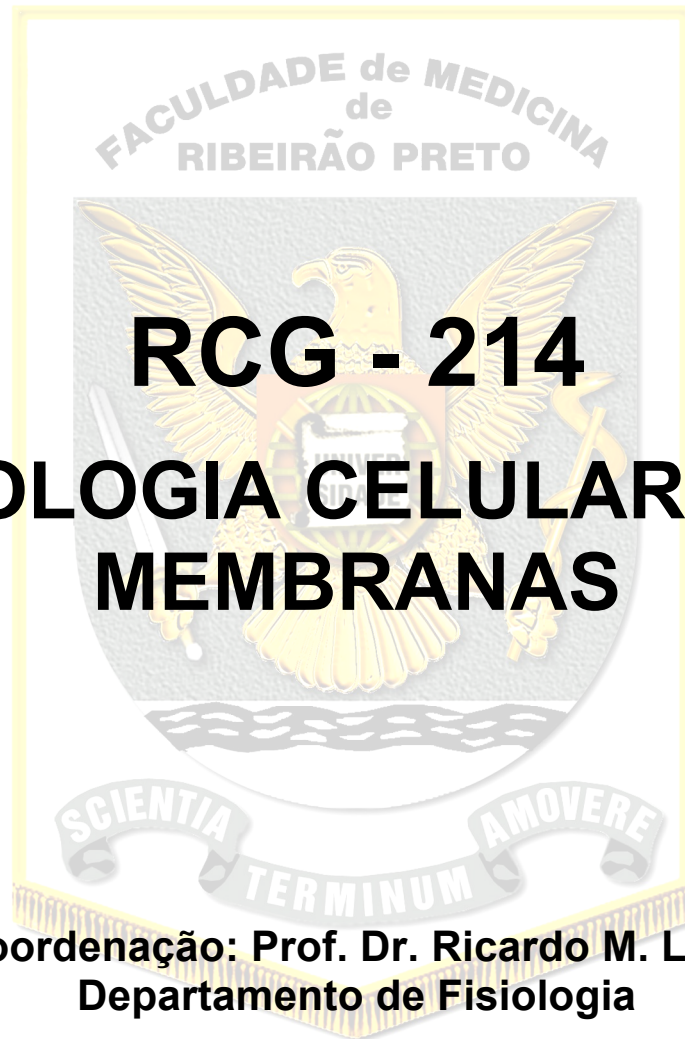


**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**



**RCG - 214**  
**FISIOLOGIA CELULAR E DE**  
**MEMBRANAS**

**Coordenação: Prof. Dr. Ricardo M. Leão  
Departamento de Fisiologia**

**2014**

## FISIOLOGIA CELULAR E DE MEMBRANAS - 2014

- 1- **Objetivos:** Este curso tem como objetivo central fornecer ao estudante os aspectos básicos do funcionamento da membrana celular, enquanto responsável por trocas de solutos e solvente entre os meios intra e extracelular e pela gênese da atividade elétrica celular. Além disso se estudará os processos de transdução do sinal elétrico em sinais químicos e mecânicos, no caso a secreção de neurotransmissores e a contração das fibras musculares
- 2- **Enfoque de Ensino:** O enfoque do curso será nos aspectos biofísicos e bioquímicos da fisiologia celular relacionado aos tópicos do curso.
- 3- **Pré-requisitos:** Os seguintes pontos deverão ter sido abordados em outras unidades:
  - 1) Lipídios e sua estruturação numa bicamada. Tipos; cargas; fluidez; etc..
  - 2) Visão morfológica da membrana celular: “freeze fracture”: modelos, etc..
  - 3) Proteínas: estruturação; mudanças conformacionais, etc..

### PARTE I – BIOFÍSICA E ELETROFISIOLOGIA DE CÉLULAS PROGRAMA TEÓRICO

O programa que segue refere-se somente a parte 4.1, as demais deverão ser publicadas pelos respectivos docentes. Os tópicos listados abaixo tem o propósito de ressaltar ao estudante os pontos essenciais que serão abordados durante o curso e que dele serão exigidos.

- 1- **Introdução ao curso:** estruturação; justificação; histórico
- 2- **Difusão de substâncias em meio homogêneo**
  - 2.1. A água como solvente biológico: origens da polaridade
  - 2.2. Íons em solução: água de hidratação
  - 2.3. Movimentação de partículas em solução: movimento browniano; distância média de difusão ( $d_{rms}$ )
  - 2.4. Difusão: coeficiente de difusão.
  - 2.5. Equilíbrio e estado estacionário.
  - 2.6. Potencial químico e eletroquímico.
- 3- **Fluxos através de membranas**
  - 3.1. Conceito de fluxo: unidirecional e resultante
  - 3.2. Coeficiente de partição
  - 3.3. Difusão: Lei de Fick, Permeabilidade
  - 3.5. Vias de permeação através de Membranas Biológicas: Canais, Carregadores e Bombas
  - 3.6. Canais iônicos
  - 3.7. Patologias associadas a canais iônicos

#### 4- Transporte de água

- 4.1 Permeabilidade da membrana à água: aquaporinas
- 4.2. Osmose e pressão osmótica
- 4.3. Osmolaridade
- 4.4. Coeficiente de reflexão
- 4.5. Equilíbrio de Donnan

#### 5 -Ions e Potencial de Membrana

- 5.1. Todas as células apresentem uma diferença de potencial elétrico através da membrana: constatação do fato
- 5.2 Conceitos básicos de eletricidade: potencial, corrente, capacitância:
- 5.3 O modelo elétrico da célula: íons em solução carregam corrente.
  - 5.3.1 Definição de despolarização e hiperpolarização da membrana: correntes de entrada e de saída
- 5.4. Lei de Ohm: definição de corrente elétrica, potencial elétrico e condutância (resistência). Gráfico IxV.
- 5.5 Gradientes iônicos e diferença de potencial elétrico: geração do potencial de equilíbrio eletroquímico - Eletroneutralidade de soluções iônicas:
- 5.6 Equilíbrio eletroquímico de um íon individual: A equação de Nernst.
- 5.7 Conceito de Força eletromotriz gerando a corrente iônica
  - 5.7.1 Potencial de reversão da corrente: polaridade da corrente
- 5.8 O potencial de repouso como o equilíbrio do fluxo de íons através da membrana
  - 5.8.1 A equação de condutância de corda.
  - 5.8.2 A equação de Goldman, Hodgkin e Katz: relacionando as permeabilidades iônicas
- 5.9 Alterando o potencial da membrana
  - 5.9.1 Alterando a condutância específica dos íons
  - 5.9.2 A importância da manutenção dos gradientes iônicos

#### 7. Propriedades Elétricas Passivas da Membrana Celular

- 7.1. Condutância e capacitância da membrana
- 7.2. O axônio como cabo – propriedades dependentes de tempo e espaço.
- 7.3. Transmissão passiva da informação elétrica.

#### 8. Bases Iônicas do Potencial de Ação

- 8.1. Potenciais extracelulares: registro superficial do nervo
- 8.2. Potencial de ação numa célula – medida intracelular
- 8.3. Excitabilidade dependente de voltagem
- 8.4. Limiar de disparo tudo ou nada.
- 8.5. Períodos refratários
- 8.6. Correntes iônicas envolvidas no potencial de ação – dissecação farmacológica
- 8.7. Condutâncias dependentes de voltagem- a técnica de “voltage clamp”.
- 8.8. Canais iônicos dependentes de voltagem – ativação e inativação
- 8.9. Condução do impulso nervoso – axônios mielinizados e amielínicos.

## 9. Canais iônicos e receptores.

- 9.1. Estrutura molecular dos canais iônicos.
- 9.2. Seletividade iônica: filtros de seletividade.
- 9.3. Modelos cinéticos do funcionamento dos canais iônicos.
- 9.4. Ativação de canais iônicos (*gating*): sensibilidade a potencial, ligantes e tensão.
- 9.5. Fechamento, inativação e dessensibilização dos canais e receptores.
- 9.6. Receptores metabotrópicos.
  - 9.6.1. Estrutura e função dos receptores ligados a proteínas G.
- 9.7. Drogas e toxinas que afetam os canais e receptores.
- 9.8. Patologias relacionadas a canais iônicos.

