Universidade de São Paulo

Instituto de Física

Modelos Markovianos para Canais Iônicos em Membranas Celulares

Émerson Flamarion da Cruz

Orientador: Prof. Dr. Mário José de Oliveira

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mário José de Oliveira (Orientador - IFUSP)

Prof. Dr. Reynaldo Daniel Pinto (IFUSP)

Prof. Dr. Marcus Vinicius Chrysóstomo Baldo (ICB-USP)

São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Cruz, Émerson Flamarion da

Modelos Markovianos para canais iônicos em membranas
celulares. São Paulo , 2006.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo
Instituto de Física – Depto. de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Mário José de Oliveira
Área de Concentração: Física

Unitermos:

1. Mecânica Estatística Clássica;
2. Física Teórica;
3. Biofísica.

USP/IF/SBI-021/2006

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Mario José de Oliveira pela paciência e inestimável compartilhamento de conhecimento comigo. Sempre atento e preocupado com a qualidade do projeto, foi fundamental em minha formação nestes primeiros passos como pesquisador.

Agradeço ainda minha família, em especial minha mãe Sra. Maria de Lourdes Leandro, sem a qual nada do que sou e represento hoje seria possível.

Finalmente agradeço a DEUS por todas as oportunidades de aprendizado que tem disponibilizado em minha vida, ora através do ingresso em excelentes instituições de ensino, ora através do contato com pessoas ímpares em sua atividade.

Dedico este trabalho ao meu filho Felipe Alberto, por ser a razão de minha constante luta em me tornar uma pessoa melhor a cada dia, para justificar a honra que me foi dada por DEUS em ser seu pai.

Resumo

Estudamos o mecanismo de abertura de canais iônicos presentes na membrana celular de células excitáveis características do sistema nervoso e muscular. O ponto de partida foi a re-interpretação do modelo fenomenológico proposto por HODGKIN E HUXLEY, sob o ponto de vista da Mecânica Estatística. Mais precisamente, considerando o mecanismo de abertura como um *processo markoviano*. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho é representar o mecanismo de abertura dos canais iônicos através de modelos estatísticos de rede e elaborar programas computacionais que simulem o funcionamento dos mesmos.

Foram considerados tanto os canais cuja cinética de abertura é dependente da diferença de potencial elétrico transmembrana, como aqueles dependentes de agentes químicos, denominados *ligantes*, que favorecem (agonistas) ou não (antagonistas) o mecanismo de abertura dos canais iônicos.

Para os canais dependentes de voltagem a modelagem estatística considerou tanto canais que apresentam apenas 2 estados de abertura como os que apresentam o estado *inativado*. Os primeiros referem-se aos canais para o potássio, enquanto os últimos aos canais para os íons de sódio. A partir dos resultados obtidos das simulações computacionais, estudamos o comportamento do fluxo de íons através da membrana celular, representada por uma rede bidimensional, e os comparamos qualitativamente com os resultados obtidos através do modelo fenomenológico proposto por HODGKIN E HUXLEY. Estudamos ainda o efeito de *bloqueadores* atuantes em canais iônicos para o íon sódio, na intenção de simular a ação de anestésicos locais como a *lidocaína*.

Finalmente, estudamos os canais iônicos dependentes de ligantes. Propusemos dois modelos estatísticos que encerram diferentes relações de dependência entre o mecanismo de abertura do canal e a concentração de ligantes na rede. Uma vez simulados computacionalmente, os modelos nos ofereceram dados para o estudo do fluxo de íons através de canais desta natureza.

Abstract

We study the opening mechanism of the ionic channels presents in cell membranes of the excitable membranes characteristics of the nervous and muscle system. The point of departure is a new interpretation of the phenomenological model introduced by HODGKIN E HUXLEY under the point of view of statistical mechanics. More precisely, by considering the opening mechanism of the ionic channels as a Markovian process.

In this way, the main purpose of this work is to represent the opening mechanism of ionic channels by means of lattice statistical models and build computer programs that simulate the way they function.

We consider the channels whose opening mechanism depend on the electric potential difference across the membrane, as well as those that depend on the chemical agents, called ligands, that favor (agonists) or not (antagonists) the open mechanism of the ionic channels.

For the voltage dependent channels, the statistical modeling covered the channels displaying only two opening states as well as those that present an inactive state besides the closing and opening states. The first are related to the potassium channels whereas the second to the sodium ions. From the results coming from the computer simulations, we studied the behavior of the ion flux through the cell membrane, represented by a two-dimensional lattice, and made a qualitative comparison with the results obtained by the phenomenological model introduced by HODGKIN E HUXLEY. In addition, we studied the effect of blockers acting on the sodium ionic channels in order to simulate the action of local anesthetic such as lidocain.

Finally, we study the ionic channels that are ligand dependent. We have proposed two statistical models that have distinct dependent relations between the opening mechanism and the ligand concentration. Once the computer simulations were performed, the model offers data for the study of the flux of ions across the channels of this nature.

Índice

Capítulo 1 – Introdução.....	8
1.1 A célula.....	10
1.2 Transporte através da membrana : Canais iônicos.....	11
1.3 Potencial de membrana.....	13
1.4 A membrana celular como um capacitor.....	19
1.5 O modelo de Hodgkin e Huxley.....	22
1.5.1 Os experimentos com axônio gigante de lula.....	22
1.5.2 A técnica de fixação de voltagem: <i>voltage-clamp</i>	23
1.5.3 O circuito elétrico equivalente para a membrana axonal.....	25
 Capítulo 2 - Modelos Markovianos para Canais Iônicos.....	 34
2.1 Processos Markovianos.....	34
2.2 A Matriz Estocástica.....	36
2.3 A Equação Mestra.....	38
2.4 Relação com o modelo de Hodgkin-Huxley.....	39
2.5 Distribuição de Probabilidades	44
 Capítulo 3 – Canais com 2 estados de abertura.....	 50
3.1 Canais Simples.....	50
3.2 Simulação Computacional.....	52
3.3 Resultados Obtidos e Discussão.....	55
 Capítulo 4 – Canais com estados de inativação.....	 58
4.1 O estado inativado.....	58
4.2 Simulação Computacional.....	59
4.3 Resultados Obtidos e Discussão.....	62

Capítulo 5 – A ação de antagonistas.....	67
5.1 Bloqueadores.....	67
5.2 Simulação Computacional.....	68
5.3 Resultados Obtidos e Discussão.....	70
 Capítulo 6 – Canais ativados por ligantes.....	 73
6.1 Agonistas	73
6.2 Simulação Computacional: Modelo 1.....	74
6.2.1 Resultados Obtidos & Discussão.....	78
6.3 Simulação Computacional : Modelo 2.....	84
6.3.1 Resultados Obtidos e Discussão.....	87
 Capítulo 7 – Conclusão.....	 90
 Apêndices.....	 92
A.1	92
A.2	108
 Referências	 133
 Bibliografia	 135

Capítulo 1

Introdução

Canais iônicos são elementos fundamentais no processo de excitabilidade nas células nervosas, musculares e de outros tecidos. Recentemente, com novas e eficientes técnicas experimentais no campo da bioquímica, farmacologia e biofísica de membranas, muitas informações sobre os canais iônicos vem sendo acumuladas e hoje se reconhece uma grande importância destes componentes presentes na membrana celular inclusive em células não-nervosas como as germinativas, glóbulos brancos e células de glândulas endócrinas. Verifica-se ainda a existência de uma grande diversidade de canais iônicos, por exemplo, uma simples célula excitável pode vários tipos de canais distintos.

Um dos experimentos pioneiros no estudo de canais iônicos é o *voltage-clamp*. Mais de 50 anos de dados de experimentos de voltage-clamp produziram (e ainda produzem!) uma riqueza de detalhes sobre o funcionamento e funções dos canais iônicos. Decorre, então, a necessidade de descrever e catalogar este vasto conjunto de informações. Tal necessidade tem levado biofísicos e fisiologistas à elaborarem modelos empíricos, onde o pioneirismo é atribuído a HODGKIN & HUXLEY. Tais modelos não explicam fisicamente o mecanismo de abertura dos canais, porém são mais acessíveis do que os modelos matemáticos analíticos dada a complexidade inerente ao sistema físico a qual pertencem os canais iônicos. Uma alternativa são os modelos estatísticos, mais acessíveis que os nem sempre possíveis

modelos analíticos e com a vantagem extra de propiciar interpretações físicas acerca de variáveis presentes nos modelos fenomenológicos.

A abordagem estatística é ainda mais interessante quando se verifica experimentalmente que os canais apresentam comportamento típico de um sistema de estados discretos markovianos.

Figura 1.1: O diagrama evidencia o comportamento estocástico da cinética de abertura de um canal iônico, registrando a corrente iônica, em função do tempo, fluindo através dele em um experimento do tipo *patch-clamp*.

(SANCHEZ et al [13])

Muitas doenças cuja etiologia era desconhecida até então, estão sendo esclarecidas à medida que se tem aprofundado o conhecimento genético e biofísico dos canais iônicos, como por exemplo a fibrose cística que ocorre devido a uma mau funcionamento do canal para cloreto. Isso, *per se*, já justifica a exploração de modelos estatísticos e suas correspondentes simulações computacionais buscando enriquecer, ainda mais, o conhecimento de tão importantes estruturas biológicas.

Neste capítulo apresentaremos os canais iônicos, suas principais características morfológicas e importância na fisiologia celular, bem como seus principais ingredientes biofísicos explorados pelos experimentos pioneiros realizados por HODGKIN & HUXLEY [8] através da consagrada técnica do *voltage clamp*.

1.1 – A Célula

A célula é a menor unidade estrutural básica dos seres vivos. Foi descoberta em 1667 pelo inglês Robert Hooke ao observar, com auxílio de um microscópio, uma célula de tecido vegetal morto (cortiça).

Toda célula, fundamentalmente, é constituída de três elementos básicos: o *núcleo*, o *citoplasma* e a *membrana celular*. O *núcleo* é o centro de controle da célula, pois contém toda informação sobre seu funcionamento e de todos os organismos a qual pertence. Em células *eucariontes* o núcleo é envolto por uma membrana porosa que o separa do *citoplasma*. O *citoplasma* é um meio aquoso onde se encontram pequenas unidades funcionais denominadas *organelas*, responsáveis por diferentes tarefas na dinâmica celular. A figura 1.2 ilustra as principais unidades funcionais presentes no interior de uma célula animal.

1. Nucléolo
2. Núcleo celular
3. Ribossomos
4. Vesículas
5. Ergastoplasma
6. Complexo de Golgi
7. Microtúbulos
8. Retículo Endoplasmático Liso
9. Mitocôndrias
10. Vacúolo
11. Citoplasma
12. Lisossomas
13. Centríolos

Figura 1.2 : A célula animal e seus principais constituintes

A *membrana celular* é a estrutura que delimita e separa o citoplasma do meio extracelular. É através dela que ocorre a troca de diversos solutos entre os compartimentos que ela separa. É na verdade uma excelente barreira de permeabilidade seletiva.

Ao longo dos anos vários modelos de *membrana plasmática* foram concebidos, entretanto, o atualmente aceito é o denominado *modelo do mosaico fluido* proposto por SINGER & NICOLSON [15]. Basicamente, o modelo descreve a *membrana celular* como uma *matriz lipídica* onde existem proteínas globulares parcialmente mergulhadas na matriz e outras que atravessam toda a membrana estabelecendo uma ponte entre o meio intracelular e o extracelular.

O modelo do mosaico fluido corresponde a uma série de requisitos morfológicos necessários ao funcionamento celular, entre eles o fato das proteínas intrínsecas, ou integrais, (assim denominadas por atravessarem totalmente membrana), serem possíveis estruturas para os canais iônicos hidrofílicos.

Figura 1.3: A membrana celular e seus principais componentes

1.2 – Transporte através da membrana celular: Canais iônicos

O mecanismo de transporte através da membrana celular pode ser dividido em dois tipos: transporte através de *carregadores* ou transporte através de *poros*. Os *carregadores* podem ser entendidos como uma espécie de rebocador onde as

moléculas engatadas em sítios específicos são rebocadas de um lado à outro da membrana celular, enquanto os *canais iônicos* podem ser entendidos como túneis ligando o meio extracelular com o intracelular.

Na verdade, canais iônicos são *poros macromoleculares* presentes na membrana celular (EISENBERG [4]). São elementos fundamentais no processo de excitabilidade em células excitáveis (como os neurônios e células musculares) A.L. & HUXLEY [1] e sua importância se estende desde o controle do movimento dos cílios através do qual o *Paramecium* se movimenta ao esclarecimento de patologias cujas etiologias eram desconhecidas até então, como a *fibrose cística*, por exemplo. Em 1996, ROJAS [11], em um artigo de revisão, mostrou que várias patologias estão relacionadas a um mau funcionamento de determinado canal iônico.

Figura 1.4: Representação hipotética de um canal iônico para o potássio formado a partir de proteínas integrais de membrana.

Tabela 1.1: Patologias associadas aos defeitos de funcionamento em canais iônicos. (Garcia [5])

Canal Iônico Defeituoso	Patologia
Canal para Sódio (Na^+)	<ul style="list-style-type: none"> - Paralisia periódica hipercalêmica (Doença de Gamstrop) - Paramiotonia congênita (Doença de Eulenburg) - Miotonia atípica - Síndrome do QT longo (gene LQT2)
Canal para Cloreto (Cl^-)	<ul style="list-style-type: none"> - Fibrose cística - Miotonia congênita (Doença de Thomsen) - Miotonia generalizada (Doença de Becker)
Canal para Potássio (K^+)	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome do QT longo (genes LQT1 e LQT3)
Canal para Cálcio (Ca^{+2})	<ul style="list-style-type: none"> - Paralisia periódica hipocalêmica - Hipotermia maligna

Tais fatos aliados à importância dos canais iônicos na excitabilidade dos nervos e músculos, levam atualmente muitos cientistas a estudarem as propriedades e características dessas estruturas de transporte transmembrana. Um estudo mais detalhado sobre canais iônicos pode ser obtido em HILLE [7].

1.3 – Potencial de membrana

A membrana celular é uma barreira semipermeável a alguns íons. No caso em que há uma *diferença de concentração iônica* entre os dois lados da membrana, o fluxo de íons é governado pela *diferença de concentração iônica* entre os dois lados e o *campo elétrico* gerado pelo desequilíbrio entre cargas positivas e negativas.

Vamos considerar a situação mostrada na figura 1.5, onde se admite que a concentração do cátion S , ($[S]$), seja maior no *meio 1* do que no *meio 2*.

Figura 1.5: Movimento iônico através de uma membrana semipermeável

Inicialmente o fluxo de iônico é dirigido do meio 1 para o meio 2, em correspondência ao gradiente de concentração do íon. No entanto com o passar do tempo o íon deixa o meio 2 mais positivo em comparação ao meio 1, dando origem a um campo elétrico que se opõe ao fluxo difusional orientado pela diferença de concentração.

Assim a ação do campo elétrico resulta numa *força de arrasto* sobre os íons. O fluxo de partículas devido a este arrasto é dado por :

$$J = [S](\mu)(f) \quad (1.3.1)$$

Onde μ é a denominada *mobilidade mecânica* e f é a *força* referente ao *campo elétrico* dado por:

$$E = -\frac{\partial V}{\partial x} \quad (1.3.2)$$

onde V é o *potencial elétrico* da membrana celular ao longo de sua espessura.

Então:

$$f = q(E) = -ze\left(\frac{\partial V}{\partial x}\right) \quad (1.3.3)$$

com e sendo a *carga elementar* ($e = 1,6 \times 10^{-19} C$) e z a *valência do íon*.

