

Bioeletrogênese conceitos e técnicas/Patch-clamp

RCB0110

Prof. Ricardo M. Leão.

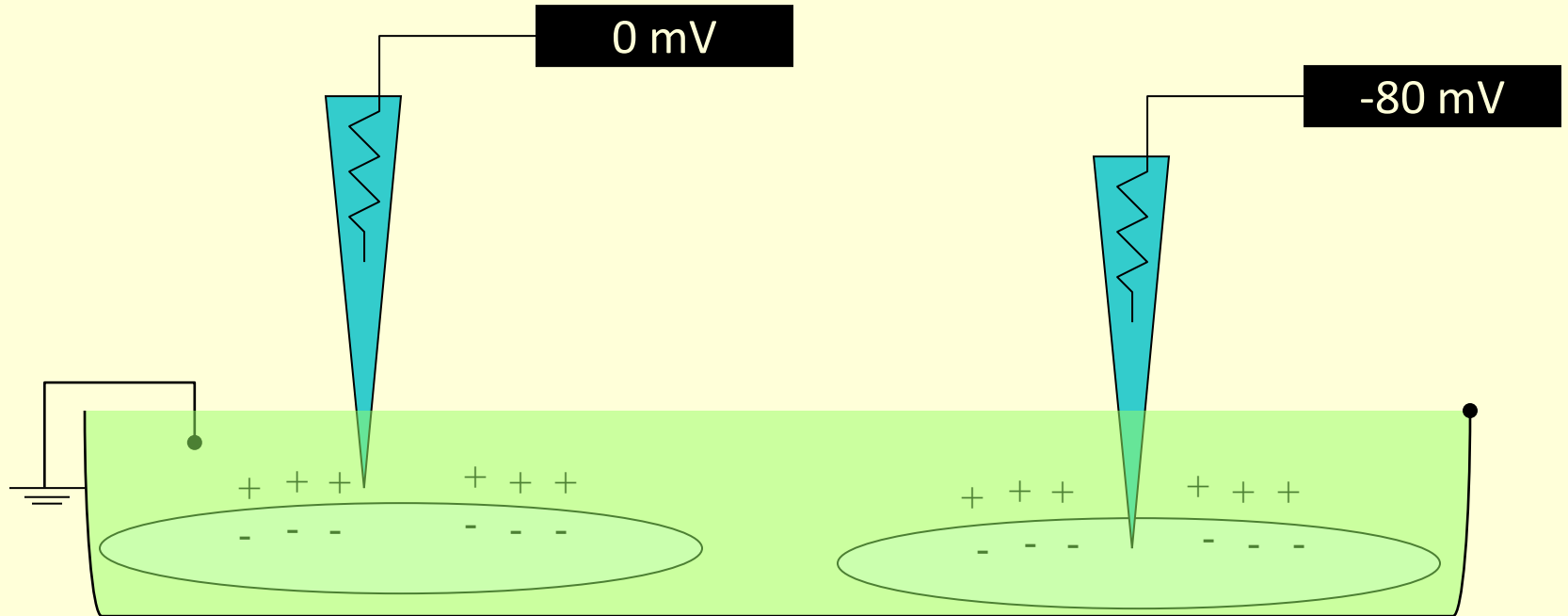
Origens do potencial de repouso

- Todas as células apresentam uma diferença de potencial elétrico (voltagem) através da membrana.
- Alterações na permeabilidade iônica da membrana levam a alterações do potencial da membrana

Algumas medidas elétricas e seus correlatos biológicos

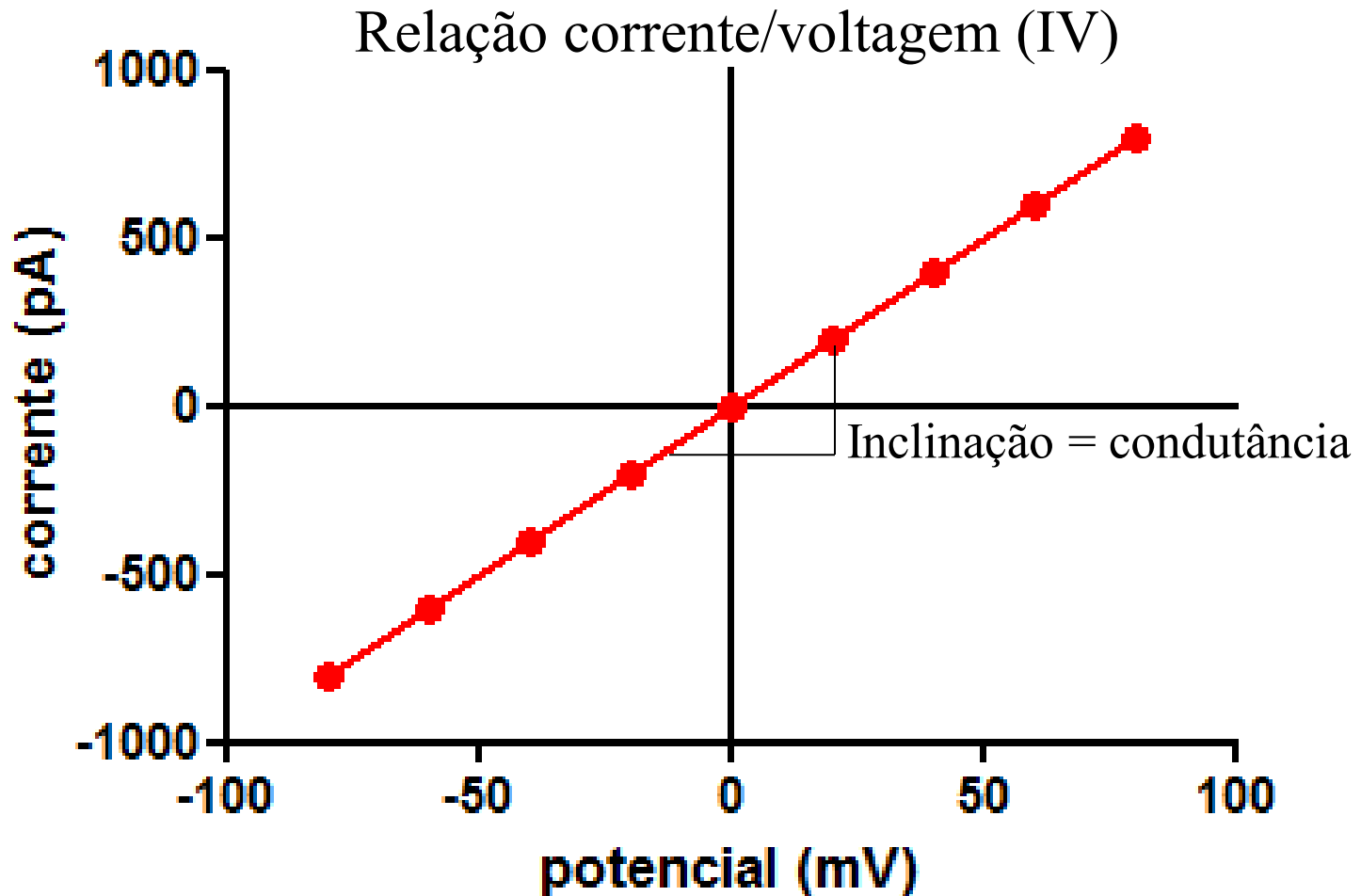
- Carga – C (coulomb)
 - Carga (positiva ou negativa) de um íon e do um campo elétrico criado por ele.
- Potencial (E,V) – V (volt)
 - Energia que move as cargas (íons) através da membrana (através dos canais). A “bateria” da membrana.
- Corrente (I)– A (ampere = C/s)
 - Fluxo de cargas (**íons**) pela membrana.
- Condutância (G) – S (siemens = A/V)
 - Representação elétrica da permeabilidade da membrana aos íons. Diretamente proporcional a quantidade de **canais iônicos** abertos presentes na membrana.
- Resistência (R)– Ω (ohm = V/A)
 - O inverso da condutância. Inversamente proporcional a quantidade de canais iônicos abertos na membrana
- Capacitância (C) – F (faraday = coulomb/V)
 - Capacitor é um material isolante que separa dois meios condutores. A membrana biológica é um capacitor. Um capacitor separa cargas, quanto maior a capacidade de separar cargas, maior a capacitância. Diretamente proporcional a área da membrana celular

Registro do potencial elétrico da membrana (ddp = diferença de potencial)



Lei de ohm relaciona corrente, voltagem e resistênci/a/conduâtncia

$$\text{Lei de ohm: } G = I/V$$



E como os organismos geram bioeletricidade?

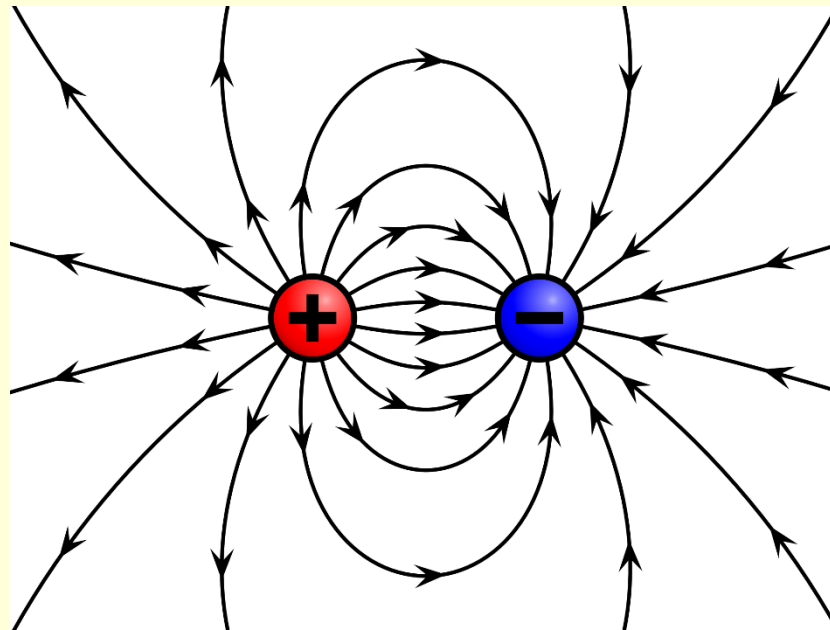
Pelo FLUXO DIFUSIONAL de ÍONS através de membrana celular e pela PERMEABILIDADE SELETIVA da membrana a determinados íons

Conceitos importantes para o entendimento da bioeletrogênese:

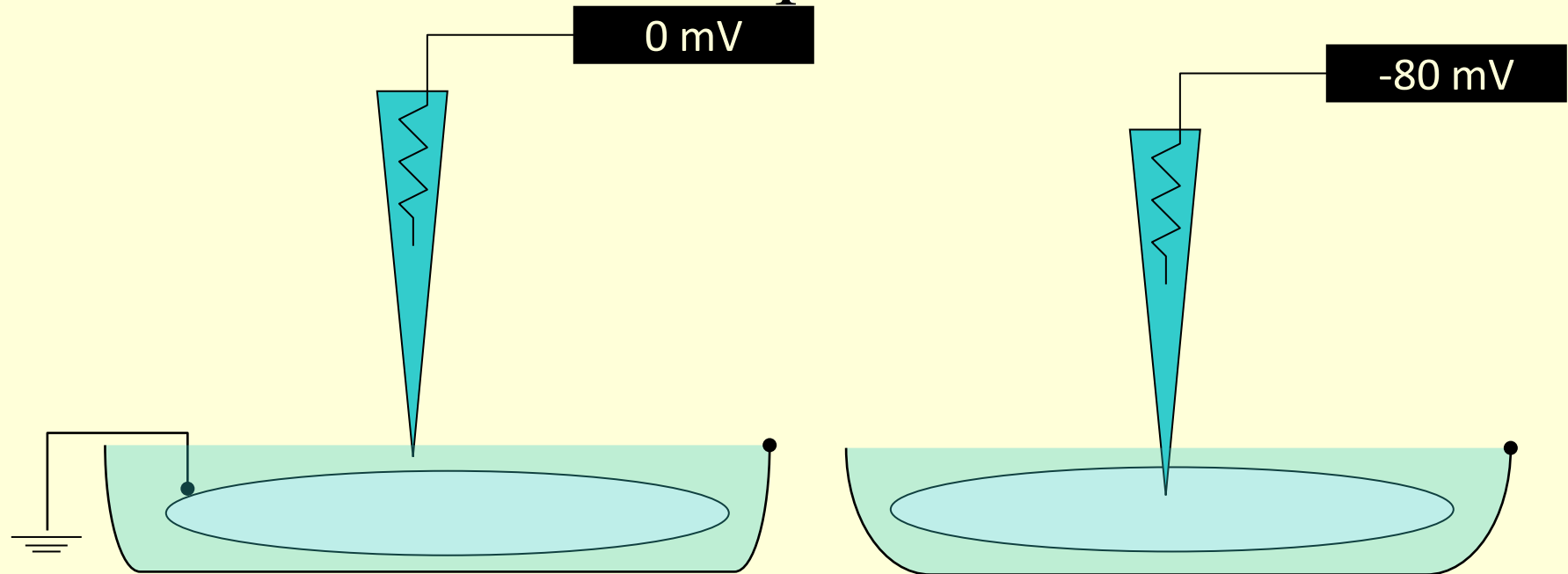
- *Íons movem de forma independente e aleatória (movimento Browniano)*



- *Íons são atraídos por íons de carga oposta e repelidos por íons da mesma carga*
- *Campos elétricos são campos gerados pelas cargas que atraem ou repelem as cargas ao seu redor (unidade V/metro)*



Fato Biológico: Registro do potencial de repouso



TIPO CELULAR	E_m (mV)
Neurônio	-70
Músculo esquelético	-80
Músculo cardíaco (atrial e ventricular)	-80
Músculo liso	-55

