

Potenciais de Ação e o Modelo de Hodgkin e Huxley

Introdução à Neurociência Computacional — prof. Bóris Marin

entrega: 24/11

As questões abaixo devem ser respondidas em forma de relatório **em grupo de até três pessoas**, com explicações *dissertativas* (não basta apresentar os gráficos/tabelas!). **Apenas um dos integrantes do grupo** deverá fazer a submissão no Moodle. Entregar **um único arquivo formato PDF**.

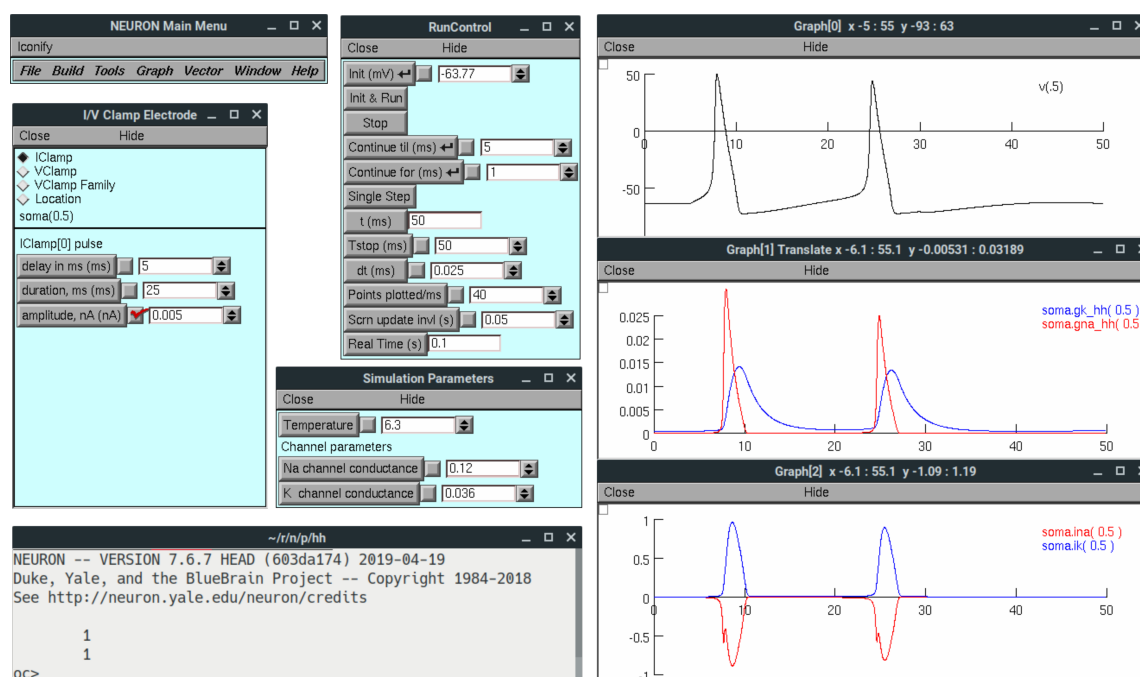
Fazendo Funcionar

Nesta atividade, utilizaremos o simulador NEURON.

Salve os arquivos correspondentes a esta atividade (disponíveis no repositório da disciplina) em algum diretório em seu computador. Execute então (duplo clique deve funcionar, se o NEURON tiver sido instalado corretamente) o arquivo `atividade_hh.hoc`.

Devem aparecer 7 janelas em seu monitor (veja a figura abaixo):

- NEURON Main Menu
- Run Control
- Simulation Parameters
- I/V Clamp Electrode
- Graph[0] (potencial de membrana)
- Graph[1] (condutâncias de Na^+ , K^+)
- Graph[2] (correntes de Na^+ , K^+)



Também aparecerá uma janela tipo linha de comando (com título `nrniv` ou `sh`). Dependendo da resolução do seu monitor, talvez você tenha de reposicionar as janelas para conseguir enxergá-las.



