



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico e canais iônicos

Aula 6

Potencial eletroquímico.

Canais iônicos.

Voltage-clamp.

Patch-clamp

Jiří Borecký
CCNH
2014



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico

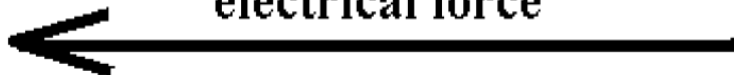
Potencial eletroquímico e canais iônicos

A		B	
1M NaCl	-	+	0.1 M NaCl
	-	+	
	-	+	
	-	+	
	-	+	
	-	+	
	-	+	
	-	+	

concentration force



electrical force



- 2 compartimentos separados por membrana permeável somente para Na^+
- Potencial eletroquímico é soma de potencial padrão, potencial químico e potencial elétrico:

$$\tilde{\mu} = \mu_0 + \mu_{\text{quim}} + \mu_{\text{el}}$$

$$\mu_{\text{quim}} = RT \ln(c)$$

$$\mu_{\text{el}} = zFE$$

$$\tilde{\mu} = \mu_0 + RT \ln(c) + zFE$$

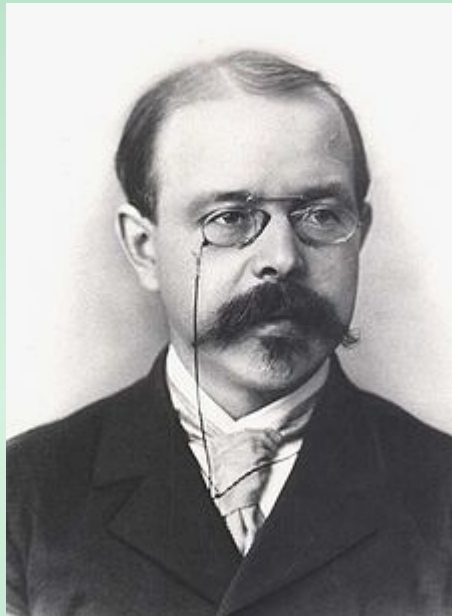


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico

Potencial eletroquímico e canais iônicos



Walther Hermann Nernst
(25 Jun 1864 – 18 Nov 1941)

➤ A diferença $\tilde{\mu}_B - \tilde{\mu}_A$ através da membrana, o $\Delta \tilde{\mu}$ é definida como

$$\Delta \tilde{\mu} = RT \ln \left(\frac{c_B}{c_A} \right) + zF\Delta V_{(B-A)}$$

$$\begin{array}{l} RT \ln(c_B/c_A) \\ zF\Delta V \end{array} \begin{array}{l} \text{➤ Força de concentração} \\ \text{➤ Força elétrica} \end{array}$$

➤ No equilíbrio, o $\Delta \tilde{\mu} = 0$, então

$$RT \ln \left(\frac{c_A}{c_B} \right) = zF\Delta V_{(B-A)}$$

➤ Rearranjando para a forma de equação de Nernst

$$\Delta V_{(B-A)} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{c_A}{c_B} \right)$$



Equação de Goldman-Hodgkin-Katz

➤ A equação de Nernst é para um íon só. Independentemente, o David E. Goldman (EUA) e dois outros, Sir Alan Lloyd Hodgkin (inglês) and Sir Bernard Katz (judeu alemão) descobriram a equação que descreve o potencial de N cátions e M ânions:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{out} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{in}}{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{in} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{out}} \right)$$

➤ Para membrana biológica que separa conjunto de íons K_x^+ , Na_{1-x}^+ , Cl^-

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{K_i^+} [K_i^+]_{out} + P_{Na_i^+} [Na_i^+]_{out} + P_{Cl_i^-} [Cl_i^-]_{in}}{P_{K_i^+} [K_i^+]_{in} + P_{Na_i^+} [Na_i^+]_{in} + P_{Cl_i^-} [Cl_i^-]_{out}} \right)$$



Equação de Goldman-Hodgkin-Katz

➤ Existe ainda uma contribuição de **transporte ativo** das **bombas iônicas eletrogênicas**, como a Na^+, K^+ -ATPase, que **geram gradientes de íons**. A equação de Goldman-Hodgkin-Katz que considera estas bombas é

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{out} + \sum_j^M P_{A_i^-} [A_i^-]_{in} + J_{bomba}}{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{in} + \sum_j^M P_{A_i^-} [A_i^-]_{out}} \right)$$

➤ Se inibir a Na^+, K^+ -ATPase por ouabaina, o potencial de neurônio cai tipicamente 10-15 mV.

➤ A contribuição de bombas eletrogênicas varia muito célula a célula. Por exemplo, nos neutrófilos, o potencial é construído praticamente por estas bombas – quando inibidas, o potencial cai até 0 mV.



Universidade Federal do ABC

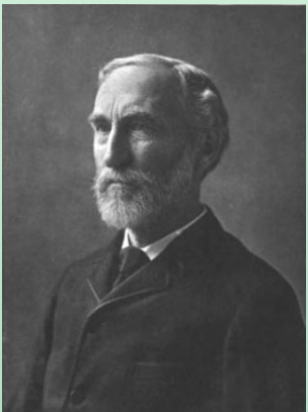
BC-1308 Biofísica

Equilíbrio de Donnan

Potencial eletroquímico e canais iônicos



Frederick George Donnan
(6 Set 1870 – 16 Dec 1956)



Josiah Willard Gibbs
(11 Fev 1839 – 28 Abr 1903)

➤ Membrana permeável para K^+ e Cl^- mas impermeável para X^-

- Cloreto tende ir do B para A – gradiente de concentração
- Potássio acompanha o cloreto para manter eletroneutralidade

$$\Delta \tilde{\mu}_K = RT \ln \left(\frac{[K^+]_B}{[K^+]_A} \right) + zF(V_B - V_A)$$

$$\Delta \tilde{\mu}_{Cl} = RT \ln \left(\frac{[Cl^-]_B}{[Cl^-]_A} \right) - zF(V_B - V_A)$$

➤ No equilíbrio, $\Delta \tilde{\mu}_{Cl} - \Delta \tilde{\mu}_K = 0$, então

$$[K^+]_A [Cl^-]_A = [K^+]_B [Cl^-]_B$$

A	B
0.1 M K^+ 0.1 M X^-	0.1 M K^+ 0.1 M Cl^-
0 mV	

A	B
$K^+ = 0.1 + Z$ $Cl^- = Z$ $X^- = 0.1$	$K^+ = 0.1 - Z$ $Cl^- = 0.1 - Z$ $X^- = 0$



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Equilíbrio de Donnan

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Consequências elétricas:

- $[K^+]_A = 2 [K^+]_B$
- $2 [Cl^-]_A = [Cl^-]_B$
- Usando eq. de Nernst, o $\Delta V = -18 \text{ mV}$

➤ Consequências osmóticas:

- $[K^+]_A + [Cl^-]_A = 1,25 ([K^+]_B + [Cl^-]_B)$
- $[X^-]_A \gg [X^-]_B$
- Se a membrana for permeável para água, esta vai difundir de B para A
- Células de plantas têm parede rígida que permite formar alta pressão osmótica
- Células de animais bombeiam alguns íons para fora do citoplasma, como Na^+ ; assim a Na^+, K^+ -ATPase tem papel importante na regulação do volume celular.

A	B
$K^+ = 0.133...M$	$K^+ = 0.066...M$
$Cl^- = 0.033...M$	$Cl^- = 0.066...M$
$X^- = 0.1 M$	$X^- = 0$



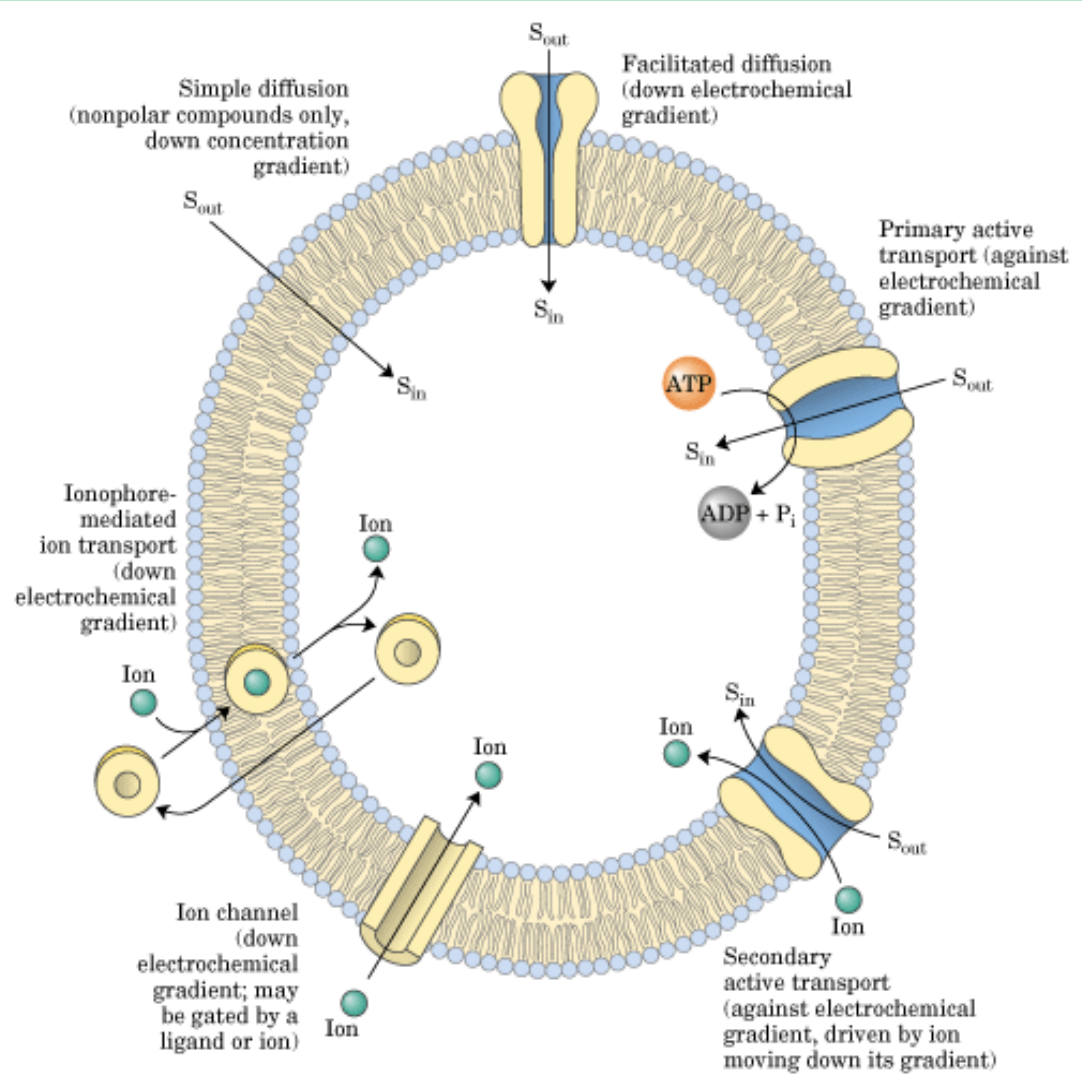
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Transporte através da membrana