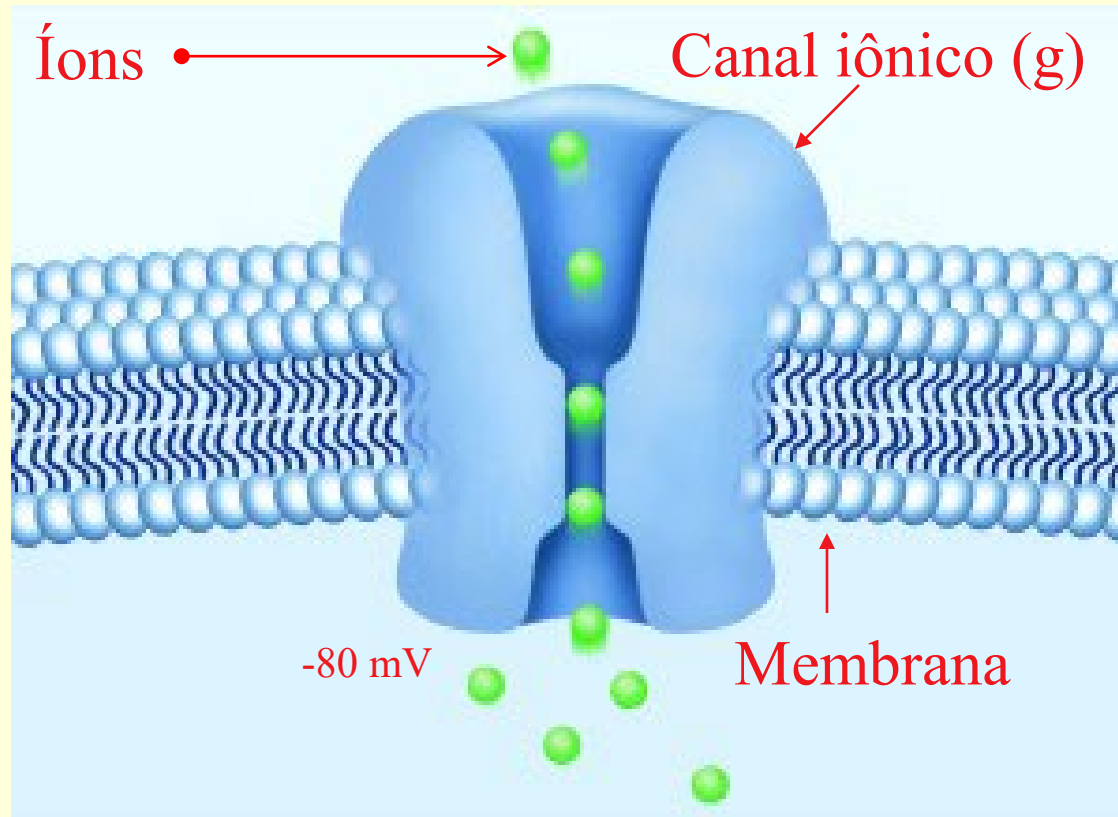
O potencial negativo NÃO quer dizer que existam mais cargas negativas dentro da célula!!!!!!

Os meios intra e extra celulares são ELETRONEUTROS, ou seja, os íons de cargas positivas são sempre contra-balançados por íons de cargas negativas e vice-versa

E como os organismos geram
bioeletricidade?

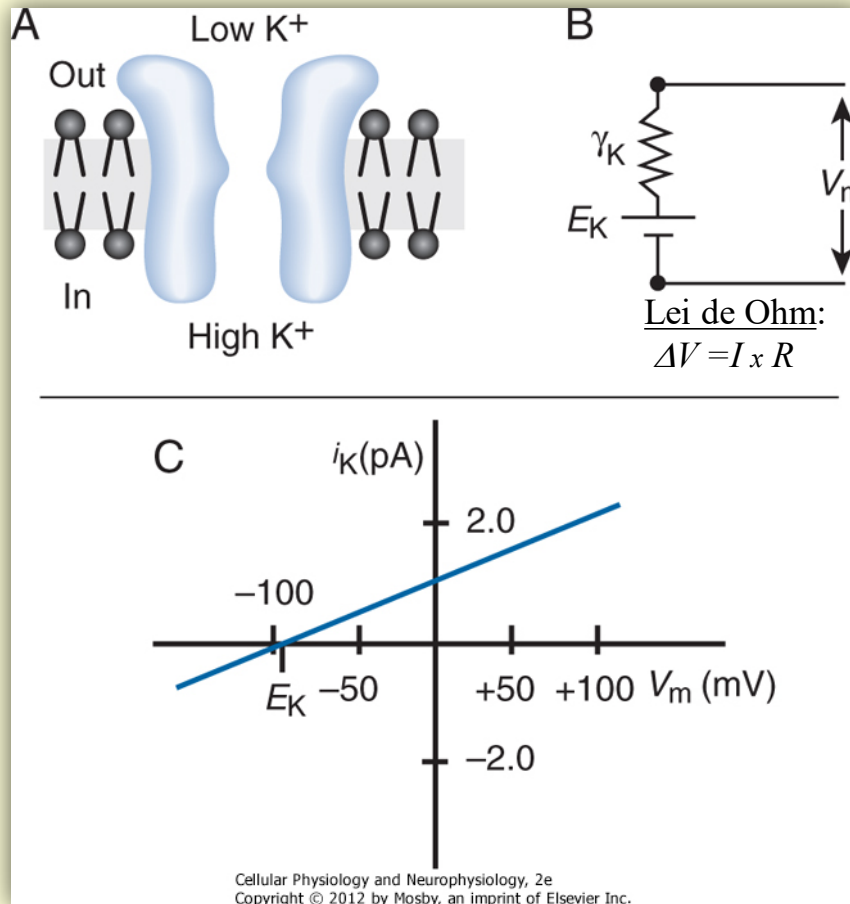
**Pelo FLUXO de ÍONS através de
membrana celular!**

A membrana celular possui proteínas que formam canais que passam íons

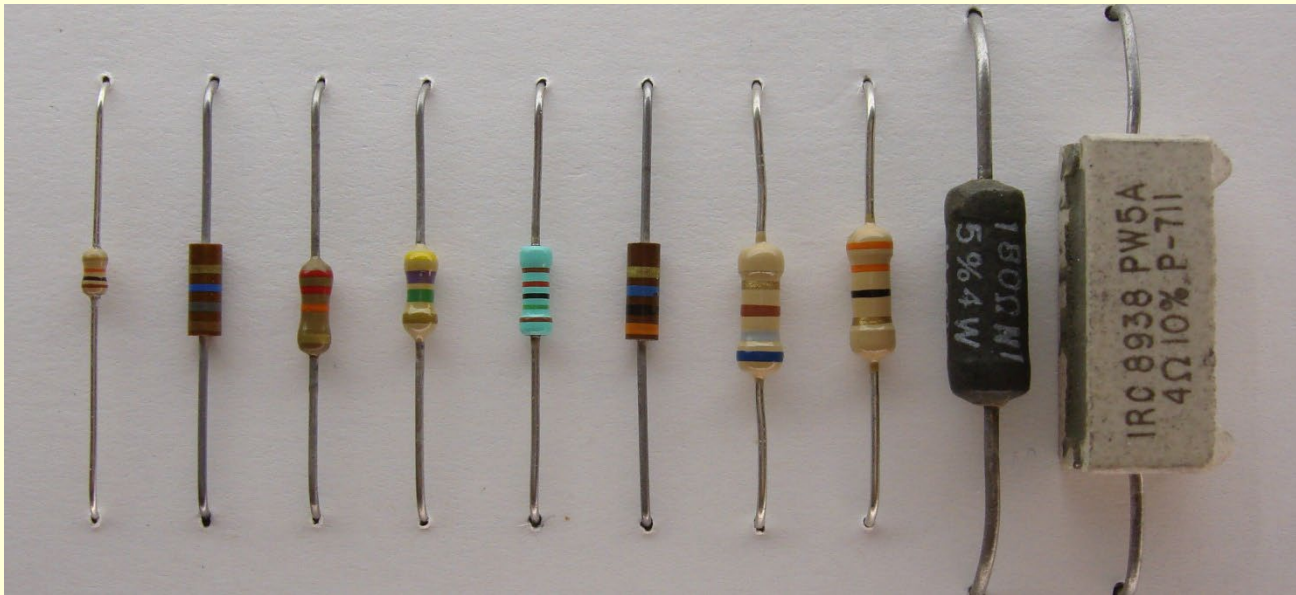


Os canais Iônicos podem ser vistos como **condutores (g)** (ou seu inverso, resistores) porque passam corrente elétrica na forma de íons!

Os canais iônicos são os condutores/resistores celulares

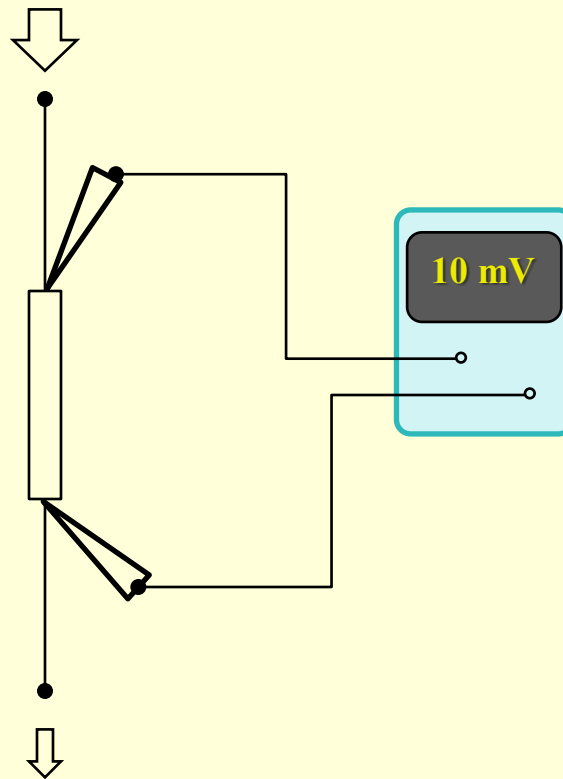


A quantidade de canais iônicos abertos na membrana determina a resistência (inverso da condutância) da membrana



A corrente que passa por um resistor causa uma “queda” de voltagem entre os dois lados do resistor

- Lei de ohm : $dV=dI.R$



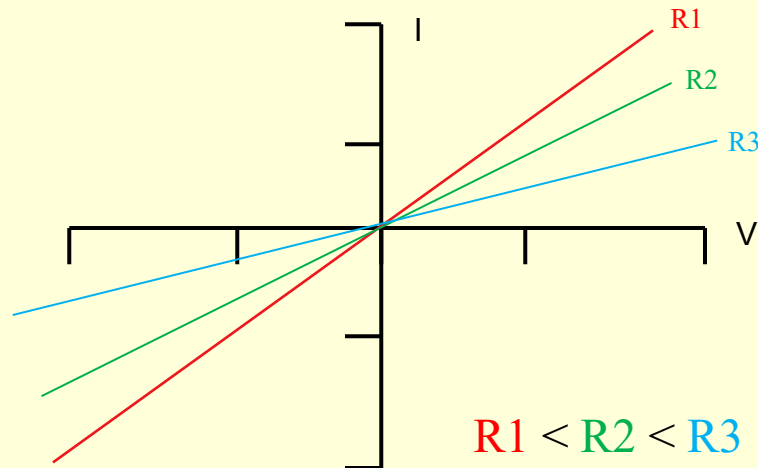
A resistência elétrica afeta a magnitude dos sinais elétricos

Lei de Ohm:

$$\Delta V = I \times R$$

$$\Delta V = I/G$$

A resistência de entrada da célula determina a magnitude da despolarização em resposta a corrente injetada



