



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA**

MESTRADO EM BIOFÍSICA

**MEMÓRIA EM CINÉTICA DE CANAIS PARA POTÁSSIO
ATIVADOS POR CÁLCIO EM CÉLULAS DE LEYDIG**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Regina Acacia Campos de Oliveira

ORIENTADOR

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

CO-ORIENTADORES

Dr. Catão Temístocles de Freitas Barbosa

Dr. Luíz Hamiel Almeida Consoni

Recife, 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

MEMÓRIA EM CINÉTICA DE CANAIS PARA POTÁSSIO
ATIVADOS POR CÁLCIO EM CÉLULAS DE LEYDIG

Regina Acacia Campos de Oliveira

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biofísica e Radiobiologia da Universidade
Federal de Pernambuco como parte dos pré-
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biofísica

Orientador

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Co-orientadores

Dr. Catão Temístocles de Freitas Barbosa

Dr. Luíz Hamiel Almeida Consoni

Apoio financeiro:

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Recife, 2003

*“Nenhum pessimista já descobriu os segredos das estrelas...
Ou viajou para uma terra inexplorada...
Ou abriu um novo paraíso ao espírito humano.”*

Hellen Keller

Aos meus companheiros de jornada, meus pais

Josemar e Elza e minha irmã Raquel

AGRADECIMENTOS

A Deus, Aquele que nos conforta e orienta na direção certa a seguir.

Ao professor Romildo de Albuquerque Nogueira pela dedicação ímpar à tarefa de orientar, pela disciplina estabelecida durante o desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

Ao professor Catão Temístocles de Freitas Barbosa pelo conhecimento valioso e na ajuda com a modelagem matemática. Sua assistência exemplar durante o Mestrado e sua alegre convivência serão inesquecíveis. Agradeço também pela ajuda imprescindível nos preparativos para a apresentação do trabalho no XXV Congresso de Matemática Aplicada e Computacional.

Ao professor Luíz Hamiel de Almeida Consoni pelo auxílio na revisão da programação e pela boa vontade durante o desenvolvimento do curso de mestrado.

Ao professor Wamberto Varanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP pela cessão dos registros da atividade iônica de canais iônicos utilizados neste trabalho.

Ao professor Cláudio Gabriel pelo acesso ao laboratório de informática do CCB e aos *softwares* indispensáveis. Espero estar sempre “firme e forte como uma rocha”.

Ao professor Carlos Manoel pela presença constante em nossos seminários.

À professora Patrícia Farias pela orientação no estágio à docência e pelo interesse pelo tema desenvolvido.

À professora Teresa Jansen pela cortesia durante os dois anos de mestrado e aos professores Oleg Krasilnikov e Liliya Yuldasheva pela solicitude.

A todos os que compõem Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Biofísica e Radiobiologia, a todos os seus professores, aos colegas de mestrado e a todos os seus funcionários, em especial à Valéria e ao Sr. Fredson pela dedicação incomum.

Enfim, quero agradecer a todos os que compõem o DBR que tornaram a minha estada a melhor possível e aos que me ajudaram na escalada do conhecimento em Biofísica.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Josemar e Elza, e à minha irmã Raquel, que sempre me incentivaram em prosseguir em meus estudos. Seu apoio e compreensão ajudaram a formar a base para que tudo se tornasse possível.

À minha avó materna e madrinha, Maria de Assis e à minha avó paterna, Italina Lucchi, anjos de sabedoria e ternura, cujas partidas inesperadas deixaram imensas saudades.

A Klaus Ulrich pelo interesse e sugestões durante o desenvolvimento do presente trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“O estado presente de um sistema da natureza é evidentemente uma consequência do que ele foi no momento precedente, e se nós tivermos a noção de que um dado instante compreende todas as relações de entidades desse universo, é possível ter as respectivas posições, movimentos, e efeitos gerais de todas essas entidades a qualquer tempo no passado ou futuro.”

Laplace, 1776

*“Então, os naturalistas observam: uma pulga
Existem pulgas menores que dela se alimentam,
E essas têm pulgas menores que as picam,
E assim o mesmo até o infinito.”*

Jonathan Swift, 1733

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
I – INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
1.1. Introdução.....	4
1.2. Fundamentação Teórica.....	7
1.2.1. A Célula de Leydig.....	7
1.2.2. Canais para potássio dependentes de voltagem e da presença do íon cálcio.....	9
1.2.3. O Modelo Markoviano para a Cinética de Canais Iônicos.....	12
1.2.4. O Modelo Fractal para a Cinética de Canais Iônicos	15
1.2.5. A Análise <i>R/S</i> de Hurst.....	18
II – OBJETIVOS	21
III – MATERIAL E MÉTODO	23
3.1. A técnica de patch-clamp.....	24
3.2. Registro de corrente no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig.....	26
3.3. Análise <i>R/S</i> de Hurst.....	27
3.3.1. Aplicação do Método de Hurst na Análise da Cinética de Canal Iônico ...	29
3.4. Simulação do Modelo Markoviano	31
3.4.1. Teste do Pacote de Programas QUB	33
3.5. Simulação do modelo fractal.....	33
3.5.1. Distribuições de tempos de fechamento e abertura para canais iônicos fractais.....	35
3.5.2. Simulações numéricas de tempos de permanências do canal nos diferentes estados cinéticos pelos modelos Markoviano e fractal.....	36
3.6. Estatística.....	39
3.7. Visualização da Seqüência de Tempos de Permanência do Canal Iônico.....	39
IV. RESULTADOS	41
4.1. Memória em registros experimentais de um canal para potássio ativado por cálcio de células de Leydig.....	42
4.2. Teste do pacote de programas QUB.....	45

4.3. Memória de registros simulados com base no modelo Markoviano e no modelo Fractal.....	47
V. DISCUSSÃO	53
VI. CONCLUSÕES.....	58
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Apêndice 1.....	63
Apêndice 2.....	66
Apêndice 3.....	67
Apêndice 4.....	69
Apêndice 5.....	70
Apêndice 6.....	72
Apêndice 7.....	74

RESUMO

Canais iônicos são proteínas que se encontram nas membranas biológicas. Essas estruturas protéicas podem assumir diferentes estados conformacionais, abertos e fechados, fenômeno este denominado de cinética de canais iônicos. A cinética das transições de um estado para o outro depende da barreira de energia potencial que separa os estados e pode ser controlada por campo elétrico, íons, substâncias químicas e outros agentes. Os tempos de permanências da proteína em cada um desses estados conformacionais têm sido modelados assumindo-se que este processo é Markoviano. Um modelo fractal também foi proposto para modelar a cinética de canal iônico (LIEBOVITCH et al., 1987).

Neste trabalho utilizamos a análise *R/S* de Hurst para testar a correlação de longo alcance na cinética de um canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig. O coeficiente de Hurst H , um parâmetro que mostra a memória existente em um processo cinético (NOGUEIRA et al., 1995), foi calculado para um registro de um canal para potássio ativado por cálcio e encontrou-se um valor de $H = 0,64 \pm 0,064$ ($n=5$), estatisticamente diferente daquele calculado para um processo sem memória.

Neste trabalho, quando a análise *R/S* foi aplicada à sequência temporal de aberturas e fechamentos obtida de um canal iônico simulado, usando-se os modelos Markoviano e fractal, mostrou-se que esses modelos não puderam descrever a correlação de longo alcance encontrada nos dados experimentais. Como conclusão, este trabalho mostra que: (i) tempos de permanência para aberturas e fechamentos do canal para potássio ativado por cálcio de células de Leydig apresentam correlação de longo alcance; (ii) os modelos Markoviano e fractal, que descrevem adequadamente as distribuições dos tempos de permanências do canal nos estados aberto e fechado, não são adequados para descrever a memória encontrada na cinética desse canal.

ABSTRACT

Ion channels are proteins molecules found in biological membranes, which can assume distinct open and closed conformational states, a phenomenon termed ion channel kinetics. The transitions from one state to another depend on the potential energy barrier that separates those two states and can be controlled by electrical field, ions and / or drugs. The dwell times in which of the protein-channel stay in one these conformational states is modeled by a Markovian process. A fractal model was also proposed for modelling of ion channel kinetics (LIEBOVITCH et al., 1987). Ion single channel records has shown that their kinetics are characterized by successive openings and closings which are correlated in time. Here the rescaled range analysis (*R/S* Hurst analysis) is used to test the long-term correlation in ion channel kinetics of a calcium-activated potassium channel in Leydig cells. The Hurst coefficient H , parameter that show the memory existent in a kinetic process (NOGUEIRA et al., 1995), was evaluated to a calcium-activated potassium channel in Leydig cells recording and was equal to $H = 0,64 \pm 0,064$ ($n=5$), value statistically different from that calculated for the memoryless process.

When the method was applied to the opening and closing time sequences obtained from ion channel simulated using models Markovian and fractal, they could not account for the long-term correlation found in experimental data. In conclusion, this work shows that: (i) open and closed-dwell times of the single calcium-activated potassium channel of Leydig cells present long-term correlation and (ii) Markovian and fractal models, which describe well the dwell time distributions, are not adequate to describe the memory found in the kinetics of this channel.

I – INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Introdução

Cada tipo de membrana biológica tem o seu próprio conjunto característico de proteínas transportadoras, que se estendem pela membrana e fornecem passagens particulares através dela para substâncias específicas e, assim, realizam trocas de moléculas ou íons com o meio extracelular.

Podem ser distinguidas duas classes principais de proteínas de proteínas transportadoras: as carreadoras e as formadoras de canais. Proteínas carreadoras ligam um soluto em um lado da membrana e o transportam para o outro lado por meio de uma mudança conformacional dessa proteína às custas de gradiente eletroquímico ou energia metabólica. Os solutos assim transportados podem ser pequenas moléculas orgânicas ou íons inorgânicos. Proteínas formadoras de canais, em contraste, formam minúsculos poros hidrofílicos na membrana, pelos quais os solutos podem passar íons devido a presença de um gradiente eletroquímico. A taxa de transporte das proteínas-canais é muito maior do que as proteínas carreadoras. A maioria das proteínas-canais deixa passar apenas íons inorgânicos e são, portanto, chamadas de canais iônicos.

Duas propriedades importantes distinguem os canais iônicos de simples poros aquosos. Primeiro, eles apresentam uma seletividade iônica, permitindo a passagem de alguns íons inorgânicos, mas não de outros. A seletividade iônica depende do diâmetro, da forma do canal iônico e das cargas no seu revestimento interno. A segunda diferença é que os canais iônicos não estão continuamente abertos. Eles podem assumir diferentes estados conformacionais, nos quais alguns permitem a passagem de íons (estados abertos) e outros não (estados fechados). A transição entre estados pode ser regulada por condições dentro e fora da célula, como a voltagem, a ligação de alguma molécula (ligante) à proteína - canal ou por uma força mecânica aplicada ao canal e outros. O fluxo de íons através do canal iônico altera a voltagem através da membrana, o que muda as forças impulsoras dos transportes transmembrana para todos os outros íons, forçando outros canais iônicos sensíveis a mudanças no potencial de membrana a abrirem ou fecharem em questão de milissegundos.

Os tempos de permanências da molécula formadora do canal iônico em cada um desses estados conformacionais, abertos ou fechados, fenômeno que caracteriza a cinética de canal, têm sido modelados assumindo-se que este processo seja Markoviano (COLQUHOUN & HAWKES, 1981; ALBERTSEN & HANSEN, 1994; KOCHETKOV et al., 1999; ROTHBERG & MAGLEBY, 1999). Contudo, alguns registros de correntes através de um

único canal iônico têm revelado que os intervalos de tempos nesses diferentes estados conformacionais estão correlacionados, ou seja, que o processo tem memória (McMANUS et al., 1985; NOGUEIRA et al., 1995).

NOGUEIRA et al. (1995), utilizando a análise *R/S* (*range* normalizado pelo desvio padrão) de Hurst, mostraram que a cinética do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig – células responsáveis pela produção de testosterona em animais machos – é um processo com memória.

A descrição da cinética de canais iônicos por um modelo fractal foi proposta por LIEBOVITCH et al. (1987), quando sugeriram um modelo com as seguintes características: (i) as taxas de transições entre os estados cinéticos do canal iônico dependiam da resolução temporal e (ii) a corrente através do canal unitário é auto-similar em diferentes escalas temporais. Nesse modelo, as taxas de transições entre os diferentes estados cinéticos seguem a uma lei de potência com o tempo da forma $k=At^{1-D}$, onde D é a dimensão fractal do processo cinético do canal e A um parâmetro da cinética fractal.

Do ponto de vista físico, o modelo Markoviano assume que as proteínas formadoras de canais transitam entre estados discretos de energias, embora as propriedades físico-químicas das proteínas formadoras de canais iônicos não sejam totalmente conhecidas. Contudo, é provável que estas compartilhem muitas propriedades em comum com proteínas globulares. A função de energia potencial para proteínas globulares tem um grande número de mínimos locais de energia, ou seja, vários poços de pequena amplitude (KARPLUS & McCAMMON, 1981; McCAMMON & HARVEY, 1987; WELCH, 1986). Isto é inconsistente com os poucos poços de energias de grandes amplitudes prevista no modelo Markoviano. Dados experimentais e simulações dinâmicas moleculares também mostram que a estrutura das proteínas globulares variam no tempo (KARPLUS & McCAMMON, 1981; LIEBOVITCH, 1993; BASSINGTHWAITE et al., 1994), o que é consistente com o modelo fractal.

Uma questão atual e central para compreensão da cinética de canais iônicos é a identificação de correlação de longo alcance (memória) na sequência dos tempos de permanências nos estados abertos e fechados desses canais. Fisicamente, a presença de correlação é um indicativo de cooperatividade no processo cinético. Um outro aspecto importante é a investigação sobre qual tipo de modelo (markoviano ou fractal) descreve de maneira mais adequada a cinética de canais iônicos, no que diz respeito à presença de memória no processo. Neste trabalho enfocaremos como modelo experimental o canal para potássio ativado por cálcio de células de Leydig, por ter sido identificado memória na sua

cinética (NOGUEIRA et al., 1995), porém com a proposição maior de desenvolver um método geral que possibilite testar a existência de memória na cinética de qualquer canal iônico.

Devido à interdisciplinaridade do tema abordado e visando tornar o texto compreensível a profissionais de áreas tão díspares como matemática, física, biologia etc. será realizada uma fundamentação teórica, onde serão descritas as células de Leydig, os maxicanais para potássio ativados por cálcio em diferentes células, os modelos markoviano e fractal para descrição da cinética dos canais iônicos e a análise R/S de Hurst, que será o método usado nesse trabalho para identificação de memória na cinética dos canais.

1.2. Fundamentação Teórica

1.2.1. A Célula de Leydig

Células de Leydig⁽¹⁾ são células “intersticiais” do testículo responsáveis pela maior parte da produção de testosterona nos animais machos. Sua atividade está sob controle hipofisário e responde ao hormônio luteinizante (LH), que leva ao aumento da produção e secreção de testosterona. O acoplamento excitação-secreção nestas células está relacionado com o aumento dos níveis intracelulares de AMPc⁽²⁾ e Ca²⁺ (JANSZEN et al., 1976; DUFAU et al., 1981). Estes eventos iniciais ocorrem poucos segundos depois da ligação do LH ao seu receptor. Também é sabido que o hormônio luteinizante (LH) e a gonadotropina coriônica humana (hCG) despolarizam as células de Leydig. A repolarização destas células é sugerida ser realizada por um canal para potássio ativado por cálcio, existente nestas células (KAWA, 1987; CARNIO & VARANDA, 1995).

Os receptores nas células de Leydig para os hormônios gonadotróficos, LH e hCG, são glicoproteínas cuja capacidade de ligação equivale a cerca de 20.000 sítios de ligação por célula de Leydig. A molécula de LH se associa ao seu receptor alvo na membrana da célula de Leydig, onde o complexo LH-receptor sofre internalização para o citosol por processo endocítico. Este processo ocorre lentamente, apenas uma pequena quantidade do hormônio é internalizada em 3 horas de incubação. Após cerca de 18 horas é que se observa uma internalização máxima. O complexo LH-receptor ativa o adenilato ciclase, catalizando a formação de AMPc. O AMPc citoplasmático se liga à subunidade reguladora de uma proteína quinase, que subsequente se dissocia, influenciando na ativação da unidade catalítica da enzima. Esta enzima ativada, por seu lado, inicia muitos eventos intermediários, que finalmente dirigem a conversão de colesterol em pregnenolona dentro das mitocôndrias. Uma vez formada, a pregnenolona se difunde para o citosol e no retículo endoplasmático liso, sob ação de enzimas específicas, é convertida em testosterona (PATTON et al., 1989; AIRES, 1999) (figura 1). Em contraste a muitas outras células secretoras, vesículas exocíticas não parecem estar envolvidas nesse processo excretório em células de Leydig (CARNIO & VARANDA, 1995).

¹ Foram descobertas pelo anatomista e zoologista alemão Franz von Leydig (1821-1908).

² AMPc – monofosfato de adenosina cíclico.

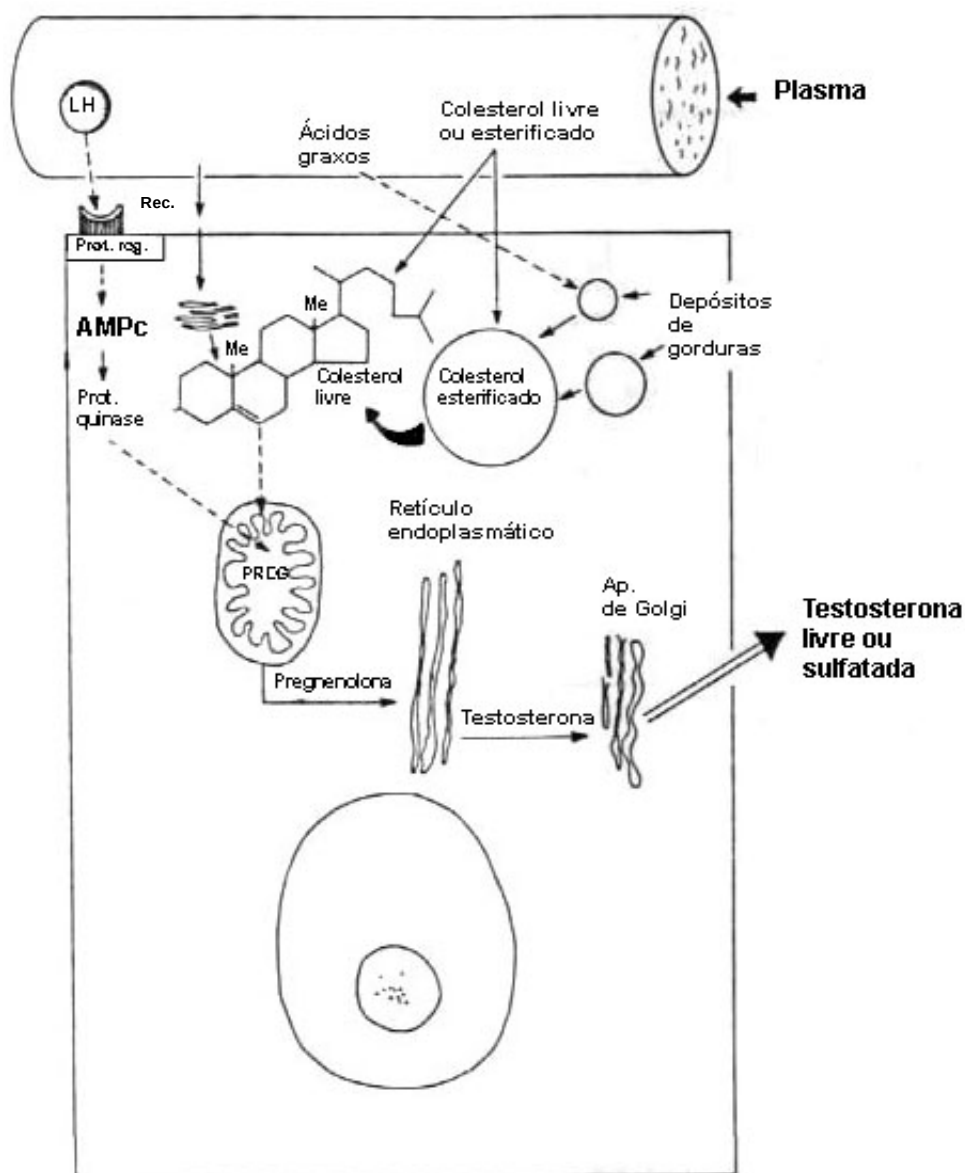


FIGURA 1. Representação esquemática dos processos envolvidos na biossíntese dos andrógenos na célula de Leydig. Rec. = receptor; Prot. Reg. = proteína reguladora; Me = CH_3 (AIRES, 1999).

