há evidências, pelas tabelas 1 e 2 de que outra espécie iônica possa fazer este 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, ao mesmo tempo ficando 10 vezes menos concentrada internamente do que externamente deste íon?

Por hora vamos continuar com os experimentos. O DNP é um inibidor metabólico cuja provável função é desacoplar a formação de ATP (Adenosina Trifosfato) da cadeia de elétrons na respiração aeróbica. Como o ATP é a “moeda” energética das células, ao se privar a célula de energia, a extrusão fica inibida. Assim, indica-se que a extrusão de Na^{+} necessitaria, ou é dependente, da energia metabólica suprida direta ou indiretamente pelo ATP.

Para ir mais a fundo nesta questão Coldwell, Hodgkin, Keynes e Shaw (1960) mostraram que a injeção de compostos fosfatados, ATP, fosfato de arginina, etc, na célula produziam um aumento transiente no efluxo de sódio em axônios envenenados com cicineto (CN) (Fig. 3.8).

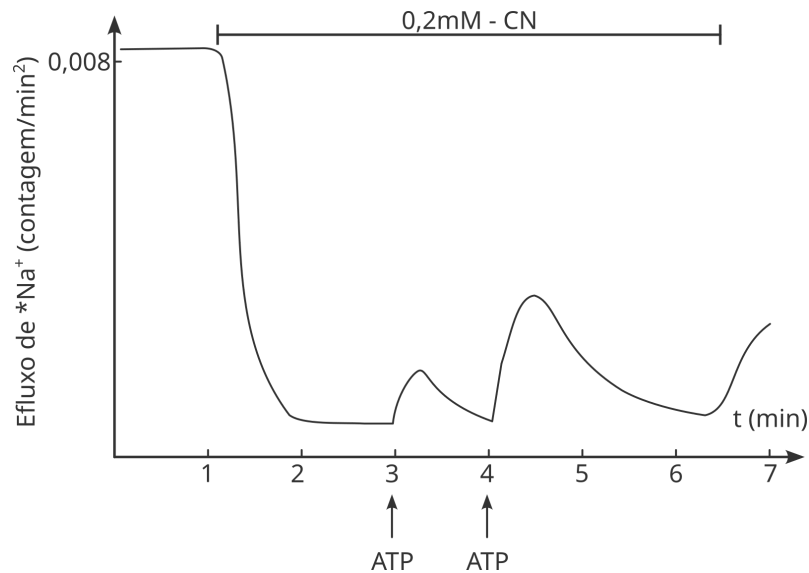


Figura 3.8 - Efeito da injeção de ATP sobre o efluxo de Na^+ em axônio de Sépia envenenado com cicineto (CN). Mais ATP foi introduzido com a segunda injeção, comparada à primeira (Coldwell et al, 1960).

Em adição, Hodgkin e Keynes mostraram também que o efluxo de sódio em axônios é dependente da concentração externa de íons de potássio (K^+). Uma solução externa sem K^+ reduz o efluxo de Na^+ para $\frac{1}{3}$ de seu valor - a extrusão ativa de Na^+ estaria, de alguma forma, ligada à captação de K^+ .

O CN depleta irreversivelmente a energia metabólica, faltando ATP para o transporte, portanto o efluxo de Na^+ cai drasticamente. Oferecendo ATP à célula, o transporte é recuperado, mostrando a participação dessa molécula no transporte de Na^+ , e caracterizando o transporte como uma possível bomba ativa (bombeamento contra gradiente de concentração, utilizando-se energia do ATP). Este transporte ativo foi postulado ser uma ATPase de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Uma bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foi isolada por Skou em 1957.

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

3.5.2. Natureza Eletrogênica da Bomba de 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 termogênico. Thomas (1969)

desenvolveu uma técnica para avaliação da eletrogenicidade da bomba em células nervosas. O pesquisador injetou Na^+ dentro do corpo celular de neurônios, utilizando um par de eletrodos, um deles preenchido com uma solução de acetato de Na^+ . Os íons migraram de um eletrodo para o outro, dentro da célula, pela passagem de corrente elétrica (carga iontoforética) e assim carregando a célula. Um terceiro microeletrodo registrava o potencial da membrana. A injeção de Na^+ produziu uma variação do potencial de membrana para valores mais negativos (Figura 3.9), de cerca de 15 mV, após o que o potencial de membrana retornava para o seu valor de repouso (em cerca de 10 minutos).

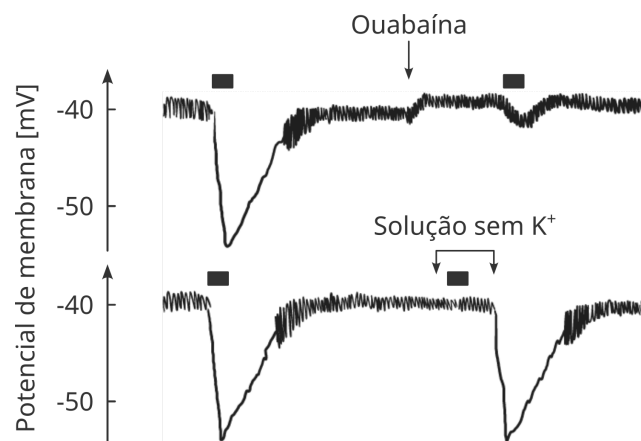


Figura 3.9 - Resposta de neurônio de caramujo (*snail*, em inglês) a injeções de íon Na^+ demonstrando a natureza eletrogênica da bomba, a inibição com o inibidor de ATPase ouabaína e a dependência da existência de K^+ no banho externo para o bombeamento.

Quando a injeção foi feita após o tratamento com ouabaína (traçado superior, seta e segunda barra), não houve modificação de E_m . No traçado inferior após a injeção controle, nova injeção é feita na ausência de K^+ no meio externo. Neste caso também não houve resposta mostrando que a variação de potencial estava acoplada ao transporte de K^+ para dentro da célula. O retorno de solução 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^+ acoplado a entrada de K^+ então deveria sair mais Na^+ do que entrar K^+ . Mais tarde, utilizando uma 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 o sódio injetado era transferido para fora (medido com eletrodo sensível a íon, estes produzem tensão proporcional à 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^+ promoveu 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 permitirem medidas precisas da corrente que flui através de toda a célula para níveis pré-fixados de potencial. Os cálculos de Thomas levaram a estimativa de um efluxo resultante no bombeamento de 27% de transferência de Na^+ , ou seja sera de 3Na^+ para cada 2K^+ .

2.5.3. 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:

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

e que E_m é de aproximadamente -60 mV no axônio isolado, poderíamos calcular $[\text{Cl}^-]_i$ como:

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

Contudo, o valor medido foi de 108 mM que é aproximadamente o dobro do previsto pela equação de Nernst. Duas hipóteses podem ser levadas:

- 1) Cl^- encontra-se ligado dentro das células, ou;
- 2) Há bombeamento ativo de Cl^- .

Medidas da atividade do Cl^- (com eletrodos sensíveis a íons) mostraram que o coeficiente de atividade do Cl^- é igual dentro e fora da célula. Isto indica que pouco Cl^- possa estar ligado no meio intracelular. Além disso, o influxo de Cl^- é reduzido à metade na presença de DNP mostrando a ideia de captação ativa.

2.5.4. Cálcio

A concentração de Ca^{2+} no axoplasma é baixa, cerca de 400 μM (total). Ao contrário do K^+ , uma grande quantidade de Ca^{2+} encontra-se ligado a diversos sítios de ligação de Ca^{2+} na forma, portanto, não-iônica (Baker e Crawford, 1972). Usando como indicador de Ca^{2+} a proteína _____ (aquorina/apuorina), que emite luz na presença de Ca^{2+} , foi possível mostrar que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é da ordem de 100 nM. O gradiente para entrada de Ca^{2+} é bastante grande ($[\text{Ca}^{2+}]_o \approx 10000 \times [\text{Ca}^{2+}]_i$). O influxo seria balanceado com a extrusão ativa do íon (Baker, 1976). Há também bombeamento similar de Mg^{2+} . Já se chamara a atenção para o fato de que a baixa concentração intracelular de Ca^{2+} e a capacidade da célula variar $[\text{Ca}^{2+}]_i$ caracterizaria o íon como um importante "frigger" fisiológico. A liberação de apenas 1% de Ca^{2+} ligado no axoplasma de lula, iria aumentar $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 40 vezes, ou seja de 0,1 para 4 μM . Veremos mais tarde que este "frigger" 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 de geração de força durante o processo de acoplamento excitação-contração. 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 Fig. 3.10 mostra um resumo de alguns transportadores iônicos de membrana que correspondem a transportes ativos.

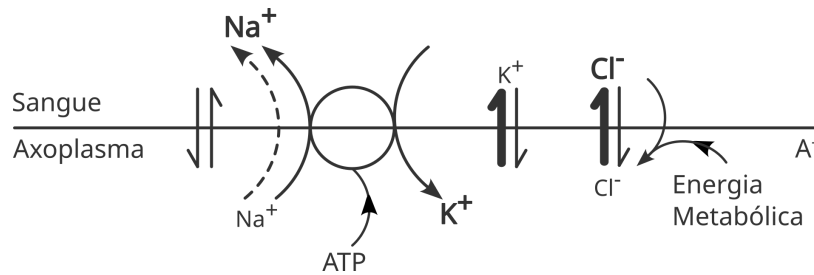


Figura 3.10 - Representação esquemática do movimento dos principais íons monovalentes através da membrana de axônio gigante de squid, na condição de repouso. Linhas cheias retas representam fluxos passivos e as curvas são transportes ativos. Tamanho dos símbolos lembram as concentrações relativas (Katz, 1975).

3.5. O Potencial de Repouso (E_R)

Vimos que a célula pode exibir uma d.d.p. através de sua membrana, gerada pelos íons difusíveis, e calculada pela equação de Nernst (pelo menos quando se pensa em cada íon separadamente, ou seja, no potencial de equilíbrio de cada íon). Se Na^+ não entra na célula, com as diferenças de concentração apresentadas (Tabelas 1 e 2), o sistema fica em equilíbrio de Donnan e Osmótico. Sabemos que Na^+ entra nas células, mas se o transporte ativo der conta de manter a $[\text{Na}^+]_i$ tão baixo quanto necessário, então tudo estaria resolvido. Isto implica que a membrana deve ser praticamente impermeável ao Na^+ , no repouso, e que mudar esta permeabilidade durante a atividade, período em que a bomba daria conta de jogar para fora o Na^+ que entrou, completaria o entendimento. Como entender, agora, 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 depois 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, a por volta de -60 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 vai, 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 dos íons 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^+ . Deste modo, K^+ parecia ser o candidato mais forte. No entanto, era preciso mostrar de algum

modo que E_R “seguiria” o E_K ou E_{Cl} . A Figura 3.11 ilustra experimentos realizados com variação de cerca de 4 vezes na concentração extracelular de K^+ ou Cl^- em fibra muscular isolada de rã.

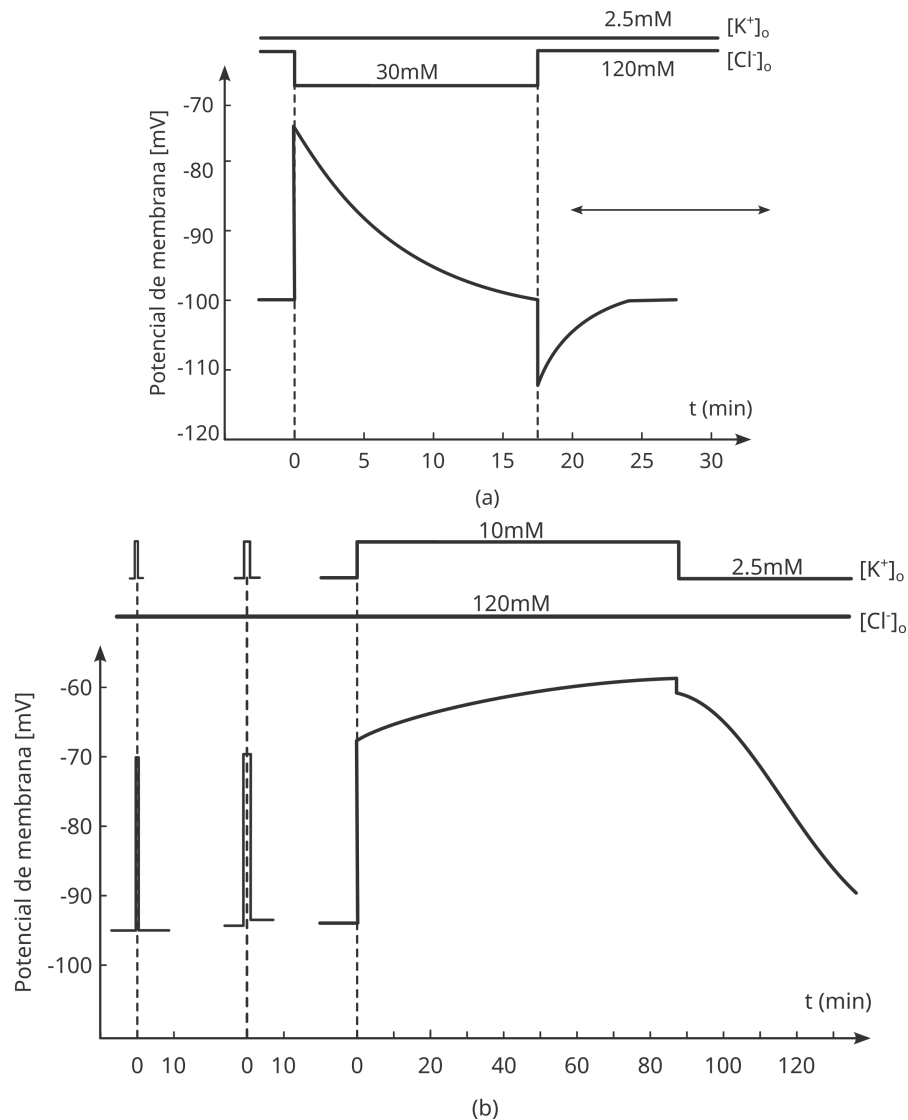


Figura 3.11 - Efeito de redução rápida de $[Cl^-]_o$ e de mudanças de $[K^+]_o$ sobre o potencial de membrana de fibra muscular isolada de rã (Hodgkin e Horowitz, 1959).

A primeira coisa a ser notada nestes experimentos é que a mudança na concentração externa dos íons efetivamente faz variar E_R . 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_R retorna para os valores iniciais de antes da mudança. No caso do K^+ a resposta de E_R é bem diferente. Variações rápidas de E_R são registradas para variações rápidas de $[K^+]_o$. A resposta a uma variação mantida de $[K^+]_o$ é uma variação de E_R que se mantém até que $[K^+]_o$ retorne aos níveis iniciais.

Os resultados desses experimentos indicam claramente que o íon K^+ esteja mais diretamente ligado ao estabelecimento de E_R . Deste modo, à $18^\circ C$:

$$E_R = 58 \log_{10} \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

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 $\log [K]_o/[K]_i$ conforme uma reta com inclinação 58 mV/unidade de acréscimo de $\log_{10}[K]_o$. Considera-se como premissa que o potencial de Cl^- não esteja influenciado. Isto pode ser conseguido eliminando o Cl^- , trocando-o por sulfatos. A Fig. 3.12 mostra as variações de E_R causados por mudanças em $[K]_o$ em músculo sartório de rã. Este experimento caracteriza o que se denomina de eletrodo de K^+ .

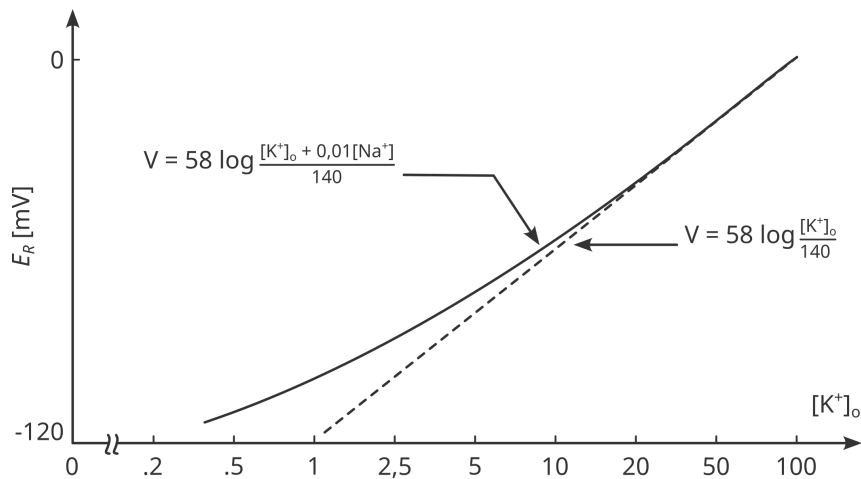


Figura 3.12 - Efeito da concentração externa de K sobre o potencial da membrana de fibras musculares isoladas de rã. A solução externa não continha Cl^- que foi substituído por sulfato (Hodgkin e Horowitz, 1959).

Os dados experimentais confirmam o modelo teórico para $[K]_o$ maiores que 10 mM. Abaixo deste valor o $|E_R|$ é menor do que o esperado. Qual seria a razão para este fato? A membrana não é totalmente impermeável aos íons de Na^+ , e deste modo Na^+ participa da gênese de E_R . Uma abordagem conhecida por teoria do campo constante foi desenvolvida anteriormente por Goldman (1943) para estudar o caso. 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:

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

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

$$P = \frac{\mu \beta R_T}{aF} \text{ [cm/s]},$$

onde β é o coeficiente de partição entre a membrana e a solução aquosa, μ 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:

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

onde $\alpha = P_{Na}/P_K$. Na Fig. 3.12 a equação acima é plotada com $\alpha = 0,01$ e neste caso ajusta-se bem aos dados experimentais. Isto significa que o íon Na^+ tem uma pequena participação, mas esta é maior quando a $[K]_o$ 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, com o objetivo principal de apresentar conceitos e evidências para explicar a origem dos biopotenciais.

3.6. Resumo

1. As células excitáveis exibem uma diferença de potencial através da membrana, negativa dentro com 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 iônicas assimétricas dos dois lados, intra e extracelular, separadas por uma membrana que exibe permeabilidade seletiva aos íons. No repouso, seu valor é maiormente devido ao potencial de equilíbrio do íon de potássio (K^+), dada sua maior permeabilidade a ele;
3. As concentrações são mantidas a partir de assimetrias geradas pelo equilíbrio de Donnan e reposição das condições iniciais sem as perturbações e em equilíbrio pelo bombeamento ativo de íons, em especial pela bomba de Na/K;
4. Aparentemente, o E_M é estabelecido de acordo com os valores dos potenciais de equilíbrio dos íons (definidos pelas suas diferenças de concentração e calculadas pela equação de Nernst) e pela permeabilidade relativa da membrana aos íons;
5. O E_M tenderá ao E_X (onde X é o íon em questão) se a membrana for mais permeável a esta espécie que a outras.

3.7. Conselho

1. Não deixe de saber o conceito de potencial de equilíbrio;
2. Memorise e saiba obter por dedução a equação de Nernst, na forma geral e na forma simplificada à 18°C;
3. Saiba como a ATPase Na^+/K^+ foi estudada para se determinar a sua natureza eletrogênica. Saiba o papel desta bomba na manutenção do E_R .

Capítulo 4

Descrição: Serão estudadas as bases iônicas do Potencial de Ação (PA); teoria do Na^+ para o PA; técnica de *voltage-clamp*; Medição de correntes iônicas em células nervosas; modelo de Hodgkin e Harley do PA nervoso; 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 perfusão 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 convenientes foram buscadas, e uma das mais utilizadas foi a preparação do axônio gigante de lula. A Fig. 4.1 ilustra esquemas gerais de medição da atividade elétrica em axônio gigante de lula. Em (a) um capilar de vidro (50 μm de diâmetro) é inserido longitudinalmente na célula (cilíndrica, cujo diâmetro varia de 500 a 700 μm). Outra configuração consiste na produção de microeletrodos de cerca de 0,5 μm de ponta para atravessar transversalmente a membrana. Os eletrodos são normalmente preenchidos com solução fisiológica isotônica, no caso daqueles de grande diâmetro, e com KCl 3M nos microeletrodos.

A Fig. 4.2 mostra um esquema (como uma fotografia em luz polarizada) de um axônio gigante de lula com um eletrodo duplo, espiral inserido no seu interior. Observe a dimensão do axônio como única solução para a necessidade, na época, de excitação de mais de um tipo de eletrodo. As preparações, nestes casos, estavam em banhos com solução fisiológica, tipicamente a solução e Ringer (115 mM NaCl, 2 mM KCl e 1,8 mM CaCl_2) para o músculo ou a própria água do mar para o nervo.

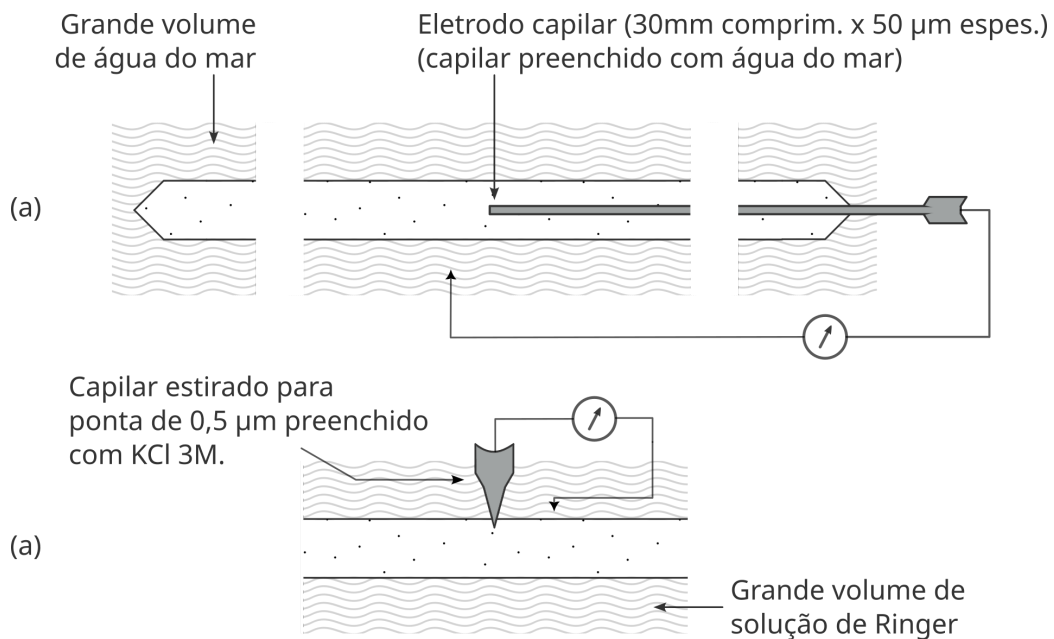


Figura 4.1 - Métodos de medição de valores absolutos do potencial de membrana e potencial de ação. (a) inserção longitudinal de eletrodo de 50 µm de diâmetro em axônio gigante de lula; (b) inserção transversal de eletrodo de 0,5 µm de diâmetro usado para registros a partir de fibras musculares e outras células (Hodgkin, 1951).

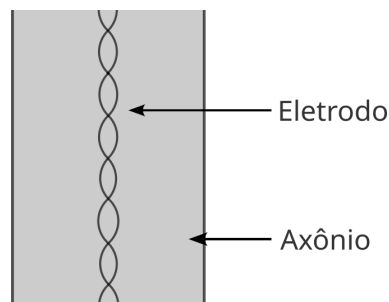


Figura 4.2 - Esquema representativo de uma fotografia, sob luz polarizada, de axônio de lula (diâmetro de 700 µm) no qual um eletrodo espiral duplo foi inserido (Keynes & Aidley's Nerve and Muscle, 2020).

4.2. Registro e Estimulação

Ao registrar biopotenciais é preciso se preocupar com os chamados potenciais de contato, ou de junção líquida. Estes potenciais são originados da polarização de metais em solução, devido à passagem de corrente elétrica através dos eletrodos. Uma boa solução quando se deseja medir potenciais de contato é usar eletrodos chamados de reversíveis, dos quais 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 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 registros mais precisos, recomenda-se as meia-células de calomel (eletrodo saturado de calomelano) (mercúrio/mercúrio-Cl⁻).

Para registros intracelulares, o eletrodo deve ser muito bem isolado, exceto na ponta, e tão fino cuja penetração na célula cause o mínimo de lesão possível, não

ocasionando fugas de corrente. A Figura 4.3 ilustra a montagem experimental com axônio e os registros obtidos.

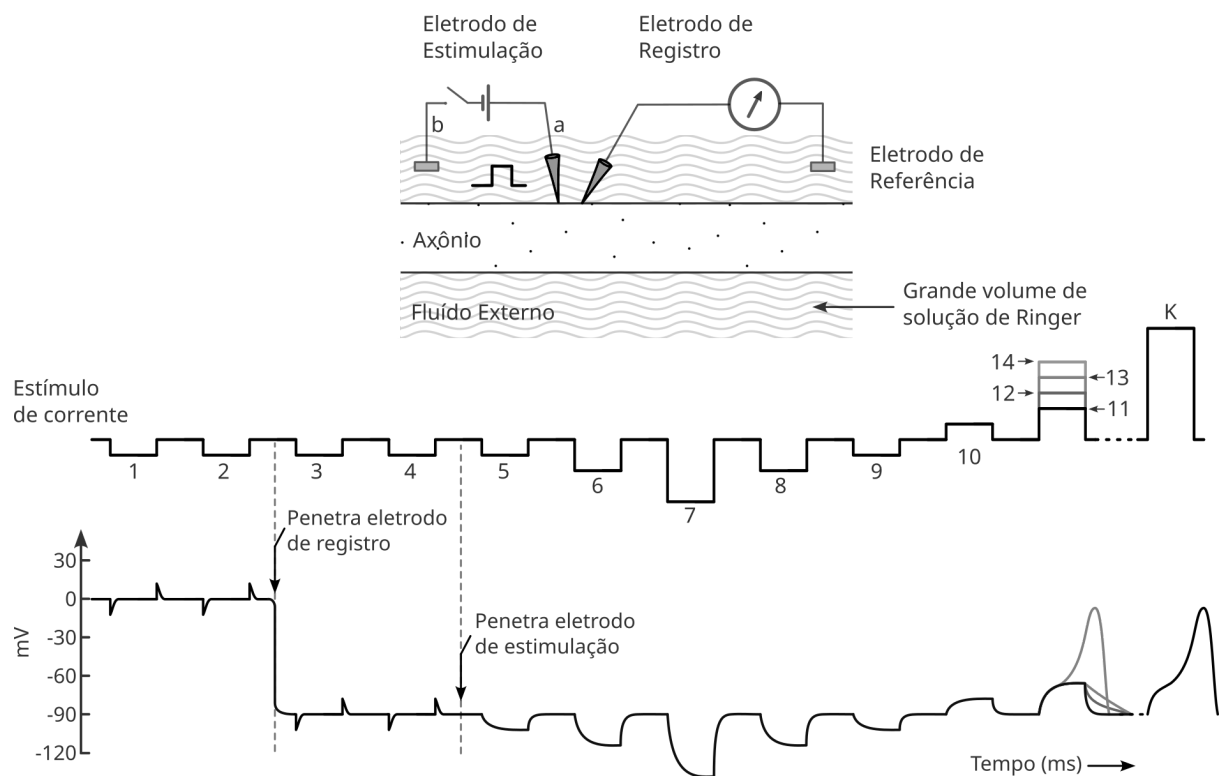


Figura 4.3 - Montagem experimental com o axônio gigante de lula e registro de potenciais graduados e potenciais de ação (Katz, 1966).

Inicialmente, ambos os eletrodos estão próximos à membrana, próximos um ao outro (~50 μm) e fora da célula. A linha superior do gráfico da Figura 4.3 mostra o protocolo de estimulação elétrica com pulsos de corrente. Pulsos negativos correspondem a injeção de corrente, e o contrário à drenagem de corrente. Veja o que está sendo captado nos eletrodos de registro. Como você explicaria a resposta aos dois primeiros pulsos? A variação de tensão tem cerca de 1 a 2 mV pico-a-pico.

Será que este registro corresponde à relação 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 elétrica entre *a* e *b* (na Figura 4.3), existir a resposta observada? Ao olhar com cuidado a resposta (e em especial com olhos de engenheiro biomédico), vemos que esta é do tipo capacitiva (uma pequena resposta capacitiva): o potencial vai para valores mais negativos e retorna exponencialmente (na borda de descida do pulso estimulatório), o inverso ocorre para as bordas de subida. Há alguma razão para que esta resposta seja uma resposta capacitiva do sistema eletrodos-solução-registro? A resposta a esta questão é sim! Há capacitâncias parasíticas que perfeitamente dão conta da geração deste sinal. A própria junção vidro-água faz surgir capacitores. Apenas para garantir que estas não são respostas da célula, basta tirar o axônio. Mas mesmo assim os sinais continuam. Na 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 vamos observar o que acontece 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 banho externo, com cerca de -100mV. Para o engenheiro, potenciais de alguns poucos milivolts são mesmo grandes, fáceis de trabalhar do ponto de vista de medição, amplificação e processamento. Este potencial registrado (-90 mV) é estável e corresponde ao registro elétrico do potencial de repouso, E_R . O ruído persiste e é razoável de se imaginar que seja a mesma resposta capacitiva das capacitâncias parasitas envolvidas. O eletrodo de estimulação continua fora da célula.

Entre os pulsos 4 e 5, o eletrodo de estímulo é penetrado na célula. Agora, como pode se ver, para os pulsos estimulatórios de 5 a 9, a passagem de corrente através da membrana celular provoca uma variação de E_M (a célula parece estar sofrendo estimulação, ou estar sendo excitada). E_M vai para valores cada vez mais negativos, à medida que os estímulos têm sua amplitude aumentada. A resposta se inverte quando, no 10º pulso a direção da corrente é invertida (ao drenar corrente da célula, E_M vai para valores positivos). Veja que os estímulos de 5 e 10 são iguais em amplitude, mas de sinais distintos (opostos em polaridade). Nestes casos, a resposta seguiu a polaridade e amplitude 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 nos pulsos de 5 a 9?

