

MODELAGEM MATEMÁTICA DE MECANISMOS DE ELETRODIFUSÃO E
RECUPERAÇÃO DOS GRADIENTES IÔNICOS DURANTE O FENÔMENO DA
DEPRESSÃO ALASTRANTE

Hewerson Zansávio Teixeira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Aprovado por:

Prof. Antonio Fernando Catelli Infantosi, Ph.D.

Prof. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, D. Sc.

Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes, D. Sc.

Prof. André Fabio Kohn, Ph. D.

Prof. Rodrigo Weber dos Santos, D. Sc.

Prof. Jurandir Nadal, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2005

TEIXEIRA, HEWERSON ZANSÁVIO

Modelagem Matemática de
Mecanismos de Eletrodifusão e
Recuperação dos Gradientes Iônicos
durante o Fenômeno da Depressão
Alastrante [Rio de Janeiro] 2005

XII, 137 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D. Sc., Engenharia Biomédica, 2005)

Tese – Universidade Federal do Rio
de Janeiro, COPPE

1. Modelagem de Fenômenos Biológicos

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*À minha mãe, Mercês, pelas incansáveis
demonstrações de amor e preocupação nas
horas mais difíceis.*

*E à minha querida Renata, pela paciência e
compreensão.*

Agradecimentos

Ao Professor Antonio-Carlos Guimarães de Almeida, muito mais do que um orientador, um amigo de coração e um exemplo a ser seguido.

Ao professor Antonio Fernando Catelli Infantosi, pelos ensinamentos e, principalmente, amizade.

Aos amigos do LANECS, em particular, Prof. Mário Antônio Duarte, Prof. João Domingos Scalon, Celso Arcanjo da Silva, Simone Raquel do Nascimento, Antônio Márcio Rodrigues e Rodrigo Seixas de Carvalho, pela amizade e por terem proporcionado um ambiente saudável e alegre.

À Dona Helena, pelo carinho inestimável com que trata a todos nesse laboratório.

Aos amigos do Programa de Engenharia Biomédica da COPPE/UFRJ que, de alguma forma, ajudaram-me neste trabalho.

Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho para Minas Gerais e Centro Oeste (CENAPAD-MG/CO), pelo suporte computacional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à CAPES, pelo imprescindível suporte financeiro.

...e agradeço a Deus, sempre presente em todos os momentos de minha vida.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D. Sc.)

MODELAGEM MATEMÁTICA DE MECANISMOS DE ELETRODIFUSÃO E
RECUPERAÇÃO DOS GRADIENTES IÔNICOS DURANTE O FENÔMENO DA
DEPRESSÃO ALASTRANTE

Hewerson Zansávio Teixeira

Junho/2005

Orientadores: Antonio Fernando Catelli Infantosi
Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Programa: Engenharia Biomédica

A Depressão Alastrante de Leão (DA) é descrita como uma supressão da atividade elétrica cerebral que se propaga em onda, a partir do ponto de estímulo, para regiões adjacentes do córtex cerebral. Durante esse processo, ocorrem intensas trocas iônicas entre os meios intracelulares neuronais e gliais e o meio extracelular. Os mecanismos de restabelecimento iônico exercem uma função importante durante o fenômeno da DA, sendo responsáveis pela recuperação e manutenção dos gradientes iônicos, essenciais para as funções celulares. Para estudar a atuação desses mecanismos na propagação da DA, foram implementados modelos computacionais, a partir da descrição matemática de cada um deles, e incorporados a uma rede de compartimentos intra- e extracelulares representativos de tecidos neuronais. Os mecanismos considerados no modelo foram as bombas de sódio e potássio, bombas de cálcio, mecanismos de co-transporte e canais retificadores de potássio. As simulações computacionais de experimentos com retina de ave mostraram o envolvimento desses mecanismos com o período refratário da DA, a velocidade de propagação da onda, as variações iônicas intra- e extracelulares e, ainda, a relação dessas alterações com o sinal óptico intrínseco.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.)

MATHEMATICAL MODELING OF THE ELECTRODIFFUSION AND IONIC
GRADIENT RECOVERY MECHANISMS DURING THE SPREADING
DEPRESSION PHENOMENON

Hewerson Zansávio Teixeira

June/2005

Advisors: Antonio Fernando Catelli Infantosi
Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Department: Biomedical Engineering

The Leão's Spreading Depression (SD) is described as a suppression of the cerebral electric activity that spreads in waveform starting from the point of stimulus to adjacent regions of the cerebral cortex. During this process, intense ionic changes occur between the extra- and intracellular spaces of neurons and glia. The ionic balance mechanisms play an important role during the phenomenon of SD as they are responsible for the recovery and maintenance of the ionic gradients that are fundamental for the appropriate operation of the cellular functions. To study the performance of these mechanisms on the SD propagation, it was implemented computational models, through the mathematical description of each one, and incorporated on a net of intra- and extracellular compartments that represent neuronal tissues. The mechanisms considered in the model were sodium and potassium pumps, calcium pumps, co-transport mechanisms and rectifying channels. The computational simulations of experiments with chick retina showed the involvement of these mechanisms in the refractory period of SD, the velocity of propagation, the intra- and extracellular ionic variations and the relation of these alterations with the intrinsic optical signal.

SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução.....	1
<i>I.1 – Objetivo.....</i>	<i>3</i>
<i>I.2 – Sumário da contribuição e estrutura do trabalho.....</i>	<i>4</i>
Capítulo II – A Depressão Alastrante.....	7
Capítulo III – Modelos para a Propagação de Ondas de Depressão Alastrante.....	17
<i>III.1 – Modelo de Hodgkin-Grafstein.....</i>	<i>17</i>
<i>III.2 – Modelo de automatas celulares.....</i>	<i>18</i>
<i>III.3 – Modelo de Tuckwell.....</i>	<i>19</i>
<i>III.4 – Modelo fisiopatológico.....</i>	<i>23</i>
<i>III.5 – Modelo para correntes iônicas durante a DA.....</i>	<i>24</i>
<i>III.6 – Modelo de DA envolvendo a atuação de gap-junctions e de forças osmóticas.....</i>	<i>29</i>
<i>III.7 – Modelo de eletrodifusão extracelular e terminais sinápticos para DA.....</i>	<i>32</i>
Capítulo IV – Descrição da estrutura do modelo de DA.....	38
<i>IV.1 – Deflagração da onda de DA.....</i>	<i>43</i>
<i>IV.2 – Recursos computacionais.....</i>	<i>44</i>
Capítulo V – Mecanismos de Bombeamento Iônico.....	45
<i>V.1 – Bomba de sódio e potássio.....</i>	<i>45</i>
<i>V.2 – Bomba de Cálcio.....</i>	<i>48</i>
<i>V.3 – Implementação da bomba de sódio e potássio.....</i>	<i>49</i>
<i>V.4 – Implementação da bomba de cálcio.....</i>	<i>54</i>
<i>V.5 – Atuação da bomba de sódio e potássio e da bomba de cálcio durante a DA.....</i>	<i>54</i>
Capítulo VI – Mecanismos de Co-Transporte Cátion-Cloreto.....	59
<i>VI.1 – Co-transporte Na-Cl (NCC).....</i>	<i>60</i>
<i>VI.2 – Co-transporte K-Cl (KCC).....</i>	<i>60</i>
<i>VI.3 – Co-transporte Na-K-2Cl (NKCC).....</i>	<i>62</i>
<i>VI.4 – Implementação dos mecanismos de co-transporte.....</i>	<i>63</i>
<i>VI.5 – Atuação dos mecanismos de co-transporte durante a DA.....</i>	<i>67</i>
Capítulo VII – Canais Retificadores de Entrada de Potássio.....	70
<i>VII.1 – Implementação dos canais retificadores de potássio.....</i>	<i>73</i>
<i>VII.2 – Atuação do canal retificador de entrada de potássio durante a DA.....</i>	<i>74</i>
Capítulo VIII – Transmissão sináptica.....	77
<i>VIII.1 – Implementação do mecanismo de transmissão sináptica.....</i>	<i>83</i>
<i>VIII.2 – Atuação do mecanismo de transmissão sináptica durante a DA.....</i>	<i>89</i>

Capítulo IX – Simulações a partir do Modelo Matemático	92
<i>IX.1 – Simulação do tecido neuronal em condições de repouso e de propagação da onda de DA</i>	<i>92</i>
<i>IX.2 – Importância do mecanismo de difusão de neurotransmissores</i>	<i>96</i>
<i>IX.3 – Simulação do sinal óptico da onda de DA na retina.....</i>	<i>98</i>
<i>IX.4 – Simulação da onda de DA durante o período refratário</i>	<i>103</i>
Capítulo X – Medidas Experimentais	106
<i>X.1 – Procedimentos</i>	<i>106</i>
<i>X.2 – Estimando a velocidade de propagação.....</i>	<i>108</i>
<i>X.3 – Estimando o comprimento longitudinal da onda de DA</i>	<i>110</i>
<i>X.4 – Relação entre a velocidade e o comprimento longitudinal da frente de onda</i>	<i>113</i>
Capítulo XI – Conclusão	119
Anexo – Trabalhos publicados no período	121
Referências Bibliográficas	122

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
α	Fração de volume (0,2)
α_{ml}	Taxa de transferência do meio intra- para extracelular de Ca^{2+}
α_{hl}	Taxa de transferência do meio intra- para extracelular de Ca^{2+}
β_{ml}	Taxa de transferência do meio extra- para intracelular de Ca^{2+}
β_{hl}	Taxa de transferência do meio extra- para intracelular de Ca^{2+}
Δt	Passo de iteração (2×10^{-2} s)
$\Delta x, \Delta y, \Delta z$	Distância entre compartimentos ou tamanho da aresta (10,5 μm)
ϕ_C	Fluxo iônico do íon C através dos canais (mM/s)
ϕ_C^P	Fluxo iônico do íon C devido aos mecanismos de bombeamento (mM/s)
ϕ_C^*	Fluxo iônico do íon C de regime permanente dos mecanismos de bombeamento (mM/s)
λ	Tortuosidade do meio extracelular (1,6)
$\bar{\nabla}$	Operador Gradiente
∇^2	Operador Laplaciano
c	Fator de escala do canal retificador (0,1)
C	Concentração iônica (mM)
D_C	Constante de difusão iônica do íon C ou do neurotransmissor (10^{-5} cm^2/s): $D_{Na} = 1,33, D_K = 1,96, D_{Cl} = 2,03, D_{Ca} = 0,79, D_{To} = 3,64$
E	Enzima de degradação de neurotransmissores

Símbolo	Descrição
ER	Enzima de reabsorção de neurotransmissores
F	Constante de Faraday (96,487 C/mMol)
f_C	Fator de multiplicação da bomba para o íon C (mM/s): $f_{Na} = 6,0, f_K = -15,0, f_{Cl} = 5,2, f_{Ca} = 0,26$
g	Subscrito que referencia o meio intracelular glial
G	Condutância iônica (Ω^{-1})
h_I	Fator de inativação do canal de Ca^{2+}
i	Subscrito que referencia o meio intracelular
\bar{I}_C	Corrente iônica relativa ao íon C (mA)
J	Densidade de corrente (mA/cm ²)
Kd	Constante de dissociação iônica
m_I	Fator de ativação do canal de Ca^{2+}
N_{slope}	Constante de Nernst, onde $N_{slope} = (R \cdot T) / (z_K \cdot F)$ (mV)
o	Subscrito que referencia o meio extracelular
P_C	Permeabilidade do íon C (cm/s)
p_c	Constante de permeabilidade iônica: nos terminais sinápticos: $p_{Na} = 3,1, p_K = 66,7, p_{Cl} = 4,28, p_{Ca} = 0,16, p_A = 200,0, p_{CA} = 1,0$; nas glias: $p_{Na} = 0,04, p_K = 6 \times 10^{-3}, p_{Cl} = 0,275, p_{Ca} = 1,17 \times 10^{-8}, p_A = 30,0, p_{CA} = 5,0 \times 10^{-4}$
p_g	Constante que determina a variação da permeabilidade de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico ($0,11 \text{ mV}^{-1}$) no modelo de TUCKWELL e MIURA (1978)
Pi	Fósforo inorgânico