Experimentos eletrofisiológicos realizados por KAWA (1987) em células de Leydig de ratos e camundongos revelaram que sua membrana celular apresenta uma diferença de potencial de repouso, medida com microeletrodos, entre -25 e -30 mV e parecia depender parcialmente da eletrodifusão de íons K^+ . DEL CORSSO & VARANDA (2003) utilizando técnica de patch clamp na configuração *whole-cell* mostraram que o potencial de repouso em células de Leydig de camundongo é de $-32,2 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$ ($n=159$), sendo sensível a concentrações extracelulares de K^+ e Cl^- e é estabelecida principalmente pela ação da bomba

de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. A aplicação de LH ou gonadotropina coriônica humana (hCG) a estas células leva à despolarização. Respostas regenerativas têm sido reportadas em células de Leydig de camundongos, mas sua base iônica e relevância fisiológica permaneciam pobremente entendidas (KAWA, 1987). Todas as medições de correntes celulares têm revelado a presença de correntes distintas constituídas por Ca^{2+} , Cl^- e/ou K^+ , dependendo da espécie estudada (CARNIO & VARANDA, 1995). O tratamento hormonal das células com LH pode aumentar algumas dessas correntes. Embora interessantes, estes dados se referiam a correntes macroscópicas e nenhuma análise extensiva havia sido feita no nível de um único canal para qualquer das correntes postuladas. O envolvimento de canais iônicos no processo é pouco conhecido em células que secretam substâncias esteróides, tais como as células de Leydig. KAWA (1987) sugeriu a presença de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) em células de Leydig, mas eles não haviam sido caracterizados em profundidade e a compreensão de sua função estava longe de ser completa. O uso da técnica de patch-clamp por CARNIO & VARANDA (1995) e VARANDA et al. (2000), em células de Leydig de camundongos, demonstrou a presença de um canal de alta condutância e seletivo a K^+ cuja cinética mostrou-se dependente dos níveis de Ca^{2+} livre, que banhavam a superfície intracelular desse canal (K_{Ca}). A atividade do canal na configuração *cell-attached* foi mostrada ser dependente de hCG e AMPc.

1.2.2. Canais para potássio dependentes de voltagem e da presença do íon cálcio

Os canais para potássio voltagem-dependentes, tais como o canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig, são membros de uma família de proteínas de membrana sinalizadoras. Essas proteínas possuem poros através dos quais passam cerca de milhões de íons por segundo com surpreendente seletividade e transitam entre os estados abertos e fechados em milisegundos à medida em que varia a voltagem ou a concentração do ligante (o íon cálcio). A arquitetura e componentes funcionais dessas moléculas sofisticadas estão se tornando cada vez mais claros, contudo alguns pontos importantes ainda precisam ser elucidados.

Os mais simples desses canais são homotetrâmeros, com cada subunidade contendo um sensor de voltagem (figura 2). O canal de potássio dependente de voltagem típico é

constituído de quatro subunidades transmembranas idênticas (ou similares) circundando um poro central. A subunidade padrão da proteína formadora do canal de potássio contém seis regiões transmembrana (S1-S6), com as terminações amino e carboxílico no lado intracelular da membrana (arquitetura tetramétrica 6TM). Estas proteínas controlam o movimento de íons através do seu poro central que precisa abrir e fechar rapidamente e ser altamente seletivo a íon potássio. Isto confere uma permeabilidade à membrana plasmática celular, que é regulada pela abertura e fechamento do poro, através de um conjunto de mudanças conformacionais chamada de *gating*. O *gating* depende de um sensor, que detecta a voltagem transmembrana mas também pode ser ativado pelo Ca^{2+} e outros sinais celulares. A abertura do canal e o conseqüente fluxo de íons K^+ para fora da célula reduz a carga positiva dentro da célula, limitando ou evitando a excitação celular.

Muitos canais 6TM tem uma estrutura caracterizada por um domínio sensor (terminal C da figura 2-C), esses incluem os canais dependentes de voltagem e ligante, tal como o Ca^{2+} , para os canais BK⁽³⁾.

Os canais BK são encontrados em muitos tipos de células, incluindo-se os neurônios, células da musculatura lisa e da musculatura esquelética. A diversidade dos tipos de células que contêm estes canais é compatível à diversidade arquitetônica exibida pelas subunidades que os compõem. Estudos prévios demonstraram que vários canais BK específicos apresentavam um único tipo de subunidade α , mas cada uma apresentava uma subunidade β discretamente diferente. A diferença das subunidades β permite que os canais BK de diferentes tipos de tecido respondam diferentemente ao cálcio e aos impulsos elétricos (BRENNER et al., 2000).

³ *Big K_{Ca} Channel*. São canais para potássio dependentes de Ca^{2+} de elevada condutância, tipicamente entre 100 a 250 pS (HILLE, 1992).

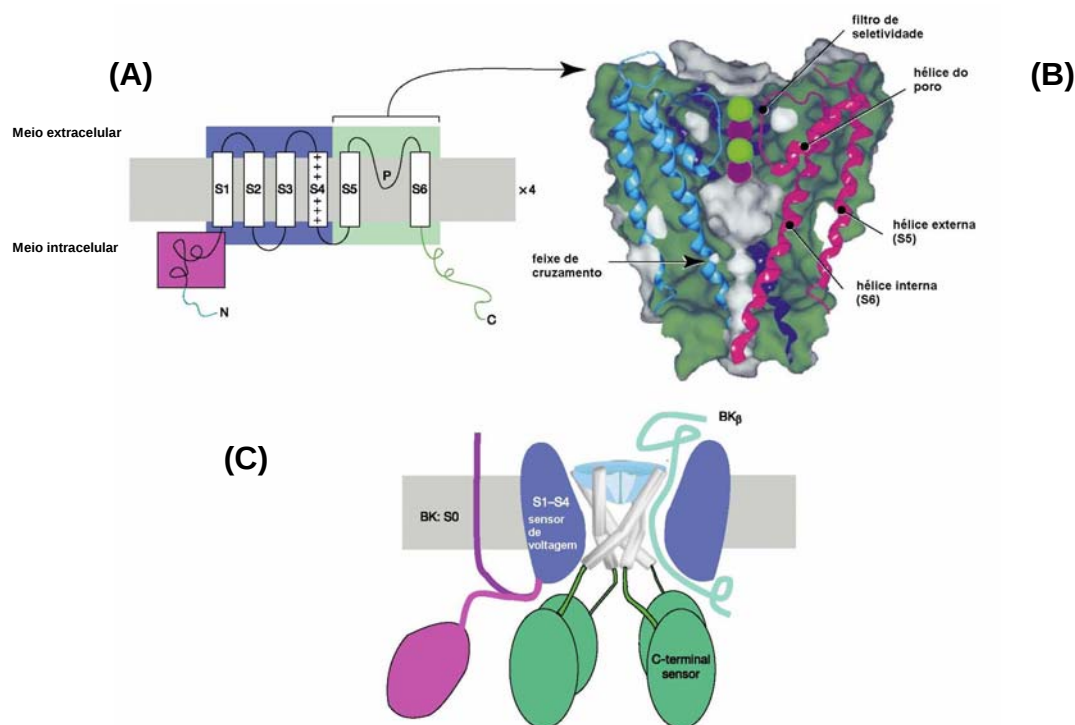


FIGURA 2. Estrutura conformacional de canal para potássio voltagem-dependente. Os canais de potássio ativados por cálcio são caracterizados pela presença de um terminal sensor – terminal C, cuja função é determinar a localização física do canal e sua associação com complexos sinalizadores. Em alguns casos o terminal sensor C pode adotar uma organização simétrica de quatro partes. O sensor de voltagem é primordial na função dos canais de potássio voltagem-dependentes, mas sua estrutura tridimensional ainda permanece desconhecida. A região transmembrana da hélice interna obstrui a entrada da superfície citoplasmática para o interior da cavidade preenchida com água no centro da proteína formadora do canal (YELLEN, 2002).

O canal para potássio usa água para manter o íon estável, parte da via de permeabilidade iônica é espessa e contém água (figura 3). Outra porção da via é bastante estreita e limita a passagem de íons. Esta região denominada filtro de seletividade do canal para potássio tem tanto o propósito de selecionar o íon que passa através do canal como também permite tornar o meio em torno do íon de K^+ semelhante ao meio espesso aquoso. Para isto, cada íon K^+ no filtro de seletividade é rodeado por dois grupos de quatro átomos de oxigênio, que se encontram na parede do filtro da proteína formadora do canal. O transporte do íon potássio é realizado em fila única (*single-file*) com moléculas de água através dessa estrutura (YELLEN, 2002).

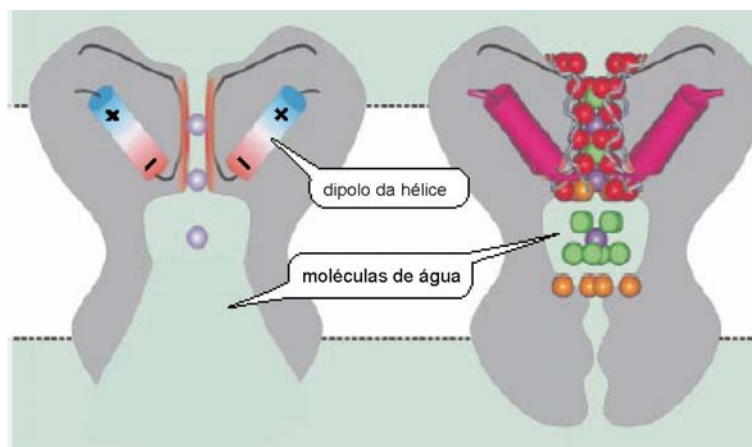


FIGURA 3. Perfis da arquitetura de canais para potássio durante o processo de transporte do íon K^+ . Perfil aproximado para um canal aberto (esquerda) e numa visão com maiores detalhes (direita). O diagrama da direita mostra um acesso mais estreito e provavelmente fechado uma cavidade preenchida com água na parte central da proteína de membrana. O íon K^+ (esfera púrpura) e suas oito moléculas de água de hidratação (esferas verdes) geram um meio adequado para hidratação para o íon. As esferas laranjas mostram a cadeia de átomos de oxigênio na parede do filtro de seletividade(YELLEN, 2002).

1.2.3. O Modelo Markoviano para a Cinética de Canais Iônicos

Na maioria dos processos estocásticos as variáveis aleatórias que representam o espaço de estados $\{X(t_1), X(t_2), \dots, X(t_n)\}$, exibem algum tipo de dependência. O tipo mais simples de dependência que um processo estocástico pode assumir é a dependência de Markov. Numa cadeia de Markov é sempre possível prever-se o estado futuro da cadeia conhecendo-se unicamente o seu estado atual. Desta forma, o futuro da cadeia não depende do espaço de estados passados da cadeia. Um processo estocástico com essas características é dito sem memória.

A cadeia de Markov usada para representação da cinética de canais iônicos é uma cadeia de parâmetro contínuo – o tempo de observação do fenômeno – e espaço de estados discretos – os estados cinéticos. Num modelo com essas características, as probabilidades de transições, por unidade de tempo, entre os estados cinéticos dependem unicamente do estado presente do canal e não dos estados anteriores pelo qual o canal transitou. A cinética dos canais iônicos tem sido modelada considerando-se que os tempos no qual a proteína formadora do canal permanece nos seus diferentes estados cinéticos obedece a um processo

estocástico Markoviano. Processos Markovianos são caracterizados por funções densidades do tipo exponencial.

Na prática eletrofisiológica, a análise é realizada a partir do registro da corrente que passa através de um único canal iônico. Nesse registro os tempos de aberturas e fechamentos do canal podem ser medidos e obtidas as taxas de transições entre os diferentes estados cinéticos. Essas taxas de transições são adquiridas a partir dos histogramas dos tempos de permanências do canal nos estados abertos e fechados. A cada estado cinético do canal é associado um termo do tipo $\exp(-kt)$ no histograma, sendo os k 's parâmetros que refletem as taxas de transições entre dois estados possíveis do canal. Dessa forma, os histogramas de tempo de permanência podem ser combinados em uma ou mais exponenciais na forma geral:

$f(t) = A_1 \exp(-t / \tau_1) + A_2 \exp(-t / \tau_2) + \dots$, onde A_1 e A_2 são constantes e τ_1 e τ_2 são constantes de tempo (AIDLEY & STANFIELD, 1996).

Uma aplicação prática do processo supracitado é a interpretação Markoviana da cinética de um canal para potássio ativado por cálcio de célula de Leydig, a partir de um modelo cinético de três estados, representado pelo esquema cinético a seguir:

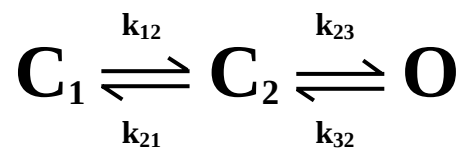


FIGURA 4. Esquema cinético representativo de um modelo Markoviano de 3 estados, com 2 estados fechados (C) e 1 estado aberto (O).

C_1 e C_2 representam os estados fechados e O representa o estado aberto, k_{12} é a taxa de transição do estado C_1 para o estado C_2 , k_{21} é a taxa de transição do estado C_2 para o estado C_1 , k_{23} é a taxa de transição do estado C_2 para o estado O e k_{32} é a taxa de transição do estado O para o C_2 . Num modelo com essas características, a função densidade de probabilidade para os intervalos de fechamento do canal pode ser descrita por uma soma de duas exponenciais, como segue:

$$f(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

E a função densidade de probabilidade para os intervalos de abertura do canal pode ser descrita por uma exponencial única:

$$f(t) = Ce^{-k_{32}t}$$

Através da análise Markoviana pode-se demonstrar que os parâmetros A, B, $\forall$ e $\exists$ da função densidade estão relacionados às taxas de transições pelo seguinte sistema de equações (COLQUHOUN & HAWKES, 1981):

$$b = k_{23} + k_{12} + k_{21}$$

$$c = k_{23} \cdot k_{12}$$

$$\alpha, \beta = \frac{1}{2} [b \pm (b^2 - 4c)^{1/2}]$$

$$A = \frac{k_{23}(k_{12} - \alpha)}{\beta - \alpha}$$

$$B = \frac{k_{23}(\beta - k_{12})}{\beta - \alpha}$$

No caso de um modelo de três estados o perfil de energia é constituído por duas barreiras com três vales de energias estáveis que correspondem aos dois estados fechados e ao estado aberto (figura 5).

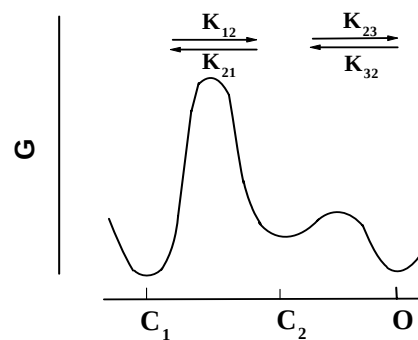


FIGURA 5. Diagrama representativo do perfil da barreira de energia livre de Gibbs entre os estados fechados e aberto para um modelo de três estados cinéticos.

A análise Markoviana permite descrever a cinética de canais com modelos de muitos estados. Nesse trabalho será usado um modelo de onze estados proposto por ROTHBERG & MAGLEBY (1999) para canais de potássio ativados por cálcio em células de músculo esquelético de rato, caracterizado por um esquema de oito estados fechados e três estados abertos. Este esquema cinético, representado pela figura 6, é satisfatório para explicar a ativação do canal para potássio em células musculares, em baixo cálcio e por esta razão foi escolhido na simulação do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig.

Na simulação do modelo de onze estados empregou-se um *software* específico “QUB” (AUERBACH et al., 2000), descrito na seção de método. O uso desse programa possibilita a obtenção da grande quantidade das taxas cinéticas necessárias, num modelo de onze estados, para descrever adequadamente a cinética do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig. O esquema cinético do modelo de onze estados é mostrado abaixo:

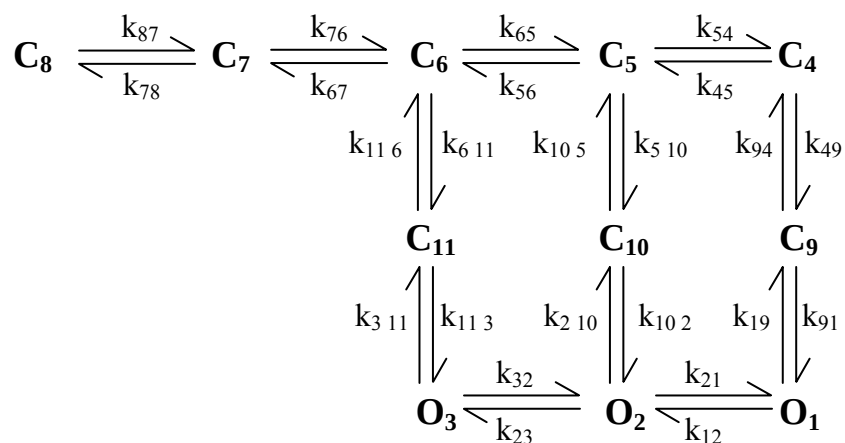


FIGURA 6. Modelo de 11 estados, com 3 estados abertos (O) e 8 estados fechados (C) (ROTHBERG & MAGLEBY, 1999).

1.2.4. O Modelo Fractal para a Cinética de Canais Iônicos

Modelos Markovianos baseiam-se em estados cinéticos discretos e independentes, onde a proteína do canal tem limitado número de conformações distintas; enquanto modelos fractais baseiam-se num grande número de estados (contínuo), onde as transições entre os estados estão associadas. As aberturas e fechamentos dos canais resultam de processos cooperativos.

Os objetos ou processos fractais são caracterizados por suas propriedades: 1. a auto-similaridade, que significa serem as partes de um objeto ou processo semelhantes ao objeto ou processo todo; 2. "scaling" (dependência de escala), que se refere ao fato da medida de uma grandeza depender da escala na qual ela é medida; 3. dimensão fractal, que é uma descrição quantitativa das propriedades de auto-similaridade e "scaling".

As propriedades de auto-similaridade e "scaling" podem ser encontradas nos vários fractais criados por algoritmos computacionais e pela natureza. Alguns exemplos simples podem elucidar as estruturas e propriedades dos fractais.

Na figura 7 está descrita a curva de Koch, que é uma dessas curvas construídas com algoritmos computacionais. Na curva de Koch, o algoritmo consiste em se adicionar, repetidamente, a cada face de um triângulo equilátero, um novo triângulo cujos lados são $1/3$ do comprimento do lado do triângulo anterior. No limite de infinitas iterações, a curva de Koch terá um perímetro infinito apesar de encerrar uma área finita. Algoritmos como esse permitem construir fractais que podem ser usados como modelos para descrever os fractais da natureza.

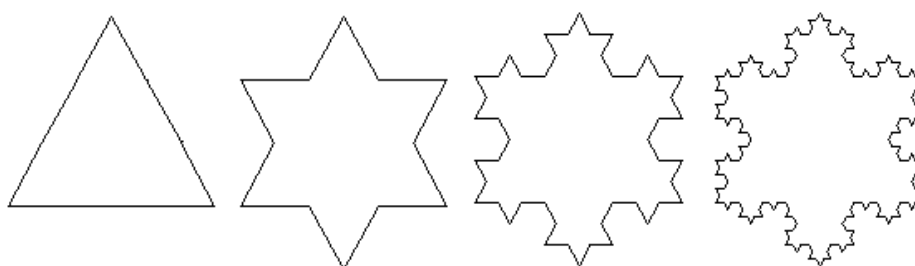


FIGURA 7. Três primeiros estágios (da esquerda para a direita) do algoritmo iterativo de construção da curva de Koch. O algoritmo consiste em se acrescentar a cada lado do triângulo um outro triângulo cujo lado é a terça parte do lado do triângulo original.

A palavra fractal, criada por Mandelbrot em 1975 (MANDELBROT, 1983), reflete também o fato das grandezas e objetos fractais apresentarem dimensões fracionárias. Essa dimensão fracionária, denominada dimensão fractal, pode ser determinada por diferentes métodos (dimensões de auto-similaridade, de capacidade, contagem de caixas – box-counting, correlação, informação, Hausdorff-Besicovitch).

Aqui é dado como exemplo o cálculo da dimensão fractal de auto-similaridade da curva de Koch. Esta dimensão descreve quantos novos pedaços geometricamente similares ao objeto todo são observados quando a resolução de observação é aumentada. Desta forma, ao se reduzir a escala de observação por um fator F serão encontrados N pedaços similares ao original.

A dimensão de auto-similaridade pode ser calculada pela seguinte expressão: $d_{\text{auto-similaridade}} = \log N / \log F$. A dimensão de auto-similaridade para o perímetro da curva de Koch é dada por $d_{\text{auto-similaridade}} = \log 4 / \log 3 = 1.26$, onde $N = 4$ é o número de novos pedaços

observados quando a escala é reduzida por um fator F (LIEBOVITCH et al., 1987; WEST, 1990; BASSINGTHWAITE et al., 1994). Essas estruturas, como a curva de Koch, cujas dimensões fracionárias não coincidem com as dimensões Euclidianas do ponto, da reta, da superfície e do espaço, são, contudo, a regra e não a exceção nas formas da natureza⁽⁴⁾.

Para alguns fractais, os pedaços menores são cópias exatas dos pedaços maiores, mas para a maioria dos fractais na natureza, os pedaços menores são estatisticamente semelhantes aos pedaços maiores. Um fractal também pode ser um processo no tempo, ou um conjunto de números extraídos de dados experimentais (LIEBOVITCH & SCHEURLE, 2000).