Resistencias em série se somam

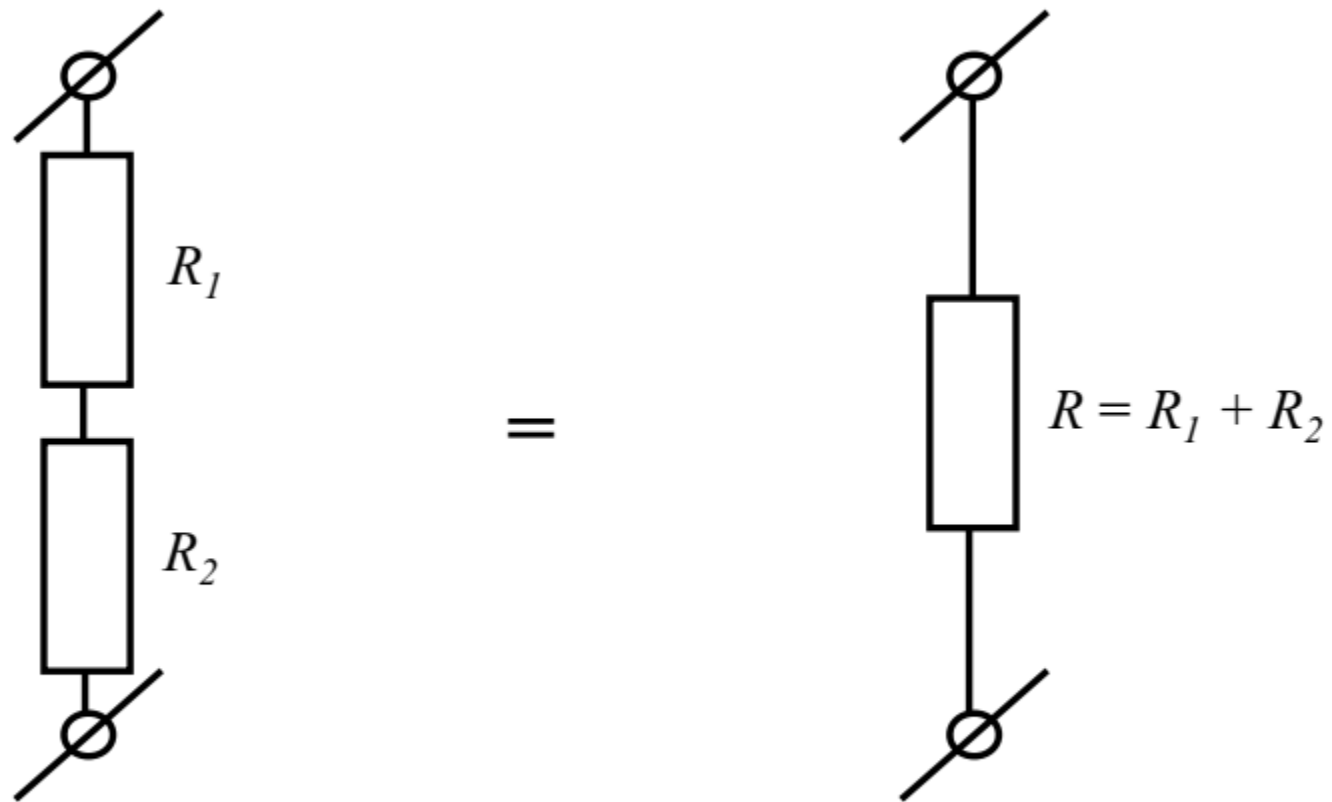


Figure 2.8 Resistors in series add up

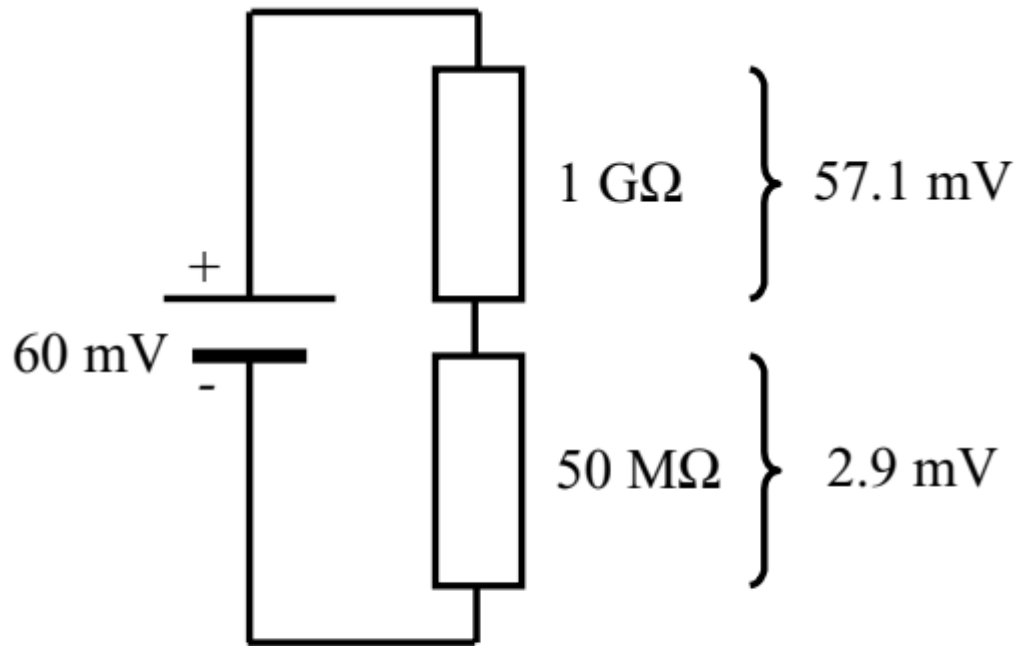


Figure 2.9 Voltage drops over resistors in series

Resistencias paralelas

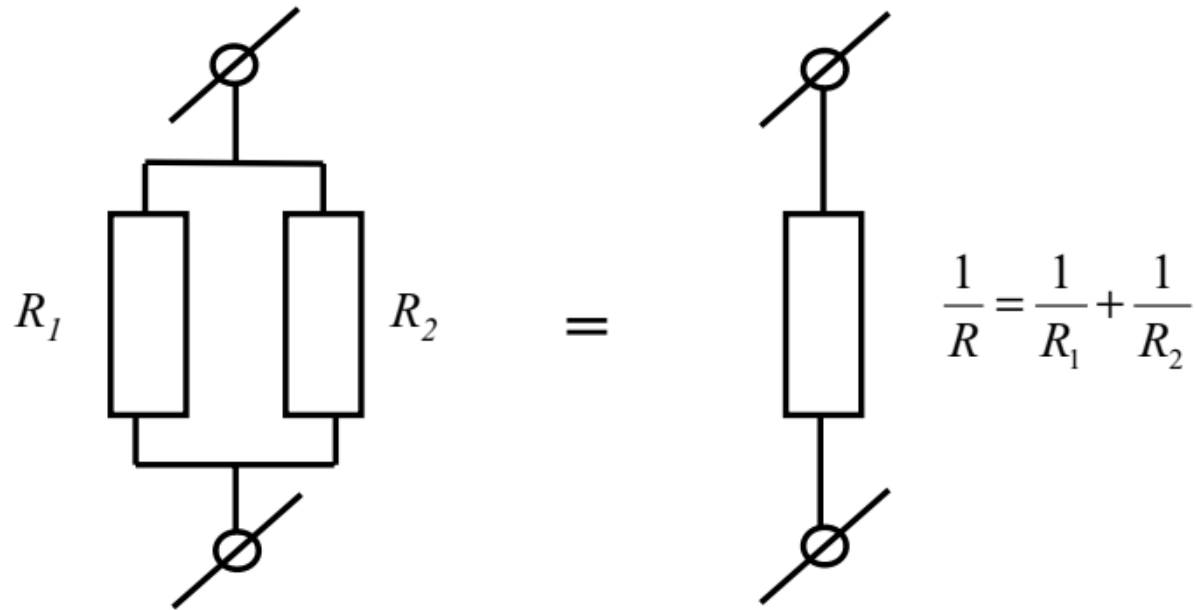
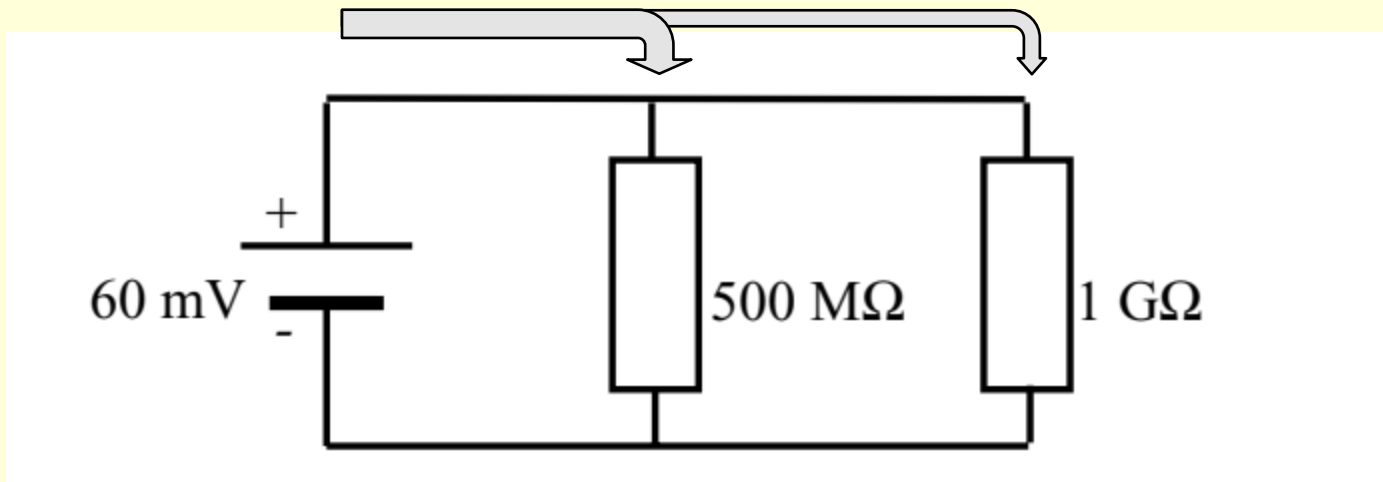


Figure 2.10 Parallel resistors form a lower total resistance than each individual resistor, because they form two separate possible pathways for current to flow. The total resistance is calculated using the reciprocal rule

Resistencias em paralelo



$$R_{\text{total}} = 333 \text{ Mohm} \left(\frac{1}{R} = \frac{1}{500} + \frac{1}{1000} \right)$$

Lei de Ohm: $V = I \times R$

$$0.06 = I \times 333 \times 10^6$$

$$I = 180 \times 10^{-12} \text{ A ou } 180 \text{ pA}$$

A membrana biológica pode ser considerada um capacitor.



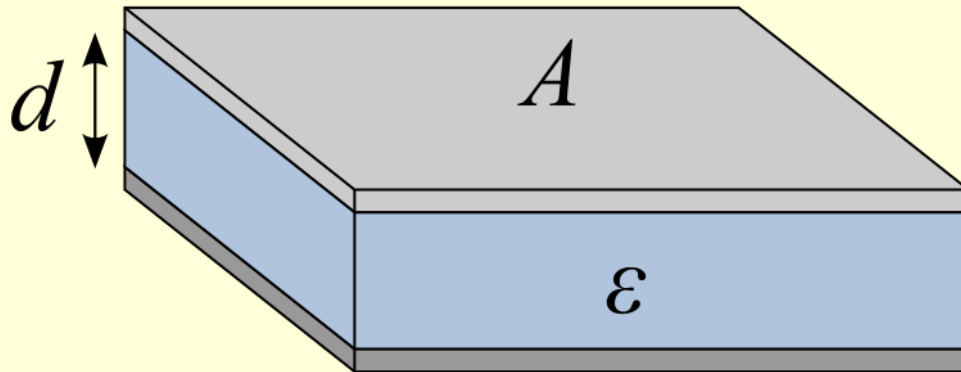
$$C = \frac{Q}{V}$$



$$C_m = \left(\frac{\epsilon}{d} \right) \cdot A$$

A membrana biológica pode ser considerada um **capacitor**.

Capacitor = meio isolante que separa dois meios condutores = separador de carga
Capacitância = capacidade de isolar cargas; Unidade: Farad (F) = Coulomb por Volt

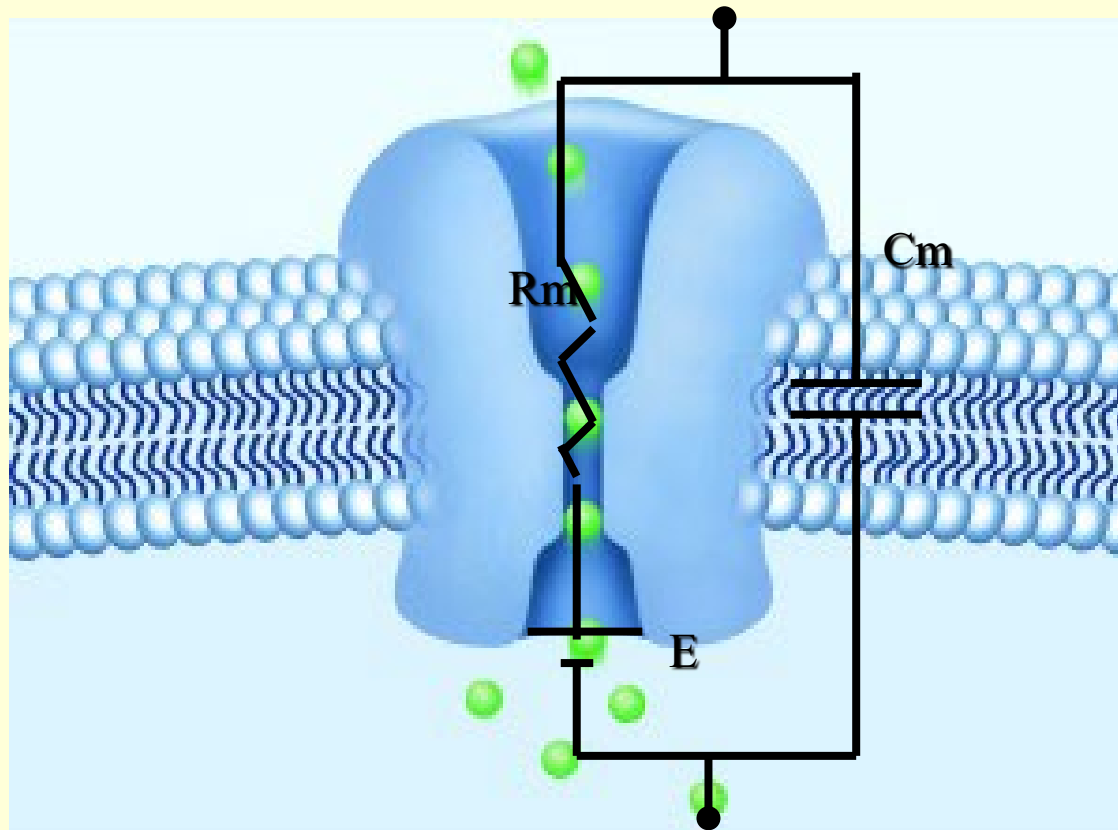


$$C = \frac{Q}{V} \begin{array}{c} + + | + + \\ \hline - - | - - \\ | \end{array}$$

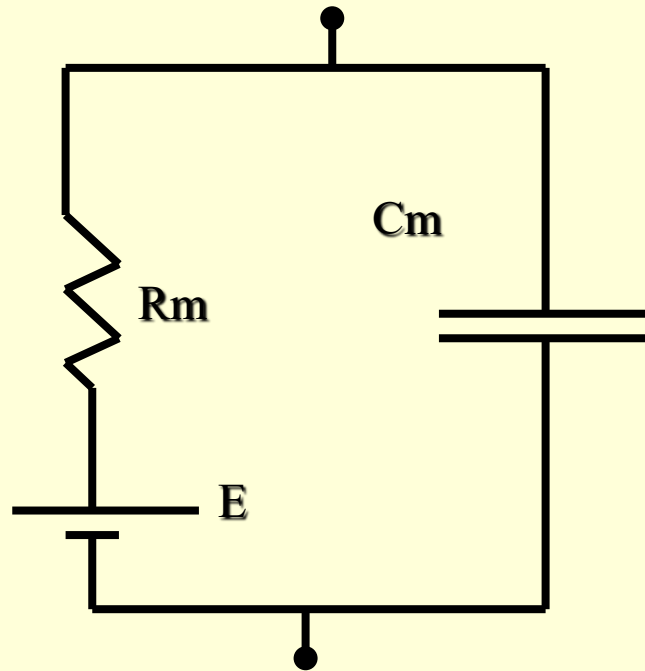
$$C_m = \left(\frac{\epsilon}{d} \right) \cdot A$$

Lei de ohm: o fluxo de íons por um resistor (R) gera corrente (I) que altera a diferença de potencial através da membrana (V)