Símbolo	Descrição
p_o	Constante que determina a variação da permeabilidade de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico (0,039 cm/s) no modelo proposto.
pos	Subscrito que referencia o meio intracelular do terminal pós-sináptico
pre	Subscrito que referencia o meio intracelular do terminal pré-sináptico
Q_{KCC}	Constante de proporcionalidade do co-transporte KCC (200,0)
Q_{NKCC}	Constante de proporcionalidade do co-transporte NKCC (-40,0)
R	Constante universal dos gases (8,314 mV·C / (K·mMol))
r_C	Constante de tempo da bomba para o íon C (mM^{-1}): $r_{Na} = r_K = r_{Cl} = 10,0$, $r_{Ca} = 40,0$
S^R	medida da taxa na qual a condutância do canal retificador altera com o potencial de membrana (33,34 mV)
SR	Sítios receptores de canais pós-sinápticos
T	Temperatura (310 K)
t	Tempo (s)
[T]	Concentração de neurotransmissores
T_oE	Neurotransmissor ligado à enzima de degradação
T_oEER	Neurotransmissor ligado à enzima de reabsorção
T_oSR	Neurotransmissores ligados a sítios receptores
T_v	Neurotransmissor armazenado em vesículas sinápticas
V	Potencial elétrico (mV)
V_C	Potencial de Nernst do íon C (mV)

Símbolo	Descrição
V_g	Constante que determina a variação da permeabilidade de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico (45,0 mV)
V_h^R	Potencial elétrico na qual a condutância do canal retificador é metade do valor máximo (-14,21 mV)
V_m	Potencial transmembrânico (mV)
y	Distribuição Gaussiana de $[\text{K}^+]_o$ (mM)
z_C	Valência do íon C : $z_{\text{Na}} = 1$, $z_{\text{K}} = 1$, $z_{\text{Cl}} = -1$, $z_{\text{Ca}} = 2$

Capítulo I – Introdução

A modelagem é considerada uma etapa essencial no conhecimento científico e um meio para deduzir o comportamento futuro e desconhecido de um sistema. No caso dos sistemas biológicos, a complexidade das descrições é um fator que limita o desenvolvimento de modelos. Atualmente, as possibilidades oferecidas pelos computadores têm aberto novas perspectivas. A manipulação de modelos complexos tem se tornado mais fácil, proporcionando o desenvolvimento de investigações mais profundas e detalhadas em modelos matemáticos. Soma-se a isso o fato de que os computadores oferecem a possibilidade de se acessar grandes quantidades de dados, o que, há um tempo atrás, seria inconcebível (NEWTON, 1984).

Na Neurociência, o uso de modelos para elucidar mecanismos neuronais tem se expandido consideravelmente nas últimas décadas. Neurofisiologistas teóricos têm se utilizado de inúmeras técnicas para estudar análogos realísticos de membrana, ações neuronais individuais e em rede. Questões não acessíveis experimentalmente puderam ser elucidadas justamente com a aplicação da modelagem neuronal.

Um exemplo de aplicação de modelos é o estudo da Depressão Alastrante (DA), fenômeno cerebral que foi descoberto pelo cientista brasileiro, Dr. Aristides Azevedo Pacheco Leão (LEÃO, 1944a), em estudos dos efeitos da estimulação elétrica local sobre as oscilações elétricas espontâneas do córtex cerebral em coelhos anestesiados. Vários modelos matemáticos para propagação de ondas em meios excitáveis, como a DA, tem sido desenvolvidos objetivando uma compreensão mais genérica da dinâmica deste tipo de sistema (YAN, 1995; BARKLEY, 1991; PLESSER e MULLER, 1995; FAST e EFIMOV, 1991; DELLNITZ *et al.*, 1995).

A primeira tentativa de se modelar a DA é atribuída a Hodgkin. O modelo era baseado numa proposição de GRAFSTEIN (1956) de que a liberação de K^+ , originada da despolarização de membranas, em um meio extracelular restrito resultaria em um movimento de K^+ por difusão que, por sua vez, produziria uma despolarização das membranas vizinhas e sustentaria a propagação. Como o modelo não foi publicado, posteriormente, GRAFSTEIN (1963) incorporou as derivações de Hodgkin para um modelo de DA, em termos de um sistema de reação-difusão. Seguindo esta idéia, TUCKWELL e MIURA (1978) desenvolveram um modelo mais elaborado, baseado em

um sistema de reação-difusão para a DA que considera as concentrações extra- e intracelulares de K^+ (principal responsável pela despolarização das membranas) e de Ca^{2+} (responsável pela ativação da liberação de neurotransmissores nos terminais de sinápticos). Posteriormente, TUCKWELL e HERMANSEN (1981) publicaram uma extensão do modelo incluindo os ions de Na^+ e Cl^- . Durante praticamente toda a década de 80, não se registrou qualquer publicação de modelos de DA. No entanto, o avanço dos recursos computacionais possibilitou a implementação de modelos mais detalhados a partir de meados da década de 90, enfocando dois aspectos principais: o fisiopatológico (REGGIA e MONTGOMERY, 1994 e 1996; REVETT *et al.*, 1998, RUPPIN *et al.*, 1999, RUPPIN e REGGIA, 2001) e os mecanismos celulares (KAGER *et al.*, 2000 e 2002, SHAPIRO, 2001, ALMEIDA *et al.*, 2004). No primeiro aspecto, os modelos foram implementados segundo dois princípios: incorporação dos supostos processos fisiopatológicos da onda de DA na progressão de lesões e a modelagem das características básicas da DA em tecidos isquemizados. No segundo aspecto, as simulações têm uma contribuição mais precisa. KAGER *et al.* (2000), modelando correntes iônicas contínuas em um único neurônio subjacente a uma atividade epiléptica e a DA, apontam um possível gerador do comportamento neuronal epileptiforme e da despolarização de DA: a realimentação de correntes iônicas que alteram as concentrações de ions, responsável pela modulação das correntes iônicas e potenciais transmembrânicos. SHAPIRO (2001), por sua vez, apresenta um modelo que incorpora os efeitos das *gap-junctions*, os gradientes de potencial citoplasmáticos e as alterações do volume e da osmolaridade. Esse modelo é baseado na proposição de SOMJEN *et al.* (1992) de que a DA se propaga com a abertura inicial das *gap-junctions*. ALMEIDA *et al.* (2004), dando ênfase à descrição do espaço extracelular por meio de equações de eletrodifusão, onde os ions estão acoplados pelo campo elétrico, apresentam um modelo tridimensional de terminais sinápticos para a DA que foi capaz de simular pela primeira vez a propagação negativa do potencial extracelular.

O modelo proposto no presente trabalho permite verificar a dinâmica das concentrações e dos potenciais extracelular e transmembrânicos nos terminais sinápticos e nas glias durante a onda de DA. As descrições de mecanismos de recuperação iônica, como bombas Na,K -ATPase, bombas Ca -ATPase, mecanismos de co-transporte e canais retificadores de entrada de K^+ , permitem a simulação de manobras experimentais e a verificação de seus efeitos sobre as movimentações iônicas.

Os mecanismos de restabelecimento iônico exercem uma função importante durante o fenômeno da DA. Esses mecanismos são responsáveis pela recuperação e manutenção dos gradientes iônicos, que são fundamentais para o correto funcionamento das funções celulares. Dentre os mecanismos, destaca-se a atuação das bombas de Na,K-ATPase e da Ca-ATPase. A Na,K-ATPase é responsável pela manutenção dos gradientes iônicos de Na^+ e K^+ entre os meios intra- e extracelulares, importante para a geração e propagação de potenciais de ação (GLITSCH, 2001). Essa bomba foi modelada como um canal iônico. Esse comportamento foi verificado por ARTIGAS e GADSBY (2002) por meio da aplicação da toxina marinha palitoxina, que interage com a bomba transformando-a em um canal iônico. Uma bomba de cálcio foi modelada nos mesmos moldes da bomba Na,K-ATPase. Conforme verificado por FILOTEO *et al.* (1997), essa bomba atua removendo o excesso de Ca^{2+} do interior de neurônios.

A atuação da bomba Na,K-ATPase é importante para o correto funcionamento dos co-transportes cátion-dependentes que promovem a regulação da concentração neuronal do Cl^- (PAYNE *et al.*, 2003). Esse transporte é eletroneuro apesar de operar contra os gradientes de concentração. No co-transporte K-Cl (KCC), o Cl^- co-transportado é trocado pelo K^+ , bombeado pela bomba de Na,K-ATPase (TAS, 1987). No co-transporte Na-K-2Cl, o influxo iônico é mantido pelo Na^+ acumulado no meio extracelular pela bomba Na,K-ATPase (PAYNE *et al.*, 2003).

Os canais retificadores, identificados por KATZ (1949), estão presentes nas membranas gliais e atuam retirando o excesso de K^+ do meio extracelular (NEWMAN, 1993) durante a DA. Esse K^+ é armazenado nas gliais, mesmo contra o gradiente de concentração. A atuação desses canais favorece o mecanismo de *spatial buffering* glial, importante durante a fase de recuperação da DA.

1.1 – Objetivo

O objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo matemático para simulação computacional das dinâmicas intracelulares (neurais e gliais), durante a DA, a partir de modelos matemáticos de terminais dendríticos neurais e processos gliais incorporados com mecanismos de eletrodifusão e recuperação dos gradientes iônicos transmembrânicos. A simulação das dinâmicas iônicas intra- e extracelulares deverá permitir a reprodução das características principais da onda de DA: o deslocamento

espacial da variação negativa do potencial extracelular, o sinal óptico intrínseco e o período refratário.

1.2 – Sumário da contribuição e estrutura do trabalho

Em trabalhos anteriores (TEIXEIRA, 2000, TEIXEIRA *et al.*, 2001, TEIXEIRA *et al.*, 2002, ALMEIDA *et al.*, 2004), a descrição compartimentalizada do meio extracelular consistiu na modelagem das dinâmicas iônicas por meio de mecanismos de eletrodifusão. O duplo acoplamento entre as espécies iônicas por meio de gradientes de concentração e de potencial permitiu a simulação do potencial extracelular. Na descrição dos compartimentos representativos dos terminais pré- e pós-sinápticos, as correntes através dos canais iônicos foram simuladas a partir da modulação das permeabilidades iônicas pós-sinápticas pelos neurotransmissores em função do influxo de Ca^{2+} pré-sináptico. Para a recuperação dos gradientes iônicos, um único mecanismo de bombeamento foi implementado para cada espécie iônica (blocos em branco do diagrama da Figura 1.1), representando a atuação conjunta dos diversos mecanismos específicos.

No trabalho atual, os mecanismos de recuperação dos gradientes iônicos constaram da bomba Na,K-ATPase, da bomba Ca-ATPase, dos mecanismos de co-transporte KCC e, ainda, dos compartimentos gliais, incluídos com a representação do co-transporte NKCC e dos canais retificadores de entrada de K^+ (blocos em cinza no diagrama da Figura 1.1). Além disso, foram implementados os protocolos para as medidas experimentais e os programas para análise da velocidade de propagação da onda de DA, além da reconstrução do sinal óptico. Por último, foi incorporado o modelo de transmissão sináptica, desenvolvido a partir de reações químicas representativas dos processos elementares da transmissão sináptica, dependentes do influxo de Ca^{2+} .