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 eletrotônicos. Já vimos que a capacitância da membrana é da ordem de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, e sua resistência elétrica varia no intervalo de 1 a 8 $\text{k}\Omega/\text{cm}^2$. As respostas graduadas são respostas passivas da membrana, “funcionando” como um 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 ($\sim +40\text{mV}$) e, independentemente do término do pulso estimulatório, atinge o nível máximo e retorna ao E_R . Em outras palavras, esta variação de E_M não é mais controlável pelo estímulo, e como pode ser visto pelo pulso k, de maior amplitude, ela é do tipo tudo-ou-nada. O nível máximo não mais depende do estímulo. Uma vez deslocado para um certo nível limiar, ou limítrofe. E_M se desenvolve na forma desta brusca variação, que se denomina de potencial de ação (PA). Ao contrário das respostas graduadas, o PA exhibe comportamento altamente não-linear, e não pode ser explicado 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 ($E_R \approx -100 \text{ mV} \Rightarrow E_M (\text{PA}) > 0$). O PA é agora a grande preocupação. Que tipo de resposta é esta, e qual a sua 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 E_M à distância do ponto de estimulação. Veja na Figura 4.4 a nova configuração experimental.

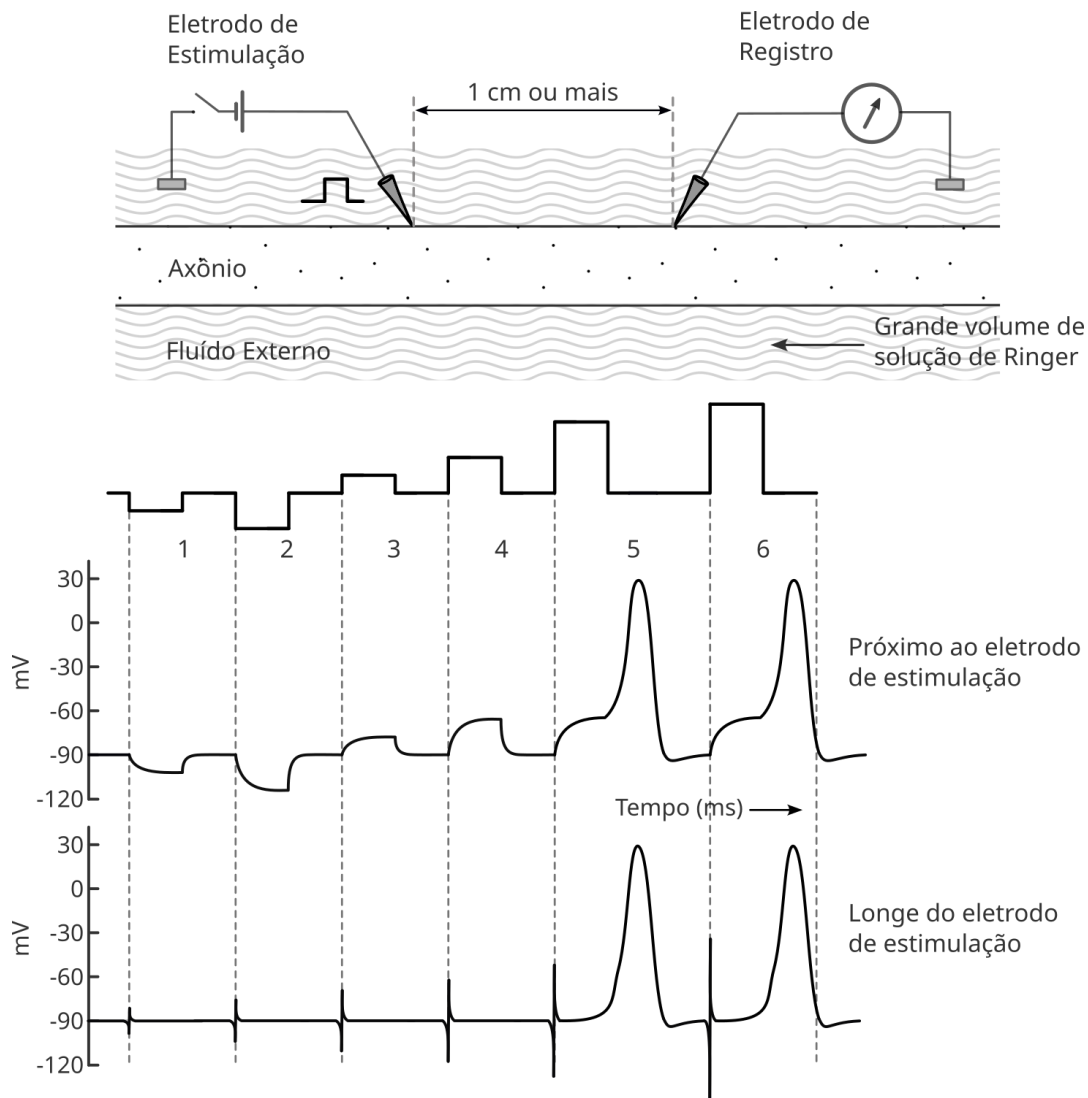


Figura 4.4 - Montagem experimental para registro de biopotenciais em axônio. Eletrodos de registro colocados vários milímetros de distância dos eletrodos de estimulação, visando investigar a propagação de potenciais (Adaptado de Katz, 1966).

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 pelo estímulo surge quase que instantaneamente nos eletrodos de captação. Veja, também, que a resposta graduada (sublimar para ocorrência de PA) não foi detectada nos eletrodos de registro, e que os PAs cujas formas e amplitudes são as mesmas, independentemente da amplitude do estímulo limiar (veja tamanho dos artefatos), aparecem no eletrodo à distância, com as mesmas características morfológicas que apareciam no eletrodo próximo (Figura 4.3). Há um certo tempo, finito, entre o estímulo e o aparecimento da resposta, chamado de tempo de latência.

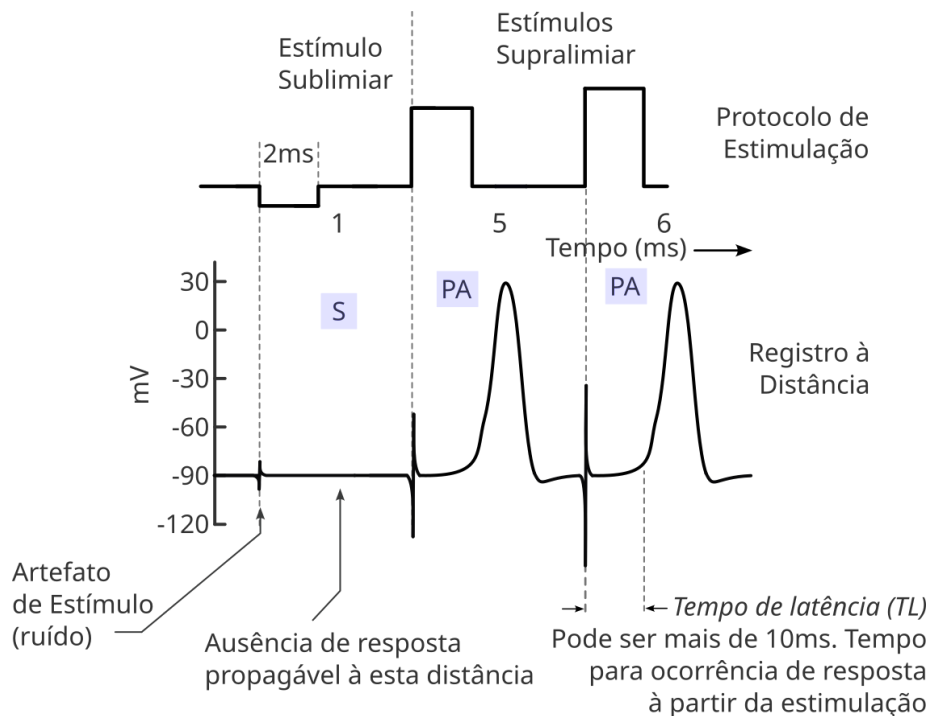


Figura 4.5 - Esquema amplificado para ilustrar a propagação de potenciais em experimentos semelhantes ao da Figura 4.4, em que a linha superior é o protocolo de estimulação, e a linha inferior a resposta medida. PA: potencial de ação, T_L : tempo de latência, S: estímulo elétrico.

É muito importante ver que a variação de E_M apresentada em resposta a estímulos graduados, é visível quando o eletrodo de registro estava posicionado próximo aos estímulos (Figs. 4.3 e 4.4), não são mais detectadas à distância (traçado inferior, Fig. 4.4, e ampliado na Fig. 5). As variações (deslocamentos) de E_M , graduadas, não foram capazes de atingir o nível crítico tal que disparasse um PA, e por isso são chamadas de sub-limiar. 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). Nestes casos, dizemos 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, em direção ao zero volts.

Nestes experimentos, apresentados nas Figs. 4.3 e 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.

Prefiro me referir a algo como condição limiar do que como potencial limiar, porque este potencial no qual um PA seria disparado é diferente se a duração do estímulo, ou sua forma de aplicação (rampa ou degrau) for alterada. Estas informações, de caráter puramente fenomenológico, têm hoje bastante embasamento teórico e experimental. Para o engenheiro biomédico, são fundamentais, e serão explicadas em tópicos à parte, quando já conhecermos melhor o potencial de ação, e formas de verificar o processo de estimulação elétrica de tecidos isolados, nervos e músculos.

Vamos, agora, explicitar características básicas dos PAs nervosos, como descrito na Figura 4.6. Deve-se notar que o PA é uma variação rápida de E_M , que produz um *overshoot*

(ultrapassa 0 mV), mesmo após o estímulo supralimiar já ter sido desligado (Fig. 4.5). É uma resposta altamente não-linear, e não mais controlável pelo estímulo (veja Fig. 4.5, aumento da intensidade do estímulo não provoca o aumento do nível obtido pelo 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 ao eletrodo de estímulo atinge a mais de 1 cm os eletrodos de registro). Isto se deve à natureza autoregenerativa 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 potencial de ação 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.

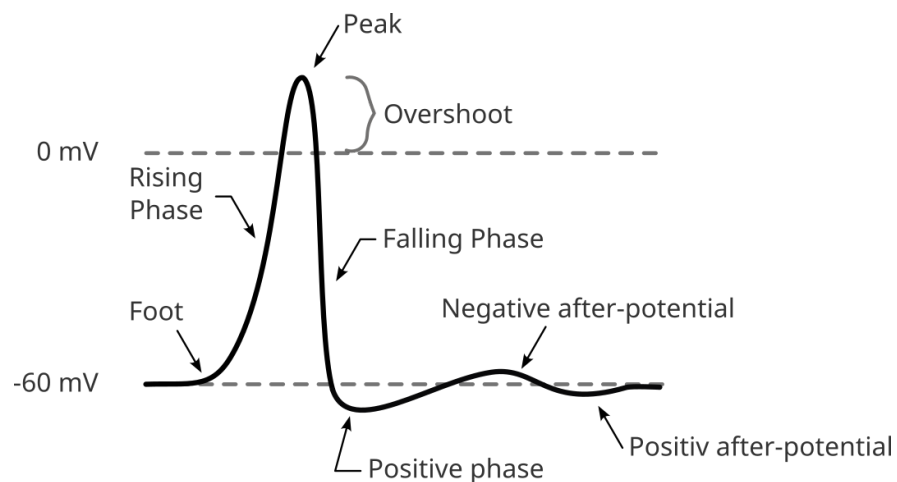


Figura 4.6 - Diagrama da nomenclatura aplicada ao potencial de ação e aos pós-potenciais.

4.4. Parâmetros de Estimulação Elétrica

4.4.1. Relação Intensidade-Duração ou 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).

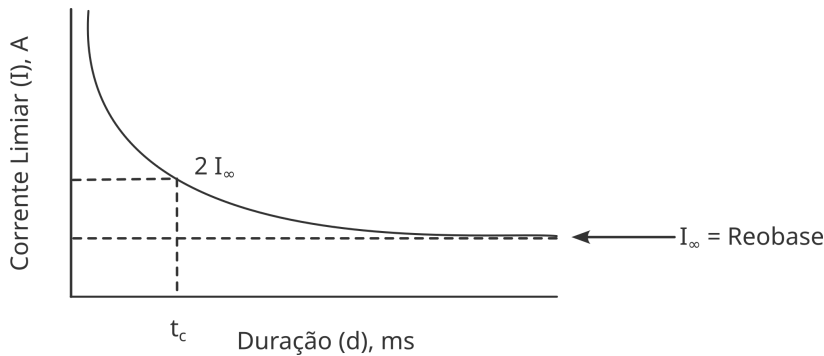


Figura 4.7 - Curva Intensidade-Duração ($I \times d$) em neurônios. I é a corrente limiar, I_∞ a corrente para $d \rightarrow \infty$, também denominada de reobase. O valor da duração para pulsos de intensidade igual ao dobro de I_∞ é denominado de tempo de cronaxia (t_c).

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 necessária para se estimular um PA com o dobro da corrente de reobase), é bastante característica das preparações e é inclusive usado com finalidade diagnóstica. A relação empírica da Figura 4.7 pode ser ajustada por uma relação tal que:

$$\frac{I}{I_\infty} = \frac{1}{1 - e^{-t/K}}, \quad (4.1)$$

onde I é a intensidade do pulso estimulatório, t é a largura do pulso, I_∞ é a intensidade limiar para valores muito grandes de t (valor reobásico), e K é uma constante (Lapique, 1907, Hill, 1936). Esta expressão é denominada de equação de Lapique, a qual já foi associada à queda de tensão em um circuito RC paralelo, mas hoje já se sabe que o fenômeno é mais confuso.

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

4.4.2. Latência

Revolvendo 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).

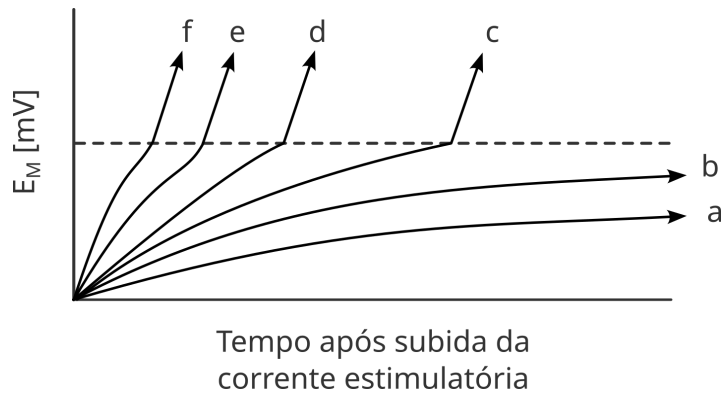


Figura 4.8 - Efeito de correntes despolarizantes sobre o E_M em axônio. A intensidade da corrente aumenta de a para f. As respostas de c a f levaram à excitação com produção de PA.

4.4.3. Adição Latente

Se um estímulo despolarizante sub-limiar é aplicado à membrana, ela permanece, por um certo período, mais “próxima” do limiar. Neste caso, um estímulo também sub-limiar, à partir do repouso, pode induzir um Potencial de Ação (Figura 4.9). De modo inverso, se o primeiro estímulo for hiperpolarizante, pode ser necessário um estímulo maior que o supra-limiar, na condição de repouso, para disparar um PA.

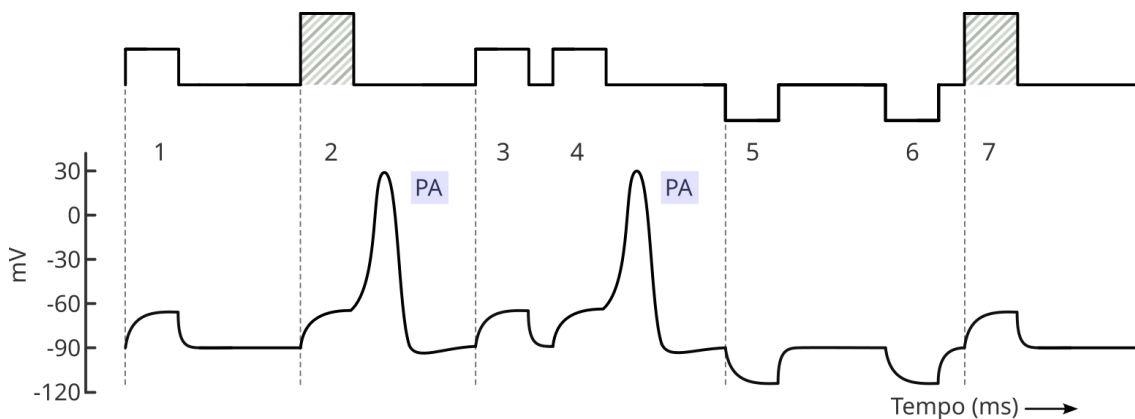


Figura 4.9 - Adição Latente: Estímulos sub-limiais podem colocar E_M mais próximo da condição limiar. Estímulos hachurados são supra-limiais, a partir do repouso (2 e 7). O estímulo 6, ao ser hiperpolarizante, e apresentado antes do estímulo 7, impediu a geração de um PA. Já o estímulo sub-limiar 3, favoreceu o aparecimento do PA pelo pulso 4.

4.4.4. Acomodação

O limiar muda durante a aplicação do pulso estimulatório. Se um pulso despolarizante é mantido, o limiar tende a subir, o contrário ocorre durante um pulso hiperpolarizante (há queda de limiar). Este fenômeno é denominado de acomodação. Como consequência da acomodação, um outro fenômeno pode ser identificado: 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, E_M ultrapassa o limiar, e um PA é disparado.

Outra consequência é o fato de que um PA pode ser gerado com uma variação de E_M 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).

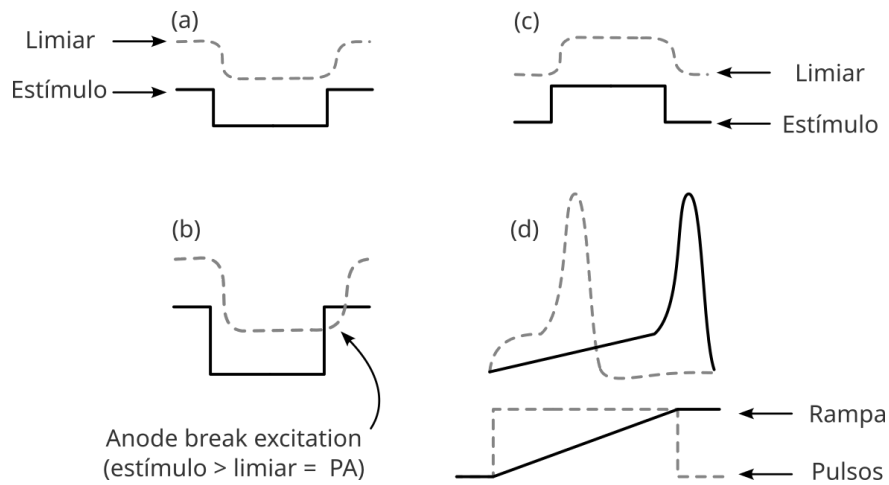


Figura 4.10 - Fenômeno da acomodação de limiar. (a) Estímulo hiperpolarizante tende a reduzir, e (b) despolarizante a aumentar o limiar. Hiperpolarização de longa duração tende a reduzir muito o limiar. (c) No retorno do pulso, pode haver estimulação por quebra de anodo. (d) A aplicação de estímulos na forma de uma rampa podem levar E_M para valores bem acima do E_M limiar correspondente em degrau ou pulso.

4.4.5. Refratariedade

A membrana celular exibe 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 $\frac{2}{3}$ de duração de um PA, começando a se reduzir (talvez um estímulo de maior intensidade possa reativar a célula no último terço de duração de um PA), entrando em um período de refratariedade relativa, até o retorno à condição normal de excitabilidade. Não é comum 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-limiar.

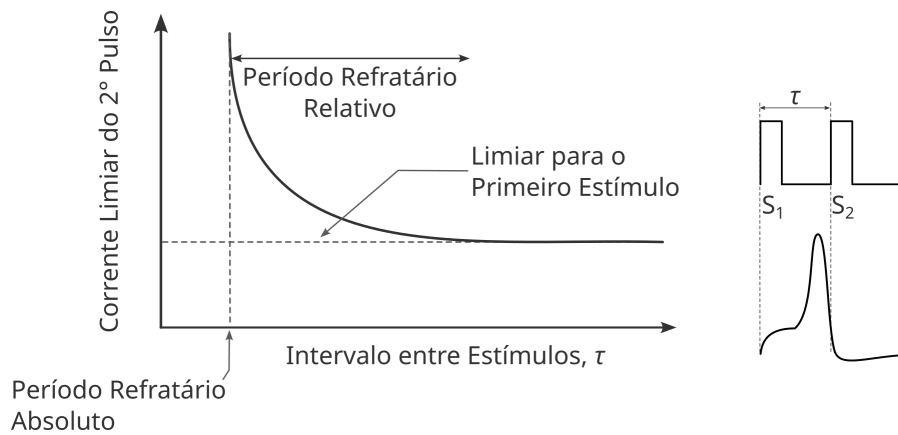


Figura 4.11 - Refratariedade celular. O período refratário absoluto equivale aproximadamente ao tempo de duração dos primeiros $\frac{2}{3}$ do PA. A curva indica que, no período refratário relativo, S_2 precisa ser maior, em amplitude, que S_1 , ambos lineares, para gerar o PA. τ é o intervalo entre os estímulos.

4.4.6. Estimulação Extracelular

Vamos ver, agora, o que acontece quando estimulamos células e conjuntos de células (tecidos) isolados, com eletrodos externos. Um pouco do entendimento do que ocorre é importante, pois 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 à ativação elétrica dos nervos ou músculos são registradas superficialmente. A estimulação elétrica é também utilizada para finalidade terapêutica como nos marcapassos, 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).

4.4.7. Potencial de Ação Composto

O esquema abaixo ilustra uma montagem, para trabalho com nervo ciático de rã. O nervo é colocado em solução de Ringer, solução na qual sobreviverá por muitas horas, ou até mesmo dias. O nervo é suspenso até a superfície do líquido, como na Fig. 4.12, 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 nestas condições, vamos ver o que acontece.

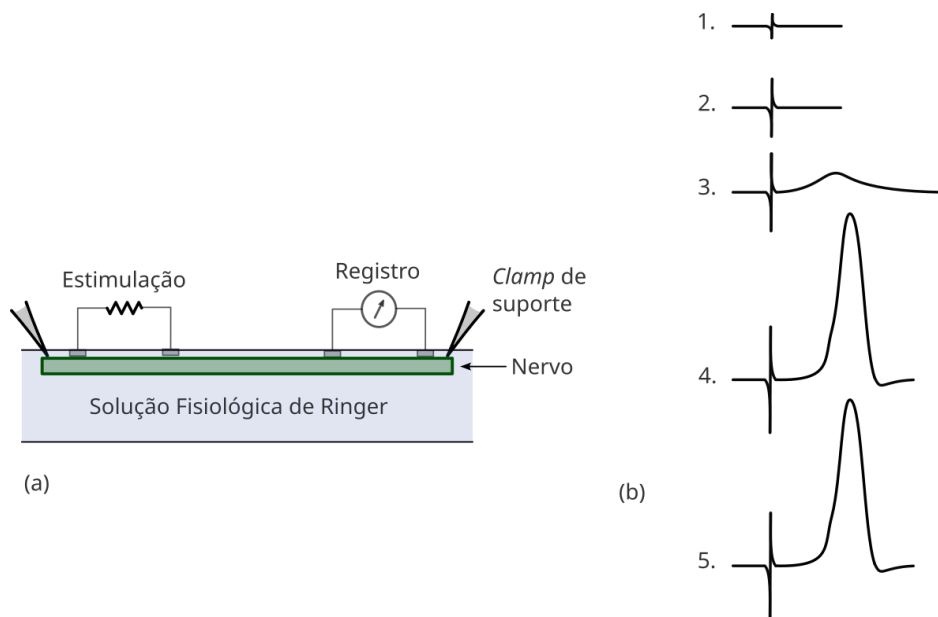


Figura 4.12 - Configuração experimental para estimular nervo ciático de rã.

Iniciamos o experimento aplicando estímulos de baixa intensidade e, no equipamento de registro, observamos apenas os artefatos de estímulo, como nos dois traços 1 e 2 da Fig. 4.12. A partir de uma intensidade “limiar”, uma resposta começa a ser visualizada, 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 individuais do nervo (axônios). É uma soma temporal (ou seja, uma composição) das contribuições (PAs) das células que acabaram sendo estimuladas. Veja que, em 3, o sinal do PAC é menor, porque nem todas as células haviam sido estimuladas. Os eletrodos estão a distâncias diferentes de cada uma das células, e além disso, o limiar estimulatório não é igual para todas as células (os axônios de maior diâmetro são excitados mais facilmente!). Se nós dissecássemos uma célula (axônio) deste nervo, e a estimulármos individualmente, a amplitude captada externamente seria extremamente pequena para este caso de eletrodos extracelulares. A resposta máxima, como visto no traçado 5 da Fig. 4.12, pode ficar entre 15 e 20 mV, bem menor que os 100 mV registrados intracelularmente.

É claro que não há sanduíche de graça! Tudo o que queremos é registrar o mais distante da fonte possível, para não sermos invasivos, mas quanto mais longe da fonte, menor o sinal adquirido. É nestas condições que nós, engenheiros biomédicos, queremos interpretar o que está ocorrendo com a fonte. Em outras palavras, queremos medir o PAC, e e poder dizer que a sua forma (ou outra característica do sinal) indica que apenas os axônios, por exemplo, classificados como de diâmetro d_1 , estão danificados, ou inoperantes. Queremos mais ainda! Que tal registrar um eletroencefalograma, e dizer que as células caracterizadas por L01 e L02 do lóbulo occipital estão hiperativas? Infelizmente estamos longe disto!

É evidente que a mesma limitação em frequência dos axônios está expressa nos nervos. A capacidade de enviar sinais a pontos distantes do organismo é restrita a uma série de pulsos breves, de frequência limitada. O processo de estimulação em si não é

objeto deste texto. Apenas para iniciar o entendimento, veja na Fig. 4.13 uma possível ideia para explicar o processo.

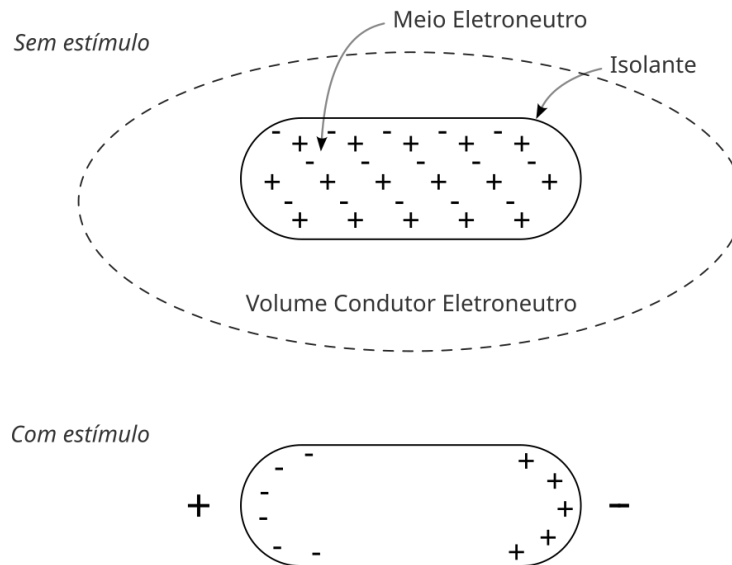


Figura 4.13 - Células e suas regiões de eletroneutralidade. As cargas se reorganizam, de modo que a eletroneutralidade seja mantida.

Do lado do polo negativo (cátodo), se acumulam internamente, e próximo à membrana, cargas positivas. As cargas positivas anulam as cargas negativas fixas na 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 de membrana do qual falamos até agora está apresentada na Fig. 4.14.

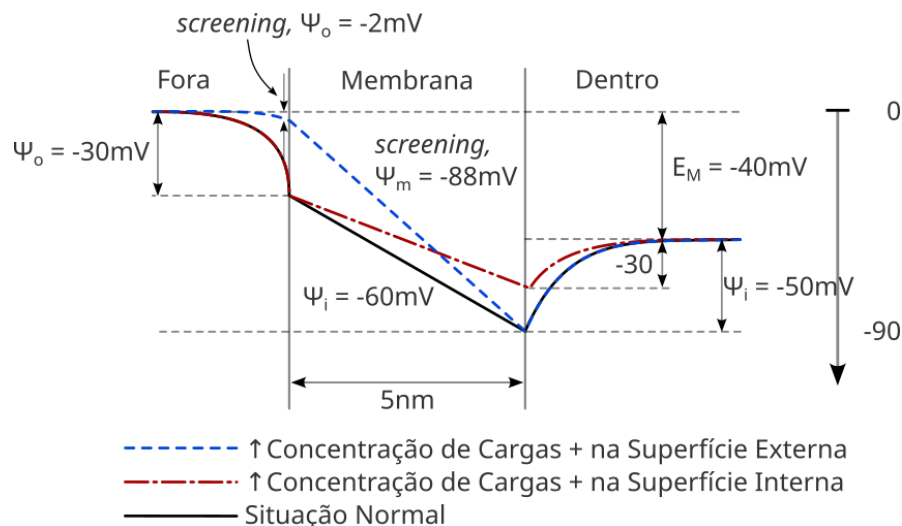


Figura 4.14 - Campo através da membrana. Efeito de acumulação de cargas (charge screening) por alta concentração de cátions divalentes no meio externo. Screening reduz ψ_0 de -30 para -2mV, fazendo ψ_M mais negativo para o mesmo E_M . $\psi_M = -90$ (dentro) - (-30) (fora) = -60 mV. Agora, $\psi_M = -90 + 2 = -88$ mV (modificado de Bers, 2001).

