

Roteiro *MetaNeuron*

Vá em <http://www.metaneuron.org/> e baixe o software *MetaNeuron*. Baixe também o manual do programa. Ou use o programa na sala pró-aluno.

A simulação consiste de painéis onde podemos controlar as variáveis e de uma tela onde é mostrado as alterações de potencial (ou de correntes) do neurônio simulado. Movendo-se o cursor e clicando com o mouse podemos ver os valores de potencial ou de corrente no canto inferior direito da tela.

Problemas sobre bioeletrogênese

Potencial de membrana (Lesson 1).

Essa lição simula o potencial de membrana usando as equações de Nerst para calcular os equilíbrios eletroquímicos e a equação GHK simplificada para os íons sódio e potássio.

Nos painéis podemos controlar as concentrações de sódio e de potássio fora e dentro da célula, e suas permeabilidades. A partir da equação de Nerst o programa calcula o potencial de equilíbrio para cada íon, mostrando-os em uma janela e no gráfico temos linhas representando o potencial de repouso da membrana, em amarelo, e os potenciais de equilíbrio do potássio e do sódio, em azul e verde respectivamente.

-Para iniciar altere as concentrações **intracelulares** de potássio para 130 mM, que é um valor característico da concentração intracelular de potássio na maioria das células.

1) Nesse exercício vamos estudar como as alterações da concentração de potássio extracelular afetam o potencial de repouso. Meça o potencial de repouso da membrana (E_m , linha amarela) e o potencial de equilíbrio do potássio (E_k , linha azul) em diferentes concentrações de potássio extracelulares: 1 mM, 3 mM (concentração inicial), 6 mM, 12 mM, 18 mM, 24 mM, 32 mM, 64 mM e 128 mM.

-Usando um programa de computador, como o Microsoft Excel, por exemplo, plote os valores de E_k e E_m contra o logaritmo (log) da concentração de potássio extracelular. Compare os dois gráficos e explique a diferença. Sugestão: Plote as duas curvas no mesmo gráfico para facilitar a comparação.

2) Nesse exercício vamos estudar como as alterações da concentração de sódio extracelular afetam o potencial de repouso. Meça o potencial de repouso da membrana (E_m , linha amarela) e o potencial de equilíbrio do sódio (E_{Na} , linha verde) em diferentes concentrações de sódio extracelulares: 120 mM (concentração inicial), 200 mM, 60 mM, 30 mM, 15 mM e 5 mM. Plote ambos os valores contra o logaritmo (log) concentração de sódio extracelular. Compare os dois gráficos e explique a diferença. Sugestão: Plote as duas curvas no mesmo gráfico para facilitar a comparação.

3) Nesse exercício vamos estudar o efeito da permeabilidade iônica no potencial de repouso da membrana. Compare as permeabilidades da membrana, mostradas nos painéis, ao sódio e ao

potássio dadas pelo programa e explique como elas influenciaram os gráficos das questões 1 e 2? Refaça os gráficos trocando a permeabilidades do sódio pela do potássio, e vice-versa.

a-Explique a dependência do potencial de membrana a cada íon e o efeito da alteração da permeabilidade iônica. Use as equações necessárias.

Constante de tempo da membrana (Lesson 2).

Essa lição simula as propriedades passivas da membrana.

Na lição 2, no painel de controle temos as variáveis que controlam a resistência e capacitância da membrana, a esquerda, e no centro e a direita temos o controle do estímulos. Na parte de baixo temos o da escala do gráfico.

-Para facilitar a visualização dos dados altere *sweep duration* para 200 ms e *sweep width* para 100 ms.

4) Usando os valores padrões de resistência de membrana ($10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) e amplitude do pulso ($10 \mu\text{A}$) calcule graficamente o valor da constante de tempo (τ) da membrana da seguinte forma:

1. Calcule a amplitude da despolarização causada pela injeção da corrente.
2. Calcule 63% desse valor.
3. Some esse valor ao potencial antes de despolarização
4. Meça o tempo para o potencial da membrana alcançar esse valor.
5. Desconte os 2 ms da latência.

Compare com o valor encontrado usando a fórmula da constante de tempo.