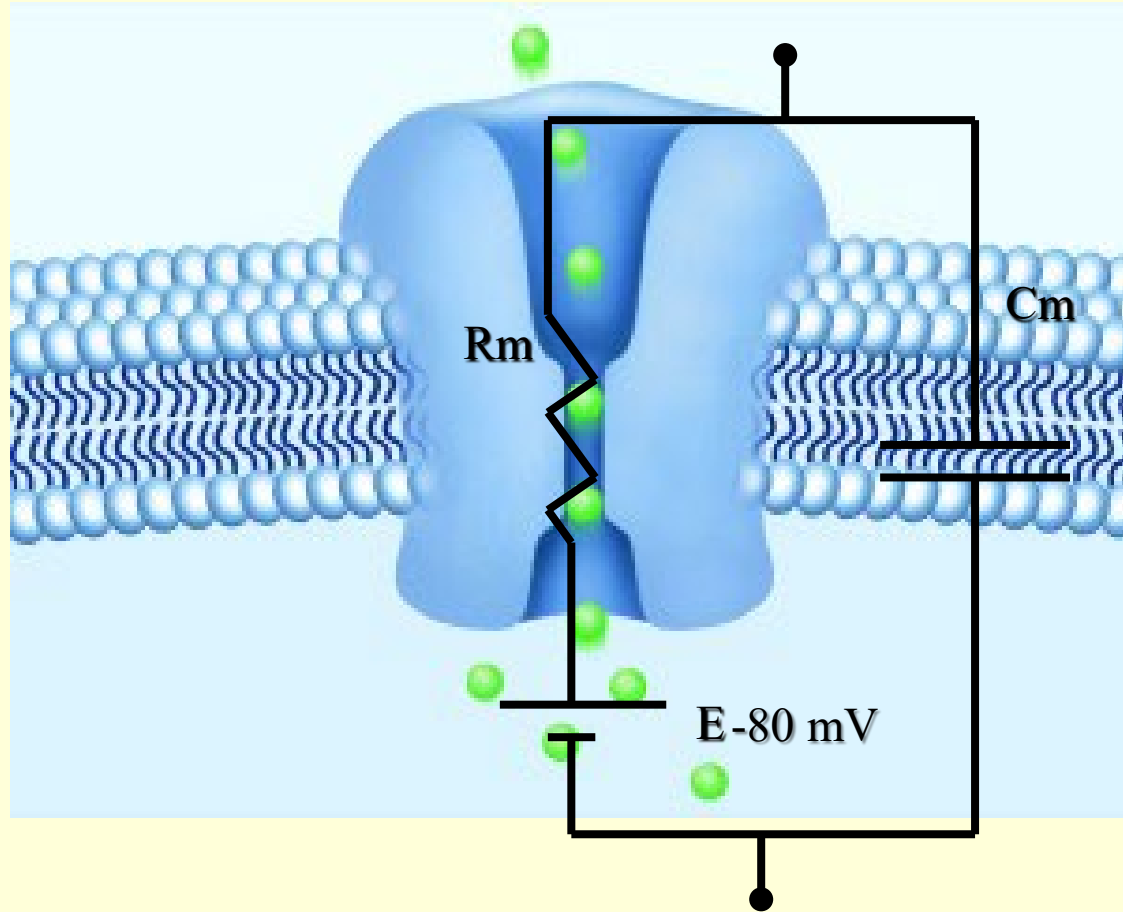
$$V=I.R$$



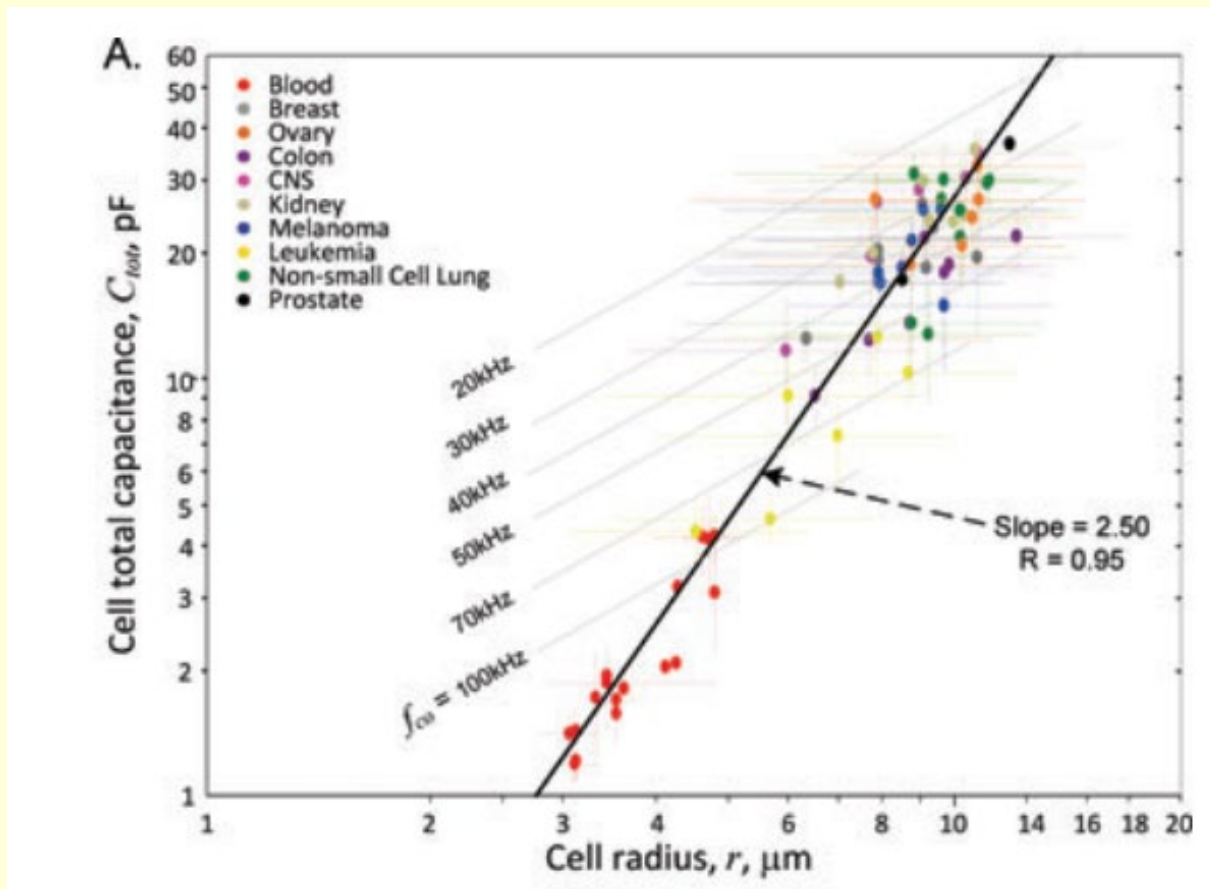
A célula pode ser representada eletricamente como um circuito com uma resistência (**R**) em paralelo com um capacitor (**C**) acoplado a uma bateria (**E**)



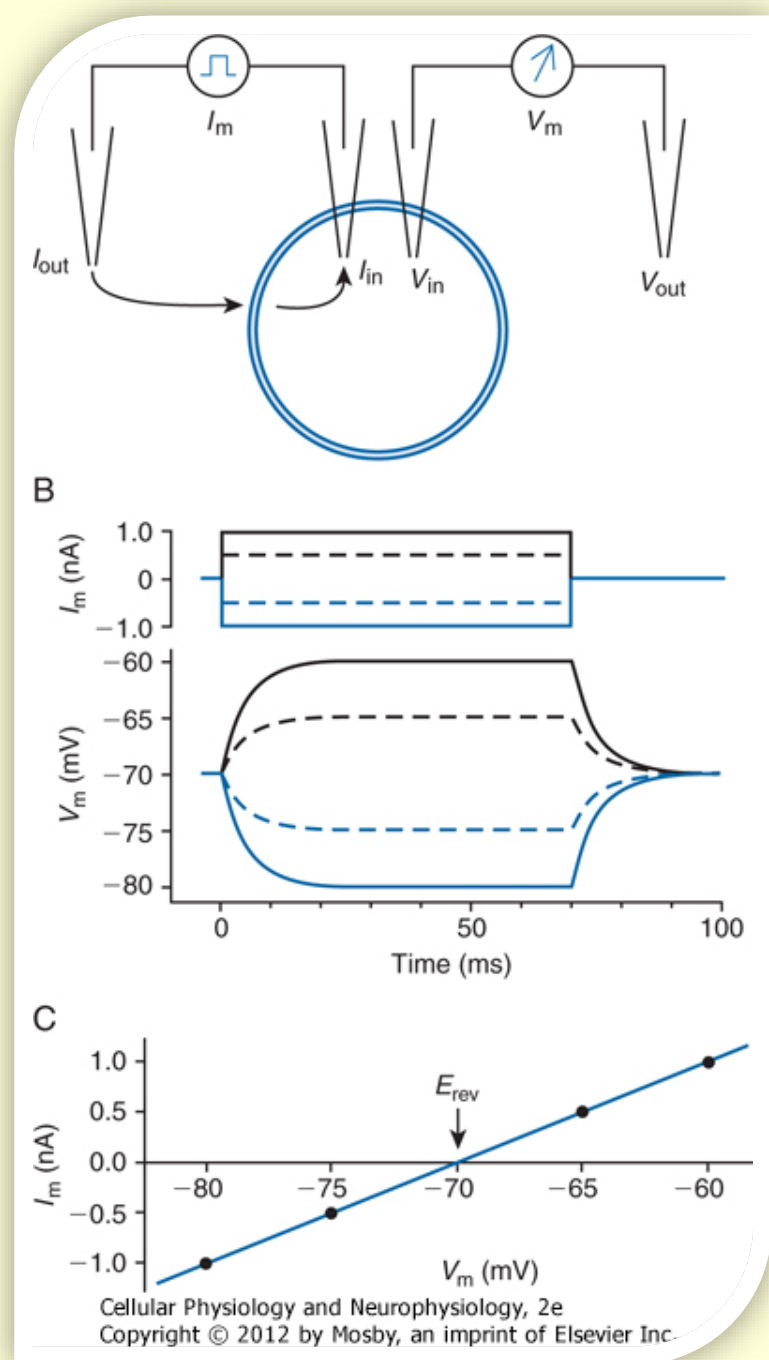
C_m = membrana
 R_m = canais
 E = diferença de potencial



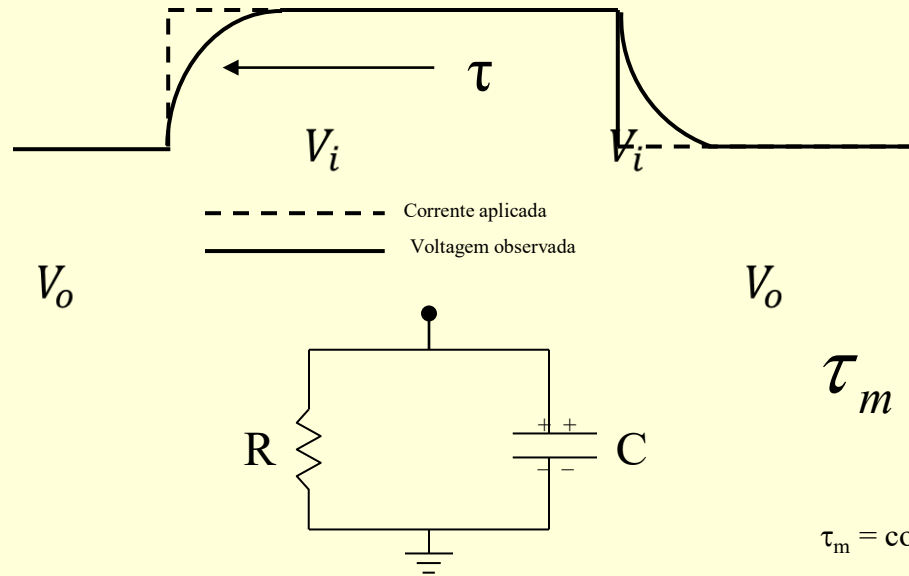
A capacitância da membrana (C_m) é proporcional a área da membrane e tamanho celular.



O potencial de membrana não é alterado instantaneamente em resposta a injeção de corrente devido ao “carregamento” inicial do capacitor (bicamada lipídica)



A constante de tempo da membrana (τ_m) reflete o tempo de carregamento da membrana e é proporcional a capacitância e a resistência da membrana



$$\tau_m = C_m R_m$$

τ_m = constante de tempo da membrana

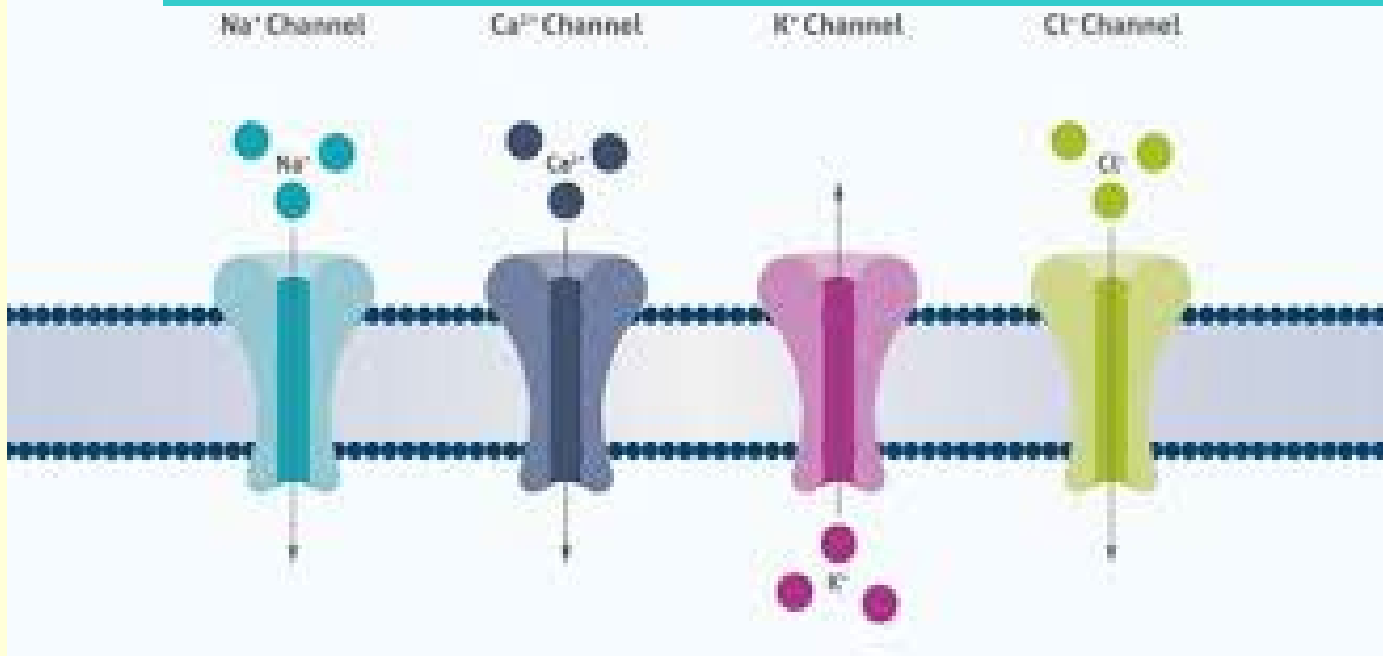
A constante de tempo da membrana (τ_m) reflete o tempo quando o potencial chega a 63% do valor final

Porque isso é importante????