Para tanto, vá menu principal do NEURON e escolha `Window` → `Print & File Window Manager`, depois `move` para arrastar as caixas azuis.

Explorando o Modelo

Entendendo o Simulador

O arquivo utilizado contém um modelo para um segmento cilíndrico de membrana (um único compartimento, com $10\text{ }\mu\text{m}$ de comprimento, $3.18\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro e área total de $100\text{ }\mu\text{m}^2$). A membrana contém uma condutância (passiva) de *leakage* (potencial de reversão -54.3 mV), além de condutâncias (ativas) de Sódio e Potássio.

Vamos agora explorar o que é possível fazer com o modelo, simulando um experimento de *current clamp* (injeção de corrente na célula, através de um eletrodo). Para tanto, vá à janela `I/V Clamp Electrode`, e escolha `IClamp`. Os parâmetros para o pulso de corrente, bem como o compartimento em questão, podem ser ajustados. Para executar a simulação, clique em `Init & Run` na janela `RunControl`.

Vamos tentar repetir o que fizemos com o modelo Integra e Dispara, mas agora com este modelo (tipo Hodgkin e Huxley). No modo `IClamp`, altere a amplitude do pulso de corrente, e veja o que acontece com a frequência de disparos. Atenção: pode ser necessário apertar `Enter` após digitar um novo valor com o teclado (outra forma é usar o mouse, apertando os botões ). Você também pode voltar um parâmetro ao seu valor original apertando o botão .


Tente também reduzir a condutância máxima de cada um dos canais, através da janela `Simulation Parameters`, e veja o que acontece. Evidentemente, num modelo temos controle sobre cada um dos parâmetros. Os valores padrão da maioria deles podem ser vistos na tabela 1, podendo ser alterados via a linha de comando.

parâmetro	significado	valor
gnabar_hh	densidade de condutância máx. Na^+	0.12 S cm^{-2}
gkbar_hh	densidade de condutância máx. K^+	0.036 S cm^{-2}
gl_hh	densidade de condutância <i>leakage</i>	0.0003 S cm^{-2}
el_hh	potencial de reversão <i>leakage</i>	-54.3 mV
nai	$[\text{Na}^+]$ intracelular	10 mM
nao	$[\text{Na}^+]$ extracelular	140 mM
ki	$[\text{K}^+]$ intracelular	54.4 mM
ko	$[\text{K}^+]$ extracelular	2.5 mM

Table 1: Valores padrão para os parâmetros da encarnação do modelo de Hodgkin e Huxley estudada nesta atividade. Todos estes valores podem ser alterados diretamente da linha de comando, na janela `nrniv`.

O protocolo de *voltage clamp*

Agora, vamos explorar protocolos de *voltage clamp*. Na janela `I/V Clamp Electrode`, escolha `VClamp`. Neste tipo de experimento, uma corrente variável é injetada na célula, de modo a manter o potencial de membrana fixo em três níveis constantes, sucessivamente: *conditioning*, *test* e *return*. Para ver a corrente injetada, você pode clicar no botão `VClamp.i_graph` nesta mesma janela.

Para nosso primeiro experimento de *voltage clamp*, vamos subir o potencial do valor de repouso (-63.77 mV), para um nível *testing* de -10 mV , por 30 ms . Altere o campo `amplitude` em `Testing Level` para -10 mV , aperte `enter` (aparecerá um  indicando que o valor está diferente do padrão), e execute a simulação (`RunControl` → `Init & Run`). Para ver a corrente necessária

para o *clamp* no gráfico (janela `VClamp[0] Graph`), você precisa alterar a escala do eixo y . Para tanto, clique com o botão direito sobre a janela do gráfico, escolha `View...` → `Set View`, aperte Enter para aceitar a escala em x , para a escala y , digite -3 3 (correntes são dadas em nA). *Útil: é possível ajustar as escalas automaticamente para que um gráfico “caiba” todo nos eixos, fazendo `View...` → `View = Plot`.*