Assim, o fluxo devido ao arrasto é dado por:

$$J = -[S]\mu.z.e.\left(\frac{\partial V}{\partial x}\right) \quad (1.3.4)$$

Conhecida como *lei de Planck*, que nada mais é do que uma forma de escrever a *1ª. lei de Ohm*, ($J = \sigma E$), para o movimento de partículas carregadas em um meio viscoso.

Já o fluxo devido à diferença de concentração iônica é dado por:

$$J = -D\left(\frac{\partial [S]}{\partial x}\right) \quad (1.3.5)$$

onde o coeficiente de difusão D obedece a relação proposta por EINSTEIN em seu trabalho sobre o movimento browniano de 1905 :

$$D = \mu.k.T \quad (1.3.6)$$

Onde k é a constante de Boltzman ($k = 1,38 \times 10^{-23} J / K$) e T a temperatura na escala absoluta .

Assim, podemos expressar o fluxo total através da membrana como:

$$J = -D\left(\frac{\partial [S]}{\partial x}\right) - [S]\mu.z.e.\left(\frac{\partial V}{\partial x}\right) \quad (1.3.7)$$

ou , utilizando (1.3.4), (1.3.5) e (1.3.6) :

$$J = -D\left\{\frac{\partial [S]}{\partial x} + \frac{z.e.[S]}{kT}\left(\frac{\partial V}{\partial x}\right)\right\} \quad (1.3.8)$$

denominada equação de *Nernst-Planck*, largamente utilizada no cálculo de fluxos iônicos em neurofisiologia.

No entanto, é comum encontrá-la na literatura expressa da seguinte forma:

$$J = -D \left\{ \frac{\partial [S]}{\partial x} + \frac{z.F.[S]}{R.T} \left(\frac{\partial V}{\partial x} \right) \right\} \quad (1.3.9)$$

Onde R é a constante universal dos gases ideais e F é a constante de Faraday, respectivamente dadas por :

$$R = k.N \quad (1.3.10)$$

e

$$F = N.e \quad (1.3.11)$$

onde N é a constante de Avogrado.

Na situação de equilíbrio a diferença de *potencial eletroquímico* é nula e, logo, o fluxo também , assim:

$$\frac{1}{[S]} \left(\frac{\partial [S]}{\partial x} \right) = - \frac{zF}{RT} \left(\frac{\partial V}{\partial x} \right) \quad (1.3.12)$$

resolvendo a equação diferencial (1.3.12) obtemos :

$$V_1 - V_2 = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[S]_2}{[S]_1} \right) \quad (1.3.13)$$

Definindo “ V ”, *potencial de membrana*, como :

$$V_1 - V_2 \equiv V \quad (1.3.14)$$

temos:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[S]_e}{[S]_i} \right) \quad (1.3.15)$$

que é a famosa *equação de Nernst*, que determina o potencial de equilíbrio para cada espécie iônica que permeia a membrana celular (CHEN & EISENBERG [2]).

A tabela 1.2 indica os valores dos potenciais de membrana na *condição de equilíbrio* para alguns íons referentes aos experimentos com o *axônio gigante de lula*, calculados à partir da equação de Nernst que, por sua vez, estão em bom acordo com os dados obtidos experimentalmente.

Tabela 1.2: Valores aproximados do potencial de equilíbrio obtidos através da equação de Nernst para a temperatura de 20°C.

Íon	Concentração Intracelular (mM)	Concentração Extracelular (mM)	Potencial de equilíbrio (mV)
Potássio (K ⁺)	400	20	-75,6
Sódio (Na ⁺)	50	440	54,9
Cloreto (Cl ⁻)	40	560	-66,6
Cálcio (Ca ⁺²)	0,4 x 10 ⁻⁴	10	156,8

Os sinais de positividade ou negatividade vistos na tabela acima referem-se ao potencial elétrico intracelular, considerando o extracelular com potencial nulo. Os valores da tabela foram calculados para uma temperatura de 20°C .

Observando os valores da tabela, depreende-se que o Ca⁺ e o Na⁺ *não* devem ser os principais determinantes do valor do potencial de repouso da membrana celular (em torno de -60/70 milivolts). De fato, experimentalmente verifica-se que, no repouso, a membrana celular é muito pouco permeável a esses íons.

Experimentos realizados por HODGKIN & HOROWICZ [9] mostraram que o potencial de membrana é controlado principalmente pelo gradiente de concentração

do potássio, daí o valor do potencial de repouso ser mais próximo do *potencial de repouso* deste íon.

Na situação de equilíbrio a corrente de saída transportada pelo potássio (i_k) é contrabalanceada pela corrente de entrada de sódio (i_{Na}). Assim, durante o repouso, a *corrente total* (i_m) que atravessa a membrana é nula.

$$i_m = i_{Na} + i_K = 0 \quad (1.3.16)$$

como:

$$i_{Na} = G_{Na} (V - V_{Na}) \quad (1.3.17)$$

e

$$i_K = G_K (V - V_K) \quad (1.3.18)$$

temos, no equilíbrio, o potencial de membrana (V_m) dado por:

$$V_m = \frac{G_{Na} \cdot V_{Na} + G_K \cdot V_K}{G_{Na} + G_K} \quad (1.3.19)$$

onde G_{Na} e G_K , são as *condutâncias* do canal para sódio e potássio respectivamente, e V_{Na} e V_K os *potenciais de repouso* do sódio e potássio, respectivamente, calculados à partir da equação de Nernst.

1.4 – A membrana celular como um capacitor

A resposta das células à pulsos elétricos subliminares, indica que a membrana celular se assemelha a um *circuito RC* (resistor – capacitor), como ilustra a figura 1.6.

Figura 1.6: Circuito elétrico equivalente para comportamento capacitivo da membrana

Considerando um capacitor inicialmente descarregado, ao se ligar a chave s e assim aplicarmos um pulso retangular de voltagem, o capacitor inicia a *fase de carregamento*, fazendo com que a carga elétrica acumulada em sua superfície aumente de acordo com a função exponencial :

$$q(t) = q_{\max} \left(1 - e^{-\frac{t}{RC}} \right) \quad (1.4.1)$$

Já no *processo de descarga*, que ocorre quando a chave s é desligada , a carga do capacitor varia de acordo com a função:

$$q(t) = q_{\max} e^{-\frac{t}{RC}} \quad (1.4.2)$$

É usual denominar o produto da resistência com a capacitância como, *constante capacitiva de tempo* que acaba por caracterizar o *circuito RC*. Assim, para o caso da membrana celular :

$$\tau_{membrana} = R_{membrana} . C_{membrana} \quad (1.4.3)$$

Enquanto a capacitância representa o comportamento elétrico da bicamada lipídica, a resistência elétrica da membrana pode ser entendida como a expressão dos canais hidrofílicos por onde fluem os íons.

Figura 1.7: O canal iônico representado como um reostato

Desta forma podemos representar um canal iônico como um tipo de resistência elétrica variável (reostato) regida pela 1ª. Lei de Ohm:

$$i = \left(\frac{1}{R} \right) V \quad (1.4.4)$$

definindo a *condutância* G , como:

$$G \equiv \frac{1}{R} \quad (1.4.5)$$

temos:

$$i = G.V \quad (1.4.6)$$

Ou seja, a *condutância* é a grandeza física que, uma vez compreendida, fornece informações sobre o funcionamento do canal iônico.

Assim, a membrana celular apresenta duas vias para a passagem de corrente elétrica: uma associada aos canais iônicos e outra de natureza capacitiva.

1.5- O Modelo de Hodgkin-Huxley

1.5.1 – Os Experimentos com o Axônio Gigante de Lula

A *lula* é um invertebrado marinho que utiliza um sistema de *propulsão à jato* para se movimentar. Através de contrações do músculo do manto, ela controla um órgão chamado *sifão* por onde entra ou sai a água do mar em jatos, fazendo, assim, com que ela se movimente. O músculo do *manto*, por sua vez, é controlado pelos neurônios do *gânglio estelar*, que enviam longos axônios para inervá-lo. O axônio mais comprido é também o mais grosso e, por isso denominado *axônio gigante*. Por suas dimensões características, o axônio gigante de lula constitui um sistema ideal para a realização de experimentos voltados para o estudo de canais iônicos.

Figura 1.8: A lula é um invertebrado marinho que utiliza um tipo de sistema de “propulsão à jato” para se locomover. Na figura estão os principais elementos deste sistema .

Em 1952, HODGKIN & HUXLEY [8] através de estudos e experimentos com *axônio gigante de lula*, propuseram um conjunto de *equações fenomenológicas* para a representação do comportamento da condutância dos canais para sódio e

potássio, em relação ao tempo e à diferença de potencial entre as faces da membrana celular do axônio gigante de lula.

1.5.2 – A técnica de fixação de voltagem: o *voltage clamp*

A técnica denominada *voltage-clamp* desenvolvida por COLE [3], MARMONT [10] e HODGKIN & HUXLEY [8], trouxe novas informações sobre as correntes de membrana e reforçou os argumentos da teoria que atribui ao sódio e ao potássio a protagonização no processo de determinação do potencial de membrana.

A técnica consiste em inserir dois eletrodos finos ao longo do axônio gigante conectados aos instrumentos ilustrados na figura 1.9. A resistência dos eletrodos é baixa o suficiente para podermos considerar que todos os pontos do axônio têm o mesmo potencial elétrico. Assim o potencial depende apenas do tempo e não do espaço, como se fosse uma célula pontual.

Um dos eletrodos é emparelhado com outro, externo ao axônio, e sua função é medir a diferença de voltagem “ V ” através da membrana celular. O outro eletrodo é utilizado para *injetar* ou *retirar* corrente da célula, na quantidade necessária para manter a diferença de potencial entre as faces da membrana em dado valor escolhido. A medida desta corrente permite o cálculo da *condutância* (g) da membrana através da 1ª.lei de Ohm ($i = gV$).

Esse procedimento experimental, bem como o aparato utilizado, compõe a técnica conhecida como *fixação de voltagem* ou *voltage clamp*.

Figura 1.9: Representação do arranjo experimental utilizado na técnica de *voltage clamp*.

Atualmente é possível estudar a atividade de poucos canais, e até mesmo de um único canal, através da técnica conhecida como *patch clamp*. Onde uma micropipeta, em cujo interior há um eletrodo, seleciona um “retalho” da membrana celular, seguindo a mesma filosofia do *voltage clamp*. A diferença entre os dois experimentos reside na área celular estudada e, por conseguinte, no número de canais considerados.

Figura 1.10: O *patch-clamp*: uma micropipeta seleciona uma pequena área da membrana celular possibilitando o estudo de um único canal iônico

1.5.3 – O circuito elétrico equivalente para a membrana axonal

A membrana axonal pode ser, esquematicamente representada pelo seguinte circuito elétrico equivalente:

Figura 1.11: O circuito elétrico equivalente para a membrana do axônio

A corrente que atravessa a membrana é devida a duas contribuições de natureza distintas :

$$i_{total} = i_{capacitiva} + i_{iônica} \quad (1.5.1)$$

Onde a *corrente iônica* é constituída por três componentes:

$$i_{iônica} = i_{Na} + i_K + i_{leak} \quad (1.5.2)$$

Onde o termo i_{leak} denota a *corrente de vazamento(leakage)*, devida à outros íons .

Através da análise dos dados experimentais obtidos, HODGKIN & HUXLEY propuseram o seguinte *modelo fenomenológico* para a condutância do canal para potássio:

$$g_K = (G_K)n^4 \quad (1.5.3)$$

onde :

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n(n) \quad (1.5.4)$$

Onde n , segundo HODGKIN & HUXLEY [8], é uma *variável adimensional* que pode variar entre 0 e 1, G_K a condutância máxima atribuída ao íon potássio, α_n e β_n são funções da voltagem, mas não do tempo.

Resolvendo a equação diferencial (1.5.4) obtemos:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n - n(\alpha_n + \beta_n)$$

efetuando a mudança de variável :

$$x = \alpha_n - n(\alpha_n + \beta_n) \Rightarrow \frac{dx}{dn} = -(\alpha_n + \beta_n)$$

temos:

$$\frac{dx}{dt} = -(\alpha_n + \beta_n)x \Rightarrow x = Ae^{-(\alpha_n + \beta_n)t}$$

Onde A é uma constante fruto do processo de integração à ser determinada. Voltando à variável anterior:

$$n = \frac{1}{(\alpha_n + \beta_n)} \left[\alpha_n - Ae^{-(\alpha_n + \beta_n)t} \right]$$

definindo :

$$\tau_n = \frac{1}{(\alpha_n + \beta_n)} \quad (1.5.5)$$

e definindo a constante de integração “A” de forma que quando $t = 0$:

$$n_0 = \frac{\alpha_{n0}}{\alpha_{n0} + \beta_{n0}} \quad (1.5.6)$$

e atentando para o fato de que quanto $t \rightarrow \infty$, temos :

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (1.5.7)$$

Podemos reescrever a solução do modelo, em termos de (1.5.5), (1.5.6) e (1.5.7) :

$$n = n_\infty + (n_0 - n_\infty) e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (1.5.8)$$

Substituindo (1.5.8) em (1.5.3), obtemos:

$$g_k = \left[g_{K_\infty}^{1/4} + (g_{K_0}^{1/4} - g_{K_\infty}^{1/4}) e^{-\frac{t}{\tau_n}} \right]^4 \quad (1.5.9)$$

Em termos de corrente elétrica:

$$i_k = g_k (V - V_K)$$

$$i_k = \left[g_{K_\infty}^{1/4} + (g_{K_0}^{1/4} - g_{K_\infty}^{1/4}) e^{-\frac{t}{\tau_n}} \right]^4 (V - V_K) \quad (1.5.10)$$

Onde os valores de α_n e β_n são obtidos pelas fórmulas empíricas:

$$\alpha_n = \frac{0,01(V+10)}{e^{\left(\frac{V+10}{10}\right)} - 1} \quad (1.5.11)$$

e

$$\beta_n = \left(\frac{1}{8}\right) e^{\left(\frac{V}{80}\right)} \quad (1.5.12)$$

O modelo de HODGKIN & HUXLEY [8], com as devidas condições de contorno, para o canal para o potássio, concorda muito bem com os dados experimentais, conforme ilustra a figura 1.12.

Figura 1.12: Respostas de g_K a aumentos em V do tipo degrau de diferentes valores. O número em cada curva dá a despolarização aplicada em mV. Os pontos são os dados experimentais e as curvas sólidas são as soluções do modelo de Hodgkin e Huxley com a condição inicial $g_K(t=0) = 0,24 \text{ mS/cm}^2$. A escala vertical é a mesma nas curvas de A e J, mas está aumentada por um fator 4 nas demais curvas. Para maior clareza, a linha de base de cada curva foi desviada para cima. (HODGKIN & HUXLEY [8])

Tabela 1.3 : Resultados experimentais obtidos por HOGKIN & HUXLEY em experimentos com o axônio gigante de lula sob temperatura de $T=6 - 7^{\circ}C$ e condutância inicial de $G_{ko}=0,24m.mho/cm^2$.(HODGKIN & HUXLEY [8])

Curva	V (mV)	$g_{k\infty}$ (mmho/cm ²)	N_{∞}	τ_{∞} (msec)	α_n (msec ⁻¹)	β_n (msec ⁻¹)
A	-109	20,7	0,961	1,05	0,915	0,037
B	-100	20	0,953	1,1	0,866	0,043
C	88	18,6	0,935	1,25	0,748	0,052
D	-76	17	0,915	1,5	0,61	0,057
E	-63	15,3	0,891	1,7	0,524	0,064
F	-51	13,27	0,859	2,05	0,419	0,069
G	-38	10,29	0,806	2,6	0,31	0,075
H	-32	8,62	0,772	3,2	0,241	0,071
I	-26	6,84	0,728	3,8	0,192	0,072
J	-19	5	0,674	4,5	0,15	0,072
K	-10	1,47	0,496	5,25	0,095	0,096
L	-6	0,98	0,448	5,25	0,085	0,105

Todavia, por se tratar de um *modelo fenomenológico* não fornece informações sobre a natureza física, bem como os elementos que regem sua cinética de abertura. Fundamentalmente, o que orientou a elaboração do modelo foi a busca da *melhor curva* concordante com os dados experimentais obtidos com o axônio gigante de lula.