Potencial eletroquímico e canais iônicos

- Difusão simples
- Difusão facilitada
 - pelo seu gradiente
- Transporte iônico via ionóforo
- Canal iônico
 - pelo seu gradiente
 - fluxo controlado
- Transporte ativo primário
 - contra seu gradiente
 - acoplado à hidrólise de ATP
- Transporte ativo secundário
 - contra seu gradiente
 - acoplado à passagem de íon pelo gradiente dele





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Potencial da membrana – Bases iônicas

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Membrana plasmática:

- permeável para K^+ , Cl^- , HCO_3^- (canais iônicos respectivos são abertos)
- Impermeável para Na^+ , Ca^{2+} , proteínas aniônicas (A^-)

Concentração de íons			
Intracelular [mM]		Extracelular [mM]	
Na^+	12	Na^+	145
K^+	155	K^+	4
Ca^{2+}	0,0001	Ca^{2+}	2
Cl^-	4	Cl^-	120
HCO_3^-	8	HCO_3^-	27
proteínas (A^-)	155	proteínas (A^-)	0



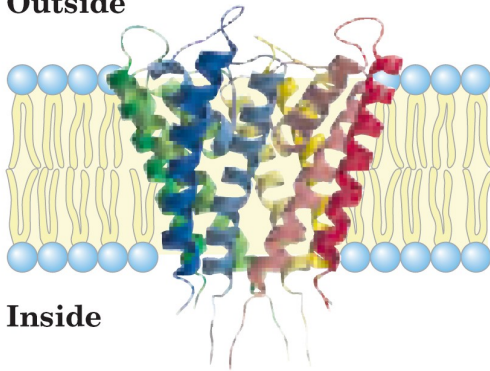
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de potássio

Potencial eletroquímico e canais iônicos

Outside



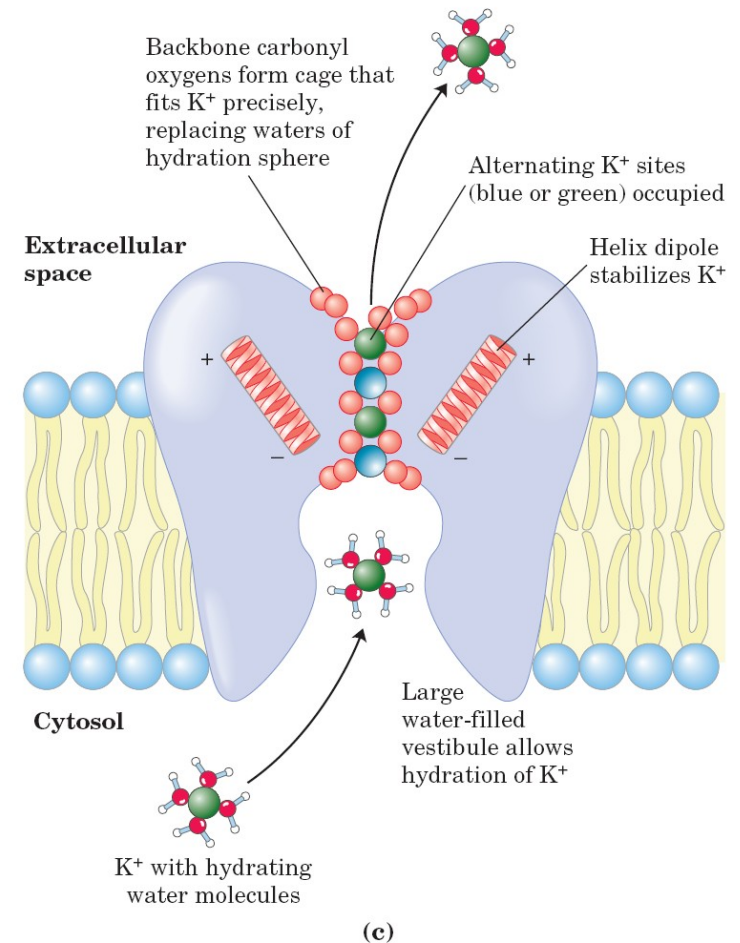
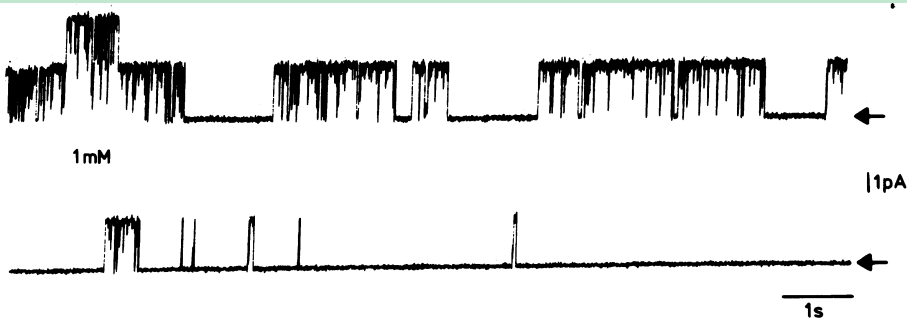
Inside

(a)



(b)

Gravação de flutuações de corrente através de 2 moléculas de canal de K^+





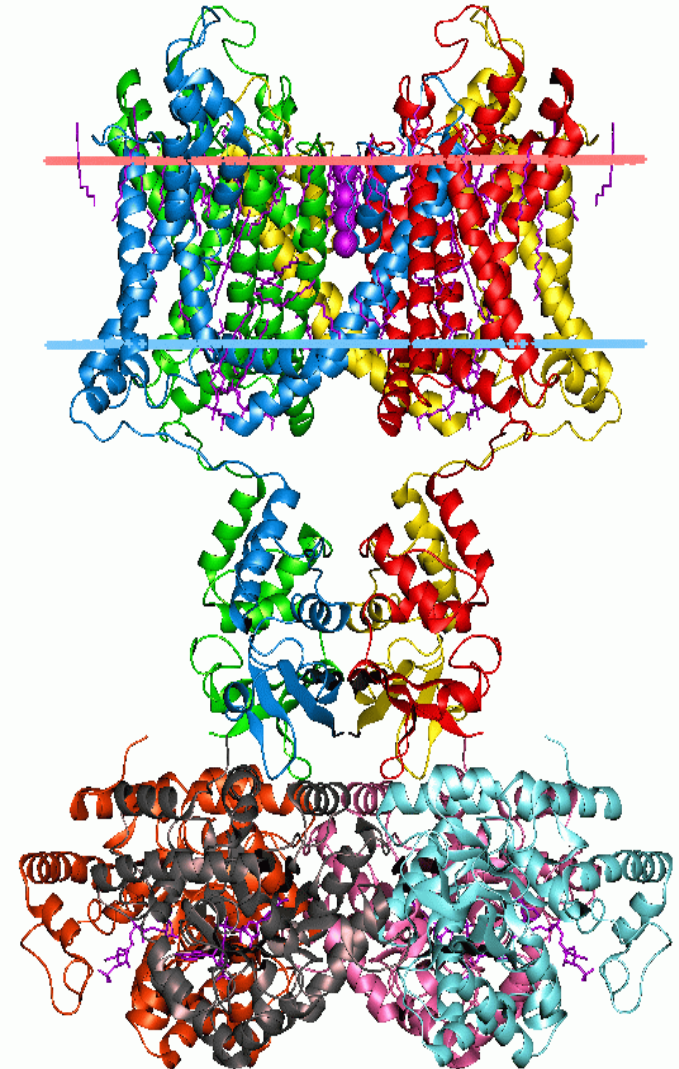
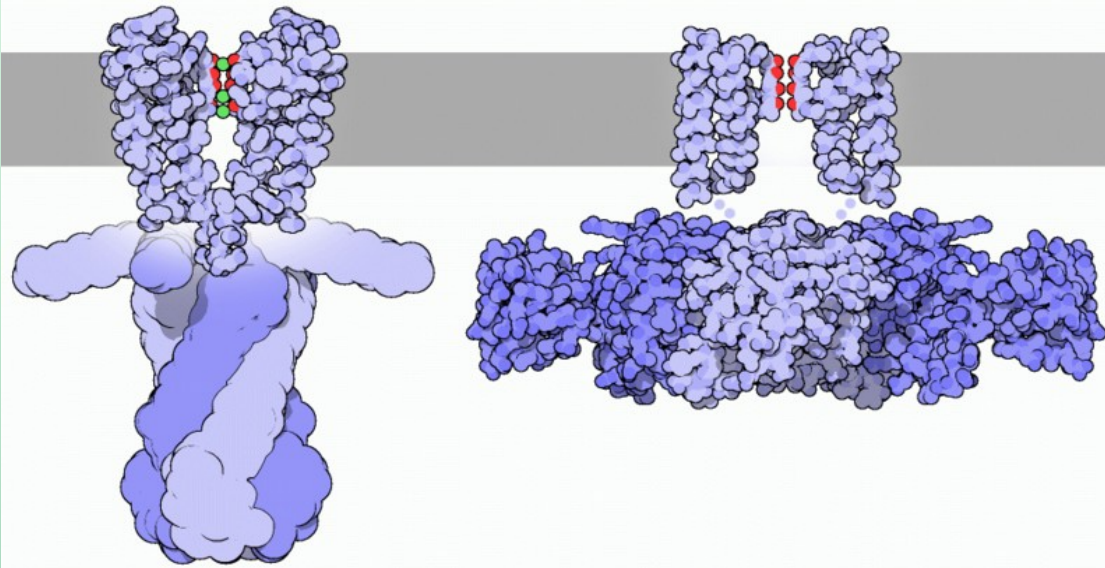
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de potássio