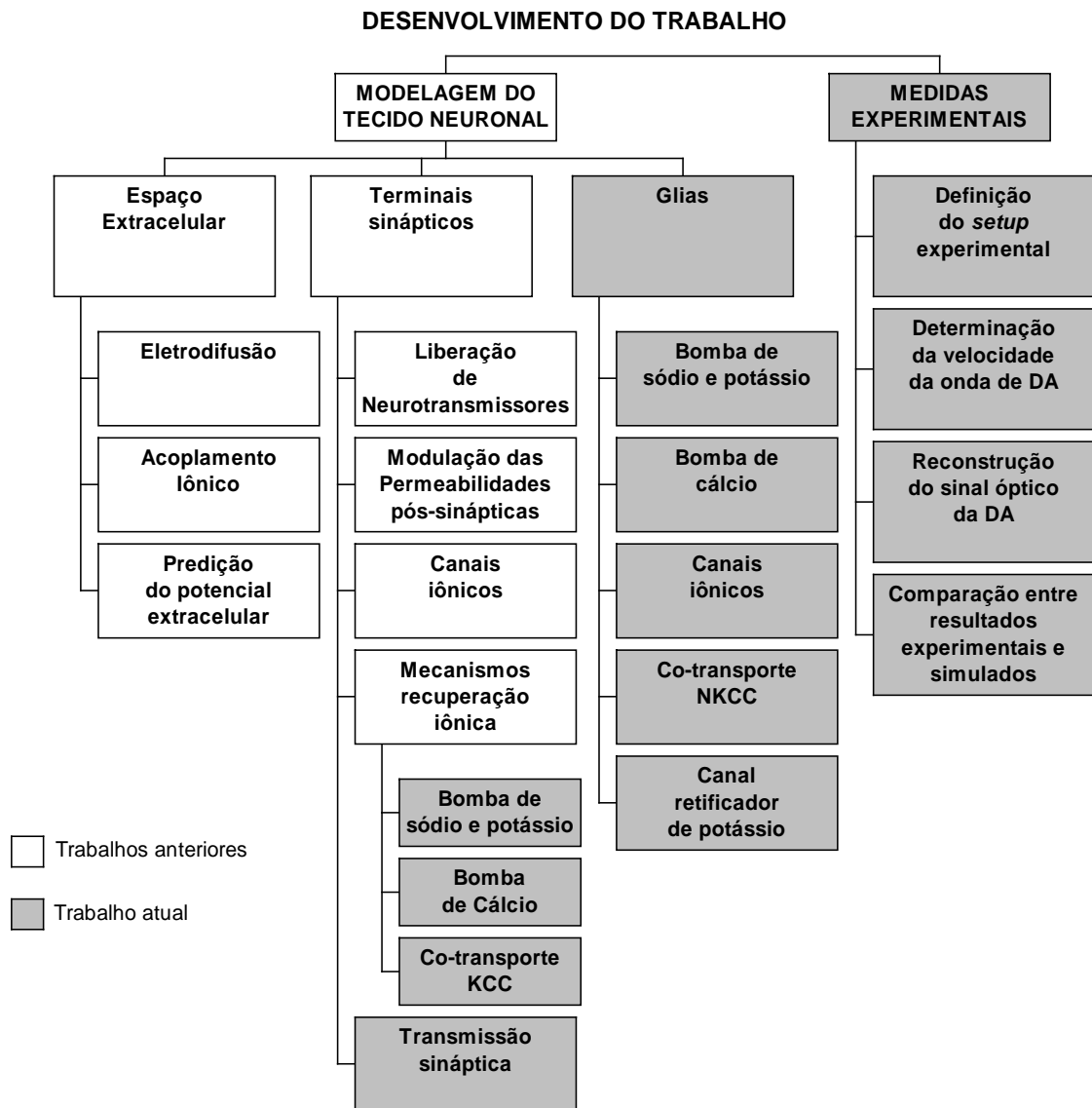


Figura 1.1 – Diagrama esquemático das etapas implementadas em trabalhos anteriores (blocos em branco) e no presente trabalho (blocos em cinza).

No Capítulo II é feita uma breve revisão do fenômeno da DA, enfocando-se os principais aspectos para a implementação do modelo matemático.

No Capítulo III, é apresentada uma revisão crítica dos modelos matemáticos de DA publicados na literatura até o momento. Cada modelo é analisado, apontando-se as vantagens e deficiências na simulação do fenômeno da DA. Após essa revisão, no Capítulo IV é apresentada a estrutura geral do modelo proposto.

Nos Capítulos V, VI e VII, são descritas as representações dos mecanismos de recuperação dos gradientes iônicos.

O Capítulo VIII é dedicado à descrição de mecanismos de transmissão sináptica.

Os resultados das simulações são apresentados no Capítulo IX. A partir da simulação das variações iônicas intra- e extracelulares, foi possível simular modulações sobre os índices de refração desses dois meios, permitindo inferir sobre relações entre as componentes do sinal óptico que caracterizam as atividades durante o evento da DA e durante o período inter-evento. Esses resultados indicaram que a indução experimental de DA, monitorada pelo sinal óptico, seria importante na etapa de validação do modelo. Além disso, a descrição do mecanismo de neurotransmissão possibilitou a simulação do período refratário da onda de DA. Os experimentos realizados e comparações com as simulações a partir do modelo são objeto do Capítulo X.

No capítulo XI, são apresentados os comentários finais a respeito do trabalho onde se ressalta, como contribuição do modelo, as simulações do deslocamento do potencial extracelular, do sinal óptico e do período refratário da onda de DA.

Capítulo II – A Depressão Alastrante

O termo “Depressão Alastrante” (DA), cunhado por LEÃO (1944a), deriva do efeito mais evidente quando o fenômeno é observado experimentalmente. Esse efeito consiste em uma depressão transiente e localizada da atividade eletroencefalográfica, que se propaga radialmente pelo córtex, a partir do ponto de estimulação.

Uma das características marcantes da DA, registrada por meio de eletrodos, é a propagação lenta de uma onda de potencial negativo no meio extracelular, com amplitudes em torno de 5 a 30 mV e velocidades entre 2 e 10 mm/min. Um registro típico da variação lenta do potencial extracelular em córtex, feito por MARTINS-FERREIRA (1954), é mostrado na Figura 2.1.

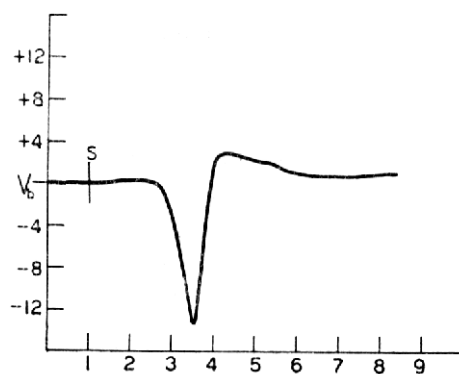


Figura 2.1 – Registro da variação lenta de potencial da depressão alastrante em córtex de pombo. Ordenada: potencial extracelular em mV; abscissa: tempo em minutos (Extraído de MARTINS-FERREIRA, 1954).

A seqüência de eventos da DA inicia-se com uma intensa despolarização de neurônios e glias nas regiões invadidas pela onda, originando disparos de potenciais de ação em alta-freqüência durante 1 a 3 s. Logo em seguida, ocorre um momento de silêncio neuronal que dura entre 10 a 15 s. Simultaneamente, há uma falha generalizada da homeostase iônica cerebral, um aumento do metabolismo e dilatação de artérias no córtex (LEÃO, 1944b).

A despolarização neuronal está associada com “dramáticas” alterações na distribuição iônica entre os compartimentos intra- e extracelulares (Figura 2.2). Há um aumento gradual da concentração de K^+ no meio extracelular até 12 mM. Quando esse

nível é atingido, a concentração de K^+ aumenta abruptamente até atingir 30 a 80 mM. O aumento descrito na concentração de K^+ é acompanhado por uma queda na concentração de Cl^- no meio extracelular de 50 a 100 mM e um decréscimo na concentração extracelular de Na^+ de aproximadamente 100 mM. Além disso, a concentração de Ca^{2+} extracelular medida durante a DA cai entre 10 e 50% do seu valor de repouso (NICHOLSON *et al.*, 1977, HANSEN e ZEUTHEN, 1981). O fato mais “intrigante” no fenômeno da DA é a absoluta reversibilidade das intensas alterações entre os meios intra- e extracelulares.

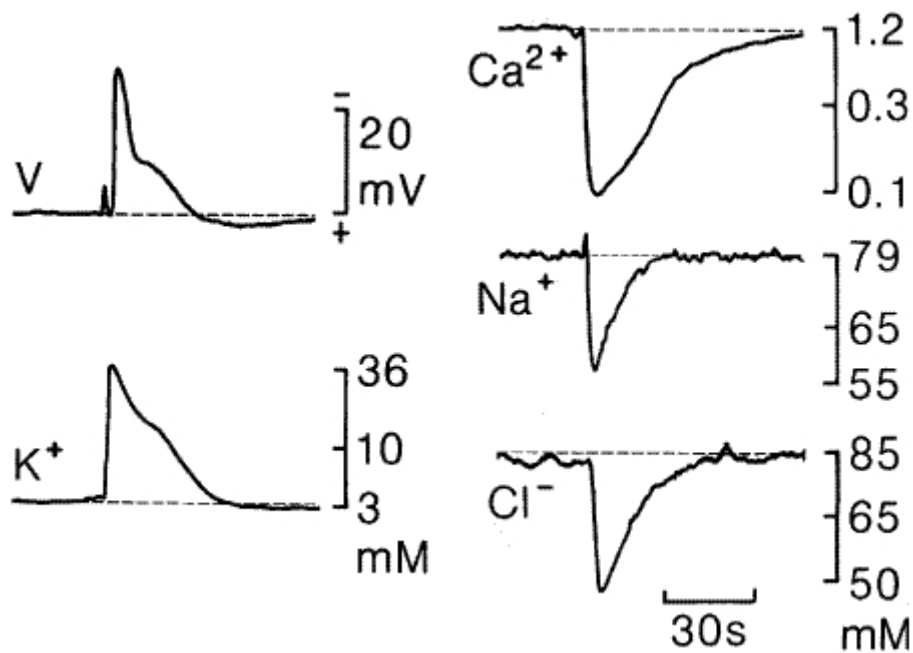


Figura 2.2 – Alterações iônicas durante a DA no cerebelo de rato. Todas as escalas de amplitude são logarítmicas (extraída de NICHOLSON, 1984).

A saída de uma grande quantidade de NaCl do interior das células poderia resultar em uma entrada de água de acordo com os gradientes osmóticos, induzindo o inchaço celular como sugerido por VAN HARREVELD (1959), e na redução transitente do meio extracelular (NICHOLSON e KRAIG, 1981, VAN HARREVELD e KHATTAB, 1967). Essa redução de volume seria a provável causa do aumento da resistividade do meio extracelular observado em neocórtex intacto (HOFFMAN *et al.*, 1973) e pelas alterações no espalhamento de luz na retina (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966). FERREIRA-FILHO e MARTINS-FERREIRA (1982) observaram um aumento da impedância do tecido com a redução da concentração extracelular do Na^+ e do Cl^- , juntamente com a diminuição de volume. A redução do

volume extracelular poderia também acentuar os efeitos de um íon e as interações mediadas por correntes através do meio extracelular devido ao aumento da resistividade do meio. A dispersão de elementos neuroativos de seus receptores poderia ser amenizada devido à redução de espaço e talvez a um aumento da tortuosidade (SCHWARTZKROIN *et al.*, 1998).

Depois da ocorrência da DA, há um período refratário, durante o qual o tecido nervoso não é capaz de sustentar uma nova onda. Esse período é seguido por um retorno gradual às condições iniciais (MARTINS-FERREIRA, 1994). A recuperação total do tecido pode levar de 20 a 30 min (MARTINS-FERREIRA e DO CARMO, 1987).

As ondas de DA apresentam propriedades similares às dos potenciais de ação que ocorrem em axônios de neurônios, sendo elas (TUCKWELL e MIURA, 1978):

- a) ambos são aproximadamente fenômenos do tipo “zero ou um”;
- b) propagam-se com velocidade e forma aproximadamente constantes;
- c) envolvem despolarização de membranas;
- d) exibem propriedades de espalhamento de luz;
- e) possuem ondas múltiplas, geradas a partir de um estímulo forte e sustentado;
- f) apresentam a propriedade de aniquilação quando uma onda colide com outra.

