

# BIOELETROGÊNESE

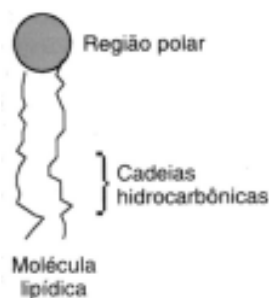
## *Laboratório de Biofísica de Membranas*

Prof. Dr. Wamberto A. Varanda

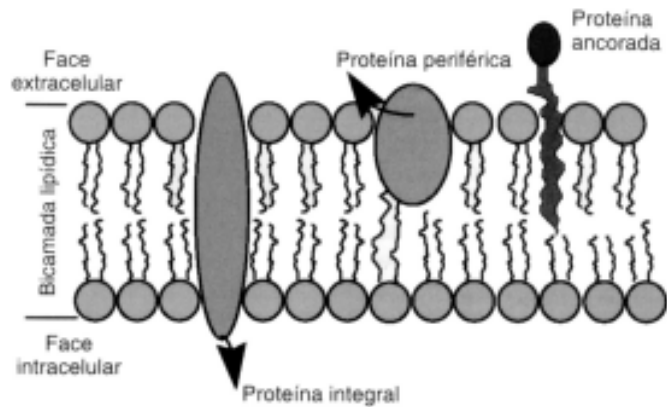
Luiz Artur P. Chaves

Vander Baptista

Todas as células são envolvidas por uma membrana de 7 a 10 nm de espessura que separa dois meios: o intra e o extracelular. A membrana celular apresenta uma estrutura geral comum, uma bicamada lipídica com proteínas inseridas. Essa bicamada lipídica é constituída principalmente por fosfolipídios e atua como barreira relativamente impermeável a passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis. Essa propriedade de barreira à moléculas hidrossolúveis é função da estrutura química dos lipídios: um esqueleto essencialmente hidrocarbônico conferindo um caráter apolar a essa região da molécula e uma extremidade polar, onde predominam grupamentos com carga, conferindo um caráter anfipático a esses lipídios de membrana (figura 1). Como consequência dessa estrutura, quando lipídios são colocados em água, tendem a se estruturar, espontaneamente, em bicamadas de modo que suas caudas hidrofóbicas ficam voltadas para o interior e sua porção hidrofílica fique exposta à água, minimizando a interação das cadeias hidrocarbônicas com as moléculas de água. As proteínas, que estão inseridas na bicamada lipídica (figura 2), associam-se a esta de vários modos podendo ser classificadas em proteínas periféricas e proteínas integrais (transmembrana). As proteínas transmembrana são responsáveis pela permeabilidade da membrana plasmática a diferentes íons ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$ , etc...).



**Figura 1.** Fosfolipídio de membrana (Mello Aires, 1999).



**Figura 2.** Tipos de proteína de membrana, classificados de acordo com a sua posição (Mello Aires, 1999).

Esta arquitetura é fundamental porque permite à célula manter diferentes concentrações iônicas entre os meios intra e extracelular. Isto é possível graças à permeabilidade seletiva e transporte ativo através da membrana, fundamentais na gênese do movimento transmembrana de íons e, como veremos adiante, na produção e transmissão de sinais elétricos. Os solutos mais importantes para nossa discussão são os íons  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$ , sendo o  $K^+$  mais concentrado no meio intracelular e  $Na^+$  e  $Cl^-$  mais concentrados no meio extracelular. A tabela 1 mostra a distribuição desses íons em neurônios gigantes de lula, uma preparação muito usada no estudo da bioeletrogênese.