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Canal de potássio disparado por voltagem de bactéria





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de potássio

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Os quatro classes principais de canais de potássio:

- Canal de potássio ativado por Ca – abre-se em resposta a presença de íon de Ca ou outras moléculas sinalizadoras.
- Canal de potássio retificado internamente (*inwardly rectifying*) - passa corrente (carga positiva) melhor para dentro da célula (como um diodo).
- Canal de potássio de domínio de poros em tandem – são constitutivamente abertos ou têm alta ativação basal, por exemplo os “canais de potássio de repouso” que estabelecem o potencial de membrana de neurônios. Quando abertos, permitem a passagem de K^+ com velocidade comparável com sua difusão na água.
- Canal de potássio disparado por voltagem (*voltage-gated*) – são canais que abrem ou fecham em resposta às mudanças do potencial de membrana.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de potássio

Potencial eletroquímico e canais iônicos

Classe	Subclasses	Função	Bloqueadores	Ativadores
Ativados por Ca 6T & 1P	Canal BK Canal SK	inibição após o estímulo elevação de Ca intracelular	apamina caribdotoxina	1-EBIO NS309 CyPPA
<i>retificados interiormemente</i> 2T & 1P	ROMK (Kir1.1)	Reciclagem e secreção de potássio em nefronos	Não selectivo: Ba ²⁺ , Cs ⁺	-
	Regulado por GPCR (Kir3.x)	Media o efeito inibitório de muitos GPCRs	Antagonistas de GPCR - ifenprodila	Agonistas de GPCR
domínio de poros em tandem 4T & 2P	sensível a ATP (Kir6.x)	Fechado quando [ATP] é alta para acionar a secreção de insulina	glibenclamida tolbutamida	diazóxido pinacidila
	TWIK TRAAK TREK TASK	Contribuição a potencial de repouso	-	halotano
disparados por voltagem 6T & 1P	hERG (Kv11.1) KvLQT1 (Kv7.1)	Repolarização do potencial de ação; limitação de frequência dos potenciais de ação (distúrbios causam disritmia)	tetraetilamonio 4-aminopiridina dendrotoxinas (aluns tipos)	retigabina (Kv7)[6]

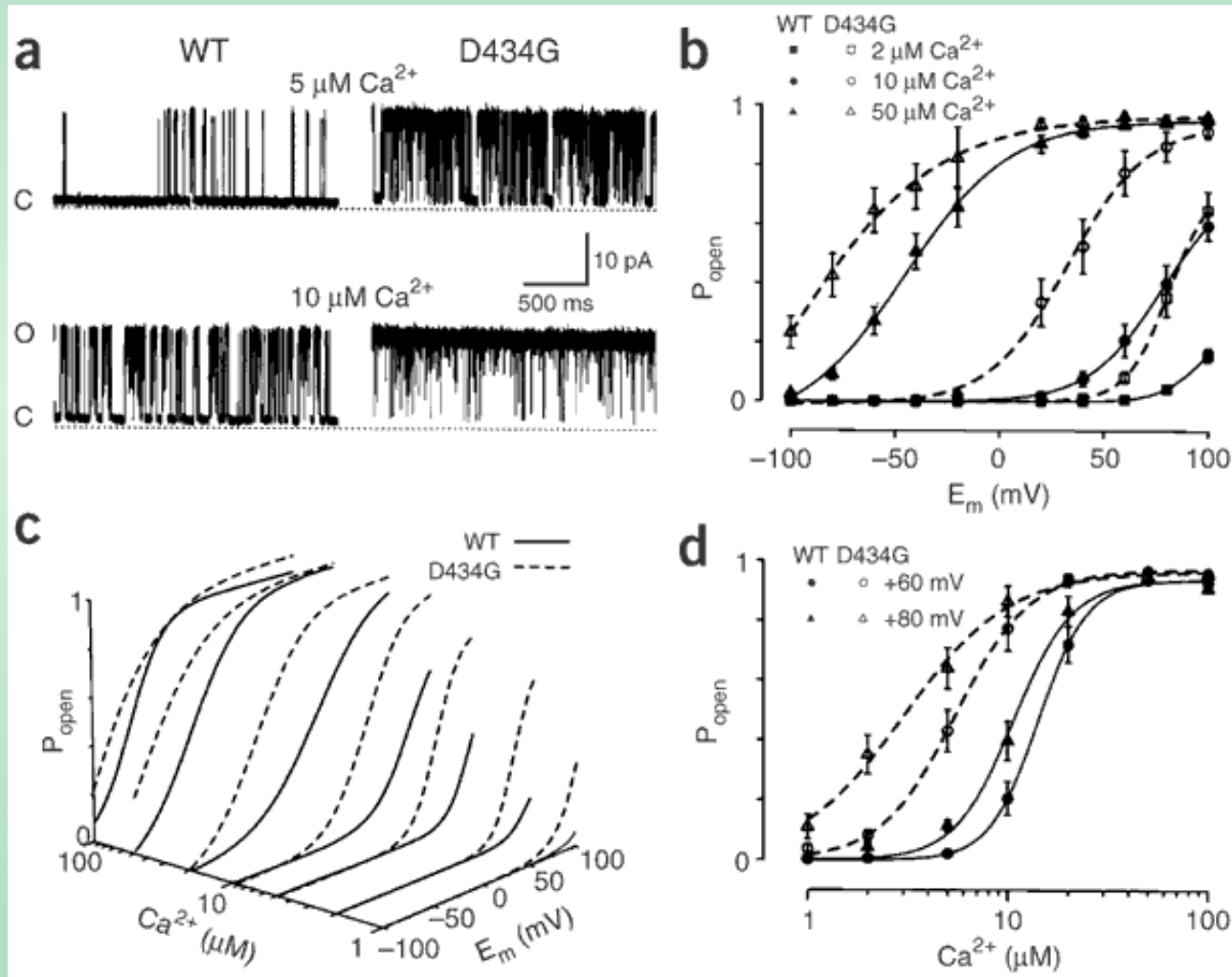


Universidade Federal do ABC

Canal de potássio Ca- e voltagem-dependente

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico e canais iônicos





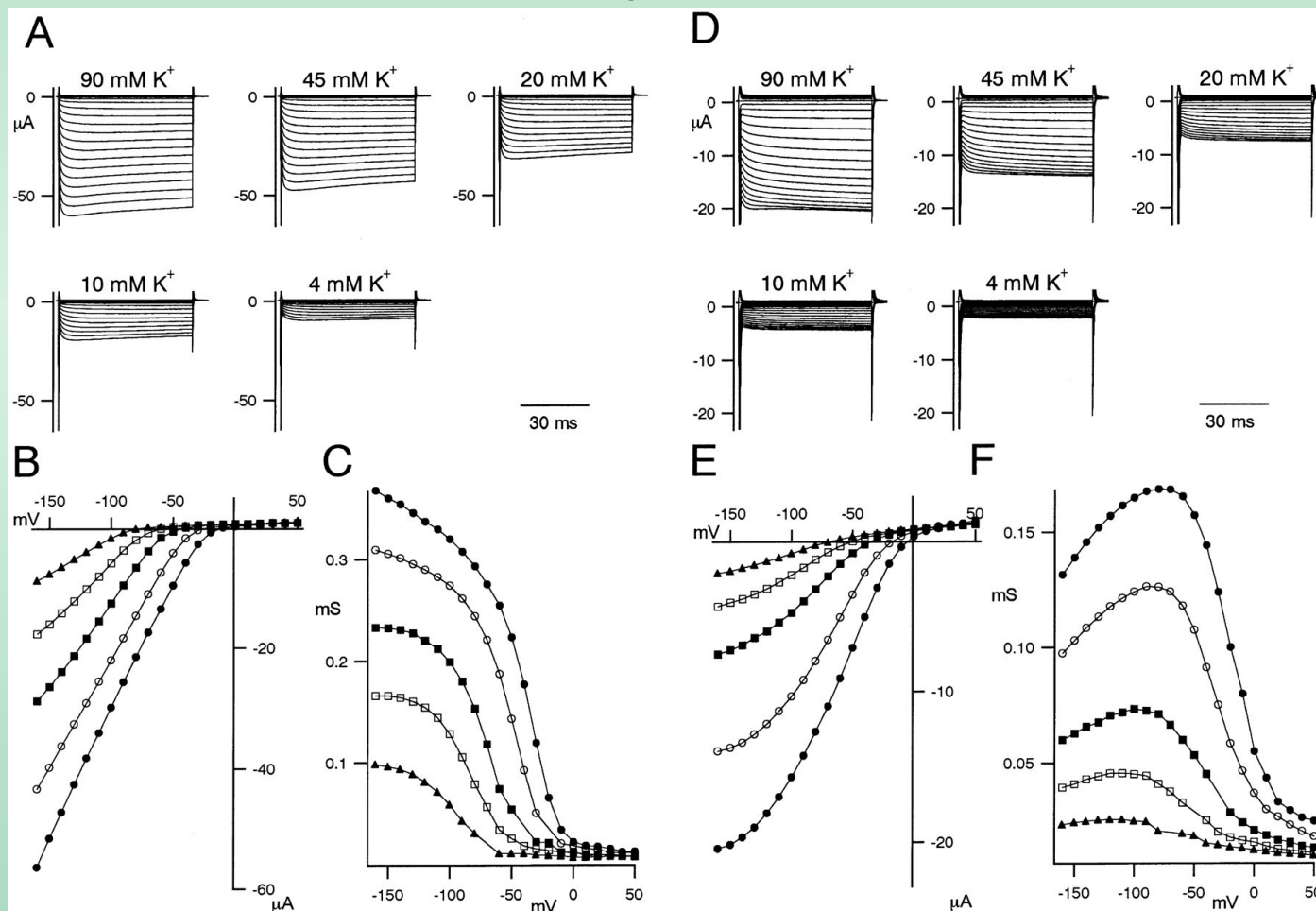
Universidade Federal do ABC

Canal de potássio retificado internamente

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico e canais iônicos

Registro de corrente do homomultímero TuGIRK-A e heteromultímero TuGIRK-A/B em várias concentrações extracelulares de K^+ .