Tanto a DA quanto os potenciais de ação dependem de fluxos iônicos através da membrana neuronal. No entanto, existem diferenças qualitativas e quantitativas importantes que devem ser ressaltadas:

- a) as escalas de tempo e espaço são maiores para a DA;
- b) a propagação da DA parece ser dependente principalmente de fluxos iônicos através de membranas sinápticas, com alguma contribuição de membranas não-sinápticas, enquanto que os potenciais de ação propagam-se por fluxos através de membranas não-sinápticas;
- c) a propagação das ondas de DA provoca alterações consideráveis nas concentrações do meio extracelular, enquanto que durante a passagem do potencial de ação as alterações são desprezíveis;
- d) os mecanismos de transporte ativo são, provavelmente, essenciais para a fase de recuperação da DA, mas são insignificantes na fase de repolarização do potencial de ação.

Inúmeros trabalhos demonstram que a DA pode se desenvolver em diferentes tecidos neuronais, em particular na retina de vertebrados, tendo sido registrada pela primeira vez, em retinas de sapo, por GOURAS (1958). A primeira descrição das alterações ópticas, no entanto, foram realizadas por MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) em retinas de aves. Uma seqüência típica do espalhamento de luz durante a passagem da onda de DA em retina é mostrada na Figura 2.3. A linha de base (Ir) corresponde à intensidade de luz espalhada em uma região não afetada pela DA. No curso da seqüência, a intensidade de luz apresenta dois mínimos (fases **a** e **c**) e dois máximos (fases **b** e **d**). Em alguns experimentos, a fase **a**, que tem uma duração de uns poucos segundos, não aparece.

MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966) e MARTINS-FERREIRA (1983) concluíram que as fases **b** e **d** do sinal óptico possuem propriedades diferentes, e, portanto, estas fases refletem mecanismos distintos durante a onda de DA. A fase **b** estaria mais relacionada com a forte movimentação iônica na frente de onda, enquanto que a fase **d** estaria mais relacionada com o metabolismo do tecido.

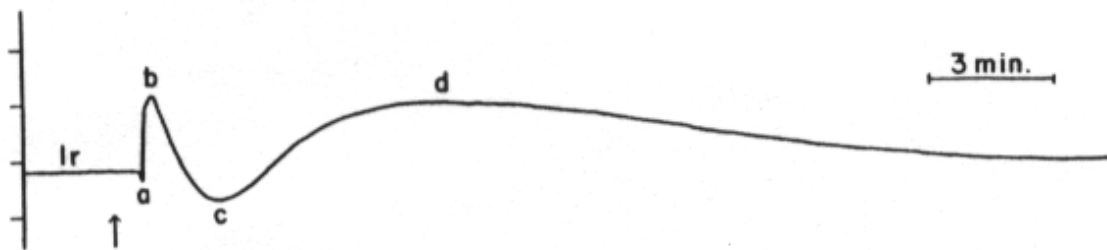


Figura 2.3 – Dinâmica temporal do espalhamento de luz durante a DA em retina de ave. Ir é a intensidade do espalhamento de luz na retina em região não invadida pela onda de DA. Forma padrão da seqüência do espalhamento de luz na retina mantida em solução nutritiva (adaptada de MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966).

A retina é um tecido nervoso com camadas bem definidas, sendo comparável a outras estruturas cerebrais, como, por exemplo, a região CA1 do hipocampo (Figura 2.4). Dessa forma, a retina é considerada um ótimo modelo de córtex para observação da propagação de ondas de DA (OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA, 1971).

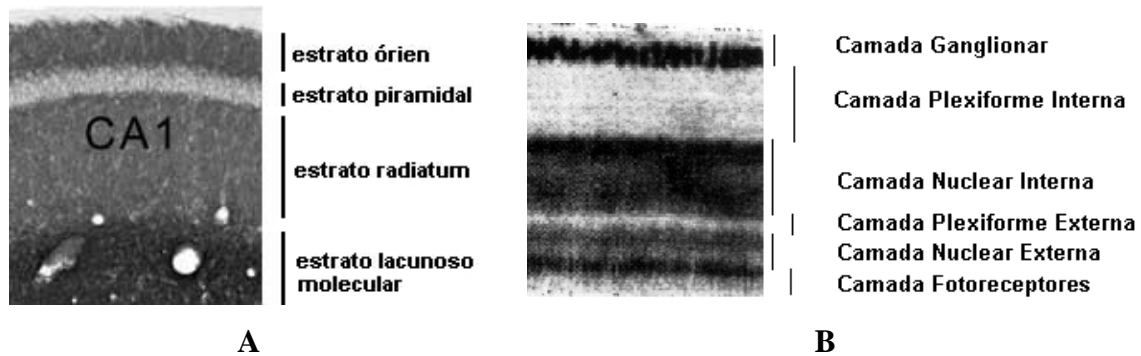


Figura 2.4 – Comparação entre os níveis de estratificação da região CA1 do hipocampo e da retina. A) Estrutura estratificada da região CA1 de hipocampo de rato (modificada de STRAESSLE *et al.*, 2003). B) Imagem digitalizada das camadas da retina de ave (Modificada de LADEWIG *et al.*, 1998).

A DA na retina é semelhante à DA cortical sob muitos aspectos, dentre os quais destacam-se (MARTINS-FERREIRA, 1983):

- a) variação negativa e lenta de potencial extracelular com amplitudes e constantes de tempo similares;
- b) aumento reversível na impedância elétrica com características similares;
- c) velocidade de propagação na mesma ordem de magnitude;
- d) existência de período refratário da ordem de minutos;
- e) susceptibilidade da preparação da DA na dependência da razão de $[K^+]/[Mg^{2+}]$ no meio extracelular;
- f) variação de volume do tecido durante a reação.

Estas propriedades fazem da retina um bom modelo de tecido cortical, com a vantagem de se poder observar, a olho nu, alterações em suas propriedades ópticas durante a passagem da onda (MARTINS-FERREIRA, 1994, RIBEIRO e MARTINS-FERREIRA, 1994).

A observação direta do espalhamento bidimensional é apenas uma das vantagens em preparações experimentais do fenômeno em retinas isoladas. Outra vantagem é a estrutura laminar com camadas de neurópilos e corpos celulares muito bem definidas. A espessura da retina de ave é compatível com a de uma fatia de tecido neuronal e a camada plexiforme interna é convenientemente larga (100 μm de espessura), o que facilita a observação. A retina de aves é desprovida de vasos sanguíneos e barreiras de

resistência mecânica elevada (MARTINS-FERREIRA, 1983). A ausência de vasos indica a existência de um sistema de distribuição de nutrientes pelas camadas da retina que favorece a movimentação de fluidos em uma interface com o meio de perfusão (MARTINS-FERREIRA, 1983).

Devido à localização anatômica de seus componentes celulares, é possível isolar as camadas de tecidos nervosos sem grandes danos. Sua transparência é uma propriedade que permite averiguar o estado da retina durante os experimentos. Sob condições de equilíbrio homeostático e sem lesões, a retina apresenta-se transparente. Lesões mecânicas ou químicas são facilmente detectadas como pontos opacos (MARTINS-FERREIRA, 1994).

Na retina de ave, a principal célula glial presente é a célula de Müller, que se apresenta disposta radialmente e atravessa todas as camadas (Figura 2.4). Cada célula possui uma árvore dendrítica extensa e complexa em relação a um eixo longitudinal passando pelo seu soma (NEWMAN, 1989, LADEWIG *et al.*, 1998).



Figura 2.4 – Células de Müller da retina de ave (modificada de NEWMAN, 1989);

Quando imersa em uma solução apropriada, descrita por MARTINS-FERREIRA (1983), a retina é capaz de sustentar ondas de DA durante várias horas, propagando-se uniformemente em várias direções, desde que os estímulos sejam aplicados em intervalos de tempo adequados.

A olho nu, a DA apresenta-se como uma onda de propagação leitosa, que ocorre devido às alterações no espalhamento de luz durante a reação, com o centro no ponto de estimulação, como pode ser visto pela Figura 2.5. A frente de onda é acompanhada por alterações locais de potencial em cada parte invadida da retina, característica da DA

(MARTINS-FERREIRA e RIBEIRO, 1995, RIBEIRO e MARTINS-FERREIRA, 1994).

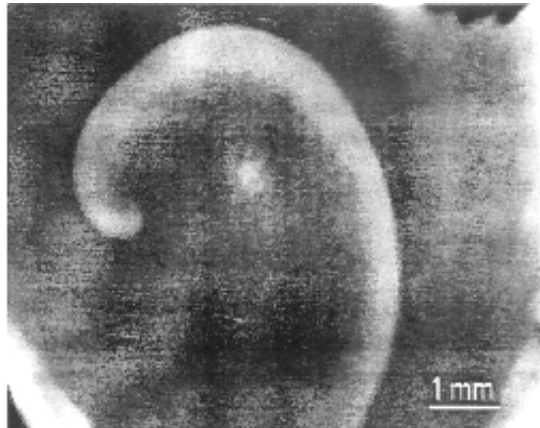


Figura 2.5 - Imagem do sinal óptico de uma onda espiral de DA em retina de galinha da espécie *Gallus gallus* (extraída de DAHLEM e MÜLLER, 1997)

Da mesma forma que no córtex, durante a DA na retina ocorre um aumento reversível da concentração de K^+ e um decaimento nas concentrações de Cl^- , Na^+ e Ca^{2+} , juntamente com alterações do pH do meio extracelular, concomitantes com uma variação lenta de potencial, característica da onda, que acompanha as alterações das propriedades ópticas. Segundo MARTINS-FERREIRA (1994), é na camada plexiforme interna da retina que as alterações no espalhamento de luz são mais intensas e as variações de $[K^+]_o$, juntamente com as variações de potencial, são máximas, durante a DA. Nessa região, ocorre uma despolarização predominante das células ganglionares e de células amácrinas que acabam perdendo a capacidade de resposta induzida por luz. Essas respostas ainda estão presentes nas células horizontais ou receptores.

Segundo MARTINS-FERREIRA (1983), a onda de DA em retinas de ave pode ser deflagrada por inúmeros estímulos, dentro os quais destacam-se:

- a) estímulos químicos (aplicações de KCl, Glutamato ou ACTH, por exemplo);
- b) estímulos mecânicos;
- c) estímulos elétricos;
- d) estímulos fisiológicos (intensa estimulação neuronal);
- e) ultra-som;

- f) estímulo óptico, se a suscetibilidade da retina for aumentada (por exemplo, perfundindo a preparação da solução nutriente normal contendo 6,0 mM de KCl, 0,5 a 1,0 mM de MgCl₂, saturado com O₂ a 100%).

De forma geral, a maior parte das hipóteses existentes para explicar a DA baseia-se na liberação maciça de algumas substâncias do interior de neurônios para o meio extracelular. Uma vez liberadas, essas substâncias podem atingir as células vizinhas, por meio de difusão, causando liberação das mesmas e, assim, estabelecendo a primeira etapa do processo de propagação da onda. Segundo MARTINS-FERREIRA e DO CARMO (1987), além de K⁺ e glutamato, neurotransmissores (inibitórios ou excitatórios) provavelmente participam do processo.

A primeira sugestão sobre o mecanismo de propagação da DA, proposta por GRAFSTEIN (1956), baseava-se na liberação maciça de K⁺ do interior dos neurônios, durante disparos de potenciais de ação, provocando o influxo de Na⁺ através dos canais dependentes de potencial. A atividade de disparo poderia elevar a concentração de K⁺ no meio extracelular até um certo limiar que, por difusão, seria o suficiente para provocar a despolarização de membranas neuronais adjacentes. Dessa forma, esses neurônios liberariam mais K⁺, até que a inativação suprimisse os disparos.