- Porque os neurônios ajustam a resistência de membrana de acordo com a função do neurônio.
 - Neurônios “integradores” necessitam de respostas mais lentas às correntes sinápticas para integrarem os sinais sinápticos.
 - Neurônios “seguidores” precisam de respostas rápidas e precisas para gerarem potenciais de ação rapidamente em resposta as correntes sinápticas.
 - Fará mais sentido quando estudarmos neurotransmissão

Como o neurônio pode alterar sua resistência de membrana?

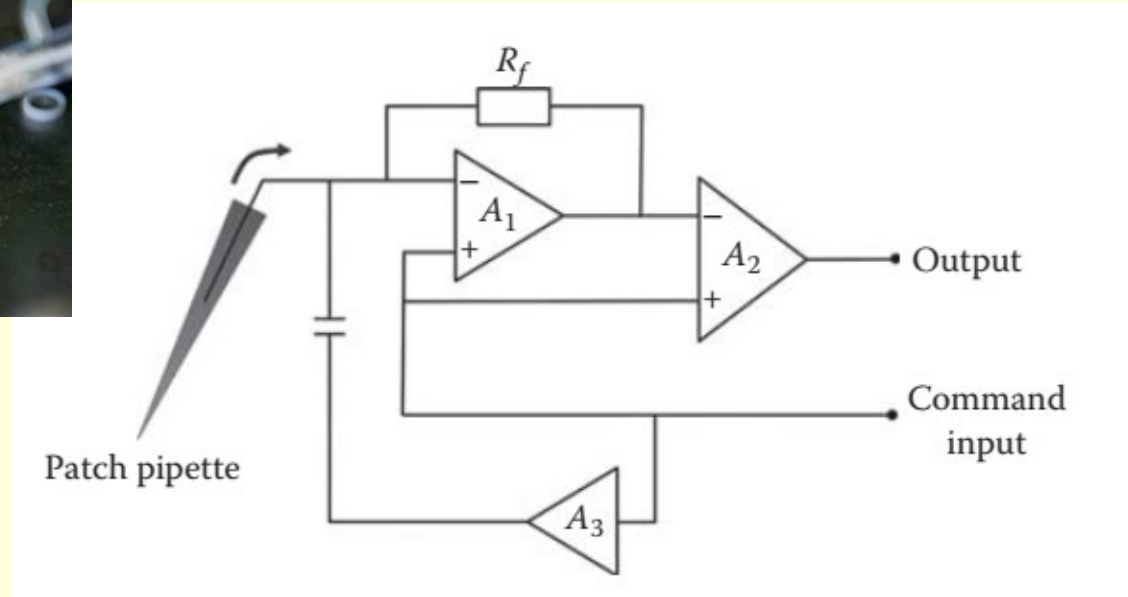
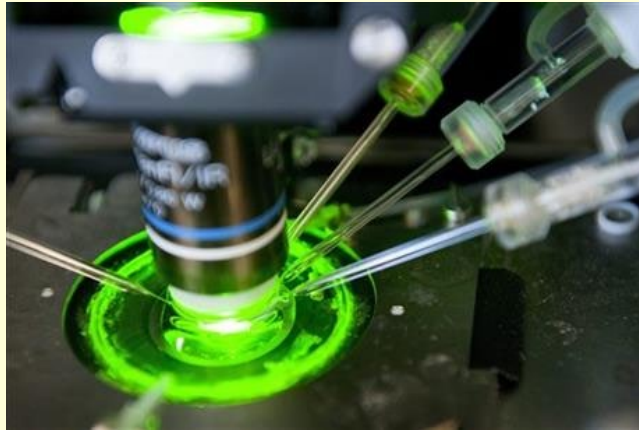
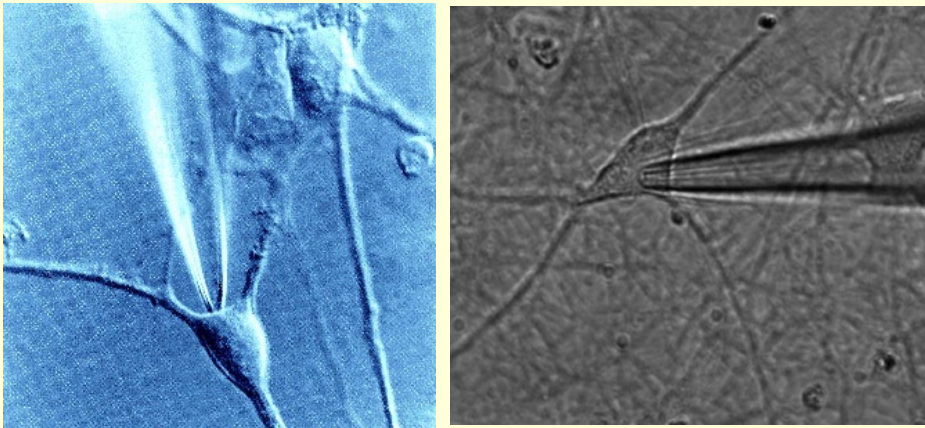
Alterando a expressão de canais iônicos na membrana



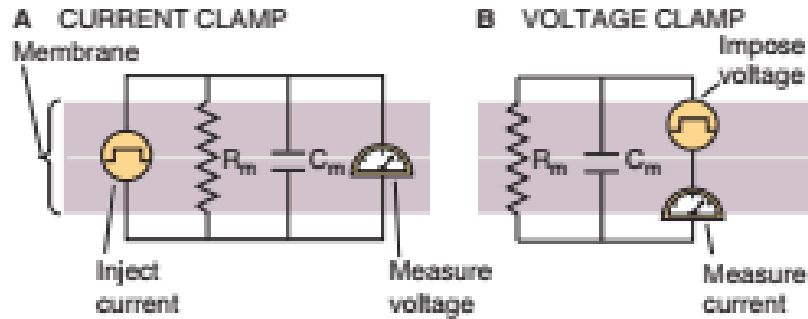
Você acha que todos os neurônios possuem resistência de membrana iguais?

Neurônio	Rm (MΩ)	
Neurônio Octopus (núcleo coclear)	2-6	} seguidores
Neurônio Bushy (núcleo coclear)	70-100	
Neurônio piramidal (neocórtex)	270-500	} integradores
Neurônios do núcleo do trato solitário (tronco)	180-1300	
Neurônio granular (cerebelo)	1000-3000	

O patch-clamp



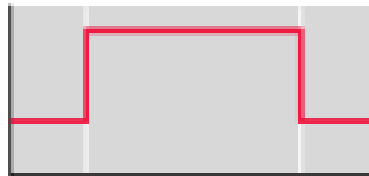
Current clamp e voltage-clamp



Current-clamp – mede o potencial de membrana
Voltage-clamp – mede a da corrente da membrana em voltagem fixa

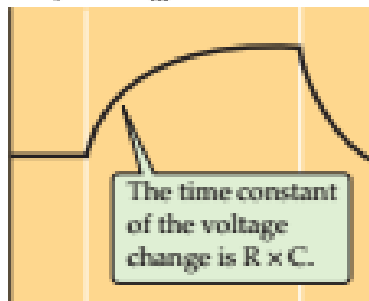
1
Inject a square pulse of I .

Stimulus I



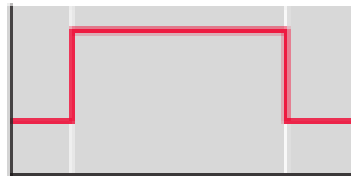
2
Observe the response of V_m .

Response V_m



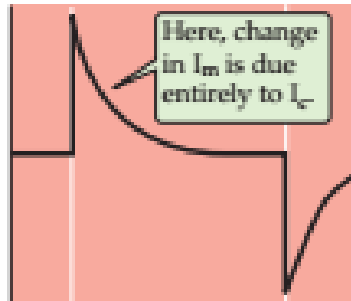
1
Impose a square pulse of V .

Stimulus V



2
Observe the response of I_m .

Response I_m



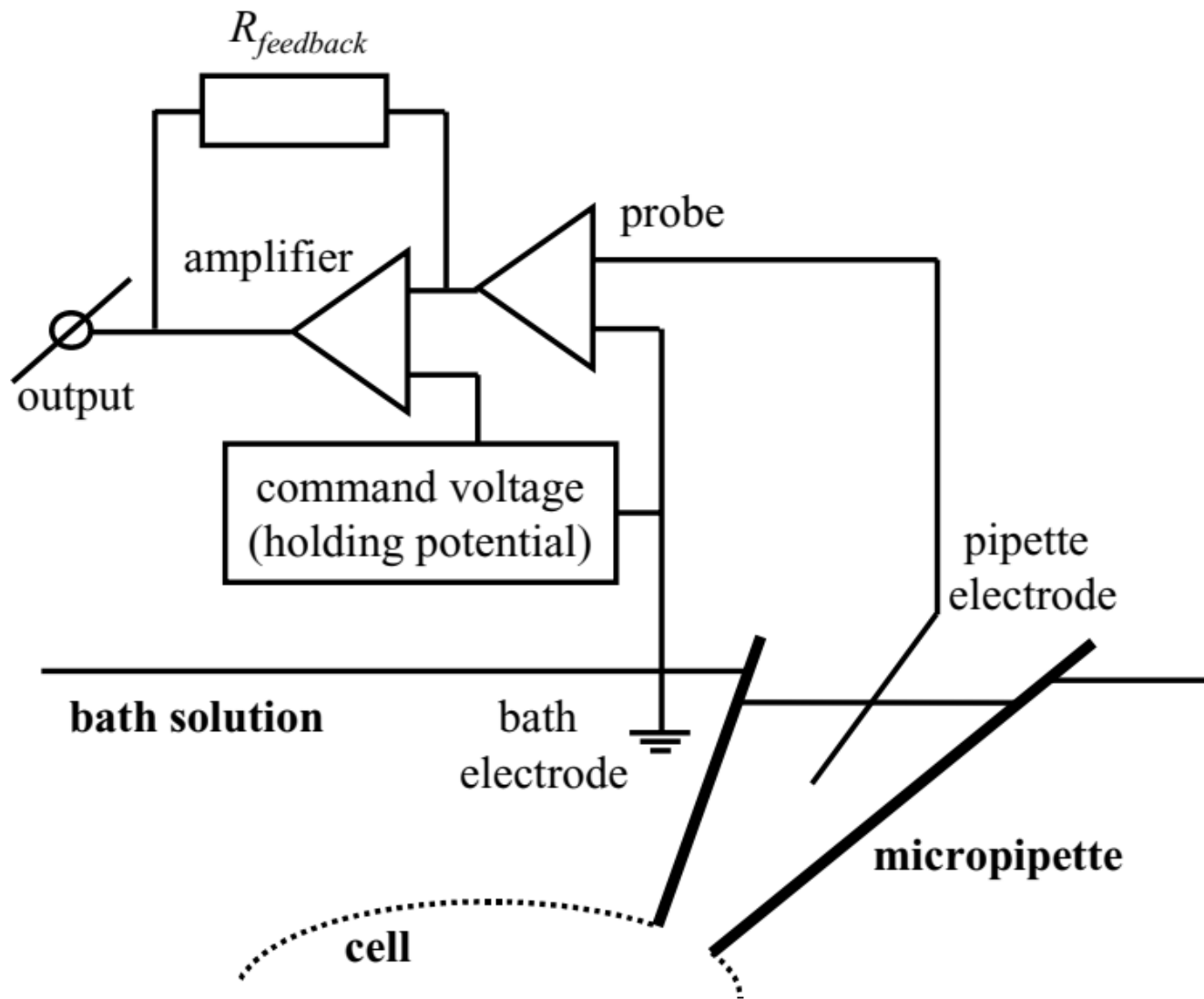


Figure 2.19 The voltage clamp principle in the whole-cell patch configuration. A command voltage is set by the experimenter and continuously compared with the measured potential. Any difference is instantaneously compensated by current injection. Whole-cell patch clamp is discussed in detail in Sections 2.3.6 and 4.2