## 10. Comunicação entre Células

- 10.1. Definição de sinapse: lados pré- e pós-sináptico.
- 10.2. Terminais sinápticos: botão sináptico; sinapse em fita; junção neuromuscular
- 10.3 Neurotransmissores
- 10.4. Vesículas sinápticas
  - 10.4.1- Proteínas relacionadas a exocitose
  - 10.4.2-Mecanismos de exocitose vesicular; toxinas que afetam a exocitose
  - 10.4.3-Endocitose e reciclagem das vesículas
  - 10.4.3-Pools vesiculares
- 10.5. Potenciais e correntes pós-sinápticas excitatórias e inibitórias: bases iônicas
- 10.6. Somação e integração sináptica
- 10.7. Interação entre sinapses: Circuitos neurais locais.
- 10.8. Plasticidade sináptica à curto prazo: depressão e facilitação.
- 10.9. Plasticidade sináptica à longo prazo: potenciação a longo prazo
- 10.10. Neurotransmissão eletrotônica: conexinas

## 11. Contração Muscular: Acoplamento Excitação-Contração

- 11.1. A placa motora.
- 11.2 A unidade motora
- 11.3. O sarcômero.
- 11.4 As proteínas sarcoméricas
- 11.5 A formação da ponte cruzada: o ciclo do ATP.
- 11.6. O controle da formação da ponte cruzada pelo cálcio.
- 11.7. A liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático: o receptor de rianodina.
- 11.8. Acoplamento excitação-contração: Túbulos T e potencial de membrana
- 11.9. A triade – transmissão do impulso elétrico ao retículo sarcoplasmático: o canal de cálcio muscular como sensor de voltagem.
- 11.10. Recaptação do cálcio pela SERCA-ATPase.
- 11.11. O receptor de rianodina
- 11.12 Acoplamento químico no músculo estriado cardíaco.
- 11.13. Tipos de fibras musculares lisas
- 11.14. Tipos de contração da musculatura lisa.
- 11.15. Mecanismos de aumento do cálcio intracelular na musculatura lisa.
- 11.16. Acoplamento excitação-contração na musculatura lisa.
- 11.17. Contração tônica da musculatura lisa.

## 11 - Bibliografia Básica

Os livros aqui citados possuem capítulos de interesse para essa parte do curso

- **Fisiologia** – ed. Berne and Levy – Elsevier Editora LTDA – 2004. Texto básico traduzido de edição americana. Aborda de forma clara e concisa os tópicos do curso.
- **Fisiologia** –ed. Mello Aires, M. - 3ª edição – Guanabara Koogan – 2008 – Livro de autores nacionais. Contém um detalhamento biofísico maior do conteúdo do curso.
- **Princípios da Neurociência** – Kandel – 4ª Edição – Manole – 2002 – Livro de neurociência que aborda nas partes I e II a maior parte do conteúdo da disciplina, com um enfoque em neurofisiologia.

Em Inglês

-**Cellular Physiology and Neurophysiology** – Blaustein, Kao and Matteson – 2nd edition. Elsevier - 2012. Livro compacto que explica em detalhes o conteúdo do curso.

-**Cell Physiology Sourcebook** – ed. Sperelakis – 4th edition. Academic Press – 2012. Livro completo sobre Fisiologia Celular.

## 12 - Sites que contém material relacionado ao curso: -

Os sítios aqui relacionados podem ser utilizados para estudo, porém estão em inglês.

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/mempot.html> - tutoriais contendo o conteúdo da disciplina

<http://nerve.bsd.uchicago.edu/> - vários simuladores de difusão, canais iônicos, bioeletrogênese e excitabilidade

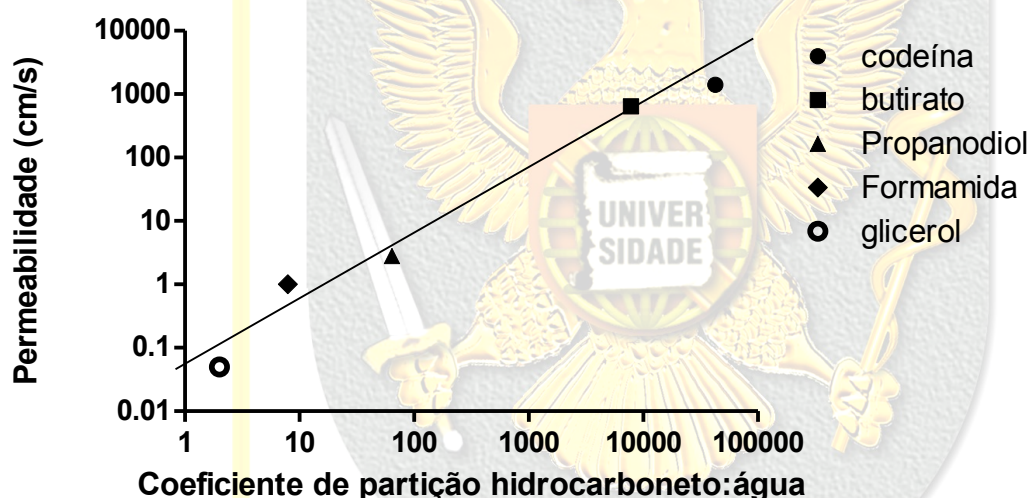
<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;2004/264/re19/DC2>- animação da exocitose e endocitose vesicular

## 13 – Algumas constantes que poderão ser utilizadas para resolução de problemas:

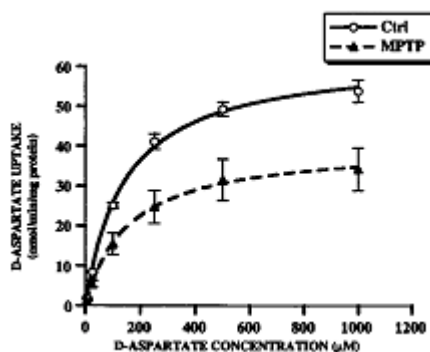
- constante dos gases (R) –  $8,31 \text{ j} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$
- Número de Avogadro (N) –  $6,02 \times 10^{23}$
- Constante de Faraday (F) – 96500 coulomb/equivalente
-

### Questões para o seminário sobre Transporte e Bioeletrogênese

- As concentrações de cloreto dentro e fora de uma célula muscular esquelética são 3,5 e 110 mM, respectivamente.
  - Calcule qual deve ser a energia necessária para transportar 1 mol desse ion de dentro para fora da célula e de fora para dentro. Comente seus cálculos.
  - Assuma, agora, que exista através da membrana celular uma diferença de potencial elétrico igual a -88 mV, lado interno negativo. Recalcule a energia envolvida no transporte desse ion de dentro para fora e de fora para dentro da célula. Comente seus achados.  
Utilize temperatura igual a 22 °C em ambos os casos.
- Na figura abaixo tem-se a permeabilidade de uma membrana artificial de lectina a diversos compostos orgânicos (dados obtidos de Orbach e Finkelstein, *J Gen Physiol* 75, 1980)

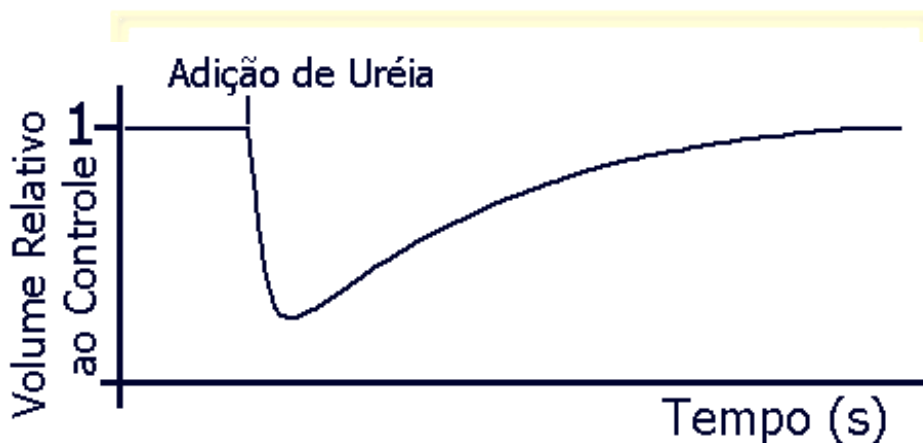


- Explique a relação entre o coeficiente de partição da molécula e a permeabilidade através da membrana.
  - Esses experimentos foram realizados a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Como o gráfico mudaria se a temperatura fosse alterada para 10°C e 40°C? Explique.
- A figura abaixo (extraído de Hazell et al., *J Neurochem* 68, 1997) mostra o efeito da substância neurotóxica MPTP sobre o transporte de aspartato em células gliais em cultura



A partir dos dados do gráfico responda:

- a) Como o aspartato atravessa a membrana? Explique.
  - b) Proponha mecanismos para a ação inibitória do MPTP sobre o transporte de aspartato.
- 4) Suponha um experimento onde glóbulos vermelhos foram colocados nas seguintes soluções:
- 3.1 300 mM de sacarose e permaneceram com o volume intacto.
  - 3.2. 300 mM de sacarose e após algum tempo adicionou-se 200 mM de uréia. O resultado foi o mostrado abaixo:



3.3. 400 mM de uréia e estouraram.