A teoria dos fractais foi usada para estudar cinética de canais (LIEBOVITCH et al. 1987), devido ao fato do registro do canal ser auto-similar e depender da escala temporal no qual o fenômeno é observado (figura 8). Esta propriedade da auto-similaridade implica no fato que uma propriedade $L(x)$, medida a uma escala x , é proporcional ao valor da propriedade, $L(ax)$, medida a uma escala ax . Isto é, $L(x)=kL(ax)$, onde k é uma constante (figura 9). Esta equação será satisfeita se $L(x)$ tem a forma de uma lei de potência característica de um processo fractal: $L(x)=Ax^{1-d}$.

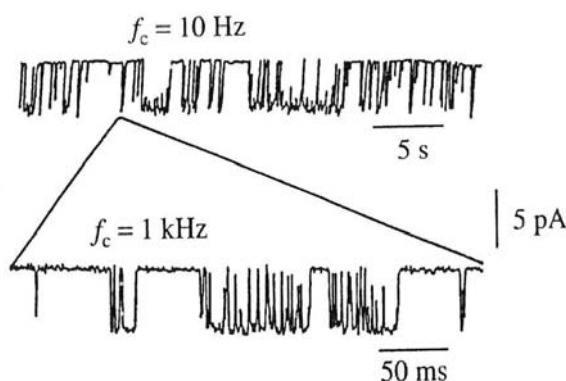


FIGURA 8. Exemplo da auto-similaridade estatística do registro de canais iônicos no tempo. O registro é auto-similar e depende da escala em que é medido. Quando a corrente através de um canal iônico unitário é examinada em uma resolução temporal maior, são reveladas rajadas em rajadas de aberturas e fechamentos do canal iônico.

⁴ Parafraseando Mandelbrot: "Nuvens não são esferas, montanhas não são cones, litorais não são círculos e as copas das árvores não são lisas, tampouco os relâmpagos viajam em linhas retas".

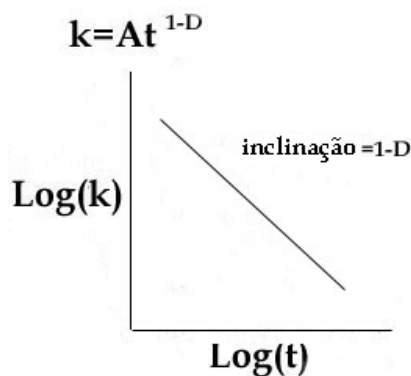


FIGURA 9. Lei de potência característica de um processo fractal. A inclinação da reta do gráfico duplo-log de uma propriedade k , medida a uma escala t , fornece a dimensão fractal do processo. A interseção com o eixo das ordenadas fornece o parâmetro A do processo.

A taxa de transição entre os diferentes estados cinéticos de um canal que é, formalmente, a probabilidade por unidade de tempo de um canal mudar entre os diferentes estados, é dependente da escala temporal na qual a corrente através de um canal é registrada. Essa taxa cinética efetiva é a probabilidade por unidade de tempo na qual o canal muda de estado. Contudo, o canal precisa permanecer em um estado por um tempo suficiente para ser possível detectá-lo naquele estado. O tempo suficiente para isso define a escala de tempo efetivo, t_{eff} . A taxa de transição da cinética, k_{eff} , é a probabilidade condicional por segundo na qual o canal muda de estado e resulta de t_{eff} : $k_{\text{eff}}(t_{\text{eff}}) = At_{\text{eff}}^{1-D}$, que é característico de um processo fractal no tempo.

1.2.5. A Análise R/S de Hurst

O tratado original de HURST (1981) contém várias informações obtidas durante sua carreira como um engenheiro civil, geográfico e ecológico trabalhando no vale do rio Nilo. O engenheiro Harold Edwin Hurst precisava determinar, a partir de dados de um milênio de fluxos anuais, que volume mínimo da represa de Assuã forneceria capacidade de armazenamento suficiente para regular o fluxo do rio Nilo corrente abaixo. O volume do reservatório é a integral no tempo da diferença entre o fluxo de entrada e de saída, como mostrado na figura 10, onde R representa a diferença entre o volume máximo e mínimo sobre um período de tempo definido.

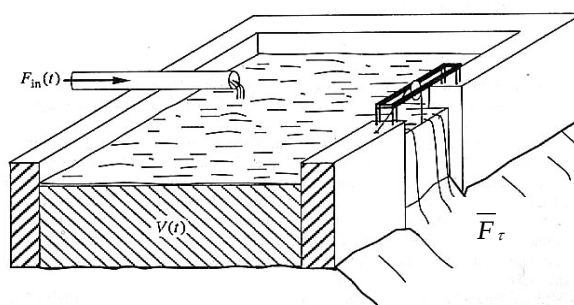


FIGURA 10. As mudanças do volume do reservatório no tempo são medidas das diferenças acumuladas entre o fluxo de entrada e de saída. Se o fluxo de entrada cada ano é $F_{in}(t)$, então o fluxo de entrada acumulado sobre t anos será

$$\int_0^t F_{in}(\lambda) d\lambda$$

O fluxo de saída é determinado a um valor constante $\bar{F}_\tau$, o valor médio de F_{in} sobre o período τ . O volume acumulado no reservatório em qualquer tempo t é

$$V(t) = \int_0^t (F_{in}(\lambda) - \bar{F}_\tau) d\lambda$$

R representa a diferença entre a quantidade máxima e mínima de água contida no reservatório. A expressão para R é $R = V_{\max} - V_{\min}$ (FEDER, 1988; BASSINGHTWAIGTHE et al., 1994; BERAN, 1994).

O objetivo de Hurst ao utilizar a análise estatística, que levou o seu nome, no projeto da represa de Assuã, foi minimizar a capacidade da mesma e executar as propostas da performance ideal do reservatório visualizada: fluxo de saída uniforme, o reservatório terminaria tão cheio quanto no começo e nunca transbordaria ou esvaziaria. Para tanto, Hurst analisou estimativas registradas durante 1809 anos, tais como os fluxos do rio, as turvações das bordas pelo lodo no lago (aluviões) durante o ano, turvações da coroa do rio Nilo e até mesmo os preços do trigo, entre outros eventos.

Hurst observou que os registros de fluxos ou níveis do rio Nilo no medidor de Roda, próximo ao Cairo, não variavam aleatoriamente, mas mostravam uma série de anos de baixo fluxo e anos de alto fluxo. A "memória" ou correlação entre anos sucessivos gerou uma nova condição ao projeto: a represa precisaria ser muito mais larga do que seria se as chuvas anuais e os fluxos do rio fossem aleatórios. Neste caso, a correlação entre anos sucessivos significava

que o reservatório seria preenchido ou se esvaziaria mais completamente do que ocorreria se a variação fosse aleatória.

Desde então, a análise proposta por Hurst tem sido usada para estudar registros temporais ou de observações em tempos diferentes.

A análise *R/S* de Hurst será introduzida aqui considerando-se uma função $F(t)$, onde o tempo assume valores inteiros $1, 2, 3, \dots, \tau$. A soma dos desvios de F em relação à média da função $\{ \langle F \rangle = (1/\tau) \sum F(t), 1 \leq t \leq \tau \}$ permite definir uma nova função:

$$X(t, \tau) = \sum [F(t) - \langle F \rangle], 1 \leq t \leq \tau.$$

A função acima representa a soma dos desvios da média de cada ponto da função desde o início dos tempos até um instante τ .

O "range" $R(t) = [\max X(t, \tau) - \min X(t, \tau)]$ da função $X(t, \tau)$ normalizado pelo desvio padrão da função $F(t)$ ($S(t) = \{(1/\tau) \sum [F(t) - \langle F \rangle]^2\}^{1/2}$) ou seja, *R/S*, será um parâmetro usado neste trabalho para se determinar correlação de longo alcance. Após esta etapa, divide-se o conjunto de dados em dois subconjuntos iguais, repete-se o procedimento do cálculo de *R/S* em cada um desses subconjuntos e calcula-se o valor médio de *R/S*. A divisão dos dados em subconjuntos é realizada até um subconjunto de dois dados ser obtido.

O valor médio da razão *R/S* para cada iteração foi mostrada por Hurst obedecer à seguinte relação empírica: $(R/S)_{\text{médio}} = (T/2)^H$, onde T assume valores iguais a $\tau, \tau/2, \tau/4$, etc. O expoente H da relação empírica, denominado coeficiente de Hurst, permite determinar a existência ou não de memória (correlação) numa série temporal, no nosso caso, a sequência de aberturas e fechamentos de um canal iônico. Quando uma série temporal totalmente aleatória é analisada por este método, o coeficiente H obtido para esta série é igual a 0,5. Quando $H \neq 0,5$ diz-se que a função tem memória. Quando $H > 0,5$ a memória é dita positiva, ou persistente, onde um aumento no presente é mais provável de ser seguido por um aumento no futuro. Se $H < 0,5$ a memória é dita negativa, ou anti-persistente, onde um aumento no presente é mais provável de ser seguido por um decréscimo no futuro.

Através da análise *R/S*, Hurst descobriu que relativamente poucos eventos naturais são aleatórios. Uma análise para 837 fenômenos naturais, para os quais os valores anuais foram obtidos, conduziu ao valor médio de H de 0,73, com um desvio padrão de mais ou menos 0,09 (HURST et al., 1965; MANDELROT & WALLIS, 1969; FEDER, 1988; BASSINGHTWAIGHTE et al., 1994).

II – OBJETIVOS

- i) Investigar a existência de correlação (memória) de longo alcance na seqüência de aberturas e fechamentos do canal para potássio ativado por cálcio de células de Leydig, em baixa concentração de íon cálcio (10 nM);
- ii) Analisar a adequação dos modelos matemáticos Markoviano e/ou fractal para descrever esta correlação.

III – MATERIAL E MÉTODO

3.1. A técnica de patch-clamp

A técnica de patch clamp foi criada por Sakmann e Neher para medir diretamente as correntes fluindo através de um único canal (SAKMANN & NEHER, 1995). A amplitude destas correntes é muito pequena, da ordem de picoamperes. Os primeiros resultados com a técnica de patch clamp foram publicados por Sakmann e Neher em 1976, mostrando as aberturas e fechamentos dos canais receptores de acetilcolina.

Nesta técnica é utilizada uma micropipeta de vidro com diâmetro na extremidade de poucos micrômetros como um eletrodo para medição das correntes. O eletrodo é preenchido com uma solução salina e pressionado contra a membrana da célula. Para conseguir um bom selo entre a pipeta e a membrana e reduzir o ruído durante o registro da atividade iônica é realizada uma sucção na pipeta de maneira que não haja fuga de corrente entre a pipeta e a membrana (gigaselo). Esse arranjo original, no qual o eletrodo de patch permanece sobre a célula depois que o gigaselo se forma é chamado de configuração *cell-attached*. Se a pipeta é arrastada para fora da célula e um patch (pedaço) da membrana é extirpado junto com a pipeta, forma-se uma nova configuração denominada *inside-out*. Neste caso, a face extracelular do patch da membrana está em contato com a solução na pipeta e a sua face citoplasmática é banhada pela solução externa. A vantagem neste caso é a de que as soluções em contato com ambos os lados da membrana podem ser controladas, como também o potencial através da membrana. Uma forte sucção ou um breve pulso acima de 1V aplicado à configuração *cell-attached* perfura a célula, mantendo o gigaselo. Neste caso, o eletrodo de patch fica em contato com o interior da célula, e permite registrar tensões ou mudanças de corrente a partir da membrana de toda a célula. Esta última configuração é chamada de *whole-cell* (AYDLEY & STANFIELD, 1995) (figura 11).

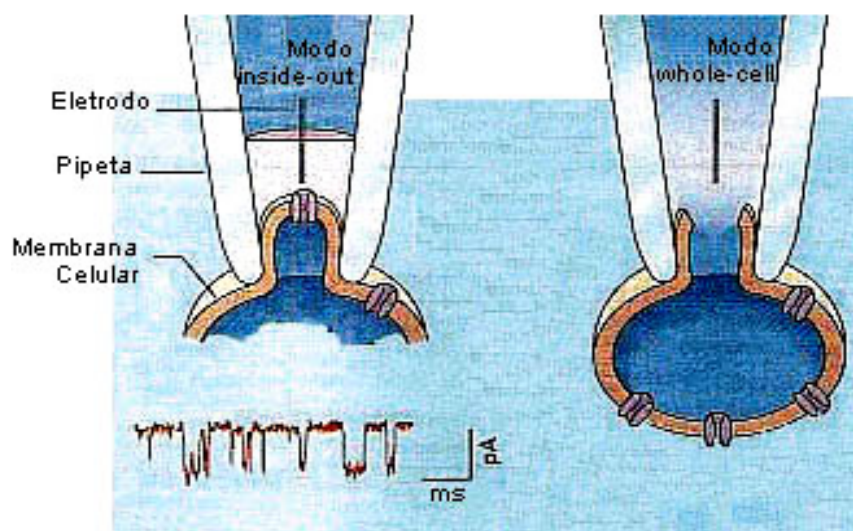


FIGURA 11. Exemplo de esquema da técnica de patch-clamp nas configurações *inside-out* e *whole-cell*. Na configuração *inside-out* o patch de membrana é extraído da célula para o registro da atividade iônica. No modo *whole-cell* o patch é perfurado e o eletrodo de medição tem acesso a todo o interior da célula.

3.2. Registro de corrente no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig

Os registros das correntes no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig foram gentilmente cedidos pelo Dr. Wamberto A. Varanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, SP.

Os registros das correntes iônicas através de canais unitários foram realizados pela técnica de *patch-clamp* na configuração *inside-out* descrita em 1981 por HAMILL et al. Tal registro é obtido selando-se na membrana celular uma micropipeta preenchida com uma solução salina – dita interna – que banha um eletrodo de Ag/AgCl. O circuito é fechado pelo eletrodo de banho, semelhante ao de registro, em contato com a solução onde se encontra a célula, dita externa. Ambos os eletrodos conectam-se a um amplificador específico (Axopatch - 200A) acoplado a um computador (IBM - PC 486) provido do *software* Pclamp6, responsável por armazenar os registros.

No início do experimento, a solução externa detinha a seguinte composição (solução de Hank balanceada): NaCl 145,0 mM; KCl 4,6mM; MgCl₂ 1,3 mM; CaCl₂ 1,6 mM; glicose 10 mM, NaHCO₃ 5 mM e HEPES 10 mM; pH de 7,4 ajustado com NaOH. Após a obtenção do *inside-out*, a câmara (onde se encontravam as células) era perfusionada com uma solução igual a interna (a da pipeta). Estas soluções eram compostas de KCl 150 mM, CaCl₂ 3,81 mM, MgCl₂ 1,0 mM, EGTA 5 mM, tamponada com HEPES 10 mM e pH ajustado a 7,4 com KOH, sendo usado o programa MaxChelator para definir sua concentração de Ca²⁺ livre em 1×10^{-8} M. Ambas as soluções foram filtradas com membranas Millipore tipo GS de éster de celulose com poros de 0,22µm.

As células foram obtidas pelo método descrito por KAWA, 1987. Nesse método, camundongos adultos eram sacrificados por deslocamento cervical e os testículos rapidamente removidos e imersos na solução externa. Em seguida, eram descapsulados e sofriam repetidas injeções da própria solução, o que remove as células intersticiais enquanto preserva os túbulos seminíferos. Após dissociadas, transferiam-se as células para uma placa de Petri contendo lamínulas imersas em solução de Hank, sobre as quais aderiam, em um período de 30 a 60 minutos. Para o registro das correntes, eram aplicadas pulsos de voltagem quadrados de -80 mV com duração 1 a 2 minutos, que era suficiente para observarmos o maior número de transições entre os estados abertos e fechados.

3.3. Análise R/S de Hurst

A idéia básica é determinar o coeficiente de Hurst H a partir de uma série temporal. Os dados consistem de valores $F(t_i)$ amostrados em intervalos uniformes de Δt .

1. Iniciar com todo o conjunto de dados observados que cobrem a duração total $\tau_{\text{máx}} = N_{\text{máx}} \Delta t$, e calcular sua média sobre a totalidade dos dados disponíveis coletados, $\bar{F}(\tau)$, ou seja, para $\tau = \tau_{\text{máx}}$ e $N = N_{\text{máx}}$,

$$\bar{F}(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N F(t_i).$$

2. Somar as diferenças de cada ponto da função em relação a média para obter o total acumulativo em cada instante $V(N, k)$, desde o instante inicial até um tempo $k \Delta t$ qualquer. $V(N, k)$ equivale $V(\tau, u)$ para $0 < k \leq N$, e $u = k \Delta t$, e $\tau = N \Delta t$:

$$V(N, k) = \sum_{i=1}^k [F(t_i) - \bar{F}(\tau)] \text{ para } 0 < k \leq N.$$

3. Encontrar o $V_{\text{máx}}$, o máximo de $V(N, k)$, e $V_{\text{mín}}$, o mínimo de $V(N, k)$ para $0 < k \leq N$ e calcular o “range”:

$$R(\tau) = V_{\text{máx}} - V_{\text{mín}}.$$

4. Calcular o desvio padrão S dos valores $F(t_i)$, das observações sobre o período τ , durante o qual a média local é $\bar{F}(\tau)$:

$$S(\tau) = \left\{ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [F(t_i) - \bar{F}(\tau)]^2 \right\}^{1/2}.$$

5. Calcular a relação $R/S=R(\tau)/S(\tau)$ e plotar o valor em um gráfico log-log (neste primeiro estágio, N é igual ao número total de valores na série temporal e é o ponto no qual ocorre $\tau_{\text{máx}}$);
6. Para o próximo estágio, N cobrirá apenas uma fração de todos os valores no conjunto de dados, tipicamente $N=N_{\text{máx}}/2$, e um novo $\tau=N\Delta t$. Então, o procedimento de entrada é repetido (passos 1-5) e determinado R/S para cada segmento do conjunto de dados.

Repetindo o procedimento, são usados valores menores de τ , em cada estágio, dividindo o conjunto de dados em segmentos e encontrando a média de R/S destes segmentos. O resultado, com as estimativas dos valores médios de R/S para cada τ , é mostrado na figura 12.

7. O expoente H é a inclinação da regressão linear do gráfico.

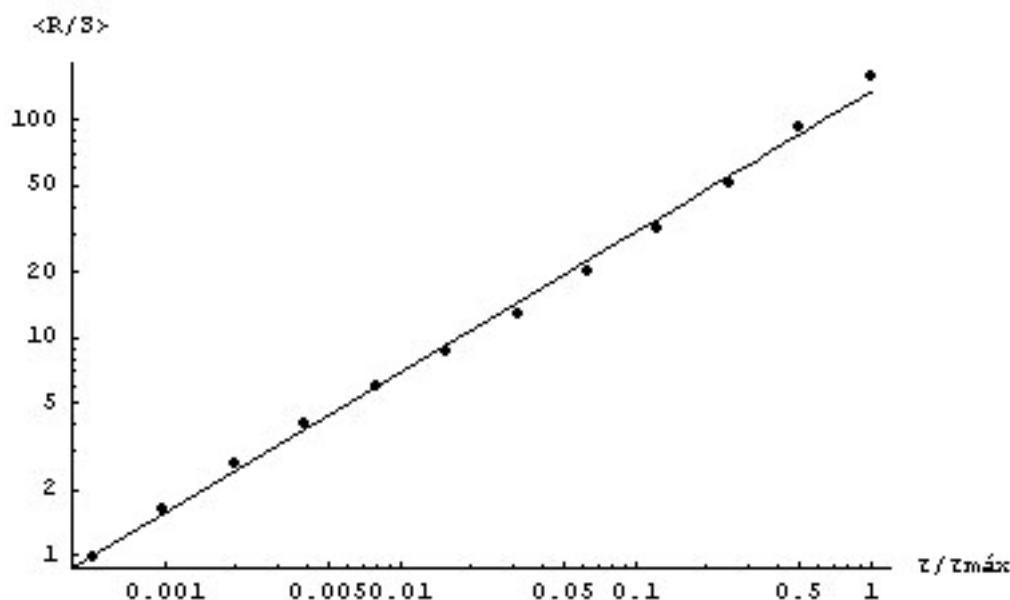


FIGURA 12. Gráfico da análise de Hurst. A abscissa é a razão entre a duração de cada intervalo de tempo escolhido e o período total de tempo. O coeficiente de Hurst, H , representa a inclinação da reta de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados num gráfico duplo-log dos valores médios de R/S contra $\tau/\tau_{\text{máx}}$. Neste gráfico foram usados 4096 intervalos de aberturas e fechamentos resultantes de um registro de canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig. O H obtido foi igual a 0,642911.

3.3.1. Aplicação do Método de Hurst na Análise da Cinética de Canal Iônico

No estudo da cinética de canais iônicos a série temporal é a seqüência de tempos de aberturas e fechamentos resultante da atividade do canal iônico. A existência ou não de correlação de longo alcance entre os tempos de aberturas e fechamentos foi investigada usando-se a análise R/S de Hurst, através de programa elaborado no *Mathematica* (WOLFRAM, 1993; BLACHMAN, 1993).