A adição de cargas positivas do lado externo, por exemplo, por aumento da concentração externa de Ca^{2+} , anula cargas da superfície externa, tornando o módulo de ψ_0

menor e aumentando ψ_M , ou seja, fazendo ψ_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 ψ_i (Fig. 4.14) tenderá a ter seu módulo reduzido, indo para valores menos negativos (digamos, para -30 mV), ψ_M irá para -70 mV $-(-30 \text{ mV}) = -40 \text{ mV}$, nível de potencial próximo do ideal para disparar um PA. Isto poderá ser melhor entendido quando se estudar o processo de ativação de canais iônicos de membranas.

Apenas para não deixar vago, o campo na membrana vai ser estímulo definitivo para muitos canais controlados por E_M . Variações em E_M levam à variações no campo que ativa a abertura, por exemplo, à canais de Na^+ (lembre-se que Na^+ é abundante no meio extracelular), que irá se mover a favor de seu gradiente eletroquímico, e com isso (se foi entendido o potencial de equilíbrio de Nernst), “leva” o E_M para valores ainda mais positivos, ativando, em realimentação positiva a abertura de 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 detalhes 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 estudarmos a teoria do núcleo condutor para explicar a condução regenerativa de PAs, e a chamada teoria dos circuitos locais para a propagação. Neste ponto, vemos também as propriedades do axônio como cabo condutor.

4.5. Teoria Iônica de Condução Nervosa

A questão que apresentamos é a seguinte: o que está acontecendo na membrana durante a passagem de um PA? A Fig. 4.15 corresponde a um dado clássico da literatura, mostrando variação da impedância elétrica de membrana durante a passagem de um PA. Esta é a primeira demonstração “direta” de modificação na permeabilidade iônica da membrana como um todo. Os autores Cole e Curtis foram responsáveis, também, pelo desenvolvimento do primeiro aparato para controlar a tensão e medir corrente através da membrana, o chamado *voltage-clamp* que veremos mais adiante.

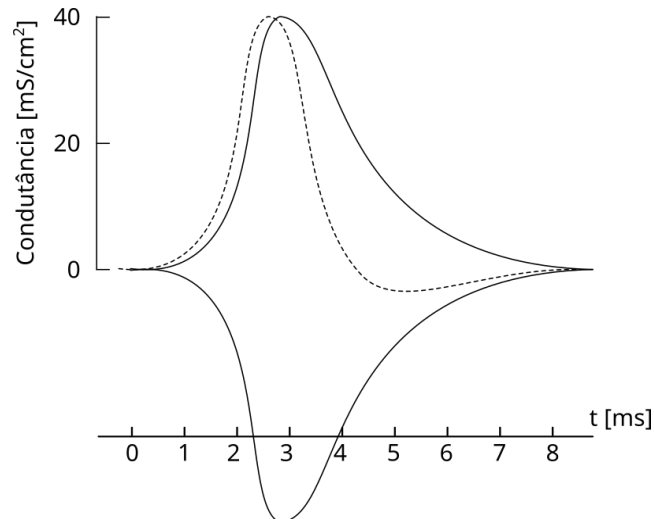


Figura 4.15 - Curto temporal da condutância de membrana em axônio de lula. A condutância cresce durante o PA, voltando aos valores de repouso lentamente. A medição foi feita pelo desbalanceamento de uma ponte de Wheatstone de alta potência aplicada através do axônio (Cole e Curtis, 1938).

Bom, em 1902, Julius Bernstein (considerado o fundador da teoria de membrana), havia proposto que, no repouso, a permeabilidade da membrana era maior ao íon potássio. O PA seria devido a uma “quebra” desta permeabilidade ao íon (quase que por romper o dielétrico, transitoriamente), levando E_M para zero. Na ocasião, só foi possível para o pesquisador mostrar que, a partir de uma estimulação, E_M atingiu zero, e retornou ao seu valor de E_R . Tendo em vista o experimento da Figura 4.15, não parecia razoável a hipótese de uma “quebra” de permeabilidade. A condutância da membrana varia continuamente, e cerca de 40 vezes o sinal inicial, durante a passagem de um PA. Era preciso se fazer alguma coisa!

Pela primeira vez, Hodgkin e Huxley (1939, 1945) e Curtis e Cole (1940, 1942) mediram um PA completo no axônio, usando micropipetas. A grande surpresa da medição mais acurada foi o fato de E_M não atingiu o nível zero, apenas. E_M era revertido para valores positivos, por dezenas 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 íons de Na^+ . Se isto ocorresse, a entrada de Na^+ levaria E_M para próximo do seu potencial de equilíbrio (E_{Na}), que está próximo de +60 mV - Viu como se é importante saber a equação de Nernst e entender o significado do potencial de equilíbrio dos íons?.

Após a guerra, ficou claro que o potencial de membrana ultrapassava o valor zero durante um PA, o que levou Hodgkin e Katz (1949) sugerirem que o processo era um rápido e específico aumento de permeabilidade da membrana aos íons de Na^+ . Para testar a validade desta ideia, conhecida como teoria do Sódio, Hodgkin e Katz mediram a amplitude de PAs de axônios colocados em soluções com diferentes concentrações de Na^+ . Na ausência do íon, 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 $\log_{10}[Na]_o$ era próxima de 58 mV, como se deveria esperar pela equação de Nernst aplicada ao Na^+ .

A batalha para medir o movimento de íons Na^+ , como sempre, começou difícil. Vamos ver aqui apenas um conjunto de experimentos realizados por Keynes em 1951 sobre

o movimento de Na^+ e K^+ radioativos em axônios. De modo semelhante ao experimento mostrado na Fig. 3.6 (estudo de ATPase Na/K), o axônio podia ser mergulhado em água do mar com isótopo radioativo, carregado com ele, e transferido para a câmara de perfusão, para contagem de radiação.

A Fig. 4.16 ilustra o experimento com ^{42}K . Após 15 min de carga, o axônio foi transferido para a câmara de medição, monitorando-se a radioatividade nos próximos 40 min. Quando apresentada em escala logarítmica, encontrou-se uma reta. O valor inicial, assim que o axônio foi transferido para a câmara de medição, foi estimado por extrapolação. A partir deste valor, conhecendo-se a $[\text{K}]$ na água do mar, e sua atividade específica, a taxa de entrada de K^+ pôde ser calculada. Em seguida, o axônio foi para a água do mar com ^{42}K para ser estimulado por 10 min. Retornando à câmara de contagem, o acréscimo de radioatividade 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.

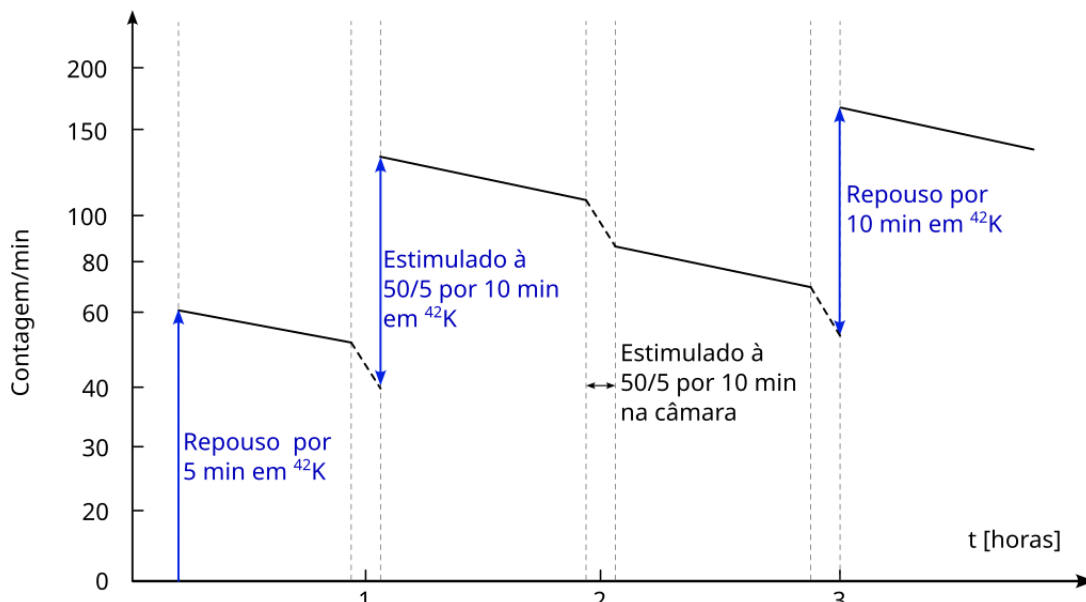


Figura 4.16 - Resultados de experimentos para ver o movimento de ^{42}K no axônio gigante de Sépia (Keynes, 1951).

Experimentos semelhantes foram realizados para encontrar números sobre o transporte do íon Na^+ no axônio. O resultado principal está apresentado na Figura 4.17. Um resumo dos principais resultados está apresentado na Fig. 4.18.

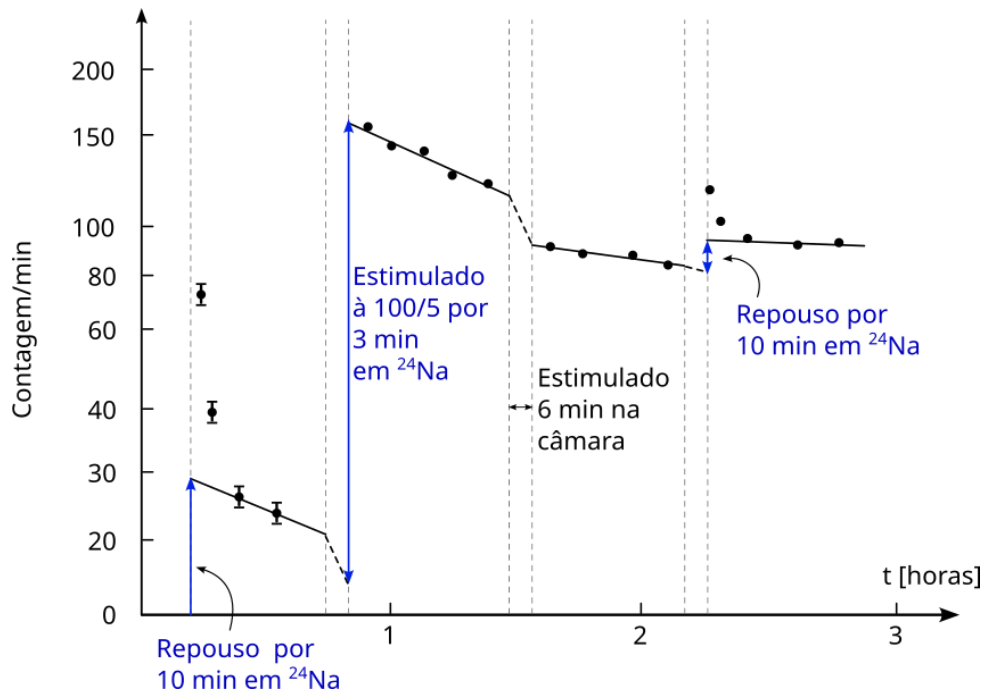


Figura 4.17 - Resultados de um experimento para determinar o movimento de íons Na^+ em axônio gigante de Sépia. Os valores registrados imediatamente após o período de imersão em água do mar radioativa provavelmente incluem radioatividade carregada do meio externo. As linhas retas são, portanto, traçadas com os pontos posteriores, apenas (Keynes, 1951).

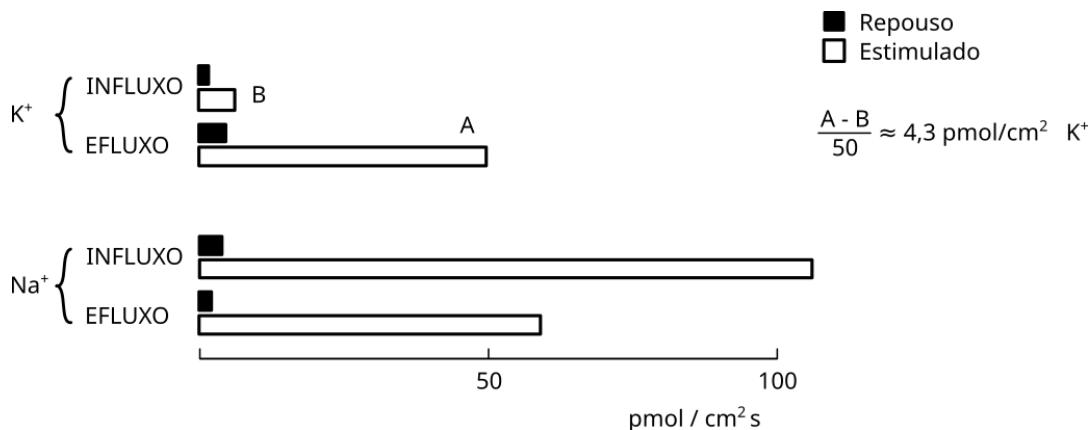


Figura 4.18 - Fluxos dos íons de Na^+ e K^+ em axônio gigante de Sépia. A barra escura identifica o repouso, e a barra branca o estímulo à 100/5 (Keynes, 1951).

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

Se esta sugestão é correta, deve ser possível mostrar que a quantidade de íons Na^+ que entram no axônio é suficiente para causar as variações de E_M . A carga Q (em coulombs) em um capacitor de capacitância C (em Farads) é dada por:

$$Q = CV,$$

onde V é a tensão através do capacitor. Se esta carga é produzida por um íon monovalente, o número de mols do íon movido de um lado para o outro do capacitor é dado por:

$$n = CV/F,$$

onde F é a constante de Faraday. No caso do axônio, $C \approx 1\mu\text{F}/\text{cm}^2$, e V (no pico do PA) é de aproximadamente 110 mV. Assim, pode-se concluir que:

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

Segue que o fluxo resultante de íon de Na^+ é mais que suficiente para dar conta da mudança de E_M durante um PA (Keynes estimou serem $3,7 \text{ pmol}/\text{cm}^2$). Uma maneira mais direta e precisa de se medir os movimentos iônicos foi realizada por medições elétricas, e serão consideradas a seguir.

4.6. Voltage-Clamp

Com base na teoria do Sódio, a despolarização inicial que produz um PA deve resultar de um aumento da condutância ao íon de Sódio. Este aumento da condutância ao Sódio produziria um deslocamento de E_M para valores mais positivos e, com isso, aumentaria ainda mais sua condutância. Assim, teríamos um efeito de realimentação positiva (efeito em cascata) da condutância ao Na^+ (g_{Na}), como mostrado na Fig. 4.19a.

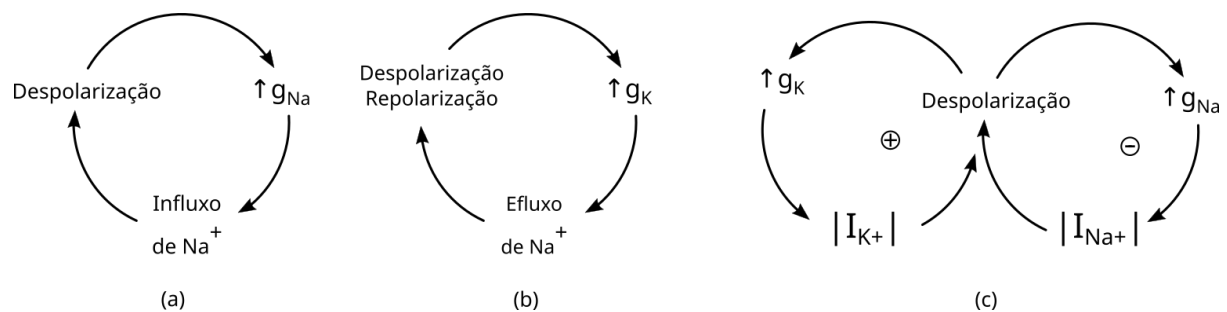


Figura 4.19 - (a) Efeito de realimentação positiva (efeito em cascata) entre a despolarização e a condutância ao Na^+ , e (b) efeito de retroalimentação negativa provocado entre despolarização e a condutância ao K^+ , e (c) a combinação dos dois efeitos, se estabilizando.

Se isto é verdade, definitivamente se constitui em um “loop” de realimentação positiva, e portanto, um sistema como este seria estável: a ativação do PA provocaria um aumento indefinido do potencial de membrana, E_M , o que sabemos que não ocorre. Onde está, portanto, a realimentação negativa para contrabalancear esse efeito (ou estabilizar o sistema). Esta se encontra em um outro “loop” do E_M , que antagoniza o efeito do íon de Na^+ , e é constituído pela realimentação entre a despolarização e a condutância ao íon de K^+ (Fig. 4.19b). A combinação dos dois efeitos é o que “estabiliza” o potencial de ação (Fig. 4.19c). Vamos ver que há outros efeitos importantes de despolarização sobre o controle da permeabilidade aos íons.

Sistemas como esse são muito difíceis de se analisar. As dificuldades foram tremendamente minoradas pelo uso de uma técnica denominada de método da fixação de voltagem, ou voltage-clamping. Nesta técnica, a corrente é drenada, ou injetada na célula para fixar em um valor desejado o potencial de membrana. Primeiramente, este método foi desenvolvido por Cole e Curtis (1936), e foi brilhantemente aplicado por Hodgkin e Huxley e Katz em 1952, e por Hodgkin e Huxley em 1952, para o estudo do PA de axônio gigante de lula. A Fig. 4.20 ilustra o esquema básico do sistema de voltage-clamping.

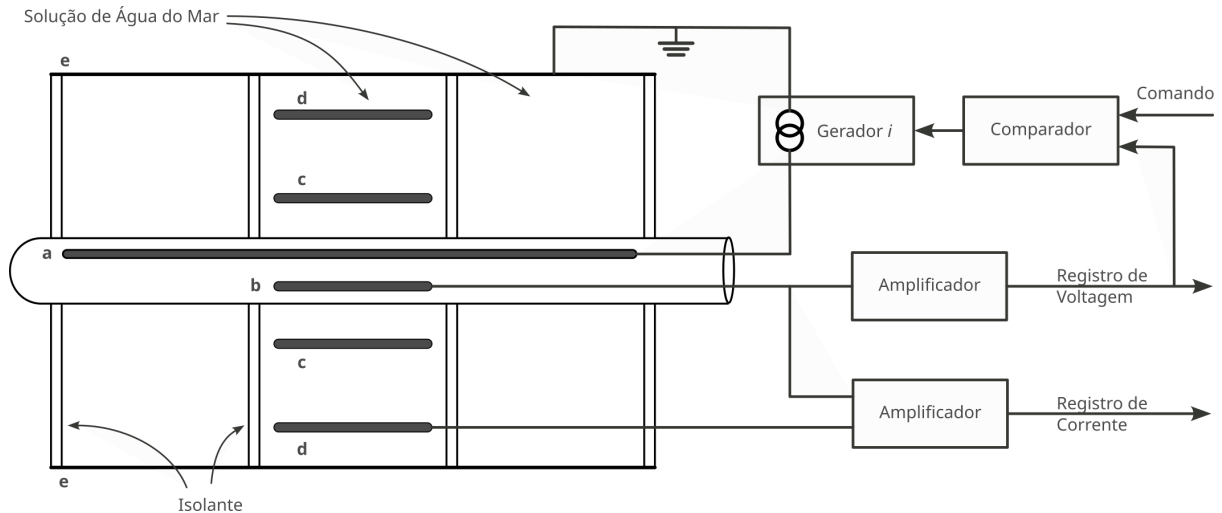


Figura 4.20 - Diagrama esquemático do método de voltage-clamping, usado para se medir correntes de membrana em axônio de lula, sob fixação da tensão (adaptado de Hodgkin, Huxley e Katz, 1952).

Dois fios de prata **a** e **b** são inseridos no interior do axônio. Do lado de fora, um eletrodo **e** é ligado ao terra. Passa-se corrente através da membrana do axônio, por meio de um gerador conectado entre os eletrodos **a** e **e**. Em uma porção central da câmara, encontram-se vários eletrodos separados por duas paredes isolantes, e por água do mar. Na parte mais intensiva da câmara, a 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 à corrente que atravessa a membrana. A tensão nessa dessa região da câmara é registrada por meio dos eletrodos **c** e **b**, sendo este último um dos eletrodos internos. Esta tensão, após amplificação, alimenta um comparador, que compara o sinal com uma referência (ou comando) para a fixação/clamping da tensão. A saída do comparador entra no gerador de corrente, de modo a controlar (aumentar ou diminuir, para estabilização) a corrente que flui através da membrana, fazendo com que a tensão através da membrana fique igual ao sinal de referência.

Este arranjo constitui-se num sistema de controle com realimentação negativa, o qual tem o papel de controlar/estabilizar a tensão aplicada (por isso voltage-clamping), sendo a tensão determinada pela tensão de referência. O fio interno tem um papel bem importante, curto-circuitando as “resistências internas”, o que leva à condição de “space-clamp” (fixação da tensão espacialmente). Neste caso, não há propagação. Vamos ver, mais tarde, com o estudo do modelo do núcleo condutor, que:

$$n = \sqrt{\frac{k}{2\rho_i}} a ,$$

onde v_c é a velocidade de condução dos PAs no axônio, k é uma constante, a é o raio do axônio, e ρ_i é a resistividade interna do axônio, dada por:

$$\rho_i = r_i \pi a^2.$$

No *space-clamp*, r_i tende a zero por causa do curto-circuito gerado pelo eletrodo interno. Assim, $\rho_i \rightarrow 0$ e $v_c \rightarrow \infty$. Assim, v_c é a mesma em todo o axônio, o que significa que, nestas condições, não há propagação. Dois eletrodos em pontos superficiais distantes, no axônio, “veriam” o mesmo E_M durante um PA.

Assume-se que a corrente que flui através da membrana do axônio seja formada por duas componentes, uma corrente capacitiva (causada pelas mudanças na densidade de cargas dos dois lados da membrana), e outra iônica (causada pela passagem de íons através da membrana). Assim, a corrente total é dada por:

$$I = C_M \frac{dE_M}{dt} + I_i,$$

onde C_M é a capacitância da membrana, E_M o potencial da membrana, e I_i a corrente iônica. Assim, quando E_M é mantido constante, no *clamp* teremos que:

$$\frac{dE_M}{dt} = 0,$$

e o registro de fluxo de corrente é a medição direta da corrente iônica que atravessa a membrana (I_i). A Fig. 4.21 ilustra as medidas feitas em 1952, por Hodgkin e Huxley.

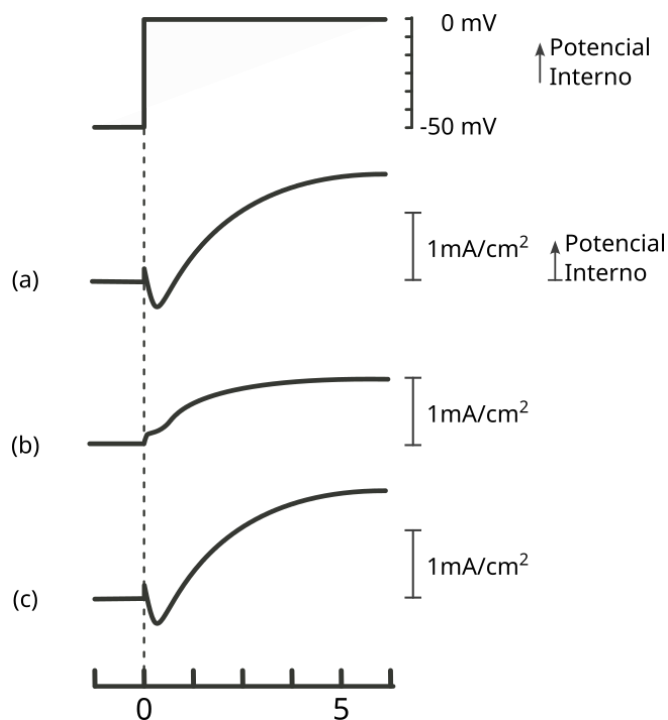


Figura 4.21 - Registros típicos de corrente transmembrana durante um degrau de voltage-clamp. (a) e (c) na água do mar, e (b) na solução sem NaCl, que foi substituído por cloreto de colina (Hodgkin, 1958, a partir de Hodgkin e Huxley, 1952a)

O registro da Fig. 4.21a mostra três componentes no sinal adquirido: primeiro há uma rápida e pequena corrente de saída. Esta é causada pela descarga do capacitor da membrana (corrente de característica capacitiva). Logo após, é registrada uma corrente entrando na célula, com uma duração de cerca de 1 ms, e finalmente, a corrente torna a sair da célula, indo para um valor em que permanece estável enquanto o degrau unitário perdurar.

Se, neste momento, lembrarmos da teoria do sódio para o PA, esperaríamos que a corrente de entrada inicial fosse causada pela entrada de Na^+ . Deste modo, ao retirar o íon do meio em que a célula se encontra, esta corrente deveria desaparecer. Isto de fato acontece, como se pode verificar na Fig. 4.21b, ficando apenas uma corrente de saída, ao ser retirado o Na^+ .

O que aconteceria se o potencial de clamp fosse posicionado mais negativo, e mais positivo, passando pelo potencial de equilíbrio do Na^+ (E_{Na})? Pode-se observar este efeito da Fig. 22, visando esclarecer essa questão.

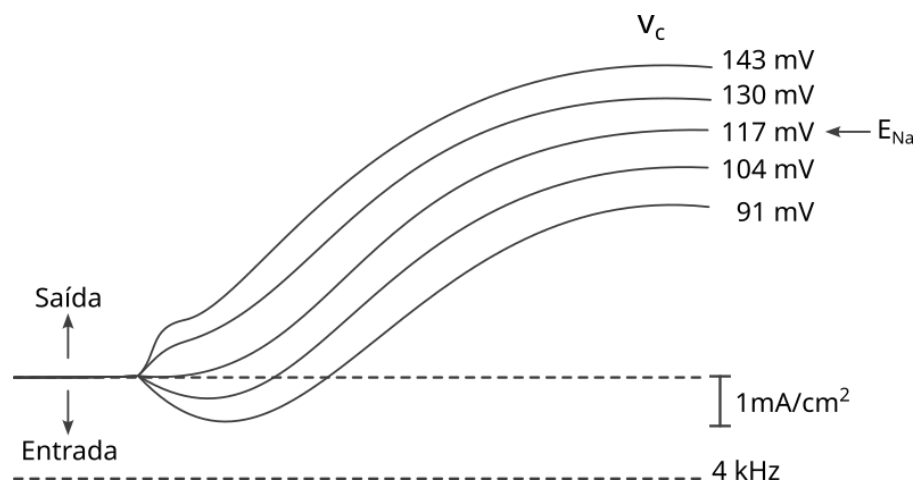


Figura 4.22 - Correntes de membrana em grandes despolarizações. Valores de tensão de *clamp* estão à direita dos traçados (Hodgkin, Huxley e Katz, 1952)

Como era de se esperar, quando o *clamp* (V_c) é feito em E_{Na} , a “corrente de Na^+ ” desaparece, ficando apenas a corrente de saída. Para $V_c < E_{\text{Na}}$, tudo se comporta como no caso típico, ou seja, a corrente de entrada seguida pela corrente de saída. Para $V_c > E_{\text{Na}}$, 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 corrente de 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} (hiperpolarização), durante o 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 o que ocorre foi obtida nos experimentos com ^{42}K na região do catodo (Hodgkin e 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 aos íons de K^+ .

A partir destes dados, e de engenhosidade da montagem experimental, foi possível desmembrar a corrente que atravessa a membrana do axônio em duas componentes: uma

corrente de saída de K^+ , obtida pela remoção de 98% do Na^+ externo, e com *clamp* em E_{Na} , e uma corrente de entrada, ocorrendo no início, que é a diferença entre a corrente total e a corrente de K^+ . A Fig. 4.23 ilustra esquematicamente a separação das correntes de Na^+ (I_{Na}) e K^+ (I_K).

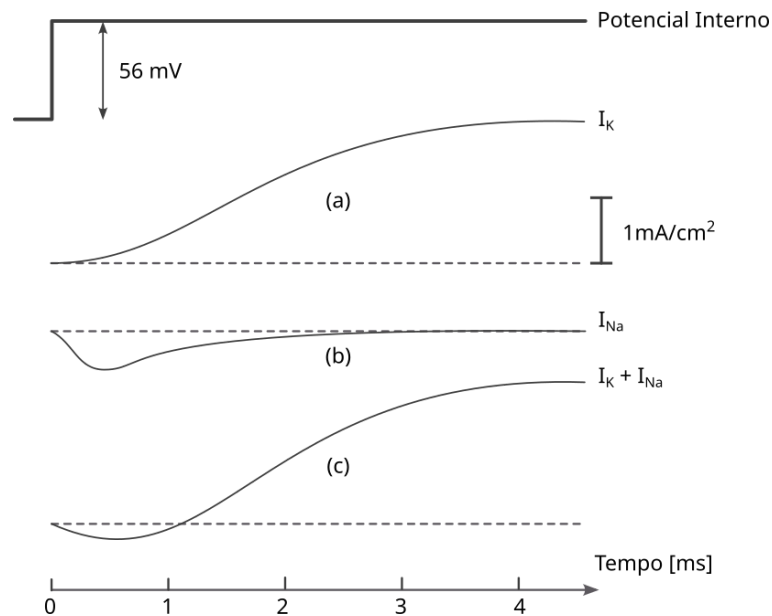


Figura 4.23 - (a) Corrente de K^+ (I_K), na ausência de Na^+ , (b) Corrente de Na^+ (I_{Na}), obtida subtraindo-se a corrente de potássio na ausência de Na^+ da (c) corrente total.