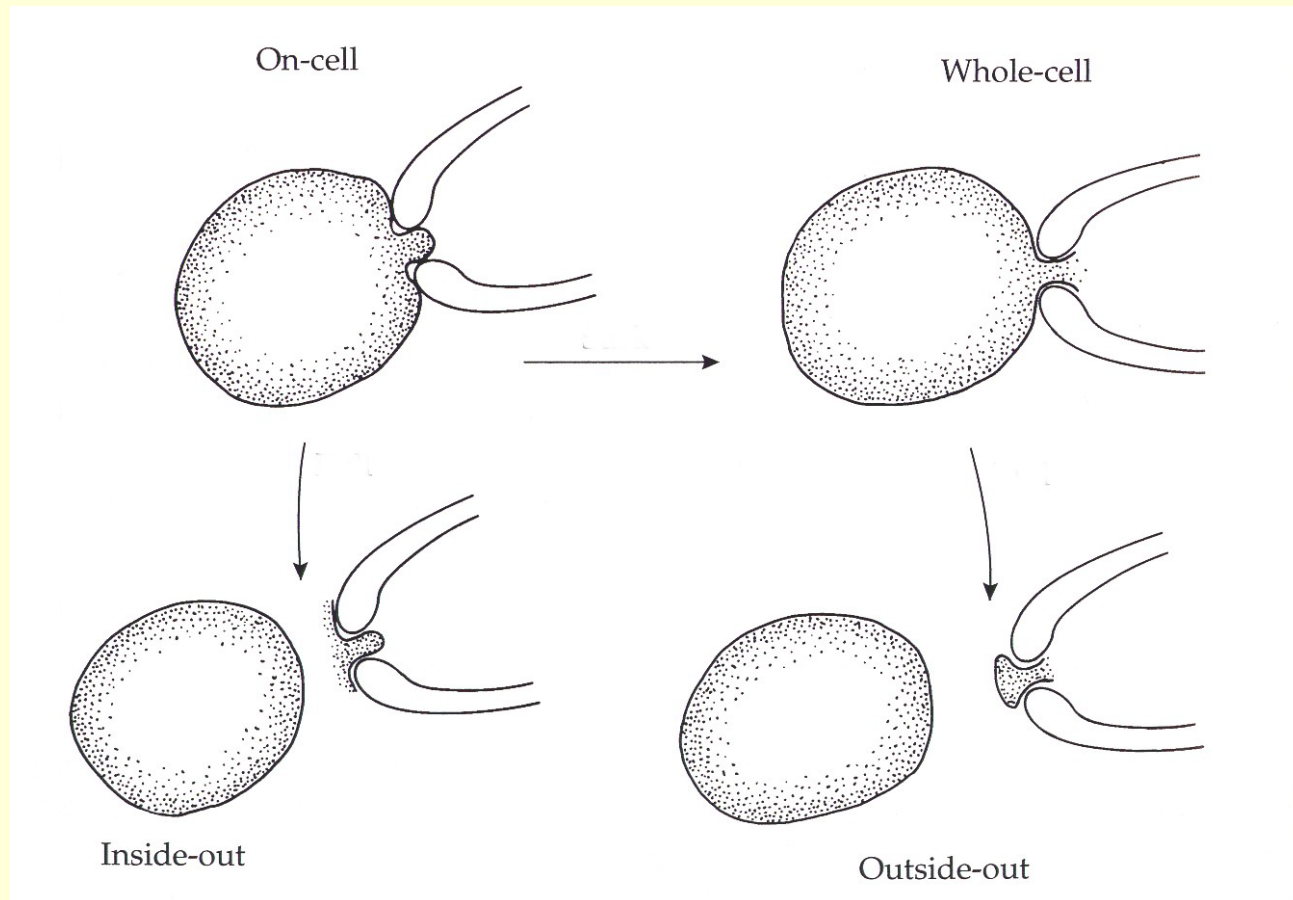
As modalidades do *patch-clamp*

1-encostar na célula e fazer sucção – alcance de resistência entre a membrana e pipeta de mais de 1 Gohm (Gigasele) – modo *on cell*.

-Puxar a pipeta (modo *inside-out*)

-No modo *on-cell* realizar mais sucção para entrar no modo *whole cell* (toda a membrana celular sob comando)

-No modo *Whole-cell* puxar a pipeta para entrar no modo *outside-out*



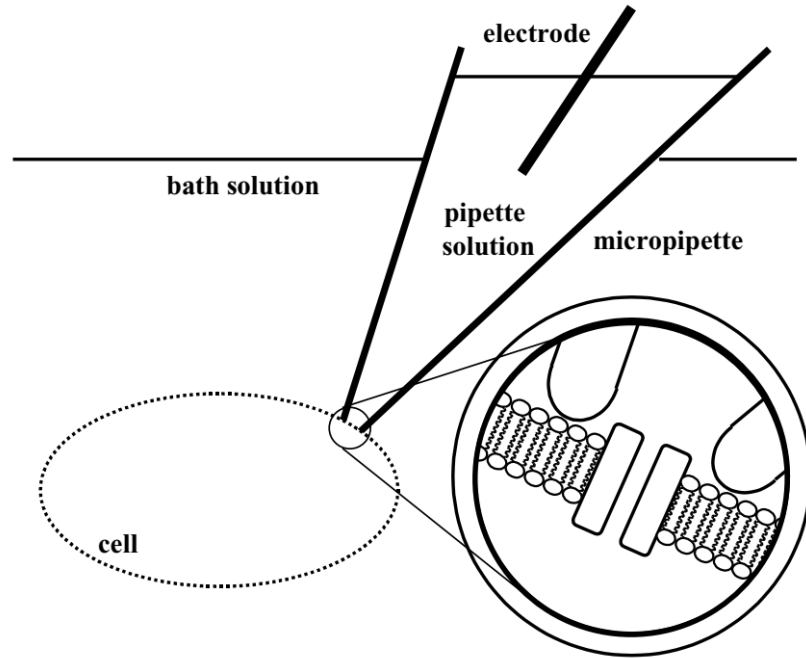


Figure 2.22 The cell-attached patch configuration

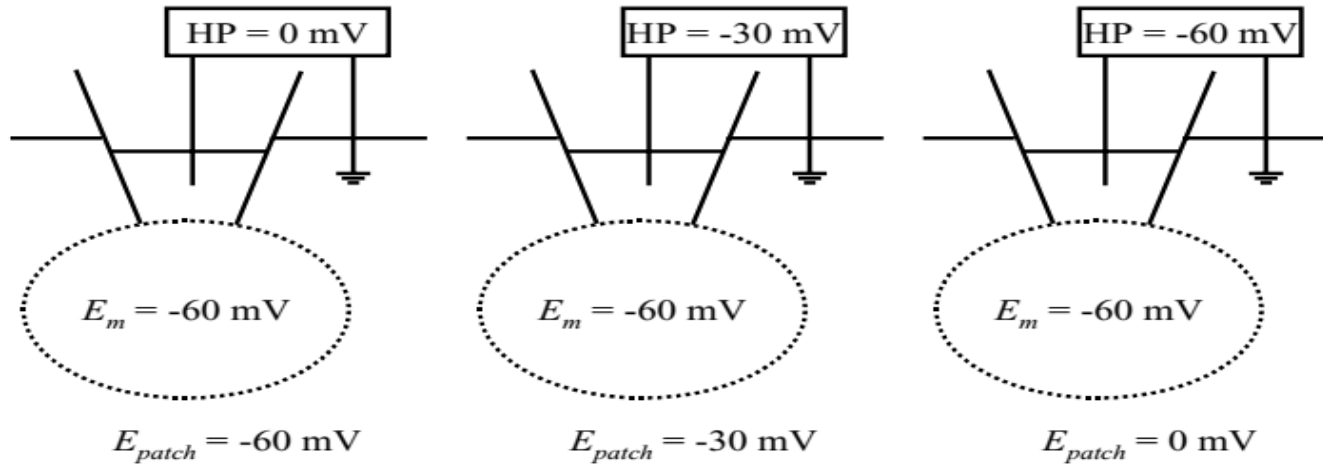
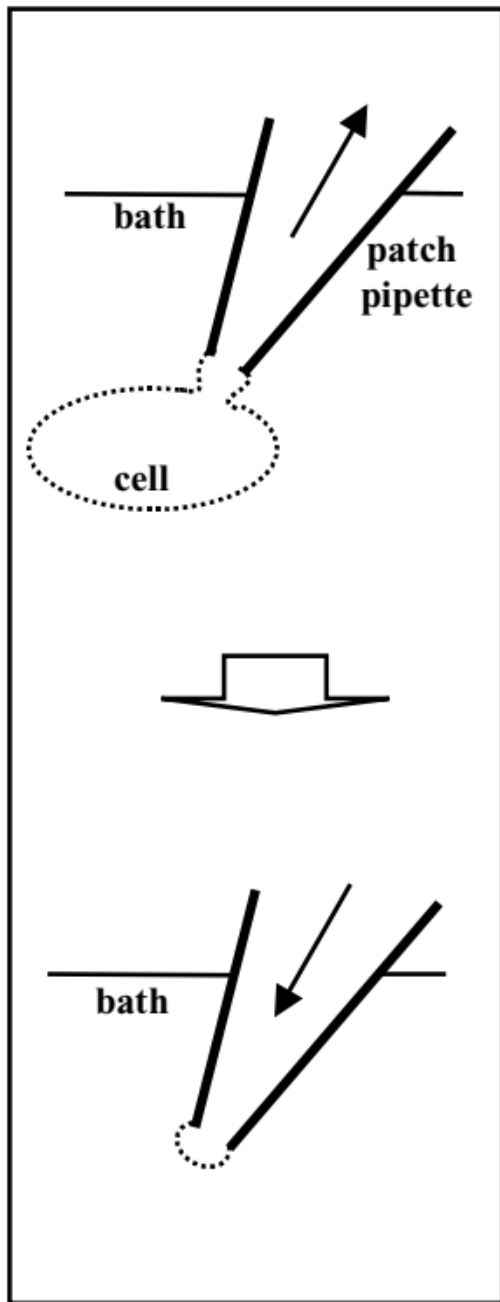
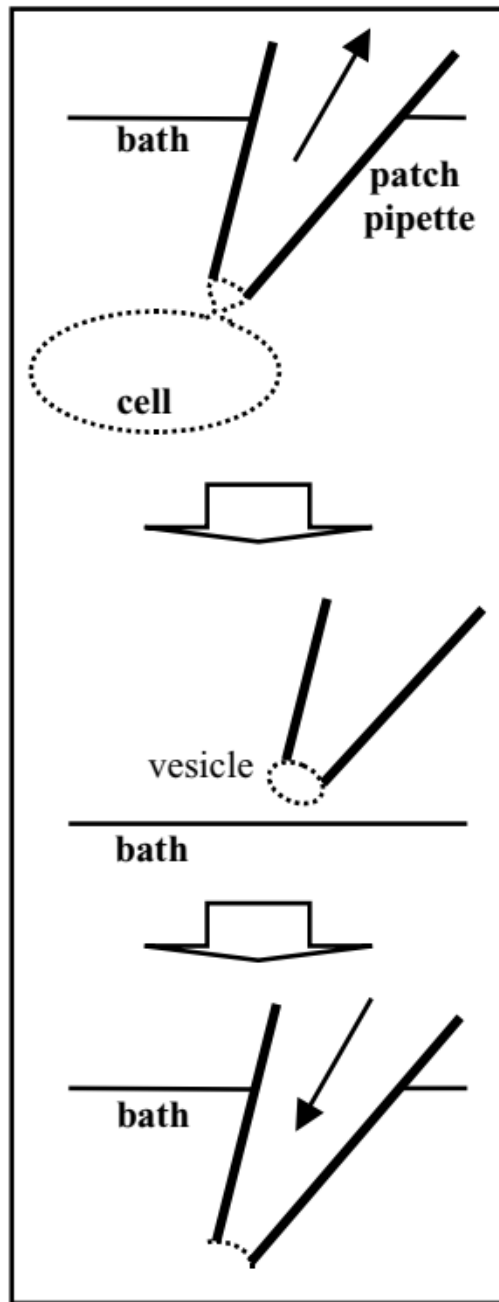


Figure 2.25 Voltage clamp in the cell-attached patch configuration. To obtain the actual potential over the patch, the command voltage (holding potential, HP) must be subtracted from the cell membrane potential