No entanto, a hipótese de Grafstein foi questionada com os experimentos de TOBIAS e NICHOLSON (1982), que verificaram que a DA se propaga em córtex tratado com tetrodoxina (TTX). Essa droga atua inibindo a ocorrência de potenciais de ação por meio do bloqueio de canais de Na⁺.

Uma hipótese alternativa havia sido proposta por VAN HARREVELD e FIFKOVÁ (1970), na qual o glutamato, uma substância neurotransmissora excitatória, exerceria o papel inicialmente atribuído ao K⁺. A liberação de glutamato produziria um aumento na permeabilidade de Na⁺ das membranas locais, provocando o influxo de Na⁺ e Cl⁻, juntamente com água. A água restauraria o equilíbrio osmótico, aumentando o volume celular e comprimindo o meio extracelular. A liberação de K⁺ poderia ocorrer como um fenômeno secundário durante a despolarização. Esta idéia foi baseada inicialmente na observação de VAN HARREVELD (1959) de que o limiar de concentração para a deflagração da DA no córtex de coelho era muito menor para o glutamato do que para o KCl quando aplicado topicamente.

No entanto, DO CARMO e LEÃO (1972) constataram que aplicações tópicas de glutamato apenas poderiam causar DA em coelhos e ratos quando acompanhada de

estimulação mecânica, ao contrário do que ocorria com aplicações tópicas de KCl. Isso levou outros autores (BURES *et al.*, 1974) a acreditarem que o glutamato não é a substância primária na DA e que essa função pertence realmente ao K^+ . Um estudo posterior, feito por FIFKOVÁ e VAN HARREVELD (1974), tenta explicar os achados de Do Carmo e Leão, mostrando que a capacidade do glutamato em deflagrar a DA era afetada pela idade do animal. De acordo com a revisão de SOMJEN (2001), o limiar de deflagração diminui com o aumento da idade. Em córtex de coelho ou rato a capacidade de se sustentar ondas aparece entre a 10^a e a 25^a semanas, dependendo da região. Na verdade, a razão é que o glutamato não é eficiente na penetração das camadas superiores do córtex, não atingindo, dessa forma, as células nervosas em uma concentração suficiente para dar origem à onda de DA (TUCKWELL e HERMANSEN, 1981).

Mais tarde, VAN HARREVELD (1978) sugeriu que há dois tipos de DA, uma mediada por K^+ (*K-based*) e outra por glutamato (*glutamate-based*). Segundo o autor, a DA mediada por K^+ ocorreria na retina de ave sob circunstâncias especiais, onde a DA mediada por glutamato fosse interrompida por ions de Mg^{2+} e a concentração de K^+ na solução de perfusão fosse maior.

Vários investigadores propuseram que a DA seria causada pela liberação simultânea e maciça de transmissores tanto inibitórios quanto excitatórios (SOMJEN, 1973, MORI *et al.*, 1976, TUCKWELL E MIURA, 1978, NICHOLSON *et al.*, 1981). Esse mecanismo poderia permitir a movimentação iônica através de canais subsinápticos ao longo dos gradientes eletroquímicos.

SOMJEN *et al.* (1992) propuseram que um aumento inicial dos fluxos através de *gap-junctions* deflagraria ondas de DA. Seguindo essa idéia, LEIBOWITZ (1992) propôs que o mecanismo fundamental para propagação das ondas de DA ocorreria no compartimento glial. As glias do sistema nervoso de vertebrados seriam acopladas por *gap-junctions*. As propagações por longas distâncias seriam, então, mediadas por um ou mais mensageiros químicos que atravessariam as *gap-junctions* gliais. Essa hipótese de propagação citoplasmática prediz que um bloqueio seletivo e completo de todas as *gap-junctions* gliais poderia fazer com que o tecido nervoso fosse incapaz de suportar a propagação de DA. A DA no escopo do tecido nervoso seria impossível de ocorrer na ausência de função glial.

Entretanto, LARGO *et al.* (1997a) atribuíram a interdição da propagação da DA por hetanol e octanal ao bloqueio de *gap-junctions* entre neurônios e não entre glias, pois os bloqueadores seletivos de glias, como o fluoracetato ou o fluorcitrato, falharam

em suprimir a DA ou prevenir a sua propagação (LARGO *et al.*, 1996, 1997a, 1997b). Tem sido especulado que, durante o início da DA, a água penetra nas células provocando a abertura de *gap-junctions* neuronais sensíveis a estiramentos (SOMJEN *et al.*, 1992).

Apesar dos vários trabalhos publicados sobre a DA nesses 60 anos, desde seu descobrimento, com diferentes protocolos experimentais e nos mais diversos tecidos neuronais, ainda não foi possível estabelecer um consenso quanto aos mecanismos de deflagração e propagação da onda de DA. É nesse contexto que a modelagem neuronal se insere, contribuindo na interpretação dos resultados experimentais e permitindo o acesso simultâneo a múltiplas variáveis o que é, experimentalmente, inviável.

Capítulo III – Modelos para a Propagação de Ondas de Depressão Alastrante

Modelos matemáticos baseados em parâmetros fisiológicos constituem uma ferramenta importante no entendimento de fenômenos complexos como a DA. Os primeiros modelos, no entanto, baseavam-se exclusivamente em um sistema de reação-difusão. Com a ampliação dos recursos computacionais, modelos mais recentes e com maior nível de detalhamento têm se focado na descrição dos mecanismos celulares. Neste capítulo, será apresentada uma revisão dos principais modelos matemáticos da DA publicados na literatura.

III.1 – Modelo de Hodgkin-Grafstein

Este modelo baseava-se na proposição de GRAFSTEIN (1956) de que a liberação de K^+ , durante disparos de potenciais de ação, em um meio extracelular restrito produziria a despolarização de membranas neuronais vizinhas por meio da difusão de K^+ . Essa despolarização provocaria a liberação de mais K^+ do interior dos neurônios, sustentando, assim, o processo de propagação da onda de DA (GRAFSTEIN, 1963).

O modelo é constituído por uma única equação de reação-difusão da concentração extracelular de K^+ . Esta equação prevê o aumento da concentração de K^+ durante a DA mas não o retorno aos valores de repouso. Para descrever a recuperação seria necessário incluir um segundo termo, de retorno, na equação. Neste modelo, a equação de reação-difusão é dada por:

$$\frac{\partial [K^+]_o}{\partial t} = D_K \cdot \frac{\partial^2 [K^+]_o}{\partial x^2} + f([K^+]_o), \quad (3.1)$$

Esse tipo de reação-difusão é denominado equação bi-estável (KEENER e SNEYD, 1998). O primeiro termo da equação representa a difusão extracelular de K^+ governada pela 2ª Lei de Fick, onde D_K é o coeficiente de difusão para K^+ . O segundo termo da equação é um polinômio de 3ª ordem que descreve a homeostase para uma

concentração de repouso K_r entre 3 e 4 mM, um limiar de disparo K_d entre 12 e 20 mM e uma magnitude máxima K_m entre 25 e 60 mM. O termo $f([K^+]_o)$ é dado por:

$$f([K^+]_o) = \frac{([K^+]_o - K_r) \cdot (K_d - [K^+]_o) \cdot ([K^+]_o - K_m)}{t \cdot K_m^2}, \quad (3.2)$$

onde t é uma constante de tempo. Um exemplo de forma de onda $f([K^+]_o)$ é mostrado na Figura 3.1:

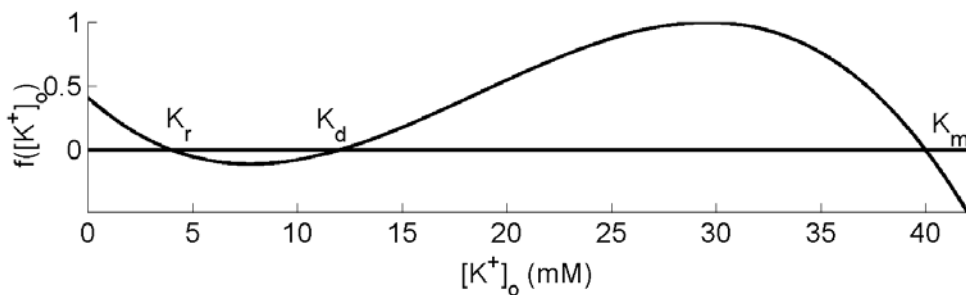


Figura 3.1 – Simulação do termo de sustentação da homeostase de K^+ . K_r representa a concentração de repouso K_d o limiar de disparo e K_m a magnitude máxima da concentração de K^+ .

III.2 – Modelo de automatas celulares

O modelo proposto por RESHODKO e BURES (1975) descreve a DA em termos da teoria de automatas celulares. Neste modelo, o tecido cortical é modelado por meio de uma matriz de células interconectadas. Cada célula se encontra em um dos três estados possíveis: **quiescente**, que descreve a célula em estado de repouso, **deprimido**, que indica que a célula foi atingida por uma onda de DA, ou **refratário**, onde a célula sofreu a ação da onda de DA e não é capaz de sustentar outra onda. Os únicos parâmetros de entrada são as conexões entre células e a duração dos estados deprimido e refratário.

Não há como estabelecer uma ligação entre esses parâmetros com os parâmetros relativos aos fluxos iônicos, pois o modelo não permite qualquer tipo de interpretação

fisiológica e representa, unicamente, o comportamento dinâmico da DA. No entanto, o modelo proporciona uma estrutura para descrição de fenômenos em meios excitáveis.

III.3 – Modelo de Tuckwell

TUCKWELL e MIURA (1978), utilizando as considerações fisiológicas para ondas de depressão alastrante (DA), propuseram um modelo matemático para o fenômeno. As variáveis levadas em consideração são a concentração extra- e intracelular dos ions K^+ e Ca^{2+} , juntamente com substâncias transmissoras excitatórias e inibitórias. O modelo é capaz de exibir o fenômeno de ondas solitárias e o aniquilamento de ondas.

A Figura 3.2 mostra uma representação esquemática do modelo simplificado de DA, proposto por TUCKWELL e MIURA (1978), onde figuram apenas os ions de K^+ , principal responsável pela despolarização da membrana, e de Ca^{2+} , que ativa a liberação de neurotransmissores. As correntes de Ca^{2+} são levadas em consideração na medida em que elas afetam a liberação de neurotransmissores. Os mecanismos de transporte ativo (bombas) estão localizados tanto em membranas pré- quanto pós-sinápticas e sua principal função é restaurar a distribuição normal de ions.

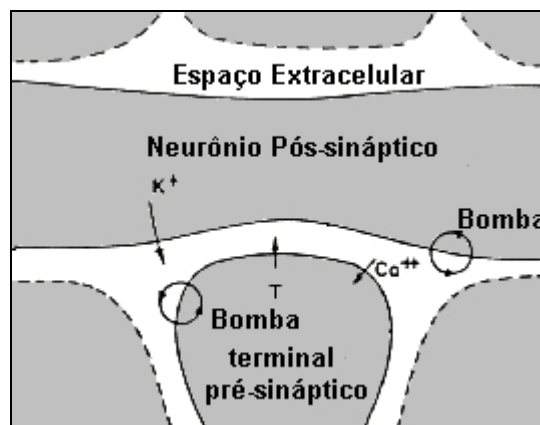


Figura 3.2 – Representação esquemática dos detalhes anatômicos e fisiológicos do micro-sistema no qual o modelo simplificado de DA é baseado (adaptado de TUCKWELL e MIURA, 1978)

Neste modelo, admite-se que as membranas pré- e pós-sinápticas assumem os mesmos potenciais. Essa simplificação tem como base a proximidade entre as

membranas e o fato de que o potencial transmembrânico é determinado principalmente pela variação de concentração no meio extracelular. O modelo é constituído por um sistema de equações de reação-difusão, com fontes e sorvedouros para os íons extracelulares (equação 3.3), e equações diferenciais de primeira ordem para os íons intracelulares (equação 3.4):

$$\frac{\partial [C]_o}{\partial t} = D_C \cdot \frac{\partial^2 [C]_o}{\partial x^2} + G_o \cdot (Vm - V_o) + \hat{\phi}^C \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial [C]_i}{\partial t} = -\frac{\alpha}{1-\alpha} \cdot [G_C \cdot (Vm - V_C) + \hat{\phi}^C], \quad (3.4)$$

onde $[C]_o$ e $[C]_i$ é o valor de concentração do íon C no meio extra- e intracelular, respectivamente, G , a condutância, Vm , o potencial transmembrânico e V_C , o potencial de Nernst do íon C . O termo $D_C \cdot \partial^2 [C]_o / \partial x^2$ provém da 2ª lei de Fick que descreve o movimento de difusão de partículas. O termo $G_C \cdot (Vm - V_C)$ representa a contribuição dos transportes passivos e $\hat{\phi}^C$, a contribuição dos transportes ativos aos fluxos iônicos, através da membrana. A taxa de troca entre os meios é obtida por meio da aplicação de fator de escala $-\alpha / (1 - \alpha)$, onde α é a fração de volume do meio extracelular ($\alpha = 0,2$).