Similarmente, para o canal para sódio, HODGKIN & HUXLEY [8] propuseram as seguintes equações fenomenológicas:

$$g_{Na} = (G_{Na})m^3h \quad (1.5.13)$$

onde m é uma *variável adimensional*, que pode tomar valores entre 0 e 1 , relacionada com o processo de *ativação* do canal, e h , também uma *variável adimensional*, que pode tomar valores entre 0 e 1, relacionada com o processo de *inativação* do canal, que obedecem às seguintes equações diferenciais de primeira ordem:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m(m) \quad (1.5.14)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h(h) \quad (1.5.15)$$

A diferença em relação ao canal para o potássio se justifica pela diferença na cinética de abertura evidenciada pelos experimentos realizados com o axônio gigante de lula.

Resolvendo as equações diferenciais e plotando os resultados, com as devidas condições de contorno, HODGKIN & HUXLEY [8] obtiveram os diagramas contidos na figura 1.13.

Figura 1.13: Respostas de g_{Na} a aumentos em V do tipo de grau de diferentes valores, indicados pelos números à esquerda (em mV). As curvas suaves são as soluções do modelo de Hodgkin e Huxley. As escalas verticais à direita estão em unidades de mS/cm^2 . (HODGKIN & HUXLEY [8])

Onde, novamente, percebe-se a concordância excelente com os dados experimentais. No entanto, como no caso do canal para o potássio, o modelo se limita a *descrever* o comportamento da condutância do canal sem, contudo, fornecer informações físicas sobre sua cinética de abertura.

Uma vez que os modelos empíricos propostos por Hodgkin & Huxley constituem a evidência experimental do comportamento da condutância dos canais para sódio e potássio, o desafio reside em buscar uma *abordagem não fenomenológica* que concorde com as equações propostas pelos já citados pesquisadores, obtendo assim uma *base física* para o entendimento da *cinética de abertura* dos canais iônicos e suas principais propriedades biofísicas. Nos capítulos seguintes estudaremos a cinética de abertura dos canais iônicos sob enfoque da *Mecânica Estatística*, mais precisamente no universo dos *processos estocásticos*.

Capítulo 2

Modelos Markovianos para Canais Iônicos

Neste capítulo iremos apresentar as bases teóricas do estudo de processos markovianos na Mecânica Estatística (SALINAS [12]) e sua relação com o modelo fenomenológico proposto pelo trabalho de HODGKIN & HUXLEY [8].

À partir da obtenção independente de um modelo estatístico coerente com o modelo fenomenológico proposto por HODGKIN & HUXLEY [8], verificaremos a possibilidade de uma interpretação estatística quanto ao mecanismo de abertura dos canais iônicos.

2.1 – Processos Markovianos

Ao realizarmos um *experimento aleatório* associamos *valores numéricos* aos seus resultados e como os *eventos* que ocorrem ao realizarmos o experimento aleatório *variam* a cada realização, também o farão os *valores numéricos* à eles associados. Por exemplo, ao lançarmos um dado não viciado, a leitura do número da face superior variará a cada lançamento (evento), assim o valor observado constitui uma *variável aleatória*.

É conveniente definirmos uma *função* que associa cada valor da *variável aleatória* a um *parâmetro* que representa o evento realizado, constituindo assim uma *função aleatória*. Se este parâmetro é o *tempo* a variável aleatória é denominada *variável estocástica*.

Um processo estocástico em que a probabilidade de que a variável estocástica tome determinado valor em dado instante dependa somente do valor que a mesma tomou no instante imediatamente anterior é denominado *processo markoviano* e o conjunto de valores obtidos pela variável estocástica em dado intervalo de tempo constitui uma *cadeia de Markov* (TOMÉ & OLIVEIRA [16]).

Assim, dada a definição de probabilidade condicional:

$$P(A | B) = \frac{P(A \cap B)}{P(B)} \Rightarrow P(A \cap B) = P(A | B) \cdot P(B) \quad (2.1.1)$$

mas (2.1.1) pode ser generalizada para :

$$P(A_1 \cap A_2 \dots \cap A_n) = P(A_1) \cdot P(A_2 | A_1) \cdot P(A_3 | A_1 A_2) \dots P(A_n | A_1 A_2 \dots A_{n-1}) \quad (2.1.2)$$

no entanto, para um processo markoviano, temos :

$$P(A_n | A_1 A_2 \dots A_{n-1}) = P(A_n | A_{n-1}) \quad (2.1.3)$$

assim, podemos reescrever (2.1.2):

$$P(A_1 \cap A_2 \dots \cap A_n) = P(A_1) \cdot P(A_2 | A_1) \cdot P(A_3 | A_2) \dots P(A_n | A_{n-1}) \quad (2.1.4)$$

Ou seja, um processo markoviano fica completamente definido pelas probabilidades condicionais.

Ou seja, a probabilidade de ocorrência de dado evento **A** é dada por :

$$P(A) = \sum_{k=1}^n P(A | B_k) P(B_k) \quad (2.1.5)$$

Para um canal iônico que possui n estados cinéticos de abertura G distintos que variam com o tempo, isto é:

$$G = G(t)$$

podemos reescrever (2.1.5) como:

$$P[G(\tau) = i] = \sum_{j=1}^n \{P[G(\tau) = i | G(\tau-1) = j] P[G(\tau-1) = j]\} \quad (2.1.6)$$

2.2 – A Matriz Estocástica

Definindo a probabilidade de transição de um dado *estado* j para o *estado* i como $T(i, j)$, temos:

$$T(i, j) \equiv P[G(\tau) = i | G(\tau-1) = j] \quad (2.2.1)$$

podemos reescrever (2.1.7) de modo que:

$$P[G(\tau) = i] = \sum_{j=1}^n T(i, j) P[G(\tau-1) = j] \quad (2.2.2)$$

e interpretando $P[G(\tau) = i]$ como um *elemento de uma matriz coluna* assim como $P[G(\tau-1) = j]$, depreende-se de (2.2.2) que :

$$P(\tau) = TP(\tau-1) \quad (2.2.3)$$

ou ainda :

$$P(\tau) = T^\tau P(0) \quad (2.2.4)$$

Na verdade as *probabilidades de transição* $T(i, j)$, podem ser organizadas em uma *matriz quadrada* denominada *Matriz Estocástica*:

Tabela 1.4: A Matriz Estocástica é uma tabela com m linhas e n colunas cujos elementos são as probabilidades de transição de um dado estado G_n para o estado G_m

		$\tau-1$				
		G1	G2	G3	...	Gn
τ	G1	$P(G1 G1)$	$P(G2 G1)$	$P(G3 G1)$		$P(Gn G1)$
	G2	$P(G1 G2)$	.			.
	G3	$P(G1 G3)$		.		.
	$\vdots$				.	.
	Gn	$P(G1 Gn)$				$P(Gn Gn)$

Como os elementos da *matriz estocástica* são *probabilidades* , segue que :

$$T(i, j) \geq 0 \quad (2.2.5)$$

E como em dado instante de tempo, o canal ocupará *um* dado estado cinético, a matriz estocástica deve estar *normalizada*, ou seja, a soma das probabilidades de transição de uma mesma coluna deve ser igual a unidade.

$$\sum_{i=1}^n T(i, j) = 1 \quad (2.2.6)$$

2.3 – A Equação Mestra

Vamos admitir que as transições ocorram a cada intervalo de tempo τ de forma que:

$$T(i, j) = \tau \cdot W(i, j) \quad \text{para } i \neq j \quad (2.3.1)$$

no entanto, sabemos que:

$$\sum_{i=1}^n T(i, j) = \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^n T(i, j) + T(i, i) = 1 \quad (2.3.2)$$

assim :

$$\sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^n T(i, j) = 1 - T(i, i) \quad (2.3.3)$$

logo :

$$T_{ii} = 1 - \tau \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^n W_{ij} = 1 \quad (2.3.4)$$

todavia , de acordo com (2.1.7) sabemos que:

$$P[G(\tau) = i] = \sum_{j=1}^n P[G(\tau) = i \mid G(\tau - 1) = j] P[G(\tau - 1) = j]$$

reescrevendo-a e combinando com (2.3.1) e (2.3.4), temos:

$$P[G(\tau) = i] = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n P[G(\tau) = i \mid G(\tau - 1) = j] P[G(\tau - 1) = j] + P[G(\tau) = i \mid G(\tau - 1) = i] P[G(\tau - 1) = i]$$

$$P[G(\tau) = i] = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n T(i, j) P[G(\tau - 1) = j] + T(i, i) P[G(\tau - 1) = i]$$

$$P[G(\tau) = i] = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n T(i, j) P[G(\tau - 1) = j] + P[G(\tau - 1) = i] - \tau \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^j W(i, j) P[G(\tau - 1) = i]$$

$$P[G(\tau) = i] - P[G(\tau - 1) = i] = \tau \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n W(i, j) P[G(\tau - 1) = j] - \tau \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^j W(i, j) P[G(\tau - 1) = i]$$

Dividindo ambos os termos por τ e tomando o limite $\tau \rightarrow 0$, temos

$$\frac{dP}{dt} = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n \{W(i, j) P[G(\tau - 1) = j] - W(j, i) P[G(\tau - 1) = i]\} \quad (2.3.5)$$

Denominada *Equação Mestra*, que representa a *evolução temporal* das *probabilidades de transição* em termos das taxas de transição $W(m, n)$.

2.4 - Relação com o Modelo de Hodgkin - Huxley

Agora que já desenvolvemos as ferramentas físico-matemáticas no campo da Mecânica Estatística, estamos em condições de abordar o comportamento, quanto a cinética de abertura, dos canais iônicos.

Após muitas tentativas, HODGKIN & HUXLEY obtiveram uma curva com boa concordância com seus dados experimentais adotando um expoente igual a 4 para a variável n na expressão (1.5.3). No mesmo sentido, os expoentes para as variáveis m e h no modelo para o canal para o sódio, foram definidos.

Na época de HODGKIN & HUXLEY não se sabia da existência de canais iônicos tal qual atualmente os concebemos. Assim as variáveis n , m e h presentes no modelo proposto por eles tinham o papel puramente fenomenológico, sem uma interpretação física associada. Para os autores do modelo as variáveis adimensionais

estavam associadas com as propriedades de ativação e inativação relacionadas ao comportamento das correntes dos íons sódio e potássio através da membrana celular.

Atualmente, tais variáveis são interpretadas nos mesmos termos de ativação / inativação, porém relacionadas agora com o mecanismo de abertura/fechamento do canal.

A condutividade macroscópica, por exemplo, do canal para potássio, pode ser vista como resultante do efeito combinado de um número enorme de canais microscópicos presentes na membrana celular. Uma hipótese plausível é imaginar que cada canal iônico possua um mecanismo de abertura que regula o fluxo de íons pelo canal. Tal mecanismo poderia muito bem ser um *conjunto de portões* que em dada conformação coloca o canal no estado aberto e em outra(as) no estado fechado.

Figura 2.1: Uma ilustração representativa de um canal iônico como um poro macromolecular hidrofílico e seus principais componentes deduzidos à partir de experimentos do tipo *voltage-clamp* : filtro de seletividade, portão e sensor de voltagem (Hille [7]).

Individualmente, cada portão pode estar em um de dois estados possíveis: *permissivo* e *não permissivo*.

Figura 2.2: Estados possíveis dos portões que constituem o mecanismo de abertura do canal iônico

Desta forma, quando *todos* os *portões* estiverem no *estado permissivo*, o canal estará no *estado aberto*. No entanto, se *pelo menos um* dos portões estiver no estado *não-permissivo*, o canal passa para o *estado fechado*.

Nesta representação, a variável “*n*” presente no modelo fenomenológico para o canal para potássio, poderia ser interpretada como a *probabilidade “p” de um dado portão estar no estado permissivo*.

Ou seja, a probabilidade do canal estar no *estado aberto* é dada por :

$$P_{aberto}(t) = \prod_{j=1}^4 P_j(t)$$

o que justifica, ou pelo menos permite uma interpretação física para a quarta potência da variável *n* no modelo proposto para a condutância do potássio.

Figura 2.2: Canal iônico no estado aberto : todos os portões se encontram no estado permissivo

Figura 2.3: Canais iônicos no estado fechado, pelo menos um dos portões está no estado não permissivo

Retornando à dinâmica markoviana, nota-se que todos os elementos de $\mathbf{W}$, a *matriz de evolução*, estão definidos com exceção dos *elementos diagonais*, o que nos outorga a liberdade de defini-los da seguinte forma :

$$\sum_{k=1}^l W(k,l) = 0 \Rightarrow \sum_{\substack{k=1 \\ k \neq l}}^l W(k,l) + W(l,l) = 0 \quad (2.4.1)$$

Ou seja:

$$W(l,l) = -\sum_{\substack{k=1 \\ k \neq l}}^l W(k,l) \quad (2.4.2)$$

Assim, reescrevendo a *equação mestra* levando em conta que:

$$\frac{dP}{dt} = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n W(i,j) P[G(\tau-1) = j] + W(i,i)P[G(\tau-1) = i]$$

temos :

$$\frac{dP}{dt} = \sum_{j=1}^n W(i,j) P[G(\tau-1) = j] \quad (2.4.3)$$

ou seja:

$$\frac{d\mathbf{P}}{dt} = \mathbf{W}\mathbf{P} \quad (2.4.4)$$

Solucionando a equação diferencial (2.4.4) obtemos :

$$\mathbf{P} = \mathbf{e}^{\mathbf{W}t}\mathbf{P}(0) \quad (2.4.5)$$

No entanto, podemos observar que, escrevendo explicitamente (2.4.4) na forma matricial e admitindo que:

$$\mathbf{W} = \begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix}, \quad \beta \text{ e } \alpha \geq 0$$

tem-se:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} P \\ 1-P \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P \\ 1-P \end{pmatrix} \quad (2.4.6)$$

De onde obtemos :

$$\frac{dP}{dt} = -\beta P + \alpha(1-P) \quad (2.4.7)$$

E então obtemos, via Mecânica Estatística, uma expressão comparável à proposta por HODGKIN & HUXLEY para o canal para o potássio, uma vez re-interpretada a variável n como uma probabilidade associada ao processo de abertura do canal.