**Tabela 1.** Distribuição dos principais íons através da membrana de axônio gigante de lula.

Íon	Citoplasma (Mm)	Fluido extracelular (mM)	Potencial de equilíbrio (mV)
$K^+$	400	20	-75
$Na^+$	50	440	+55
$Cl^-$	52	560	-60
$A^-$ (íons orgânicos)	385	---	---

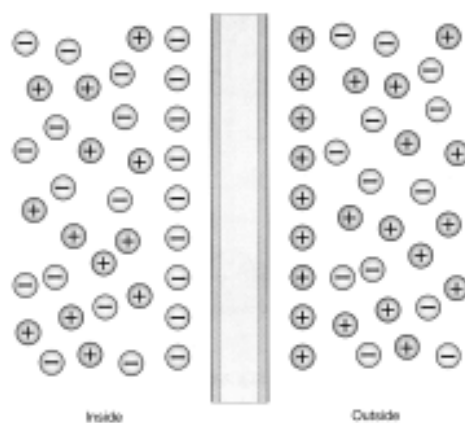
As proteínas integrais de membrana, que permitem a passagem de íons, são estruturas especializadas e formam os chamados **canais iônicos**. O estudo desses canais mostrou que os mesmos apresentam algumas propriedades em comum: 1 – condutância, 2 – reconhecem e selecionam íons específicos e 3 – abrem e fecham em resposta a sinais específicos elétricos, químicos e mecânicos (**canais controlados** ou **gated**). Alguns canais iônicos

de membrana abrem-se e fecham-se independentemente de estímulos (**canais passivos** ou **nongated**) e são importantes para a gênese e manutenção do potencial de repouso da célula.

O potencial de repouso é resultado da separação de cargas (íons) através da membrana. O excesso de cargas negativas na superfície interna da membrana e positivas na superfície externa representam uma fração muito pequena do total de íons dentro e fora da célula (figura 3). Devido a essa densidade de carga diferente nos dois lados, a membrana pode ser comparada a um **capacitor**, isto é, dois materiais condutores (meios intra e extracelular) separados por um material isolante (a bicamada lipídica). Essa separação de cargas gera uma diferença de potencial elétrico ou voltagem, chamada potencial de membrana de repouso ( $V_m$ ). O termo potencial de repouso aplica-se somente ao potencial através da membrana quando a célula está em repouso enquanto o termo potencial de membrana é mais geral e refere-se a diferença de potencial elétrico em qualquer momento, no repouso ou durante o potencial de ação.

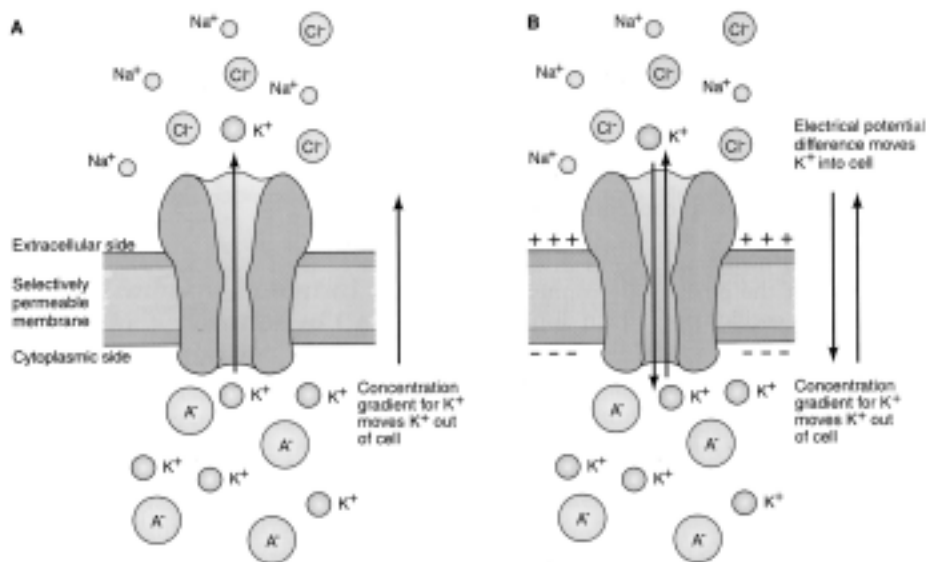
$$V_m = V_{int} - V_{ext}$$

Por convenção o potencial no extracelular é igual a zero. Assim, como o intracelular é negativo o potencial de repouso em neurônios é cerca de  $-60$  a  $-70$  mV.



**Figura 3.** O potencial de membrana é resultado da separação de cargas somente na superfície da membrana (Kandel, 1991).