Discuta:

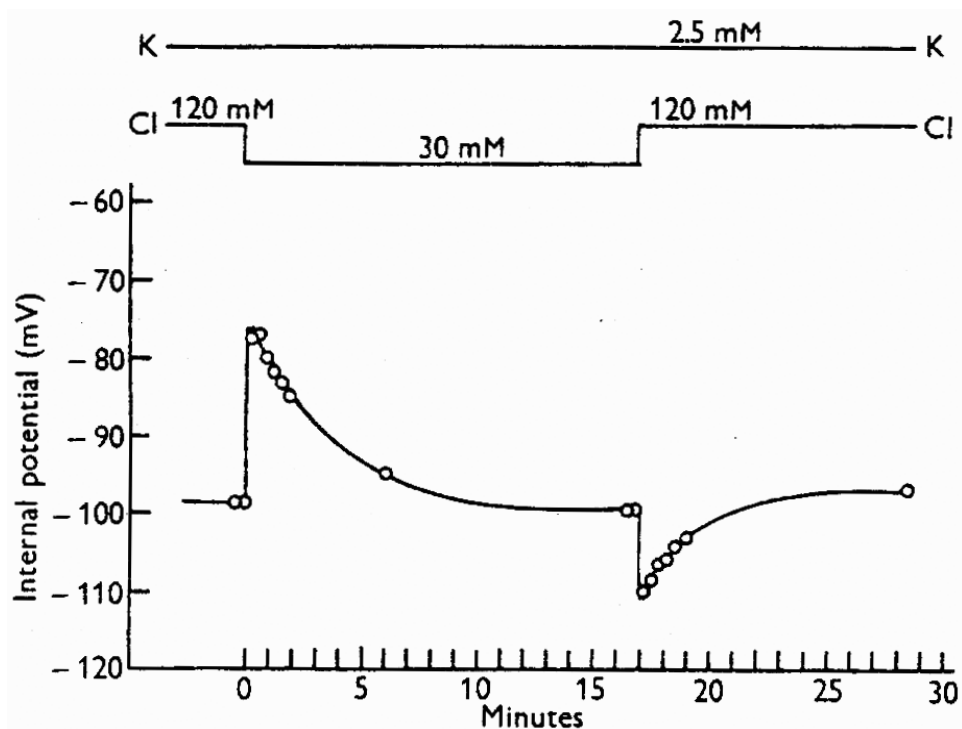
- a) Classifique essas soluções quanto a osmolaridade e tonicidade.
- b) Por que no item 4.2 o volume das hemácias retornou ao valor inicial? O que isto indica?
- c) Qual a osmolaridade plasmática? Que substância é a principal responsável por ela?
- d) Qual o  $\sigma$  (coeficiente de reflexão) da sacarose? E da uréia?

5) A tabela abaixo mostra valores de concentração de cátions e ânions difusíveis e de proteínas no plasma e no líquido intersticial. Calcule quais deverão ser as concentrações de cátions e ânions difusíveis no interstício. Comente seus cálculos e os resultados encontrados.

**Nota:**  $ax^2 + bx + c = 0$ ;  $x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$

	Plasma (mM)	Interstício (mM)
Proteinato	17,0	4,0
Cátions difusíveis	161,0	?
Anions difusíveis	144,0	?

- 6) A figura abaixo foi retirada de um trabalho de Hodgkin e Horowitz (1959). Trata-se da investigação, por técnicas eletrofisiológicas, da origem do potencial de repouso e das permeabilidades iônicas da membrana celular de músculo semitendinoso de rã.

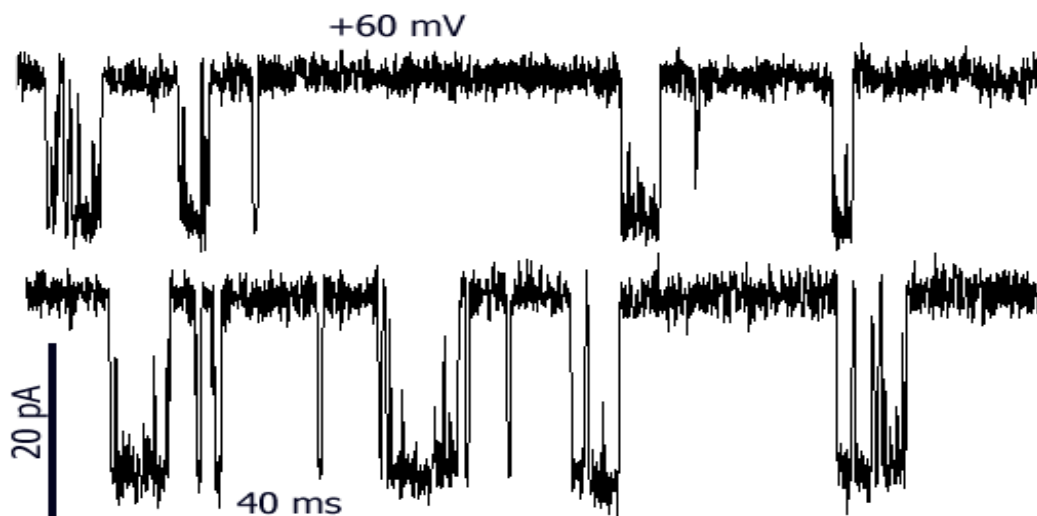


Em solução de Ringer (solução idêntica ao plasma na composição em eletrólitos) o potencial de repouso é de -98 mV. Nestas condições o potencial de membrana ( $V_m$ ) é igual ao potencial de equilíbrio para o cloreto ( $E_{Cl}$ ). Quando a solução de Ringer é instantaneamente trocada por uma outra com menor concentração de Cl (30 mM) e idêntica quanto aos demais íons, observa-se uma rápida despolarização da membrana, seguida de repolarização. Ao se retornar à solução de Ringer tem-se um traçado que é praticamente uma imagem especular do anterior. Discuta:

- As variações do potencial de repouso que se observam nas mudanças súbitas de concentração do Cl no meio extracelular. Pode-se concluir que a membrana é permeável ao cloreto? Por que? Explique a repolarização que se observa ao se manter a fibra muscular na solução de baixa concentração de Cl.
- Para um dado valor estável do potencial de repouso, se você pretendesse calcular o potencial de repouso pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz, sabendo as concentrações dos íons e suas permeabilidades, você consideraria o cloreto na equação? E nos transientes?



- 7) A figura abaixo mostra registros temporais da corrente iônica que passa por um único canal de potássio ativado por cálcio, observado em células de Leydig, a um potencial de +60mV (lado intracelular do canal positivo) e com concentrações de  $K^+$  iguais em ambos os lados.



Deflexões para cima significam corrente passando pelo canal.

- Estime a condutância do canal.
  - Analise as oscilações de corrente. Explique-as. Qual o significado dessas oscilações para a condutância da membrana celular, que contém milhares desses canais por micrômetro quadrado?
  - Que argumentos você usaria a favor do canal e contra a difusão facilitada neste caso?
- 8) Os dados abaixo foram extraídos do trabalho de Hodgkin e Horowics (1959) onde foram medidas as diferenças de potencial elétrico, através da membrana celular do músculo semitendinoso da rã, em várias condições de composição iônica da solução externa.

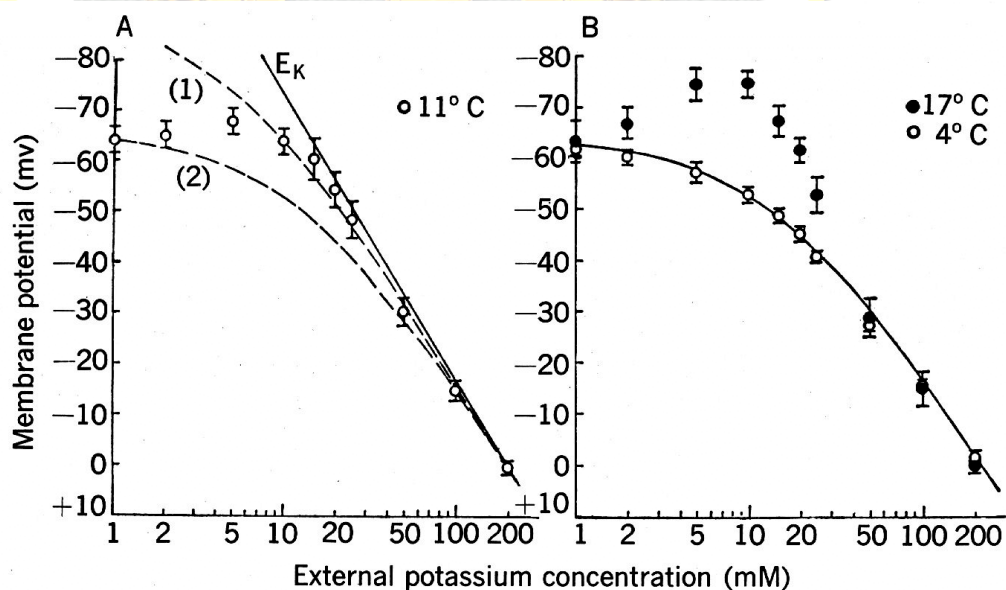
$K_O$ (mM)	D.P. da Membrana (mV)
0,5	-117,0
1,0	-109,0
2,5	-94,0
5,0	-80,0
5,0	-80,0
10,0	-65,0
30,0	-38,0
80,0	-14,0

onde:  $K_O$  = concentração de  $K^+$  na solução banhante; D.P. = diferença de potencial elétrico através da membrana, sinal refere-se ao intracelular. A fim de manter a eletroneutralidade das

soluções as mesmas continham outros ions que não interessam ao problema. Sacarose foi usada para se manter a osmolaridade.