A taxa de liberação de neurotransmissores, é proporcional ao influxo de Ca^{2+} , sendo a condutância de Ca^{2+} , G_{Ca} , função do próprio potencial transmembrânico do terminal pré-sináptico (equação 3.5).

$$\frac{\partial T_n}{\partial t} \propto G_{Ca} \cdot (Vm - V_{Ca}), \quad (3.5)$$

onde $G_{Ca} = g_o \cdot (1 + \tanh[p_g \cdot (Vm + V_g)])$, com $g_o = 0,039$ cm/s, $p_g = 0,11$ mV⁻¹ e $V_g = 45,0$ mV. A abertura e o fechamento de canais iônicos são modulados indiretamente pela corrente de Ca^{2+} que provoca a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Reescrevendo-se as equações 3.3 e 3.4 para K^+ e Ca^{2+} e modulando a abertura dos canais de K^+ em função da taxa de liberação de neurotransmissores (equação 3.5), tem-se:

$$\frac{\partial [K^+]_o}{\partial t} = D_K \cdot \frac{\partial^2 [K^+]_o}{\partial x^2} + p_K \cdot [G_{Ca} \cdot (Vm - V_{Ca})] \cdot (Vm - V_K) + \hat{\phi}^K \quad (3.6)$$

$$\frac{\partial [K^+]_i}{\partial t} = -\frac{\alpha}{1-\alpha} \cdot (p_K \cdot [G_{Ca} \cdot (Vm - V_{Ca})] \cdot (Vm - V_K) + \hat{\phi}^K) \quad (3.7)$$

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]_o}{\partial t} = D_{Ca} \cdot \frac{\partial^2 [Ca^{2+}]_o}{\partial x^2} + p_{Ca} \cdot G_{Ca} \cdot (Vm - V_{Ca}) + \hat{\phi}^{Ca} \quad (3.8)$$

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]_i}{\partial t} = -\frac{\alpha}{1-\alpha} \cdot [p_{Ca} \cdot G_{Ca} \cdot (Vm - V_{Ca}) + \hat{\phi}^{Ca}], \quad (3.9)$$

onde p_K e p_{Ca} são fatores de multiplicação das condutâncias. Forma-se, portanto, um sistema de duas equações de reação-difusão para concentração de K^+ e Ca^{2+} no meio extracelular acopladas com um sistema de duas equações diferenciais ordinárias para as concentrações intracelulares.

O potencial transmembrânico é calculado por meio da equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) (equação 3.10) simplificada, e aplicada considerando-se a uma temperatura de 37°C:

$$Vm = 58,0 \cdot \log_{10} \left(\frac{[K^+]_o + \gamma}{[K^+]_i + \delta} \right), \quad (3.10)$$

onde as constantes γ e δ contém os parâmetros relacionados às concentrações de Na^+ e Cl^- , as quais, por simplificação, foram consideradas constantes.

Os potenciais iônicos são calculados por meio da equação de Nernst (equações 3.11 e 3.12):

$$V_K = 58,0 \cdot \log_{10} \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right) \quad (3.11)$$

$$V_{Ca} = 29,0 \cdot \log_{10} \left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right) \quad (3.12)$$

O gradiente eletroquímico provoca um influxo de Ca^{2+} e um efluxo de K^+ . Para uma bomba que retorna ions do meio extra- para o intracelular, como é o caso do K^+ , o fluxo da bomba de K^+ é dado por:

$$\hat{\phi}_o^K = f^K \cdot (1 - \exp(-r^K \cdot ([K^+]_o - [K^+]_o^R))) + f^{*K}, \quad (3.13)$$

onde $\hat{\phi}_o^K$ é o fluxo de concentração de K^+ referente ao meio extracelular (índice o), f^K e r^K são constantes positivas e $[K^+]_o^R$ a concentração de potássio em repouso. O sinal negativo da constante f^K indica que a bomba diminui a concentração no meio extracelular. f^{*K} é a constante de bombeamento em regime permanente. O controle da bomba é feito pelo nível de concentração extracelular.

Para o Ca^{2+} a bomba deve atuar provocando um efluxo desse íon, ou seja, o controle da bomba é feito em função do nível de concentração intracelular. Assim,

$$\hat{\phi}_o^{Ca} = f^{Ca} \cdot (1 - \exp(-r^{Ca} \cdot ([Ca^+]_i - [Ca^+]_i^R))) + f^{*Ca} \quad (3.14)$$

Com este modelo, os autores conseguiram descrever um fenômeno de características similares à propagação de ondas de DA em meios excitáveis. As velocidades obtidas variavam entre 1,0 a 2,9 mm/min com uma magnitude da onda de K^+ em torno de 15 a 20 mM e uma variação no potencial de membrana de 20 mV (TUCKWELL, 1980, 1981).

Posteriormente, TUCKWELL e HERMANSEN (1981) publicaram uma extensão do modelo envolvendo os ions de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} , além da descrição da atuação de duas substâncias neurotransmissoras, uma excitatória e outra inibitória, que poderiam ser o glutamato e o GABA (ácido gama-aminobutírico), respectivamente. Diferentemente do modelo anterior, as substâncias neurotransmissoras são explicitamente representadas por equações de reação-difusão próprias.

Como não havia modelos para a ligação de glutamato ou GABA a receptores, os autores consideraram que a maneira com que esses neurotransmissores provocam a

alteração das condutâncias iônicas era similar àquela proposta para a acetilcolina (KATZ e THESLEFF, 1957, KATZ e MILEDI, 1973). Dessa forma, considerou-se a probabilidade por unidade de tempo de que um receptor esteja ligado a um neurotransmissor, a probabilidade de que um receptor no estado TR (Transmissor-Receptor) torna-se refratário e a probabilidade de que um receptor deixe de ser refratário.

Esse modelo foi capaz de prever a deflagração de ondas de DA tanto para a aplicação de KCl quanto de glutamato. Observou-se que o nível de limiar do glutamato é muito menor do que para K^+ . Além disso, a formação da onda de glutamato precedeu a formação da onda de K^+ . No entanto, é provável que, com diferentes intensidades dos mecanismos de recuperação, a ordem de ocorrência das ondas de DA se inverta.

III.4 – Modelo fisiopatológico

REGGIA e MONTGOMERY (1994, 1996), REVETT *et al.* (1998), RUPPIN *et al.* (1999) e RUPPIN e REGGIA (2001) tentaram relacionar modelos teóricos simplificados de DA à fisiopatologia de condições clínicas. Dessa forma, foi constituído um modelo neuro-metabólico das interações que supostamente ocorrem no córtex durante a passagem de múltiplas ondas de DA, correlacionando com a morte de tecidos em um derrame cerebral.

O modelo bi-estável proposto por GRAFSTEIN (1963) propicia a descrição de um mecanismo para a excitabilidade, mas negligencia o mecanismo de recuperação. Este fato foi revisto por REGGIA e MONTGOMERY (1994, 1996), em uma versão discreta e bi-dimensional do modelo bi-estável, com a inclusão de uma variável no termo que descreve a homeostase do sistema, $f([K^+]_o)$, na equação 3.2. A função $f([K^+]_o)$ passa a ser descrita por um polinômio de 3ª ordem dado por:

$$f([K^+]_o) = A \cdot ([K^+]_o - K_r) \cdot (K_d - [K^+]_o) \cdot ([K^+]_o - K_m) - r \cdot [K^+]_o, \quad (3.15)$$

onde $A < 0$ é uma taxa constante. A variável r representa a taxa de seqüestro de K^+ e é dada por:

$$\frac{\partial r}{\partial t} = B \cdot \left(([K^+]_o - K_r) - C_r \right), \quad (3.16)$$

onde $0 < B \ll |A|$ e $C > 0$ são constantes.

Essa técnica foi inspirada no modelo Fitzhugh-Nagumo para excitação nervosa e no modelo Morris-Lecar para fibra muscular (MORRIS e LECAR, 1981).

Posteriormente, o modelo foi modificado por REVETT *et al.* (1998) e RUPPIN *et al.* (1999) para estudar a relação entre DA e a isquemia. Isso foi feito com a descrição dos efeitos de lesão em tecidos no termo de homeostase $f([K^+]_o)$:

$$f([K^+]_o) = c_{KA} \cdot I \cdot ([K^+]_o - K_r) \cdot (K_d - [K^+]_o) \cdot ([K^+]_o - K_m) \cdot ([K^+]_o + 0,1) + \\ + C_{KS} \cdot (Sk - I) \cdot (K_m - [K^+]_o) - r \cdot [K^+]_o + K_{inf} \quad , \quad (3.17)$$

onde $c_{KA} < 0$, $C_{KS} > 0$, $C_{KD} > 0$ e $K_{inf} < 0$ são constantes. O segundo termo representa um “leakage patológico” do K^+ intracelular no meio extracelular danificado, sendo uma função dos níveis de K^+ intracelular Sk , viabilidade do tecido I , e do K^+ extracelular. O terceiro termo reflete o seqüestro de K^+ extracelular e o último termo, K_{inf} , representa a infusão externa de K^+ no córtex simulado.

III.5 – Modelo para correntes iônicas durante a DA

KAGER *et al.* (2000) modelaram as correntes de Na^+ dependentes de potenciais transitório e persistentes e correntes controladas por receptores NMDA. Segundo os autores, correntes contínuas que penetram na membrana neuronal podem sustentar crises epilépticas e a DA. Um único neurônio, dividido em dendrito e soma, foi envolvido por um meio extracelular onde ocorre a movimentação de K^+ e Na^+ , cujos gradientes são restaurados por meio de uma bomba de Na^+ e K^+ . Além disso, $[K^+]_o$ foi controlada por uma função de reabsorção que mimetiza fenomenologicamente o comportamento das glias, que acumulam K^+ em seu interior através do mecanismo de *spatial buffering*. Nesse modelo, a DA poderia ser produzida de duas maneiras: por uma corrente NMDA dendrítica ou por uma corrente persistente de Na^+ .

O modelo incorporou correntes passivas proporcionais a uma condutância de *leakage* (g_{leak}) para Na^+ e K^+ ($I_{leak,Na}$ e $I_{leak,K}$) e uma corrente de *leakage* fixa ($I_{leak,f}$) para estabilizar o potencial de membrana:

$$I_{leak,Na} = g_{leak,Na} \cdot (Vm - E_{Na}), \quad (3.18)$$

$$I_{leak,K} = g_{leak,K} \cdot (Vm - E_K), \quad (3.19)$$

$$I_{leak,f} = g_{leak,f} \cdot (Vm + 70), \quad (3.20)$$

onde E_{Na} e E_K são os potenciais de Nernst de Na^+ e K^+ , respectivamente, e Vm o potencial de membrana.