Notamos quatro “fases” distintas para a corrente ao longo desta simulação:

- 1) Um pico bastante breve imediatamente após a mudança no nível de *clamp* ($t = 10$ ms). Esta é a corrente capacitiva, correspondente ao acúmulo de carga através da capacitância da membrana.
- 2) Um pico negativo, que representa a corrente extra necessária para contrabalançar a corrente devida aos canais rápidos de Na^+ , mantendo V constante.
- 3) Uma corrente positiva continuada, em resposta ao aumento da condutância de Potássio.
- 4) Uma corrente transiente de menor amplitude, após o *clamp* retornar ao potencial de repouso (pequeno pico positivo logo após $t = 40$), devido à mudança na *driving force* ($V - E_K$) e o fechamento gradual dos canais de K^+ para este valor do potencial de membrana.

Lembremos que o potencial de membrana e a corrente do *clamp* (janelas `Graph[0]` e `VClamp[0]`) eram as únicas variáveis acessíveis e controláveis nos experimentos de Hodgkin e Huxley. As variáveis mostradas nos outros gráficos não são observáveis diretamente, só sendo possível determiná-las em simulações.

A corrente de Potássio

Para estudar a corrente de Potássio individualmente, Hodgkin e Huxley substituíram os íons Na^+ da solução extracelular por Colina (íon não permeante), o que efetivamente elimina a contribuição dos canais de Sódio para a corrente transmembrânica. Você pode simular estes experimentos mudando o valor da condutância máxima de Sódio (janela `Simulation Parameters`) para 0 S cm^{-2} . Rode a simulação novamente, e note que o pico negativo na corrente de *clamp* desaparece.

Vamos agora estudar a condutância de K^+ com mais detalhe. Note que as séries temporais para a corrente e condutância (janelas `VClamp[0]`, `Graph[2]` e `Graph[1]`) mostram uma subida lenta logo após o degrau, mas que começa a acelerar até enfim atingir o valor estacionário. Para reproduzir este formato, HH utilizaram um expoente na variável que descreve a ativação dos canais de potássio (n), modelando a condutância como (\bar{g}_K é `gkbar_hh` no simulador)

$$g_K = \bar{g}_K n^4$$

É possível (embora esta variável não seja acessível experimentalmente!) obter a série temporal da variável de ativação n . Para tanto, vá à janela `NEURON Main Menu` → `Graph` → `State axis` para gerar um gráfico de variáveis de estado. Na nova janela que se abrirá, clique com o botão direito, e escolha `Plot what?`. No menu que se abre, selecione `soma.` na coluna da esquerda e depois em `n_hh` na coluna do meio. Faça o mesmo para as variáveis de (in)ativação do canal de Sódio, `m_hh` e `h_hh`. Para diferenciar curvas no mesmo gráfico, você pode mudar as cores de cada uma, clicando com o botão direito sobre a janela, escolhendo `Color/Brush`, selecionando uma cor no menu que aparece, e finalmente clicando sobre a curva (ou no nome da variável na legenda).

Retorne agora a condutância de Sódio para seu valor padrão (0.12 S cm^{-2}), e refaça o experimento de *voltage clamp*, desta vez com a condutância de Potássio reduzida a zero. Preste atenção aos diferentes comportamentos das variáveis de ativação / inativação. Repita este procedimento para alguns valores do potencial de *testing* (10 mV, -10 mV, -30 mV, -50 mV). Você pode sobrepor as curvas, clicando com o botão esquerdo no gráfico e selecionando `Keep Lines`.