2.5 –Distribuição de Probabilidades

Consideremos a matriz de evolução:

$$\mathbf{W} = \begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix}, \quad \beta \text{ e } \alpha \geq 0 \quad (2.5.1)$$

através da *equação característica*:

$$\det[\mathbf{W} - \lambda \mathbf{I}] = 0, \text{ onde } \mathbf{I} \text{ é a matriz identidade}$$

podemos calcular os autovalores :

$$\begin{vmatrix} -\beta - \lambda & \alpha \\ \beta & -\alpha - \lambda \end{vmatrix} = 0 \Rightarrow \lambda(\beta + \alpha) + \lambda^2 = 0$$

o que resulta em

$$\lambda_1 = 0 \text{ e } \lambda_2 = -(\beta + \alpha)$$

Logo, os autovetores referentes ao autovalor λ_1 são:

$$(\phi_1 \ \phi_2) \begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix} = \lambda_1 (\phi_1 \ \phi_2) \Rightarrow \phi_1 = \phi_2$$

ou seja :

$${}_1\Phi = (\phi_1 \ \phi_2) = A(1 \ 1)$$

e ainda :

$$\begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \psi_1 \\ \psi_2 \end{pmatrix} = \lambda_1 \begin{pmatrix} \psi_1 \\ \psi_2 \end{pmatrix} \Rightarrow -\beta\psi_1 + \alpha\psi_2 = 0$$

ou seja :

$${}_1\Psi = \begin{pmatrix} \psi_1 \\ \psi_2 \end{pmatrix} = A \begin{pmatrix} 1 \\ \beta/\alpha \end{pmatrix}$$

Normalizando os autovetores obtemos:

$$A^2(1 \ 1) \begin{pmatrix} 1 \\ \beta/\alpha \end{pmatrix} = 1 \Rightarrow A^2 = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

Analogamente, para o autovalor λ_2 , obtemos :

$${}_2\Psi = B \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \end{pmatrix} \text{ e } {}_2\Phi = B \begin{pmatrix} 1 & -\alpha/\beta \end{pmatrix}$$

Normalizando temos :

$$B^2 = \frac{\beta}{\alpha + \beta}$$

Construindo as matrizes $\mathbf{U}$ e $\mathbf{V}$, dadas por:

The diagram shows two matrices, $\mathbf{U}$ and $\mathbf{V}$, represented in a block-matrix format. Matrix $\mathbf{U}$ is a 2x2 matrix with blocks labeled 1Ψ and 2Ψ . Matrix $\mathbf{V}$ is a 2x2 matrix with blocks labeled 1Φ and 2Φ . Arrows indicate the mapping from Ψ to Φ and vice versa.

de onde podemos verificar que :

$$\mathbf{UV} = \mathbf{VU} = \mathbf{I}$$

o que nos possibilita o seguinte recurso algébrico :

$$\mathbf{W} = (\mathbf{I})\mathbf{W}(\mathbf{I}) = (\mathbf{UV})\mathbf{W}(\mathbf{UV}) = \mathbf{U}(\mathbf{VWU})\mathbf{V}$$

ou seja :

$$\mathbf{W} = \mathbf{U}(\mathbf{D})\mathbf{V}$$

onde :

$$\mathbf{D} = \mathbf{VWU}$$

Calculando $\mathbf{D}$ explicitamente, obtemos:

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} A & \frac{A}{\alpha B} \\ B & -\frac{A}{\beta} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \frac{A}{\alpha} & B \\ \frac{A\beta}{\alpha} & -B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -(\beta + \alpha) \end{pmatrix}$$

assim , como :

$$\mathbf{W} = \mathbf{UDV} \Rightarrow \mathbf{W}^n = (\mathbf{UDV})(\mathbf{UDV})(\mathbf{UDV})\dots(\mathbf{UDV})$$

podemos utilizar a *propriedade associativa* e ainda o fato de que $\mathbf{VU}=\mathbf{UV}=\mathbf{I}$, assim temos:

$$\mathbf{W}^n = \mathbf{UD}^n\mathbf{V}$$

$$\mathbf{W}^n = \mathbf{UD}^n\mathbf{V} = \begin{pmatrix} \frac{A}{\alpha} & B \\ \frac{A\beta}{\alpha} & -B \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -(\beta + \alpha)^n \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A & \frac{A}{\alpha B} \\ B & -\frac{A}{\beta} \end{pmatrix} = -\frac{B^2[-(\alpha + \beta)]^n}{\beta} \mathbf{W}$$

ou ainda:

$$\mathbf{W}^n = -\frac{[-(\alpha + \beta)]^n}{\alpha + \beta} \mathbf{W}$$

como:

$$e^{t\mathbf{W}} = \mathbf{I} + \mathbf{W}t + \frac{\mathbf{W}t^2}{2!} + \dots + \frac{\mathbf{W}^n t^n}{n!} = \mathbf{I} + \sum_{k=1}^n \frac{\mathbf{W}^k t^k}{k!}$$

temos:

$$e^{t\mathbf{W}} = \mathbf{I} - \left(\frac{1}{\alpha + \beta} \right) \mathbf{W} \sum_{k=1}^n \frac{[-(\alpha + \beta)]^k t^k}{k!}$$

ou seja:

$$e^{t\mathbf{W}} = \mathbf{I} - \left(\frac{1}{\alpha + \beta} \right) \left(e^{-(\alpha + \beta)t} - 1 \right) \mathbf{W}$$

Desta forma, como :

$$\mathbf{P}(t) = e^{t\mathbf{W}} \mathbf{P}(0)$$

temos:

$$\mathbf{P}(t) = \left[\mathbf{I} - \left(\frac{1}{\alpha + \beta} \right) \left(e^{-(\alpha + \beta)t} - 1 \right) \mathbf{W} \right] \mathbf{P}(0)$$

o que resulta em :

$$\begin{pmatrix} P_1(t) \\ P_2(t) \end{pmatrix} = \frac{1}{\alpha + \beta} \begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \end{pmatrix} + \frac{e^{-(\alpha + \beta)t}}{\alpha + \beta} \begin{pmatrix} \beta & -\alpha \\ -\beta & \alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_1(0) \\ P_2(0) \end{pmatrix} \quad (2.5.2)$$

De onde podemos observar que $\begin{pmatrix} P_1(t) \\ P_2(t) \end{pmatrix}$ evolui para um *estado estacionário*

obedecendo a um decaimento exponencial. De fato, para $t \rightarrow \infty$, verificamos que:

$$\begin{pmatrix} P_1 \\ P_2 \end{pmatrix} = \frac{1}{\alpha + \beta} \begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \end{pmatrix} \quad (2.5.3)$$

Na verdade, tal comportamento é coerente com o modelo proposto por HODGKIN & HUXLEY [8] e, portanto, compatível com as observações experimentais. Isso nos motiva a atribuir um *comportamento markoviano* para a *cinética de abertura* dos canais iônicos. O que, na verdade, constitui uma abordagem física para o problema .

Nos capítulos seguintes, iremos propor *modelos de rede* (TOMÉ [17]) e simular computacionalmente o comportamento de vários canais iônicos hipotéticos sujeitos a dois tipos principais de dependência com relação aos mecanismos de abertura: a dependência à voltagem e a dependência de partículas que se difundem livremente (ligantes) no meio extracelular.

Capítulo 3

Canais com 2 estados de abertura

Neste capítulo iremos apresentar e discutir os resultados das simulações computacionais dos canais iônicos que possuem o mais simples, mas não menos importante mecanismo de abertura: os canais simples.

3.1 – Canais Simples

Há uma classe de canais iônicos, como os para os *íons potássio*, que apresentam dois estados cinéticos de abertura: o *estado fechado* e o *estado aberto*, denominados *canais simples*. Embora possuam uma cinética de abertura bastante simples, por possuírem apenas dois estados de abertura, desempenham importante papel na determinação do *potencial de repouso* das células excitáveis, como as células nervosas e do miocárdio.

Experimentos com o *axônio gigante de lula* demonstraram que as *probabilidades de transição* entre os dois estados de abertura, são dependentes da diferença de potencial a que está submetida a membrana celular.

Vamos simular tal comportamento cinético variando as *probabilidades de transição*, o que pode ser compreendido como a correspondente variação na *diferença de potencial* a que está submetida a membrana celular.

Figura 3.1: Grafo representativo das possíveis transições, e suas respectivas probabilidades, entre estados de abertura para o canal para o potássio dependente da diferença de potencial entre as faces da membrana celular

Assim, a matriz estocástica “ T ” associada ao mecanismo de abertura dos canais com 2 estados de abertura é :

$$T(i, j) = T[G(t + \tau), G(t)]$$

	<i>Aberto</i>	<i>Fechado</i>
<i>Aberto</i>	1-r	Q
<i>Fechado</i>	r	1-q

3.2 – Simulação Computacional

Para a simulação computacional foi elaborado um programa utilizando o software **Delphi 7.0**, cuja sintaxe algoritmo e respectiva interface se encontram no Apêndice A1.

Nesta simulação, (e em todas as demais) a membrana celular foi representada por um *uma rede quadrada* de dimensões 100x100, constituindo, portanto, 100000 sítios, onde para cada sítio atribui-se três variáveis: “ η ”, “ σ ” e “ μ ”, cujos significados físicos são:

η : variável que representa a existência ($\eta=1$) ou não ($\eta=0$) de canal no sítio

σ : variável que representa o estado de abertura do canal, aberto ($\sigma=1$) ou fechado ($\sigma=0$).

μ : variável que indica a existência ($\mu=1$) ou não ($\mu=0$) de íon no sítio

A simulação é feita da seguinte forma:

- Os canais são distribuídos de forma homogênea na rede, alternado sítios com e sem canal, perfazendo um total de 5000 canais presentes na rede. Já a distribuição de íons é feita de forma aleatória na rede, totalizando 5000 íons na rede.

- Inicialmente, todos os canais estão no estado fechado.

- A cada intervalo de tempo “ Δt ”, representado pelo passo de Monte Carlo no programa computacional, todos os sítios da rede são visitados e atualizados segundo as regras listadas na tabela 3.1

- A cada atualização da rede, o *fluxo de íons* é obtido pela contagem dos íons que atravessam a rede. Tais valores são armazenados e, ao final de N iterações, calcula-se o fluxo médio não levando em conta as primeiras 5000 iterações.

- Os íons não são retirados da rede ao transporem a rede. Isso tem como razão a manutenção da concentração de íons na rede.

- A difusão dos íons obedece a seguinte regra: um dos quatro sítios imediatamente vizinhos ao sítio ocupado pelo íon é sorteado. Caso o sítio sorteado já possua um íon o íon difusor permanece onde está, caso contrário migra para o sítio sorteado.

- O estado de abertura do canal (η) é calculado da seguinte forma : adota-se um valor arbitrário “**p**” para a *probabilidade de abertura* do canal e um valor arbitrário “**r**” para a *probabilidade de fechamento* do canal. Assim, havendo um canal no sítio ($\eta=1$) e ele estando fechado ($\sigma=0$) gera-se um *número aleatório* “ **ϵ** ” , entre 0 e 1 , de forma que, se $\epsilon \leq p$ o canal abre (e caso exista um íon no sítio este “atravessa” a rede) , caso contrário ele permanece fechado. O mesmo raciocínio se aplica para o caso em que o canal se encontrar no estado aberto.

Tabela 3.1 – Dinâmica utilizada na simulação computacional da cinética de abertura de *canais simples*.

Existência do canal no sítio (η)	Estado de abertura do canal (σ)	Presença do íon no sítio (μ)	Dinâmica
1	1	1	O íon atravessa a rede
		0	-
	0	1	O íon difunde -
		0	-
0	-	1	O íon difunde
		0	-

Figura 3.2 – Ilustração de um setor da rede quadrada utilizada na simulação computacional e seus principais elementos: íons, canais abertos e canais fechados. Cada intersecção de linhas representa um sítio da rede.

3.3 – Resultados Obtidos e Discussão

A simulação computacional fornece o *fluxo percentual médio* ou *fluxo relativo* definido por:

$$\Phi_{\text{Relativo}} = \frac{\Phi_{\text{médio}}}{\Phi_{\text{máximo}}}$$

onde, de acordo com a dimensão da rede e a concentração de íons na rede adotados inicialmente, temos: $\Phi_{\text{máximo}} = 5000 \text{ íons} / \text{tempo}$, onde o tempo é dado em uma unidade arbitrária representada pelo *passo de Monte Carlo* no programa computacional e o *fluxo médio* ($\Phi_{\text{médio}}$) é a média do número de íons que atravessam a rede após N iterações.

A análise dos resultados consiste no estudo do comportamento do *fluxo relativo* em relação ao tempo, representado pelo passo de Monte Carlo, e em relação a outros parâmetros, tais como probabilidades de transição entre estados, ação de bloqueadores, concentração de ligantes, etc.

Vejamos os resultados obtidos das simulações.

Figura 3.3 – Comportamento da intensidade do fluxo percentual médio com relação ao tempo para alguns valores da probabilidade de abertura (p). Para a probabilidade de fechamento (r) foi adotado o valor “0,5”.

Figura 3.4 – Comportamento da intensidade do fluxo percentual médio com relação à variação da probabilidade de abertura (p). Para a probabilidade “ r ”, foi adotado o valor “0,5”.

Figura 3.5 – Distribuição da percentagem de canais abertos após 10.000 iterações. Para as probabilidades de fechamento (r) e abertura (p) foram adotados os valores “0,5” e “0,3” respectivamente.

Da análise da figura 3.3 depreende-se que o canal atinge um *fluxo estacionário* após poucas iterações, independentemente do valor adotado para a probabilidade de abertura (p). Entretanto, o valor do fluxo relativo no regime estacionário é proporcional ao valor atribuído à probabilidade de abertura, como ilustra a figura 3.4 .

O histograma contido na figura 3.5 evidencia a correspondência entre porcentagem de canais abertos e o valor adotado para a probabilidade de abertura (p) justificando a proporcionalidade entre o fluxo relativo médio, obtido no regime estacionário e a probabilidade de abertura (p).

Comparando as figuras 3.3 e 1.12 verificamos que os resultados obtidos da simulação computacional estão em excelente acordo qualitativo com o comportamento experimental observado por HODGKIN & HUXLEY, nos experimentos com o axônio gigante de lula, quanto ao canal para o potássio

Isso indica que o canal para potássio em questão, pode ser compreendido como um sistema constituído de dois estados markovianos discretos governados por uma cinética simples com duas taxas de transição características que podem muito bem representar a sensibilidade à voltagem do mecanismo de abertura do canal.

Capítulo 4

Canais com estados de inativação

Neste capítulo iremos estudar os resultados obtidos das simulações referentes aos canais que, como os canais para sódio presentes na membrana do axônio gigante de lula estudado por HODGKIN E HUXLEY [8], apresentam um estado em que não há fluxo de íons pelo canal, porém de comportamento distinto do estado fechado. Trata-se do estado inativado.

4.1 – O estado inativado

Existe uma classe de canais iônicos, como os canais para sódio presentes no axônio gigante de lula, que apresenta um terceiro estado de abertura : o *estado inativado*.

Figura 4.1: Grafo representativo das possíveis transições entre estados de abertura e suas respectivas probabilidades para o canal para sódio

A matriz estocástica que representa o grafo da figura 4.1, pode ser escrita como:

	<i>Aberto</i>	<i>Fechado</i>	<i>Inativado</i>
<i>Aberto</i>	1-r-s	p	0
<i>Fechado</i>	r	1-p-q	t
<i>Inativado</i>	s	q	1-t

Onde cada elemento da matriz representa a probabilidade de transição entre dois estados na seguinte ordem:

$$T(i, j) = T[G(t + \tau), G(t)]$$

A justificativa para a não existência da possibilidade do canal passar do estado inativado para o estado aberto, é a de que experimentos com canais iônicos que possuem estados de inativação, apresentam uma baixa ocorrência deste tipo de mudança de estado de abertura.