Murata Y et al. J. Biol. Chem. 2001;276:18529-18539

jbc



Universidade Federal do ABC

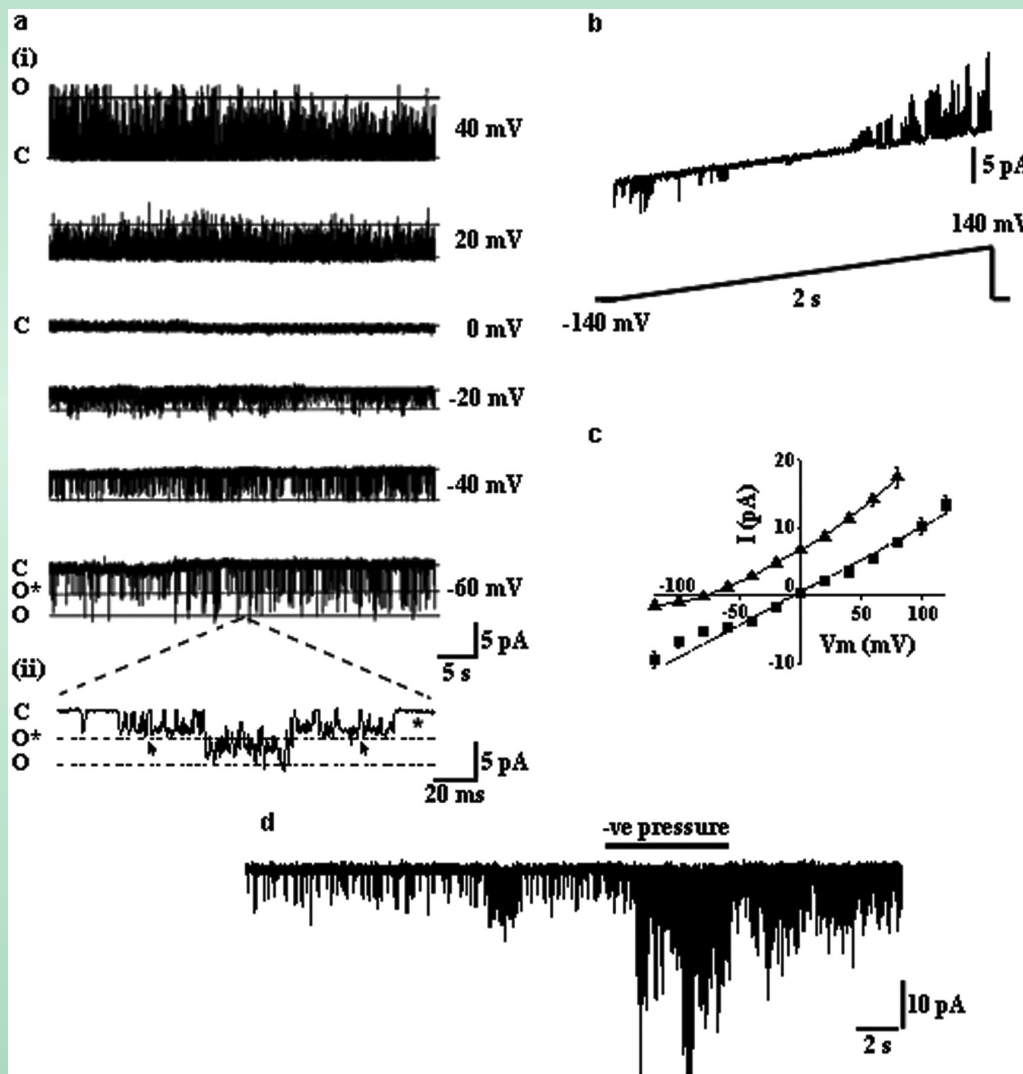
Canal de potássio retificado externamente

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico e canais iônicos

Caracterização de canais únicos de hTREK1 em *patches inside-out*.

Relação de corrente/voltagem de canais únicos obtidas pela medição de amplitude de correntes unitárias em potenciais variados em gradientes de $[K^+]$ simétrico e fisiológico.



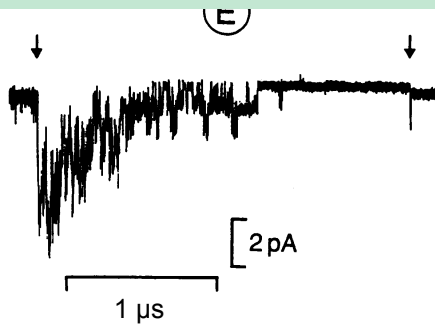
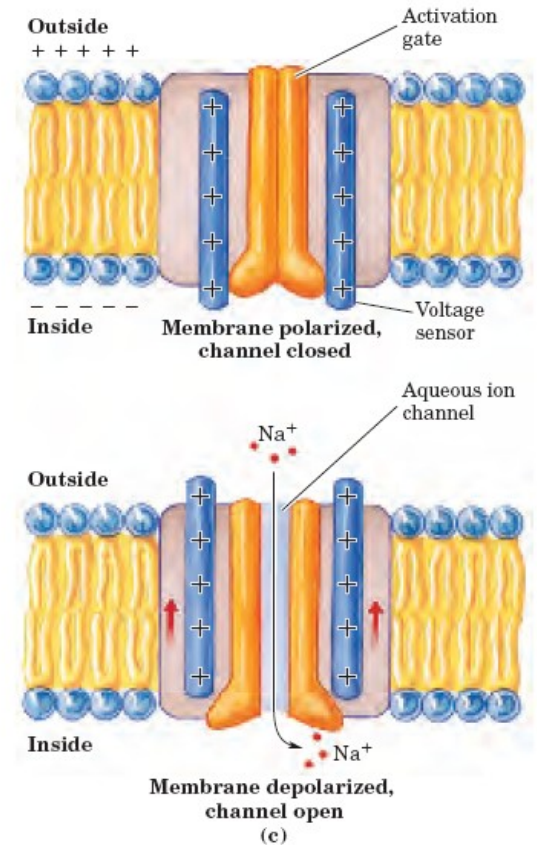
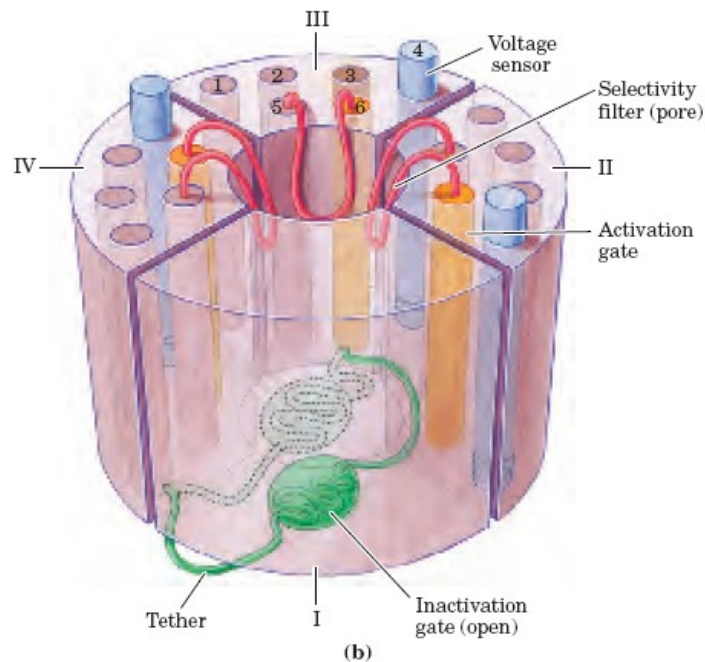