Com base nos dados analise as seguintes questões:

- Coloque em gráfico o valor da DP medida contra o log da concentração externa de  $K^+$ . Que conclusão você pode tirar deste achado? Explique.
  - Que tipo de equação descreveria os dados em sua totalidade?
  - Trace, sobre os pontos, a linha esperada considerando-se que a função fosse descrita pela equação de Nernst. Por que os pontos iniciais fogem dessa linha? Explique.
- 9) Os resultados mostrados nos gráficos que seguem, foram obtidos em neurônios de moluscos com a finalidade de entender-se os fatores determinantes do potencial de repouso. Foram feitas determinações do mesmo, com microeletrodos, em função da concentração externa de  $K^+$  em diversas temperaturas. Leia com atenção a legenda das figuras.

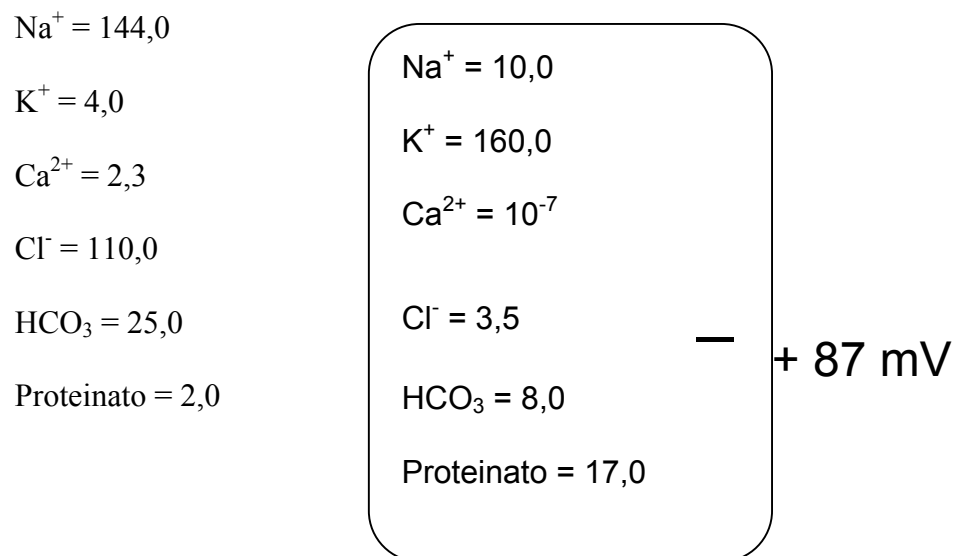


**Potencial de repouso dependente de  $[K]_o$  em neurônios de moluscos. A, os potenciais de repouso medidos a 11°C se afastam do potencial de equilíbrio do potássio ( $E_K$ ) exceto para  $[K]_o$  elevados. As linhas 1 e 2, dadas pela equação GHK, para dois valores de  $P_{Na}/P_K$ , também se afastam dos pontos experimentais. B, A 4° C, mas não a 17° C, a linha dada pela equação do campo constante se ajusta aos pontos assumindo-se  $P_{Na}/P_K = 0.033$ :  $[K]_i = 235$  mM.  $P_{Na}$  = permeabilidade a sódio e  $P_K$  = permeabilidade a potássio.**

Discuta:

- Que fenômeno dependente de temperatura estaria desviando a resposta da membrana do modelo GHK?

10) O esquema abaixo representa uma célula com as concentrações intra e extracelulares dos principais íons indicadas em mEq/l.



Considerando-se que as concentrações de proteína dentro e fora da célula são diferentes e, que as mesmas não permeiam a membrana celular, seria de se esperar um movimento resultante de água para o interior celular (inchamento), o que poderia levar a um rompimento da membrana.

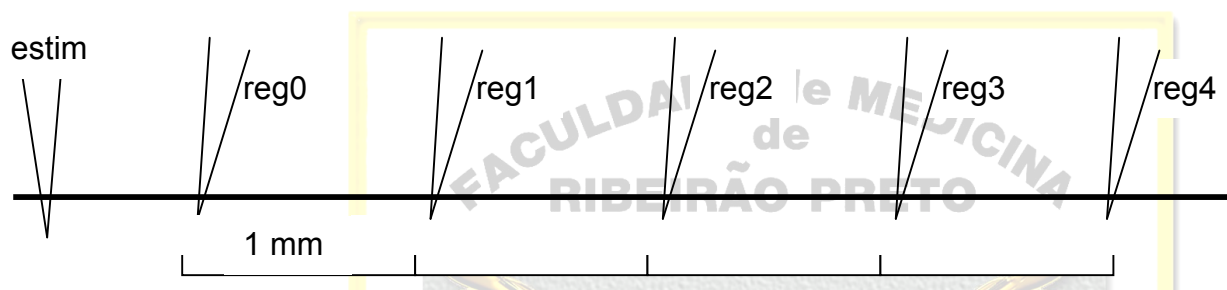
a) Qual é o nome desse fenômeno?

b) Qual o mecanismo desenvolvido pela célula que lhe permite regular seu volume e, portanto, não estourar?

## Fisiologia de Membranas – RCG-213

### Questões para o seminário sobre Excitabilidade Celular

1 – Suponha um experimento onde o axônio gigante da lula é impalado com uma série de microeletrodos, para injeção de corrente (estim) e para registro de voltagem (reg), como mostrado na figura abaixo.

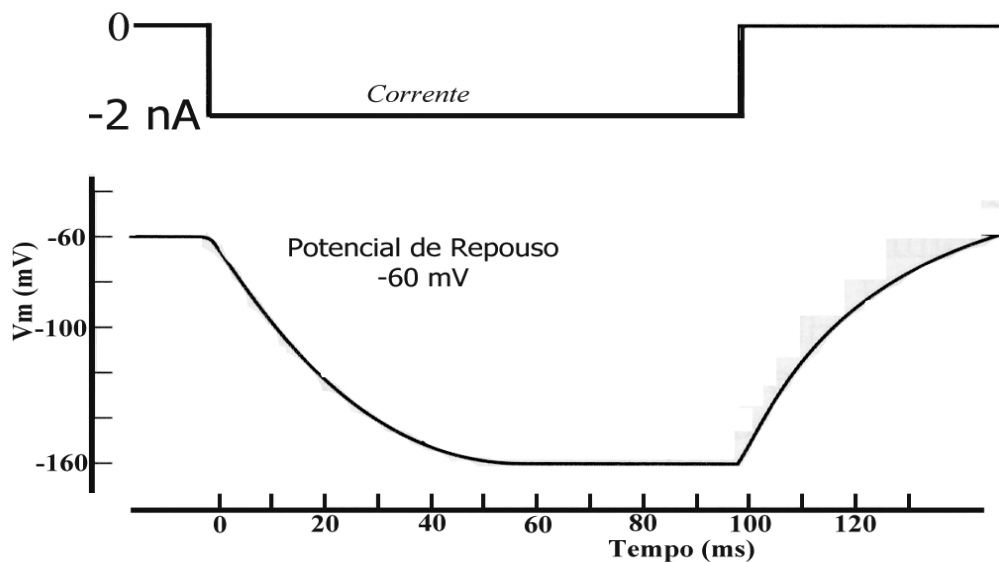


Assuma que o potencial de repouso deste axônio seja de  $-60$  mV e que só estejamos analisando as propriedades passivas do mesmo, isto é, nossos estímulos não geram potenciais de ação.

- Após aplicarmos um estímulo no ponto marcado pelo eletrodo de estimulação, observou-se que a voltagem em reg0 foi  $V$ ; em reg1 foi  $0,606V$ ; em reg2 foi  $0,36V$ ; em reg3 foi  $0,21V$  e em reg4 foi  $0,13V$ . Calcule a constante de espaço deste axônio. (resolva o problema graficamente).
- Monte um circuito elétrico equivalente desse axônio e explique o porque da queda na voltagem a medida que nos distanciamos de reg1. Que parâmetros você alteraria no seu circuito para que a Voltagem caia mais acentuadamente com a distância e menos acentuadamente? Correlacione seus parâmetros elétricos com o existente numa célula.