A análise R/S tem sido usada (NOGUEIRA et al., 1995; VARANDA et al., 2000) para estudar registros da atividade de canais iônicos. O método de Hurst foi aplicado à análise de eventos de canais iônicos unitários, onde a série temporal, neste caso, consiste de um registro corrente *versus* tempo de uma certa duração. A função a ser analisada é o decurso do tempo de atividade do canal, amostrado sobre N intervalos de tempos adjacentes de abertura e fechamento.

A estratégia empregada foi a seguinte (fluxograma da figura 13 e apêndice 1):

1. Os dados empregados corresponderam aos 2^n primeiros termos da seqüência temporal do registro do canal iônico, onde n esteve na faixa de 10 a 13;
2. O valor de R/S foi calculado primeiramente usando os 2^n dados da amostra inicial, um segundo valor médio de R/S foi calculado usando 2 amostras de 2^{n-1} dados e assim sucessivamente até que o valor R/S médio fosse calculado sobre 2^{n-1} amostras de 2 dados. Dessa maneira, foram realizadas n iterações para o cálculo do valor de R/S médio, partindo-se da amostra inicial;
3. Os valores médios de R/S foram plotados contra $\tau/\tau_{\text{máx}}$ em um gráfico duplo log;
4. O coeficiente de Hurst foi calculado a partir do declive da linha reta resultante deste tipo de gráfico.

Esses dados experimentais foram aleatorizados e a análise de Hurst novamente aplicada aos dados aleatorizados. Utilizou-se para isso um programa elaborado no *Mathematica* que realiza o “embaralhamento aleatório” de um conjunto de dados, no caso a seqüência de tempos alternados de abertura e fechamento experimentais.

A “aleatorização” foi feita de maneira semelhante ao procedimento descrito em KOCHETKOV et al. (1999). Em resumo, o procedimento de Kochetkov é equivalente a gerar uma tabela de dados aleatórios e realizar uma equivalência com uma tabela de dados experimentais. No nosso caso, os dados aleatórios foram organizados em ordem decrescente e

o mesmo deslocamento de posição obtido por cada dado da tabela de dados aleatórios na formação dessa tabela decrescente foi aplicada a cada dado equivalente na tabela experimental. Como resultado, um conjunto de dados experimentais, agora “embaralhado aleatoriamente”, foi obtido (figura 14 e apêndice 2).

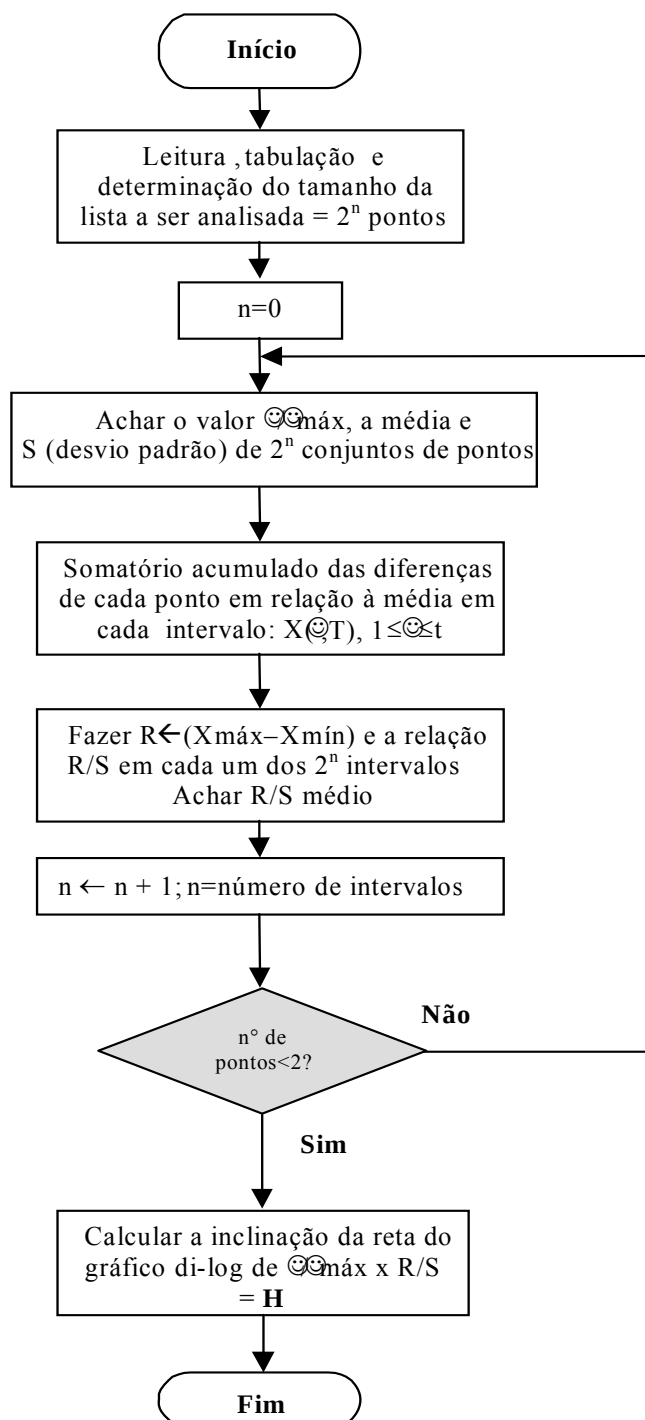


FIGURA 13. Fluxograma da análise R/S aplicada à sequência de tempos de permanência de um registro de canal iônico para determinar a memória (correlação de longo alcance) na sequência temporal.

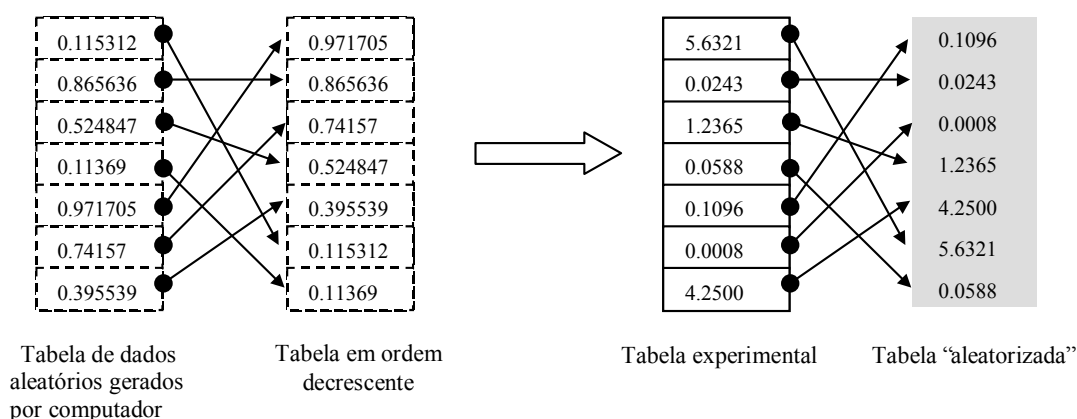


FIGURA 14. Exemplo de “aleatorização” de dados temporais empregada na verificação de memória dos registros experimentais. O mesmo deslocamento produzido na tabela de dados aleatórios gerados por computador na sua ordenação decrescente é executado equivalentemente na tabela de dados temporais a serem “aleatorizados”.

3.4. Simulação do Modelo Markoviano

O modelo de onze estados descrito na figura 6 foi simulado usando programas do pacote QUB (AUERBACH et al., 2000). O pacote QUB é utilizado na análise de dados em canais unitários (<http://www.qub.buffalo.edu>) e assume que a cinética do canal é Markoviana⁽⁵⁾. A simulação foi realizada como segue (figura 15):

1. Os dados obtidos experimentalmente foram reprocessados no programa QuB;
2. Após esta etapa, um outro programa do QUB, o “SKM”, foi usado para gerar os tempos de permanências do canal nos estados aberto e fechado (*dwell times*);
3. O arquivo de tempos de permanência foi analisado em outro programa do QUB, o “MIL” (*maximum-interval-likelihood*) (QIN et al. 1996; 1997), onde os parâmetros cinéticos foram obtidos em comparação com o modelo (construído usando o “SIMU”, um outro programa do QUB) e o arquivo dos tempos de permanências experimentais;
4. Obtidas as constantes do modelo de onze estados, foram feitas com simulações das correntes no programa SIMU;
5. Para cada um dos cem arquivos simulados com base no modelo Markoviano de onze estados foram obtidos os H's correspondentes, calculados da seguinte forma:

⁵ O estado futuro de um canal depende apenas do seu estado atual e as taxas cinéticas de transição entre os estados não variam.

- a) A seqüência temporal do arquivo de tempos de permanência contém uma tabela, composta em segmentos, que associa o estado do canal (0 = fechamento e 1 = abertura) ao correspondente tempo gasto no estado. A tabela foi trabalhada no programa Excel para agrupar os segmentos num único segmento e retirar a seqüência de 0's e 1's, a fim de formar uma matriz coluna de tempos de fechamentos e aberturas do canal. A seqüência única de tempos de abertura e fechamento foi, então, salva no formato texto, que foi lido pelo programa de cálculo de H elaborado no *Mathematica*;
- b) O cálculo de H foi feito no programa específico sobre 2^{12} tempos de abertura e fechamento gerados na simulação.

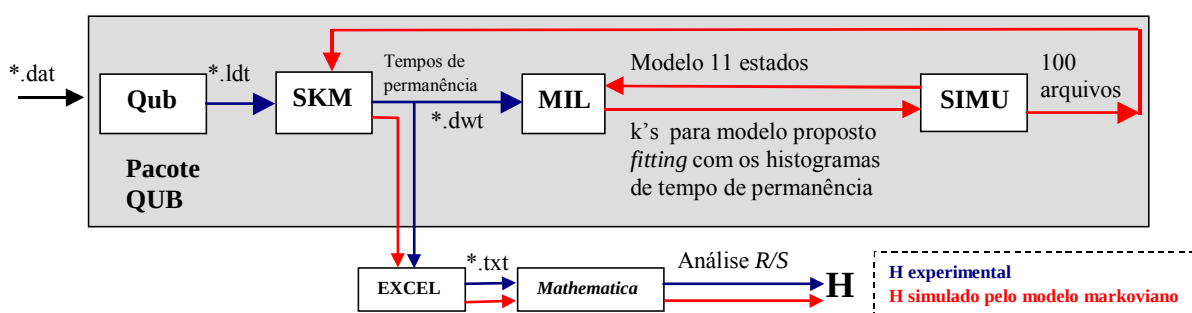


FIGURA 15. Esquema de obtenção dos coeficientes H dos arquivos experimentais e do H médio simulado com base no modelo Markoviano de cinética de canais iônicos. O arquivo original de saída do Pclamp6 (de extensão dat) é processado no pacote QUB, no qual se extrai a seqüência experimental de aberturas e fechamentos (extensão dwt) e as constantes cinéticas para o modelo de onze estados proposto. São simulados 100 arquivos de 2^{12} tempos de permanência com base no modelo Markoviano. Nessas seqüências de tempos de fechamentos e aberturas experimentais e simuladas pelo modelo de Markov é aplicada a análise R/S de Hurst, que determina a existência ou não de memória na seqüência temporal.

A fração de tempos de permanência de um registro de canal iônico é um parâmetro cinético que permanece invariante em experimentos realizados em uma mesma condição (NOGUEIRA, 1986):

$$\text{Fração (fechamento)} = \frac{t_{\text{médio fechamento}}}{t_{\text{médio abertura}} + t_{\text{médio fechamento}}}$$

$$\text{Fração (abertura)} = \frac{t_{\text{médio abertura}}}{t_{\text{médio abertura}} + t_{\text{médio fechamento}}}$$

As frações de tempo de permanência dos registros simulados pelo modelo Markoviano de onze estados foram calculadas para avaliar a aproximação alcançada pelo modelo sobre o registro original do canal através de programa elaborado no Mathematica (apêndice 3).

3.4.1. Teste do Pacote de Programas QUB

Para testar se o QUB calcula adequadamente as constantes cinéticas de um modelo Markoviano, foi utilizado um outro programa que tem a mesma função, o ChannelLab, da Synptosoft (<http://www.synptosoft.com>). O ChannelLab é um programa de análise cinética de canais iônicos e, de maneira semelhante ao QuB, constrói os histogramas de tempos de permanências do registro do canal com base na raiz quadrada da probabilidade de ocorrência de eventos com determinada duração versus o logaritmo da duração. Este programa emprega o mesmo método de ajuste de exponenciais do MIL, o *maximum likelihood*.

Dados dos tempos de permanência de um registro de canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig foram analisados no ChannelLab. Um modelo Markoviano de três estados foi proposto para simular os dados experimentais (CARNIO & VARANDA, 1995). A saída do ChannelLab fornece os parâmetros das exponenciais que descrevem a cinética de abertura e fechamento do canal.

Os parâmetros das exponenciais obtidas através do ChannelLab permitiram o cálculo das taxas cinéticas com o auxílio das equações de COLQUHOUN e HAWKES (1981).

O programa ChannelLab usado foi a versão de demonstração 2.030115 (2002). Os cálculos das taxas cinéticas do modelo de três estados a partir dos parâmetros das exponenciais e os cálculos dos parâmetros das exponenciais a partir das taxas cinéticas geradas pelo MIL foram realizados com auxílio do *Mathematica* (apêndices 4 e 5).

3.5. Simulação do modelo fractal

A simulação do modelo fractal foi feita através de um algoritmo de geração de dados fractais (LIEBOVITCH et al., 1987). Simulou-se o registro de um canal fractal de dois estados

em programa elaborado no *Mathematica*. O programa de simulação fractal (fluxograma da figura 18 e apêndice 6) gera uma seqüência de 2^n tempos de fechamento e abertura, simulando o registro de um canal fractal de dois estados:

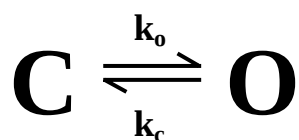


FIGURA 16. Esquema cinético representativo de um modelo fractal de dois estados cinéticos, um fechado (C) e um aberto (O), onde $k_o = At^{1-D}$ e $k_c = A't^{1-D'}$.

Foram gerados 2^{12} tempos de fechamento e abertura na simulação da cinética fractal.

Para calcular os valores de D , D' , A e A' foi aplicado o método descrito em LIEBOVITCH et al. (1987). Foram extraídas a seqüência de tempos de fechamento e abertura de um registro de canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig (no presente caso aproveitou-se a extração dos tempos de permanência realizada pelo pacote QUB sobre registro de canal iônico) e construídos, em escala semilogaritmica, histogramas dos tempos de fechamento e abertura para t_s de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 ms, onde os valores dos t_s são as larguras das colunas dos histogramas ("bins"). A taxa cinética efetiva k_{eff} é obtida através da inclinação desse gráfico entre o 2º e 4º bins de cada histograma (ver figuras 25 e 26). A inclinação de um gráfico duplo logaritmo de k_{eff} versus o $t_{eff} = t_s$ fornece os $1-D$ e $1-D'$, onde D e D' são as dimensões fractais do fechamento e da abertura, respectivamente. A interseção da reta com o eixo das ordenadas forneceu $\text{Log}(A)$ e $\text{Log}(A')$, onde A e A' são os coeficientes da cinética do fechamento e da abertura, respectivamente (ver figura 27).

Dos registros simulados com base no modelo fractal foram calculadas as frações de tempo de permanência para avaliar a aproximação alcançada pelo modelo fractal sobre a fração de tempos de permanência do registro original.

Os cálculos dos valores de D , D' , A e A' foram realizados no programa Origin 5.0. As seqüências de abertura e fechamento foram extraídas do registro original e as frações dos tempos de permanência calculados através de programa elaborado no Mathematica (apêndice 3).

3.5.1. Distribuições de tempos de fechamento e abertura para canais iônicos fractais

Seja $P(t)$ a distribuição de probabilidade cumulativa dos tempos de fechamento, denominada de probabilidade de que o canal permaneça fechado para a duração t . Então $P(t+\Delta t)$, a probabilidade de que o canal permaneça fechado pela duração $t+\Delta t$, é igual à probabilidade de permanecer fechado para duração t , vezes a probabilidade condicional de que ele não se abra no intervalo Δt restante, dado que ele tenha permanecido fechado pela duração t . Então,

$$P(t + \Delta t) = P(t)[1 - k_o \Delta t].$$

No limite $\Delta t \rightarrow 0$ esta equação se torna

$$\frac{dP(t)}{P(t)} = -k_o dt.$$

Para um canal fechado $\rightleftharpoons$ aberto com cinética markoviana, k_o =constante. A equação acima pode ser integrada para encontrar que $P(t)=\exp(-k_o t)$. Contudo, para um canal com cinética fractal, $k_o=At^{1-D}$ e $P(t)$ é igual a:

$$P(t) = \exp\left(-\frac{A}{2-D} t^{2-D}\right).$$

Como é esperado observar um comportamento mais rápido em escalas de tempo menores, k_o precisa ser uma função não-crescente de t , de forma que a lei de escala fractal $k_o=At^{1-D}$ requer $D \geq 1$. A condição limite de $P(0)=1$ requer que $D < 2$. Então, a dimensão fractal é restrita à faixa $1 \leq D < 2$.

Esta restrição na faixa da dimensão fractal D também tem uma interpretação geométrica. Quando o número de transições entre aberturas e fechamentos do canal é escassa, a forma do registro do canal tem a forma aproximada a uma reta. Isto é, a sua dimensão se aproxima a $D=1$. Se o número de transições do canal é bastante elevada, o registro do canal tende a ocupar um plano. Então, ele cobriria uma área e teria a dimensão $D=2$. O canal fractal, como a curva de Koch, está entre estes dois extremos. O comprimento de seu traço é também infinito, mas de uma maneira muito especial, de forma que seu comprimento medido é proporcional a t_{eff}^{1-D} , onde t_{eff} é a escala de tempo na qual o comprimento do traço é medido e D é sua dimensão fractal.

A distribuição de frequência $f(t)$ de tempo de fechamento, ou seja, a probabilidade de que o canal permaneça fechado por uma duração entre t e $t+dt$, é dada por:

$$f(t) = -\frac{dP(t)}{dt} = At^{1-D} \exp\left(-\frac{A}{2-D}t^{2-D}\right).$$

Para o canal fractal a duração média de fechamento do canal $\langle t \rangle$, é dada por:

$$\langle t \rangle \equiv \int_0^\infty tf(t)dt = \frac{\Gamma\left(1 + \frac{1}{2-D}\right)}{\left(\frac{A}{2-D}\right)^{1/(2-D)}}, \text{ onde } \Gamma \text{ é a função gama.}$$

3.5.2. Simulações numéricas de tempos de permanências do canal nos diferentes estados cinéticos pelos modelos Markoviano e fractal (LIEBOVITCH et al., 1987)

A corrente $I(t)$ flui através do canal a um tempo t quando o canal está em um estado i . Se o canal está no estado i no tempo $P\Delta t$, então a probabilidade de que ele esteja no estado $j \neq i$ no tempo $(P+1)\Delta t$ é $k_{ij}\Delta t$, onde k_{ij} é a constante cinética. O passo de tempo Δt é escolhido de forma que $k_{ij}\Delta t \ll 1$. Na simulação, o valor escolhido para Δt foi 50 μs . A probabilidade de que o canal permaneça no estado i é:

$$1 - \sum_{j \neq i} k_{ij}\Delta t$$

A soma das probabilidades de todos os possíveis resultados precisa ser igual a 1. Marcam-se segmentos de retas no intervalo $[0,1]$, cada um dos quais corresponde à transição do estado e é igual em comprimento à probabilidade de transição do estado. Um gerador de números pseudo-aleatórios com probabilidade uniforme no intervalo $[0,1]$ é então usado para gerar um número que cairá em um desses segmentos de linha e, então, nos dirá o estado j do canal no tempo $(P+1)\Delta t$ (figura 17).

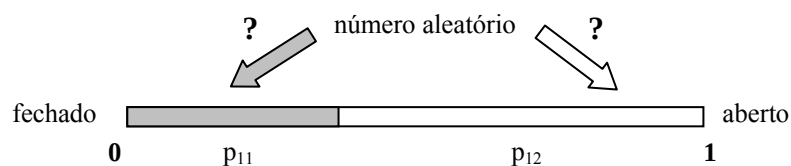


FIGURA 17. Critério de decisão para a formação da seqüência de tempos de fechamentos e aberturas para um canal fractal de dois estados cinéticos, de acordo com o algoritmo proposto por LIEBOVITCH et al. (1987). O canal está primeiramente no estado fechado. Se um número aleatório lançado entre 0 e 1 estiver na região do segmento p_{11} , que representa a probabilidade de que ele permaneça fechado, o canal permanecerá o próximo Δt nesse estado. Do contrário, se o número aleatório estiver fora da faixa representada por p_{11} o canal trocará de estado e o próximo Δt é contado para o estado oposto.

Para um canal Markoviano $k_{ij} = \text{constante}$ ($D=1$) e para um canal fractal k_{ij} é proporcional ao tempo gasto num determinado estado elevado à potência $1-D$.