A ideia geral estava pronta: a permeabilidade (ou condutância) ao Na^+ deveria aumentar à medida que E_M fosse para valores despolarizantes, com isto, I_{Na} seria gerada, seguida de um aumento da condutância ao íon K^+ , gerando a corrente 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, transitória de I_{Na} e estabilização de I_K em um valor constante, monotonicamente? Aplicando-se a lei de Ohm, teremos que:

$$I_{Na} = q_{Na}(E_M - E_{Na})$$

$$\Rightarrow I_{Na} = q_{Na}(V - V_{Na}).$$

Deste modo, a partir de (c) da Fig. 4.23, fica fácil calcular q_{Na} , conhecendo-se V_{Na} . De maneira similar, a condutância ao K^+ pode ser calculada da Fig. 4.23b:

$$I_K = q_K(V - V_K).$$

O resultado está apresentado na Fig. 24.

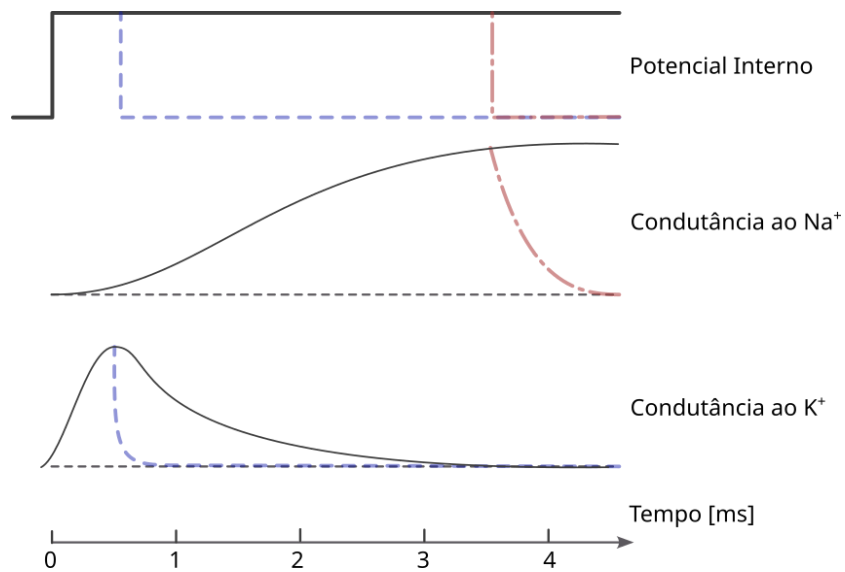


Figura 4.24 - Condutâncias para o Potássio e para o Sódio, dado um potencial de estimulação. Caso o pulso estimulatório termine no tracejado em azul, a condutância do Potássio seguirá a curva tracejada em azul. Caso o pulso termine na curva em vermelha, a resposta da condutância do Sódio é mostrado em vermelho.

Na Fig. 4.21, estão apresentados os cálculos das condutâncias para diferentes níveis de potenciais, a partir da importante contribuição de Hodgkin e Huxley (1952d).

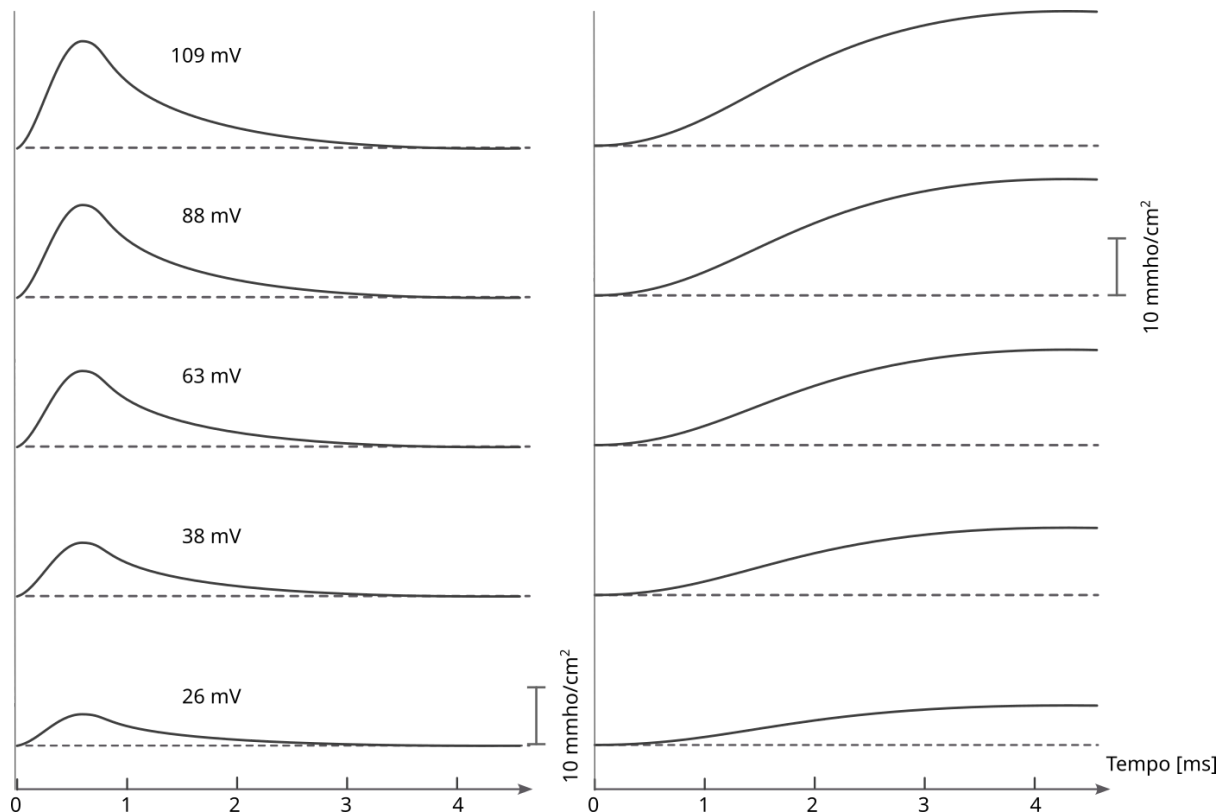


Figura 4.25 - Mudanças de condutância aos íons, causadas por despolarização por diferentes níveis de tensão (Hodgkin e Huxley, 1952d).

Resumindo: A despolarização produz três efeitos sobre a condutância iônica:

- 1) Aumento rápido de g_{Na} , seguido por 2);
- 2) Lento declínio de g_{Na} (conhecido por inativação de g_{Na});
- 3) Aumento lento da condutância ao potássio, g_K .

As variações de condutância dependem do deslocamento de V . Se V é levado ao valor de repouso, as mudanças nas condutâncias são revertidos. Veja que, se V é mantido, g_{Na} retorna ao nível inicial. Isto significa que há uma dependência pura do tempo, que será, esclarecida mais tarde como uma inativação tempo-dependente.

4.7. Modelo Conceitual para as Variações de Condutância

A interpretação física conceitual pode ser estudada pela observação da ideia das mudanças de q_K (mais simples).

- 1) “Partículas” dentro ou na membrana controlam a passagem de íons de K^+ ;
- 2) Um certo número de partículas ocupam certos “lugares” na membrana;
- 3) Controle Probabilístico:

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

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

- 4) As “partículas” são independentes;
- 5) As “partículas” não ficam permanentemente no “lugar” (veja Fig. 4.26).

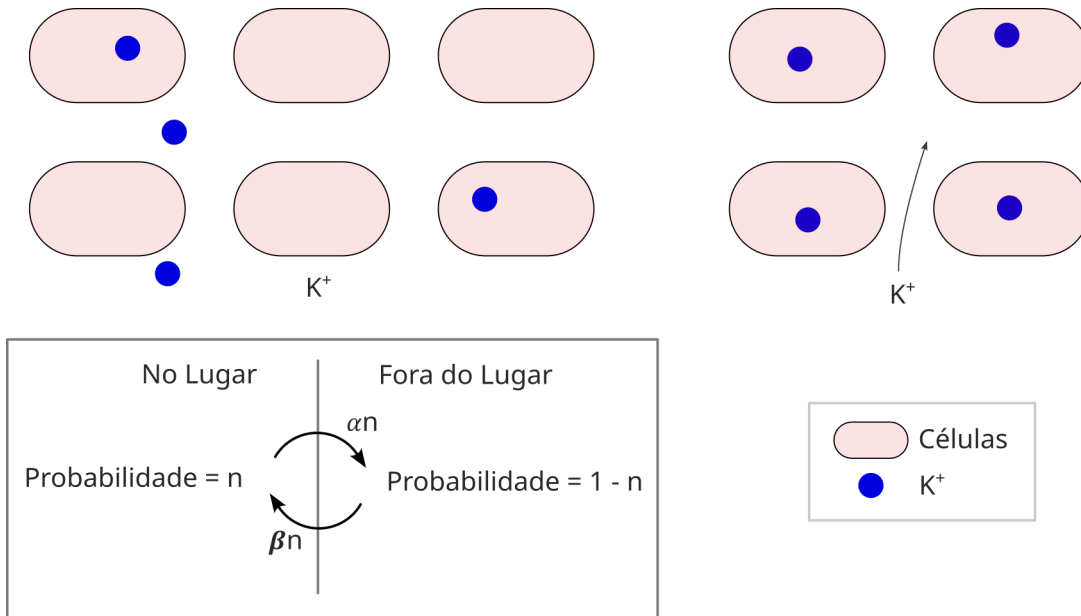


Figura 4.26 - As partículas de K^+ não ficam permanentemente no mesmo lugar.

Fenomenologicamente, pode-se descrever a seguinte equação, adquirida do ajuste aos dados experimentais:

$$g_K = \overline{g_K} \cdot n^4 \quad (4.5)$$

A Eq. 4.5 foi obtida empiricamente, das mudanças de condutância e ajuste de equações polinomiais. $\overline{g_K}$ seria a máxima condutância ao íon. A ideia então é que os íons de K^+ podem atravessar a membrana quando 4 “partículas” carregadas se movessem 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:

$$\frac{dn}{dt} = (1 - n)\alpha_n - n\beta_n, \quad (4.6)$$

equação tirada dos modelos de dois compartimentos. As constantes α e β são constantes de variação que à 6 °C mudam com V , de acordo com a Eq. 4.7.

$$\alpha_n = \frac{0,01(V+1)}{\exp[(V+10)/10]-1}; \quad \beta_n = 0,125 \cdot \exp(V/80). \quad (4.7)$$

Observação: é um bom exercício verificar na literatura como as constantes α e β são determinadas experimentalmente.

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

$$g_{Na} = \overline{g_{Na}} \cdot m^3 \cdot h, \quad (4.8)$$

onde $\overline{g_{Na}}$ é uma constante que representa o máximo valor de g_{Na} . A Eq. 4.7 é baseada na hipótese de que a condutância ao sódio seria controlada por três “partículas”, cada uma com probabilidade m de estar em um dado “lugar” exato, produzindo ativação de I_{Na} ($m =$

variável de ativação do íon de Na⁺), e o processo é inativado por um evento de probabilidade (1-h). A variável m é dada por:

$$\frac{dm}{dt} = (1 - m)\alpha_m - m\beta_m, \quad (4.9)$$

onde, a 6 °C:

$$\alpha_m = \frac{0,1(V+2,5)}{\exp[(V+25)/10]-1}; \quad \beta_m = 4. \exp(V/18). \quad (4.10)$$

E h, A 6 °C:

$$\frac{dh}{dt} = (1 - h)\alpha_h - h\beta_h, \quad (4.11)$$

$$\beta_h = \frac{1}{\exp[(V+20)/10]+1}; \quad \alpha_h = 0,07. \exp(V/20). \quad (4.12)$$

A corrente total de membrana, I, é dada pela equação:

$$I = c_M \frac{dV}{dt} + I_K + I_{Na} + I_h, \quad (4.13)$$

$$I = c_M \frac{dV}{dt} + g_K(V - V_K) + g_{Na}(V - V_{Na}) + g_l(V - V_l), \quad (4.14)$$

$$I = c_M \frac{dV}{dt} + \overline{g}_K n^4 (V - V_K) + \overline{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + g_l (V - V_l), \quad (4.15)$$

4.8. Cálculo da Forma do PA

Agora, se o modelo conceitual está correto, é possível, da Eq. 4.6, calcular 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-propagável. Se a propagação for permitida, novos termos devem ser considerados (obtidos da equação do núcleo condutor que veremos mais tarde):

$$I = \frac{a}{2R\theta^2} \frac{d^2V}{dt^2}, \quad (4.16)$$

onde a é o raio do axônio, R a resistividade do axoplasma, e θ a velocidade de condução. O valor exato de θ 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_l , R_l e c_M , e as equações obtidas para g_{Na} e g_K , a forma do PA pode ser calculada. A partir de experimentos de *clamp*, H-H foram capazes de determinar como g_K e g_{Na} dependem de V e do tempo. Vamos agora falar que:

$$g = f(E_M, t), \quad (4.17)$$

em que V será E_M e V_X será E_X (E_{Na} ou E_K). A Fig. 4.27 ilustra o potencial de ação calculado, e sua comparação com um PA medido (Huxley calculou tudo por integração numérica, com calculadora manual!!).

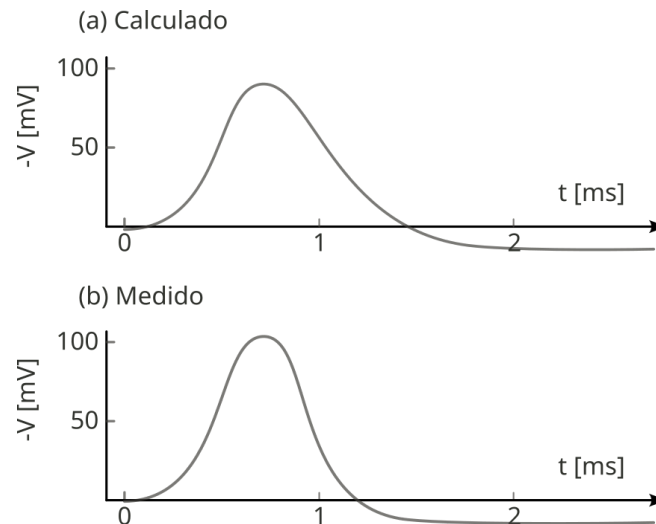


Figura 4.27 - Comparação de PAs (a) calculado e (b) propagado, em axônio de lula a 18 °C. A velocidade de condução foi de 18,8 m/s. A velocidade observada foi de 21.2 m/s (Hodgkin e Huxley, 1952d).

A Fig. 4.28, a seguir, é uma figura clássica muito usada para mostrar um PA propagado, e as respectivas mudanças nas condutâncias iônicas.

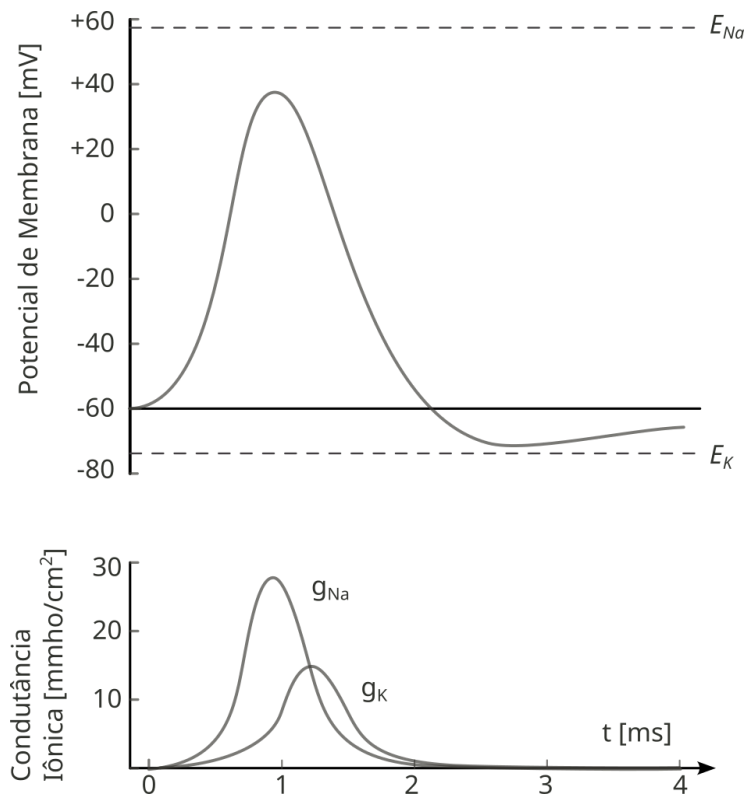


Figura 4.28 - Cálculo das mudanças de g_K e g_{Na} (curvas inferiores), durante uma PA propagado (curva superior). Originalmente calculado de modo mais preciso por Hodgkin e Huxley, 1952d.

Agora sim, vamos apresentar uma “colher de chá” aos engenheiros eletricitas. Uma boa síntese das ideias do modo de H-H pode ser feita utilizando-se um modelo elétrico da membrana, com as respectivas condutâncias. Esta síntese está apresentada na Fig. 4.28, na qual E é o potencial de membrana (d.d.p. dentro com relação ao meio externo), e as resistências o inverso das condutâncias. C_M é a capacitância da membrana. I_l é um vazamento de corrente (*leak* ou *leakage*, do termo em inglês), talvez devido a passagem mais livre de íons de cloreto através da bicamada.

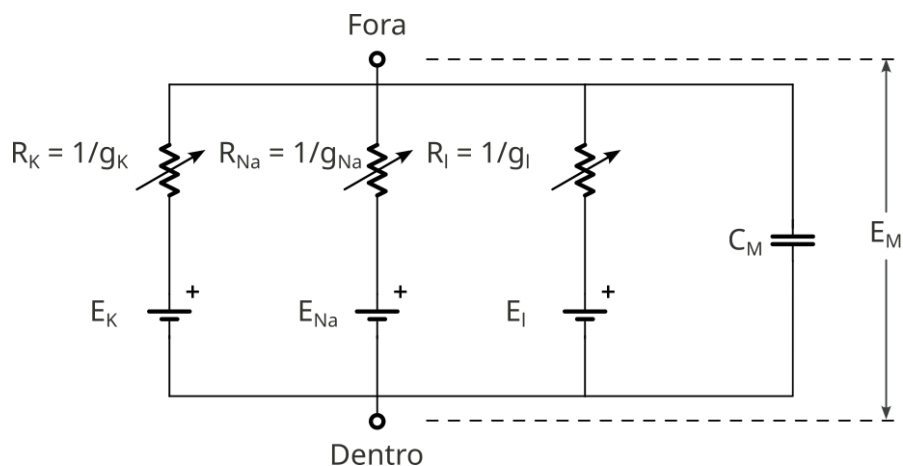


Figura 4.29 - Modelo conceitual de um pedaço (*patch*, do inglês) de membrana excitável. Veja que os potenciais de equilíbrio são baterias “constantes”.

Neste modelo, vamos assumir que o gradiente de concentração de um certo íon atue 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:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \log_e \frac{[K]_o}{[K]_i}, \quad (4.18)$$

no axônio de lula, E_K ≈ -70 mV (negativo dentro!). De modo similar, podemos ver que:

$$E_{Na} = \frac{RT}{zF} \log_e \frac{[Na]_o}{[Na]_i}, \quad (4.19)$$

e E_{Na} é tipicamente +55 mV. Os outros íons, dos quais Cl⁻ seria o mais expressivo, contribuem com uma terceira bateria, E_I, que pode produzir uma “corrente de fuga”. O valor de E_I está próximo de -55 mV. Em série com as baterias, estão as condutâncias variáveis, g_{Na} e g_K, e uma constante g_I. Estas representam, então, a facilidade com que os íons atravessem a membrana. Estes três “canais iônicos” estão ligados em paralelo, e são assumidos como independentes. As correntes que fluem por esses canais são I_{Na}, I_K e I_I. O efeito capacitivo está representado por C_M.

Resumo: Em repouso, E depende das condutâncias relativas, e neste caso, g_K >> g_{Na}, g_I, assim E_M tenderá a E_C - 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 → E_{Na}, g_{Na} atinge um máximo, e retorna de modo tempo-dependente. Em seguida, g_K aumenta, tendendo a levar E_M para E_K, e com isto o curso temporal do PA é justificado. Eletricistas, pensem nisto!

4.9. Canais Iônicos

Com o trabalho de H-H ficou claro que as condutâncias aos íons Na⁺ e K⁺ variam com o potencial de membrana. Na verdade, as condutâncias são chaveadas para a condição de ativadas pelo E_M. Do mesmo modo, canais seletivos aos respectivos íons são ativados pelo E_M. A abertura ou fechamento de milhares destas unidades é o que confere à membrana maior ou menor permeabilidade ao dado íon. Vamos ver que os canais de membrana se dividem em duas grandes categorias: os canais voltagem-dependentes, ou canais chaveados por tensão, e os canais chaveados por ligantes. O esquema abaixo (Fig. 4.30) ilustra os dois tipos de canais. No caso do canal controlado por tensão (Fig. 4.30), quando é estabelecida uma tensão V_M através da membrana, muda a condição de A para B, e o canal C se abre. Quando o canal é controlado por ligante, quando o ligante L se acopla ao receptor seletivo da membrana, o canal C se abre

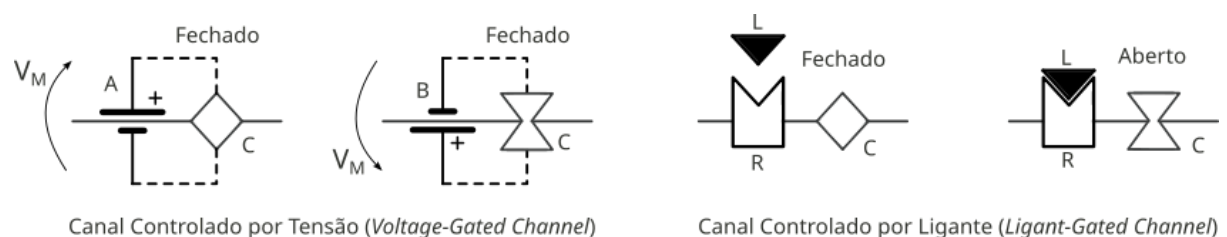


Figura 4.30 - Diagrama esquemático mostrando a diferença entre o canal controlado por tensão, eo canal controlado por ligante.

Vamos agora falar dos canais ativados por tensão. Destes, o canal de Na⁺ é um dos que exibem maior grau de conservação, ou 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 podem informar sobre a atividade individual de um canal específico. O método mais adequado para isto é o chamado de patch-clamp (fixação de pedaço). Nesta técnica, uma área muito pequena de membrana pode ser submetida à fixação de tensão, e os canais, que podem ser em número muito pequeno, ou apenas um, do pedaço estudado. As primeiras medições desta natureza foram feitas por Neher e Sakmann (1976), estudando os canais de acetilcolina em músculos desnervado.

A Fig. 4.31 ilustra essa técnica. Um microeletrodo 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 µm de diâmetro. A ponta deve ser polida e, eventualmente, tratada com resina para reduzir a condutância e capacitância do vidro, além de conferir à ponta um formato adequado, normalmente em forma de bala (*bullet shape*, do inglês). Este microeletrodo é preenchido com solução fisiológica cuja composição depende do que se deseja para o caso específico. Em princípio, essa solução deve ser isotônica com relação ao meio intracelular. O eletrodo é conduzido por um micromanipulador, até tocar a membrana da célula (Fig 4.31). 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 100 MΩ. Pequena pressão negativa é aplicada ao eletrodo (por sucção), de modo que a membrana seja protundida 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 de tight-seal (ou selo apertado), ou Gigaseal (selo com mais de 1 GΩ). Neste momento, é estabelecida a configuração denominada de célula ligada, ou cell attached.

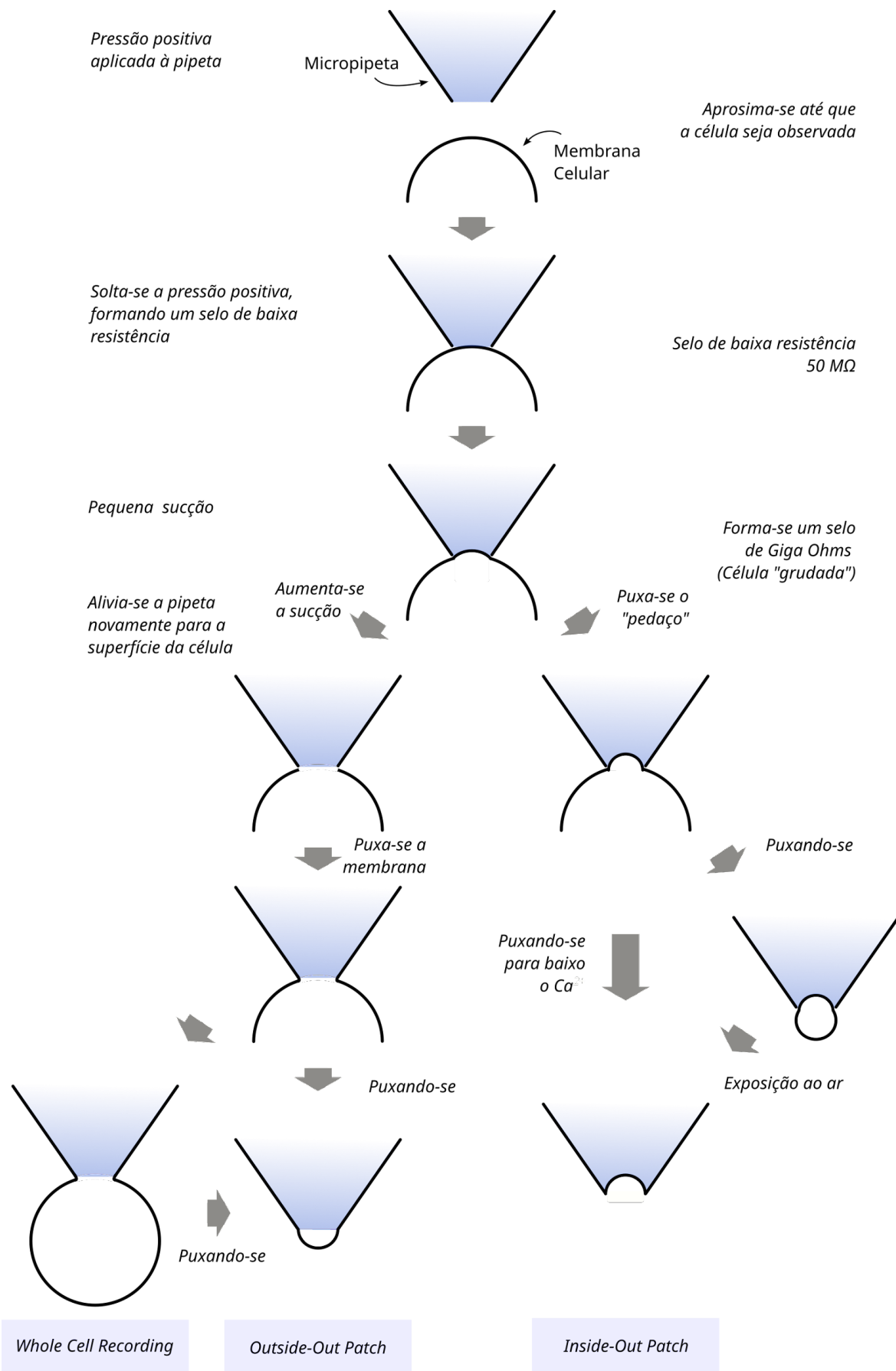


Figura 4.31 - Diferentes configurações possíveis no experimento de *patch-clamp*.

A partir desta configuração, outras três configurações podem ser atingidas, com os passos mostrados na Fig. 4.32. 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.

O circuito de *Patch-clamp*, representado esquematicamente na Fig. 4.31, consiste em um amplificador de alto ganho, no qual a saída é realimentada à entrada através do resistor R. Isto garante que a tensão V seja mantida próxima ao sinal de comando V_s . A saída é proporcional à corrente que flui através do *patch* em contato com o eletrodo.

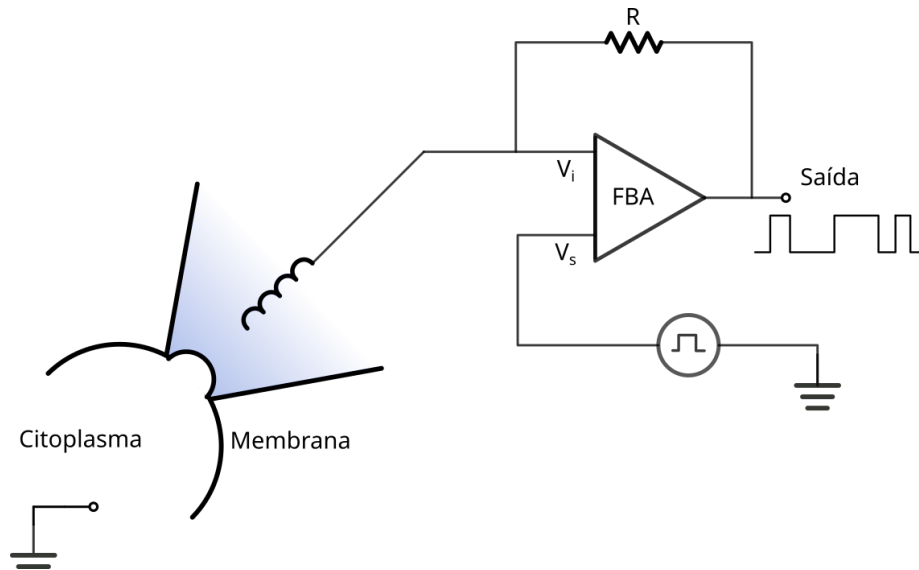


Figura 4.32 - Circuito esquemático para o controle eletrônico do experimento de *patch-clamp*.

A Fig. 4.33 ilustra o primeiro experimento no qual se registrou correntes iônicas com a técnica de *patch-clamp*. Os pesquisadores, interessados em se medir canais de sódio em myoballs, que são células esféricas em cultura, usaram TEA para bloquear os canais de K^+ .