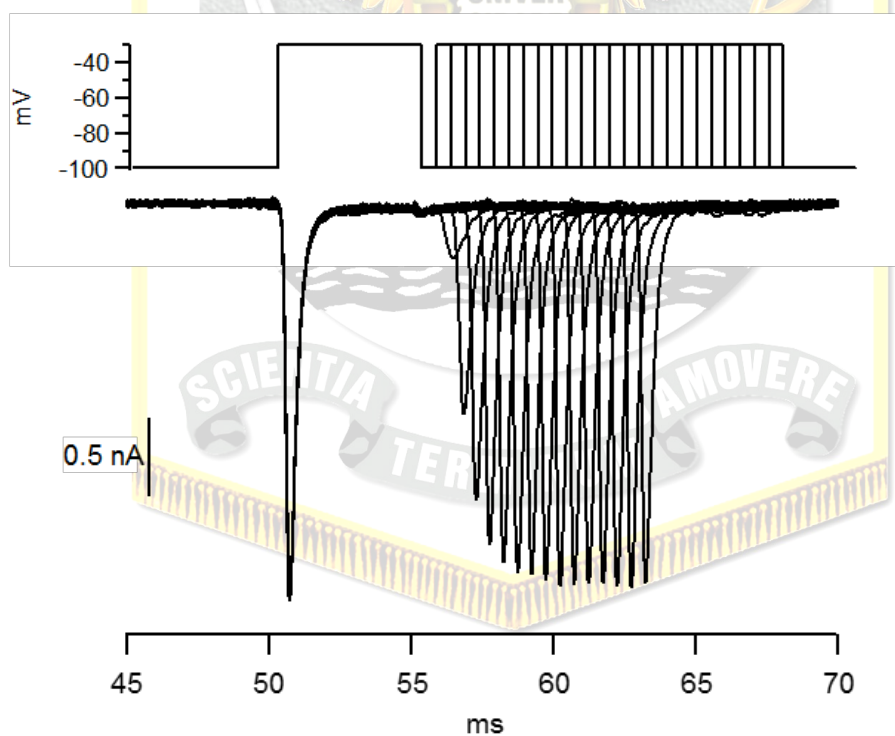
2 – Num experimento com uma célula qualquer procedeu-se a aplicação de um pulso de corrente com amplitude de  $-2$  nA e duração de  $100$  ms, obtendo-se a resposta de potencial mostrada na figura abaixo.

- Defina constante de tempo e calcule-a para esta célula.
- Que propriedades da membrana definem esta variável? Explique.
- Associe a constante de tempo de uma dada célula com sua capacidade de gerar uma atividade rítmica de disparo do potencial de ação. Discuta a condição para se ter uma frequência alta e uma mais baixa de disparos.



3- A figura abaixo extraída de Leao et al (*J Neurosci* 2005) mostra registros de corrente de sódio dependentes de potencial neuronais em resposta a duas despolarizações a -30 mV separadas por intervalos de tempo sucessivamente maiores (de 0,5 ms até 12 ms com passos de 0,5 ms).

- Explique o motivo do segundo registro aumentar a medida que aumentamos o intervalo entre os dois eventos.
- Qual é o efeito desse comportamento da corrente de sódio sobre a excitabilidade neuronal?

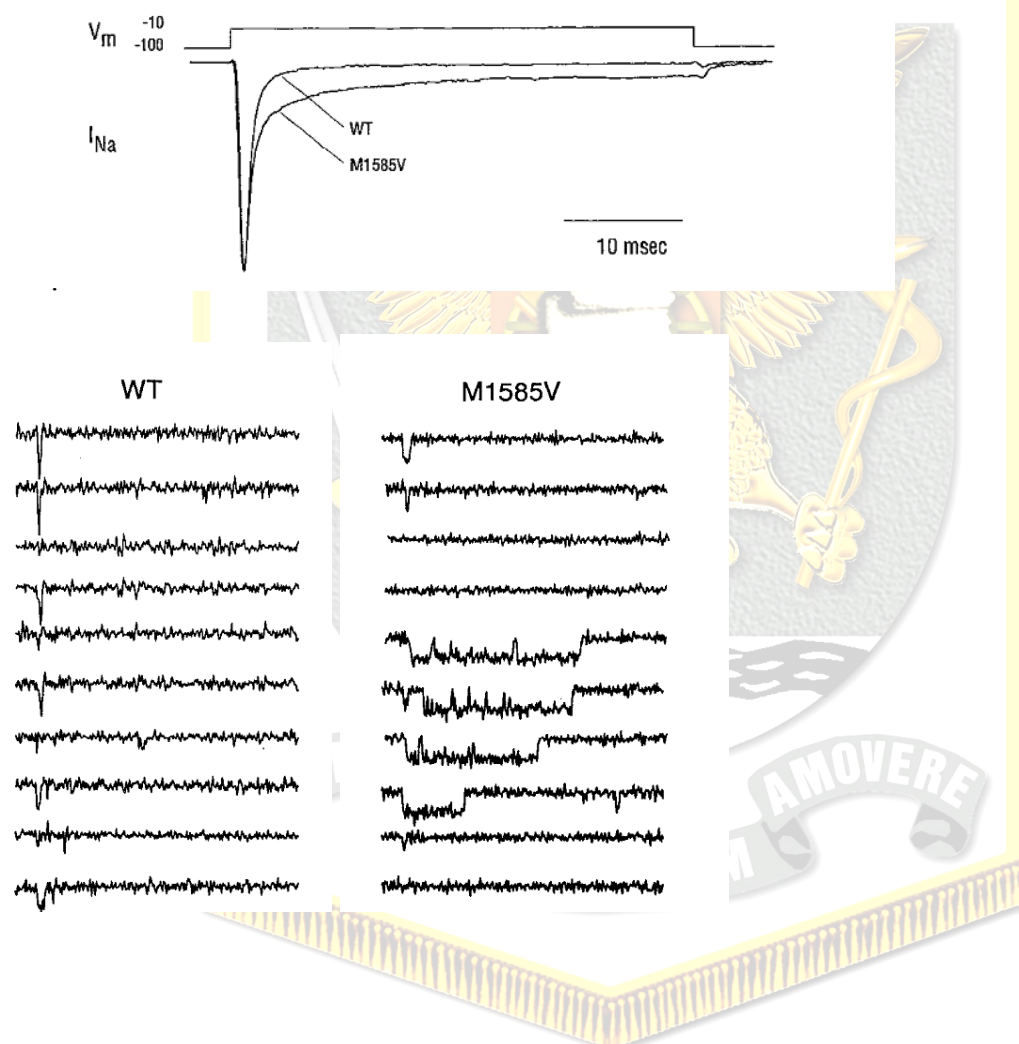


- a) Podemos visualizar proteínas por meio de uma técnica chamada imunocitoquímica. Para isso usamos anticorpos específicos contra nossa proteína de interesse. O anticorpo é então ligado com uma substância fluorescente, e sob microscopia de fluorescência podemos detectar a marcação da proteína. Essa técnica é muito utilizada para se identificar a localização celular e tecidual de canais iônicos e receptores. Imagine uma situação onde incubamos amostras de nervo ciático com anticorpos contra canais de sódio dependentes de potencial conjugados com uma substância fluorescente, e depois visualizamos a fluorescência em microscopia de fluorescência. Sabendo que o nervo ciático possui tanto axônios mielinizados como não mielinizados mostre como você os identificaria nessa situação. Explique.

A

B

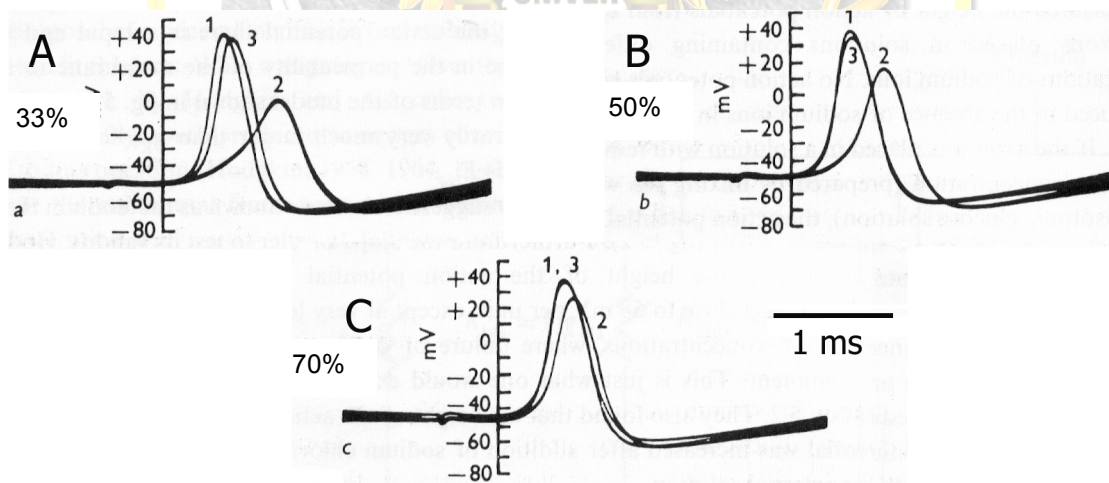
- 5 – Mutações em canais iônicos estão relacionadas a diversos tipos de patologias. Por exemplo mutações em canais de sódio voltagem-dependentes do músculo estriado esquelético estão relacionadas a diversos tipos de paralisias e miotomias. A Paralisia Periódica Hipercalêmica (HPP) é uma doença herdada dominantemente que produz ataques recorrentes de paralisia muscular em resposta a pequenas elevações do potássio sérico, produzidas por exemplo após atividade física. Registros em músculos de pacientes com essa patologia mostram que durante os ataques o potencial de repouso das fibras esqueléticas estão bastante despolarizados tornando o músculo eletricamente não-excitável, levando a paralisia. Mutações no gene SCN4A que codifica a subunidade alfa do canal de sódio voltagem dependente muscular esquelético são relacionadas com essa condição. Os registros abaixo mostram o efeito de uma mutação de um metionina para valina na posição 1585, localizada no segmento transmembrana 6 do domínio 4 da subunidade alfa. O registro superior mostra a corrente de sódio macroscópica em células expressando o canal selvagem (WT) e o mutante (M1585V) em resposta a uma despolarização a -10 mV e os registros inferiores registros de canais unitário das mesmas células durante uma despolarização a -20 mV (dados de Cannon e Strittmatter, *Neuron* 10, 1993)