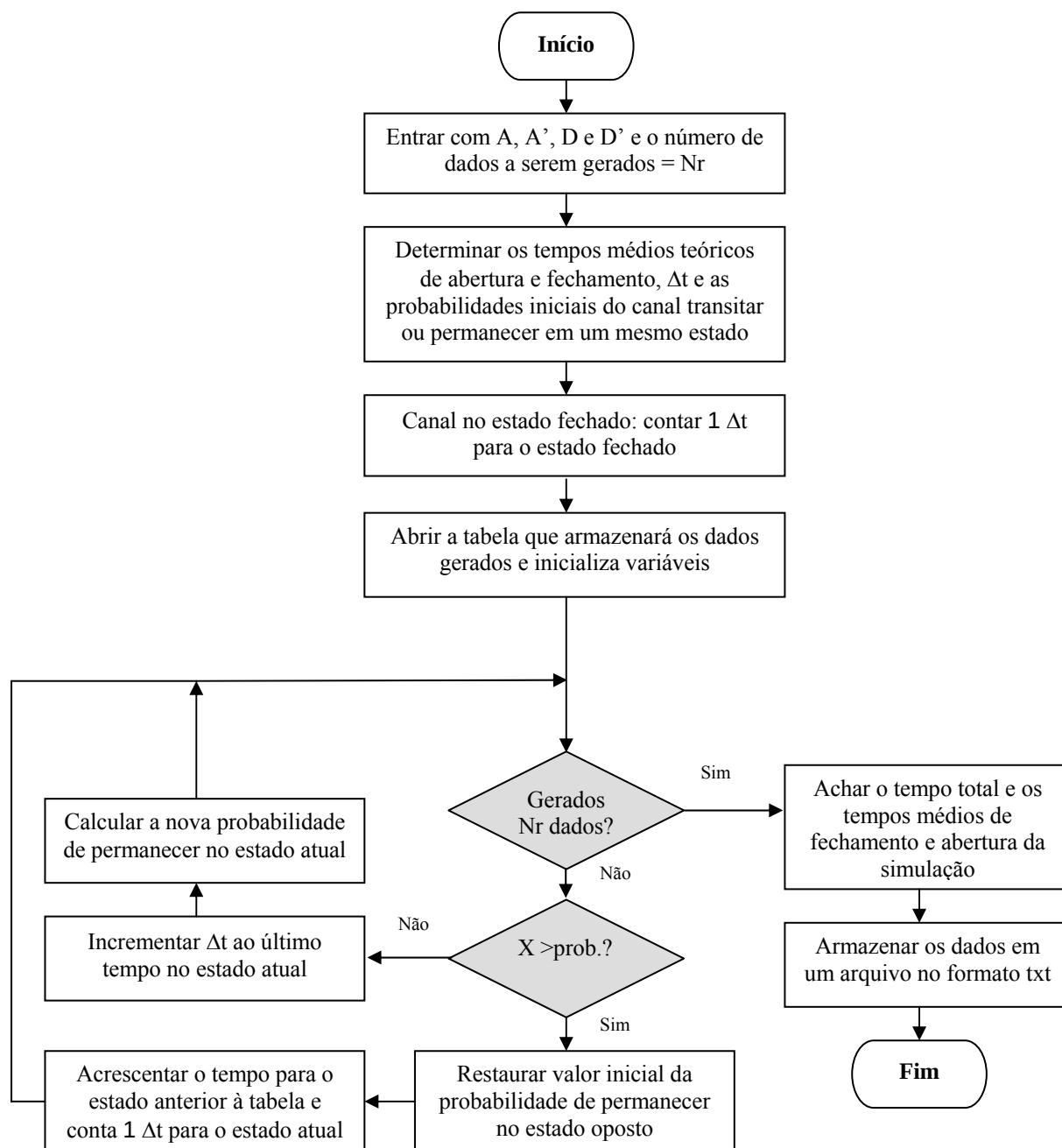


FIGURA 18. Fluxograma da simulação de geração de uma tabela sequencial de tempos de abertura e fechamento baseada no modelo de um canal fractal de dois estados (LIEBOVITCH et al., 1987). X indica um número pseudo-aleatório lançado para a comparação com a probabilidade de permanência em um determinado estado, como critério de decisão para a permanência ou troca de estado.

3.6. Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para testar se a distribuição dos valores dos coeficientes de Hurst obtidos nas simulações seguem uma distribuição normal. O teste-Z bicaudal foi utilizado para testar se o valor médio do coeficiente de Hurst H experimental difere significativamente do valor de H simulado. Todos os testes foram realizados no programa *STATISTICA* versão 5.1.

Neste trabalho foi utilizado um microcomputador com a seguinte configuração: *AMD Duron* 950 MHz; 128 *megabytes* de memória RAM, disco rígido com 20 *gigabytes* de memória.

Os softwares empregados foram o *Mathematica* versão 4.0, da empresa *Wolfram Research, Inc.* (1999), *STATISTICA* versão 5.1, desenvolvido pela empresa *StatSoft, Inc.* (1998), *Origin* versão 5.0, desenvolvido pela *Microcal Software, Inc.* (1997), e *Excel 97*, da *Microsoft Corporation*.

3.7. Visualização da Seqüência de Tempos de Permanência do Canal Iônico

Para a visualização da seqüência de tempos de aberturas e fechamentos do canal iônico, experimentais ou simulados, foi elaborado um programa no *Mathematica*, conforme fluxograma da figura 19 (apêndice 7).

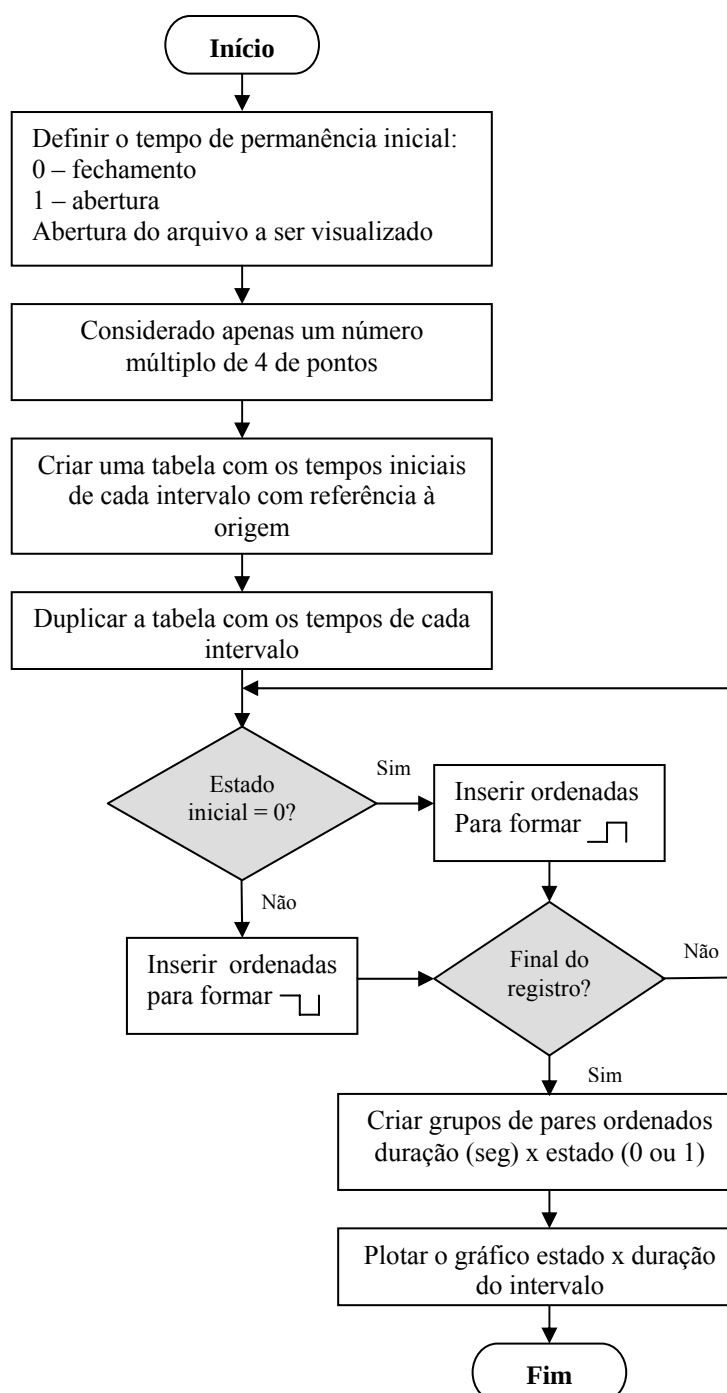


FIGURA 19. Fluxograma da obtenção da visualização do registro iônico a partir de uma sequência de tempos de fechamentos e aberturas para a programação no *Mathematica*.

IV. RESULTADOS

4.1. Memória em registros experimentais de um canal para potássio ativado por cálcio de células de Leydig

A figura 20 apresenta trechos de um dos registros da corrente no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig, numa membrana com a voltagem fixada em -80 mV e numa concentração de cálcio livre de 10 nM.

Sabe-se que o íon Ba^{2+} produz um bloqueio discreto de canais BK. Se Ca^{2+} produz um bloqueio similar, então uma dificuldade potencial existente em experimentos em concentrações altas de Ca^{2+} intracelular é a possibilidade de bloqueio discreto do canal pelo Ca^{2+} (ROTHBERG & MAGLEBY, 1999). Dessa maneira, os experimentos empregados foram realizados em baixa concentração de cálcio.

A condutância característica do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig é igual a 265 pS (VARANDA et al., 2000).



FIGURA 20. Atividade iônica em um canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig medida a -80 mV e a 10 nM Ca^{2+} , registrada no arquivo R03. A linha de base do registro é superior, de forma que os sentidos das amplitudes das correntes estão invertidos, dessa forma, o traço superior representa o fechamento do canal (F) e o inferior a abertura do canal (A).

A tabela 1 mostra os valores dos coeficientes de Hurst obtidos para cinco registros experimentais da corrente no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig. O valor médio obtido para o coeficiente de Hurst nesses experimentos é igual a $0,640 \pm 0,064$. Este valor sugere a existência de memória positiva no processo cinético desse canal. Quando esses dados experimentais são embaralhados no programa de “aleatorização” a memória é perdida e um valor de $H = 0,57 \pm 0,007$ ($n=5$) é encontrado nessa condição. Esse procedimento mostra que a correlação de longo alcance é uma propriedade inerente à série temporal associada à sequência dos tempos de aberturas e fechamentos do canal unitário.

Arquivo experimental	H	H para os dados embaralhados
R01	0,642911237	0,5659279200
R02	0,583813982	0,5751839630
R03	0,739722189	0,5614118300
R04	0,650064911	0,5783907440
R05	0,586039964	0,5683844661

TABELA 1. Coeficientes de Hurst de cinco registros experimentais da atividade iônica de um canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig em comparação com os coeficientes dos mesmos registros temporais quando submetidos a um primeiro estágio de aleatorização em programa elaborado no *Mathematica*.

Para verificar se os registros experimentais são aleatórios ou se existe correlação de longo alcance foi aplicada a análise *R/S* de Hurst utilizando a seguinte estratégia:

1. O arquivo R03, de maior memória positiva, serviu de entrada para o programa de aleatorização. Ao arquivo resultante da aleatorização foi aplicada uma segunda aleatorização, até que o número de estágios de aleatorização chegasse a 100;
2. Foi feito um teste de Shapiro-Wilk (figura 21) nos 100 valores de H dos arquivos obtidos em cada estágio de aleatorização. O teste mostrou que os dados podem ser descritos por uma distribuição normal ($p=0,3922$);
3. Foi feito um teste-Z bicaudal sobre o valor de H do registro experimental R03 e os 100 H's obtidos da aleatorização. O teste Z mostrou que o valor do H experimental é significativamente diferente do valor de H obtido pela aleatorização do registro R03 ($p=0$). Este procedimento mostrou que o H experimental não pertence à distribuição dos coeficientes H do registro aleatorizado, evidenciando a existência de uma memória positiva no registro experimental, estatisticamente diferente daquela obtida se os dados fossem aleatórios.

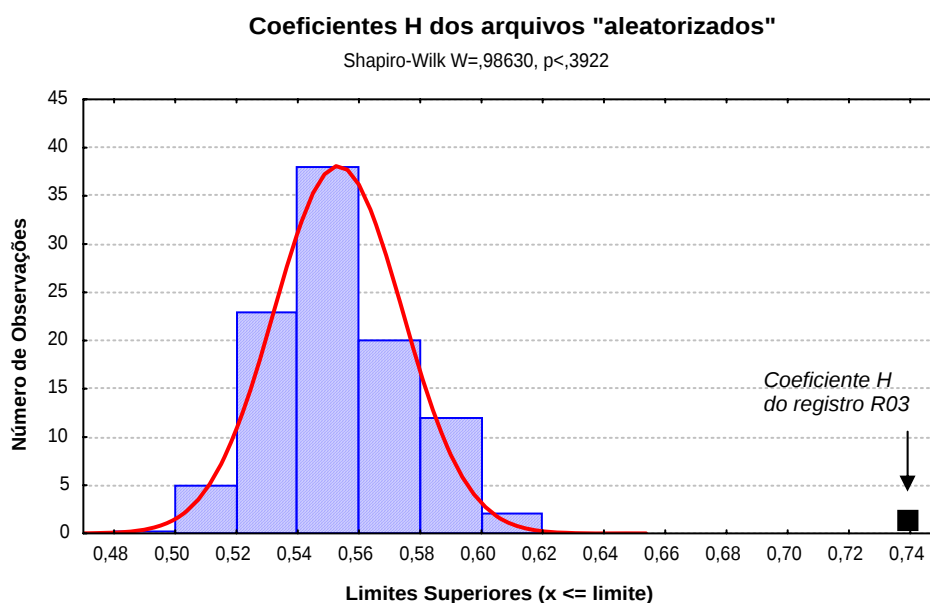


FIGURA 21. Distribuição dos coeficientes H do registro R03 “aleatorizado” em 100 estágios de aleatorização. O teste de Shapiro-Wilk indicou uma chance de 39,22% de que a distribuição dos H’s do registro “aleatorizado” fosse normal, o que habilitou a utilização do teste-Z para a comparação das médias de H experimental e H “aleatorizado”. O teste-Z indicou uma probabilidade nula de que o valor experimental de H do registro experimental R03 (0,739722189) pertencesse à distribuição dos H “aleatorizados”, indicando que os dados experimentais não podem ser considerados aleatórios.

4.2. Teste do pacote de programas QUB

Para o teste com o pacote de programas QUB foi escolhido o arquivo experimental R03, que por ser o registro de maior memória positiva também foi o escolhido nas modelagens subseqüentes. A modelagem Markoviana de três estados cinéticos realizada no programa MIL e o ajuste por exponenciais obtido pelo ChannelLab geraram como resposta em exponenciais de abertura e fechamento e em taxas cinéticas de transições entre os estados, os valores listados nas tabelas 2 e 3. A figura 22 apresenta a convergência dos resultados nos dois programas de análise de cinética de canais.

A pequena variação existente entre os valores das taxas cinéticas (abaixo de 5%) fornecidas pelos dois programas independentes permite afirmar que o pacote QUB apresenta uma aproximação bastante razoável do valor das taxas cinéticas.

Exponencial (t em ms ⁻¹)	QUB	ChannelLab
Abertura	$f(t) = 0,02125 e^{-t/47,05}$	$f(t) = 0,02171 e^{-t/46,027}$
Fechamento	$f(t) = 0,136 e^{-t/6,612} + 0,00058 e^{-t/171,864}$	$f(t) = 0,1359 e^{-t/6,637} + 0,000574 e^{-t/171,40}$

TABELA 2. Exponenciais de abertura e fechamento fornecidas como resposta dos programas QUB e ChannelLab para o registro experimental R03 ajustadas com base em um modelo Markoviano de três estados cinéticos. As componentes exponenciais fornecidas pelo QUB foram calculadas através da solução do sistema de equações proposto por COLQUHOUN & HAWKES (1981), para um modelo Markoviano de três estados cinéticos.

Constante	Valor em Hz calculado pelo QUB	Valor em Hz calculado pelo ChannelLab	Variação(%)
k ₁₂	6,4308	6,43345	0,0412
k ₂₁	13,787	13,6068	1,3243
k ₂₃	136,85	136,464	0,2829
k ₃₂	21,256	21,7263	2,1647

TABELA 3. Taxas cinéticas, em Hz, do registro experimental R03 ajustadas com base em um modelo Markoviano de três estados cinéticos. As taxas cinéticas de transição entre dois estados possíveis foram calculadas através do programa MIL, do pacote QUB e através da combinação de exponenciais fornecida pelo ChannelLab, das quais foram calculadas as taxas cinéticas através da solução do sistema de equações proposto por COLQUHOUN & HAWKES (1981).

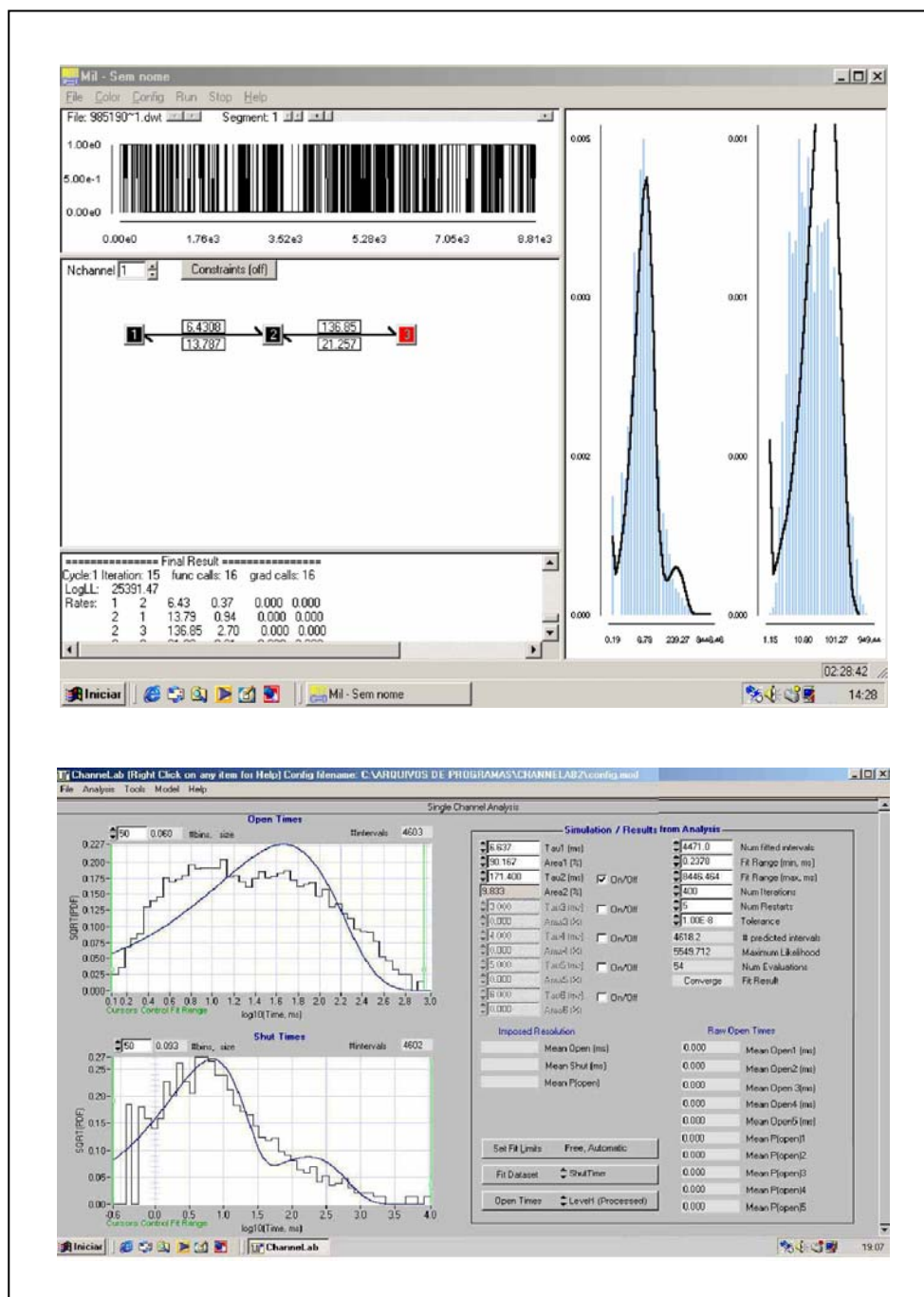


FIGURA 22. Programa MIL (janela superior), quando da convergência para o resultado da combinação do modelo de três estados cinéticos, com os dados experimentais do registro R03. À esquerda superior o programa mostra o registro do canal iônico. Na figura superior à esquerda são também mostrados os valores das constantes cinéticas do modelo e à direita uma descrição visual do ajuste pelo método da máxima verossimilhança para os histogramas de probabilidade de fechamento e abertura, respectivamente, da esquerda para a direita. A janela inferior apresenta o resultado da aproximação da exponencial para o histograma de tempos de abertura (acima) e por exponencial dupla dos tempos de fechamento (abaixo) para o registro R03 realizada pelo programa ChannelLab.