A permeabilidade para  $K^+$  e  $Na^+$ , no repouso, é determinada pela proporção dos canais passivos abertos para cada um desses íons presentes na membrana. Vamos imaginar uma célula hipotética cuja membrana seja permeável somente ao íon  $K^+$ . Como o  $K^+$  está mais concentrado dentro da célula, esse íon tende a sair por difusão seguindo seu gradiente de concentração (**gradiente químico**), resultando na saída de cátions do interior da célula. O gradiente químico do  $K^+$  gera um **gradiente elétrico** (separação de cargas) através da membrana e quanto maior o efluxo de  $K^+$ , maior será esse gradiente elétrico. Em consequência disso, aumenta também a força que tende a restringir a saída de  $K^+$ . Essa força é de origem elétrica e surge da atração que as cargas negativas do lado interno da membrana exercem sobre as cargas positivas. Esse íon sai da célula até que a força difusional que o empurra para fora se iguala à força elétrica que o atrai. Podemos dizer que a difusão ou o processo de saída de  $K^+$  é auto-limitante pois cria uma outra força (atração eletrostática) que o limita e também que esse processo gera uma diferença de potencial elétrico (figura 4).



**Figura 4.** O fluxo de  $K^+$  através da membrana é determinado pelo gradiente de concentração e potencial elétrico através da membrana (Kandel, 1991). A – Em uma célula permeável somente ao  $K^+$  o potencial de repouso resulta do efluxo de  $K^+$  seguindo seu gradiente de concentração. B – O efluxo de  $K^+$  cria um excesso de cargas positivas fora da célula e deixa o interior negativo. Este gradiente elétrico tende a diminuir o efluxo de  $K^+$  e o equilíbrio é atingido quando as forças químicas e elétricas são iguais e opostas.

O potencial de membrana no qual o íon  $K^+$  está em equilíbrio eletroquímico pode ser calculado através da equação de Nernst:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}}$$

onde  $E_K$  é o potencial de equilíbrio para o íon  $K^+$ ,  $R$  é a constante dos gases,  $T$  a temperatura em graus Kelvin,  $z$  a valência do íon,  $F$  a constante de Faraday e  $[K^+]_{ext}$  e  $[K^+]_{int}$  são as concentrações de  $K^+$  fora e dentro da célula respectivamente. Para o íon  $K^+$ ,  $z$  é igual a 1 e a  $25^\circ C$   $\frac{RT}{zF}$  é igual a 26 mV. A constante para converter logaritmo natural para decimal é 2,3. Assim:

$$E_K = 26 \times 2,3 \log_{10} \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}}$$

Essa equação pode ser usada para calcular o potencial de equilíbrio de qualquer íon presente nos dois lados da membrana, desde que conheçamos suas concentrações. Tomando-se os dados da tabela I tem-se que o potencial de equilíbrio do  $K^+$  é  $-75$  mV,  $Na^+$  é  $+55$  mV e do  $Cl^-$   $-60$  mV.

Geralmente, o potencial de membrana é próximo do potencial de Nernst para o íon ou íons que são mais permeantes pela membrana, lembrando que a permeabilidade para um dado íon é proporcional ao número de canais abertos ao mesmo. Se inserirmos um microeletrodo na célula imaginada acima, com membrana permeável somente ao íon  $K^+$ , este medirá um potencial de membrana igual ao potencial de equilíbrio do íon  $K^+$ . Um exemplo real desse modelo ocorre em células da glia, onde a membrana é permeável quase que exclusivamente ao  $K^+$ .

Vamos considerar o que irá acontecer se adicionarmos, na célula hipotética do exemplo acima, alguns poucos canais para  $Na^+$ , dessa maneira, conferindo à membrana uma pequena permeabilidade a esse íon. Os íons  $Na^+$  estão mais concentrados no fluído extracelular que no citoplasma e o interior da célula está negativo. Assim, tanto o gradiente químico como o gradiente elétrico favorece o influxo de  $Na^+$ . Embora a permeabilidade ao  $Na^+$  seja muito baixa ela permite que esse íon entre na célula, seguindo seu gradiente eletroquímico. Esse pequeno influxo de  $Na^+$  diminui a densidade de cargas negativas no lado interno da membrana, tirando o  $K^+$  de seu potencial de equilíbrio ( $E_K$ ). Quanto mais o  $V_m$  diverge do  $E_K$  (pela maior entrada de  $Na^+$ ),

maior a força eletroquímica que dirige o  $K^+$  para fora da célula e conseqüentemente maior o efluxo de  $K^+$ . A partir de um ponto, o  $V_m$  alcança seu valor de repouso no qual o efluxo de  $K^+$  é contrabalançado pelo influxo de  $Na^+$ .