- Correlacione os dados de canal unitário com os de corrente macroscópica.
- Que fenômeno deve estar alterado por essa mutação?
- Como o potencial de ação será afetado por essa mutação?

6 – Hodgkin e Katz foram dos primeiros a investigar os mecanismos de gênese e propagação de potenciais de ação. Os registros abaixo foram retirados de um de seus trabalhos publicado em 1949, onde os autores mediram potenciais de ação em axônios gigantes de lula em função da concentração de  $\text{Na}^+$  no líquido que banhava o axônio.

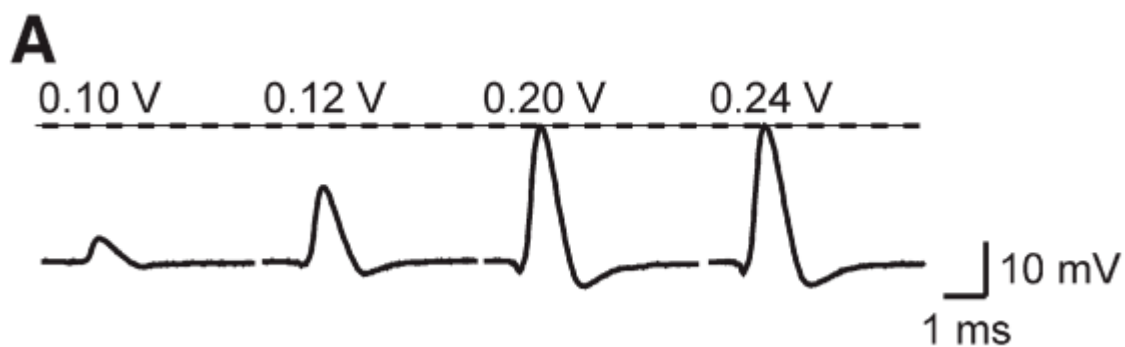
Em **A** a concentração de sódio foi reduzida para 33 %, em **B** para 50 % e em **C** para 70 % do normal. Em cada gráfico o número 1 indica o controle (100% de sódio); 2 indica a situação de sódio alterado e 3 indica o retorno a situação controle.



- Descreva as observações qualitativamente enfatizando o papel do sódio no processo.
- Que tratamento você daria aos dados no sentido de comprovar a participação do íon sódio no processo? Comente.



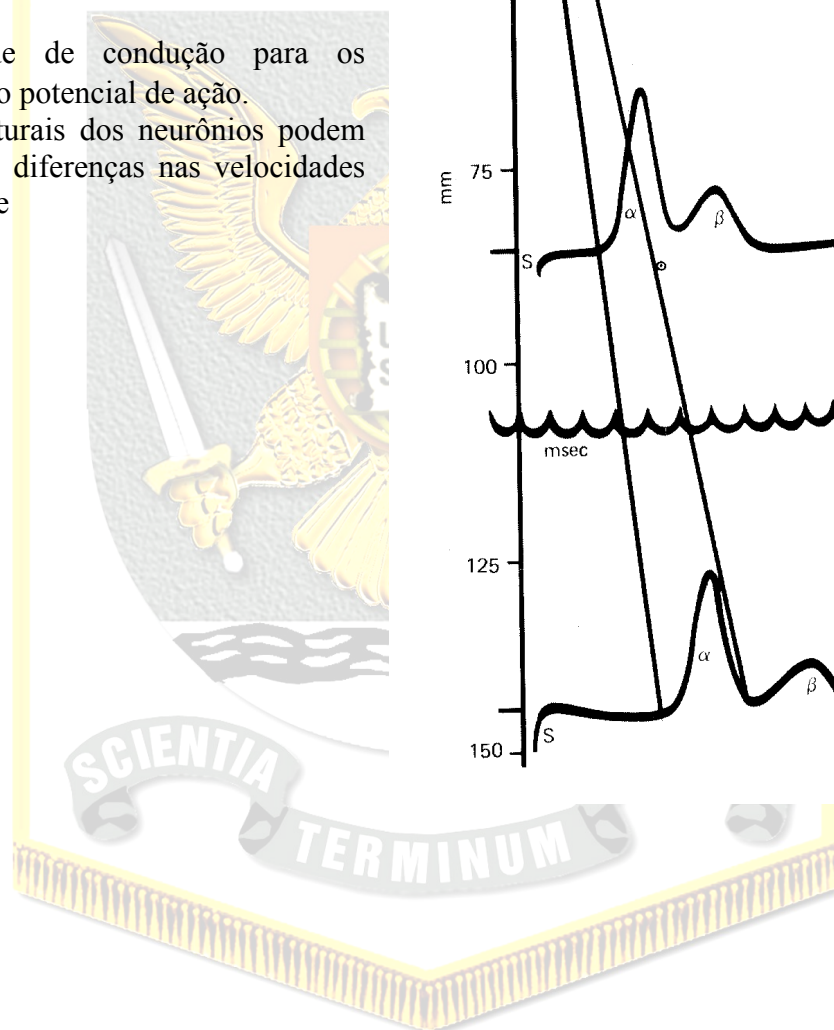
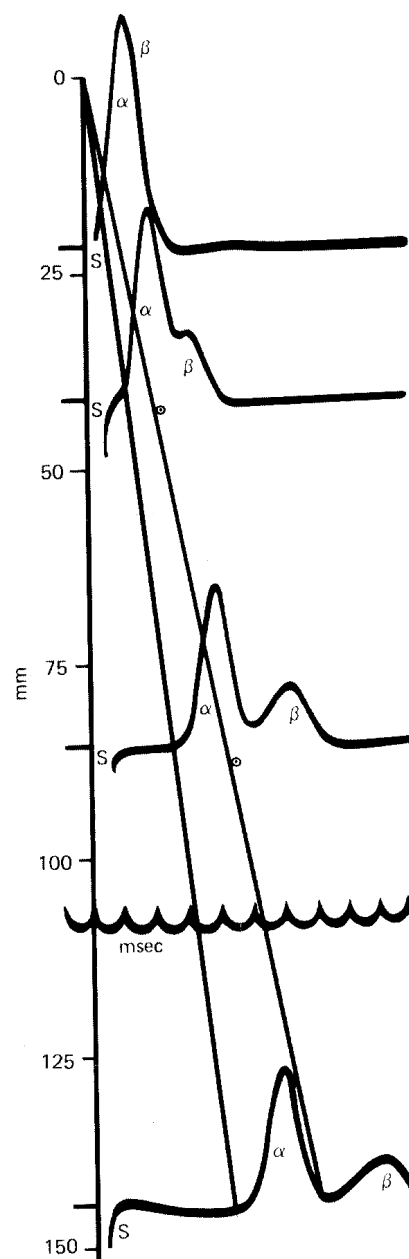
7-A figura abaixo mostra registros extracelulares de potencial de ação composto do nervo ciático de rã em resposta a diferentes intensidades de estimulação (Mizuta et al., *Life Sciences*, 83, 2008). Explique porque o potencial de ação composto não tem o comportamento de “tudo ou nada”.