Figura 4.33 - Correntes de canal unitário de Na^+ em células musculares de rato cultivada. $V = -30mV$, $V = 0$ é o potencial de repouso (Sigworth e Neher, 1980).

Note que cada registro pode conter, ou não, variações de corrente que correspondem à abertura de um canal. A despolarização aumenta a probabilidade de abertura dos canais, e assim, a corrente total que flui pela membrana. O traçado *b* corresponde a somatória de todos os registros sincronizados pelo mesmo pulso de *clamp*. O canal existente se abre distribuído no tempo de modo estocástico. Desta forma, a soma temporal se comporta como se vários canais tivessem sendo ativados pelo mesmo pulso. O breve nível de corrente que flui por um canal é de, aproximadamente, ± 5 pA.

A dinâmica de transporte de íons pelos canais pode ser obtida das equações de H-H. Para um impulso de *clamp* de -50 para -10 mV para *patch* de número variável de canais. Se a corrente média for de $1,6$ pA, como na figura anterior, podemos calcular o número de íons de Na^+ que se movem:

$$\text{Número de íons/segundo} = \frac{\text{Corrente [A]} \times \text{Const. de Avogadro}}{\text{Constante de Faraday}} = \frac{1,6 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{23}}{9,6 \times 10^4} = \frac{10^7 \text{ íon}}{\text{s}} \quad (4.20)$$

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, γ , pode ser obtida através de:

$$i = \gamma(V - V_{Na}) \quad (4.21)$$

$$\gamma = \frac{1,6 \text{ pA}}{0,09 \text{ v}} = 18 \text{ pS} \quad (4.22)$$

Neste caso, não vamos nos aprofundar mais sobre o tema, contudo, é importante que ao menos uma ideia do modelo mais comumente usado para explicar seu funcionamento seja dada. A Fig. 4.34 ilustra os componentes básicos do canal de sódio.

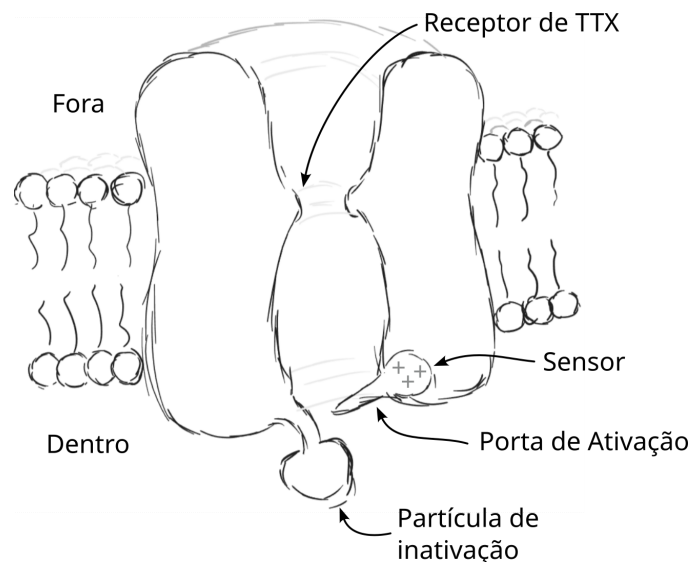


Figura 4.34 - Desenho esquemático para mostrar as principais características do canal de sódio (adaptado dos diagramas de Armstrong, 1981, Hille, 1984 e Aidley, 1989).

O movimento de cargas na membrana (veja sensor de voltagem, Fig. 4.34) é muito menor, e antecede a corrente capacitiva e a corrente iônica. Este transporte de cargas é denominado de *gating current* (correntes de chaveamento). Bloqueando o canal com tetrodotoxina (TTX), e eliminando-se eletronicamente a corrente capacitiva (simétrica), pode-se medir as correntes de chaveamento.

Pode-se remover proteoliticamente a inativação do canal por perfusão 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 poço e impede a passagem do íon.

Há bloqueadores seletivos do canal de sódio, como a tetrodotoxina, e a saxitoxina. Alguns anestésicos locais, como Procaína 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.

4.10. O Potencial de Ação Cardíaco - Elementos

O evento que inicia o processo de acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco é o potencial de ação (PA). Como já definido para o caso nervoso, o PA é uma variação característica do potencial de membrana (E_M) que depende da complexa atuação de muitos canais iônicos e transportadores, e neste caso das próprias variações intracelulares da concentração de cálcio iniciados pelo PA. As mudanças de E_M durante o PA definem a força eletromotriz que influencia muitos canais de transportadores. O PA é o sinal que se propaga por todas as células do coração de modo que, a seu tempo, cada uma seja ativada (e todas, na forma de uma rede bem conexas), e produza sua atividade contrátil em maior ou menor grau. Vamos concentrar nossa atenção no PA ventricular, passando rapidamente pela morfologia dos PAs nas diversas regiões do coração, como uma pequena atenção às correntes geradoras da atividade marcapasso. A Fig. 4.35 ilustra o curso temporal do PA para diversas regiões do coração de mamíferos. A posição do pico dos PAs caracteriza aproximadamente os atrasos de ocorrência nas diversas regiões. Por exemplo, o atraso entre os picos atrial e de Purkinje corresponde ao intervalo P-R do eletrocardiograma, abordado futuramente.

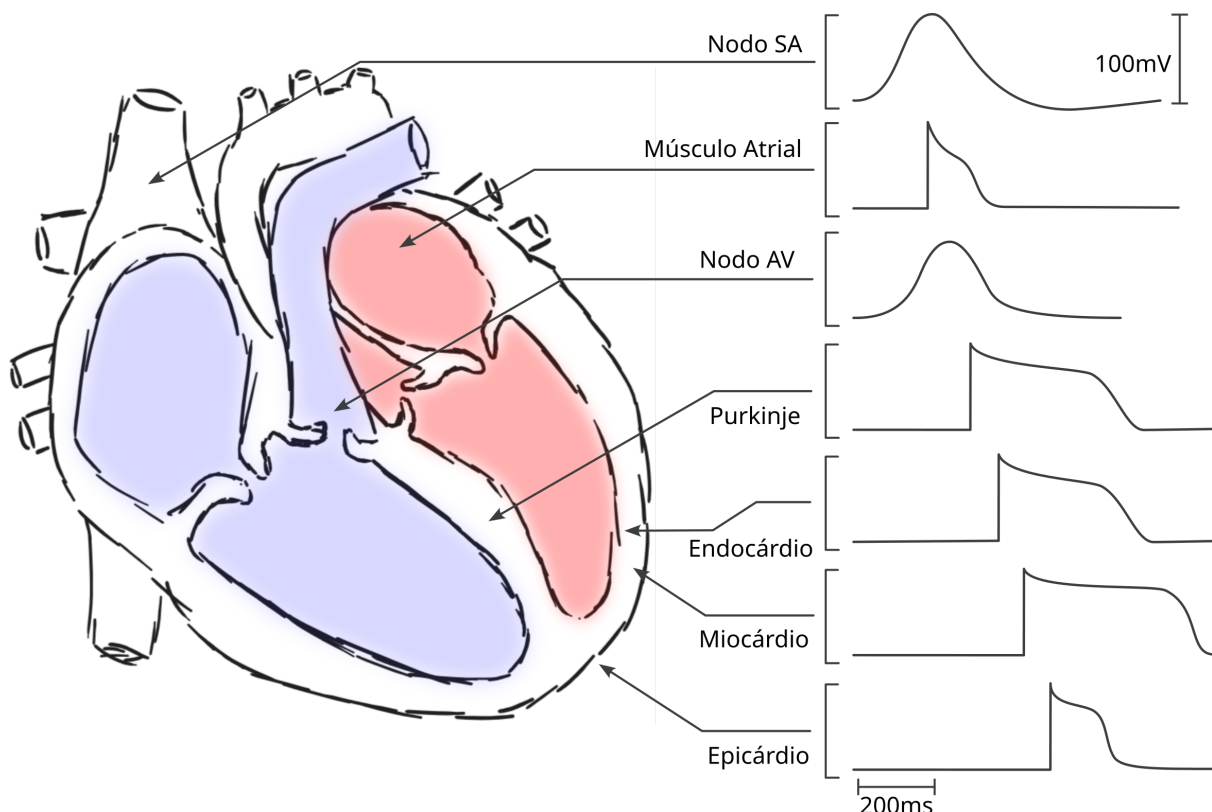


Figura 4.35 - Variações regionais do curso temporal dos PAs em diferentes regiões do coração.

O potencial de repouso das células do coração também apresenta diferenças regionais. Nas células ventriculares, PR fica em torno de -80 mV, e no nóduo sinusal, entre -60 mV e -50 mV. A Fig. 4.36 mostra esquematicamente um PA típico de células

ventriculares de coelho (PA calculado pelo modelo de Lue e Rudy, 1991, por meio do programa LabHeart, desenvolvido por J. L. Puglisi e D. Bers). Dentre as correntes mostradas, na Fig. 4.36c, temos a corrente de Ca^{2+} por canais tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$), a corrente de Ca^{2+} por canais tipo T ($I_{\text{Ca,T}}$), a corrente de troca Na/Ca (I_{NaCaX} , de onde “x” remete à *exchange*, em inglês), a corrente gerada pela ATPase de Na/K ($I_{\text{NaK-ATPase}}$), a corrente repolarizante tempo independente (I_{K1}), e a corrente repolarizante de potássio.

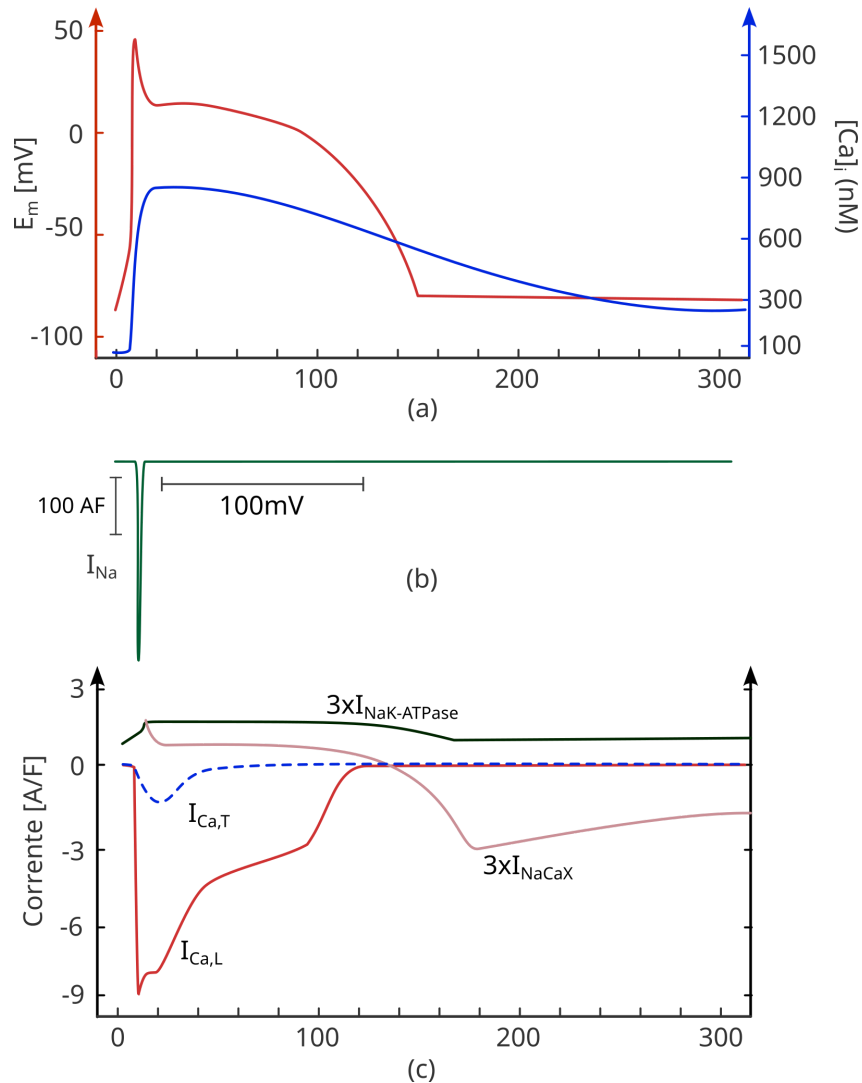


Figura 4.36 - (a) Curso temporal de um PA ventricular de coelho superimposto ao transiente de Ca^{2+} ($[\text{Ca}]_i$), (b) corrente de sódio, e (c) algumas das principais correntes iônicas.

O esquema da Fig. 4.37 indica as diversas fases do PA, e as respectivas correntes de cada fase. No pico do PA, I_{Na} cai para 1% de seu valor, e a corrente de Ca^{2+} chega a 43% do valor máximo (valor absoluto de $I_{\text{Ca,L}}$ e I_{Na} são aproximadamente 4 A/F). Neste ponto,

$$I_{\text{Na}} + I_{\text{Ca,L}} = I_{\text{K}} \quad (4.23)$$

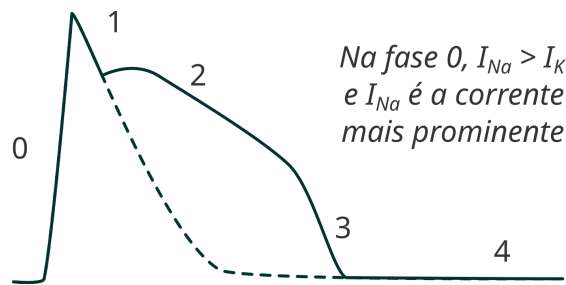


Figura 4.37 - As diversas fases do PA.

Na Fase 1 de repolarização rápida e precoce, ocorre grande inativação de I_{Na} , e ativação de I_{to} . Nesta fase, a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (vide $[Ca]_i$ na Fig. 4.36) ativa $I_{Cl(Ca)}$ - corrente de cloreto ativada pelo Ca^{2+} . Neste animal, I_{to} pode ser tão pronunciado, que o platô acaba eliminado (veja linha pontilhada). A Fase 2 é caracterizada por um longo platô, devido ao balanço entre a saída e a entrada de corrente. Nesta fase, a corrente de entrada dá-se, principalmente por $I_{Ca,L}$, e a de saída, por correntes de K através dos canais retificadores (I_{Kur} , I_{Kr} e I_{Ks} , dado não mostrado na Fig. 4.36)

Em algum ponto, a repolarização se acelera, chamado de Fase 3, de modo que E_M volte ao PR. A corrente de potássio, I_{Kr} , é importante na parte inicial deste decaimento mais acelerado, seguida pela I_{Ks} , quando $E_M \leq -30$ mV o acelera mais ao retorno para o PR. A Fase 4 é correspondente à fase de despolarização lenta, que se inicia com a corrente I_t , que se ativa com a hiperpolarização. A Fig. 4.38 ilustra o PA de células dos nódulos Sinoatrial e Atrioventricular.

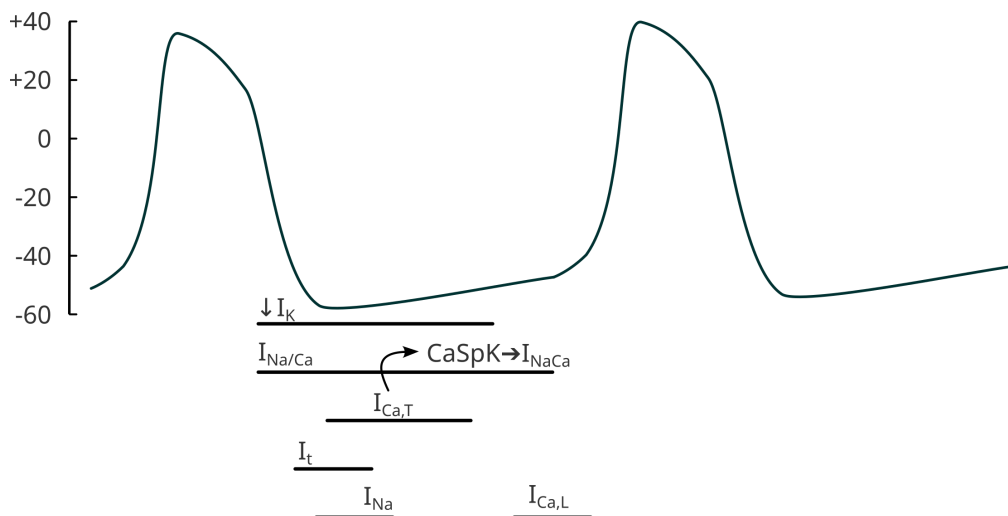


Figura 4.38 - Correntes que contribuem para a atividade de marcapasso das células nodais. Inativação de corrente de K^+ (de saída) é contraposta pelas outras correntes ($I_{Na/Ca}$, I_t , $I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$ e I_{Na}).

4.11. Despolarizações Precoces e Tardias

A Fig. 4.39 ilustra os fenômenos de despolarização precoces e tardias (*early and delayed after depolarization*). A reativação do PA pode ocorrer por reativação da corrente I_{Ca} (curva verde, Fig. 4.39). A sobrecarga de Ca^{2+} no RS seguida de liberação espontânea do Ca^{2+} , além das correntes I_{NaCa} , $I_{Cl(Ca)}$ e I_{Ks} podem ser a causa dos DADs. Modificações do platô (e, conseqüentemente, da duração do período refratário) das células de diferentes

pontos do coração, podem ser a causa de outra importante arritmia: a arritmia por excitação reentrante.

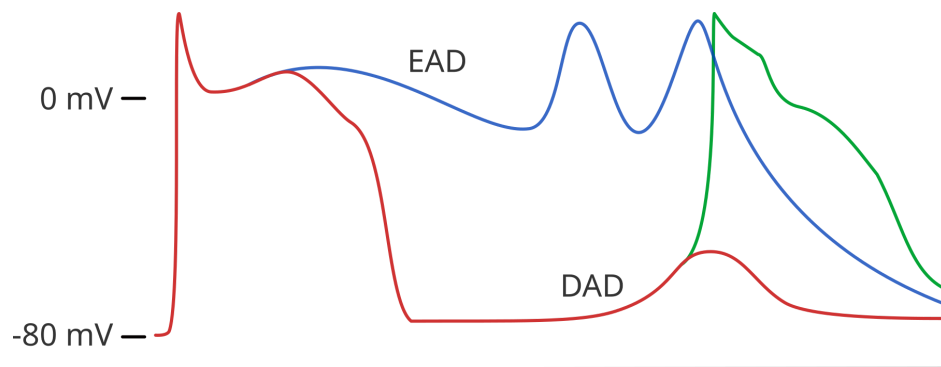


Figura 4.39 - PA e arritmias: EAD - *Early after depolarization* (em azul), DAD - *Delayed after depolarization* (em vermelho). Reativação do PA pode ocorrer por reativação da corrente I_{Ca} (em verde).

Capítulo 5

Resumo: Propagação de potenciais de ação no nervo, constantes do _____, modelo do núcleo condutor, teoria dos circuitos locais e condução saltatória.

A propagação da atividade elétrica no nervo depende não só de sua excitabilidade, mas também da sua estrutura de cabo condutor. Já sabemos que a membrana do axônio possui uma resistência transversal, r_m , e uma capacitância também transversal, c_m . Se quisermos propor um circuito para representar um certo comprimento longitudinal de um axônio, é preciso considerar a resistência longitudinal do meio externo, r_o , e a resistência longitudinal do axoplasma, r_i . O circuito completo se apresenta na Fig. 5.1a.

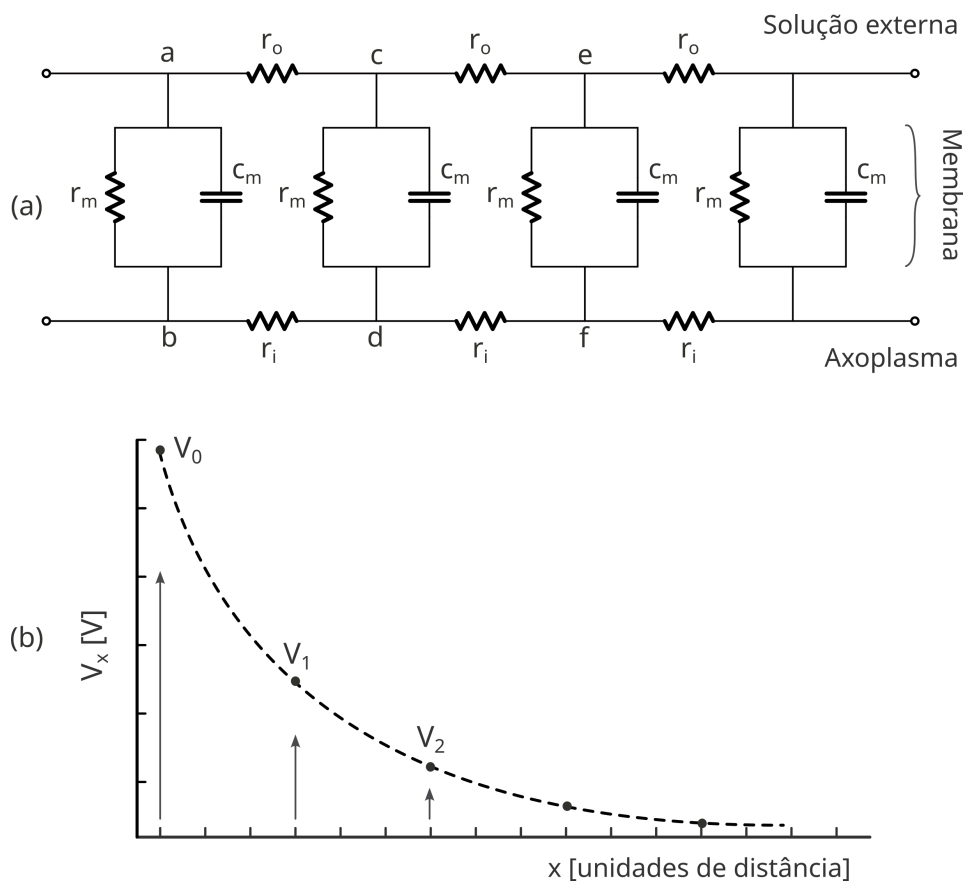


Figura 5.1 - (a) Modelo elétrico das propriedades passivas do axônio, e (b) distribuição em *steady-state* do potencial transmembrana quando uma fonte de corrente contínua é conectada entre **a e b**.

Esta forma de representação do axônio é denominada de teoria do núcleo condutor, uma vez que assume que o axônio se comporta como um cabo com baixa isolamento. É assumido que a membrana seja uma estrutura contínua. O potencial de membrana não é representado, e para incorporá-lo bastaria introduzir uma bateria em série com r_m . Na nossa explicação não precisamos disso porque a análise será feita apenas para uma mudança local em V_m . O circuito também omite a resistência radial, do meio, e do axoplasma.

Aplicando-se corrente em um ponto x_0 do axônio, fazemos com que uma tensão V_0 se estabeleça através da membrana. A tensão através da membrana em um ponto distante de x_0 , x (de valor V_x), deverá depender da distância x . Como existem capacitores, esta tensão deve depender também do tempo t . Deste modo, torna-se interessante se saber como V varia com x e t , ou seja, $V(x,t)$. Assumimos que r_m , c_m , r_o e r_i não variam ao longo do cabo, e que o mesmo é infinitamente longo.

A corrente que flui transversalmente à membrana i_m será a soma das correntes através de r_m e c_m , ou seja, teremos:

$$i_m = \frac{V}{r_m} + c_m \frac{dV}{dt}. \quad (5.1)$$

A corrente i que flui longitudinalmente pelas resistências r_o e r_i deve ser progressivamente menor à medida que se afasta da fonte, porque uma fração constante é desviada através da membrana a cada unidade de comprimento. Assim:

$$i = - \frac{dV}{dx} \left(\frac{1}{r_o + r_i} \right), \quad (5.2)$$

e

$$i_m = - \frac{di}{dx}. \quad (5.3)$$

Deste modo:

$$i_m = \left(\frac{1}{r_o + r_i} \right) \frac{d^2V}{dx^2}, \quad (5.4)$$

e, unindo-se as duas equações anteriores (5.4 e 5.3), tem-se:

$$\frac{V}{r_m} + c_m \frac{dV}{dt} = \left(\frac{1}{r_o + r_i} \right) \frac{d^2V}{dx^2}, \quad (5.5)$$

ou

$$V = \left(\frac{r_m}{r_o + r_i} \right) \frac{d^2V}{dx^2} - r_m c_m \frac{dV}{dt}. \quad (5.6)$$

Podemos, agora, definir duas constantes, a constante de espaço, λ , e a constante de tempo, τ , como as Eqs. 5.7 e 5.8.

$$\lambda^2 = \frac{r_m}{r_o + r_i}, \quad (5.7)$$

$$\tau = r_m c_m. \quad (5.8)$$

Assim, a Eq. 5.6 se reduz à:

$$V = \lambda^2 \frac{d^2V}{dx^2} - \tau \frac{dV}{dt}. \quad (5.9)$$

Aqui fica definido V como função função de x e de t , $V = f(x,t)$. Existem diferentes maneiras de se resolver a Eq. 5.9, e há, também, necessidade de se aplicar várias transformações. Vamos considerar alguns resultados mais simples. Considere a situação em que uma corrente constante é aplicada por um tempo "infinito" para se gerar a tensão V_0 no ponto de aplicação da corrente. A tensão em um ponto x será V_x . Assim, a equação geral se torna:

$$V = \lambda^2 \frac{d^2V}{dx^2}. \quad (5.10)$$

A solução não trivial dessa equação é:

$$V_x = V_o e^{-x/\lambda}. \quad (5.11)$$

Isto significa que a tensão cai exponencialmente com a distância. Na Fig. 5.1a, a partir de V_o , V cai com x , e se $x = \lambda$,

$$V_x = V_o e^{-1}, \quad (5.12)$$

ou seja, λ é o comprimento no qual a tensão caiu para 1/e do seu valor inicial.

A carga Q , na membrana, pode ser obtida integrando-se pela capacitância vezes a integral da tensão:

$$Q_x = c_m \int_0^{\infty} V dx, \quad (5.13)$$

ou seja, pela integração da Eq. 5.6 em x . Se a corrente aplicada é constante, e se inicia em $t = 0$, teremos:

$$Q_t = Q_{\infty} (1 - e^{-t/\tau}), \quad (5.14)$$

onde Q_t é a carga no instante t , e Q_{∞} a carga com t tendendo ao infinito (ou, aproximadamente, Q para $t \gg \tau$). Se a corrente que produziu Q_o é rapidamente desligada em $t = 0$, a carga da membrana cai exponencialmente:

$$Q_t = Q_o e^{-t/\tau}. \quad (5.15)$$

A constante de tempo, τ , é tempo necessário para que a variação da carga de membrana atinja 1/e do seu valor de regime. O efeito geral das equações que descrevem as mudanças de potencial em um dado ponto é que o potencial cai, ou aumenta, mais lentamente quanto mais longe estiver do ponto de sua aplicação.

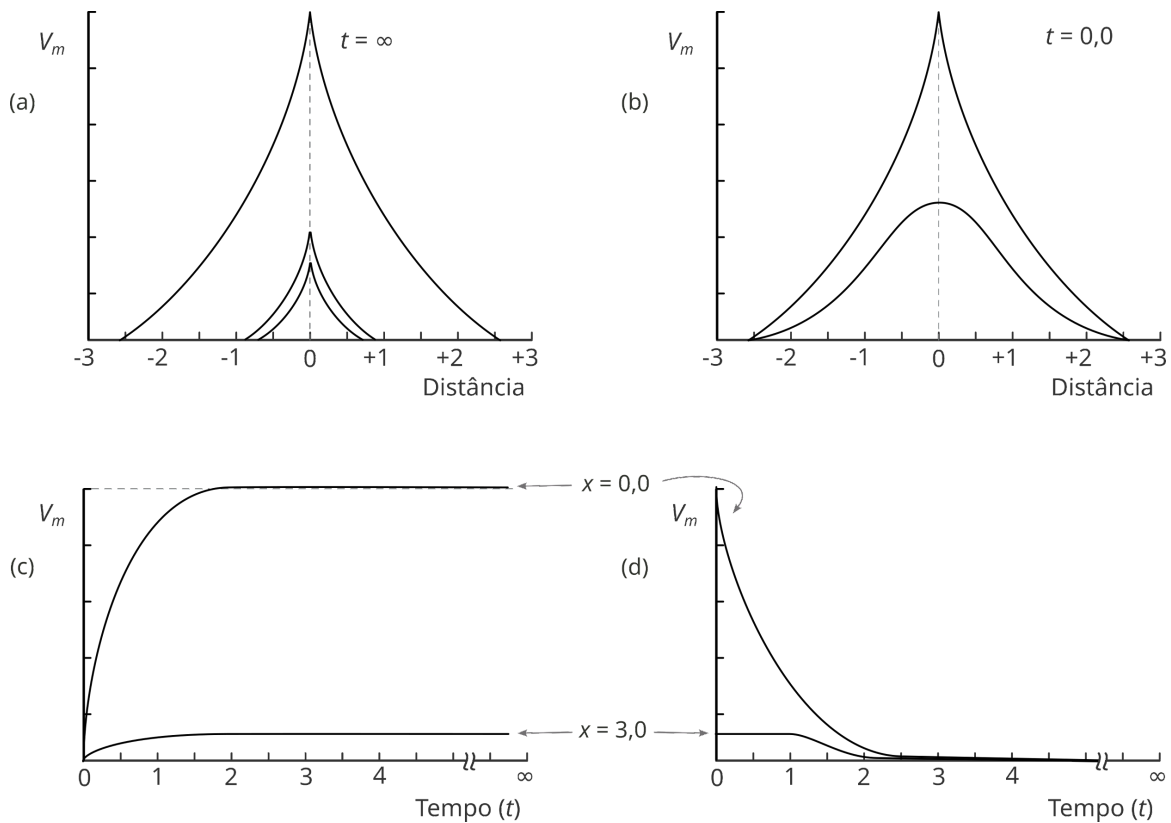


Figura 5.2 - Distribuição teórica da diferença de potencial através da membrana neural, a partir de um deslocamento de potencial. Os gráficos (a) e (b) correspondem à distribuição espacial de V_m para tempos distintos, e os gráficos (c) e (d) ao avanço temporal de V_m em pontos x distintos.