Os autores utilizaram as equações clássicas do modelo de HODGKIN e HUXLEY (1952) para descrever as condutâncias dependentes de potencial e expressões para descrever as transições dependentes de potencial de primeira ordem m , n e h baseadas num modelo de células piramidais descritos por TRAUB *et al.* (1994). A descrição das várias correntes de ativação na membrana foi feita por meio da equação de GHK de corrente:

$$I_{GHK}([Ion]_i, [Ion]_o, Vm) = P_o \cdot \frac{z_{ion}^2 \cdot F^2 \cdot Vm}{R \cdot T} \cdot \frac{[Ion]_i - [Ion]_o \cdot e^{\left(\frac{-z_{ion} \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{-z_{ion} \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}}, \quad (3.21)$$

onde $[Ion]_i$ e $[Ion]_o$ são as concentrações intra- e extracelulares, respectivamente.

A dependência de potencial descrita por HODGKIN e HUXLEY (1952) foi incorporada da seguinte maneira:

$$I_{Ion}(Vm, t) = g_{max} \cdot Gates\{m(Vm, t), n(Vm, t), h(Vm, t)\} \cdot I_{GHK}, \quad (3.22)$$

onde $Gates\{m(Vm, t), n(Vm, t), h(Vm, t)\}$ descreve a dependência da corrente dos fatores de ativação e/ou inativação. As variáveis n , m e h são soluções de equações diferenciais de primeira ordem, cujos coeficientes são funções instantâneas do potencial Vm e são utilizadas para modular a permeabilidade na equação de GHK de corrente.

Seis correntes de ativação foram incorporadas nos moldes da equação 3.22, sendo elas:

1. corrente transiente de Na^+ , $I_{Na,T}$, com $Gates(m, n, h) = m^3 \cdot h$;
2. corrente persistente de Na^+ , $I_{Na,P}$, com $Gates(m, n, h) = m^2 \cdot h$;
3. corrente de Na^+ mediada por NMDA, $I_{Na,NMDA}$, com $Gates(m, n, h) = m \cdot h$;
4. corrente retificadora de K^+ de atraso, $I_{K,DR}$, com $Gates(m, n, h) = n^2$;
5. corrente transiente de K^+ , $I_{K,A}$, com $Gates(m, n, h) = m^2 \cdot h$;
6. corrente de K^+ mediada por NMDA, $I_{K,NMDA}$, com $Gates(m, n, h) = m \cdot h$.

No cálculo das correntes mediadas por NMDA, foi incluído um termo para representar o bloqueio por ions de Mg^{2+} que é dependente de potencial. Esse termo é um divisor da equação de corrente dado por $1 + 0,33 \cdot [\text{Mg}^{2+}]_o \cdot e^{-(0,07 \cdot V_m + 0,7)}$.

Para restaurar o balanço iônico, foi implementada uma bomba de Na^+ e K^+ estimulada pela $[\text{K}^+]_o$ e pela $[\text{Na}^+]_i$ de acordo com as seguintes relações (LÄUGER, 1991):

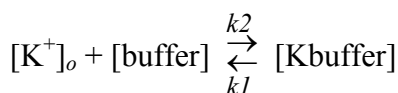
$$I_K = -2 \cdot I_{\max} \cdot A \quad (3.23)$$

$$I_{Na} = 3 \cdot I_{\max} \cdot A \quad (3.24)$$

$$A = \left(1 + \frac{Km_K}{[\text{K}^+]_o}\right)^{-2} \cdot \left(1 + \frac{Km_{Na}}{[\text{Na}^+]_i}\right)^{-3}, \quad (3.25)$$

onde Km_K e Km_{Na} são constantes.

O seqüestro de K^+ extracelular pelas glias foi representado fenomenologicamente por meio do seguinte esquema:



onde $k1$ é uma constante de retorno e $k2$, uma constante de avanço, dadas por:

$$k1 = 0,0008 \quad (3.26)$$

$$k2 = \frac{k1}{1 + e^{\left(\frac{[K^+]_o - 15}{-1,09}\right)}}, \quad (3.27)$$

onde [buffer] e [Kbuffer] são, respectivamente, o *buffer* livre e o *buffer* ocupado.

A distribuição dos diversos componentes de corrente entre os elementos do modelo é mostrada na Figura 3.3.

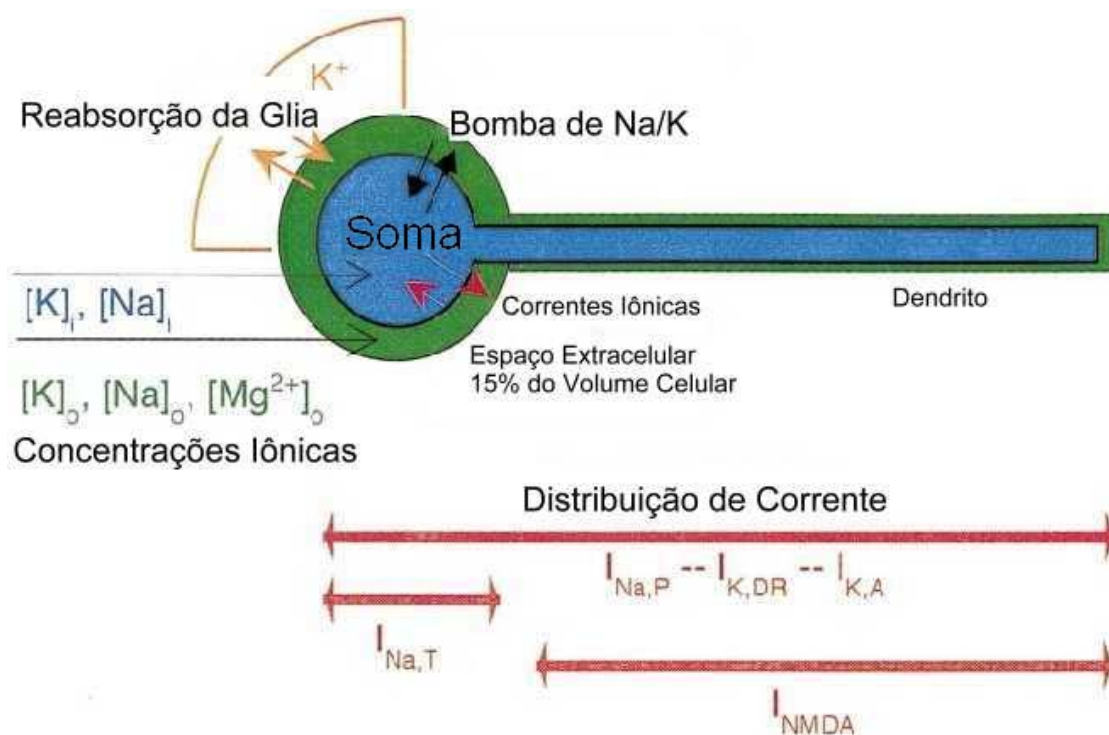


Figura 3.3 – Diagrama esquemático dos principais constituintes do modelo e da distribuição dos elementos de corrente transmembrânica: corrente transiente de Na^+ ($I_{Na,T}$), corrente permanente de Na^+ ($I_{Na,P}$), corrente retificadora de K^+ ($I_{K,DR}$), corrente transitória de K^+ ($I_{K,A}$) corrente mediada por receptores NMDA (I_{NMDA}), fluxos iônicos ativos e passivos e concentração (adaptado de KAGER *et al.*, 2000).

KAGER *et al.* (2000) utilizaram um modelo de célula baseada na reconstrução de neurônios presentes na região CA1 do hipocampo de ratos jovens adultos (Figura 3.4).

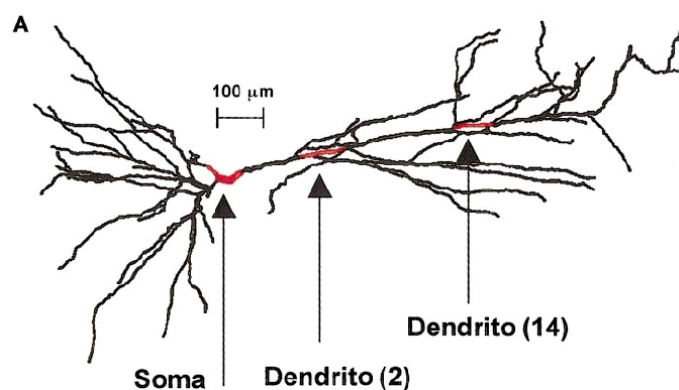


Figura 3.4 – Modelo geométrico de neurônio baseado na região CA1 do hipocampo de ratos (adaptado de KAGER *et al.*, 2000).

Vários testes foram executados em neurônios simplificados constituídos por um único compartimento somático com ramificações dendríticas dispersas anexadas. O neurônio foi representado por 201 compartimentos e implementado no ambiente de simulação NEURON (HINES e CARNEVALE, 1997).

O modelo é favorável à hipótese dual de VAN HARREVELD (1978) que defende a ação conjunta do K^+ e do glutamato na propagação de ondas de DA. Os autores sugerem que apenas um neurônio é capaz de produzir processos fisiopatológicos auto-sustentados durante uma crise epiléptica ou a DA.

A característica tudo ou nada da despolarização de DA simulada é similar à DA experimental. A deflagração da DA acontece quando os níveis de $[K^+]_o$ excedem 8 mM.

Embora o comportamento do modelo, em muitos aspectos, tenha reproduzido resultados experimentais, o mesmo não foi capaz de emular várias características dos neurônios. As velocidades de propagação estimadas em registros dendríticos do modelo, por exemplo, são bem mais rápidas do que a velocidade de propagação da DA no cérebro.

Uma outra deficiência do modelo foi a ausência de difusão lateral. A difusão iônica poderia suavizar as transições bruscas no tempo e espaço. A inclusão dos ions de Ca^{2+} e Cl^- poderia contribuir para balanço de cargas e difusão espacial.

Posteriormente, KAGER *et al.* (2002), acrescentaram o Cl^- e ânions intracelulares impermeáveis de forma a preservar a eletroneutralidade das soluções e para que fosse possível avaliar o efeito da osmolaridade. Diferente do modelo anterior, foi implementado um sistema de *buffer* iônico, presente nas glias, através de um compartimento delimitado por uma membrana em contato com o meio extracelular e a

difusão extracelular de ions foi considerada. As propriedades elétricas passivas passaram a ser calculadas por meio da equação de GHK de corrente, ao invés da aplicação da lei de Ohm, como em 3.18, 3.19 e 3.20.

Nesse modelo, os autores tentaram identificar as condições para a deflagração da onda de DA, apontando como condição crítica a ativação de uma corrente persistente de membrana de entrada nos dendritos apicais. Essa condição ocorria quando:

$$(I_{Na,P} + I_{NMDA} + I_{Na,leak}) > (I_{K,DR} + I_{Na,Kpump} + I_{K,leak}) \quad (3.28)$$

Este modelo, embora mais completo, ainda não incorpora certos tipos de transporte presentes em tecidos cerebrais, efeitos de eletrodifusão no meio extracelular. Além disso, o modelo considera um único neurônio, enquanto que a DA é um fenômeno que envolve a participação de vários neurônios. Mais notável é a ausência de Ca^{2+} , importante na liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos

III.6 – Modelo de DA envolvendo a atuação de *gap-junctions* e de forças osmóticas

O modelo computacional de DA desenvolvido por SHAPIRO (2001) baseia-se em experimentos recentes que sugerem que as *gap-junctions* podem ser necessárias para a propagação da onda de DA (MARTINS-FERREIRA e RIBEIRO, 1995, NEDERGAARD *et al.*, 1995, LARGO *et al.*, 1996). As movimentações iônicas através de um sincício neuronal de células conectadas por *gap-junctions* são descritas por meio de mecanismos de eletrodifusão. A difusão extracelular é modelada, mas as simulações mostram que esse movimento é menos significativo do que outros componentes do modelo. O tecido cortical é descrito como um meio unidimensional contínuo, para a redução do esforço computacional, com dois compartimentos, representando o meio intracelular e o meio extracelular. O compartimento do meio intracelular representa um sincício de neurônios conectados por *gap-junctions*. Os compartimentos do meio extracelular representam a região preenchida com fluido entre duas células no neurópilo. O espaço ocupado por células não neuronais não é modelado, embora a atividade de glia, que normalmente mantém a homeostase extracelular, esteja incluída. Um diagrama esquemático do modelo é apresentado na Figura 3.5.