4.2 – Simulação Computacional

O algoritmo utilizado na simulação de canais iônicos com 3 estados é , basicamente, o mesmo utilizado para os canais com 2 estados. No entanto, a simulação computacional deve, agora, considerar um novo ingrediente na cinética de abertura com a inserção de novo valor para a grandeza que representa o estado de abertura do canal (σ). Assim, $\sigma = 2$ denotará o canal no *estado inativado*.

Com este novo componente, o estado de abertura de um dado canal será definido da seguinte forma: adota-se valores para as probabilidades **p**, **q**, **r**, **t** e **s**, cujos significados são:

p : probabilidade do canal ,estando fechado , se abrir

q : probabilidade do canal, estando fechado, se inativar

r : probabilidade do canal, estando aberto, se fechar.

s : probabilidade do canal, estando aberto, se inativar

t : probabilidade do canal , estando inativado, passar para o estado fechado

Assim, por exemplo, escolhendo-se um canal que se encontre no *estado fechado*, gera-se um número aleatório, “ ϵ ”, entre 0 e 1 e sendo $\epsilon < p$ o canal se abre. No entanto se $p \leq \epsilon < (p+q)$, o canal passa para o estado inativado, e , claro , se $\epsilon \geq (p+q)$, o canal permanece no estado fechado. O mesmo raciocínio se aplica aos demais processos de mudança de estado de abertura.

O restante é idêntico ao algoritmo para *canais simples*.

Tabela 4.1 – Dinâmica utilizada na simulação computacional.

Existência de canal no sítio (η)	Estado de abertura (σ)	Presença de íon no sítio (μ)	Fluxo de íons
1	0	1	O íon difunde
		0	-
	2	1	O íon difunde
		0	-
	1	1	O íon atravessa a rede
		0	-
0	0	1	O íon difunde
		0	-

Figura 4.2 – Ilustração de um setor da rede quadrada utilizada na simulação computacional e seus principais elementos : íons, canais abertos , canais fechados e canais inativados. Cada intersecção de linhas representa um sítio da rede.

4.3 – Resultados Obtidos e Discussão

Seguindo os mesmos passos da simulação feita no capítulo anterior, obtivemos os diagramas:

Figura 4.3: Comportamento da intensidade do fluxo percentual médio com relação à variação da probabilidade (q) do canal estando no estado fechado passar ao estado inativado. Para as probabilidades “p”, “r”, “s” e “t”, foram adotados os valores “0,5”, “0,5”, “0” e “1” respectivamente.

Figura 4.4: Comportamento do fluxo percentual médio no decorrer do tempo para alguns valores da probabilidade (q) do canal passar do estado fechado para o estado inativado.

Para as probabilidades “p”, “r”, “s” e “t”, foram adotados os valores “0,5”, “0,5”, “0” e “1” respectivamente.

Figura 4.5 – Distribuição da porcentagem de canais abertos após 10.000 iterações. Para as probabilidades de fechamento (r), abertura (p), inativação (q) e ativação (t), foram adotados os valores “0,5”, “0,5”, “0,2” e “0,1” respectivamente.

Figura 4.6 – Distribuição da percentagem de canais abertos após 10.000 iterações. Para as probabilidades de fechamento (r), abertura (p), inativação (q) e ativação (t), foram adotados os valores “0,5”, “0,5”, “0,4” e “0,1” respectivamente.

Figura 4.7 – Comportamento do fluxo relativo no decurso do tempo (unidade arbitrária) para distintos valores para a probabilidade de inativação (q). Para as probabilidades de fechamento (r), abertura (p), e ativação (t), foram adotados os valores “0,5”, “0,5”, e “0” respectivamente. O tempo é expresso em uma unidade arbitrária representada pelo passo de Monte Carlo.

Figura 4.8 – Comportamento do fluxo relativo no decurso do tempo (unidade arbitrária) para distintos valores para a probabilidade de ativação (t). Para as probabilidades de fechamento (r), abertura (p), e inativação (q), foram adotados os valores “0,5”, “0,5”, e “0,4” respectivamente. O tempo é expresso em uma unidade arbitrária representada pelo passo de Monte Carlo.

Verifica-se da figura 4.4, que o canal atinge rapidamente um fluxo estacionário independentemente do valor atribuído à probabilidade do canal passar do estado fechado para o estado inativado. Todavia, o fluxo relativo sofre uma redução em seu valor, no regime estacionário, para valores crescentes de “ q ”, como indica o diagrama 4.3. Tal observação se confirma ao compararmos os histogramas presentes nas figuras 4.5 e 4.6, onde verifica-se uma redução na população de canais abertos por ocasião do aumento da probabilidade de inativação (q).

Para o valor nulo atribuído à probabilidade do canal passar do estado inativado para o fechado (t), e sendo não nula a probabilidade do canal passar do estado fechado para o inativado, podemos observar que o sistema evolui para um estado absorvente. Como era de se esperar tal estado ocorre tão rapidamente quanto maior for a probabilidade do canal passar do estado fechado para o inativado (q), como indica a figura 4.7.

Verifica-se ainda, do gráfico contido na figura 4.8, a evolução temporal do fluxo relativo em termos da probabilidade do canal passar do estado inativado para o

estado fechado (t). Nele podemos observar que o fluxo relativo atinge um regime estacionário rapidamente com valores proporcionais a probabilidade “ t ”, o que faz sentido se considerarmos a análise sobre as figuras 4.7 e 4.6.

Particularmente, os resultados representados no diagrama da figura 4.7 estão em bom acordo qualitativo com o diagrama ilustrado na figura 1.13, obtido dos experimentos realizados por HODGKIN & HUXLEY, com o axônio gigante de lula, no estudo do canal para sódio.

Novamente, podemos verificar a possibilidade da interpretação estatística, compreendendo canais que possuem estados de inativação, como o para sódio, como um sistema constituído de três estados markovianos discretos conforme ilustra a figura 4.1.

Capítulo 5

A ação de antagonistas

Neste capítulo exploraremos a abordagem estatística para o mecanismo de abertura dos canais iônicos introduzindo um novo ingrediente: os bloqueadores. A idéia principal é estudar o efeito de agentes inibidores, ou *antagonistas*, de canais tal qual a ação de algumas substâncias encontradas em fármacos de uso comum.

5.1- Bloqueadores

Muitas substâncias encontradas na natureza podem modificar a cinética de abertura dos canais iônicos presentes em células nervosas: são as neurotoxinas. Muitas neurotoxinas atuam tanto no bloqueio quanto no aumento da probabilidade de abertura dos canais, em especial os para sódio. Exemplos naturais são encontrados no veneno de escorpiões, nas toxinas alcalóides secretadas por alguns anfíbios tropicais e em substâncias inseticidas de muitas plantas. Tais toxinas causam dor e podem até levar à morte, promovendo disparos repetitivos ou constante despolarização do nervo e músculo e por induzir arritmias cardíacas.

No campo dos fármacos de uso cotidiano, muitos anestésicos locais, como a lidocaína, causam um bloqueio reversível da propagação do impulso ao longo das fibras nervosas através da prevenção do movimento dos íons sódio para dentro das

células nervosas. Presume-se que anestésicos locais do tipo amida atuem no interior dos canais para sódio das membranas nervosas. A efetividade de tais anestésicos, além do local de aplicação dependem de sua concentração.

Para simular o efeito de bloqueadores, colocamos, um novo estado para o canal: o bloqueado ($\sigma = 3$).

Uma vez neste estado, o canal se comporta do mesmo modo como se estivesse fechado.

5.2 – Simulação Computacional

A simulação foi realizada utilizando como plataforma o algoritmo utilizado para *canais simples* e respeitando as seguintes premissas:

- Os canais são distribuídos de forma homogênea na rede, alternado sítios com e sem canal, perfazendo um total de 5000 canais presentes na rede. Já a distribuição de íons é feita de forma aleatória na rede, totalizando 5000 íons na rede.
- Inicialmente, todos os canais estão no estado fechado.
- A cada intervalo de tempo " Δt ", representado pelo passo de Monte Carlo no programa computacional, todos os sítios da rede são visitados e atualizados.
- A difusão dos íons é *independente* da difusão dos bloqueadores e vice-versa
- O estado de abertura do canal é calculado primeiramente em função das probabilidades de abertura e fechamento
- Após definido o estado de abertura do canal considera-se o efeito do bloqueador sobre o canal. A tabela 5.1 sumariza a dinâmica utilizada na simulação.
- A cada atualização da rede, o *fluxo de íons* é obtido pela contagem dos íons que atravessam a rede. Tais valores são armazenados e, ao final de N iterações, calcula-se o fluxo médio não levando em conta as primeiras 5000 iterações.
- Os íons não são retirados da rede ao transporem a rede. Isso tem como razão a manutenção da concentração de íons na rede.
- Os bloqueadores podem se ligar ao canal com probabilidade v e se desligarem, deixando o canal no estado fechado, com probabilidade w .

Tabela 5.1 – Dinâmica utilizada simulação computacional sobre efeitos de bloqueadores sobre canais simples

(η)	(σ)	bloqueador no sítio (α)	Dinâmica do bloqueador
1	0 ou 2	1	O bloqueador difunde na rede
		0	-
	1	1	O canal é bloqueado com probabilidade v ($\sigma=3$)
		0	-
	3	1	-
		0	O canal pode liberar o bloqueador com probabilidade w voltando a ficar no estado fechado
0	0	1	O bloqueador difunde na rede
		0	-

Figura 5.1 – Ilustração de um setor da rede quadrada utilizada na simulação computacional e seus principais elementos : íons, canais abertos , canais fechados e canais bloqueados. Cada intersecção de linhas representa um sítio da rede.

5.2 – Resultados Obtidos e Discussão

Figura 5.2: Comportamento do fluxo percentual médio no decorrer do tempo para a presença de 3000 bloqueadores na rede

Tabela 5.1 – Condições iniciais e dados obtidos das simulações feitas sobre o efeito de bloqueadores sobre canais simples

Probabilidades	
Bloqueio (v)	Desbloqueio (w)
1	0,1
Aberto→Fechado (p)	Fechado→Aberto (r)
0,5	0,5
Concentração de bloqueadores na rede	Fluxo Percentual Médio
1000	33,83
2000	28,27
3000	24,65
4000	21,42
5000	18,77
6000	16,15
7000	13,37
8000	10,89
9000	8,1
10000	5,33

Figura 5.3: Comportamento do fluxo percentual médio em função do número de bloqueadores na rede e condições iniciais definidas na tabela 5.1.

O diagrama ilustrado na figura 5.2, evidencia a evolução para um fluxo relativo estacionário após poucas iterações. Tal observação se mostrou independente do número de bloqueadores na rede. Entretanto, o diagrama ilustrado na figura 5.3, denota a redução do fluxo relativo em termos do número de bloqueadores na rede. O que é coerente com a ação do antagonista.

Verificamos, assim, que o modelo estatístico corresponde ao fenomenologicamente observado que é a redução da atividade dos canais por ação de agentes inibidores e seu comportamento com a concentração do mesmo.

Capítulo 6

Canais controlados por ligantes

Neste capítulo iremos estudar uma classe de canais iônicos cujo mecanismo de abertura não é regulado pelo potencial de membrana, mas sim pela *concentração de agentes químicos* no interior, ou exterior, da célula. Tais agentes são denominados *ligantes*.

O estudo propõe e explora os resultados obtidos das simulações computacionais de dois modelos distintos de dependência quanto aos ligantes.

6.1 – Agonistas

Existe uma grande família de canais iônicos cujo mecanismo de abertura é comandado por espécies químicas denominadas *ligantes*. Por exemplo, muitos canais iônicos que desenvolvem importante papel na transmissão sináptica respondem a específicos *neurotransmissores* que regulam a cinética de abertura do canal, como a acetilcolina, glutamatos, glicinas, etc.

Desta família de canais os mais bem estudados são os ativados pela acetilcolina (ACh) que desenvolve o papel de agonista, encontrados nas junções neuromusculares de vertebrados. Experimentalmente verifica-se a seguinte relação de dependência: se *duas* moléculas de ACh se ligam ao sítio receptor presente no

canal iônico o canal abre. Outro exemplo é uma classe de canais para potássio dependentes de Ca^{++} ativados quando a concentração intracelular deste íon aumenta (GUISONI & OLIVEIRA [6]).

No caso de canais dependentes de Ach, podemos representar os estados de abertura e suas respectivas relações com os ligantes e o canal através do grafo da figura 6.1.

Figura 6.1: Grafo representativo das possíveis transições entre estados de abertura e suas respectivas probabilidades para o canal controlado por ligantes (modelo 1). “p” e “q” representam as probabilidades do ligante se acoplar ou não ao canal respectivamente.

Ou seja, o canal estará *aberto* (A) quando *dois* ligantes estiverem acoplados a ele e *fechado*(F) na situação em que *um* ou *nenhum* ligante esteja acoplado a ele.

6-2 – Simulação Computacional: Modelo 1

Ainda representando a membrana celular como uma rede quadrada de 100x100 sítios, realizamos as simulações de acordo com as seguintes premissas:

- Para cada sítio atribui-se cinco variáveis: “ η ”, “ σ ”, “ μ ”, “ λ ” e “ θ ” cujos significados físicos são:

η : variável que representa a existência ($\eta=1$) ou não ($\eta=0$) de canal no sítio

σ : variável que representa o estado de abertura do canal , aberto ($\sigma =1$) ou fechado ($\sigma =0$).

μ : variável que indica a existência ($\mu=1$) ou não ($\mu=0$) de íon no sítio

λ : variável que indica o número de ligantes acoplados ao canal (0, 1 ou 2)

θ : variável que indica a existência ($\theta=1$) ou não ($\theta=0$) de ligante no sítio

- Os canais são distribuídos de forma homogênea na rede, alternado sítios com e sem canal, perfazendo um total de 5000 canais presentes na rede. Já a distribuição de íons é feita de forma aleatória na rede, totalizando 5000 íons na rede.

- A distribuição inicial de ligantes é feita de forma aleatória

- Inicialmente, todos os canais estão no estado fechado.

- A cada intervalo de tempo " Δt ", representado pelo passo de Monte Carlo no programa computacional, todos os sítios da rede são visitados e atualizados segundo as regras listadas na tabela 6.1

- A cada atualização da rede, o *fluxo de íons* é obtido pela contagem dos íons que atravessam a rede. Tais valores são armazenados e, ao final de N iterações, calcula-se o fluxo médio não levando em conta as primeiras 1000 iterações.

- Os íons não são retirados da rede ao transporem a rede. Isso tem como razão a manutenção da concentração de íons na rede e se justifica pela enorme oferta de íons no meio extra e intracelular.

- A difusão de íons e ligantes obedece a mesma regra utilizada no algoritmo para *canais simples*.

- Íons e ligantes não interagem entre si.

- As probabilidades de acoplamento e desacoplamento são independentes entre si.

Tabela 6.1 – Dinâmica utilizada na simulação computacional. (Modelo 1)

Existência de canal no sítio (η)	Ligantes acoplados ao canal (λ)	Presença de ligante no sítio (θ)	Acoplamento/ Desacoplamento	Estado de abertura (σ)	Presença de íon no sítio (μ)	Fluxo de íons
1	0	0	-	0	1	O íon difunde
					0	-
		1	O ligante se acopla tornando $\theta=1$ e $\lambda=1$	0	1	O íon difunde
					0	-
	1	0	-	0	1	O íon difunde
					0	-
		1	O ligante se acopla ao canal com “p” tornando $\theta=0$ e $\lambda=2$	1	1	O íon passa
					0	-
	2	0	Se $\mu=0$ o canal libera um ligante com “q” tornando $\theta=1$ e $\lambda=1$	0	1	O íon difunde
					0	-
			Nada ocorre	1	1	O íon passa
					0	-
		1	O ligante difunde	1	1	O íon passa
					0	-
0	0	1	O ligante difunde	0	1	O íon difunde
		0	-		0	-

Figura 6.2 – Ilustração de um setor da rede quadrada utilizada na simulação computacional e seus principais elementos: íons, canais abertos e canais fechados. Cada intersecção de linhas representa um sítio da rede.