outside-out excised patch



inside-out excised patch



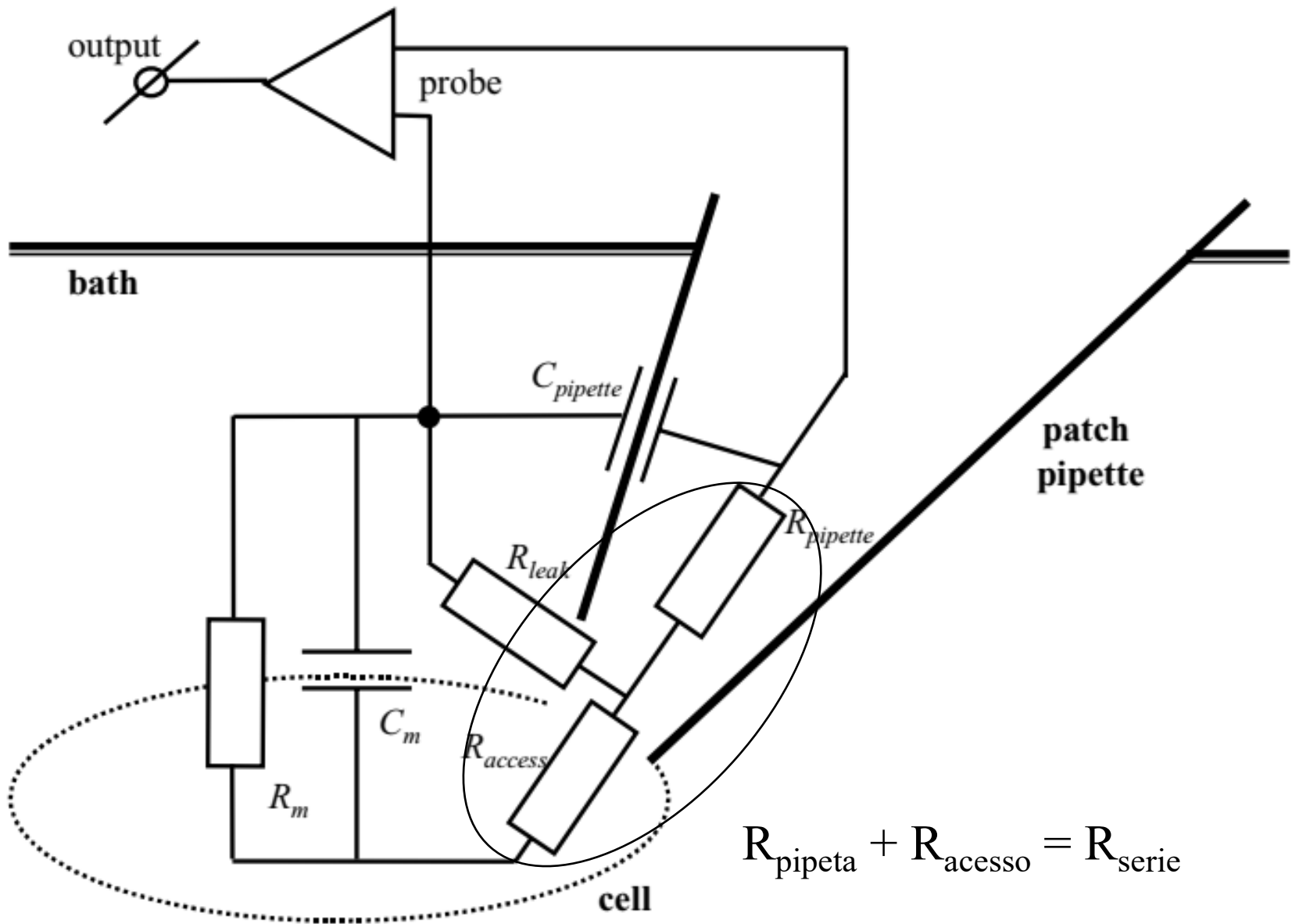
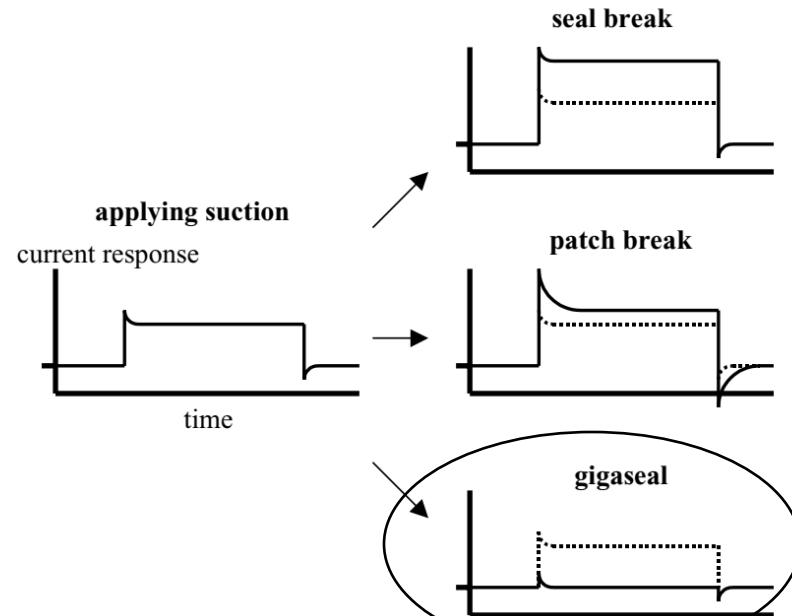
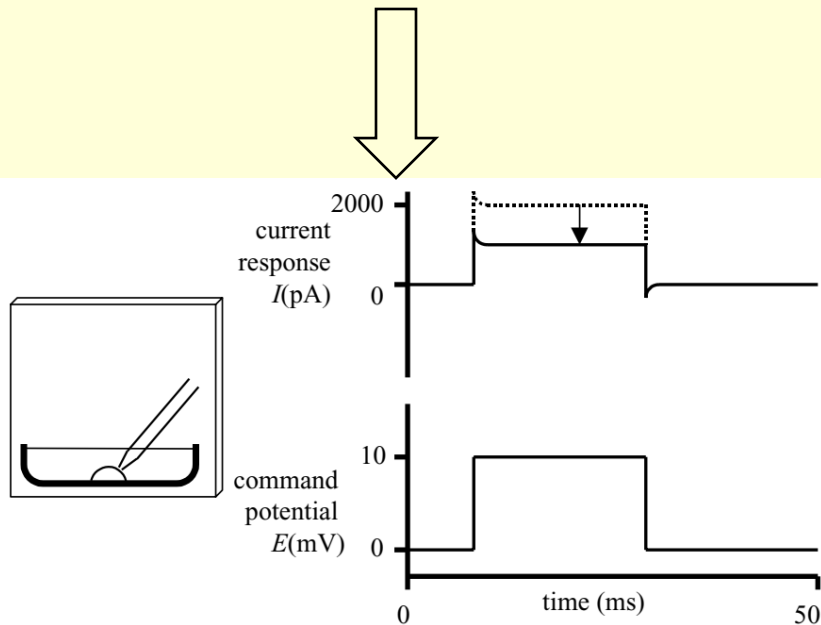
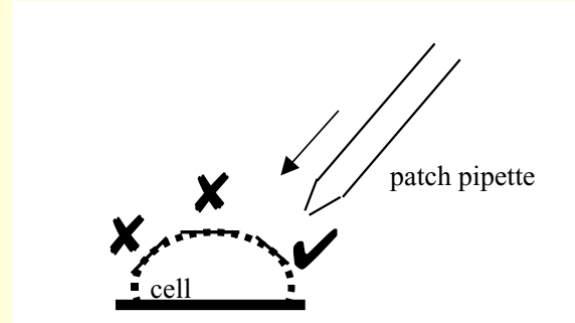
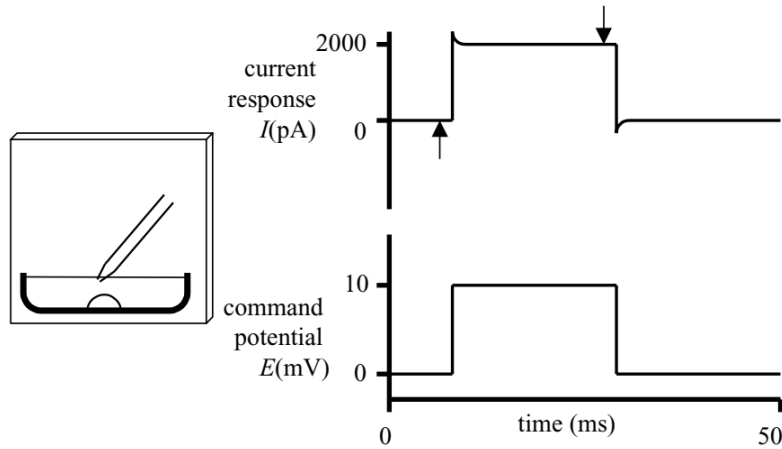
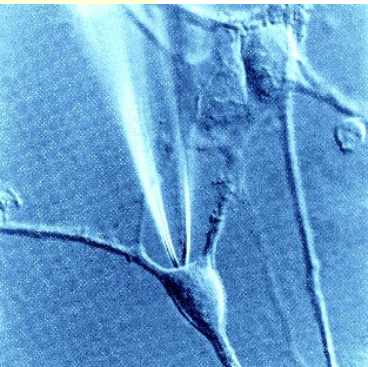
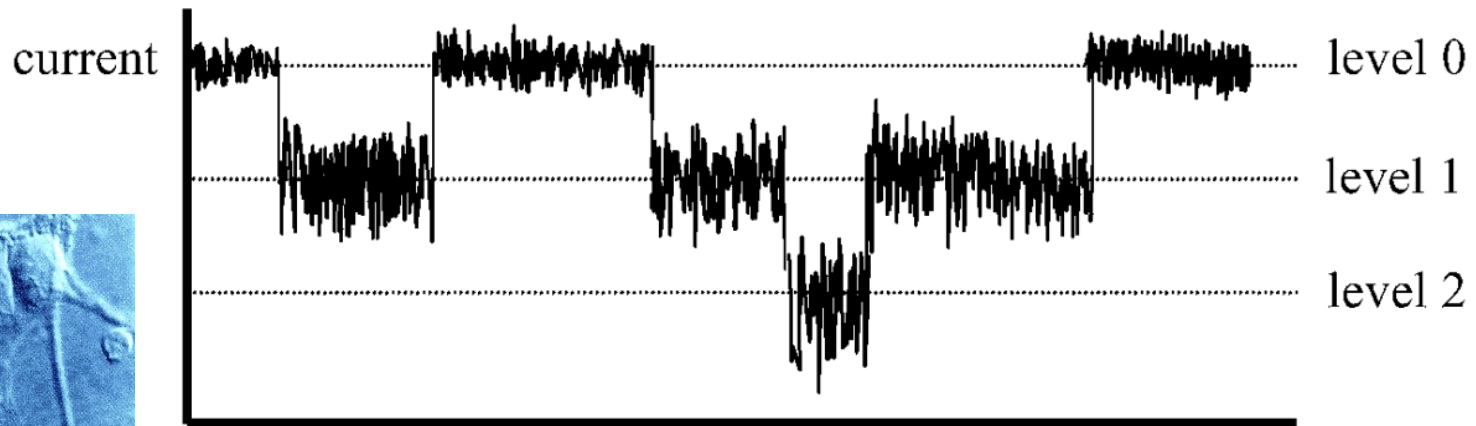
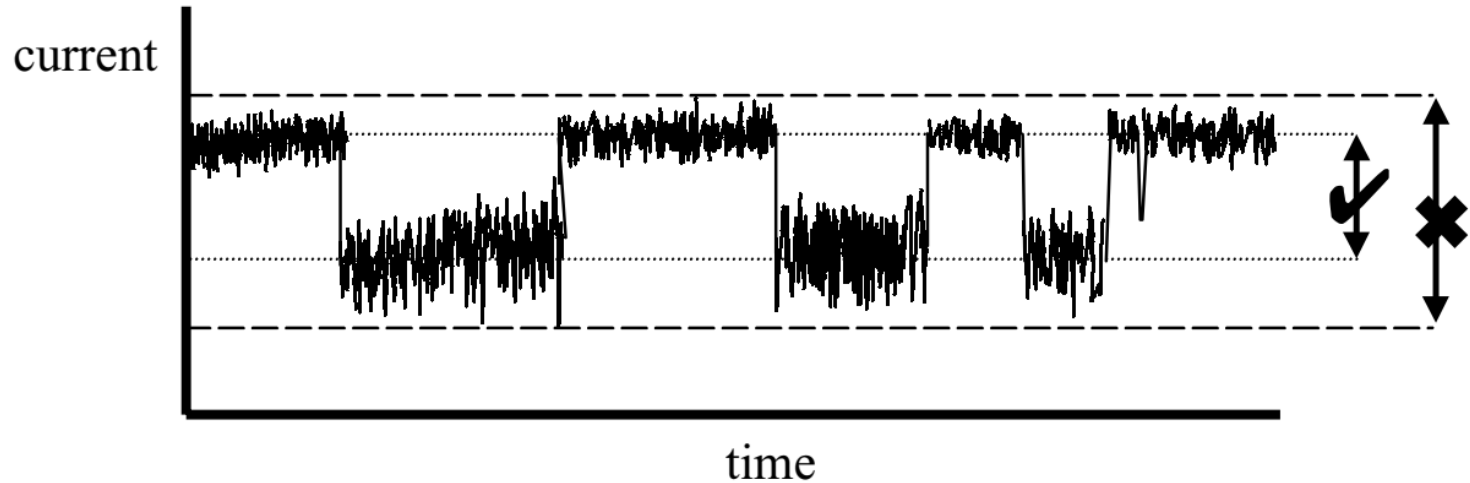


Figure 2.26 Equivalent circuit for the whole-cell configuration

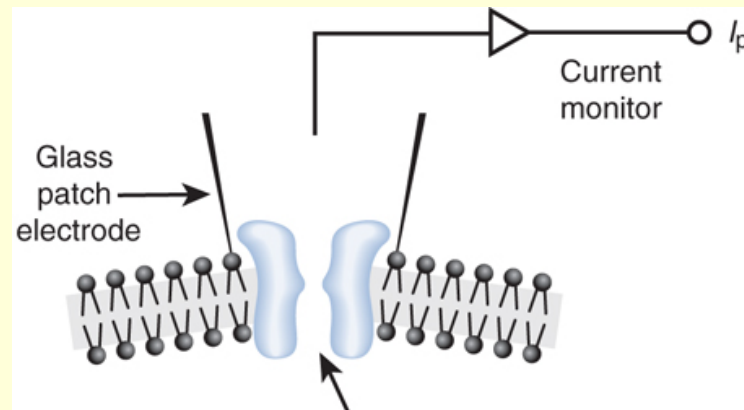
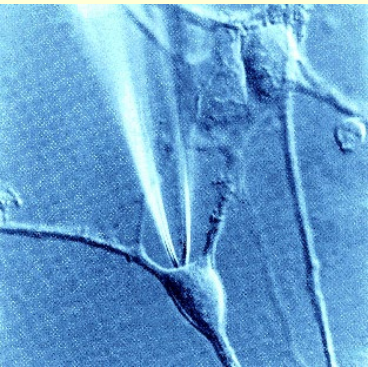
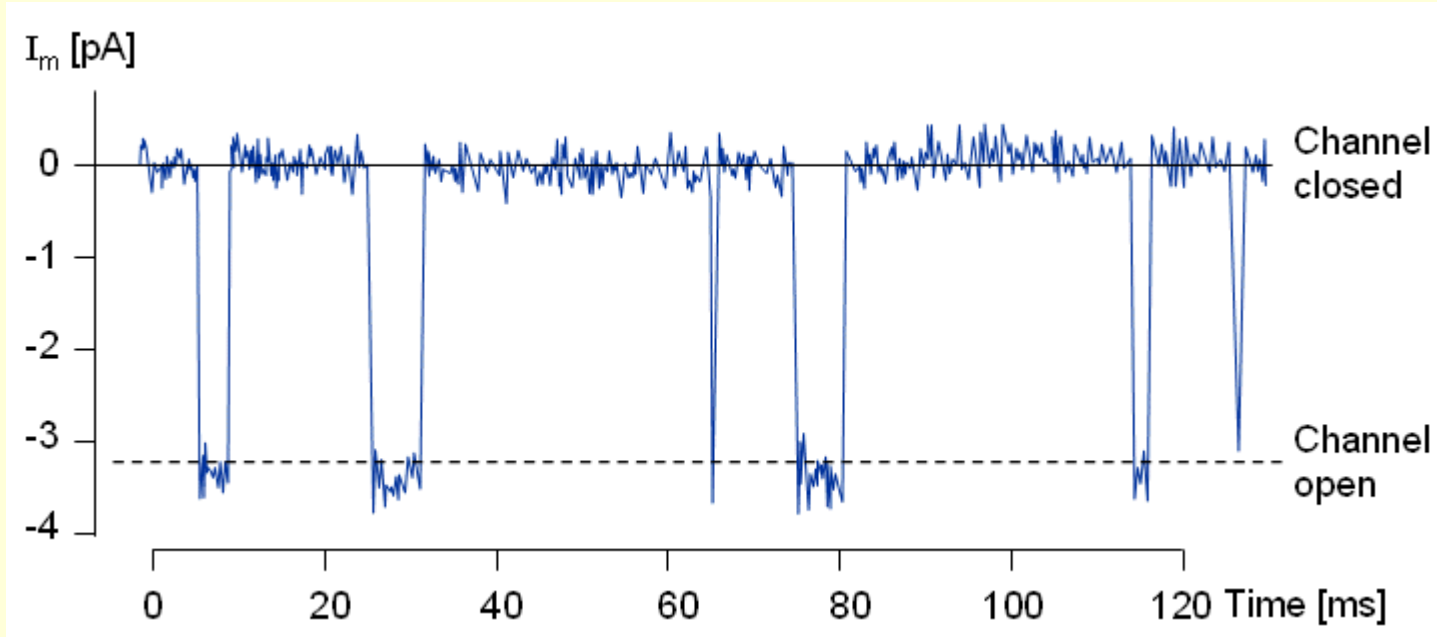
Estabelecimento do giga-selo e *Whole-cell*