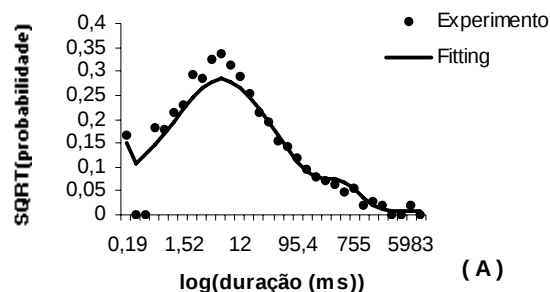
4.3. Memória de registros simulados com base no modelo Markoviano e no modelo Fractal

Para ajustar os parâmetros cinéticos do modelo Markoviano foi escolhido o arquivo de dados experimentais que mostrou maior memória positiva, R03. A tabela 4 mostra os valores obtidos para as constantes cinéticas, em Hz, nas diferentes transições cinéticas e a figura 23 mostra as respostas fornecidas pelo programa MIL. A figura 23 mostra que o modelo Markoviano pode descrever de maneira adequada a cinética dos canais para potássio ativados por cálcio em células de Leydig. Nessa figura, pode ser observado que os dados experimentais mostrados nos histogramas dos tempos de fechamentos (A) e aberturas (B) do canal se ajustam bem ao modelo Markoviano.

Constante	Valor em Hz	Constante	Valor em Hz
k_{12}	14.631	k_{105}	0.1116
k_{21}	3.2445	k_{510}	0.1546
k_{23}	14.241	k_{116}	5221.3
k_{32}	64.773	k_{611}	1.0264
k_{19}	344.19	k_{45}	49.921
k_{91}	343.3	k_{54}	2050.8
k_{210}	78.657	k_{56}	2585.3
k_{102}	1342.9	k_{65}	411.85
k_{311}	0.0012	k_{67}	718.59
k_{113}	90.508	k_{76}	123.22
k_{94}	70.972	k_{78}	1.4343
k_{49}	99.651	k_{87}	2.0488

TABELA 4. Valores em Hz das constantes cinéticas, taxas de transição entre dois estados possíveis do canal obtidos da combinação pelo modelo Markoviano de onze estados cinéticos executada no MIL (pacote QUB) em relação aos dados experimentais.

Aproximação do modelo markoviano de 11 estados com os tempos de fechamento



Aproximação do modelo markoviano de 11 estados com os tempos de abertura

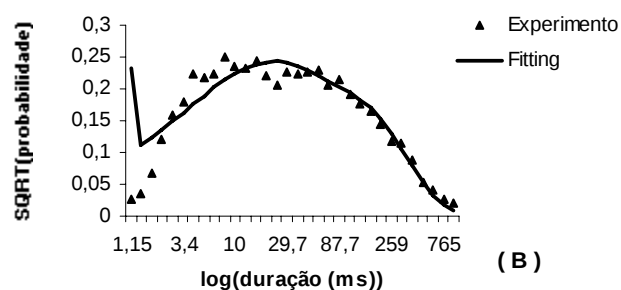


FIGURA 23. Aproximação (*fitting*) feita pelo modelo Markoviano com os dados experimentais de tempos de fechamento (A) e abertura (B). O modelo Markoviano de onze estados proposto por ROTHBERG & MAGLEBY (1999) foi capaz de se ajustar com segurança à cinética do canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig.

A análise de Hurst foi aplicada à sequência dos tempos de aberturas e fechamentos simulados pelo modelo Markoviano. Nesse caso, o valor médio de H foi a 0,573 com desvio padrão de 0,026 ($n=100$). O teste de Shapiro-Wilk realizado com os valores dos H 's simulados mostra que esses dados podem ser descritos por uma distribuição normal ($p=0,8386$). O teste-Z bicaudal mostra que o valor médio do H experimental é significativamente diferente do valor médio do H obtido pela simulação com o modelo Markoviano ($p=0,0082$). Esta análise estatística mostra que o modelo Markoviano é inadequado para prever a memória encontrada na cinética do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig (figura 24).

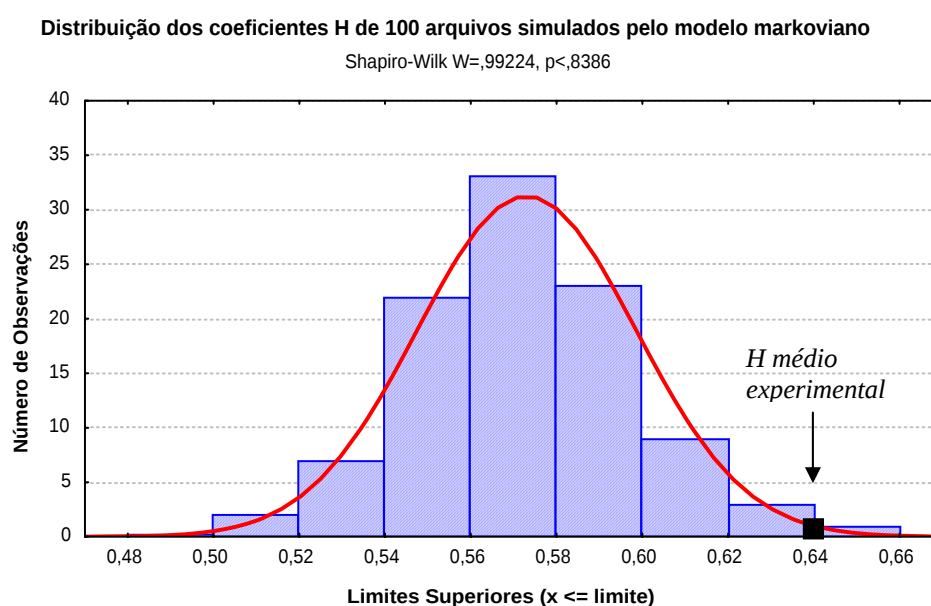


FIGURA 24. Distribuição dos coeficientes H de 100 arquivos simulados com base no modelo Markoviano. O teste de Shapiro-Wilk mostrou uma chance de 83,86% de que a distribuição dos H 's simulados com base no modelo Markoviano fosse normal. O teste-Z mostrou uma probabilidade de apenas 0,0082 de que o valor H médio experimental pertencesse à distribuição de H 's simulados com base nesse modelo.

O mesmo arquivo de dados experimentais usado para a descrição dos parâmetros do modelo Markoviano foi também utilizado na simulação fractal.

Um modelo fractal como o proposto por LIEBOVITCH et al. (1987) foi usado visando a descrever a memória encontrada na cinética do canal. Os parâmetros usados na simulação do modelo fractal foram respectivamente: $D=1,456$ (dimensão fractal da cinética de fechamento) e $A=4,91 \text{ Hz}^{0,5439}$ (coeficiente da cinética de fechamento) e $D'=1,402$ (dimensão fractal da cinética de abertura) e $A'=7,32 \text{ Hz}^{0,5982}$ (coeficiente da cinética de abertura).

Os parâmetros A , A' , D e D' foram escolhidos de maneira que a simulação fractal fornecesse um tempo médio de permanência nos estados fechados e abertos que fosse semelhante àquele encontrado nos dados experimentais. Os valores dos A 's e D 's foram obtidos como descrito por LIEBOVITCH et al. (1987), usando-se larguras de histogramas (“bins”) iguais a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 ms para as seqüências de fechamento e abertura (figuras 25 e 26, respectivamente). A figura 27 mostra um gráfico duplo-log da constante cinética efetiva k_{eff} versus o tempo efetivo t_{eff} do modelo fractal para a cinética de fechamento e abertura do canal para K^+ ativado por cálcio em célula de Leydig.

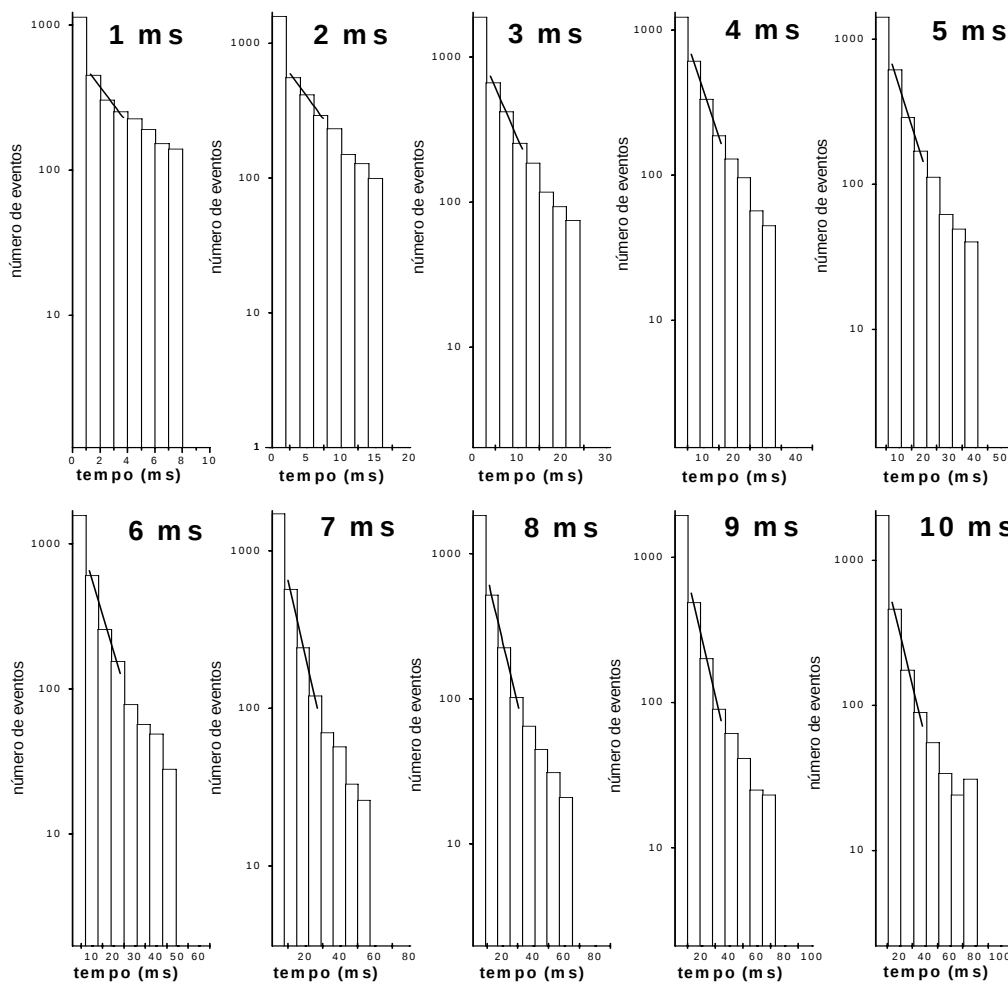


FIGURA 25. Histogramas de freqüência de duração de 4190 fechamentos do canal registrados em R03 para larguras de “bin” que vão de 1 a 10 milisegundos. O negativo da inclinação da regressão linear por mínimos quadrados entre o 2º e 4º “bins” do gráfico semilogaritmo fornece k_{eff} para cada largura de “bin”. Existe auto-similaridade da forma dos histogramas, caracterizando o registro fractal (LIEBOVITCH et al., 1987).

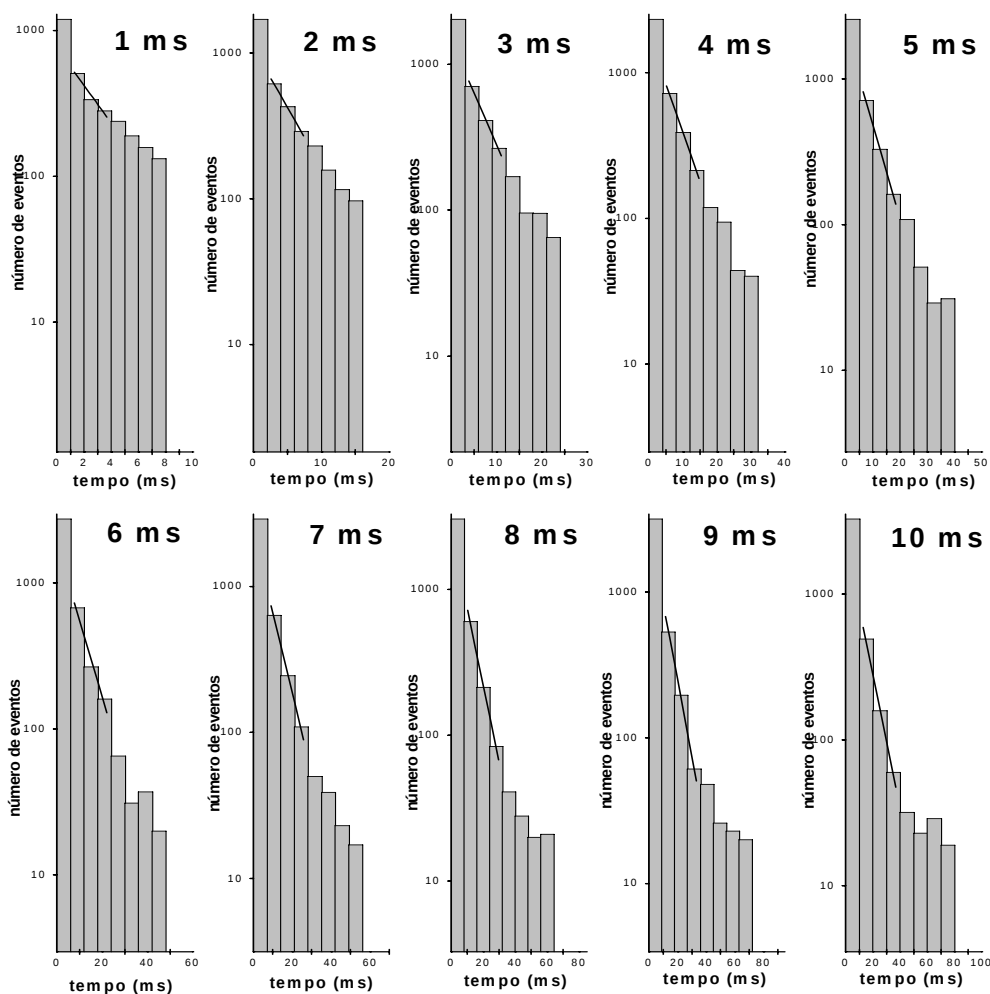


FIGURA 26. Histogramas de frequência de duração de 4191 aberturas do canal registrados em R03 para larguras de “bin” que vão de 1 a 10 milissegundos. Existe auto-similaridade na forma dos histogramas.

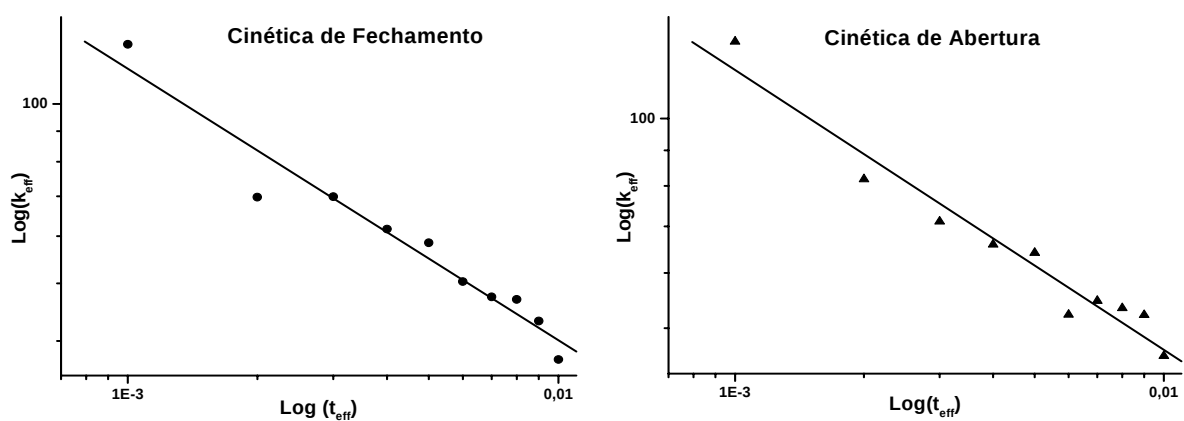


FIGURA 27. Gráfico duplo-log da relação $k_{\text{eff}} \times t_{\text{eff}}$ do fechamento e abertura do canal. Os dados situam-se na proximidade da reta de regressão, a lei de escala fractal. Dos dois gráficos extraíram-se os parâmetros da modelagem fractal necessários para a simulação dos arquivos com base no mesmo modelo.

A análise de Hurst foi aplicada à sequência dos tempos abertos e fechados obtidos pela simulação do modelo fractal. Em 100 simulações o valor de H médio $\pm$ desvio padrão foi igual a $0,559 \pm 0,023$. O teste de Shapiro-Wilk mostrou que os valores obtidos para os coeficientes de Hurst H seguem uma distribuição normal ($p=0,2456$) e o teste-Z evidencia que o valor médio de H obtidos na análise dos dados experimentais é significativamente diferente daquele obtido na análise dos dados do modelo fractal ($p=0,00046$). Esse resultado mostra que o modelo fractal também não é adequado para reproduzir a memória encontrada na cinética do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig (figura 28).

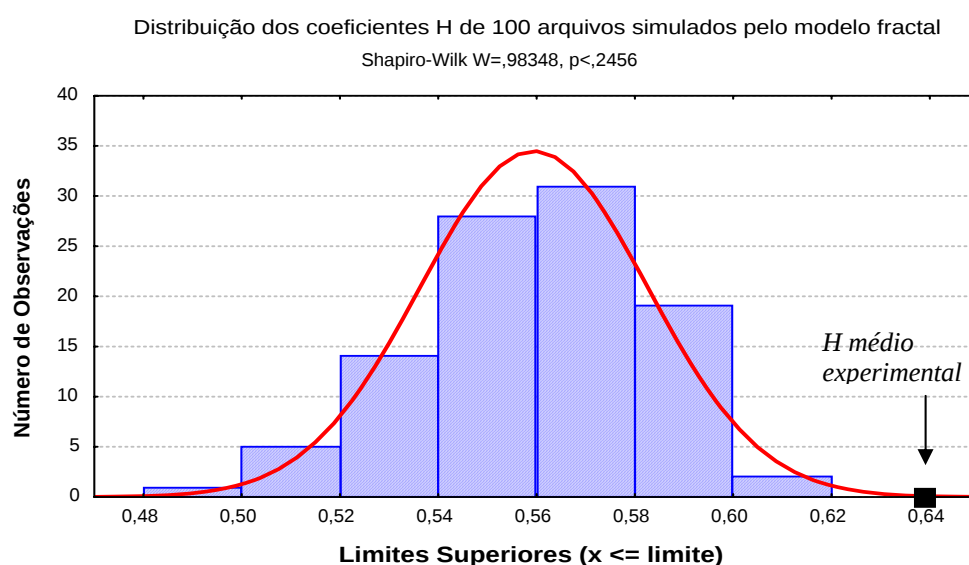


FIGURA 28. Distribuição dos coeficientes H de 100 arquivos simulados com base no modelo fractal. O teste de Shapiro-Wilk mostrou uma chance de 24,56% de que a distribuição dos H 's simulados com base no modelo Markoviano fosse normal. O teste-Z mostrou uma probabilidade de apenas 0,00046 de que o valor H médio experimental pertencesse à distribuição de H 's simulados com base nesse modelo.

A figura 29 mostra numa mesma escala (A) a corrente através do canal unitário; (B) a simulação da corrente no canal unitário pelo modelo Markoviano e (C) a simulação da corrente pelo modelo fractal. Os exemplos de registro de simulação extraídos de um dos arquivos simulados com base nos modelos Markoviano e fractal mostram que os mesmos guardam semelhança com relação ao registro original. Assim, podem-se observar as curtas aberturas seguidas por longos fechamentos característicos do registro original R03.

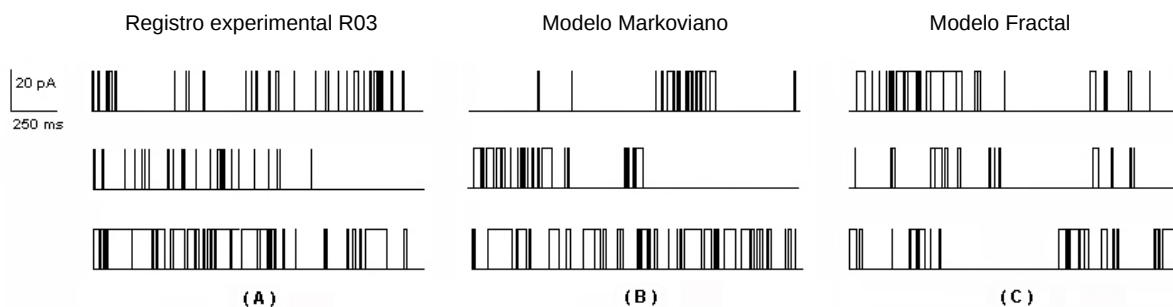


FIGURA 29. Em janelas de 1,75 segundos estão trechos do registro experimental R03 (A), de um dos registros simulados da cinética do canal com base no modelo Markoviano de onze estados (B) e de um dos registros simulados com base no modelo fractal (C). O traço inferior indica o fechamento do canal e o superior a abertura do canal.