6.2.1 – Resultados Obtidos e Discussão

Figura 6.3: Comportamento do fluxo percentual médio no decorrer do tempo para 5000 ligantes na rede e probabilidade de acoplagem (p) igual a 1 e probabilidade de desacoplagem (q) igual a 0,1.

Tabela 6.2 – Condições iniciais e resultados obtidos nas simulações de canais controlados por ligantes (Modelo 1)

Probabilidades	
Acoplagem (p)	Desacoplagem (q)
1	0,1
Concentração de Ligantes na rede	Fluxo Percentual Médio
1000	0,75
2000	3,23
3000	7,62
4000	12,77
5000	20,2
6000	29,08
7000	40,01
8000	51,44
9000	65,8
10000	80,5

Figura 6.5: Comportamento do fluxo percentual médio em relação ao número de ligantes na rede.

Tabela 6.3 – Condições iniciais e resultados obtidos nas simulações de canais controlados por ligantes (Modelo 1).

Concentração de Ligantes na rede	Probabilidade de Acoplagem (p)
7000	1
Probabilidade de Desacoplagem (q)	Fluxo Percentual Médio
0,1	40,25
0,2	34,77
0,3	31,19
0,4	28,5
0,5	26,35
0,6	24,59
0,7	23
0,8	21,52
0,9	20,16

Figura 6.6: Comportamento do fluxo percentual médio em relação à probabilidade de desacoplamento (q) do ligante. A probabilidade de acoplamento foi adotada igual a unidade.

Figura 6.7: Comportamento do fluxo percentual médio em relação ao tempo. As curvas I, II e III correspondem a concentrações de 4000, 5000 e 7000 ligantes na rede respectivamente.

Do diagrama representado pela figura 6.3 verifica-se que o fluxo relativo atinge um regime estacionário, cujo valor depende do número de ligantes inseridos na rede, conforme atesta o gráfico contido na figura 6.5. A proporcionalidade entre fluxo relativo e o número de ligantes na rede, já era esperada uma vez que a maior oferta de ligantes acarreta um aumento na ocorrência de configurações que caracterizam o estado aberto do canal segundo as regras listadas na tabela 6.1. Da mesma forma, não é surpresa que o comportamento decrescente do fluxo relativo em relação à probabilidade de desacoplamento torna-se evidente no diagrama representado na figura 6.6.

Já no gráfico da figura 6.7 observa-se que é necessária uma quantidade mínima de ligantes para se obter um fluxo estacionário. Para as condições iniciais tamanho da rede adotadas, esta quantidade se mostrou não ser inferior a 5500 ligantes na rede. Ou seja, abaixo deste valor o sistema evolui para absorvente conforme indica as curvas I e II de 6.7.

A abordagem estatística forneceu resultados coerentes com o comportamento esperado de canais cujo mecanismo de abertura é regido por agonistas. Além de fornecer informações que podem servir de base para hipóteses sobre a relação entre a concentração de ligantes e o fluxo iônico pelo canal, como sugere o diagrama contido na figura 6.7.

6-3 – Simulação Computacional: Modelo 2

Continuando o estudo de canais iônicos controlados por ligantes, exploramos uma relação alternativa entre o ligante e o estado de abertura do canal. O modelo segue as mesmas premissas básicas do modelo anterior, porém difere com relação às regras de abertura e fechamento do canal.

Havendo um ligante no sítio onde exista um canal, dinâmica de abertura do canal é representada pelo grafo da figura 6.8.

Figura 6.8: Grafo representativo das possíveis transições entre estados de abertura e suas respectivas probabilidades para o canal controlado por ligantes (modelo 2). “p” e “q” representam as probabilidades do ligante se acoplar ou não ao canal respectivamente.

Ou seja, um canal estará *aberto* (A) quando *um* ligante estiver acoplado a ele e *fechado* (F) na situação em que *dois* ou *nenhum* ligante esteja acoplado a ele.

A tabela 6.4 sumariza a dinâmica utilizada na simulação computacional.

Tabela 6.4 – Dinâmica utilizada na simulação computacional. (Modelo 2)

Existência de canal no sítio (η)	Ligantes acoplados ao canal (λ)	Presença de ligante no sítio (θ)	Acoplamento/Desacoplamento	Estado de abertura (σ)	Presença de íon no sítio (μ)	Fluxo de íons
1	0	0	-	0	1	O íon difunde
					0	-
		1	O ligante se acopla tornando $\theta=1$ e $\lambda=1$	0	1	O íon difunde
					0	-
	1	0	-	1	1	O íon passa
					0	-
		1	O ligante se acopla ao canal com “p” tornando $\theta=0$ e $\lambda=2$	0	1	O íon difunde
					0	-
	2	0	Se $\mu=0$ o canal libera um ligante com “q” tornando $\theta=1$ e $\lambda=1$	1	1	O íon passa
					0	-
			Nada ocorre	0	1	O íon difunde
					0	-
		1	O ligante difunde	0	1	O íon difunde
					0	-
0	0	1	O ligante difunde	0	1	O íon difunde
		0	-		0	-

Figura 6.9 – Ilustração de um setor da rede quadrada utilizada na simulação computacional e seus principais elementos: íons, canais abertos e canais fechados. Cada intersecção de linhas representa um sítio da rede.

6.3.1 – Resultados Obtidos e Discussão

Figura 6.10: Comportamento do fluxo percentual médio no decorrer do tempo para 4000 ligantes na rede, probabilidade de acoplamento (p) igual a 1 e probabilidade de desacoplamento (q) igual a 0,1.

**Tabela 6.5 – Dinâmica utilizada na simulação de canais controlados por ligantes
(Modelo 2)**

Probabilidades	
Acoplagem (p)	Desacoplagem (q)
1	0,1
Concentração de Ligantes na rede	Fluxo Percentual Médio
1000	18,19
2000	32,32
3000	43,26
4000	50,15
5000	52,44
6000	50,28
7000	45,18
8000	35,94
9000	23,95
10000	7,34

Figura 6.11: Comportamento do fluxo percentual médio em relação ao número de ligantes presentes na rede de acordo com as condições iniciais listadas na tabela 6.5

O gráfico da figura 6.10 denota que o fluxo relativo atinge um regime estacionário, cujo valor depende do número de ligantes inseridos na rede conforme ilustra a figura 6.11. Ainda no mesmo diagrama podemos notar que canais regidos pela dinâmica proposta, apontam um máximo para o fluxo relativo, o que implica dois comportamentos distintos com relação ao número de ligantes na rede. Ou seja, em um primeiro momento o número de canais abertos é proporcional ao número de ligantes na rede, porém após dado *valor crítico* para a concentração de ligantes o número de canais abertos passa a se comportar de maneira oposta ao aumento no número de ligantes na rede, o que influencia diretamente no valor do fluxo iônico. Este interessante comportamento da cinética de abertura do canal, além de evidenciar a sensibilidade à concentração do ligante, sugere algum tipo de mecanismo de controle da atividade do canal sensível à quantidade de ligante no meio, o que poderia muito bem servir como uma “válvula de segurança” impedindo que a concentração intracelular de determinado íon não exceda determinado valor crítico, através da inibição do funcionamento de canais responsáveis pelo seu transporte.

Capítulo 7

Conclusão

Após o estudo que constituiu este trabalho, concluimos que a modelagem estatística emergente da interpretação dos canais iônicos como sistemas de estados discretos markovianos, obteve sucesso não só na concordância qualitativa com o modelo fenomenológico proposto por HODGKIN & HUXLEY [8], mas foi capaz de propiciar uma interpretação física para os parâmetros adimensionais presentes nos modelos empíricos de HODGKIN & HUXLEY. Parâmetros estes que constituem peça importantíssima, senão fundamental, no entendimento do mecanismo de abertura dos canais iônicos.

Os resultados obtidos e discutidos nos *capítulos 3 e 4* não deixam dúvida de que canais iônicos são estruturas físicas de dinâmica estocástica inerente, permitindo assim, não só uma interpretação física para o fenômeno como também franqueando toda a estrutura físico-matemática da Mecânica Estatística na qual se inclui os modelos estatísticos de rede.

Desta forma, o presente trabalho mais do que simular canais cujo comportamento já se conhece experimentalmente, estabelece uma plataforma de trabalho na abordagem do estudo dos canais iônicos e sua cinética de abertura.

Assumir uma interpretação markoviana para o mecanismo de abertura dos canais, permitiu a simulação de situações mais complexas, como o caso em que os canais dependem de ligantes para seu processo de abertura, como discutido no

capítulo 6. Tais sistemas são exemplos de situações em que a modelagem analítica se torna extremamente difícil, quando não impossível. No entanto a abordagem estatística nos permitiu construir modelos cujos resultados são qualitativamente consistentes com o observado experimentalmente. Permitindo até a exploração de uma situação hipotética (*modelo 2*), o que indica o poderio especulativo da abordagem estatística corroborada, inclusive, pelo trabalho de GUISONI & OLIVEIRA [6].

Sob o ponto de vista da aplicação dos modelos estatísticos de rede, o estudo contido no *capítulo 5* exemplifica a utilização desta ferramenta no desenvolvimento de modelos estatísticos de rede que simulem computacionalmente a ação de fármacos e outras substâncias que influem no comportamento dos canais, reforçando uma vez mais o benefício da abordagem na elucidação de doenças, bem como o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes.

A metodologia desenvolvida neste trabalho permite, também, uma ampla gama de especulações acerca das estruturas responsáveis pela seletividade, sensibilidade aos agentes ativadores, ou inibidores, dos canais. Dada a enorme e crescente quantidade de informações obtidas experimentalmente sobre canais iônicos, acreditamos ser interessante estudar tais estruturas e suas características sob o ponto de vista da Mecânica Estatística. Expandindo o horizonte de estudos além dos eventos macroscópicos, como o fluxo, tratados neste trabalho. Considerando, por exemplo, o movimento do próprio íon no interior do canal (SIGG & BEZANILLA [14]). Estudo este que pode, muito bem, fornecer pistas importantes sobre a natureza física da estrutura interna do canal que regula seu mecanismo de abertura.

Apêndices

A1 – Single Channels, canais com estados de inativação e canais sob efeito de bloqueadores

Para a elaboração de todos os programas utilizados nas simulações computacionais, o software **Delphi 7.0** que utiliza a linguagem PASCAL. A interface gráfica do programa desenvolvido é ilustrada na figura A1.1

Figura A1.1 – Interface gráfica para simulação dos canais dependentes de voltagem

A1.1 – Sintaxe em DELPHI-PASCAL

{Canais Dependentes de Voltagem}

```
procedure TForm1.Button1Click(Sender: TObject);
var open,deltat,w,sum,fluxomedio,valor,cargap,t,v,s,z,r,y,p,q,x:real;
bloqueio,it,abertop,aberto,carga,teste,soma,je,jd,iup,idw,m,n,k,i,j,nv:integer;
venon, mi, sigma, eta: array[1..100,1..100] of integer;
h:array[0..1000]of longint;
fluxo:array[0..100000]of real;
```

```
begin
```

```
randomize;
```

```
it:=strtoint(edit10.Text); {número de iterações}
```

{Leitura das probabilidades }

```
p:=strtofloat(edit1.Text); {Probabilidade Fechado→Aberto}
```

```
r:=strtofloat(edit2.Text); {Probabilidade Aberto→Fechado}
```

```
q:=strtofloat(edit3.Text); {Probabilidade Fechado→Inativado}
```

```
s:=strtofloat(edit4.Text); {Probabilidade Aberto→Inativado}
```

```
t:=strtofloat(edit5.Text); {Probabilidade Inativado→Fechado}
```

```
nv:=strtoint(edit7.Text); {Número de bloqueadores na rede}
```

```
v:=strtofloat(edit8.Text); {Probabilidade de bloqueio}
```

```
w:=strtofloat(edit9.Text); {Probabilidade de desbloqueio}
```

{Criação do vetor histograma}

```
for i:=0 to 1000 do begin
```

```
h[i]:=0;
```

```
end;
```

{Criação do vetor fluxo}

```
for i:=1 to it do begin
```

```
fluxo[i]:=0;
end;
```

{Criação das matrizes :etal,sigma, venon ,mi}

```
for i:=1 to 100 do begin
for j:=1 to 100 do begin
eta[i,j]:=0;
sigma[i,j]:=0;
mi[i,j]:=0;
venon[i,j]:=0;
end;
end;
```

{Distribuição dos canais na rede e atribuição dos estados iniciais de abertura}

```
for i:=1 to 100 do begin
for j:=1 to 100 do begin
k:=i+j;
if odd(k) then begin
eta[i,j]:=1;
end;
end;
end;
```

{Distribuição dos íons na rede}

```
k:=8000;
while k>0 do begin
m:=random(100)+1;
n:=random(100)+1;
if mi[m,n]=0 then begin
mi[m,n]:=1;
k:=k-1;
```

end;

end;

{Distribuição de bloqueadores na rede}

k:=nv;

while k>0 do begin

m:=random(100)+1;

n:=random(100)+1;

if venon[m,n]=0 then begin

venon[m,n]:=1;

k:=k-1;

end;

end;

{Indicador do estágio de execução do programa}

gauge1.progress:=0;

gauge1.minvalue:=0;

gauge1.maxvalue:=it;

{Condições iniciais dos gráficos e contadores}

series1.Clear;

series2.clear;

open:=0;

{Confifuração do banco de dados}

if table1.Active then table1.close;

table1.emptytable;

table1.open;

if table2.Active then table2.close;

table2.emptytable;

table2.open;

{Início do primeiro loop }

for i:=0 to it do begin

carga:=0;

aberto:=0;

for m:=1 to 100 do begin *{Início do 2o loop}*

for n:=1 to 100 do begin *{Início do 2o loop}*

{Condições periódicas de contorno}

je:=n-1; if je<=0 then je:=1;

jd:=n+1; if jd>100 then jd:=100;

iup:=m-1; if iup<=0 then iup:=1;

idw:=m+1; if idw>100 then idw:=100;

{Difusão dos íons na rede}

if (eta[m,n]=0)and(mi[m,n]=1)then begin

x:=random(4);

if x=0 then begin

if mi[m,jd]=0 then begin

mi[m,n]:=0;

mi[m,jd]:=1;

end;

end;

if x=1 then begin

if mi[m,je]=0 then begin

mi[m,n]:=0;

mi[m,jd]:=1;

end;

end;

if x=2 then begin

```

if mi[iup,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if mi[idw,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=3)and(mi[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if mi[m,jd]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if mi[m,je]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if mi[iup,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[iup,n]:=1;
end;

```

```

end;
if x=3 then begin
if mi[idw,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

if (canal[m,n]=1)and(gate[m,n]=0)and(ion[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if mi[m,jd]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if mi[m,je]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if mi[iup,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if mi[idw,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;

```

```

mi[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=2)and(mi[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if mi[m,jd]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if mi[m,je]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if mi[iup,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if mi[idw,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

```

{Difusão dos bloqueadores na rede}

```

if (sigma[m,n]=0)and(venon[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if venon[m,jd]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if venon[m,je]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if venon[iup,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if venon[idw,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=0)and(venon[m,n]=1)then begin
x:=random(4);