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de sódio

Potencial eletroquímico e canais iônicos



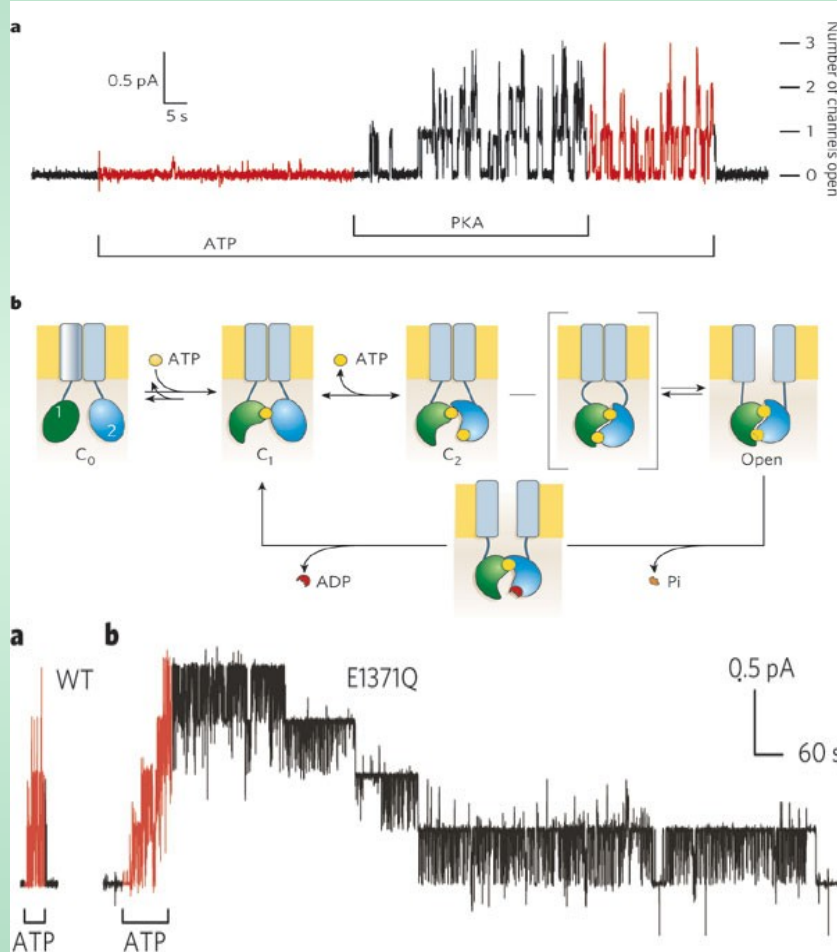


Universidade Federal do ABC

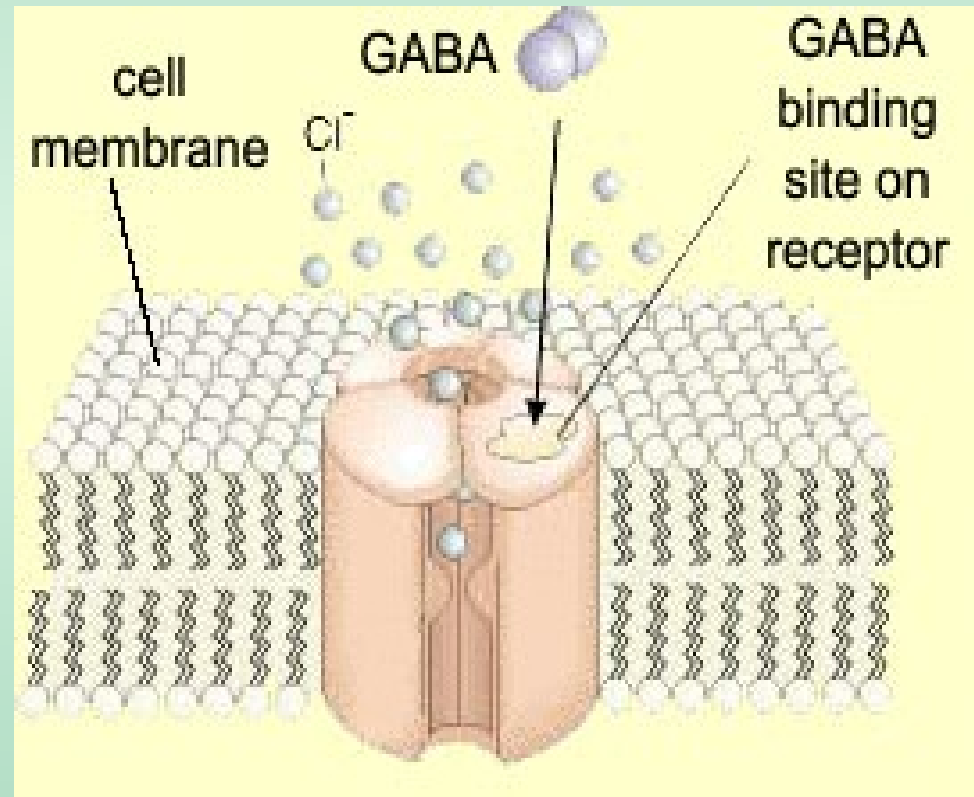
BC-1308 Biofísica

Canal de cloreto

Potencial eletroquímico e canais iônicos



Canal de cloreto de receptor de GABA



Canais de cloreto de CFTR

Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. Mar 23;440(7083):477-83

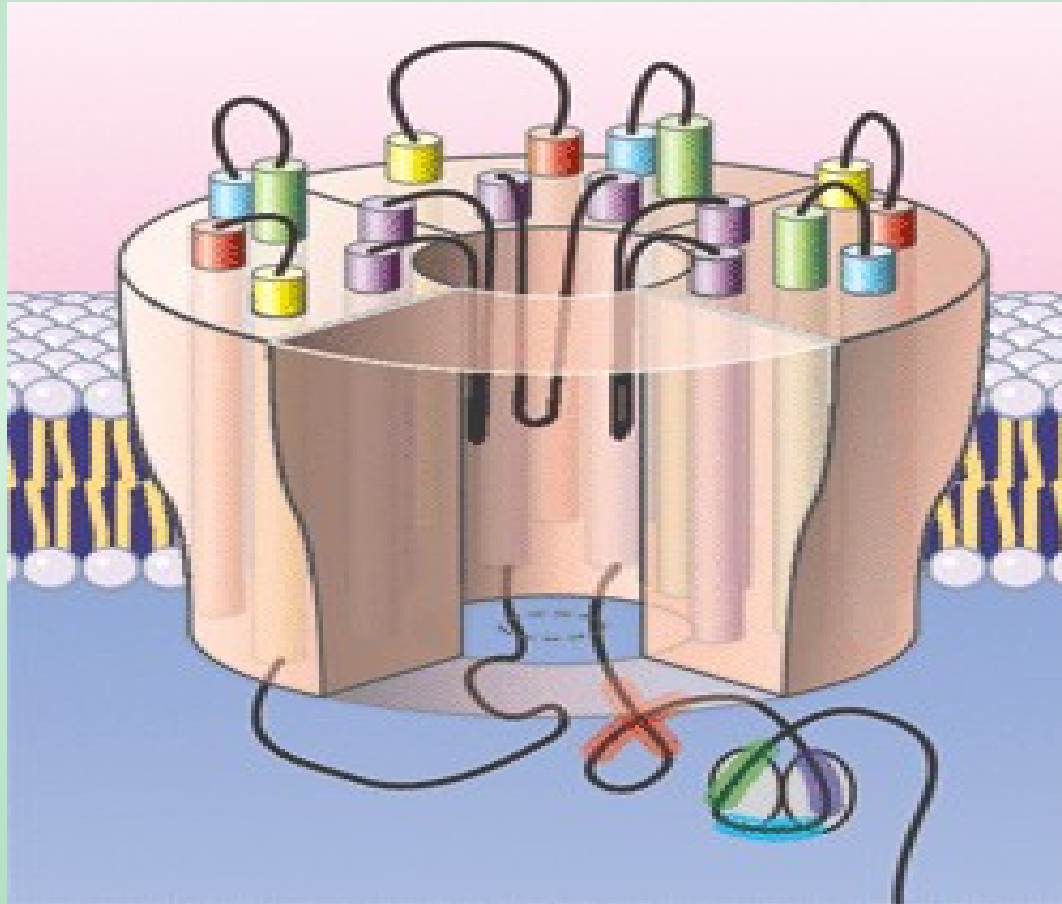


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de cálcio

Potencial eletroquímico e canais iônicos



Canal de cálcio disparado por voltagem é regulado por calmodulina



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal de cálcio

Potencial eletroquímico e canais iônicos

Tipo	Disparado por	Proteína	Gene	Localização	Função
L	Voltagem alta	Cav1.1 Cav1.2 Cav1.3 Cav1.4	CACNA1S CACNA1C CACNA1D CACNA1F	Músculo esquelético, osso (osteoblastos), miócitos ventriculares, dendritos e troncos de dendritos de neurônios corticais	Contração de células de músculo liso e cardíaco. Responsáveis por potencial de ação prolongado em músculo cardíaco.
P Q	Voltagem alta	Cav2.1	CACNA1A	Neurônios de Purkinje neurônios no cerebelo / células granulosas do cerebelo	Liberação de neurotransmissores
N	Voltagem alta	Cav2.2	CACNA1B	Cérebro em geral	Liberação de neurotransmissores
R	Voltagem intermédia	Cav2.3	CACNA1E	células granulosas do cerebelo, outros neurônios	?
T	Voltagem baixa	Cav3.1 Cav3.2 Cav3.3	CACNA1G CACNA1H CACNA1I	neurônios, células com atividade de marca- passo, osso (osteoblastos)	Ritmo regular do sino