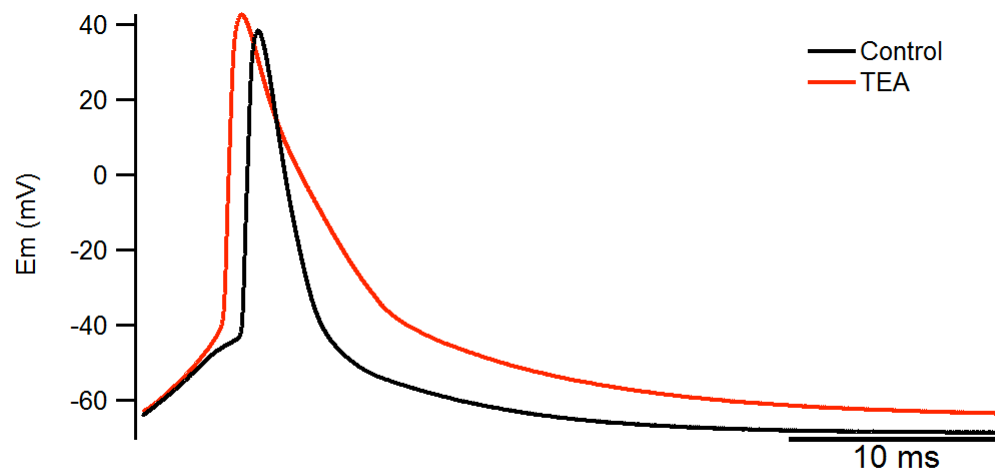
8 – Registros extracelulares de nervo são usados comumente na clínica neurológica. A velocidade de condução do nervo pode ser determinada colocando-se um eletrodo estimulador num ponto qualquer e eletrodos de registro na superfície do nervo, a distâncias variáveis do primeiro. Perceba que conhecendo-se a distância entre os eletrodos e anotando-se o tempo entre o estímulo e a resposta observada no eletrodo de registro pode-se calcular a velocidade de condução do potencial de ação. Erlanger e Gasser (1937) foram dos primeiros a realizar essas medidas em nervos sensoriais. Um dos seus achados encontra-se mostrado abaixo.

A escala a esquerda indica a distância a partir do eletrodo de estimulação até o ponto de medida do potencial de ação. A letra S em cada traçado indica o momento em que o estímulo foi aplicado. O traçado ondulado marcado msec representa a calibração o tempo em milissegundos (cada intervalo representa 1 milissegundo).

- Calcule a velocidade de condução para os componentes  $\alpha$  e  $\beta$  do potencial de ação.
- Que parâmetros estruturais dos neurônios podem estar determinando as diferenças nas velocidades de condução? Explique

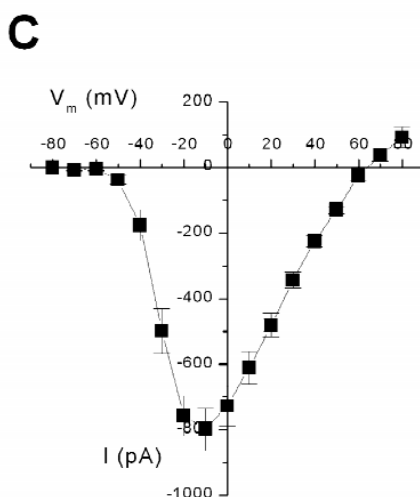
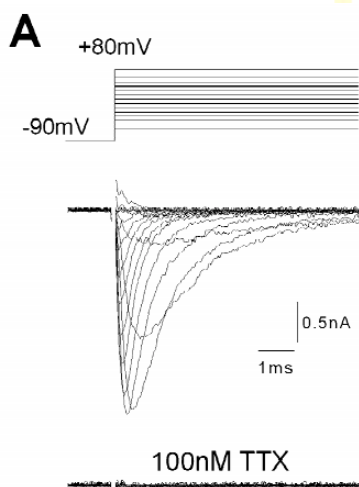


9-A figura abaixo mostra o efeito da droga TEA (tetraetilamônio) sobre o potencial de ação de um neurônio central. Baseado em seu conhecimento explique o efeito da droga.

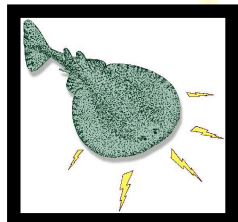


10- A figura abaixo mostra correntes iônicas em células HEK293 que expressam heterologicamente a subunidade alfa do canal de sódio sensível a voltagem  $Na_v1.6$  humano (Burbridge et al., *Mol. Brain Res* 103, 2002). A esquerda temos os registros de corrente em resposta a graduais despolarizações graduais a partir de -90 mV até +80 mV, e o efeito da toxina tetrodotoxina (TTX) sobre as correntes. A direita temos o gráfico corrente X voltagem. Responda:

- Qual seria o efeito da TTX sobre o potencial de ação?
- Como o gráfico da direita foi construído?
- Baseado no gráfico corrente X voltagem onde aproximadamente seria o limiar do potencial de ação de um neurônio que expressasse esse canal?
- Por que a partir de -10 mV a corrente começa a decair e reverte de polaridade em torno de +60 mV?



## Fisiologia de Membranas – RCG-213



### Questões para Seminário sobre Transmissão Sináptica.

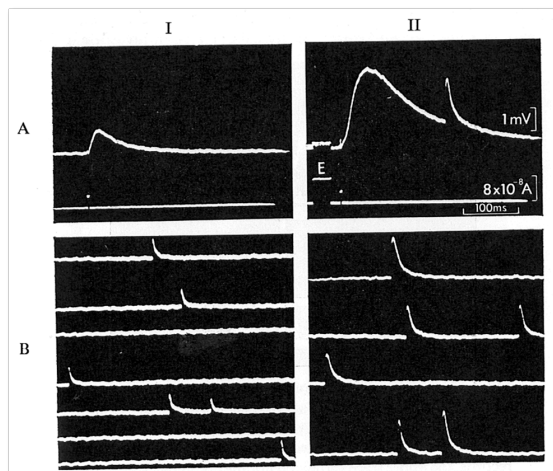
1 – O órgão elétrico da raia *Torpedo* é um modelo bastante utilizado para o estudo da fisiologia das vesículas sinápticas devido à grande quantidade de vesículas colinérgicas que podem dele ser purificadas. Experimentos feitos na década de 70 onde incubaram pedaços do órgão elétrico com colina (o precursor da acetilcolina) marcada com trício (hidrogênio radioativo) observaram que apenas uma fração pequenada das vesículas tinham incorporado a maior parte da acetilcolina sintetizada a partir da colina marcada com trício. Após estimulação elétrica do tecido, para induzir a exocitose, essa acetilcolina triciada era rapidamente liberada no espaço extracelular. Elabore uma hipótese que explique por que a acetilcolina recém sintetizada (triciada) não se distribuiu homogeneamente em todas as vesículas e foi prontamente liberada pela estimulação do tecido.

2 – Em uma preparação de junção neuromuscular do músculo semitendinoso da rã são registrados potenciais de placa motora espontâneos (miniatura) e evocados pela estimulação do nervo motor. A amplitude média dos potenciais miniatura era de 0,4 mV enquanto a do potencial de placa motora era sempre maior do que o limiar do potencial de ação muscular ( $> 30$  mV a partir do repouso). Após a redução do cálcio extracelular de 2 mM para 0,2 mM a amplitude dos potenciais miniatura não foi alterada, enquanto as dos potenciais evocados caíram para valores similares as do potencial miniatura, incapazes de ultrapassar o limiar do potencial de ação, além de diversas vezes eles não serem evocados pela estimulação do nervo. Explique

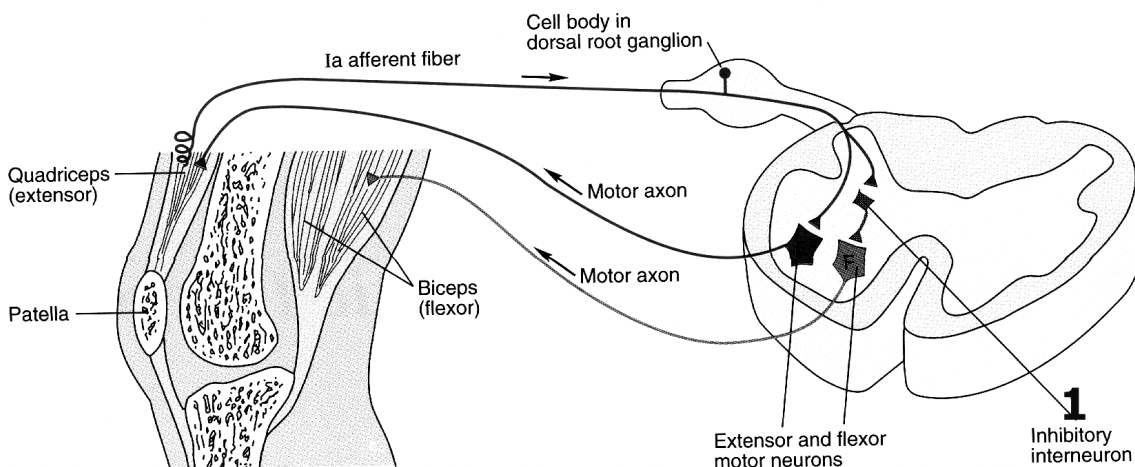
- a) Porque as amplitudes dos potenciais miniatura não foram afetadas, enquanto as dos potenciais evocados de placa motora caíram tão drasticamente após a redução do cálcio extracelular?
- b) Qual é o significado fisiológico do potencial evocado de placa motora ser sempre supralimiar?