A tabela 5 mostra a aproximação feita pela modelagem Markoviana e fractal sobre as frações os tempos médios do registro original. As modelagens Markoviana e fractal mostraram valores razoáveis na aproximação da cinética do canal, embora os dois modelos não sejam eficientes na identificação da memória do canal. O modelo fractal mostrou um melhor desempenho na aproximação cinética do registro original do canal iônico, em termos das médias das frações de tempos abertos e fechados.

Fração de tempo de permanência (ms)	Experimento (R03)	Modelagem Markoviana	Modelagem Fractal
Fechamento	0,566	$0,669 \pm 0,056$ (n=100)	$0,572 \pm 0,012$ (n=100)
Abertura	0,434	$0,331 \pm 0,056$ (n=100)	$0,428 \pm 0,012$ (n=100)

TABELA 5. Aproximação feita sobre as frações de tempos de permanência nas modelagens markoviana e fractal. As médias das frações de tempo de fechamento e abertura extraídos dos 100 arquivos simulados em cada modelagem mostra que os dois modelos são adequados na aproximação da cinética do canal, em termos de médias das frações de tempos abertos e fechados, embora sejam ineficientes para descrever a memória da cinética do canal. O melhor desempenho na aproximação do valor médio de fração de tempo de permanência foi obtido na simulação computacional fractal da cinética do canal iônico.

V. DISCUSSÃO

A questão fundamental envolvida no estudo de séries temporais resultantes de uma seqüência de medidas de grandezas que flutuam no tempo é encontrar um modelo que melhor descreva suas propriedades. Na cinética de um único canal iônico as séries temporais são compostas de uma longa seqüência de eventos de abertura e fechamentos, característicos de um processo de um determinado canal. Modelos Markoviano e fractal têm sido usados para modelar este processo cinético.

A modelagem matemática Markoviana do processo cinético em diferentes canais iônicos não tem levado em consideração as propriedades físicas das proteínas formadoras de canais iônicos. O modelo Markoviano da cinética de canal iônico consiste de um pequeno conjunto de estados de abertura e fechamento, das conexões entre os estados e das taxas cinéticas, que são as probabilidades por tempo do canal mudar de um estado para outro.

A análise cinética usando um modelo fractal foi mais adequada para explicar as propriedades de auto-similaridade e dependência de escala dos dados de registros de canais iônicos. Este novo modelo deslocou a análise de dados dos canais iônicos baseado unicamente na determinação dos parâmetros cinéticos para a determinação das propriedades físicas das proteínas formadoras de canais, tais como sua distribuição de barreiras de energia e/ou sua dependência com relação ao tempo (LIEBOVITCH et al., 2001).

As propriedades das proteínas formadoras de canais iônicos não são ainda bem conhecidas nas proteínas formadoras de canais. No entanto, é provável que as proteínas de membrana compartilhem muitas propriedades em comum com as proteínas globulares, cujas algumas propriedades estruturais e físicas já são bastantes conhecidas.

Nas proteínas globulares a função que descreve a energia potencial ao longo da molécula revela a presença de vários mínimos locais e superficiais. Esse perfil de energia é consistente com o modelo fractal e não com um modelo do tipo Markoviano, onde as transições ocorrem entre poucos estados cinéticos, discretos e profundos de energia potencial. Além disso, a própria estrutura da proteína globular varia com o tempo (KARPLUS & McCAMMON, 1981; LIEBOVITCH, 1993; BASSINGTHWAITE et al., 1994) (figura 30).

Apesar de sua inconsistência com a compreensão atual das proteínas globulares, o conceito Markoviano de cinética persiste e continua sendo predominante. No entanto, tem sido mostrado que a estrutura das proteínas formadoras de canais iônicos são tão flexíveis que os átomos que a compõem podem ter um contínuo de estados de energia, como sugerido pelos estudos teóricos e experimentais da dinâmica molecular dessas proteínas (KAZACHENKO et

al., 2001). Isso é consistente com o modelo fractal e inconsistente com os poucos mínimos profundos do modelo Markoviano.

No presente caso, as modelagens Markoviana e fractal feitas sobre os dados experimentais dos tempos de permanências nos estados abertos e fechados observados para um canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig, mostraram que o modelo fractal apresenta uma melhor aproximação com os dados cinéticos experimentais, em termos de frações dos tempos médios.

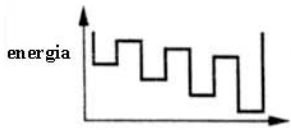
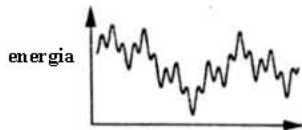
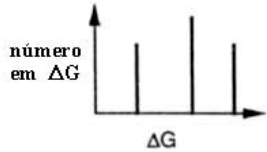
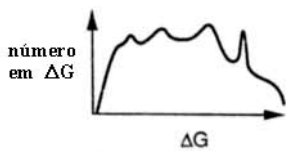
Propriedade	"Markov"	"Fractal"
1. Função de energia potencial	Poucos mínimos profundos 	Muitos mínimos superficiais 
2. Barreira de energia de ativação	Fina, discreta 	Larga, contínua 
3. Estrutura	Estática	Variante no tempo
4. Transição entre estados	Independente	Associada por uma escala

FIGURA 30. Comparação entre as propriedades das proteínas implicadas pelo modelo Markoviano e fractal (BASSINGTHWAIGHTE, 1994). O modelo fractal apresenta maior consistência com as propriedades físicas das proteínas globulares e, conseqüentemente, também é provável que esteja mais próximo da explicação das propriedades físicas das proteínas formadoras de canais iônicos.

No que diz respeito à memória, a análise de Hurst aplicada aos dados cinéticos obtidos com a simulação do modelo Markoviano não reproduziu a correlação de longo alcance identificada no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig. Os resultados mostraram que um modelo Markoviano de onze estados cinéticos (três abertos e oito fechados), que descreve bem a cinética desse canal em baixo cálcio, também não reproduz a memória do canal. Os valores de H obtidos nas simulações foram próximos a 0,5 (registro

sem memória), em claro contraste com o valor de $H = 0,64 \pm 0,064$ ($n=5$) obtido com os dados experimentais, que reflete a memória deste canal. Esse resultado está em concordância com aqueles obtidos anteriormente para um modelo Markoviano de oito estados proposto por KOCHETKOV et al. (1999) para um canal para potássio ativado por cálcio em células *Vero* dos rins. Modelos Markovianos de três e quatro estados propostos por VARANDA et al. (2000) para descrever a cinética do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig também não responderam pela memória desse canal. Isto mostra que Modelos Markovianos que descrevem muito bem as distribuições de tempos de permanências do canal nos estados abertos e fechados, foram ineficazes para descrever a correlação de longo alcance encontrada para os tempos de abertura e fechamento deste canal ativado por cálcio. Este fato indica que modelos que assumem que proteínas formadoras de canais fazem transições apenas entre estados discretos de energia não são completamente adequados para descrever o processo cinético do canal unitário (VARANDA et al., 2000).

Outro aspecto interessante é que o coeficiente de Hurst não varia com a voltagem aplicada através do canal (VARANDA et al., 2000). Embora a cinética do canal mude com os potenciais de membrana, aumentando ou diminuindo a probabilidade de encontrar o canal no estado aberto, a dinâmica do processo permanece invariável, sugerindo que a memória é uma propriedade intrínseca do sistema. Isso significa que esta memória surge da dinâmica interna da proteína do canal, o que é completamente diferente de afirmar que a memória surge de um processo Markoviano específico.

A modelagem fractal realizada sobre o canal para potássio ativado por cálcio também não gerou dados cinéticos capazes de descrever a memória apresentada no registro original, apesar de descrever melhor a cinética do canal que o modelo Markoviano, em termos de médias frações de tempos abertos e fechados. Isso evidencia a existência de características das proteínas formadoras do canal ainda não previstas nem na modelagem Markoviana nem na fractal.

Medições biofísicas, tal como a ressonância magnética nuclear (NMR), mais sensíveis ao movimento do canal, ao número de estados conformacionais e à distribuição das barreiras de energias podem fornecer informações adicionais sobre a natureza física do canal e, mais especificamente, sobre a sua cinética (BASSINGTHWAIGTHE et al., 1994). As propriedades estatísticas de uma proteína mudando de um estado para outro, como a de qualquer outro sistema complexo que transita entre estados diferentes, são muito pouco conhecidas. Devido à complexidade envolvida no mecanismo de mudança conformacional da estrutura da proteína

formadora do canal iônico para a abertura e fechamento do mesmo, sugere-se a continuação do estudo da memória da cinética de canais iônicos utilizando outros modelos matemáticos, tais como o modelo caótico e as redes neurais. É necessário utilizar outras modelagens cinéticas para descrever o padrão temporal de abertura e fechamento dos canais iônicos que levem em consideração as prováveis propriedades físicas da proteína formadora do canal e que se atenham à complexidade do processo cinético, no intuito de identificar o parâmetro físico responsável pela memória da cinética de canais iônicos.

VI. CONCLUSÕES

1. O pacote de programas QUB, de análise de cinética da canais iônicos, forneceu uma resposta satisfatória na aproximação das taxas cinéticas de um modelo Markoviano de três estados;
2. Tempos de permanência nos estados abertos e fechados do canal para potássio ativado por cálcio de células de Leydig, em baixo Ca^{2+} (10 nM), apresentam memória, ou seja, correlação positiva de longo alcance;
3. A simulação computacional feita com base no modelo fractal apresentou uma melhor descrição da cinética do canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig comparativamente ao modelo Markoviano, em termos de médias de frações de tempos abertos e fechados;
4. Os modelos Markoviano e fractal, que descrevem adequadamente as distribuições dos tempos de permanências do canal nos estados aberto e fechado, não são adequados para descrever a memória encontrada na cinética desse canal.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDLEY, D. J.; STANFIELD, P. R. **Ion Channels, Molecules in Action**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- ALBERTSEN, A.; HANSEN, U. Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. *Biophysical Journal*, v. 67, p. 1393-1403, 1994.
- AUERBACH, A.; MILESCU, L.; QIN, F.; QIONG, F.; SACHS, F. **“Single Channel Kinetic. Analysis Made Easy - Tutorial 2000”**. Buffalo: State University of New York at Buffalo, Buffalo, 2000.
- BASSINGTHWAIGTHE, J. B.; LIEBOVITCH, L. S.; WEST, B. J. **Fractal Physiology**. New York: Oxford University Press, 1994.
- BERAN, J. **Statistics for Long-Memory Processes**. New York: Chapman & Hall, 1994.
- BLACHMAN, N. R. **Mathematica: Uma Abordagem Prática**. Rio de Janeiro: Prentice Hall do Brasil, 1993.
- BRENNER, R.; PERÉZ, G. J.; BONEV, A. V.; ECKMAN, D. M.; KOSEK, J.C.; WILER, S. W.; PATTERSON, A. J.; NELSON, M. T.; ALDRICH, R. W. Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, v. 407, p. 870-876, 2000.
- CARNIO, E. A.; VARANDA, W. A. Calcium - activated potassium channels are involved in the response of mouse Leydig cells to human chorionic gonadotropin. *Brazilian J. Med. Biol. Res*, v. 28, p. 813-824, 1995.
- COULQUHOUN, D.; HAWKES, A.G. On the stochastic properties of single ion channel openings and clusters of bursts. *Philos. Trans. Roy. Soc. London*. Ser. B300, p. 1-59, 1981.
- DEL CORSSO, C.; VARANDA, W. A. The resting potential of mouse Leydig cells: role of an electrogenic Na^+/K^+ pump. *Journal of Membrane Biology*, v. 191, n. 2, p. 123-31, jan. 2003. National Center of Biotechnology Information [on line]. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [capturado em 1 fev. 2003]. Resumo.
- DUFAU, M. L.; SORREL, S. H.; CATT, K. J. Gonadotropin-induced phosphorylation of endogenous proteins in the Leydig cell. *FEBS LETTER*, v. 131, p. 229-234, 1981.
- FEDER, J. **Fractals**. New York: Plenum Press, 1988.

- HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMAN, B.; SIGWORTH, F.I. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, v. 391, p. 85-100, 1981.
- HILLE, B. **Ionic Channels of Excitable Membranes**. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 1992.
- HURST, H. E. Long-term storage capacity of reservoirs. *Trans. Amer. Soc. Civ. Eng.* v. 116, p. 770-808, 1951.
- HURST, H. E.; BLACK, R. P.; SIMAIKI, Y. M. **Long-term Storage: An Experimental Study**. London: Constable, 1965.
- JANSZEN, F. H. A.; COOKE, B. A.; VAN DRIEL, M.J.A.; VAN DER MOLEN, H. J. The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. *Biochem. J.*, v. 160, p. 433-437, 1976.
- KARPLUS, M.; McCAMMON, J. A. The internal dynamics of globular proteins. *CRC Crit. Ver. Biochem.* v. 9, p. 293-349, 1981.
- KAWA, K. Existence of calcium channels and intracellular couplings in the testosterone secreting cells of mouse. *J. Physiol.*, v. 393, p. 606-647, 1987.
- KAZACHENKO, V. N.; KOCHETKOV, K. V.; ASLANIDI, O.V.; GRINEVICH, A. A. Fractal properties of the ion channel gating mechanism: a fast Fourier transform study. *Biophysics*, v. 46, n. 6, p. 1010-1018, 2001.
- KOCHETKOV, K. V.; KAZACHENKO, V. N.; ASLANIDI, O. V.; CHEMERIS, N.K.; GAPEYEV, A.B. Non-markovian gating of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured kidney cell Vero. Range Analysis. *Journal of Biological Physics*, v. 25, p. 211-222, 1999.
- LIEBOVITCH, L. S. Interpretation of protein structure and dynamics from the statistics of open and closed times measured in a single ion-channel protein. *Journal Statistical Physiology*, v. 70, p. 329-337, 1993.
- LIEBOVITCH, L. S.; FISCHBARG, J.; KONIAREK, J. P. Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multitaste Markov processes. *Mathematical Biosciences*, v. 84, p. 37-68, 1987.
- LIEBOVITCH, L. S.; SCHEURLE, D. Two lessons from fractals and chaos. *Complexity*, v. 5, n. 4, p. 34-43, 2000.
- LIEBOVITCH, L. S.; SCHEURLE, D.; RUSEK, M.; ZOCHOWSKI, M. Fractal methods to analyze ion channel kinetics. *Methods*, v. 24, p. 359-375, 2001.
- MANDELBROT, B. B. **The Fractal Geometry of Nature**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1983.

- MANDELBROT, B. B.; WALLIS, J. R. Some long-run properties of geophysical records. *Water Resources Research*, v. 5, n. 2, p. 321-340, 1969.
- McCAMMON, J.; HARVEY, S. C. **Dynamics of proteins and nucleic acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- McMANUS, O. B.; BLATZ, A. L.; MAGLEBY, K. L. Inverse relationship of the durations of adjacent open and shut intervals for Cl^- and K^+ channels. *Nature*, v. 317, p. 325-332, 1985.
- NOGUEIRA, R. A. **Canais iônicos formados por colicina Ia em bicamadas lipídicas planas**. São Paulo, 1986. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade de São Paulo, 1986.
- NOGUEIRA, R. A.; VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S. Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 28, p. 491-496, 1995.
- PATTON, H. D.; FUCHS, F. A.; HILLE, B.; SCHER, A. M.; STEINER, R. **Textbook of Physiology**. 21 ed. London: W. B. Saunders, 1989. v.2.
- QIN, F.; AUERBACH, A.; SACHS, F. Estimating single-channel kinetic parameters from idealized patch clamp data containing missed events. *Biophys. J.* v. 70, p. 264-280, 1996.
- QIN, F.; AUERBACH, A.; SACHS, F. Maximum likelihood estimation of aggregated Markov processes. *Proc. R. Soc. B*, v. 264, p. 375-383, 1997.
- ROTHBERG, B. S.; MAGLEBY, K. L. Gating kinetics of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in high Ca^{2+} suggest a two-tiered allosteric mechanism. *J. Gen. Physiol.* v. 114, p. 93-124, jul. 1999.
- SAKMANN, B.; NEHER, E. **Single-Channel Recording**. 2 ed. New York: Plenum, 1995.
- VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S.; FIGUEIROA, J. N.; NOGUEIRA, R. A. Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. *J. Theor. Biol.*, v. 206, p. 243-353, 2000.
- WELCH, G. R. **The Fluctuating Enzyme**. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- WEST, B. J. **Fractal Fisiology and Chaos in Medicine – Studies of Nonlinear Phenomena in Life Science**. v. 1. Singapore: World Scientific, 1990.
- WOLFRAM, S. **Mathematica, A System for Doing Mathematics by Computer**. 2 ed. Reading: Addison-Wesley, 1993.
- YELLEN, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, v. 419, p. 35-42, 2002.

Apêndice 1

Programa para calcular o coeficiente H da análise R/S de Hurst

Análise de Hurst

Cálculo do coeficiente H de Hurst para detecção de memória (correlação de longo alcance)

Abrindo a lista no Mathematica

Protected[f] ---> values of f cannot be changed

```
tempo=TimeUsed[];
Clear[recepfile]
recepfile=ReadList["C:\Hurst\R01.txt",Number];

Clear[N1,lista]
N1=Length[recepfile];Print["N1(Tamanho da lista)=" ,N1]
lista=Table[x[n]=Part[recepfile,n],{n,1,N1}];
```

N1(Tamanho da lista)=4713

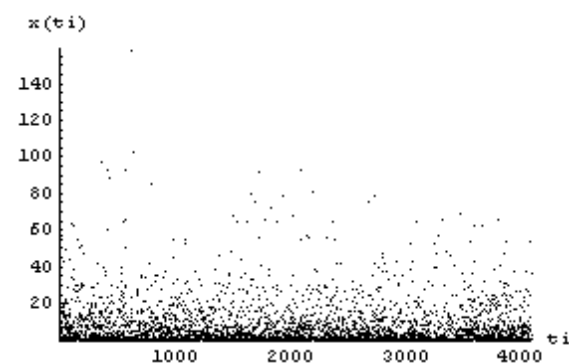
Utilizar apenas um conjunto de pontos que seja múltiplo de 2. Os pontos restantes serão descartados

```
Clear[mtdois, extwo]; mtdois = N[Log[10, N1] / Log[10, 2]];
If[FractionalPart[mtdois] != 1, extwo = Floor[mtdois], extwo = Ceiling[mtdois];];
N1 = 2^extwo; lista = Take[lista, N1];
Print["Pontos utilizados = ", N1];
```

Pontos utilizados = 4096

Construindo o grafico $x(t_i)$ versus t_i . Para não vê-lo: substitua "\$DisplayFunction" por "Identity"

```
ListPlot[lista,PlotStyle->PointSize[0.0075],
AxesOrigin->{1,Min[lista]},
PlotRange->{{1,N1+1},{Min[lista],Max[lista]}},
AxesLabel->{"t_i","x(t_i)"},PlotJoined->False,
DisplayFunction->$DisplayFunction];
```



Abertura do pacote estatístico

```
<< Statistics`DescriptiveStatistics`
```

Cálculo iterativo: o set de dados é continuamente dividido por dois em cada iteração para encontrar a média R/S até que o número de pontos em cada conjunto seja igual a dois. Esse valor pode ser editado alterando-se a comparação com "N2"

```

N2=N1;Nele=1;Datagraf={};
While[N2>=2,
Clear[Tabela,S1,Desvmed,Mda,SDM,xmax1,xmin1,Rtau1,RSHurst1,RSmed,NXP];
div=0;SRS=0;Dados=lista;
Ptx=N[N2/N1];
  While[Nele>div,Tabela=Table[x[n]=Take[Dados,N2]];
    S1=Table[x[n]=Apply[Plus,Tabela]];Mda=N[S1/N2];
    Stau=N[StandardDeviationMLE[Tabela]];
    Desvmed=Table[Tabela[[i]]-Mda,{i,1,N2}];
nn=2;SDM={First[Desvmed]};So=First[Desvmed];
While[nn<=N2,So=So+Desvmed[[nn]];SDM=Append[SDM,So];nn+=1;
];
  xmax1=Max[SDM];xmin1=Min[SDM];Rtau1=xmax1-xmin1;
  If[Stau!=0,RSHurst1=N[Rtau1/Stau]];
  div+=1;SRS+=RSHurst1;Dados=Drop[Dados,N2]
];
RSmed=N[SRS/div];NXP={Ptx,RSmed};Datagraf=Join[Datagraf,NXP];Nele=2Nele;
N2=N[N2/2]
]

```

Rearranjando os pontos para o gráfico de LogR/S versus LogAmostra e estabelecendo a equação da reta da regressão Log[10,y]-Log[10,x]

```

Datagraf = Partition[Datagraf, 2]; Reg = N[Log[10, Datagraf]];
Lin = Fit[Reg, {1, x}, x];
H = Coefficient[Lin, x]; b = Coefficient[Lin, x, 0];
dezelevado = b + H * Log[10, x]; y = 10 ^dezelevado;
Print["Coeficiente de Hurst=", H];