Em uma célula real, como no neurônio gigante de lula, o potencial de equilíbrio para o íon  $Na^+$  é de +55 mV (tabela 1). Se inserirmos um microeletrodo nessa célula, este medirá um potencial de membrana ( $V_m$ ) de cerca de -60 mV. O potencial de membrana é estabelecido através do balanço entre as permeabilidades aos íons  $Na^+$  e  $K^+$ . Nesse exemplo a relação  $P_{Na}/P_K$  é muito baixa, ou seja, a membrana é muito mais permeável ao íon  $K^+$  e dessa maneira o potencial de membrana (-60 mV) estará mais próximo do potencial de equilíbrio do íon  $K^+$  (-75 mV); caso a relação  $P_{Na}/P_K$  aumente, o potencial de repouso se deslocará em direção ao potencial de equilíbrio do íon  $Na^+$  (+55 mV). Para membrana permeáveis a dois ou mais íons usa-se a equação de Goldman, Hodgkin e Katz (GHK) para calcular o potencial de membrana:

$$V_m = 58 \log \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}$$

onde,  $P_K$  é a permeabilidade ao íon  $K^+$ ,  $P_{Na}$  é a permeabilidade ao íon  $Na^+$ ,  $P_{Cl}$  é a permeabilidade ao íon  $Cl^-$  e suas respectivas concentrações nos meios intra e extracelular.

O fluxo passivo de  $K^+$  (para fora) e  $Na^+$  (para dentro) através dos canais passivos e conseqüente geração do  $V_m$  é constante. Apesar disso não ocorre dissipação do gradiente químico devido a atividade da  $Na^+-K^+$  ATPase que transloca íons  $Na^+$  do intracelular para fora enquanto transporta  $K^+$  do extracelular para dentro da célula. Como a bomba move  $Na^+$  e  $K^+$  contra seus gradientes eletroquímicos, energia é necessária para que esse transporte ocorra e ela é proveniente da hidrólise do ATP. Outra característica da bomba  $Na^+-K^+$  ATPase é que ela transporta 3 íons  $Na^+$  para o extracelular e 2 íons  $K^+$  para o intracelular. A resultante é um efluxo de cargas positivas que tende a hiperpolarizar levemente o potencial de membrana, ou seja, tornar o  $V_m$  um pouco mais negativo do que seria esperado apenas da distribuição passiva de íons.

Em relação ao cloreto, sua concentração é maior fora da célula e esse gradiente de concentração é balanceado pelo potencial de membrana, ou seja,

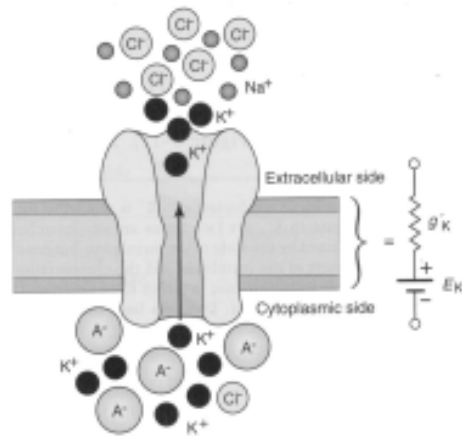
a negatividade interna opõe-se ao influxo dos íons  $\text{Cl}^-$  (ânion). Assim, o potencial de membrana em repouso é determinado principalmente pela razão de concentração de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , porque, a concentração interna de  $\text{Cl}^-$ , sendo baixa, pode mudar para se acomodar a mudanças no potencial de repouso, já que o mesmo encontra-se equilibrado. Podemos dizer que os íons  $\text{Cl}^-$  estão passivamente distribuídos através da membrana e não havendo bomba de  $\text{Cl}^-$  na célula  $E_{\text{Cl}}$  será igual ao  $V_m$ .