A relação entre a resistência de uma unidade de membrana, r_m , com a resistência por unidade de área, R_m se dá por:

$$r_m = R_m / 2\pi a , \quad (5.16)$$

na qual a é o raio do axônio. De modo similar a capacitância por unidade de comprimento, c_m , pode-se definir a capacitância por unidade de área, C_m , dada por:

$$c_m = 2\pi a C_m , \quad (5.17)$$

A resistência do axoplasma, em unidades de comprimento do axônio, r_i , pode ser relacionada à resistividade do axoplasma R_i , por:

$$r_i = R_i / \pi a^2 . \quad (5.18)$$

Exemplo: Um axônio tem raio igual a $25 \mu\text{m}$, resistência de membrana $R_m = 2000 \Omega\text{cm}^2$, resistência do axoplasma $R_i = 60\Omega\text{cm}$, e capacitância de membrana $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Assim, r_m (resistência de uma unidade de comprimento) é $127 \text{ k}\Omega\text{cm}$, r_i (resistência interna longitudinal) é $3,06 \text{ M}\Omega/\text{cm}$, e c_m (capacitância por unidade de comprimento) vale $0,0157\mu\text{F}/\text{cm}^{-1}$.

Estas relações podem ser inseridas nas equações do núcleo condutor para análises úteis. Vamos assumir que o axônio está em um volume grande de meio externo, de modo que $r_i \gg r_o$. Nesse caso, pode-se simplificar Eq. 5.7:

$$\lambda^2 = \frac{r_m}{r_o+r_i} = \frac{r_m}{r_i} \Rightarrow \lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_i}}, \quad (5.19)$$

$$\Rightarrow \lambda = \sqrt{\frac{R_m \pi a^2}{2 \pi a R_i}}, \quad (5.20)$$

$$\therefore \lambda = \sqrt{\frac{a R_m}{2 R_i}}. \quad (5.21)$$

Se R_m/R_i permanecer constante, então λ é proporcional à raiz quadrada do raio do axônio. Podemos definir uma relação útil. A partir de:

$$\tau = r_m c_m.$$

$$\Rightarrow \tau = (R_m/2\pi a)(2\pi a C_m). \quad (5.22)$$

$$\therefore \tau = R_m/C_m \text{ (é independente do raio!)}. \quad (5.23)$$

Ainda,

$$i_m = \frac{\pi a^2}{R_i} \frac{d^2 V}{dx^2}. \quad (5.24)$$

A densidade de corrente por unidade de membrana, I_m , está relacionada com a corrente por unidade de comprimento de acordo à:

$$i_m = I_m 2\pi a, \quad (5.25)$$

$$I_m = \frac{a}{2R_i} \frac{d^2 V}{dx^2}. \quad (5.26)$$

A teoria do núcleo condutor foi testada por Hodgkin e Rushton (1946), usando-se eletrodos extracelulares. O potencial medido externamente é proporcional ao potencial transmembrana, com constante de proporcionalidade $r_o/(r_o+r_i)$, e assim as equações do núcleo condutor ainda podem ser aplicadas. Os resultados obtidos para R_m e C_m foram próximos daqueles obtidos por Cole e Curtis utilizando-se a ponte de Wheatstone.

Vamos, agora, examinar uma forma de deduzir as equações para o modelo do núcleo condutor, e desenvolver a ideia da chamada teoria dos circuitos locais para se explicar como um potencial de ação é propagado. A ideia é que, ao aparecer um PA pela aplicação de corrente em a-b (vide Fig. 5.1), o potencial de membrana atingirá um valor de V_o (em a-b) de aproximadamente 4 vezes o limiar. O potencial estabelecido em c-d (Fig. 5.1a) irá ficar mais negativo, indo para V_1 (Fig. 5.1b), mas em algum ponto o limiar é ultrapassado, e um PA surge em c-d. Isto quer dizer que o potencial, inicialmente indo para V_2 , é elevado para V_1 com o PA, e novamente outro PA é gerado em e-f. Assim, um PA se propaga de a-b para e-f, e irá continuar se propagando por toda a cadeia. Além disso, a menos que haja alguma mudança ao longo do comprimento da membrana, no limiar, ou nas resistências e capacitâncias do sistema, a velocidade de propagação será constante.

Esta hipótese de mecanismo de condução é conhecida como teoria dos circuitos locais, uma vez que postula que a condução seja dependente de correntes eletrotônicas que atravessam a membrana na fonte do PA. Os circuitos locais são apresentados na

Figura 5.3. Observe que, para dar início às correntes locais passivas (eletrotônicas) no início do PA, deve haver algum fluxo de corrente de entrada no pico do PA. Este fluxo de corrente é do negativo para o positivo. É análogo ao fluxo dentro de uma bateria. Em outras palavras, a energia necessária para causar correntes eletrotônicas que fluem do positivo para o negativo é derivada deste movimento de entrada de cargas positivas no pico do PA (Fig. 5.3). A “bateria” é colocada em ação em qualquer ponto particular onde o potencial de membrana ultrapasse o limiar daquele ponto.

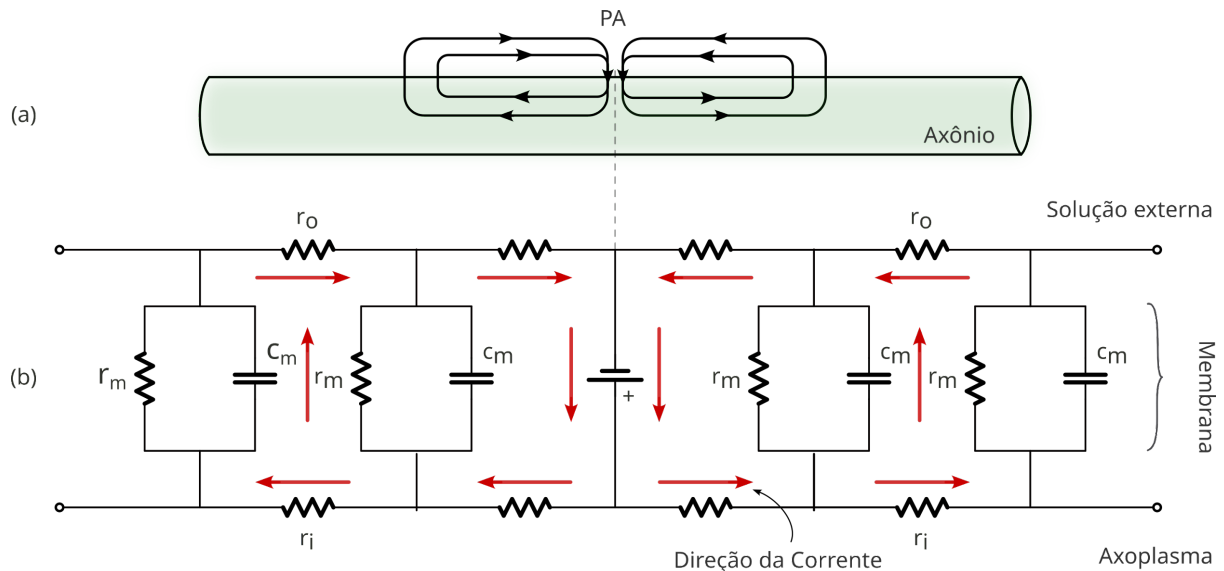


Figura 5.3 - (a) Correntes de circuito local estabelecidas durante um PA, e (b) diagrama circuitual para se ilustrar as correntes desenvolvidas em uma bateria inserida no modelo de núcleo condutor.

5.1. Modelo do Núcleo Condutor

A ideia do modelo e da teoria do núcleo condutor já está apresentada até aqui. Contudo, faz-se interessante explorar uma dedução formal para o modelo. Isso é importante para se estabelecer a premissa mais claramente, e o que resulta na decorrência da teoria dos circuitos locais. Vamos iniciar estabelecendo a condição básica fundamental e as premissas que fundamentam o modelo.

Princípio Básico: Há acoplamento espacial de corrente nas regiões adjacentes ao local de aparecimento do potencial na membrana (e.g. proveniente de um PA).

A Motivação Inicial para o Desenvolvimento: Várias propriedades de transmissão do PA são consequências da geometria da célula, e de suas características elétricas, assim como a de seus meios intra e extracelulares. Estas propriedades não dependem fortemente das características elétricas da membrana.

Premissas do Modelo:

- 1) A célula é um cabo cilíndrico, e a membrana celular separa dois meios homogêneos, isotrópicos e condutores ôhmicos de corrente;

- 2) As variáveis elétricas possuem simetria cilíndrica de modo que seja válido um modelo unidimensional;
- 3) Assume-se a descrição de corrente e tensão pela teoria de circuitos;
- 4) As correntes nos condutores internos e externos fluem apenas longitudinalmente. As correntes atravessam a membrana no sentido radial.

As Figs. 5.4, 5.5 e 5.6 descrevem a geometria e o circuito elétrico equivalente do Modelo de Núcleo Condutor.

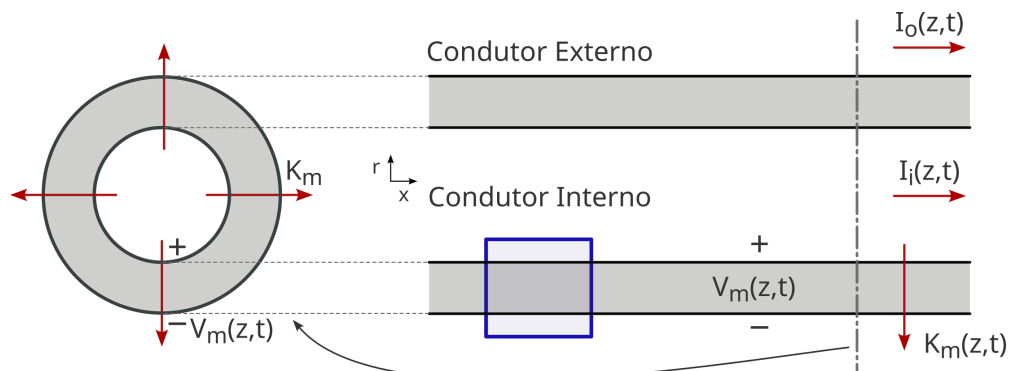


Figura 5.4 - Geometria para o modelo do núcleo condutor, mostrando as correntes e tensões envolvidas nas regiões internas e externas.

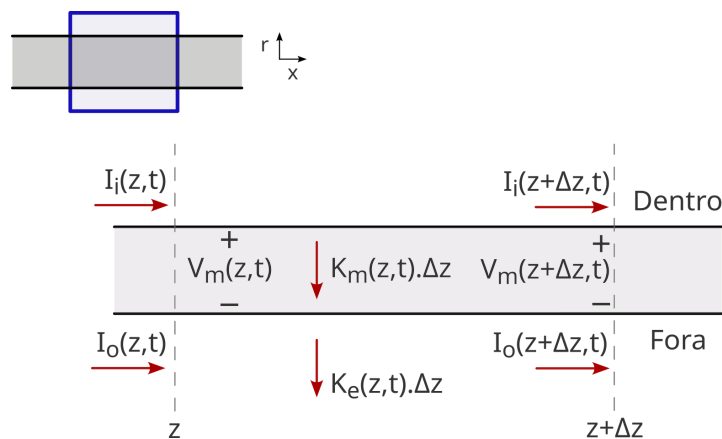


Figura 5.5 - Geometria para o modelo do núcleo condutor, em sua região de fronteira da membrana, com as correntes e tensões envolvidas, dentro e fora da membrana.

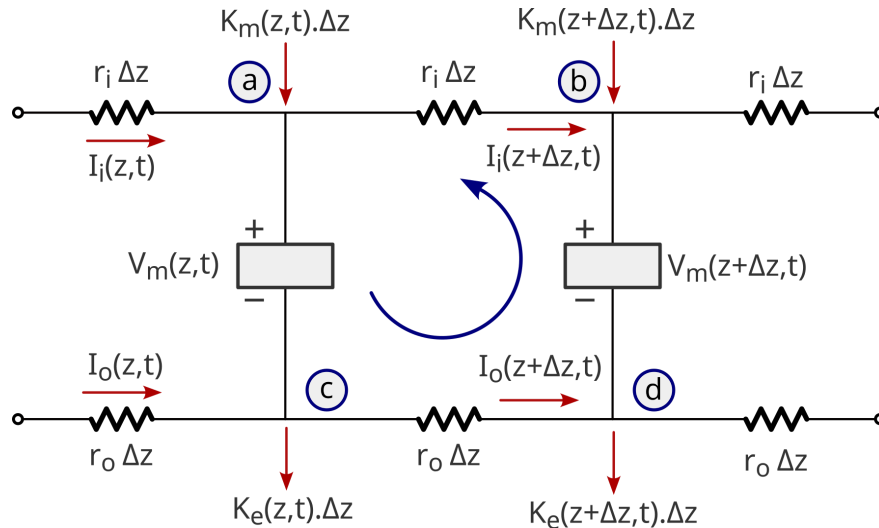


Figura 5.6 - Circuito equivalente do modelo de núcleo condutor, com a tensão V_m , e as correntes I_i , I_o , K_m e K_e .

Definindo-se as variáveis que aparecem nas figuras:

- $V_m(z,t)$: Potencial de membrana. Positivo quando o condutor interno está mais positivo que o condutor externo (V). Está na região em que o PA é desenvolvido;
- $I_i(z,t)$: Corrente longitudinal fluindo pelo condutor interno, na direção positiva de z (A);
- $I_o(z,t)$: Corrente longitudinal fluindo pelo condutor externo, na direção positiva de z (A);
- $K_m(z,t)$: Corrente que sai de dentro da célula, por unidade de comprimento (A/cm), ou densidade de corrente;
- $K_e(z,t)$: Corrente que flui para fora da célula, por unidade de comprimento (A/cm), ou densidade de corrente;
- r_i : Resistência do condutor interno, por unidade de comprimento (Ω/cm);
- r_o : Resistência do condutor externo, por unidade de comprimento (Ω/cm);

Aplicando-se a lei das mechas de Kirchhoff para na malha a-b-c-d (Fig. 5.6), teremos:

$$V_m(z,t) + r_o \Delta z \cdot I_o(z + \Delta z, t) - r_i \Delta z \cdot I_i(z + \Delta z, t) - V_m(z + \Delta z, t) = 0 . \quad (5.27)$$

Rearranjando-se, e dividindo por Δz :

$$\frac{I_i(z+\Delta z,t) - I_i(z,t)}{\Delta z} = - K_m(z, t) , \quad (5.28)$$

$$\frac{I_o(z+\Delta z,t) - I_o(z,t)}{\Delta z} = K_m(z,t) - K_e(z,t), \quad (5.29)$$

$$\frac{V_m(z+\Delta z,t) - V_m(z,t)}{\Delta z} = r_o I_o(z + \Delta z, t) - r_i I_i(z + \Delta z, t). \quad (5.30)$$

Tomando-se o limite para $\Delta z \rightarrow 0$ é possível se obter as Eqs. 5.31 a 5.34, sendo que a expressão 5.33 foi obtida derivando-se a Eq. 5.30.

$$1. \quad \frac{\partial I_i}{\partial z} = -K_m(z,t); \quad (5.31)$$

$$2. \quad \frac{\partial I_o}{\partial z} = K_m(z,t) - K_e(z,t); \quad (5.32)$$

$$3. \quad \frac{\partial V_m}{\partial z} = r_o I_o(z + \Delta z, t) - r_i I_i(z + \Delta z, t); \quad (5.33)$$

$$4. \quad \frac{\partial^2 V_m}{\partial z^2} = r_o \frac{\partial I_o(z,t)}{\partial z} - r_i \frac{\partial I_i(z,t)}{\partial z}. \quad (5.34)$$

Substituindo-se a Eq. 5.31 e 5.32 na Eq. 5.34, teremos, finalmente:

$$\frac{\partial^2 V_m}{\partial z^2} = (r_o + r_i)K_m(z,t) - r_o K_e(z,t), \quad (5.35)$$

que é a equação do núcleo condutor (ENC) Esta equação é válida independentemente das propriedades elétricas da membrana, que podem ser não-lineares e variantes no tempo.

5.2. Consequências do Modelo de Núcleo Condutor

Vamos agora explorar algumas soluções da equação 5.35, que caracterizaremos como consequências do modelo.

5.2.1. Fluxo de Corrente Durante o PA - Teorema dos Circuitos Locais

Considere que um PA esteja se propagando ao longo de um axônio, e que não haja eletrodos externos, ou seja, $K_e = 0$. A equação do núcleo condutor (ENC) se resume à:

$$K_m(z,t) = \frac{1}{r_o + r_i} \frac{\partial^2 V_m(z,t)}{\partial z^2}. \quad (5.36)$$

Considerando-se que não exista acúmulo de cargas em um plano perpendicular ao axônio:

$$I_i(z,t) = -I_o(z,t). \quad (5.37)$$

Agora, utilizando-se as Eqs. 5.37 e 5.34:

$$\frac{\partial V_m(z,t)}{\partial z} = r_o I_o(z,t) - r_i I_i(z + \Delta z, t), \quad (5.38)$$

$$\Rightarrow I_o(z,t) = \frac{1}{r_o+r_i} \frac{\partial V_m(z,t)}{\partial z}. \quad (5.39)$$

Agora, utilizaremos de um artifício. Para um PA se propagando na direção positiva, e com velocidade constante, e igual a v :

$$V_m(z,t) = f(t \pm z/v), \quad (5.40)$$

$$\frac{\partial V_m(z,t)}{\partial z} = \pm \frac{1}{v} f'(t \pm z/v) \text{ e } \frac{\partial V_m}{\partial t} = f'(t \pm z/v), \quad (5.41)$$

$$\Rightarrow \pm v \frac{\partial V_m}{\partial z} = \frac{\partial V_m}{\partial t}. \quad (5.42)$$

Ainda, considerando-se:

$$\frac{\partial^2 V_m}{\partial z^2} = \frac{1}{v^2} f''(t \pm z/v) \text{ e } \frac{\partial^2 V_m}{\partial t^2} = f''(t \pm z/v), \quad (5.43)$$

$$\Rightarrow \frac{\partial^2 V_m}{\partial z^2} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 V_m}{\partial t^2}. \quad (5.44)$$

Substituindo-se a Eq. 5.42 em 5.36, e a Eq.5.44 em 5.39, teremos as seguintes equações:

$$I_o(z,t) = \pm \frac{1}{(r_o+r_i)v} \frac{\partial V_m(z,t)}{\partial t}, \quad (5.45)$$

$$\Rightarrow K_m(z,t) = \frac{1}{(r_o+r_i)v^2} \frac{\partial^2 V_m}{\partial t^2}. \quad (5.46)$$

Para v constante, dado $V_m(z,t)$, podemos calcular I_o , I_i e K_m .

Vamos assumir, agora, um PA se propagando na direção negativa de z ($-z$). Neste caso, temos que o potencial de membrana, V_m , pode ser escrito como uma função:

$$V_m(z,t) = f(t + z/v), \quad (5.47)$$

e a forma de V_m é a mesma em t (em um dado ponto z particular) ou em z/v (em um dado tempo particular). A Fig. 5.7, a seguir, exemplifica um PA sendo gerado, com seus respectivos $V_m(z,t)$, I_o e K_m .

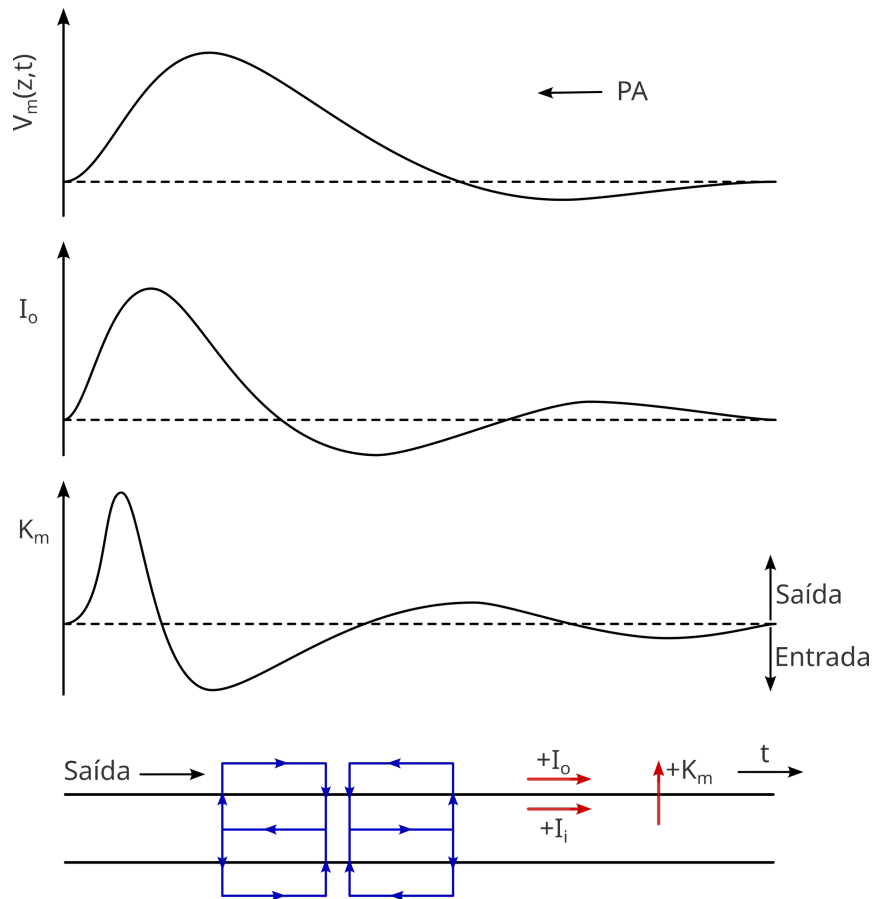


Figura 5.7 - PA gerado em V_m , e seus respectivos I_o , e K_m .

A consequência é que uma grande corrente de saída, à frente do PA, irá despolarizar a membrana, e gerar um novo PA, regenerando completamente o PA do segmento anterior. Deste modo, o PA se propaga, sem modificação de forma ou amplitude, por longas distâncias.

5.2.2. Velocidade de Condução de Axônio não Mielinizado

Considerando-se:

$$K_m(z, t) = \frac{1}{(r_o + r_i)v^2} \frac{\partial^2 V_m(z, t)}{\partial t^2}, \quad (5.48)$$

a densidade de corrente na membrana será

$$J_m(z, t) = \frac{1}{2\pi a} K_m(z, t), \quad (5.49)$$

onde a é o raio do axônio. Portanto:

$$\frac{\partial^2 V_m(z, t) / \partial t^2}{J_m(z, t)} = 2\pi a (r_o + r_i)v^2 = k = cte.. \quad (5.50)$$

Fazendo-se $r_i \gg r_o$, teremos:

$$2 \pi a r_i v^2 = k, \quad (5.51)$$

sendo $r_i = f(a)$. Expressemos r_i (resistência interna por comprimento), em termos da resistividade:

$$r_i = \frac{\rho_i}{\pi a^2}, \quad (5.52)$$

$$\Rightarrow 2 \pi a = \frac{\rho_i}{\pi a^2} v^2 = k, \quad (5.53)$$

$$\Rightarrow v = \sqrt{\frac{k}{2 \rho_i} a}, \quad (5.54)$$

ou seja, a velocidade de condução é proporcional à raiz quadrada do raio do axônio.

Esse resultado foi buscado por Castilho e Moore (1959). Sabendo-se que

$$r_i = \frac{\rho_i}{\pi a^2} \Rightarrow \rho_i = r_i \pi a^2, \quad (5.55)$$

eles idealizaram colocar um fio condutor dentro de um axônio, para reduzir a resistência r_i , como mostrado no diagrama esquemático da Fig. 5.8. V_m foi medido nas posições 1 e 2, adquirindo-se os valores V_{m1} e V_{m2} , respectivamente, como mostrado no esquema da Fig. 5.9.

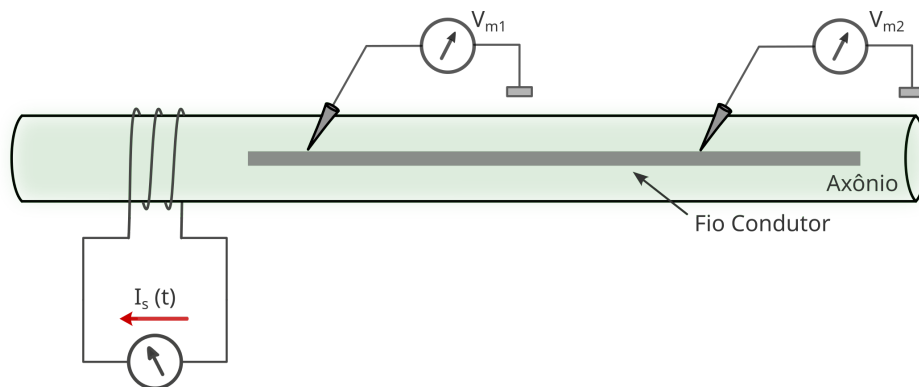


Figura 5.8 - Experimento de verificação da expressão 5.55 (Castilho e Moore, 1959)

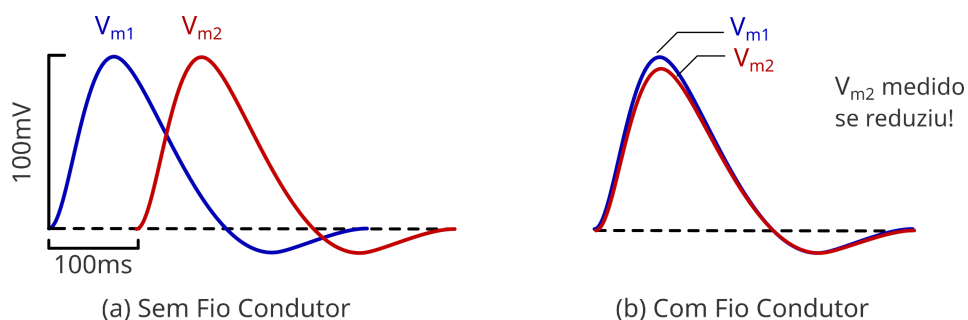


Figura 5.9 - Medida das tensões nos pontos 1 e 2, com e sem a presença do fio condutor (Castilho e Moore, 1959).

Pode-se observar que, no experimento com o fio condutor (Fig. 5.9b), a velocidade de condução se aumentou drasticamente, pois a resistividade do fio, e portanto, agora, a resistência r_i também, diminuíram drasticamente, ou seja:

$$\downarrow r_i, \downarrow \rho_i \Rightarrow v = \sqrt{\frac{k}{2\rho_i}} a \rightarrow \infty. \quad (5.56)$$

Foi a partir do conhecimento de que o potencial se propaga por meio de correntes locais que podemos explicar as diferentes formas de potenciais registrados na superfície da membrana celular, quando se estimula eletricamente a célula, como mostrado esquematicamente na Fig. 5.10.

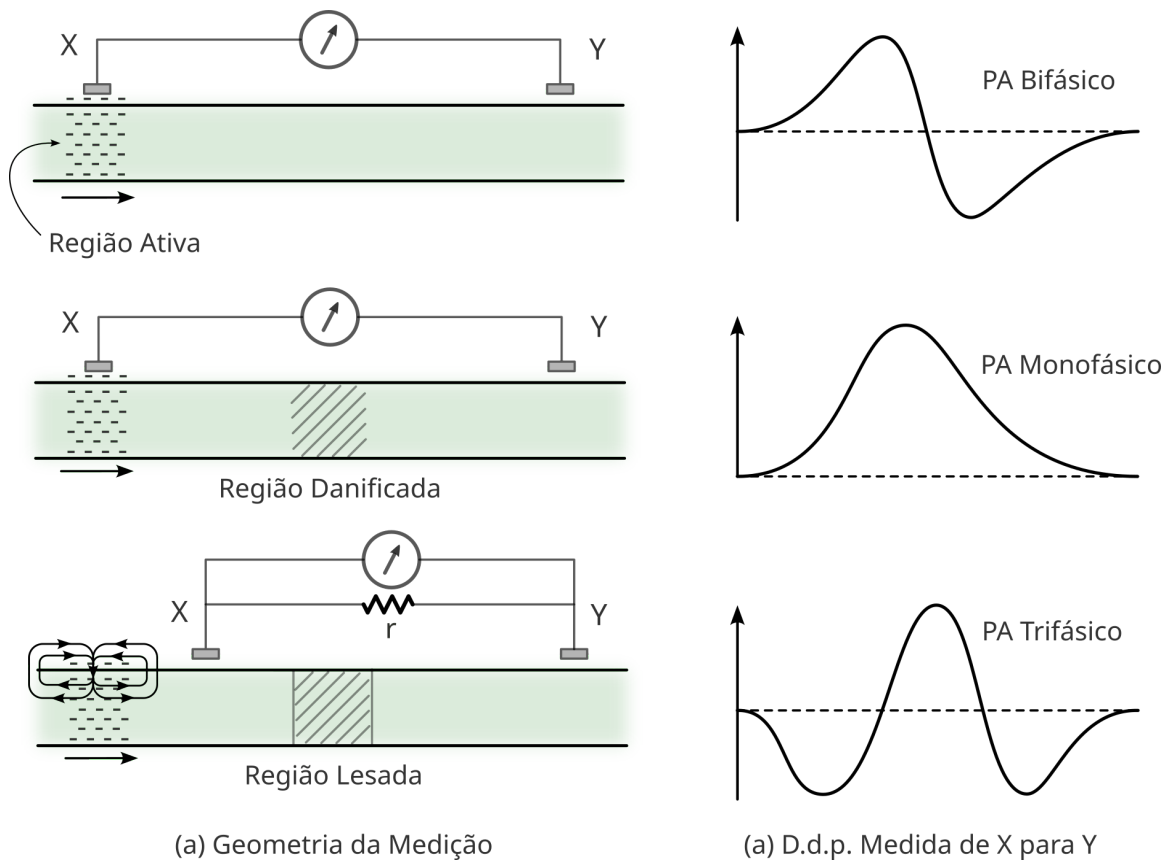


Figura 5.10 - Formas diferentes de potenciais medidos.