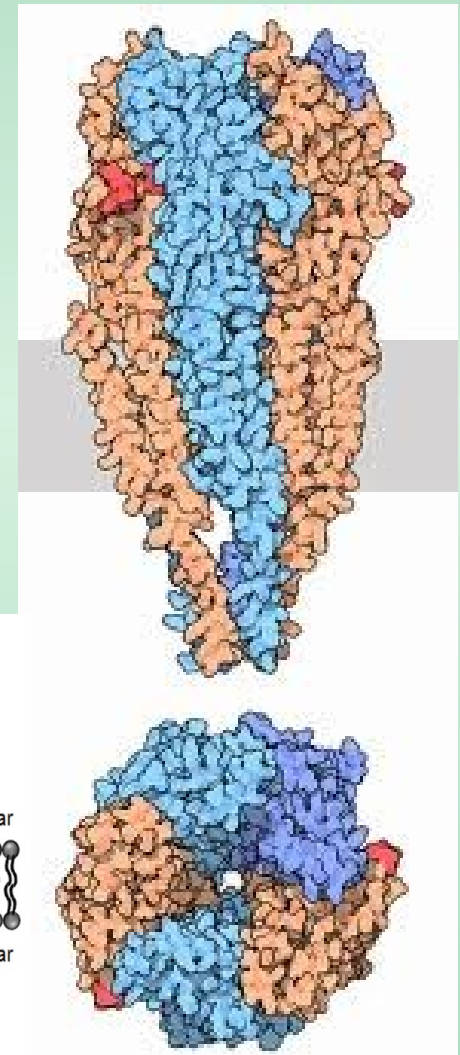
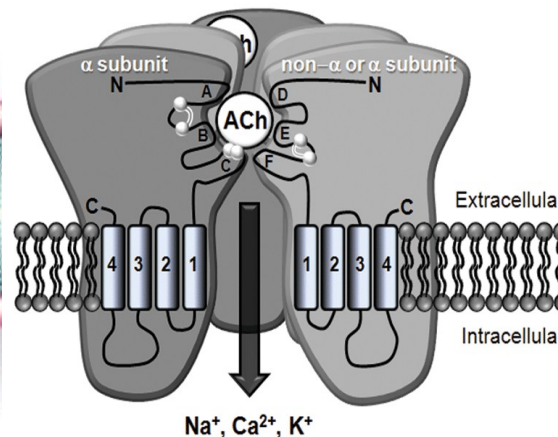
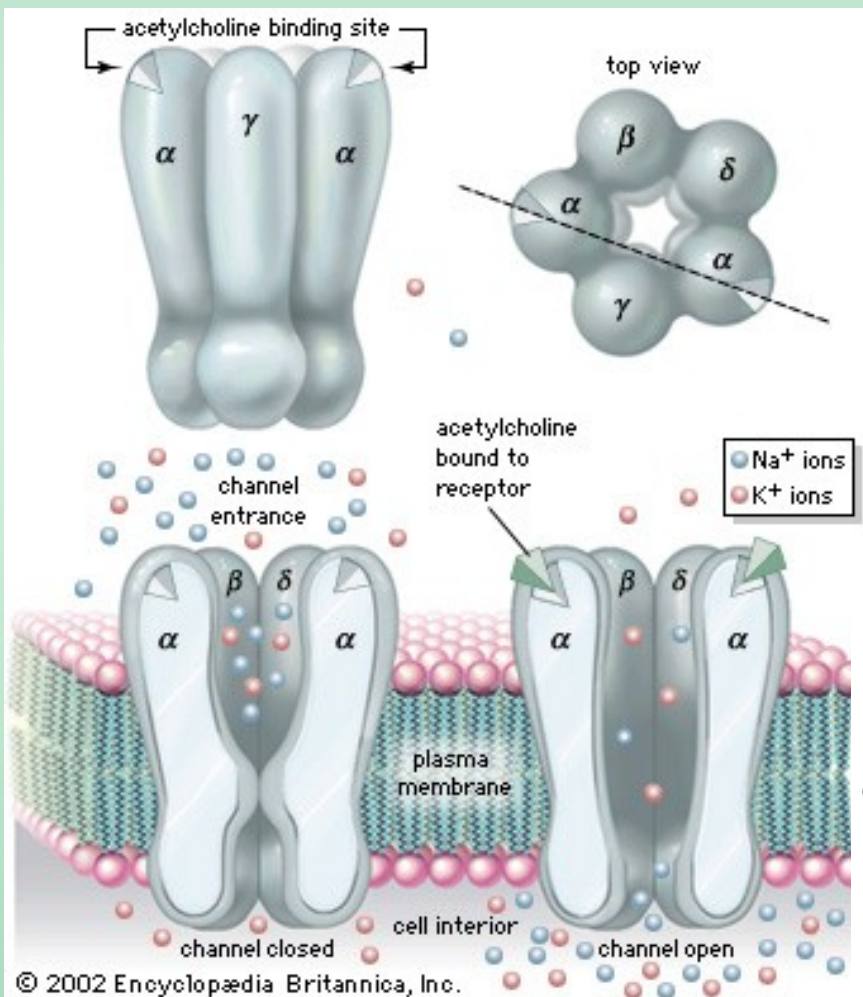
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Canal quimicamente sensível

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Receptor de acetilcolina: canal iônico não seletivo





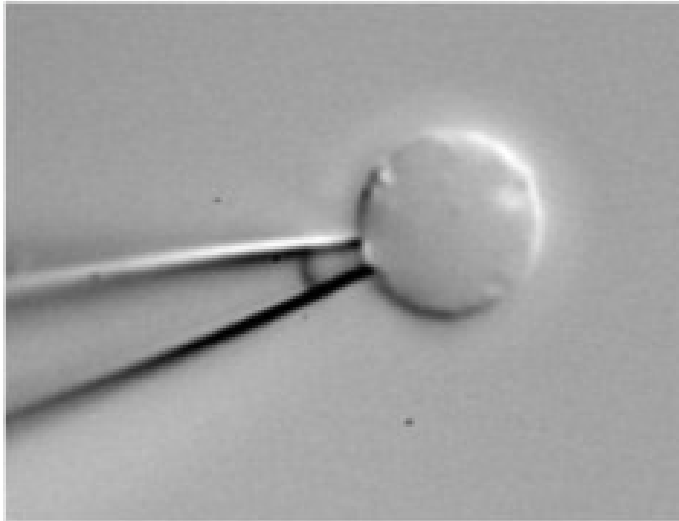
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

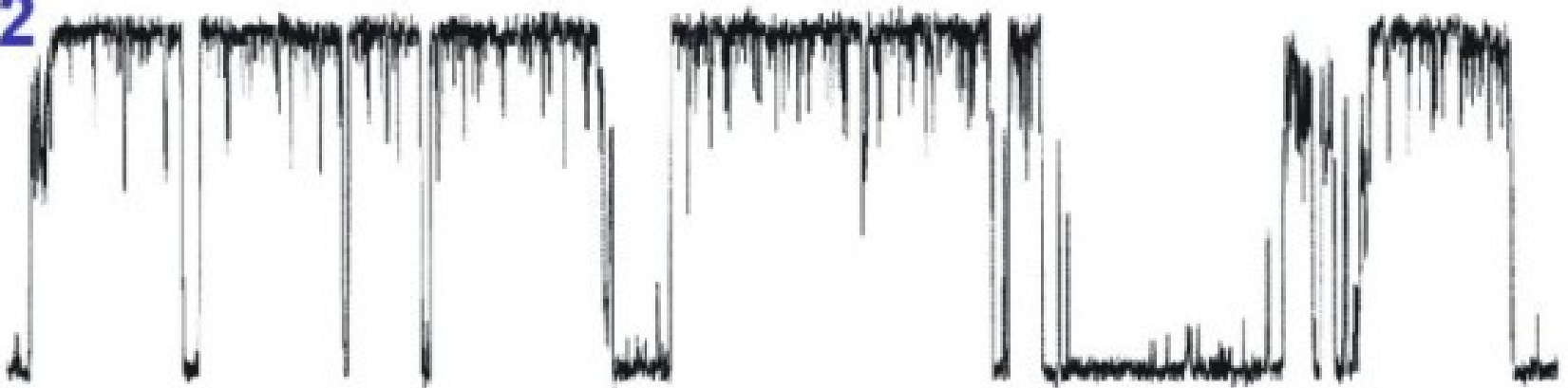
Canal mecano-sensível

Potencial eletroquímico e canais iônicos

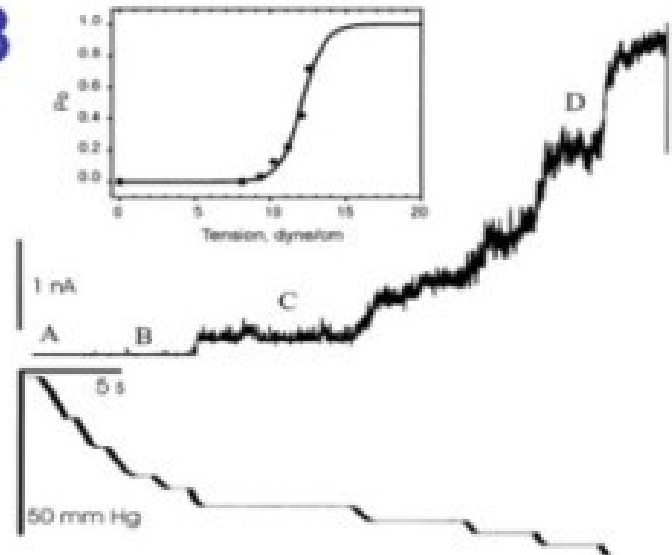
1



2



3





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Método de medir os potenciais da membrana – *patch-clamp*