Como vimos os íons não atravessam a bicamada lipídica, pois esta é um pobre condutor de corrente iônica, mas cada canal iônico atua como um condutor de corrente iônica. Quando o íon atravessa esse canal ele interage com as paredes do mesmo e a resistência à passagem desse íon através do canal é maior se comparado a um volume equivalente de fluido extracelular. Assim, cada canal atua como um condutor de resistência  $R$ . A condutância de cada canal, que é uma medida de quão eficientemente o canal pode conduzir íons, é inversamente proporcional à resistência desse canal e representada por  $g$ .

$$g = \frac{1}{R}$$

Ao ser permeado por íons cada canal iônico contribui para a geração de uma diferença de potencial através da membrana. Por exemplo, o íon  $\text{K}^+$  ao se difundir por um canal seletivamente permeável a ele, leva a uma separação de cargas através da membrana (cargas positivas acumulam-se fora e negativas dentro) criando então uma diferença de potencial elétrico. Assim cada canal iônico atua como um condutor e como uma bateria (figura 5).

Visto que cada canal pode ser representado por uma condutância ( $g$ ), então a corrente ( $I$ ) que passa através dos mesmos pode ser calculada usando a Lei de Ohm:



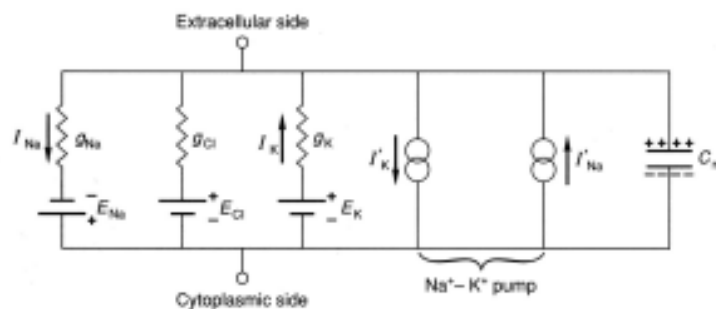
**Figura 5.** Cada canal seletivo ao  $K^+$  dá origem a uma diferença de potencial igual ao potencial de Nernst do  $K^+$ , podendo ser representado por uma bateria em série com um condutor (Kandel, 1991).

$$I = g \times V$$

Todos os canais para  $K^+$  passivos da membrana podem ser combinados, num condutor único equivalente (que representa toda a população desses canais de uma célula) em série com uma única bateria equivalente. Devemos considerar que: a condutância total da membrana dessa célula em repouso ao  $K^+$  ( $g_K$ ) é proporcional ao número da canais para  $K^+$  passivos abertos ( $N_K$ ) multiplicado pela condutância da cada canal ( $g'_K$ ).

$$g_K = N_K \times g'_K$$

Visto que a bicamada lipídica de uma célula pode ser comparada a um capacitor e que os canais iônicos podem ser representados por baterias e resistências, as propriedades funcionais de uma membrana podem ser entendidas através do circuito elétrico equivalente mostrado na figura 6.



**Figura 6.** Circuito elétrico equivalente a um neurônio em repouso (Kandel, 1991).



Quando o neurônio encontra-se no estado de repouso, as correntes de  $K^+$  e  $Na^+$  ( $I_K$  e  $I_{Na}$ ) resultantes da difusão passiva dos íons através dos canais da membrana são balanceadas pelo transporte ativo pela  $Na^+-K^+$  ATPase. Desse modo, nesse circuito elétrico a bomba seria o gerador de corrente, ou seja, manteria as baterias iônicas carregadas.  $C_m$  é a capacitância da célula, pois como vimos, essa possui a habilidade de separar cargas de sinais opostos na sua superfície.  $E_{Na}$ ,  $E_{Cl}$  e  $E_K$  são os respectivos potenciais de equilíbrio para  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e  $K^+$  e  $g_{Na}$ ,  $g_{Cl}$  e  $g_K$  suas respectivas condutâncias. É importante lembrar que o potencial de membrana é determinado pelo íon (ou íons) com maior condutância ou permeabilidade.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** Ver no final do próximo tópico (Potencial de Ação).