3-A figura abaixo é de um experimento original de Bernard Katz e mostra o efeito da droga eserina (painel II, painel I controle) nos potenciais de placa motora evocados (na presença de doses submáximas de d-tubocurarina) (A) e espontâneos (B) da junção neuromuscular da rã. A eserina inibe a enzima acetilcolinaesterase, localizada na fenda sináptica de sinapses colinérgicas. Responda:

- Porque a eserina aumenta a duração e amplitude dos potenciais sinápticos?
- Você esperaria algum efeito da eserina na frequência dos potenciais espontâneos?
- Porquê foram usadas doses submáximas de d-tubocurarina para registrar os potenciais evocados?

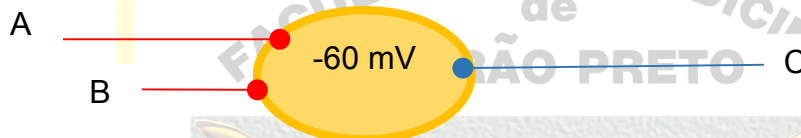


4 – No esquema abaixo é mostrado um arco reflexo simples composto pelos músculos extensor e flexor de um membro e as vias nervosas responsáveis pelo reflexo.



- Descreva a sequência de eventos gerada pela extensão do quadriceps.
- O que aconteceria se não houvesse o interneurônio inibitório entre a fibra aferente do fuso muscular e o neurônio motor do bíceps?

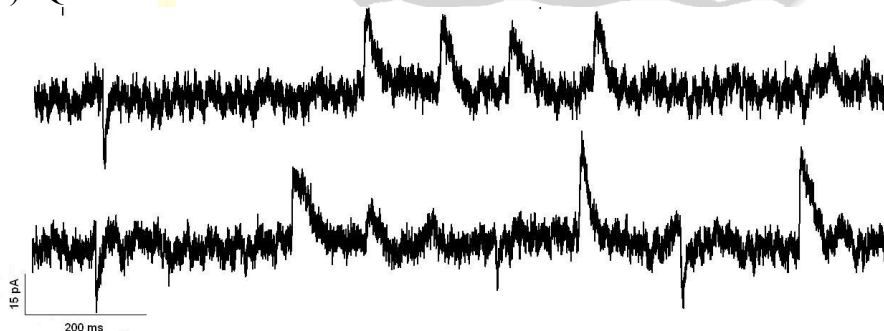
5 – Um neurônio hipotético (esquema abaixo) recebe 3 sinapses, duas excitatórias (A e B) e uma inibitória (C). Cada sinapse excitatória despolariza a membrana em 10 mV e a inibitória hiperpolariza em 5 mV. A partir de um potencial de repouso de -60 mV quais seriam as condições para alcançarmos o limiar do potencial de ação que seria de -42 mV? Como a sinapse inibitória seria efetiva em impedir que se alcançasse o limiar do potencial de ação? Represente graficamente sua resposta.



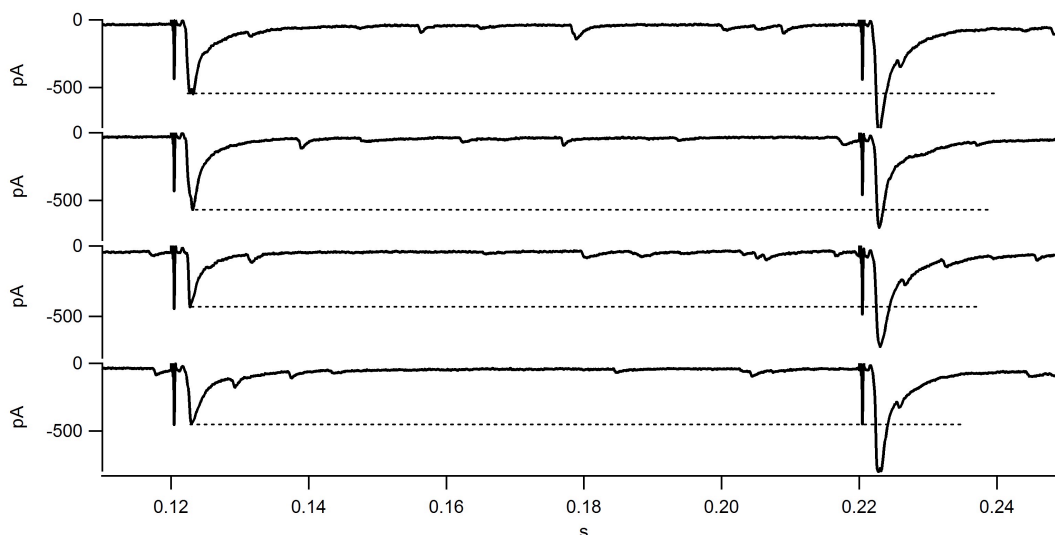
- 6 – A droga vesamicol inibe o transporte de acetilcolina para o interior das vesículas sinápticas.
- O que aconteceria com a contração de um músculo esquelético qualquer se a quantidade de ACh presente em cada vesícula pré-sináptica achar-se bastante reduzida em relação ao estado normal devido a incubação com o vesamicol?
  - Nestas condições qual a modificação esperada nos potenciais miniatura e nos potenciais evocados da placa motora?

7-O exemplo abaixo mostra correntes pós-sinápticas espontâneas registradas em um neurônio central, mantido em um potencial de -30 mV, dialisado com uma solução interna contendo 10 mM de cloreto e externa contendo 120 mM de cloreto.

- Explique a razão biofísica de termos no mesmo neurônio correntes de saída (positivas) e de entrada (negativas).
- Quais neurotransmissores você acredita medeiam essas correntes?

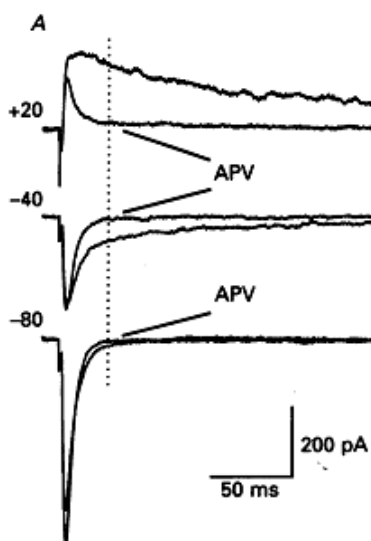


8- O exemplo abaixo mostra uma série de pares de correntes pós-sinápticas glutamatérgicas evocadas com 100 ms de intervalo. O intervalo entre cada par é de 30 segundos. O traço vertical antes de cada corrente representa o artefato do estímulo (estímulo de 10V com 100  $\mu$ s de duração). O neurônio é mantido em *voltage-clamp* a -70 mV. A linha pontilhada horizontal assinala a amplitude da primeira corrente.



Responda: a) qual fenômeno de plasticidade sináptica você observa? Ele seria de curto ou longo prazo? Explique as suas conclusões.

9- A figura abaixo extraída de Hestrin et al., (*J Physiol*, 430, 1990) mostra um dos primeiros registros em *voltage-clamp* de correntes sinápticas glutamatérgicas em neurônios hipocâmpais.



Ela mostra as correntes evocadas pela estimulação do axônio aferente de Schaffer, e registradas em diversos potenciais indicados ao lado do registro. São mostrados 2 registros, o registro controle e após a aplicação do antagonista dos receptores NMDA, APV.

- Que características você observa que distinguem as correntes NMDA das não-NMDA (resistentes ao APV)?
- Usando seu conhecimento explique o fato da corrente NMDA não ser observadas no potencial de -80 mV?

10- Síndromes miastênicas congênitas são um espectro de patologias que afetam negativamente a junção neuromuscular comprometendo a neurotransmissão muscular esquelética. Anormalidades em diversos processos da neurotransmissão juncional tem sido implicados como fatores causadores dessa patologia, entre eles mutações nos receptores nicotínicos musculares. As síndromes do canal lento são miastenias onde a duração da resposta à acetilcolina é aumentada. No exemplo abaixo são mostrados registros realizados de uma biópsia de músculo intercostal de uma paciente com miastenia congênita do canal lento (patient) e de um indivíduos normais (control). No painel superior são mostrados registros de corrente juncionais, enquanto no inferior registros de canal unitário em resposta a aplicação de acetilcolina. A abertura do canal é representada pela corrente para cima. (Dados retirados de Milone et al., *J Neurosci*, 17, 1997).

- a) Correlacione os resultados de canal unitário com os registros de correntes juncionais acima.