Capítulo 6

Descrição: Sistema cardiovascular, sistema nervoso, sistema auditivo periférico, sistema visual periférico.

6.1. Sistema Cardiovascular

O Sistema Cardiovascular, ou Sistema Circulatório, é composto pelo coração e pelos vasos sanguíneos, e tem a função de transportar o sangue pelo corpo, garantindo a chegada de nutrientes e de oxigênio em todos os órgãos, tecidos e células. A função do coração, é bombear o sangue para os vasos sanguíneos, puxando o sangue das veias por baixa pressão, e impelindo-o às artérias por alta pressão. A Fig 6.1 contém um diagrama esquemático da estrutura anatômica básica do coração.

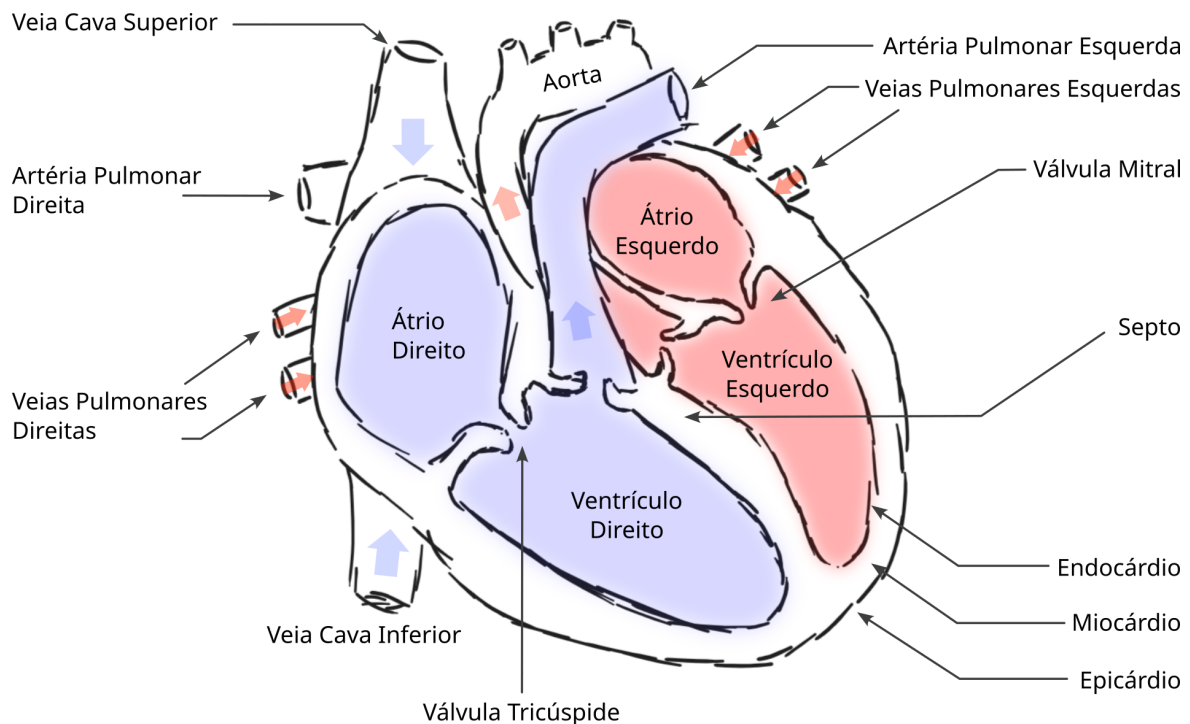


Figura 6.1 - Estrutura anatômica básica do coração.

6.1.1. O Coração

O coração dos mamíferos é um órgão muscular, envolvido por três camadas principais: endocárdio, miocárdio e epicárdio. O miocárdio, camada intermediária, é a camada mais grossa do órgão, formado por células musculares cardíacas estriadas. O endocárdio e o epicárdio são as camadas de recobrimento interno e externo, respectivamente, garantindo a proteção do músculo (Fig. 6.1). Algumas válvulas estão posicionadas em regiões que recebem fluxo de sangue, para, ao ser contraído o músculo, o sangue que atravessa o órgão não retorne à direção contrária (refluxo de sangue).

Esse importante órgão recebe o sangue proveniente das veias em seus átrios esquerdo e direito, bombeando/impulsionando o sangue para as artérias através dos ventrículos. Para tanto, átrios e ventrículos contraem e relaxam, compassadamente, de maneira a puxar o sangue das veias, pela baixa pressão formada pelo relaxamento das células musculares, e impelem o sangue através da alta pressão gerada pelo movimento de contração. Neste órgão, a contração é chamada de sístole, e o relaxamento de diástole.

6.1.2. Vasos Sanguíneos

Os vasos sanguíneos são estruturas tubulares ocas que transportam o sangue pelos tecidos e células do corpo, como canos de água transportam água pelos cômodos de uma casa, provenientes da caixa d'água. O sangue é um tecido do corpo humano que tem a capacidade de carrear nutrientes e oxigênio, alimentando as atividades células. Os vasos sanguíneos são divididos em artérias, arteríolas, veias, vênulas e capilares.

O sangue, proveniente das artérias, se distribui pelos tecidos do corpo humano, chegando a vasos menos calibrosos, as arteríolas. Impelido pela alta pressão proveniente do coração, o sangue passa a experimentar uma diminuição na pressão, à medida que trafega para longe do coração. Após isso, o sangue chega aos capilares, estruturas menores ainda, com paredes que permitem a troca mais efetiva de substâncias entre o sangue e os tecidos adjacentes. Nesta etapa, o sangue rico em oxigênio (O_2), disponibiliza essa molécula por meio de trocas gasosas, em que as hemácias trocam O_2 por gás carbônico (CO_2). Posteriormente, os capilares se juntam em vênulas, vasos de calibres maiores, até culminar nas veias, vasos de maior calibre que conduzem, novamente, o sangue ao coração, agora rico em gás carbônico. Para que o sangue não tenha fluxo contrário à direção do coração, as veias são portadas de válvulas.

6.1.3. Circulação Sistêmica e Pulmonar

Os seres humanos possuem uma dupla circulação, constituída de dois circuitos distintos, o circuito chamado de circulação sistêmica, ou grande circulação, e a circulação pulmonar, ou pequena circulação. É chamada de circulação sistêmica, o circuito em que o sangue parte do coração em direção aos diversos órgãos e tecidos do corpo, retornando, posteriormente, ao coração. Já a circulação pulmonar, refere-se ao circuito em que o sangue deixa o coração, através das artérias pulmonares, e, rico em CO_2 , vai em direção ao pulmão para realizar as trocas gasosas nos alvéolos pulmonares. Posteriormente, o sangue retorna do pulmão ao coração pelas veias pulmonares, já rico em O_2 , o que também faz parte da pequena circulação, retornando ao seu outro circuito, a grande circulação.

6.1.4. Composição Tecidual dos Vasos Sanguíneos

Os vasos sanguíneos são compostos por tecidos, como a túnica adventícia, túnica média (músculo não estriado), tecido conjuntivo e a túnica íntima, composta por uma membrana basal e o endotélio. Na Fig. 6.2 se apresentam os diferentes tecidos dos vasos sanguíneos, onde se pode ver, também, a válvula no interior da veia.

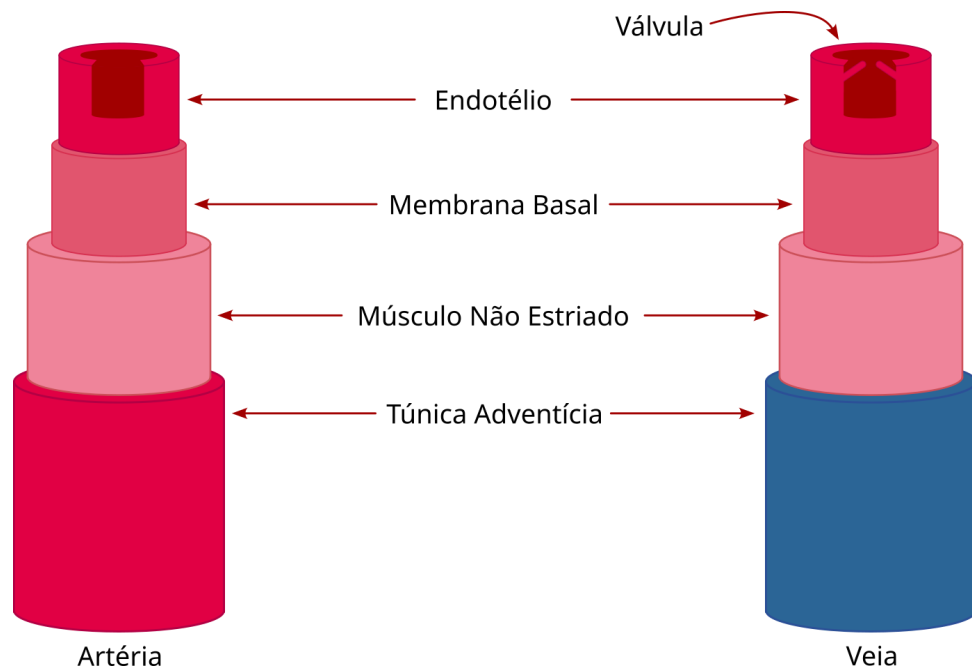


Figura 6.2 - Composição tecidual dos vasos sanguíneos, contendo: túnica adventícia, músculo não estriado (ou túnica média), membrana basal e endotélio.

6.1.5. Mecanismos de Regulação da Pressão Arterial

A pressão arterial deve ser mantida maior que a pressão venosa, para que todos os órgãos e tecidos sejam perfundidos com seus nutrientes e oxigênio. Para manter esse nível de pressão, dois sistemas são os principais na regulação da pressão arterial média, o reflexo barorreceptor (neuromediado), e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Os barorreceptores são terminações nervosas que se encontram no seio carotídeo e no arco aórtico, e que se despolarizam quando estiradas. A variação da pressão arterial pode modificar o estiramento dos barorreceptores, fazendo-os sensorear essa grandeza física. Essas terminações são sensíveis, principalmente, à mudanças rápidas da pressão arterial.

Os sinais captados pelos barorreceptores são conduzidos do seio carotídeo para o tronco encefálico por meio do nervo do seio carotídeo, e do arco aórtico para o tronco encefálico pelo nervo vago. Do tronco encefálico, os sinais são direcionados para o bulbo, que aumenta ou diminui o fluxo eferente dos sistemas nervosos simpático e parassimpático. O fluxo eferente parassimpático proporciona a diminuição da frequência cardíaca, e o fluxo simpático proporciona o aumento da frequência cardíaca, efeito sobre o músculo cardíaco (volume sistólico e aumento da contratilidade), efeito sobre as arteríolas (vasoconstrição e aumento da Resistência Periférica Total, ou RP, resistência oferecida pelo sistema circulatório a pressão arterial), e efeito sobre as veias (vasoconstrição).

Já o SRAA regula a pressão arterial (PA) por meio do volume sanguíneo, um mecanismo mais lento de regulação, mediado por ação hormonal. O mecanismo que ativa o SRAA é a diminuição da pressão arterial, que estimula a síntese e secreção de aldosterona, atuando a reabsorção renal dos íons de Na^+ , levando ao aumento do LEC (volume de líquido extracelular), e conseqüentemente do volume sanguíneo. Esse aumento do retorno venoso aumenta o débito cardíaco (DC, fluxo sanguíneo produzido pelo coração, em litros por minuto), culminando no aumento da pressão arterial.

6.1.6. Curva Pressão-Volume

A curva pressão-volume (P-V), ou curva de complacência, constitui-se no gráfico da variação de volume e pressão no ventrículo esquerdo, ao longo de um ciclo cardíaco. A análise das curvas de pressão-volume constitui-se em um importante método para o diagnóstico de diversas patologias que afetam a mecânica cardíaca. O gráfico, após cada ciclo cardíaco, volta ao mesmo ponto, formando um laço, ou *loop*. Na Fig. 6.3 se apresenta um exemplo de curva P-V, com a identificação de todas as etapas.

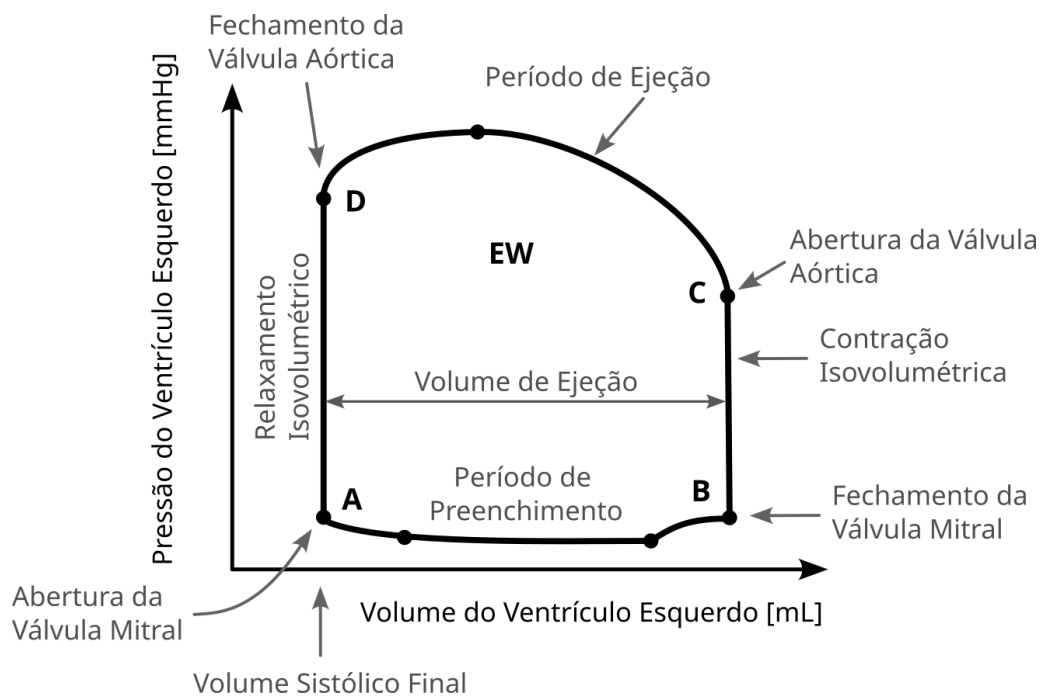


Figura 6.3 - Curva pressão-volume (P-V), ou curva de complacência, com suas respectivas fases.

No ponto A, abre-se a válvula mitral, no qual o volume do ventrículo esquerdo é preenchido, com pouca diferença de pressão, já que a válvula mitral permanece aberta. Assim que a válvula mitral se fecha (em B), onde um aumento isovolumétrico de pressão irá ocorrer, até o ponto em que a válvula aórtica se abre (ponto C), onde há um relaxamento da pressão, pelo início de fluxo sanguíneo pela aorta. Com isso, o volume de fluido no ventrículo esquerdo diminui, com certa variação de pressão, moderada, até o fechamento da válvula aórtica (D), que dá origem a um relaxamento isovolumétrico de pressão (segmento D-A). A diferença entre os volumes em B e A é igual ao volume de ejeção.

6.1.7. Ciclo Cardíaco

Ciclo cardíaco refere-se aos cíclicos eventos de variação de fluxo e pressão sanguínea. Esse ciclo se inicia com a geração de um potencial de ação nas células de marcapasso, no nodo sinoatrial (NSA). O impulso elétrico percorre o miocárdio, e atinge os ventrículos primeiro, devido a um atraso de propagação, garantindo um bom funcionamento do coração como bomba de fluido [1]. O diagrama de Wiggers na Fig. 6.4 mostra o desencadeamento de eventos que acontecem durante o ciclo cardíaco, no ventrículo esquerdo. Essa figura detém uma informação semelhante à curva de pressão-volume

cardíaca, porém resolvida no tempo. Ainda, está adicionado na Fig. 6.4 os sinais esquemáticos para o eletrocardiograma, o fonocardiograma, entre outras pressões.

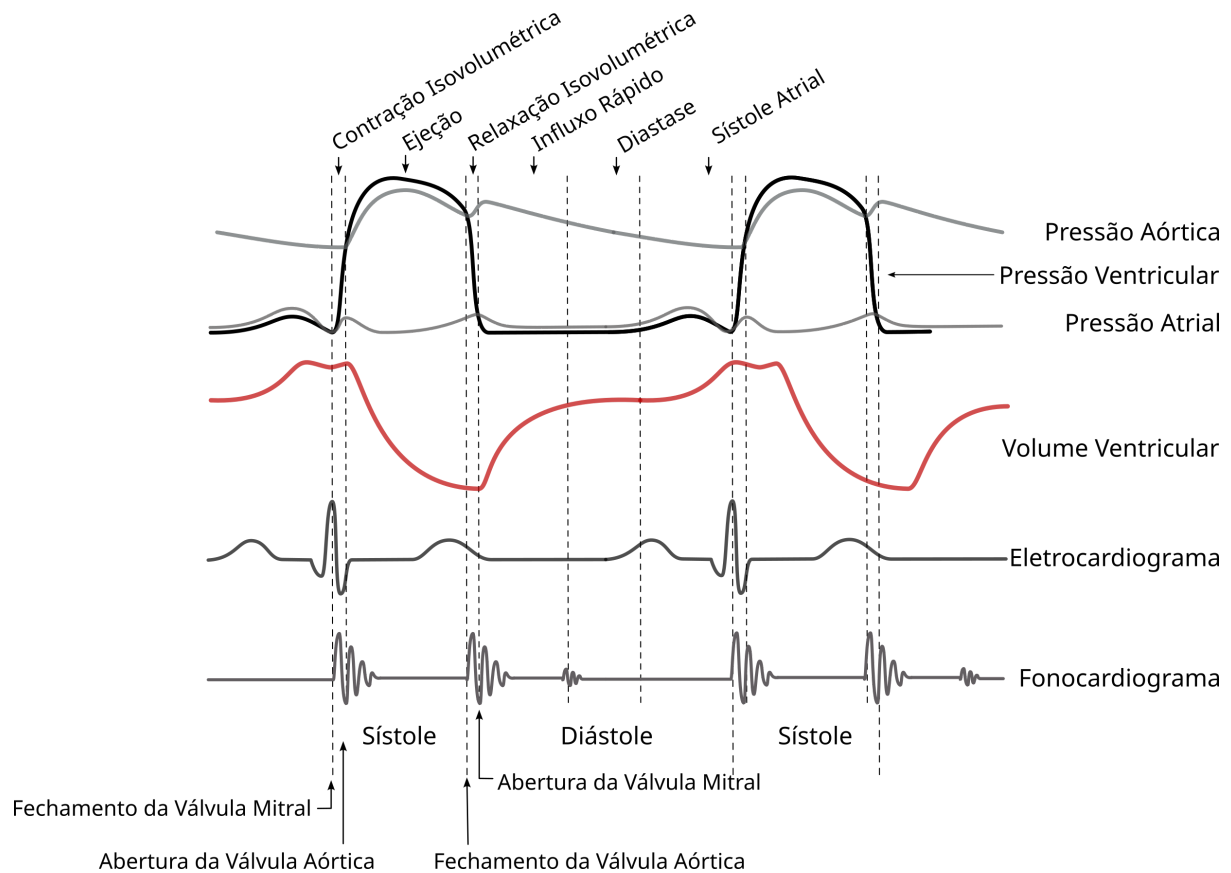


Figura 6.4 - Diagrama de Wigger para o ventrículo esquerdo (Adaptado de [2]).

6.1.8. Referências

[1] Abdulkader, Fernando. "Fisiologia, 5ª Edição-Margarida De Mello Aires."

[2] Thies, Roger. "Gastrointestinal physiology." *Physiology* (1992): 171-198.

6.2. Sistema Nervoso

O sistema nervoso atua na transmissão de sinais pelo organismo, coordenando suas ações voluntárias e involuntárias. É constituído de duas partes principais na maioria dos animais, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O sistema nervoso periférico é constituído do sistema nervoso somático, e do sistema nervoso autônomo, que constitui-se do sistema nervoso simpático e parassimpático, que regulam ações involuntárias, e do sistema nervoso entérico, controlando o aparelho digestivo.

O sistema nervoso somático caracteriza-se por coordenar o conjunto de ações conscientes do organismo, coordenando, por exemplo, os movimentos voluntários do corpo, e também recebe estímulos externos, provenientes dos diversos sensores do corpo,

enviando-os ao SNC para tomada de decisão. Já o sistema nervoso simpático (que é parte do sistema nervoso autônomo), e responde a perigos iminentes, ou situações de estresse, também sendo responsável por incrementar o nível de batimentos cardíacos, como visto na Sec. 6.1 deste documento. O sistema nervoso simpático também atua na liberação de adrenalina pelo sistema, ou diminuindo a motilidade do intestino grosso, ou aumentando o peristaltismo do estômago, por exemplo.

Já o sistema nervoso parassimpático atua em situações de relaxamento, como na redução de batimentos cardíacos, dilatação dos vasos sanguíneos, constrição pupilar, e estimulação do sistema digestivo. Já o sistema nervoso entérico, constituído por neurônios de células gliais, atua em ações de regulatórias do estômago, intestino grosso e delgado, além de pâncreas e vesícula biliar, gerenciando a digestão do organismo.

O SNC integra as informações provenientes dos outros sistemas, processa e envia estímulos de resposta, atuando na coordenação de todos os estímulos do corpo. O sistema nervoso central é formado pelo encéfalo e pela medula espinhal, sendo que o encéfalo constitui-se de cérebro, cerebelo, tálamo, hipotálamo e bulbo. Nesse sistema, existem as substâncias branca e cinzenta. A substância cinzenta é formada pelos corpos dos neurônios, já as brancas, pelos seus prolongamentos. A massa cinzenta ocorre nas regiões mais externas do sistema nervoso, e a massa branca nas regiões mais internas.

6.2.1. Os Neurônios

Os neurônios são formados por dendritos, corpo celular (ou soma), axônio e terminações sinápticas. De modo neural, os neurônios recebem e emitem informações, processando-as, na passagem dos estímulos elétricos pelo seu corpo. Os impulsos elétricos chegam aos neurônios pelos dendritos, pelos potenciais de ação, ao atingir certo limiar de ativação do neurônio, gerarão um mesmo potencial de ação, a ser transmitido pelo neurônio. A ativação do limiar de um neurônio acarreta em sua sinapse, conectando dois neurônios distintos. A ativação de um dado grupo de neurônios em uma rede neuronal diz qual ação será tomada ou percebida pelo órgão.

As sinapses são classificadas em químicas e elétricas, sendo as químicas mais comuns em mamíferos, e as sinapses elétricas mais comuns em organismos invertebrados, ocorrendo em algumas células gliais ou musculares em humanos. As sinapses químicas se iniciam no terminal do axônio de células pré-sinápticas, fazendo com que vesículas cheias de neurotransmissores sejam liberadas na fenda sináptica, recebidas por proteínas chamadas de receptores químicos na membrana da célula pós-sináptica.

Os sinais elétricos que trafegam diretamente de uma célula para outra através de junções comunicantes são caracterizados por sinapses elétricas. As junções comunicantes são canais que conduzem íons, permitindo a passagem de potenciais de ação pelas células.

6.2.2. O Reflexo Miotático

O reflexo miotático é o estiramento muscular que ocorre quando há alongamento das fibras musculares por alguma ação externa. Por exemplo, se um fisioterapeuta atingir com um martelo o tendão do músculo do quadríceps, na região do joelho, causará o estiramento de fusos, ao sentir o alongamento pelo neurônio sensorial, levando as

informações para o sistema nervoso, na coluna espinhal. Na Fig. 6.6 se mostra os sinais mecânicos (aplicados por um martelo de fisioterapeuta), elétrico (de geração de um PA), e de movimentação (um goniômetro usado para medir a amplitude de movimento).

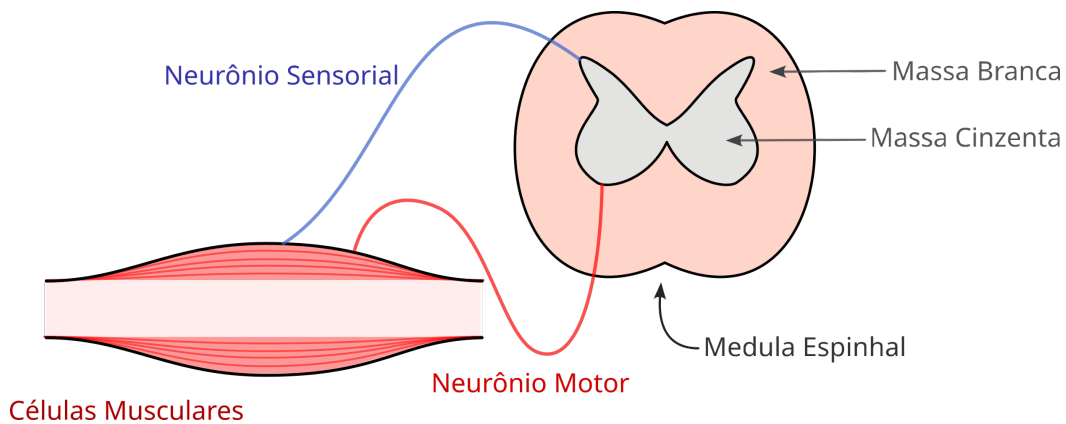


Figura 6.5 - Diagrama de reflexo do miotático.

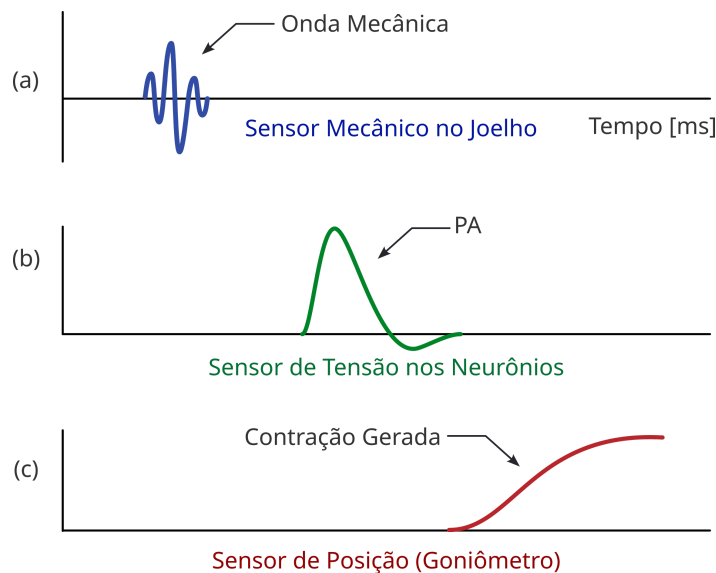


Figura 6.6 - Desencadeamento de sinais da estimulação do reflexo miotático, desde (a) a geração da onda mecânica, (b) propagação do PA e (c) execução da contração muscular.

6.3. Sistema Auditivo Periférico

O sistema auditivo periférico é o sistema responsável pela audição, consistindo em: orelha externa, orelha média, orelha interna e nervo vestibulococlear, como mostrado na Fig. 6.7. A orelha externa é formada, por exemplo, pelo pavilhão auricular, estrutura de cartilagem e tecido adiposo, pelo meato acústico externo, estrutura tubular que vai em direção à orelha média, e membrana timpânica, fina estrutura de tecido conjuntivo cartilaginoso. Já a orelha média é uma cavidade no interior do osso temporal, formada por martelo, bigorna e estribo, os quais transmitem e amplificam as ondas sonoras captadas pelo ouvido externo, até as ondas sonoras chegarem até a orelha interna. A orelha interna é composta pelo órgão vestibulococlear, responsável tanto pela audição, quanto pelo

equilíbrio do corpo, e pela cóclea, responsável pela audição, contendo o órgão de Corti, que transforma ondas de fluido em sinais nervosos, para serem transmitidos pelo nervo auditivo.

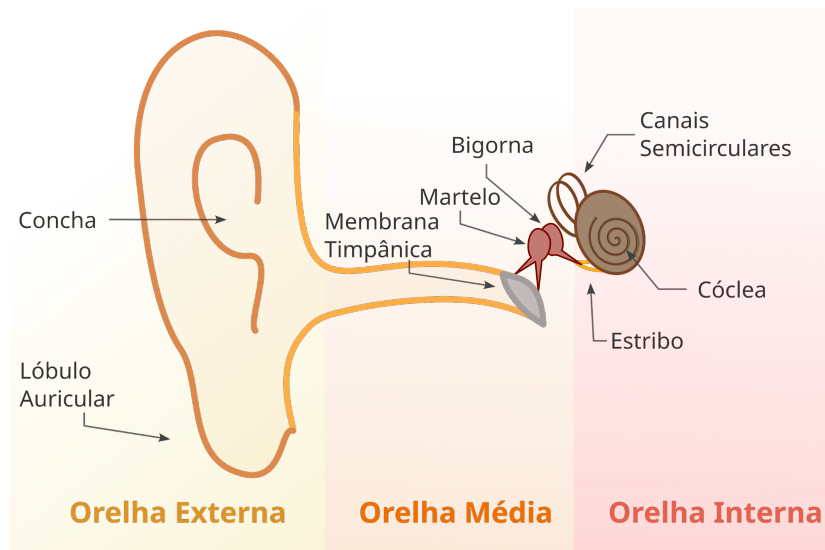


Figura 6.7 - Anatomia do Sistema Auditivo, mostrando a orelha interna, média e externa.