```

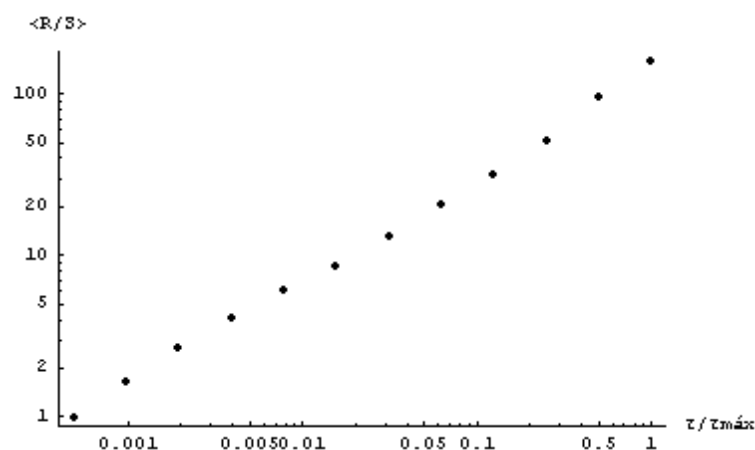
Coeficiente de Hurst=0.642911

Gráfico das médias de R/S em cada iteração

```

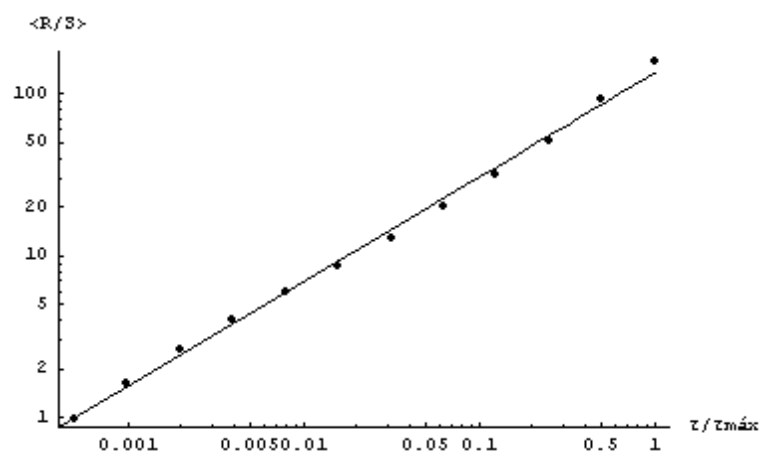
Needs["Graphics`Graphics`"]
G1=LogLogListPlot[Datagraf,PlotStyle->PointSize[0.015],
AxesLabel->{" $\tau/\tau_{\text{máx}}$ ", "<R/S>"},PlotJoined->False,
DisplayFunction->$DisplayFunction];

```



```
Rãprox = LogLogPlot[y, {x, 0.0001, 1}, DisplayFunction -> Identity];
```

```
Show[G1, %]
```



```
- Graphics -
```

Cálculo do tempo de execução

```
Clear[a, b]; a = TimeUsed[] - tempo; b = N[a / 60]; Print["Tempo em minutos=", b]
```

```
Tempo em minutos=0.118333
```

Salva valores de H em arquivo

```
H >>> Hs.txt
```

Apêndice 2

Programa para executar a aleatorização de uma sequência temporal

Aleatorização de Lista

Aleatorização de dados: fornece um arquivo.txt de 2't dados "aleatórios" que servirão como lista a ser analisada pelo programa do Método de Hurst para detecção de memória a longo prazo

Aqui abre a lista a ser "aleatorizada" e calcula o número de pontos

```
t1 = TimeUsed[];

Clear[faixadat]
faixadat = ReadList["C:\Hurst\R01.txt", Number];
Clear[Totn, conjunto]
Totn = Length[faixadat];
Print["Totn(tamanho do conjunto)=", Totn]
conjunto = Table[x[n] = Part[faixadat, n], {n, 1, Totn}];
```

Totn(tamanho do conjunto)=4713

Aqui gera a mesma tabela de números aleatórios com o mesmo número de pontos

```
SeedRandom[Totn]
Est = Table[x[t[i]] = Random[], {i, 1, Totn}];
```

Aqui salva a tabela a sera aleatorizada e ordena a tabela de números aleatórios em ordem decrescente

```
cjtfim = conjunto;
Tabestfim = Sort[Est, Greater];
```

Aqui orienta a colocação dos pontos na tabela aleatorizada de acordo com as mudanças de posição ocorridas na tabela de dados aleatórios

```
po = 1;
While[po ≤ Totn, cof = Tabestfim[[po]];
  fin = Position[Est, cof]; fin = fin[[1, 1]];
  cjtfim[[po]] = conjunto[[fin]];
  po += 1]
```

Aqui coloca os dados em forma de coluna em um arquivo de extensão txt que ficará em:
"C:\Arquivos de programas\Wolfram Research\Mathematica\4.0\cjtfim.txt"

```
cjtfim = ColumnForm[cjtfim];
cjtfim >> cjtfim.txt
```

Aqui calcula o tempo total gasto na execução dos cálculos

```
te2 = N[(TimeUsed[] - t1) / 60]; Print["Tempo de execução em minutos = ", te2];
```

Tempo de execução em minutos = 0.2975

Apêndice 3

Programa para extrair a seqüência de tempos de fechamento e abertura e calcular as frações de tempo de permanência de um registro de canal iônico

Extração dos tempos de permanência e cálculo das frações de tempos de permanência

Programa para extrair os tempos de fechamento e abertura de um registro de canal iônico

e calcular as frações de tempo de permanência

Entrar com o estado inicial do canal na variável **Estadoinicial**:

0 - estado fechado

1 - estado aberto

e com o arquivo a ser analisado no formato txt. A seqüência de tempos de fechamento será armazenada em Int_fechamento.txt e a seqüência de abertura estará em Int_abertura.txt. Os arquivos de tempo de permanência estarão no diretório de instalação do *Mathematica*:

"C:\Arquivos de programas\Wolfram Research\Mathematica\4.0\[Nome do arquivo].txt".

```
Estadoinicial=0;
Clear[recepfile]
recepfile=ReadList["C:\Hurst\F11.txt",Number];
Clear[N1,lista]
Ni=Length[recepfile];
Print["Número de intervalos do arquivo = ",Ni]
lista=Table[x[n]=Part[recepfile,n],
{n,1,Ni}];
```

Número de intervalos do arquivo = 4096

```
ind = 1; Grupo1 = {}; Grupo2 = {}; L1 = 0; Sp1 = 0; L2 = 0; Sp2 = 0;
tm1 = 0; tm2 = 0; frt1 = 0; frt2 = 0;
While[ind <= Ni, termo = lista[[ind]]; At = {termo};
  If[OddQ[ind], Grupo1 = Join[Grupo1, At]; L1 += 1; Sp1 = Sp1 + termo; ,
    Grupo2 = Join[Grupo2, At]; L2 += 1; Sp2 = Sp2 + termo]; ind += 1];
tm1 = N[Sp1 / L1]; tm2 = N[Sp2 / L2]; frt1 = N[tm1 / (tm1 + tm2)];
frt2 = N[tm2 / (tm1 + tm2)];
Grupo1 = ColumnForm[Grupo1]; Grupo2 = ColumnForm[Grupo2];
```

```

If[EstadoInicial < 1,
  Print["Soma fechamento = ", Sp1];
  Print["Número de intervalos de fechamento = ", L1];
  Print["Tempo médio de fechamento = ", tm1];
  Print["fração de tempo de fechamento = ", frt1];
Print["Soma abertura = ", Sp2];
  Print["Número de intervalos de abertura = ", L2];
  Print["Tempo médio de abertura = ", tm2];
  Print["fração de tempo de abertura = ", frt2];
Grupo1 >> Int_fechamento.txt; Grupo2 >> Int_abertura.txt;,
  Print["Soma fechamento = ", Sp2];
  Print["Número de intervalos de fechamento = ", L2];
  Print["Tempo médio de fechamento = ", tm2];
  Print["fração de tempo de fechamento = ", frt2];
Print["Soma abertura = ", Sp1];
  Print["Número de intervalos de abertura = ", L1];
  Print["Tempo médio de abertura = ", tm1];
  Print["fração de tempo de abertura = ", frt1];
Grupo1 >> Int_abertura.txt; Grupo2 >> Int_fechamento.txt;]

```

Soma fechamento = 64.554

Número de intervalos de fechamento = 2048

Tempo médio de fechamento = 0.0315205

fração de tempo de fechamento = 0.565955

Soma abertura = 49.5081

Número de intervalos de abertura = 2048

Tempo médio de abertura = 0.0241739

fração de tempo de abertura = 0.434045

Apêndice 4

Programa para calcular as taxas cinéticas de transição entre estados de um modelo Markoviano de três estados cinéticos

Cálculo das taxas cinéticas de um modelo Markoviano de três estados cinéticos

Programa para calcular as taxas cinéticas de um modelo Markoviano de 3 estados:



Entrar com valores dos parâmetros da exponencial de abertura (A_0 e t_0):

$$\left| A_0 e^{-x/t_0} \right|$$

e das exponenciais de fechamento (A_1, t_1, A_2 e t_2):

$$\left| A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2} \right|$$

```
A0 = 2.1726378;
t0 = 46.027;
A1 = 0.13585505;
t1 = 6.637;
A2 = 0.00057369;
t2 = 171.4;
```

Calcula as taxas cinéticas de transição entre os estados (Colquhoun & Hawkes, 1981).

```
Clear[alfa, bt, K23, K12, K21, K32, b, c, h, m];
K32 = N[1/t0]; Print["K32 = ", K32];
alfa = N[1/t1]; bt = N[1/t2];
If[A1 < A2, h = bt; bt = alfa; alfa = h; m = A2; A2 = A1; A1 = m; ];
Print["alfa = ", alfa]; Print["beta = ", bt];
Print[Solve[{alfa == 0.5 * (b + (b^2 - 4 * c) ^ 0.5),
  bt == 0.5 * (b - (b^2 - 4 * c) ^ 0.5),
  A1 == K23 * ((K12 - alfa) / (bt - alfa)),
  A2 == K23 * ((bt - K12) / (bt - alfa)),
  b == K23 + K12 + K21}, {b, c, K23, K12, K21}]];
```

```
K32 = 0.0217264
```

```
alfa = 0.15067
```

```
beta = 0.00583431
```

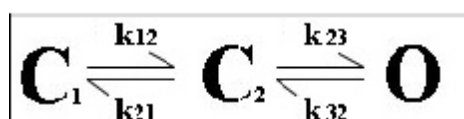
```
{{c -> 0.000879058, K21 -> 0.0136327, K12 -> 0.00644335, b -> 0.156505, K23 -> 0.136429}}
```

Apêndice 5

Programa para calcular os parâmetros das exponenciais de abertura e de fechamento de um modelo Markoviano de três estados cinéticos

Cálculo dos parâmetros das exponenciais de abertura e fechamento de um modelo Markoviano de três estados cinéticos

Programa para calcular os parâmetros ajustáveis das exponenciais de um modelo Markoviano de 3 estados:



Entrar com valores das taxas cinéticas (K12, K21, K23 e K32) de transição entre os estados:

```
K12 = 0.0064308;
K21 = 0.013787;
K23 = 0.13685;
K32 = 0.021256;
```

Calcula os parâmetros ajustáveis da exponencial de abertura (A0 e t0):

$$\left| A_0 e^{-x/t_0} \right|$$

e das exponenciais de fechamento (A1, t1, A2 e t2):

$$\left| A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2} \right|$$

```
Clear[c, b, alf, bet, A0, t0, A1, t1, A2, t2];
c = K12 * K23;
b = K12 + K21 + K23;
alf = N[(0.5 * (b + ((b ^ 2) - 4 * c) ^ 0.5))];
bet = N[(0.5 * (b - ((b ^ 2) - 4 * c) ^ 0.5))];
t0 = N[1/K32]; t1 = N[1/alf]; t2 = N[1/bet];
A0 = N[1/t0];
A1 = N[K23 * ((K12 - alf) / (bet - alf))];
A2 = N[K23 * ((bet - K12) / (bet - alf))];
Print["A0 = ", A0]; Print["t0 = ", t0];
Print["alfa = ", alf]; Print["beta = ", bet];
Print["A1 = ", A1]; Print["t1 = ", t1];
Print["A2 = ", A2]; Print["t2 = ", t2];
```

```
A0 = 0.021256
```

```
t0 = 47.0455
```

```
alfa = 0.151249
```

```
beta = 0.00581858
```

```
A1 = 0.136274
```

```
t1 = 6.6116
```

```
A2 = 0.000576103
```

```
t2 = 171.863
```

Apêndice 6

Programa para gerar uma seqüência fractal de tempos de abertura e fechamento de um canal iônico de dois estados

Geração de dados do modelo fractal

Simulação de tempos de abertura e fechamento em um canal fractal de dois estados

Des-dimensão fractal do fechamento Asi-setpoint cinético do fechamento

Dabt-dimensão fractal da abertura Abe-setpoint cinético da abertura Nr=número total de dados a serem gerados

Pff-probabilidade de permanecer no estado fechado Pfa-probabilidade de passar para o estado aberto

Pabab-probabilidade de permanecer no estado aberto Pabfec-probabilidade de passar para o estado fechado

Grafrac-tabela com a seqüência fractal $1 \leq D < 2$ (Liebovitch et al. (1987))

```
tp = TimeUsed[];
```

```
Des = 1.4561; Asi = 4.9094; Dabt = 1.4018; Abe = 7.3193; Nr = 4096;
```

Aqui calcula os tempos médios teóricos de fechamento e abertura (Liebovitch et al.,1987) , úteis na escolha de deltat: deltat não pode ser maior que o tempo médio teórico

```
fun = Asi * x * (x ^ (1 - Des)) * Exp[-(Asi / (2 - Des)) * x ^ (2 - Des)];
```

```
tfec = N[Integrate[fun, {x, 0, Infinity}]];
```

```
Print["Tempo médio teórico de fechamento = ", tfec];
```

```
Tempo médio teórico de fechamento = 0.0303281
```

```
fcab = Abe * x * (x ^ (1 - Dabt)) * Exp[-(Abe / (2 - Dabt)) * x ^ (2 - Dabt)];
```

```
taberto = N[Integrate[fcab, {x, 0, Infinity}]];
```

```
Print["Tempo médio teórico de abertura = ", taberto];
```

```
Tempo médio teórico de abertura = 0.0229593
```

Canal inicialmente no estado fechado

```
tes = 0.00005;
```

```
K12 = Asi * tes ^ (1 - Des)
```

```
K21 = Abe * tes ^ (1 - Dabt)
```

```
449.498
```

```
391.402
```

Probabilidade inicial do canal permanecer no estado fechado e a de passar para o estado aberto. Deltat=tes. tes em segundos. Deltat têm o valor típico de 5 ms (Liebovitch et al.,1987) . Deltat deve ser escolhido de forma que $k_0 \text{ vezes tes} \ll 1$; $k_0 \text{ vezes tes} \ll 1$.

```
Pfa = K12 * tes;
```

```
Pff = 1 - Pfa;
```

```
Print["p11 = ", Pff]; Print["p12 = ", Pfa];
```

```
p11 = 0.977525
```

```
p12 = 0.0224749
```

Cálculo da probabilidade inicial de permanecer no estado aberto ou de passar para o estado fechado

```
Pabfec = K21 * tes;
Pabab = 1 - Pabfec;
Print["p22 = ", Pabfec];
Print["p21 = ", Pabab];
```

```
p22 = 0.0195701
```

```
p21 = 0.98043
```

Admitir o canal inicialmente no estado fechado. Abrir uma tabela para dados fechamento-abertura e calcular as probabilidades iniciais do canal permanecer fechado e aberto.

As probabilidades mudam à medida que o tempo varia durante cada estado.

pospt-índice da tabela comp-probabilidade do estado atual prcp-flag que indica em que estado se está: 0 para fechado e 1 para aberto
pfechori-probabilidade de permanecer no estado fechado para t=tes pabeori-probabilidade de permanecer no estado aberto para t=tes

```
Grafrac = {}; ultit = tes;
Tf = 0; comp = Pff; prcp = 0; pfechori = Pff; pabeori = Pabab;
```

```
While[Tf < Nr, xis = Random[];
  If[xis > comp,
    If[prcp ≠ 0, Pff = pfechori; comp = Pff; prcp = 0,
      Pabab = pabeori; comp = Pabab; prcp = 1];
    Grafrac = Join[Grafrac, {ultit}];
    Tf += 1; ultit = tes;
    ultit = ultit + tes;
    If[prcp ≠ 0, Pabab = 1 - tes * Abe * ultit ^ (1 - Daht);
      comp = Pabab;
      Pff = 1 - tes * Asi * ultit ^ (1 - Des); comp = Pff];
  ];
]
```

```
Soma = Apply[Plus, Grafrac]; Print["Tempo total em segundos = ", Soma];
```

```
Tempo total em segundos = 107.385
```

Aqui encontra os tempos experimentais médios de fechamento e abertura

```
im = 1; pp = 2; Somaim = 0; Spar = 0;
While[pp ≤ Nr, Somaim = Somaim + Grafrac[[im]]; im += 2; Spar = Spar + Grafrac[[pp]]; pp += 2];
Clear[Sf, Sa]; Sf = Somaim * 2 / Nr; Sa = Spar * 2 / Nr;
Print["Tempo médio experimental de fechamento = ", Sf];
Print["Tempo médio experimental de abertura = ", Sa];
```

```
Tempo médio experimental de fechamento = 0.0289368
```

```
Tempo médio experimental de abertura = 0.0234975
```

Aqui armazena os dados em arquivo de formato texto que ficará em "C:\Arquivos de programas\Wolfram Research\Mathematica\W4.0\Nome do arquivo.txt"

```
Grafrac = ColumnForm[Grafrac]; Grafrac >> F1.txt
```

```
tfim = TimeUsed[] - tp; Tseg = N[tfim / 60];
Print["Tempo de execução em minutos = ", Tseg];
```

```
Tempo de execução em minutos = 1.26983
```

Apêndice 7

Programa para gerar a visualização de uma seqüência de tempos de abertura e fechamento

Registro do canal iônico

Visualização do registro de pontos na seqüência fechamento-abertura

Aqui entrar com o caminho do arquivo em lista a ser aberto e com o tempo inicial através da variável "Tempo inicial": 0 - fechamento, 1 - abertura. Só será considerado um número múltiplo de 4 dos tempos de fechamento e abertura.

```
Clear[Tempoinicial];Tempoinicial=0;
Clear[recepfile]
recepfile=ReadList["C:\\Hurst\\F1.txt",Number];
```

```
Clear[Nr,Registro,Rdv4]
Nr=Length[recepfile];
Print["Nr(Tamanho da lista)=",Nr]
Registro=Table[x[n]=Part[recepfile,n],
{n,1,Nr}];
If[OddQ[Nr],Registro=Delete[Registro,-1];Nr=Nr-1];
Rdv4=N[Nr/4];If[FractionalPart[Rdv4]!=0,
Registro=Delete[Registro,-2];Nr=Nr-2];
Print["Nr(Tamanho utilizado)=",Nr];
```

```
Nr(Tamanho da lista)=4096
```

```
Nr(Tamanho utilizado)=4096
```

```
nn = 2; Sotem = {First[Registro]}; S = First[Registro];
While[nn ≤ Nr, S = S + Registro[[nn]]; Sotem = Append[Sotem, S]; nn += 1;];

Nfim = N[2 * Nr]; ultipt = Last[Sotem]; jj = 1; hh = 2;
While[jj ≤ Nfim, pt = Sotem[[jj]]; Sotem = Insert[Sotem, pt, hh]; jj += 2; hh += 2;];
pp = 2; Tempos = Sotem; passo = N[2 * Nr]; inc = 0;
While[inc < passo,
  If[Tempoinicial ≠ 1,
    Tempos = Insert[Tempos, 0, pp]; pp += 2; Tempos = Insert[Tempos, 1, pp]; pp += 2;
    Tempos = Insert[Tempos, 1, pp]; pp += 2; Tempos = Insert[Tempos, 0, pp]; pp += 2; ,
    Tempos = Insert[Tempos, 1, pp]; pp += 2; Tempos = Insert[Tempos, 0, pp]; pp += 2;
  Tempos = Insert[Tempos, 0, pp]; pp += 2; Tempos = Insert[Tempos, 1, pp]; pp += 2;];
  inc += 4;];

If[Tempoinicial ≠ 1, Tempos = Insert[Tempos, 0, 1]; Tempos = Insert[Tempos, 0, 1]; ,
  Tempos = Insert[Tempos, 1, 1]; Tempos = Insert[Tempos, 0, 1];];
Tempos = Partition[Tempos, 2];
```

Aqui configurar o passo de visualização dos dados em cada gráfico. Dois cliques rápidos sobre o primeiro gráfico gerado irá simular o registro em uma animação

```
eix = 0; faixa = 1.75;
```

```
While[eix <= ultipt,
```

```
ListPlot[Tempos, PlotStyle → PointSize[0.0075], AxesOrigin → {eix, 0},
```

```
PlotRange → {{eix, eix + faixa}, {0, 5}}, AxesLabel → {"seg", "Estado"},
```

```
PlotJoined → True, DisplayFunction → $DisplayFunction]; eix += faixa;]
```