```

```

if x=0 then begin
  if venon[m,jd]=0 then begin
    venon[m,n]:=0;
    venon[m,jd]:=1;
  end;
end;

if x=1 then begin
  if venon[m,je]=0 then begin
    venon[m,n]:=0;
    venon[m,je]:=1;
  end;
end;

if x=2 then begin
  if venon[iup,n]=0 then begin
    venon[m,n]:=0;
    venon[iup,n]:=1;
  end;
end;

if x=3 then begin
  if venon[idw,n]=0 then begin
    venon[m,n]:=0;
    venon[idw,n]:=1;
  end;
end;
end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=3)and(venon[m,n]=1)then begin
  x:=random(4);
  if x=0 then begin
    if venon[m,jd]=0 then begin
      venon[m,n]:=0;
      venon[m,jd]:=1;
    end;
  end;
end;

```

```

end;
end;
if x=1 then begin
if venon[m,je]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if venon[iup,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if venon[idw,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=2)and(venon[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if venon[m,jd]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if venon[m,je]=0 then begin

```

```

venon[m,n]:=0;
venon[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if venon[iup,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if venon[idw,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[idw,n]:=1;
end;
end;
end;
end;

```

{Cálculo do estado de abertura dos canais }

```

teste:=0;
if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=0)and(teste=0)then begin
teste:=1;
z:=p+q;
y:=random(1000001)/1000000;
if y<=p then gate[m,n]:=1;
if (y>p)and(y<=z)then gate[m,n]:=2
end;

```

```

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)and(teste=0)then begin
teste:=1;
z:=r+s;
y:=random(1000001)/1000000;

```



```

if y<=r then gate[m,n]:=0;
if (y>r)and(y<=z)then gate[m,n]:=2
end;

```

```

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=2)and(teste=0)then begin
teste:=1;
y:=random(1000001)/1000000;
if y<=t then gate[m,n]:=0;
end;

```

{Efeito do bloqueador sobre o estado de abertura do canal}

```

bloqueio:=0;
if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)and(venon[m,n]=1) then begin
bloqueio:=1;
y:=random(1000001)/1000000;
if y<=v then begin
sigma[m,n]:=3;
venon[m,n]:=0;
end
else begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if venon[m,jd]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if venon[m,je]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[m,je]:=1;
end;
end;

```

```

end;
if x=2 then begin
if venon[iup,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if venon[idw,n]=0 then begin
venon[m,n]:=0;
venon[idw,n]:=1;
end;
end;

end;
end;

```

{Desbloqueio do canal}

```

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=3)and(venon[m,n]=0)and(bloqueio=0)then begin
y:=random(1000001)/1000000;
if y<=w then begin
gate[m,n]:=0;
venon[m,n]:=1;
end;
end;

```

{Contagem dos íons que atravessam a rede}

```

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)and(mi[m,n]=1) then carga:=carga+1;

```

{Contagem dos canais abertos}

```

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)then begin
aberto:=aberto+1;

```

```

valor:=aberto/5;
abertop:=round(valor);
end;

```

```

end;{Final do 2o. loop}
end;{Final do 2o. loop}

```

```

{Construção do gráfico e indicador de processamento}
series1.AddXY(i,cargap);
cargap:=carga/50;

```

```

{Inserção de dados no banco de dados}
table1.Insert;
table1['tempo']:=i;
table1['fluxo']:=cargap;
table1.post;

```

```

fluxo[i]:=cargap;

```

```

{contagem do tempo de abertura do canal[50,51]}
open:=open+gate[50,51];

```

```

{geração de dados para histograma}
h[abertop]:=h[abertop]+1;

```

```

{indicador do estágio de execução do programa}
gauge1.progress:=gauge1.progress+1;

```

```

end;{Final do 1o.loop}

```

```

{Dados de saída para confecção do histograma de canais abertos}
for k:=1000 downto 0 do begin

```

```

table2.Insert;
table2['percentagem']:=k;
table2['frequência']:=h[k];
table2.post;
end;

```

{construção do histograma de canais abertos}

```

for i:=0 to 1000 do begin
series2.add(h[i]);
end;

```

{cálculo do fluxo médio}

```

sum:=0;
j:=0;
for i:=5000 to it do begin
sum:=sum+fluxo[i];
j:=j+1;
end;
fluxomedio:=sum/j;
edit6.Text:=floattostrf(fluxomedio,ffgeneral,4,2);

```

end;{Final da subrotina}

A.2 – Canais controlados por ligantes

Figura A2.1 – Interface gráfica para simulação dos canais dependentes de ligantes (modelos 1 e 2).

A2.1 - Sintaxe em DELPHI-PASCAL: Modelo 1

```

procedure TForm1.Button1Click(Sender: TObject);
var deltat,open,r,q,p,sum,fluxomedio,valor,cargap,z,y,x:real;
it,sitio,find,c,abertop,aberto,
carga,teste,soma,je,jd,iup,idw,m,n,k,i,j,l:longint;
mi, sigma, eta, teta, lambda:array[1..100,1..100] of integer;
h:array[0..1000]of longint;
fluxo:array[0..100000]of real;

begin

```

```
randomize;
```

```
c:=strtoint(edit1.Text); {c=número total de ligantes na rede}
```

```
p:=strtofloat(edit3.Text); {p=probabilidade do ligante se acoplar ao canal}
```

```
q:=strtofloat(edit4.Text); {q=Probabilidade do ligante desacoplar do canal}
```

```
it:=strtoint(edit5.Text); {Número de iterações}
```

```
{Criação do vetor histograma}
```

```
for i:=0 to 1000 do begin
```

```
h[i]:=0;
```

```
end;
```

```
{Criação do vetor fluxo}
```

```
for i:=1 to it do begin
```

```
fluxo[i]:=0;
```

```
end;
```

```
{Construção das matrizes: canais, ligantes, íons, gate}
```

```
for i:=1 to 100 do begin
```

```
for j:=1 to 100 do begin
```

```
eta[i,j]:=0;
```

```
sigma[i,j]:=0;
```

```
lambda[i,j]:=0;
```

```
teta[i,j]:=0;
```

```
mi[i,j]:=0;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
{Distribuição de canais na rede}
```

```
for i:=1 to 100 do begin
```

```
for j:=1 to 100 do begin
```

```
k:=i+j;
```

```

if odd(k) then begin
eta[i,j]:=1;
end;
end;
end;

```

{Distribuição dos íons na rede}

```

k:=8000;
while k>0 do begin
m:=random(100)+1;
n:=random(100)+1;
if mi[m,n]=0 then begin
mi[m,n]:=1;
k:=k-1;
end;
end;

```

{Distribuição dos ligantes na rede}

```

k:=c;
while k>0 do begin
m:=random(100)+1;
n:=random(100)+1;
if teta[m,n]=0 then begin
teta[m,n]:=1;
k:=k-1;
end;
end;

```

{Indicador do estágio de execução do programa}

```

gauge1.progress:=0;
gauge1.minvalue:=0;
gauge1.maxvalue:=it;

```

{Condições iniciais dos gráficos e contadores}

series1.Clear;

series2.clear;

abertop:=0;

cargap:=0;

open:=0;

{Configuração do banco de dados}

if table1.Active then table1.close;

table1.emptytable;

table1.open;

if table2.Active then table2.close;

table2.emptytable;

table2.open;

{Início do primeiro loop }

for i:=0 to it do begin

{indicador do estágio de execução do programa}

gauge1.progress:=gauge1.progress+1;

carga:=0;

aberto:=0;

abertop:=0;

{Atualização da rede : 2o. loop}

for m:=1 to 100 do begin

for n:=1 to 100 do begin

{Condições periódicas de contorno}


```

je:=n-1; if je<=0 then je:=1;
jd:=n+1; if jd>100 then jd:=100;
iup:=m-1; if iup<=0 then iup:=1;
idw:=m+1; if idw>100 then idw:=100;

```

{difusão dos íons na rede}

```

if (canal[m,n]=0)and(ion[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if mi[m,jd]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if mi[m,je]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if ion[iup,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if mi[idw,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[idw,n]:=1;
end;
end;

```

end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=0)and(mi[m,n]=1)then begin

x:=random(4);

if x=0 then begin

if mi[m,jd]=0 then begin

mi[m,n]:=0;

mi[m,jd]:=1;

end;

end;

if x=1 then begin

if mi[m,je]=0 then begin

mi[m,n]:=0;

mi[m,je]:=1;

end;

end;

if x=2 then begin

if mi[iup,n]=0 then begin

mi[m,n]:=0;

mi[iup,n]:=1;

end;

end;

if x=3 then begin

if mi[idw,n]=0 then begin

mi[m,n]:=0;

mi[idw,n]:=1;

end;

end;

end;

{Difusão dos ligantes na rede}

teste:=0;

```
if(eta[m,n]=0)and(teta[m,n]=1)then begin
```

```
teste:=1;
```

```
x:=random(4);
```

```
if x=0 then begin
```

```
if teta[m,jd]=0 then begin
```

```
teta[m,n]:=0;
```

```
teta[m,jd]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if x=1 then begin
```

```
if teta[m,je]=0 then begin
```

```
teta[m,n]:=0;
```

```
teta[m,je]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if x=2 then begin
```

```
if teta[iup,n]=0 then begin
```

```
teta[m,n]:=0;
```

```
teta[iup,n]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if x=3 then begin
```

```
if teta[idw,n]=0 then begin
```

```
teta[m,n]:=0;
```

```
teta[idw,n]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=0)and(teste=0)then begin
```

```
teste:=1;
```

```
y:=random(1000001)/1000000;
```

```

if y<=p then begin
lambda[m,n]:=1;
lambda[m,n]:=0;
end
else begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if teta[m,jd]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if teta[m,je]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if teta[iup,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if teta[idw,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[idw,n]:=1;
end;
end;

end;

```

end;

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=1)and(teste=0)then begin

teste:=1;

y:=random(1000001)/1000000;

if y<=p then begin

count[m,n]:=2;

bound[m,n]:=0;

end

else begin

x:=random(4);

if x=0 then begin

if teta[m,jd]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[m,jd]:=1;

end;

end;

if x=1 then begin

if teta[m,je]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[m,je]:=1;

end;

end;

if x=2 then begin

if teta[iup,n]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[iup,n]:=1;

end;

end;

```

if x=3 then begin
if teta[idw,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[idw,n]:=1;
end;
end;
end;
end;

```

```

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=2)and(teste=0)then begin
teste:=1;
x:=random(4);
if x=0 then begin
if teta[m,jd]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,jd]:=1;
end;
end;

```

```

if x=1 then begin
if teta[m,je]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,je]:=1;
end;
end;

```

```

if x=2 then begin
if teta[iup,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[iup,n]:=1;
end;

```

end;

if x=3 then begin

if teta[idw,n]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[idw,n]:=1;

end;

end;

end;

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=0)and(lambda[m,n]=2)and(teste=0)then begin

teste:=1;

y:=random(1000001)/1000000;

if y<q then begin

lambda[m,n]:=1;

teta[m,n]:=1;

end;

end;

{Cálculo do estado de abertura do canal}

if(eta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=0)then sigma[m,n]:=0;

if(eta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=1)then sigma[m,n]:=0;

if(eta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=2)then sigma[m,n]:=1;

{Contagem dos íons que atravessam a rede}

if(eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)and(mi[m,n]=1)then carga:=carga+1;

{Contagem dos canais abertos}

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)then begin

aberto:=aberto+1;

{Cálculo do percentual de canais abertos}

valor:=aberto/5;

abertop:=round(valor);

end;

end;{Final do 2o. loop}

end;{Final do 2o. loop}

{Geração de dados para histograma de canais abertos}

h[abertop]:=h[abertop]+1;

{Construção do gráfico (fluxo relativo x tempo)

e indicador de processamento}

cargap:=carga/50;

series1.AddXY(i,cargap);

{Inserção de dados no arquivo de saída}

table1.Insert;

table1['tempo']:=i;

table1['fluxo']:=cargap;

table1.post;

{ Coleta do fluxo}

fluxo[i]:=cargap;

end;{Final do 1o.loop}

{construção do histograma frequencial de canais abertos}

for k:=0 to 1000 do begin

series2.add(h[k]);

end;

{Dados de saída para confecção do histograma}

for k:=1000 downto 0 do begin

table2.Insert;

table2['percentagem']:=k;

table2['frequência']:=h[k];

table2.post;

end;

{cálculo do fluxo médio}

sum:=0;

j:=0;

for k:=5000 to it do begin

sum:=sum+fluxo[k];

j:=j+1;

end;

fluxomedio:=sum/j;

edit2.Text:=floattostrf(fluxomedio,ffgeneral,4,2);

{Fim da subroutine}

end;

A2.2 - Sintaxe em DELPHI-PASCAL: Modelo 2

{Canais controlados por ligantes: Modelo 2}

procedure TForm1.Button1Click(Sender: TObject);

var deltat,open,r,q,p,sum,fluxomedio,valor,cargap,z,y,x:real;

it,sitio,find,c,abertop,aberto,

carga,teste,soma,je,jd,iup,idw,m,n,k,i,j,l:longint;

mi, sigma, eta, teta, lambda:array[1..100,1..100] of integer;

h:array[0..1000]of longint;

fluxo:array[0..100000]of real;

```

begin
randomize;

c:=strtoint(edit1.Text); {c=número total de ligantes na rede}
p:=strtofloat(edit3.Text); {p=probabilidade do ligante se acoplar ao canal}
q:=strtofloat(edit4.Text); {q=Probabilidade do ligante desacoplar do canal}
it:=strtoint(edit5.Text); {Número de iterações}

{Criação do vetor histograma}
for i:=0 to 1000 do begin
h[i]:=0;
end;

{Criação do vetor fluxo}
for i:=1 to it do begin
fluxo[i]:=0;
end;

{Construção das matrizes: eta ,teta, mi e sigma}

for i:=1 to 100 do begin
for j:=1 to 100 do begin
eta[i,j]:=0;
sigma[i,j]:=0;
lambda[i,j]:=0;
teta[i,j]:=0;
mi[i,j]:=0;
end;
end;

{Distribuição de canais na rede }

```

```

for i:=1 to 100 do begin
for j:=1 to 100 do begin
k:=i+j;
if odd(k) then begin
eta[i,j]:=1;
end;
end;
end;

```

{Distribuição dos íons na rede}

```

k:=8000;
while k>0 do begin
m:=random(100)+1;
n:=random(100)+1;
if mi[m,n]=0 then begin
mi[m,n]:=1;
k:=k-1;
end;
end;

```

{Distribuição dos ligantes na rede}

```

k:=c;
while k>0 do begin
m:=random(100)+1;
n:=random(100)+1;
if teta[m,n]=0 then begin
teta[m,n]:=1;
k:=k-1;
end;
end;

```

{Indicador do estágio de execução do programa}

```

gauge1.progress:=0;
gauge1.minvalue:=0;
gauge1.maxvalue:=it;

```

{Condições iniciais dos gráficos e contadores}

```

series1.Clear;
series2.clear;
abertop:=0;
cargap:=0;
open:=0;

```

{Configuração do banco de dados}

```

if table1.Active then table1.close;
table1.emptytable;
table1.open;

```

```

if table2.Active then table2.close;
table2.emptytable;
table2.open;

```

{Início do primeiro loop }

```

for i:=0 to it do begin

```

{indicador do estágio de execução do programa}

```

gauge1.progress:=gauge1.progress+1;

```

```

carga:=0;
aberto:=0;
abertop:=0;