5) Altere os valores da corrente injetada para mais ($15 \mu\text{A}$) e para menos ($5 \mu\text{A}$) e faça um gráfico da voltagem alcançada versus a corrente e calcule a inclinação da reta (use o valor de 10 uM tbm).

Qual a lei que a equação da reta está representando e qual variável a inclinação da reta representa? O que ela significa eletricamente e biologicamente?

6) Vamos analisar o efeito da resistência da membrana sobre a resposta da membrana celular a injeção de corrente.

a)Altere os valores da resistência da membrana para mais ($15 \text{ kohm}/\text{cm}^2$) e para menos ($5 \text{ kohm}/\text{cm}^2$) e meça a alteração máxima de voltagem em cada situação e a constante de tempo da membrana. Explique os resultados segundo seu conhecimento. Como um neurônio poderia alterar sua resistência da membrana a essa alteração fisiologicamente?

b) Supondo o limiar do potencial de ação a linha roxa, meça o tempo de disparo para uma despolarização de 100 mV em um modelo com as 3 constantes de tempo medidas. Para isso use um estímulo de 10 μA para a membrana de resistência de 10 kohm/cm²; 20 μA para a membrana de resistência de 5 kohm/cm²; e 6.66 μA para a membrana de resistência de 15 kohm/cm².

Analize o impacto de se alterar a resistência da membrana sobre o disparo de potenciais de ação? Como o neurônio pode alterar sua resistência de membrana?

Constante de espaço da membrana (Lesson 3).

Nessa lição o painel de controle temos o controle das variáveis das propriedades dos axônios e dendritos e do estímulo. Na extrema esquerda podemos selecionar se queremos ver as alterações de potencial pela distância ou pelo tempo. Vamos observar as alterações do potencial com a distância.

- Para facilitar a visualização dos dados altere *Length* para 2000 μm e amplitude para 11 pA.

7) Meça graficamente a constante de espaço da membrana.

Calcule a distância que o potencial caiu para 37% do valor inicial ($t=0$). Veja a figura no final para melhor entendimento.

8) Nesse exercício vamos estudar o efeito da resistência da membrana e do citoplasma na constante de espaço. Altere os parâmetros do axônio como nas opções abaixo, meça a constante de espaço da membrana e explique seus resultados.

a) Altere a resistência da membrana de 5 para 1 e 50 k Ω .cm²

b) Volte a resistência da membrana para 5 k Ω .cm². Altere o diâmetro do axônio para 0,5 e 1 micrometro

9) Explique os efeitos da resistência da membrana sobre a constante de espaço. Explique usando um modelo elétrico do axônio.

10 Explique os efeitos do diâmetro do axônio sobre a constante de espaço. Explique usando um modelo elétrico do axônio.

11) Explique os efeitos da bainha de mielina sobre a constante de tempo, de espaço e velocidade de propagação do sinal elétrico ao longo do axônio.

Problemas sobre potencial de ação

Potencial de ação (Lesson 4).

Nessa lição é simulado o potencial de ação do nervo usando-se os parâmetros clássicos de Hodgkin e Huxley. Simula-se um nervo com uma condutância de sódio e outra de potássio, dependentes de potencial, e uma de vazamento, não dependente de potencial.

Nos painéis de controle podemos controlar as condutâncias e os potenciais de equilíbrio do sódio e potássio, adicionar os bloqueadores tetrodotoxina (TTX) e tetraetilamônio (TEA), no painel à esquerda. No painel seguinte temos os controles da condutância de vazamento (leak) e no painel abaixo podemos selecionar a exibição das condutâncias ou das correntes de sódio e potássio que formam o potencial de ação. Podemos controlar também a corrente de manutenção (holding) e a temperatura. Mas não alteraremos nenhum desses parâmetros nessa aula. Abaixo temos os controles dos estímulos a serem aplicados a célula virtual, e no painel inferior o controle de exibição do gráfico.

Nesse momento no painel “Conductances and Currents” vamos assinalar “showing ionic conductances” (mostrar as condutâncias iônicas).

1) Altere a amplitude do estímulo para 0 μA , vá aumentando até 100 μA em passos de 10 μA .