Exercícios

- 1) No modo *voltage clamp*, faça gráficos dos valores estacionários (ao final da fase *testing*, ou seja, $t \approx 35$ ms), em função da tensão de *clamping*, das seguintes variáveis:

- condutâncias $g_{Na}^{\infty}(V)$, $g_K^{\infty}(V)$
- ativação/inativação $n^{\infty}(V)$, $m^{\infty}(V)$, $h^{\infty}(V)$
- correntes $I_{Na}^{\infty}(V)$, $I_K^{\infty}(V)$

Escolha os seguintes valores de tensão para o degrau: $V_{\text{clamp}} = [-120, -100, \dots, 80]$ mV. Para fazer estes gráficos, você deve anotar cada valor de tensão, e “medir” o valor estacionário em questão usando o cursor (clique direito sobre o gráfico, depois `Crosshair`), obtendo assim os pares [tensão, variável] para o gráfico.

- 2) Com base nos gráficos anteriores, responda:

- Quais são as diferenças principais entre gráficos de corrente e de condutância?
- O que estes gráficos permitem inferir acerca dos potenciais de reversão de cada íon?

- 3) No modo *voltage clamp*, examine o efeito de pulsos hiperpolarizantes anteriores ao pulso *testing* (pulsos de *conditioning*). Para tanto, escolha algumas tensões de *conditioning* entre o potencial de equilíbrio e -120 mV (duração de 15 ms), mantendo o nível de *testing* em 0 mV. Qual é o efeito destes pulsos de condicionamento nas condutância de Sódio e Potássio? Descreva, no contexto do modelo de HH, os mecanismos responsáveis por tais efeitos.
- 4) Com base nas figuras e respostas aos itens anteriores, escreva um texto curto (3 a 4 parágrafos) discutindo as principais diferenças entre as correntes de Na^+ e K^+ , e seu papel na excitabilidade neuronal.
- 5) Mude agora para o modo de *current clamp* (`I/V Clamp Electrode` \rightarrow `IClamp`). Ajuste o *delay* para 5 ms e a duração dos pulsos para 25 ms. Encontre a corrente mínima (positiva) necessária para induzir o disparo de um único potencial de ação (este valor se chama *reobase*). Quão “preciso” é este valor crítico (“limiar”)? É possível encontrar valores de corrente que dão origem a potenciais de ação com amplitudes intermediárias?
- 6) Ainda em *current clamp*, aplique agora pulsos com 200 ms de duração, ajustando o tempo total de simulação (`RunControl` \rightarrow `Tstop`) a 205 ms. Qual é a corrente mínima para produzir disparo tônico (trens de potenciais de ação)? Quão “precisa” é a transição do disparo de um único PA ao modo tônico? Você consegue achar um valor de corrente que cause exatamente dois potenciais de ação?
- 7) Construa um gráfico do número de potenciais de ação num intervalo de 200 ms, em função da corrente aplicada. O que acontece com o número de spikes se aumentarmos a corrente injetada em 10 vezes? e em 100? Justifique este resultado com base no modelo de HH.
- 8) Na questão 5, vimos que é possível gerar potenciais de ação isolados aplicando níveis constantes de corrente. Também é possível induzir o disparo de PAs com pulsos transientes de corrente, mesmo se a duração do pulso for inferior àquela do PA. Qual é o efeito da duração do pulso no limiar de corrente necessário para que seja disparado um único PA? Faça um gráfico dos limiares contra duração do pulso, para pulsos de largura entre 0.1 ms e 5 ms. Há alguma relação simples entre largura do pulso e limiar de corrente? (atenção: use um passo de integração de 0.0125 ms para este exercício, mudando o valor de dt em `RunControl`).
- 9) Todos os exercícios anteriores usaram pulsos depolarizantes de corrente. O que acontece para pulsos hiperpolarizantes (ajuste a amplitude do pulso para -0.01 nA e a duração para 5 ms)? Qual é o limiar, em termos da magnitude da corrente e duração do pulso, para induzir este efeito, conhecido como *anode break excitation*? Quais mecanismos do modelo são responsáveis por este comportamento? Sugestão: estude as séries temporais das variáveis de ativação e inativação n , m e h .