6.3.1. A Transdução Mecano-Elétrica

Ao ser transmitida a vibração para a cóclea, a onda sonora faz com que as células ciliadas, no interior do órgão de Corti, na região interna da cóclea, façam a transdução do estímulo mecânico em estímulo elétrico. Isso ocorre, porque, a vibração da membrana basilar, do órgão de Corti, ocasiona movimentação mecânica dos estereocílios, estruturas alongadas das células ciliadas, compostas de cílios maiores e menores, em escada. Ao se movimentarem em direção aos estereocílios maiores, resulta-se na abertura de canais de cátions (K^+ , e posteriormente Ca^{2+}). Primeiro, os canais de potássio são abertos, permitindo a entrada de potássio, o que resulta na despolarização da célula ciliada, levando à abertura de canais de Ca^{2+} . O influxo de Ca^{2+} leva à liberação de um neurotransmissor excitatório. Já a movimentação em direção aos estereocílios menores, resulta no fechamento dos canais desses cátions, e na hiperpolarização das células ciliadas. Esse fenômeno faz com que as ondas sonoras de vibração acústica sejam transformadas em vibrações elétricas percebidas pelas células neurotransmissoras, e as vesículas sinápticas levem os neurotransmissores, os quais se difundem às terminações pós-sinápticas, levando o estímulo ao sistema nervoso.

6.4. Sistema Visual Periférico

O sistema visual periférico é responsável por captar e transmitir estímulos luminosos que chegam ao olho. A luz que chega ao olho, atravessa pela pupila e pela córnea, passa pelo humor aquoso, cristalino, humor vítreo, e se dirige à retina. Ao passar por um orifício, como o da pupila, a imagem é invertida, chegando até a retina “de ponta cabeça”. Um

impulso nervoso é gerado no nervo óptico, sendo transmitido ao SNC, que interpreta a imagem e toma decisões. Na Fig. 6.8 se mostra a estrutura morfológica do olho humano.

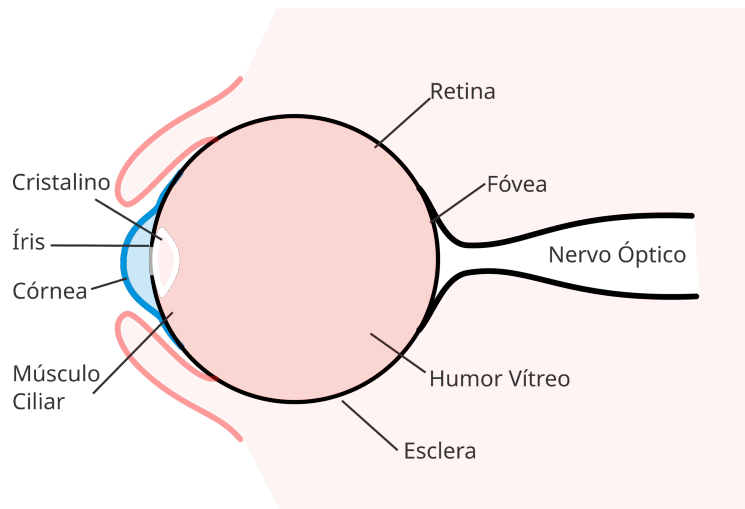


Figura 6.8 - Estrutura morfológica do olho.

Existem seis músculos extraoculares principais, que auxiliam na movimentação do olho. São eles, músculo ocular reto superior, e reto inferior (na parte superior e inferior da cavidade ocular), músculo reto lateral e reto medial (nas regiões laterais externas e internas do olho, e os músculos oblíquos inferior e superior, que se posicionam obliquamente nessa região. Todos esses músculos recobrem a cavidade, acompanhando o nervo óptico até a parte anterior da cavidade.

6.4.1. A Transdução do Sinal Luminoso

A fototransdução é um processo que ocorre nos discos membranares do segmento externo dos fotorreceptores, tornando o sinal luminoso em impulso nervoso, a ser conduzido pela via óptica ao córtex visual. Esse processo acontece no epitélio pigmentado da retina, com funções de regulação metabólica. A transdução da rodopsina nos discos membranares dos bastonetes. A rodopsina é a junção de uma proteína estrutural (opsina) com um cromóforo, o retinaldeído, envolvido por essa proteína. O cromóforo é responsável por absorver a energia luminosa proveniente do ambiente, e a rodopsina é responsável por fazer a conversão da energia luminosa em energia química.

6.4.2. As Cores

As células chamadas de cones e bastonetes, que ficam na retina, são responsáveis pela diferente sensibilidade das cores. Cada cone ou bastonete é sensível a uma faixa espectral distinta. Os cones azuis, por exemplo, são mais sensíveis a comprimentos de onda da faixa de 450 nm a 500 nm, já os bastonetes, são mais sensíveis entre 500 e 550 nm. Os cones verdes são sensíveis entre 550 e 600 nm, já os cones vermelhos são mais sensíveis em comprimentos de onda de 600 a 680 nm.

Capítulo 7

Descrição: Fluxo estacionário, Equação da Continuidade, Equação de Bernoulli, medição de pressão no leito vascular, viscosidade do sangue, fluxo laminar em tubos rígidos, Equação de Poiseuille, condições de aplicação da equação de Poiseuille, fluxo turbulento, efeitos de reentrâncias e perfil de velocidade na aorta.

7.1. Hidrodinâmica e Engenharia Biomédica

A hidrodinâmica versa sobre o estudo dos processos que envolvem o fluxo de um fluido, de maneira macroscópica. É importante, em engenharia biomédica, pois pode representar o fluxo de sangue nos vasos sanguíneos, ou o fluxo de ar na garganta, traquéia e pulmões, por exemplo.

7.2. Equação da Continuidade

Considerando-se o escoamento estacionário de um fluido, em que a velocidade de escoamento é constante no tempo, em qualquer ponto no espaço, podendo variar de um ponto para outro. Considerando-se, ainda, que o fluido é incompressível, mantendo sua densidade constante ao longo do escoamento, e que o fluido não é viscoso. Por último, considera-se que o movimento do fluido é irrotacional, não havendo velocidade angular em nenhum ponto. Com essas características, o fluido é chamado de fluido ideal [1].

Na Fig. 7.1 se apresenta um fluido ideal transitando em um canal cuja secção transversal é variável. Se um volume constante de fluido se desloca através de duas secções de áreas distintas, sua massa é a mesma, dada que a densidade é constante (fluido incompressível). Se o líquido atravessa a secção de área A_1 à uma velocidade v_1 , teremos a equação que segue:

$$\Delta m_1 = \rho \Delta x_1 A_1, \quad (7.1)$$

que é a massa que atravessa a dada área. Para a secção de área A_2 , o mesmo pode ser definido:

$$\Delta m_2 = \rho \Delta x_2 A_2. \quad (7.2)$$

Se o fluido ideal atravessa o tubo, o mesmo que passa por A_1 em um dado intervalo de tempo, passa por A_2 , também, no mesmo intervalo de tempo. Assim, a massa de fluido é a mesma nos dois volumes, que é o princípio da conservação de massas. Assim podemos igualar as Eqs. 7.1 e 7.2:

$$\Delta m_1 = \Delta m_2, \quad (7.3)$$

$$\Rightarrow \rho \Delta x_2 A_2 = \rho \Delta x_1 A_1. \quad (7.4)$$

Fazendo-se $\Delta x_1 = v_1 \Delta t$ e $\Delta x_2 = v_2 \Delta t$, teremos as Eqs. 7.5 e 7.6.

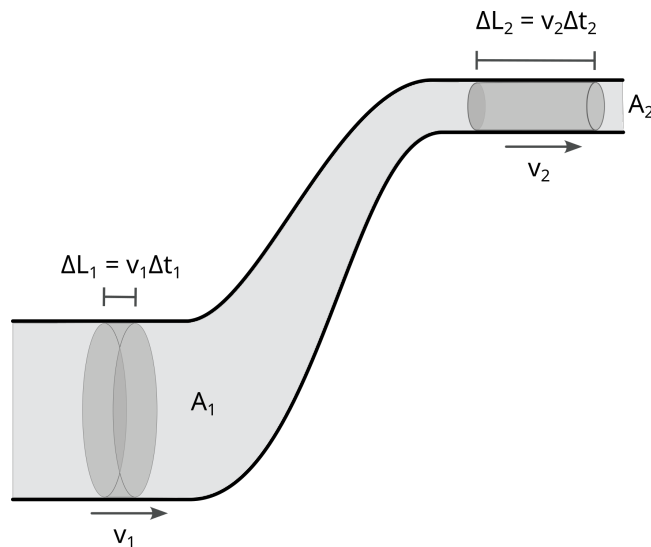


Figura 7.1 - Escoamento de um fluido por um canal de seção transversal variável, para o cálculo da equação de continuidade (Adaptado de [1]).

$$\rho v_1 A_1 \Delta t = \rho v_2 A_2 \Delta t , \quad (7.5)$$

$$\Rightarrow v_1 A_1 = v_2 A_2 . \quad (7.6)$$

Esse escoamento é chamado de escoamento estacionário [1], em que o produto da velocidade pela área de seção é constante, e a Eq. 7.6 é conhecida como equação da continuidade, expressando que a velocidade é inversamente proporcional à área da seção transversal do tubo para um fluido ideal. Como consequência, um fluido, como o sangue, aumenta consideravelmente sua velocidade ao atravessar uma veia com estrangulamento, ou menor calibre, quando o consideramos um fluido ideal.

7.3. Equação de Bernoulli

A equação de Bernoulli pode ser encontrada considerando-se o teorema do trabalho-energia, e a diferença de energia potencial entre o escoamento por duas seções distintas, em níveis de altura distintos, como mostrado na Fig. 7.2. A pressão que move o fluido no tubo pode ser definida como a força pela área, logo, a força resultante na seção de área A_1 e A_2 vale $P_1 A_1$ e $P_2 A_2$, respectivamente. Assim, pode-se definir o trabalho realizado na seção A_1 e A_2 , durante um dado intervalo de tempo, como:

$$W_1 = F_1 \Delta x_1 = P_1 A_1 \Delta x_1 , \quad (7.7)$$

$$W_2 = F_2 \Delta x_2 = P_2 A_2 \Delta x_2 . \quad (7.8)$$

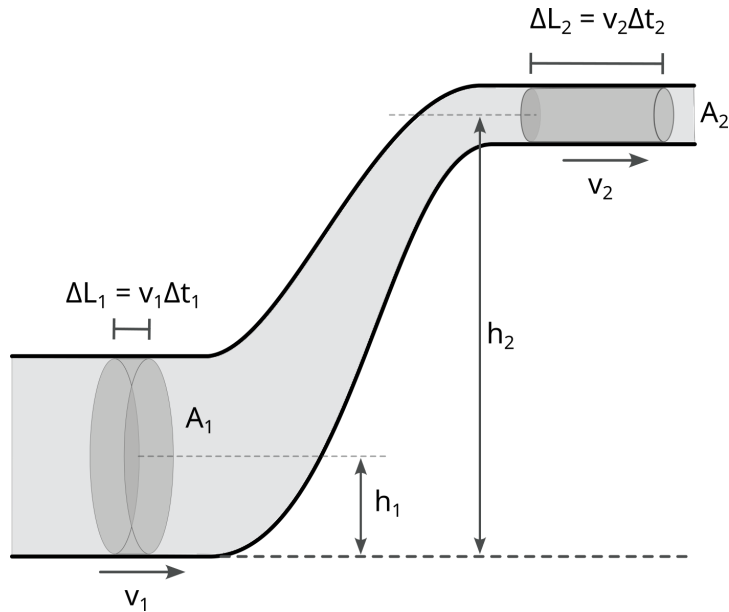


Figura 7.2 - Escoamento de um fluido por um canal de seção transversal variável, para o cálculo da equação de continuidade (Adaptado de [1]).

O trabalho realizado ao se elevar uma coluna de fluido da região de altura h_1 para a região de altura h_2 vale:

$$\Delta mg(h_2 - h_1), \quad (7.9)$$

em que Δm é a massa contida no volume $A_1 \Delta x_1$, que é o mesmo volume de $A_2 \Delta x_2$, g é a constante gravitacional. Já a energia cinética concernente à massa Δm trafegando nas velocidades v_1 e v_2 pode ser expressa por:

$$\frac{\Delta m v_1^2}{2} \text{ e } \frac{\Delta m v_2^2}{2}, \quad (7.10)$$

respectivamente.

O teorema energia-trabalho diz que a diferença de energia deve ser igual à diferença de trabalho. Assim, pode-se escrever a seguinte equação:

$$\frac{\Delta m v_2^2}{2} - \frac{\Delta m v_1^2}{2} = P_1 A_1 \Delta x_1 - P_2 A_2 \Delta x_2 - \Delta mg(h_2 - h_1). \quad (7.11)$$

Substituindo-se o volume do fluido deslocado, de $A_1 \Delta x_1$ para $\Delta m/\rho$, e de $A_2 \Delta x_2$ para $\Delta m/\rho$, igualmente, teremos a Eq. 7.12.

$$\frac{\Delta m v_2^2}{2} - \frac{\Delta m v_1^2}{2} = P_1 \frac{\Delta m}{\rho} - P_2 \frac{\Delta m}{\rho} - \Delta mg(h_2 - h_1). \quad (7.12)$$

Eliminando-se a massa Δm da Eq. 7.12, e rearranjando-se os termos, é possível se encontrar a equação de Bernoulli:

$$\rho \frac{v_2^2}{2} + P_2 + \rho g h_2 = \rho \frac{v_1^2}{2} + P_1 + \rho g h_1 = cte. \quad (7.13)$$

Essa equação se constitui em um compromisso entre a velocidade e a pressão e a altura do fluido ideal, escoando-se estacionariamente. Caso não haja diferença de altura, a equação diz algo parecido com a equação de continuidade.

7.4. Medidas de Pressão no Leito Vascular

Como é possível se ver, a pressão sanguínea não é a mesma em todos os tipos de vasos sanguíneos, ou à todas as distâncias do órgão de bombeamento (o coração). Doutro modo, diferentes pressões são encontradas, durante o circuito vascular. Considere as equações de continuidade (Eq. 7.6), por exemplo, se a área se altera, a velocidade de escoamento do fluido também se altera (considerando um escoamento estacionário e um fluido ideal). Podemos ver, como se mostra na Fig. 7.3, que a área da somatória das áreas transversais dos capilares (aproximadamente 2600 cm^2), são significativamente maiores que a somatória das áreas dos outros vasos, e assim sucessivamente até os vasos mais calibrosos do corpo humano, como a aorta ($2,5 \text{ cm}^2$) e a veia cava (8 cm^2). Isso faz com que haja uma diminuição significativa da velocidade com a qual o fluido percorre os capilares, facilitando as trocas gasosas, e entrega de nutrientes aos tecidos e células.

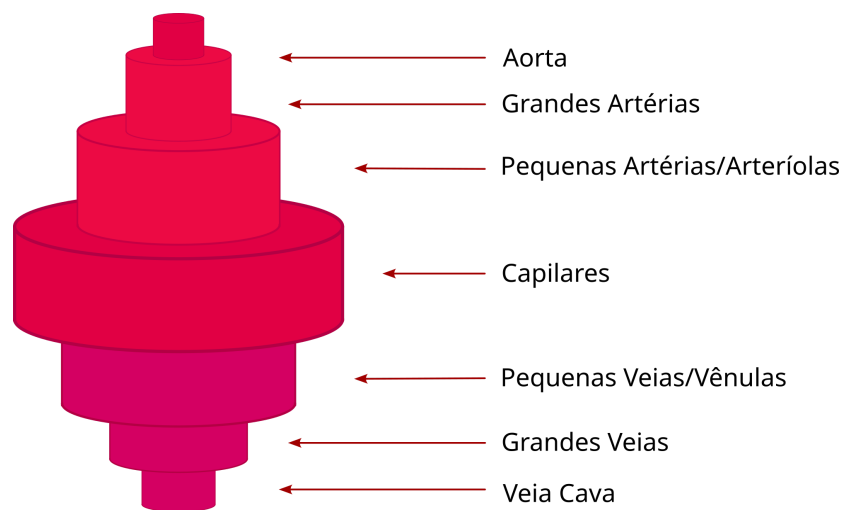


Figura 7.3 - Área somada dos capilares, em comparação às veias e artérias de pequeno e grande calibre.

Lembrando-se da equação de Bernoulli (Eq. 7.13), é possível, também, que a pressão interna aos vasos também mude a velocidade de escoamento do sangue. O aumento da pressão faria a velocidade de escoamento se aumentar, que é o que ocorre para vasos mais calibrosos, principalmente na ejeção de sangue rico em O_2 , como é o caso da aorta. Na Fig. 7.4 se mostra um gráfico da pressão sanguínea, nos diferentes vasos do circuito. Como é possível se ver, há uma grande queda na pressão nas artérias, capilares e veias, que volta a ser aumentada pelo bombeamento de sangue no ventrículo direito.

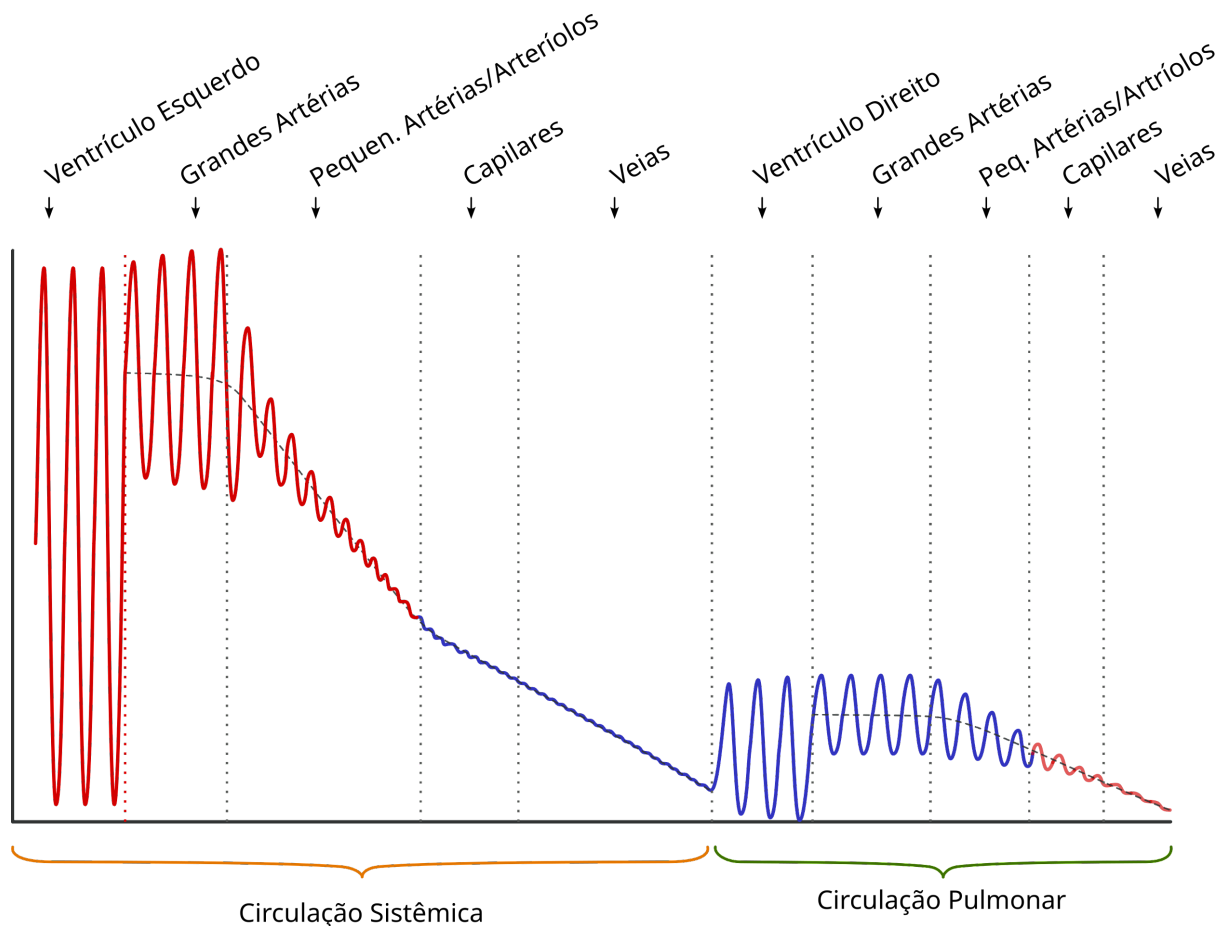


Figura 7.4 - Medida da pressão sanguínea ao longo dos diferentes vasos sanguíneos do organismo, para a grande e para a pequena circulação. Em vermelho identifica-se o sangue oxigenado, e em azul, o sangue desoxigenado.

7.5. Viscosidade

Até agora, não se considerou a viscosidade dos fluidos nas equações mostradas. A viscosidade é a resistência apresentada ao movimento, que pode ser importante quando o sangue aumenta o hematócrito, que é a razão entre o volume de glóbulos vermelhos pelo volume de sangue. Como os glóbulos vermelhos são numerosos nesse fluido, ao aumentarem seu volume, podem deixar o sangue mais viscoso, o que impacta na sua translação no sistema circulatório. Essa resistência ao movimento, assim como o atrito em superfícies sólidas, também ocasiona em dissipação de energia para a forma térmica.

A viscosidade cria o fenômeno do fluxo laminar, que pode ser visto como se o fluido fosse segregado em diversas finas camadas concêntricas, sendo que cada camada se move com uma velocidade diferente, menor em direção a borda (maior raio, em relação ao centro), e maior em direção ao centro do escoamento (menor raio), como mostrado na Fig. 7.5. Analisando-se do ponto de vista das lâminas, a força necessária para se movimentar uma dada lâmina de área A , é proporcional à área A , e à taxa de variação da velocidade longitudinal do fluido, com relação ao eixo transversal y (ou seja, quanto a velocidade em x varia com y), por meio de uma constante de proporcionalidade η . A constante de proporcionalidade η é chamada de viscosidade. A Eq. 7.14, a seguir, descreve essa relação.

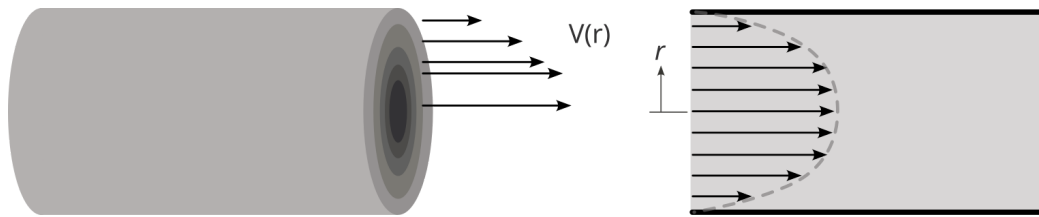


Figura 7.5 - Fluxo laminar, em que finas camadas de fluido escoam com velocidades distintas, em função do raio r .

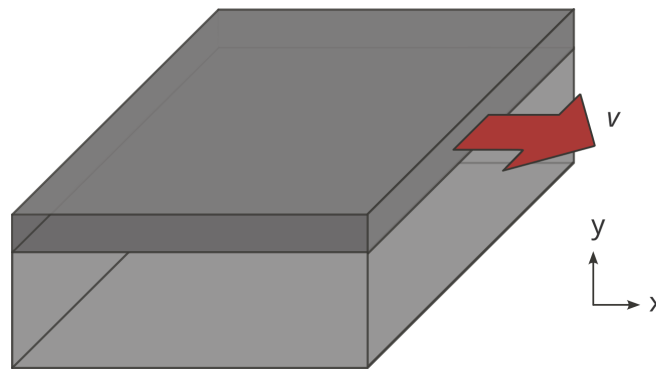


Figura 7.6 - Geometria do fluxo laminar de uma dada lâmina de área A em um fluido (Adaptado de [1]).

$$F_{visc} = \eta A \frac{\Delta v_x}{\Delta y} . \tag{7.14}$$

A viscosidade é importante, pois é a dificuldade, ou resistência ao transporte de um dado fluido, como o sangue, que pode afetar P-V do coração, e estar relacionada à algumas doenças e comorbidades.

7.6. Lei de Hagen-Poiseuille

A equação de Hagen-Poiseuille descreve o escoamento de um fluido incompressível de baixa viscosidade, como o sangue, em um canal de secção tubular. Considere o sangue fluindo por um tubo como mostrado na Fig. 7.7. Sendo Q a vazão de fluido nessa seção tubular, definido como a diferença de pressão pela resistência viscosa ao fluxo, e R , podemos definir a lei de Hagen-Poiseuille com as equações seguintes.

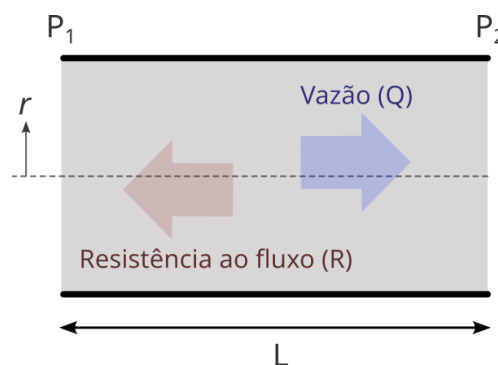


Figura 7.7 - Geometria para a equação de Hagen-Poiseuille, com um fluido incompressível de baixa viscosidade fluindo por um canal de secção tubular.

$$Q = \frac{P_1 - P_2}{R}, \quad (7.15)$$

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}. \quad (7.16)$$

Através dessa equação, pode-se calcular diversos efeitos da geometria e viscosidade sobre a vazão de um fluido, como o sangue, por exemplo. Considere um sangue com hematócrito alto, em um circuito cujo coração está mais alto que um membro superior, como o braço esquerdo (Fig. 7.8). Pela equação, para distâncias o dobro maiores, nas mesmas condições, o fluxo Q cai pela metade, já que é inversamente proporcional à L , comprimento do tubo. Já r influencia muito mais fortemente, com dependência à quarta potência. Ou seja, caso o raio de um vaso sanguíneo caia pela metade, segundo a lei de Hagen-Poiseuille, o fluxo cairia 16 vezes, uma queda muito mais drástica!

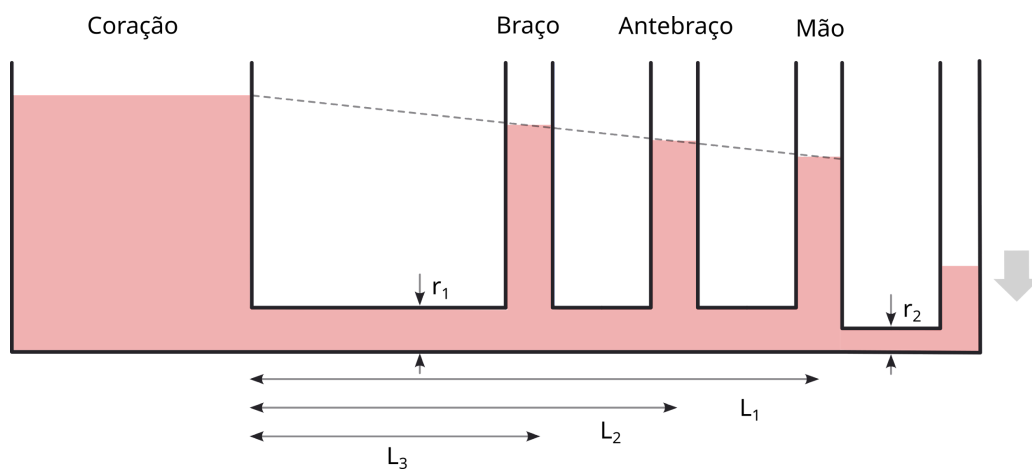


Figura 7.8 - Exemplo da lei de Hagen-Poiseuille aplicada nos vasos sanguíneos do coração, ao irrigar o braço, antebraço e mão esquerda ($L_1 > L_2 > L_3$ e r_1 o dobro de r_2).

7.7. Fluxo Turbulento - Relação de Reynolds

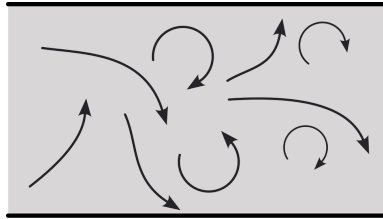
Principalmente sob maiores velocidades, o fluxo de um fluido pode passar de laminar para turbulento, quando a velocidade passa a alterar sua direção e intensidade de forma praticamente aleatória, não mais podendo ser descrita pelas equações dos tópicos anteriores. Nesses casos, é comum o aparecimento de redemoinhos, ou vórtex. A abordagem desse tipo de escoamento requer análise mais detalhada e equações mais complexas de Mecânica dos Fluidos. A relação de Reynolds estabelecida pela Eq. 7.17 mostra um número que expressa a tendência à turbulência. Se o resultado dessa equação for maior do que 1000, há probabilidade de turbulência, mesmo em vasos retos e lisos.

$$R = \frac{\rho D v}{\eta}, \quad (7.17)$$

onde ρ é a densidade, η a viscosidade, D o diâmetro do tubo, e v a velocidade.

Essa equação nos mostra que, em situações em que a velocidade aumenta, há grandes chances de ocorrer fluxo turbulento. De igual modo, se a densidade do sangue aumenta, se sua viscosidade cai, ou se o diâmetro dos vasos aumenta, a probabilidade de turbulência aumenta proporcionalmente. Na aorta, por exemplo, o número de Reynolds

atinge valores bem maiores que 1000 [1] durante o período de ejeção de sangue pelo ventrículo. O estreitamento e obstrução dos vasos, também pode ser um estímulo para a ocorrência de fluxo turbulento. Pode-se ver na Fig. 7.9 o diagrama de um fluxo turbulento.



Fluxo Turbulento

Figura 7.9 - Diagrama de um fluxo turbulento, cuja probabilidade de ocorrer aumenta com o aumento do número de Reynolds.

7.8. Referências

[1] Weissmüller, Gilberto, Nice Maria Americano Costa Pinto, e Paulo Mascarello Bisch. "Biofísica." (2010).