-Explique o que vc observou e faça um gráfico com o potencial de membrana versus o estímulo. Que propriedades do potencial de ação esse gráfico demonstra? Qual deve ser um valor aproximado do limiar do potencial de ação?

-Explique o comportamento das condutâncias de sódio (verde) e de potássio (azul). O que gera essas condutâncias

2) Nesse exercício vamos investigar o efeito de alterações nas concentrações de sódio no potencial de ação. Pode-se desabilitar a exibição das condutância se assim for desejado. Para isso vamos alterar o valor do potencial de equilíbrio do sódio (E_{Na}) gradativamente. Porém para facilitar o disparo de potenciais de ação vamos primeiro aumentar a amplitude do estímulo em 100 μA . Agora altere o valor do potencial de equilíbrio do sódio para 10 mV e depois para 20 mV até chegar em 100 mV, em passos de 10 mV. Plote o valor do pico do potencial de ação pelo valor de E_{Na}

-Explique seus resultados.

3) Vamos agora estudar como dois potenciais de ação disparados próximos um do outro se comportam. Primeiro vamos retornar os valores de E_{Na} para 50 mV e da intensidade do estímulo para 65 μA . Agora ative o segundo estímulo (*stimulus 2 - on*). Aumente o *sweep duration* para 10

ms para melhor visualizarmos os dois potenciais de ação. Coloque o *delay* (atraso) do segundo estímulo em 1 ms. Vá aumentando esse valor em passos de 1 ms até aparecer um segundo potencial de ação.

-Explique o que está acontecendo e os motivos.

-Faça o mesmo experimento com uma intensidade do segundo estímulo de 100 e 200 μ A. Explique os resultados.

Voltage-clamp (Lesson 5).

Nessa parte vamos estudar as correntes iônicas que geram o potencial de ação, usando uma simulação de um neurônio no modo *voltage-clamp*. Nesse modo mantemos a célula em um potencial de manutenção (“holding”) e estimulamos as correntes geradas por um potencial teste que é mostrado em vermelho no painel .

Os painéis de controle dessa lição são semelhantes a da lição anterior como você pode observar.

No visor, vemos a corrente iônica em amarelo, o potencial em vermelho, e os potenciais de equilíbrio do sódio e do potássio em azul e verde respectivamente.

4) Observe a tela inicial da lição. Explique a corrente gerada pelo potencial teste (-5 mV por 4 ms). Observe os efeitos da aplicação de TTX e TEA, e descreva as diferenças observadas das correntes isoladas. Quais são os íons carreadores dessas correntes e em que direção eles estão fluindo (para dentro ou para fora da célula (Explique)? Relacione as correntes iônicas com o potencial de ação.

5) Vamos agora estudar a corrente de sódio dependente de voltagem. **Isole a corrente de sódio com o bloqueador do canal de potássio** e altere a amplitude do Estímulo 1 para -65 mV e prossiga com passos de 10 mV até 75 mV. Plote o gráfico **corrente-voltagem** para a corrente de sódio medindo o ponto máximo da corrente (seja ela negativa ou positiva). Explique o que está acontecendo com os canais de sódio do nervo à medida que a membrana é despolarizada. Explique porque a corrente de sódio altera sua polaridade (vai de uma corrente de entrada, negativa, para uma de saída positiva) em um determinado potencial.

6) Altere o potencial de equilíbrio do sódio de 50 mV, até -20 mV em passos de -10 mV. Explique o efeito dessas alterações sobre a corrente.

7) Como fizemos com os potenciais de ação vamos fazer a mesma coisa com as correntes de sódio, vamos estudar como duas correntes de sódio ativadas próximas umas das outras se comportam. Então ative (on) o segundo pulso. Isole com a droga a corrente de sódio. Altere o *sweep duration* para 20 ms e duração (*width*) de cada pulso (*sweep*) para 2 ms, para melhor visualização das correntes.

Agora altere o intervalo (*delay*) do segundo *sweep* de 1 ms até 10 ms , em passos de 1 ms. Plote a razão entre o pico da corrente de sódio do pulso 2 com a do pulso 1, pelo intervalo entre os dois pulsos. Explique os resultados e como esse fenômeno influencia o disparo de potenciais de ação?