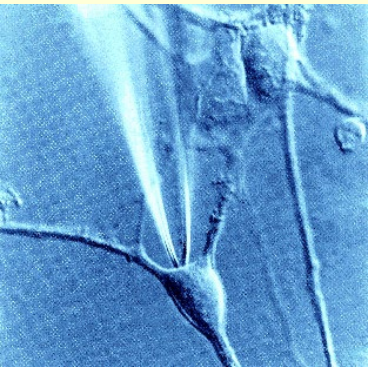
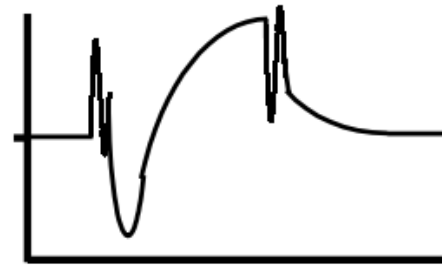
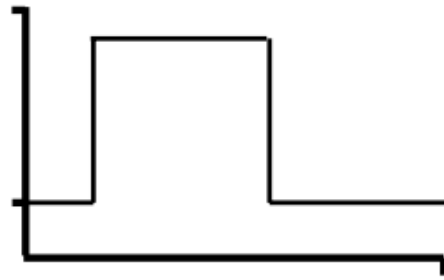
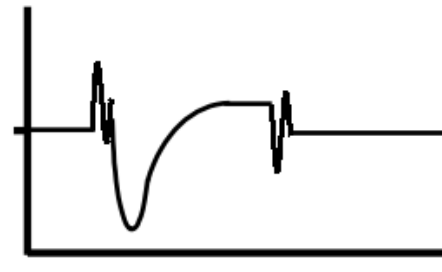
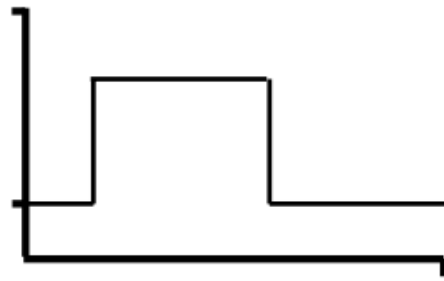
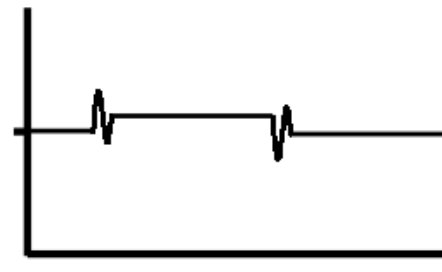
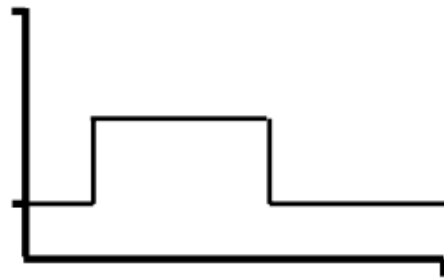
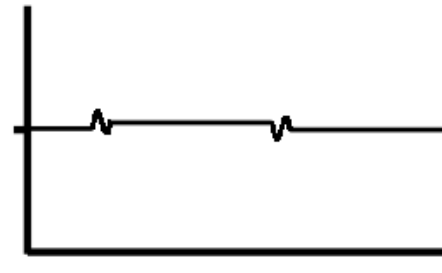
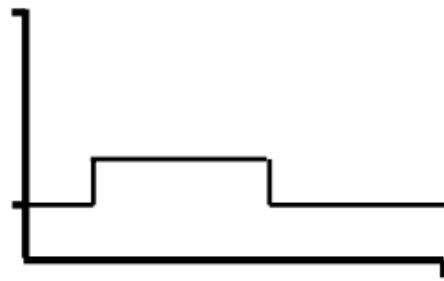
Correntes em *cell-attached*, *inside-out* e *outside-out* single channel



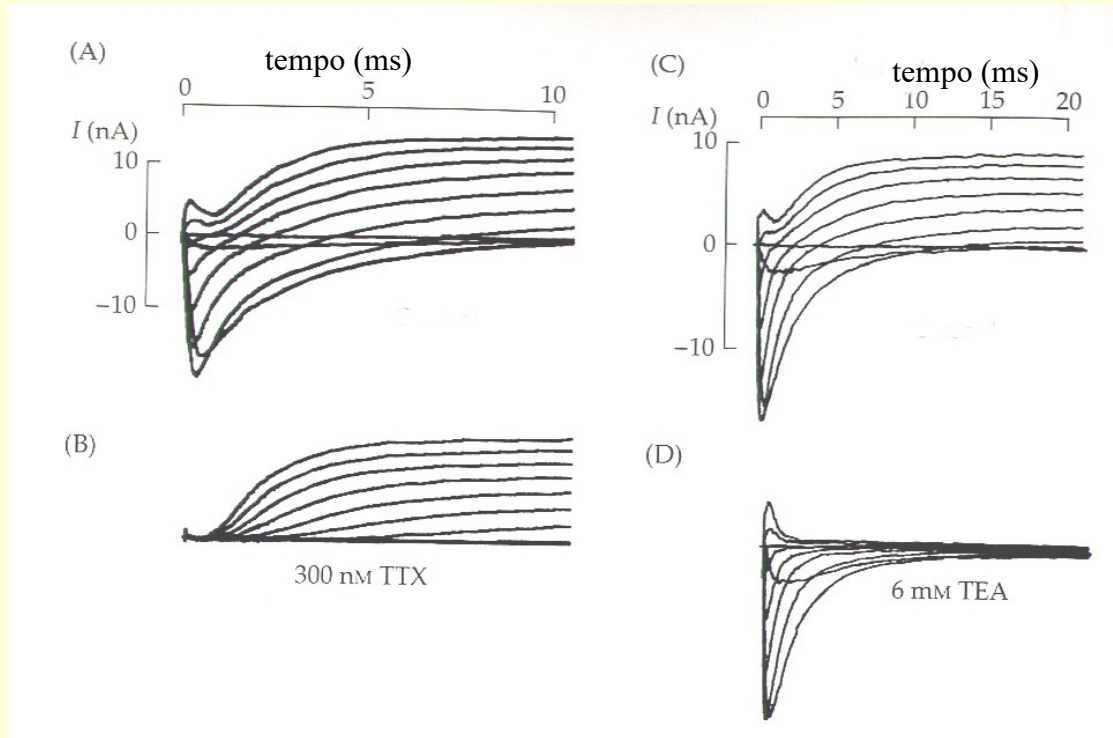
Single-channel recording



Correntes em *whole cell*



Isolamento farmacológico



bloqueadores de canais de sódio

tetrodotoxina, saixitoxina

bloqueadores de canais de potássio

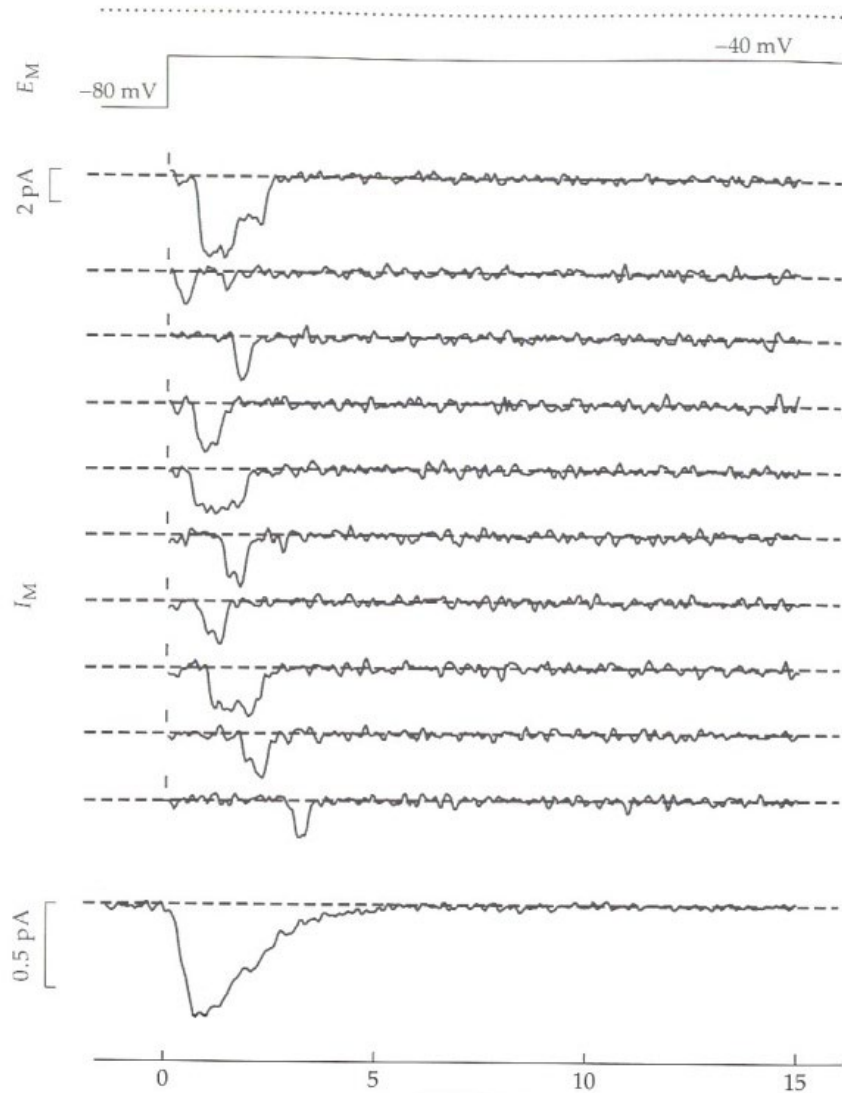
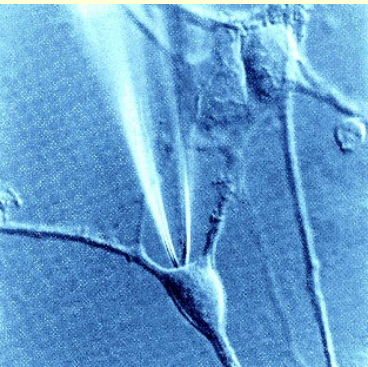
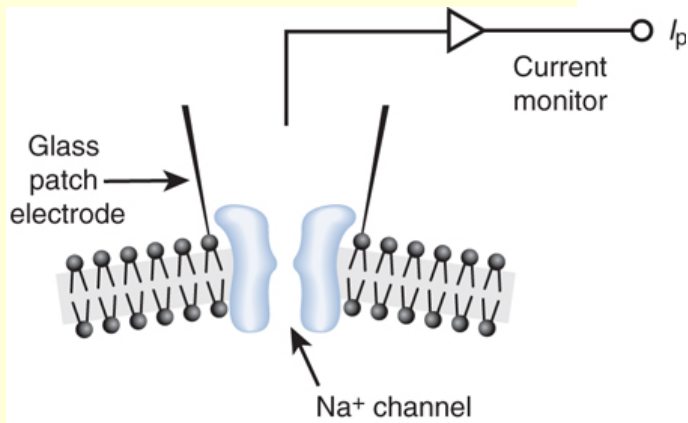
tetraetilamonio, céσιο (interno), 4-aminopiridina

bloqueadores de canais de cálcio

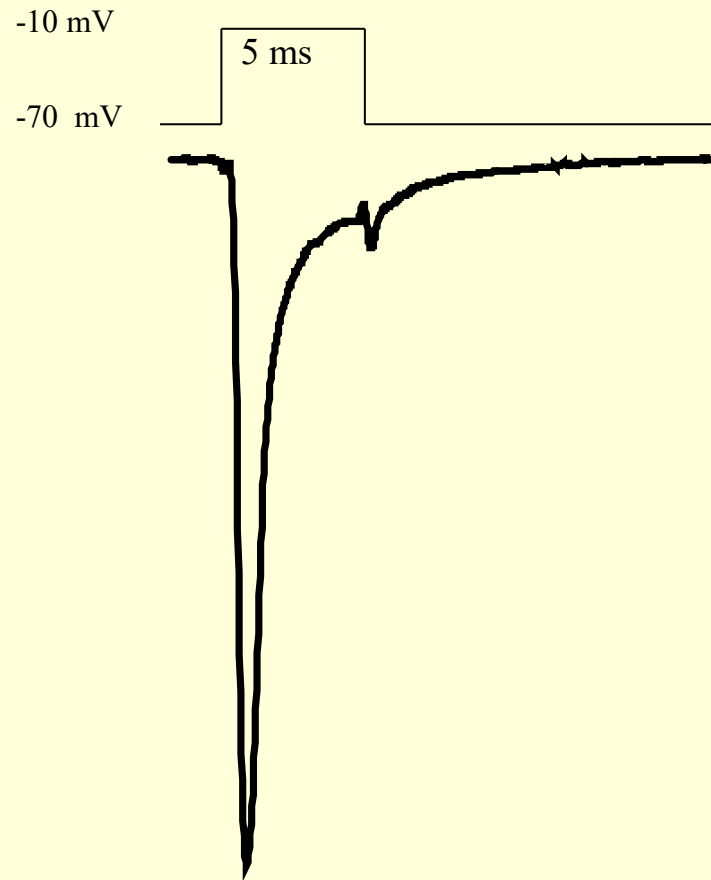
cádmio, cobalto, ω -conotoxinas, dihidropiridinas

A soma das correntes unitárias resulta em uma corrente semelhante a registrada em Whole-cell

Correntes de sódio unitárias



Correntes macroscópicas = *whole-cell*



Corrente de sódio macroscópica