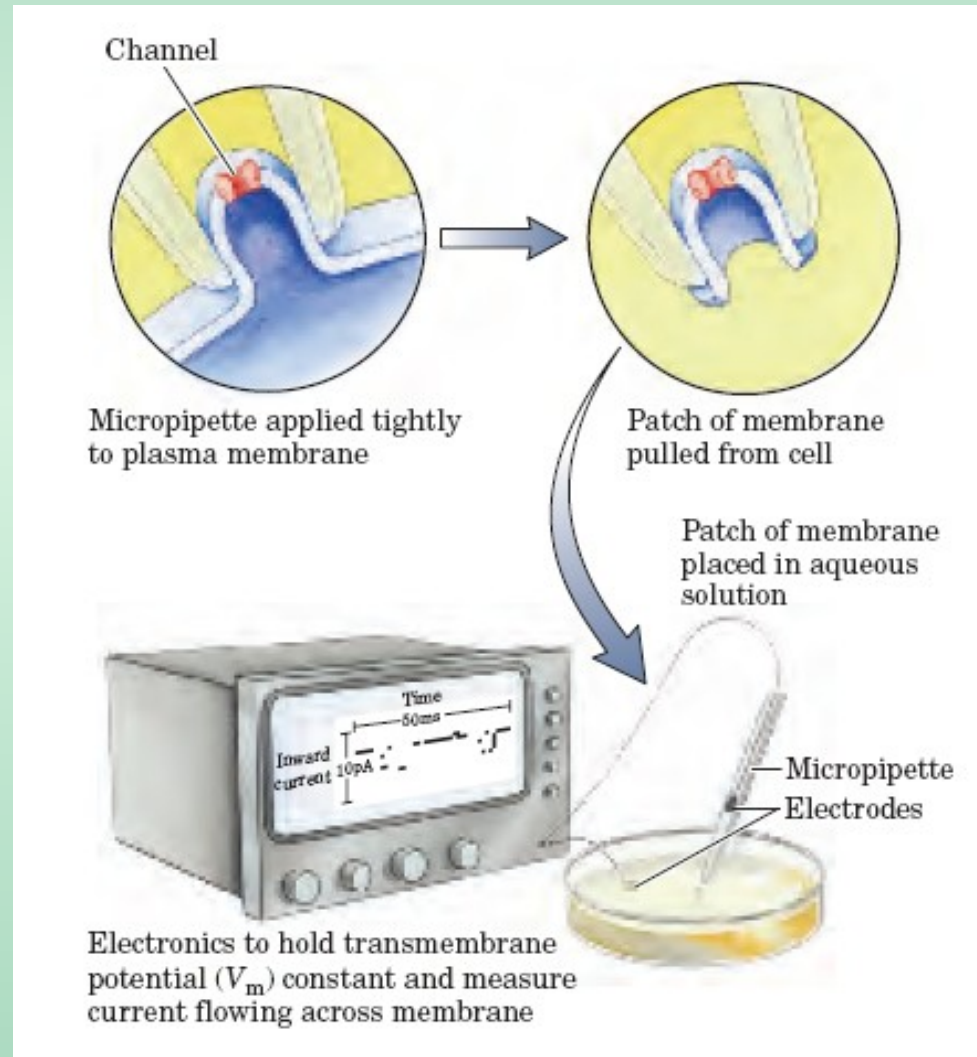
Potencial eletroquímico e canais iônicos



Erwin Neher



Bert Sakmann



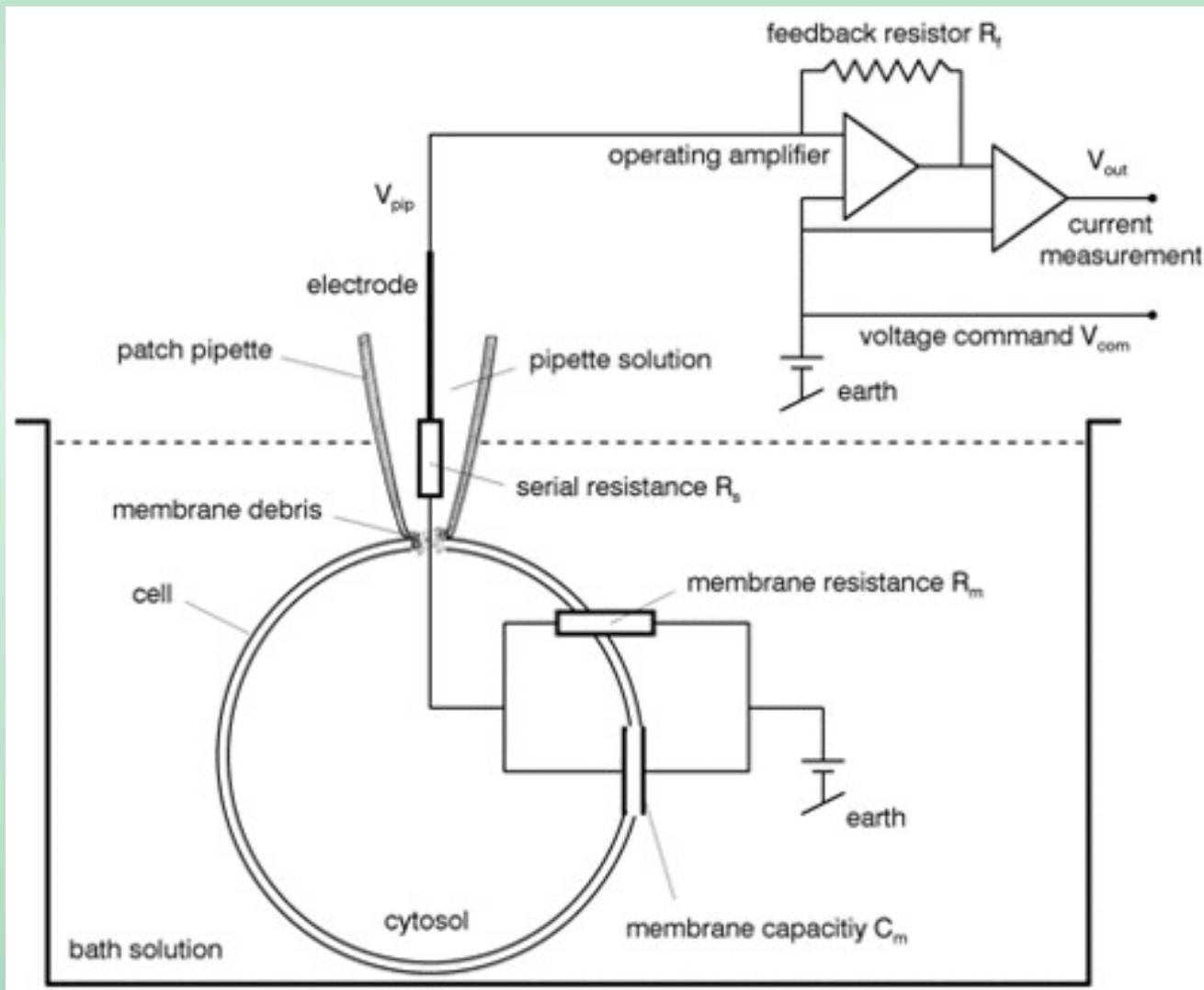


Universidade Federal do ABC

Método de medir os potenciais da membrana – *patch-clamp*

BC-1308 Biofísica

Potencial eletroquímico e canais iônicos





Universidade Federal do ABC

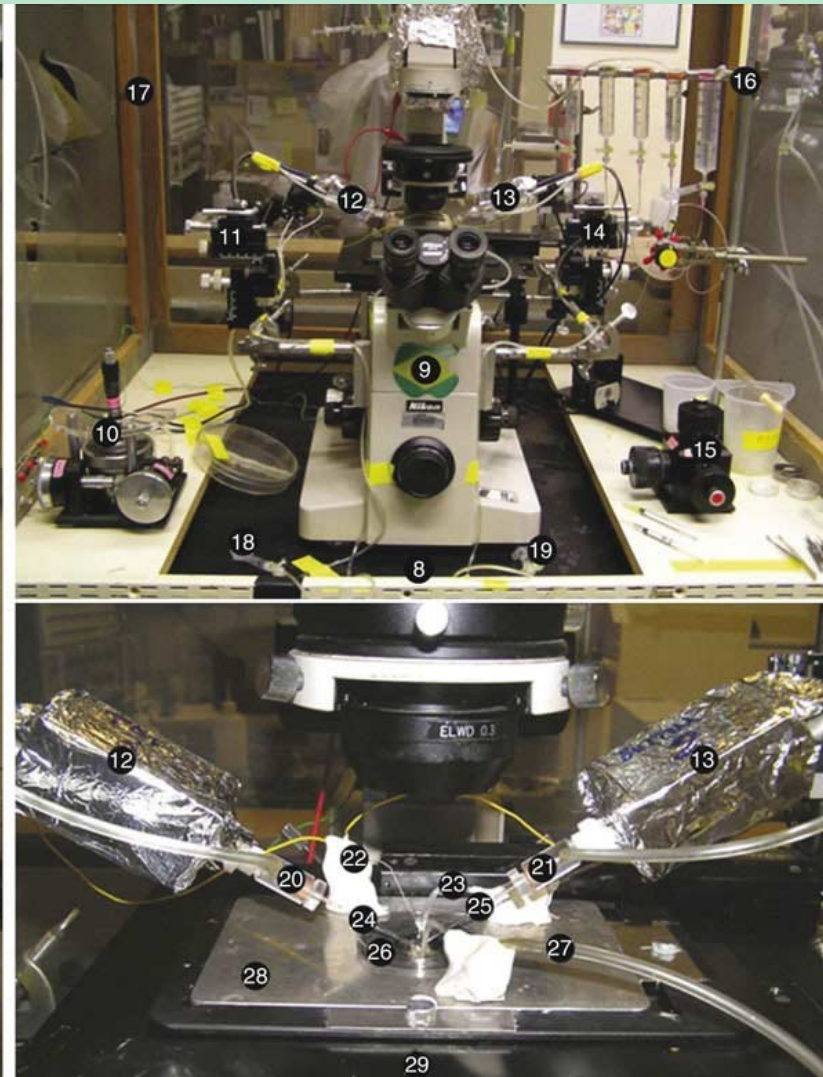
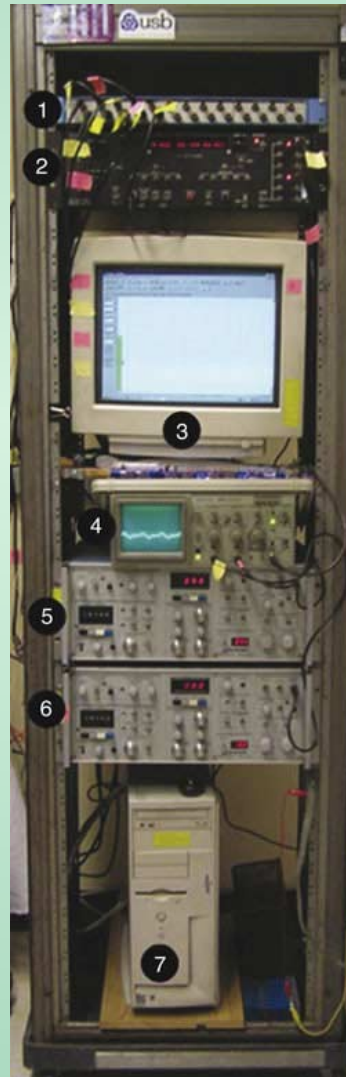
BC-1308 Biofísica