```

{Atualização da rede : 2o. loop}

```
for m:=1 to 100 do begin
```

```
for n:=1 to 100 do begin
```

```
{Condições periódicas de contorno}
```

```
je:=n-1; if je<=0 then je:=1;
```

```
jd:=n+1; if jd>100 then jd:=100;
```

```
iup:=m-1; if iup<=0 then iup:=1;
```

```
idw:=m+1; if idw>100 then idw:=100;
```

```
{difusão dos íons na rede}
```

```
if (eta[m,n]=0)and(mi[m,n]=1)then begin
```

```
x:=random(4);
```

```
if x=0 then begin
```

```
if mi[m,jd]=0 then begin
```

```
mi[m,n]:=0;
```

```
mi[m,jd]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if x=1 then begin
```

```
if mi[m,je]=0 then begin
```

```
mi[m,n]:=0;
```

```
mi[m,je]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if x=2 then begin
```

```
if mi[iup,n]=0 then begin
```

```
mi[m,n]:=0;
```

```
mi[iup,n]:=1;
```

```
end;
```

```
end;
```

```
if x=3 then begin
```

```
if mi[idw,n]=0 then begin
```

```

mi[m,n]:=0;
mi[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=0)and(mi[m,n]=1)then begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if mi[m,jd]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if mi[m,je]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if mi[iup,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if mi[idw,n]=0 then begin
mi[m,n]:=0;
mi[idw,n]:=1;
end;
end;

```

end;

{Difusão dos ligantes na rede}

teste:=0;

if(eta[m,n]=0)and(teta[m,n]=1)then begin

teste:=1;

x:=random(4);

if x=0 then begin

if teta[m,jd]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[m,jd]:=1;

end;

end;

if x=1 then begin

if teta[m,je]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[m,je]:=1;

end;

end;

if x=2 then begin

if teta[iup,n]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta [iup,n]:=1;

end;

end;

if x=3 then begin

if teta [idw,n]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[idw,n]:=1;

end;

end;

end;

```

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=0)and(teste=0)then begin
teste:=1;
y:=random(1000001)/1000000;
if y<=p then begin
lambda[m,n]:=1;
teta[m,n]:=0;
end
else begin
x:=random(4);
if x=0 then begin
if teta[m,jd]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,jd]:=1;
end;
end;
if x=1 then begin
if teta[m,je]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,je]:=1;
end;
end;
if x=2 then begin
if teta[iup,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[iup,n]:=1;
end;
end;
if x=3 then begin
if teta[idw,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[idw,n]:=1;

```


end;

end;

end;

end;

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=1)and(teste=0)then begin

teste:=1;

y:=random(1000001)/1000000;

if y<=p then begin

lambda[m,n]:=2;

teta[m,n]:=0;

end

else begin

x:=random(4);

if x=0 then begin

if teta[m,jd]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[m,jd]:=1;

end;

end;

if x=1 then begin

if teta[m,je]=0 then begin

teta[m,n]:=0;

teta[m,je]:=1;

end;

end;

if x=2 then begin

if teta[iup,n]=0 then begin

```

teta[m,n]:=0;
teta[iup,n]:=1;
end;
end;

```

```

if x=3 then begin
if teta[idw,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[idw,n]:=1;
end;
end;
end;
end;

```

```

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=2)and(teste=0)then begin
teste:=1;
x:=random(4);
if x=0 then begin
if teta[m,jd]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,jd]:=1;
end;
end;
end;

```

```

if x=1 then begin
if teta[m,je]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[m,je]:=1;
end;
end;
end;

```

```

if x=2 then begin

```

```

if teta[iup,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[iup,n]:=1;
end;
end;

```

```

if x=3 then begin
if teta[idw,n]=0 then begin
teta[m,n]:=0;
teta[idw,n]:=1;
end;
end;
end;

```

```

if(eta[m,n]=1)and(teta[m,n]=0)and(lambda[m,n]=2)and(teste=0)then begin
teste:=1;
y:=random(1000001)/1000000;
if y<q then begin
lambda[m,n]:=1;
teta[m,n]:=1;
end;
end;

```

{Cálculo do estado de abertura do canal}

```

if(eta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=0)then sigma[m,n]:=0;
if(eta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=1)then sigma[m,n]:=1;
if(eta[m,n]=1)and(lambda[m,n]=2)then sigma[m,n]:=0;

```

{Contagem dos íons que atravessam a rede}

```

if(eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)and(mi[m,n]=1)then carga:=carga+1;

```

{Contagem dos canais abertos}

```
if (eta[m,n]=1)and(sigma[m,n]=1)then begin
```

```
aberto:=aberto+1;
```

```
{Cálculo do percentual de canais abertos}
```

```
valor:=aberto/5;
```

```
abertop:=round(valor);
```

```
end;
```

```
end;{Final do 2o. loop}
```

```
end;{Final do 2o. loop}
```

```
{Geração de dados para histograma frequencial de canais abertos}
```

```
h[abertop]:=h[abertop]+1;
```

```
{Construção do gráfico (fluxo relativo x tempo)
```

```
e indicador de processamento}
```

```
cargap:=carga/50;
```

```
series1.AddXY(i,cargap);
```

```
{Inserção de dados no arquivo de saída}
```

```
table1.Insert;
```

```
table1['tempo']:=i;
```

```
table1['fluxo']:=cargap;
```

```
table1.post;
```

```
{Coleta do fluxo}
```

```
fluxo[i]:=cargap;
```

```
end;{Final do 1o.loop}
```

```
{construção do histograma frequencial de canais abertos}
```

```
for k:=0 to 1000 do begin
```

```
series2.add(h[k]);
```

```
end;
```

```
{Dados de saída para confecção do histograma}
```

```
for k:=1000 downto 0 do begin
```

```
table2.Insert;
```

```
table2['percentagem']:=k;
```

```
table2['frequência']:=h[k];
```

```
table2.post;
```

```
end;
```

```
{cálculo do fluxo médio}
```

```
sum:=0;
```

```
j:=0;
```

```
for k:=5000 to it do begin
```

```
sum:=sum+fluxo[k];
```

```
j:=j+1;
```

```
end;
```

```
fluxomedio:=sum/j;
```

```
edit2.Text:=floattostrf(fluxomedio,ffgeneral,4,2);
```

```
{Fim da subrotina}
```

```
end;
```

Referências

- [1] A.L. & Huxley, A.F., “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve”, *Journal of Physiology*, **117**:500-544 (1952)

- [2] Chen, D., Lear, J., & Eisenberg, R.S. “Permeation through an open channel Poisson-Nernst-Planck theory of a synthetic ionic channel”.
Biophysical Journal, **72**: 97-116 (1997)

- [3] Cole, K.S. “Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane”,
Arch. Sci. Physiol., **3**: 253-258 (1949)

- [4] Eisenberg, R.S.,”Ionic channels in biological membranes, natural nanotubes”,
Accounts of Chemical Research **31**: 117-125 (1998)

- [5] Garcia, E.A.C., “Biofísica”, *Sarvier, São Paulo* (1998)

- [6] Guisoni, N. & de Oliveira, M.J., “Lattice Model for calcium dynamics”. *Physical Review E*, **71**, 061910 (2005).

- [7] Hille, B., “Ionic Channels of Excitable Membranes”, *Sinauer Assoc.*, (1992)

- [8] Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F., “Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*”, *Journal of Physiology*, **116**:449-472 (1952)

- [9] Hodgkin, A.L., Horowicz, P., “ The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres”, *J. Physiol.*, **148**:127-160 (1959)
- [10] Marmont, G., “ Studies on the axon membrane. A new method”, *J. Cell. Comp. Physiol.* **34**:351-382 (1949)
- [11] Rojas, C.V., “Ion channels and human genetic diseases”, *NIPS* **11**:36-42 (1996)
- [12] Salinas, S.R.A., “Introdução à Física Estatística”, *Edusp*, (1999)
- [13] Sánchez, J.A., Dani, J.A., Siemen, D. & Hille, B., “Slow permeation of organic cations in acetylcholine receptors channels” *J. Gen. Physiol.* **87**:985-1001 (1986)
- [14] Sigg, D., Qian, H., Bezanilla, F., “Kramers’ diffusion theory applied to gating kinetics of voltage-dependent ion channels”, *Biophysical Journal*, **76**:782-803 (1999)
- [15] Singer, S.J. & Nicolson, G.L., “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes”, *Science*, **175**:720-731 (1972)
- [16] Tomé, T. & de Oliveira, M. J. “Dinâmica Estocástica e irreversibilidade”, *Edusp*, (2001)
- [17] Tomé, T. “Irreversibilidade: Modelos de Rede com Dinâmicas Estocásticas”, *Tese de Livre-Docência, Instituto de Física, Universidade de São Paulo* (1996)

Bibliografia

- [1] Bezanilla, F., Perozo, E. & Stefani, E. "Gating of Shaker K⁺ channels. II. The components of gating currents and a model of channel activation". *Biophysical Journal*, **66**:1011-1021 (1994)

- [2] Binder, K., "Monte Carlo Method in Statistical Physics". *Springer-Verlag*, 2. edition, Berlin (1986)

- [3] Chen, D.P. & Eisenberg, R.S. "Charges, currents, and potentials in ionic channels of one conformation". *Biophysical Journal*. **64**:1405-1421 (1993a).

- [4] Chen, D., Eisenberg, R., Jerome, J., & Shu, C. "Hydrodynamic model of temperature change in open ionic channels". *Biophysical J.* **69**: 2304-2322. (1995).

- [5] Condat, C. A., and Jäckle, J., "Closed-time distribution of ionic channels analytical solution to a one-dimensional defect-diffusion model". *Biophysical Journal*, **55**:915-925 (1989)

- [6] Cooper, K.E., Gates, P.Y. & Eisenberg, R.S. "Surmounting barriers in ionic channels". *Quart. Rev. Biophysics*. **21**: 331-364 (1988).

- [7] Cooper, K.E., Gates, P.Y., & Eisenberg, R.S. "Diffusion theory and discrete rate constants in ion permeation". *J. Membrane Biol.* **106**: 95-105 (1988).

- [8] Corry, B., Allen, T. W., Kuyucak, S. & Chung, S., "Mechanisms of Permeation and Selectivity in Calcium Channels" *Biophys J.* **80**: 195-214. (2001)

- [9] Eisenberg, R.S., Klosek, M.M. & Schuss, Z., "Diffusion as a chemical reaction; Stochastic trajectories between fixed concentrations", *Journal of Chemical Physics*, **102**:1767 (1995)

- [10] Eisenberg, R.S., Klosek, M.M. & Schuss, Z. "Diffusion as a chemical reaction: stochastic trajectories between fixed concentrations". *J. Chem. Phys.*, **102(4)**: 1767-1780 (1995).

- [11] Eisenberg, R.S., Frank, M., Stevens, C.F., "Membranes, Channels and Noise", *Plenum Press*, (1984)

- [12] Eisenberg, R.S. "Computing the field in proteins and channels". *J. Membrane Biol.* **150**:1-25 (1996).

- [13] Eisenberg, R.S., "Ionic channels in biological membranes. Electrostatic analysis of a natural nanotube". *Contemporary Physics*, **39 (6)**: 447-466 (1998)

- [14] Eisenberg, R.S." From Structure to Function in Open Ionic Channels" *Journal of Membrane Biology*, **171**:1-24 (1999)

- [15] Eisenberg, R. S., "Ionic channels: natural nanotubes described by the drift diffusion equations". *Superlattices and Microstructures*. **27**: 545-549. (2000)

- [16] Eisenberg, R.S. "Ionic channels as natural nanodevices".
J. Computational Electronics **1**: 331-334 (2002)
- [17] Eisenberg, R.S. "Ion channels as devices".
J. Computational Electronics **2**: 245-249 (2003)
- [18] Eisenberg, R.S. "Why can't protons move through ion channels?"
Biophysical Journal **85**: 3427-3428 (2003)
- [19] Gardner, Carl L., Jerome, Joseph W. & Eisenberg, R.S.
"Electrodiffusion model simulation of rectangular current pulses in a voltage
biased biological channel". *Journal of Theoretical Biology*, **219**: 291-299. (2002)
- [20] Gardner, C. L., Jerome, J. W. & Eisenberg, R.S. "Electrodiffusion Model
Simulation of Rectangular Current Pulses in a Biological Channel".
J. Computational Electronics, **1**: 347-351 (2002).
- [21] Gates , P.Y., Cooper, K.E., Rae, J. & Eisenberg, R.S. "Predictions of
diffusion models for one ion membrane channels". *Progress in Biophysics and
Molecular Biology*. **53**: 153-196 (1989).
- [22] Hammersley, J.M. & Handscomb, D.C., " Monte Carlo Methods". *Chapman
and
Hall, London* (1964)
- [23] Heerman, D.W., "Computer Simulation Methods in Theoretical Physics",
Springer –Verlag, 2. ed., (1990)

- [24] Hollerbach, U., Chen, D.P., & Eisenberg, R.S. "Two and three dimensional Poisson-Nernst-Planck simulations of current through Gramicidin-A". *J. Scientific Computing*, **16(4)**: 373-409 (2001)
- [25] Horowicz, P., Gage, P.W. & Eisenberg, R.S. "The role of the electrochemical gradient in determining potassium fluxes in frog striated muscle". *J. Gen. Physiol.* **51**: 193s-203s (1968).
- [26] Isenberg, G., "Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibres controlled by (Ca^{+2}) ? *Nature*, **253**:273-274 (1975)
- [27] Kienker, P., "Equivalence of aggregate Markov models of ion-channel gating", *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, **236**:269-309 (1989)
- [28] Kramers, H.A., "Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions", *Physica*, **7**:284-304 (1940)
- [29] Liebovitch, L.S., "Testing fractal and Markov models of ion channel kinetics" *Biophysical Journal*, **55**:373-377 (1989)
- [30] Liebovitch, L.S., Fischbarg, J. & Koniarek, J.P., "Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov process". *Math. Biosci.* **84**:37-68 (1987)
- [31] Montroll, E.W. & Weiss, G.H., "Random Walks in Lattices. II". *J. Math. Phys.*, **6**:167 (1965)
- [32] Mujumdar, MP "Monte Carlo simulations of ionic channel selectivity", *Bioinformatics*, **7**:359-364 (1991)

- [33] Nonner, W. & Eisenberg, R.S., "Electrodifussion in ionic channels of biological membranes". *Journal of Molecular Fluids*, **87**:149-162 (2000)
- [34] Oliveira, M.J., "Numerical Stochastic Methods in Statistical Mechanics", *Int. J. Mod. Phys.*, **10**:1313 (1996)
- [35] Papoulis, A., "Probability, Random Variables and Stochastic Process". *MacGraw-Hill* (1991)
- [36] Rumelin, W. "Numeric treatment of stochastics differential equations". *SIAM J. Numerical Anal.* **19**:604-613 (1982)
- [37] Van Kampen, N.G., "Stochastics Process in Physics and Chemistry ". *North-Holland Personal Library* (1992)
- [38] Van der Straaten, T., Kathawala, G., Kuang, Z., Boda, D., Chen, D.P., Ravaioli, U., Eisenberg, R.S., and Henderson, D. "Equilibrium structure of electrolyte calculated using equilibrium Monte Carlo, Molecular Dynamics, and transport Monte Carlo simulation". *Nanotech* **3**: 447-451 (2002)
- [39] Van der Straaten, T. A., Tang, J. M., Ravaioli, U., Eisenberg, R. S. & Aluru, N. "Simulating ion permeation through the OmpF Porin ion channel using three dimensional drift-diffusion theory. *Journal of Computational Electronics* **2**: 29-47(2003)