Método de medir os potenciais da membrana – *patch-clamp*

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Aparelho:

- microscópio invertido
- plataforma amortecida
- gaiola de Faraday
- micromanipuladores
- estimulador
- pré-amplificador com eletrodo e micropipeta
- amplificador
- osciloscópio
- sistema de análise





Universidade Federal do ABC

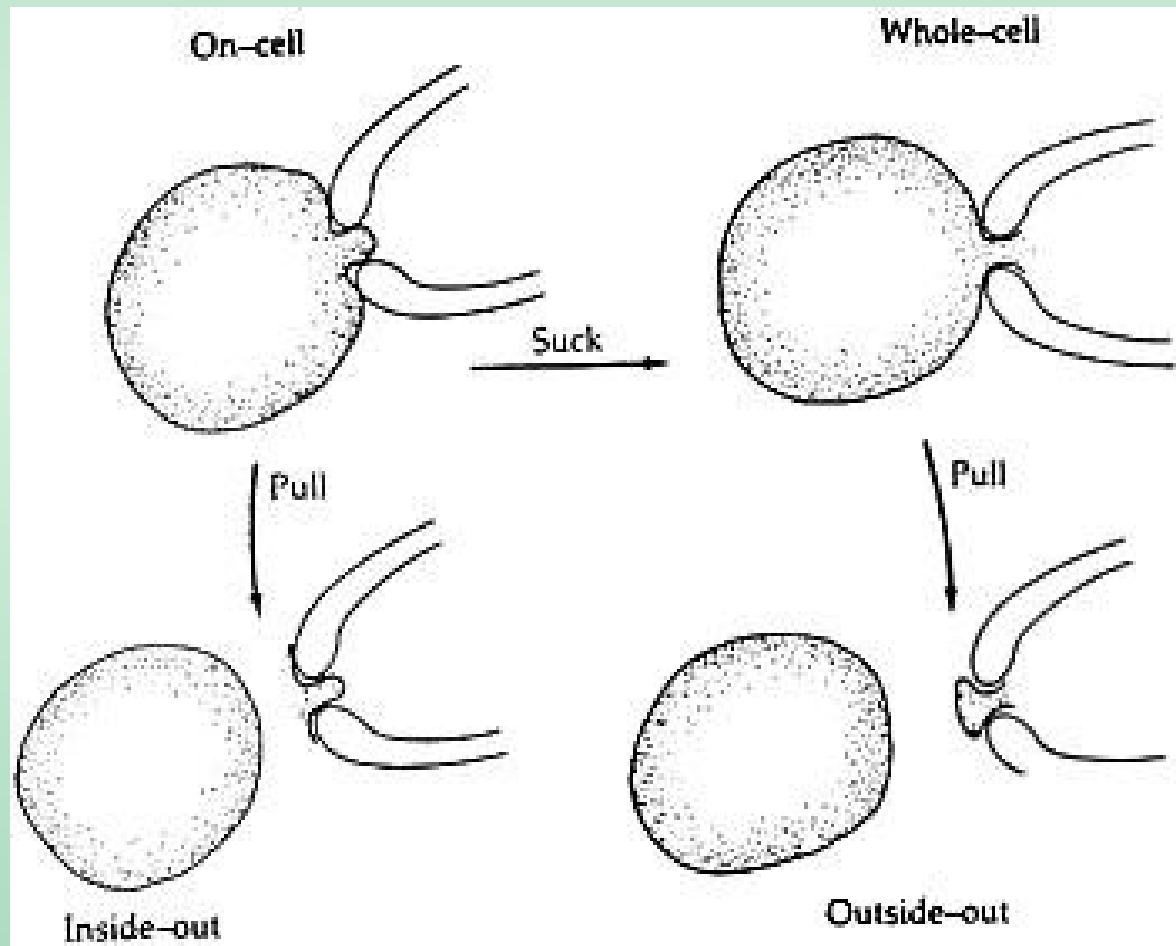
BC-1308 Biofísica

Método de medir os potenciais da membrana – *patch-clamp*

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Modos de *patch-clamp*:

- anexo à célula
- interior p/ fora
- célula inteira
- exterior p/ fora





Universidade Federal do ABC

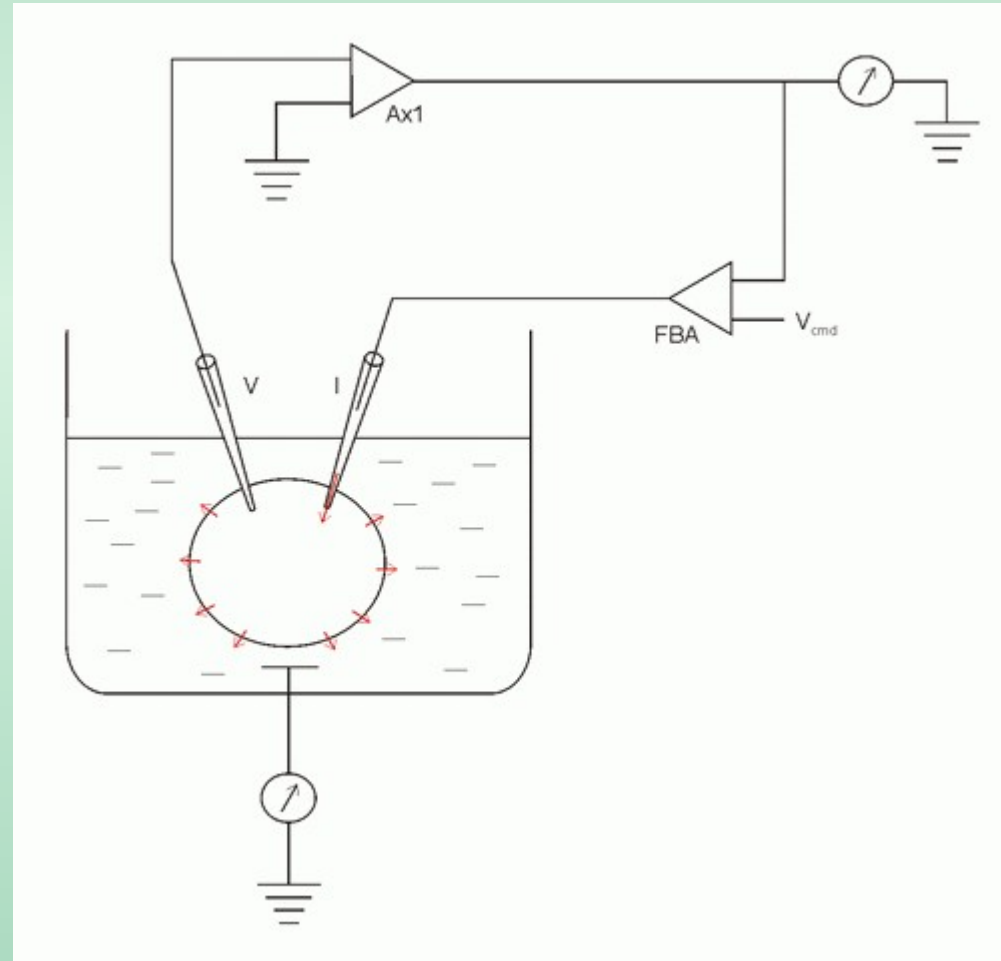
BC-1308 Biofísica

Método de medir os potenciais da membrana – *voltage-clamp*

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Esquema de *voltage-clamp*:

- Eletrodo de voltagem mede o potencial
- Eletrodo de corrente aplica corrente que compensa a ΔV





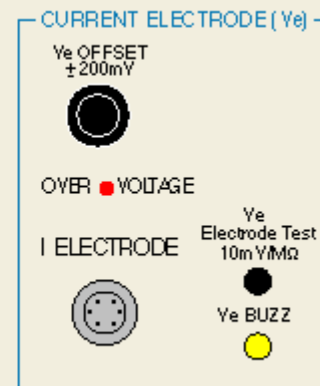
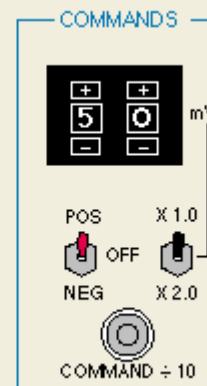
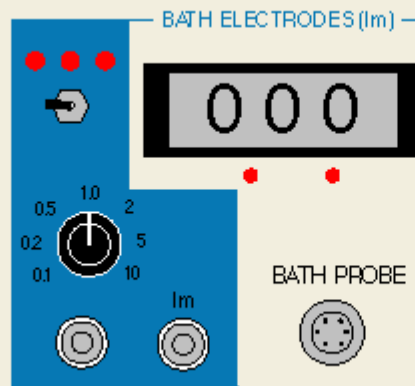
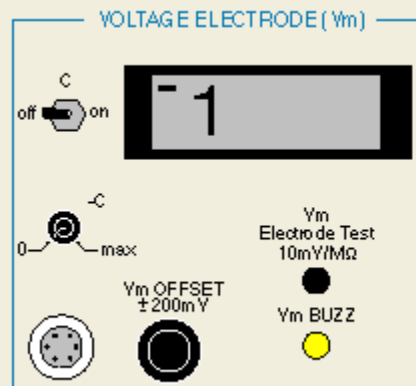
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Método de medir os potenciais da membrana – *voltage-clamp*

Potencial eletroquímico e canais iônicos

➤ Painel frontal do aparelho usado para gravar os sinais de *voltage-clamp*



POWER