As concentrações intracelular, $[C]_i$, e extracelular $[C]_o$ de cada íon foram descritas por uma equação de eletrodifusão generalizada para cada um dos meios:

$$\begin{aligned}\frac{\partial [C]_i}{\partial t} &= D_{C,i} \cdot \frac{\partial^2 [C]_i}{\partial x^2} + \frac{z \cdot F}{R \cdot T} \cdot \frac{\partial}{\partial x} \cdot \left([C]_i \cdot D_{C,i} \cdot \frac{\partial Vm}{\partial x} \right) - \kappa \cdot J_{C,m} + s_C, \\ \frac{\partial [C]_o}{\partial t} &= D_{C,o} \cdot \frac{\partial^2 [C]_o}{\partial x^2} + \frac{\kappa \cdot f}{1-f} \cdot J_{C,m} - J_{c,glia}\end{aligned}\quad (3.29)$$

onde D_C é a constante de difusão do íon C , κ é a área de superfície dendrítica média, $J_{C,m}$ é o somatório das diversas correntes de membrana relativas a cada íon C e de bombas, s_C modela uma fonte intercelular de Ca^{2+} , f é a fração de volume neuronal e $J_{c,glia}$ descreve o seqüestro glial. O potencial de membrana Vm é calculado por meio de uma equação GHK de potencial. Uma parte das correntes segue o formalismo estabelecido por HODGKIN e HUXLEY (1952), cuja equação geral, semelhante à equação 3.22, é dada por:

$$J_C(Vm,t) = g_{\max} \cdot Gates\{m(Vm,t), h(Vm,t)\} \cdot (Vm - V_C) \quad (3.30)$$

Oito correntes de ativação foram incorporadas nos moldes da equação 3.30, sendo elas.

- três correntes de K^+ dependentes de potencial (VGKC): corrente transitória (J_A , onde $Gates(m,h) = m \cdot h$), correntes que fluem pelo canal muscarínico (J_M , onde $Gates(m,h) = m$) e corrente lenta retificadora (J_{DR} , onde $Gates(m,h) = m^2 \cdot h$);
- três correntes de K^+ ativadas por Ca^{2+} (K(Ca)) que passam por canais de condutância elevada (J_{BK} , onde $Gates(m,h) = m$), que é tanto dependente de potencial, quanto de Ca^{2+} , canais de condutância intermediária (J_{IK} , onde $Gates(m,h) = m$) e canais de baixa condutância (J_{SK} , onde $Gates(m,h) = m^2$);
- duas correntes de Na^+ dependentes de potencial (VGNaC), com uma componente rápida (J_F , onde $Gates(m,h) = m \cdot h$) e outra persistente (J_p , onde $Gates(m,h) = m$);

Oito correntes de ativação foram incorporadas nos moldes da equação de GHK de corrente (3.21 ou 3.22), sendo elas:

- correntes iônicas de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} ativadas por NMDA (J_{NMDA}), que incluem termos que modelam a dependência de glutamato e o bloqueio dependente de potencial por ions Mg^{2+} ;
- correntes de “leak” ou fuga de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (J_{leak});
- duas correntes de Ca^{2+} dependentes de potencial (VGCC, onde $Gates(m,h) = m \cdot h$), uma ativada em potenciais de membrana elevados (J_{HVA}) e outra em potenciais de membrana mais baixos (J_{LVA});

A bomba Na,K-ATPase é descrita pelo modelo analítico proposto por LEMIEUX *et al.* (1992) para o músculo cardíaco. O modelo incorpora ainda uma bomba Ca-ATPase, descrita por uma equação de Michaelis-Menten (DIPOLLO e BEAUGÉ, 1979, DE SCHUTTER e SMOLEN, 1998), um trocador Na,Ca proposto por DI FRANCESCO e NOBLE (1985), um trocador HCO_3, Cl , descrito por uma equação de Michaelis-Menten, e canais ativados por meio de distensão da membrana.

Os mecanismos de *buffering* de Ca^{2+} , presentes no retículo endoplasmático, são modelados de acordo com os modelos descritos por KEENER e SNEYD (1998) e ATRI *et al.* (1993).

O modelo conta ainda com a descrição da regulação da homeostase feito pelas glias. Os níveis de K^+ e Na^+ são mantidos com um trocador Na,K e um co-transporte NKCC, descrito por uma função de Michaelis-Menten. A homeostase de Cl^- é mantida por meio de um trocador HCO_3, Cl .

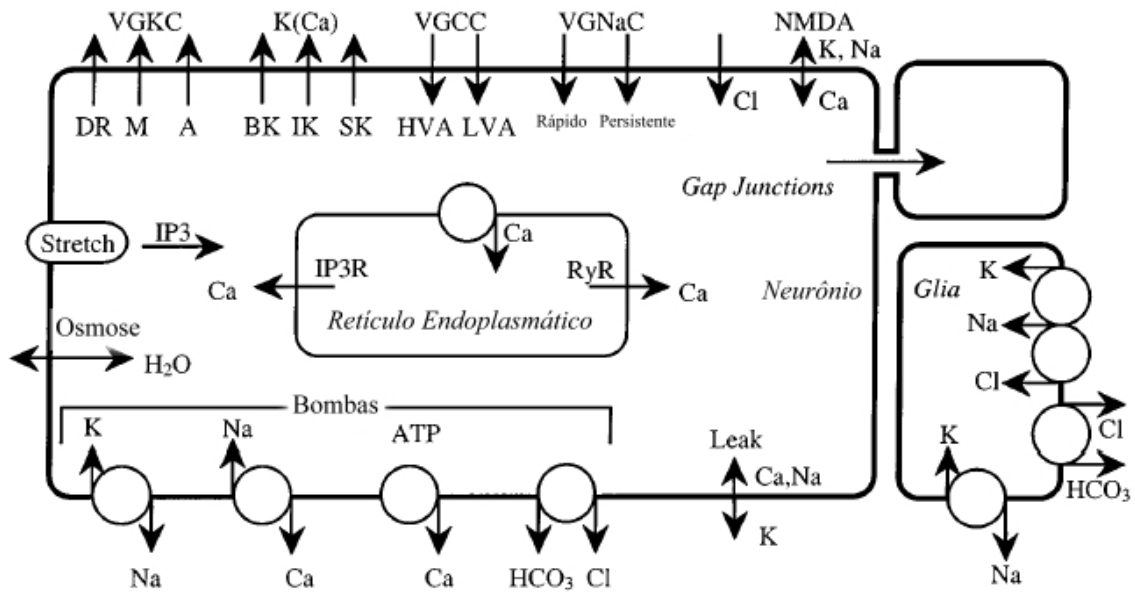


Figura 3.5 – Diagrama esquemático do modelo de DA proposto por SHAPIRO (2001).

Como resultado, o modelo apresenta a propriedade de que as ondas são independentes do estímulo aplicado, sendo deflagradas acima de um determinado limiar. Foi possível registrar uma velocidade de onda em torno de 5,9 mm/min, dentro dos limites observados experimentalmente. Por esse modelo, a difusão extracelular não é necessária para a propagação da onda. O autor não inclui no modelo a tortuosidade do meio extracelular por observar que esta variável não é fundamental para os resultados.

A expansão osmótica é necessária para que haja a DA na simulação. As simulações prevêm que a DA só ocorrerá se as células puderem se expandir em resposta a um aumento de pressão osmótica e se o K^+ puder se movimentar através das *gap-junctions*.

III.7 – Modelo de eletrodifusão extracelular e terminais sinápticos para DA

O modelo proposto por ALMEIDA *et al.* (2004) consiste de três compartimentos: o espaço intersticial, onde a movimentação iônica é descrita por mecanismos de eletrodifusão, e os meios intracelulares pré- e pós-sinápticos, onde são descritas as dinâmicas transmembrânicas. Esses meios interagem entre si e constituem a unidade funcional do modelo. A distribuição volumétrica dessas unidades representa o tecido neuronal.

Baseados na hipótese de que a negatividade do potencial extracelular é

parcialmente devido a um potencial de Nernst ao longo do meio extracelular (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000), ALMEIDA *et al.* (2004) consideraram que o campo elétrico extracelular poderia influenciar a dinâmica iônica neste meio. Neste caso, os fluxos iônicos extracelulares foram representados por duas componentes: uma produzida pelo gradiente de concentração (difusão iônica) e outra devida ao campo elétrico, $\vec{\nabla}V$, onde V é o potencial extracelular. A partir da segunda Lei de Fick e da equação de Nernst-Planck, obteve-se a densidade de corrente no meio extracelular, \vec{I}_C , considerando-se os dois efeitos em relação a uma espécie iônica C (onde $C = \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}$ ou Cl^-):

$$\vec{I}_C = -z_C F \frac{D_C}{\lambda^2} \vec{\nabla}[C]_o - \frac{z_C^2 F^2}{RT} \frac{D_C}{\lambda^2} [C]_o \vec{\nabla}V, \quad (3.31)$$

onde $[C]_o$ é a concentração extracelular de C , com valência z_C e coeficiente de difusão D_C , $\lambda = 1,6$ é a tortuosidade do meio extracelular, $F = 96,487 \text{ C/mMol}$ é a constante de Faraday, $T = 310 \text{ K}$ é a temperatura absoluta, $R = 8,314 \text{ mV}\cdot\text{C}/(\text{K}\cdot\text{mMol})$ é a constante universal dos gases.

A variação temporal de concentração iônica foi descrita em função da densidade de corrente iônica de acordo com a seguinte relação:

$$\frac{\partial[C]_o}{\partial t} = -\frac{1}{z_C F} \vec{\nabla} \cdot \vec{I}_C, \quad (3.32)$$

de (3.31) e (3.32) obteve-se a equação que governa as alterações temporais na concentração iônica espacial do íon C , considerando os efeitos da difusão e do campo elétrico:

$$\frac{\partial[C]_o}{\partial t} = \frac{D_C}{\lambda^2} \nabla^2 [C]_o + \frac{z_C F D_C}{RT \lambda^2} \vec{\nabla}[C]_o \cdot \vec{\nabla}V + \frac{z_C F D_C}{RT \lambda^2} [C]_o \nabla^2 V. \quad (3.33)$$

Uma questão abordada por ALMEIDA *et al.* (2004) refere-se quanto ao estabelecimento do potencial extracelular V em função da distribuição das espécies iônicas. No caso da membrana celular, o potencial transmembrânico, de acordo com a

equação de GHK, é baseado no balanço das correntes iônicas transmembrânicas. O princípio desse balanço é a nulidade do somatório das correntes iônicas. A equação de GHK é, na verdade, uma extensão da equação de Nernst para membranas permeáveis a mais de uma espécie iônica. De modo similar, o equilíbrio dinâmico é estabelecido quando o fluxo iônico total através da membrana é nulo. Assim, para um modelo que envolve as concentrações de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , utilizando a equação 3.31, a corrente para cada íon pode ser estimada e o equilíbrio dinâmico pode ser considerado como sendo o somatório dessas correntes iônicas igual a zero, ou seja:

$$\begin{aligned}
& -z_{Na}F \frac{D_{Na}}{\lambda^2} \left(\bar{\nabla}[Na^+]_o + \frac{z_{Na}F}{RT} [Na^+]_o \bar{\nabla}V \right) - \\
& -z_KF \frac{D_K}{\lambda^2} \left(\bar{\nabla}[K^+]_o + \frac{z_KF}{RT} [K^+]_o \bar{\nabla}V \right) - \\
& -z_{Cl}F \frac{D_{Cl}}{\lambda^2} \left(\bar{\nabla}[Cl^-]_o + \frac{z_{Cl}F}{RT} [Cl^-]_o \bar{\nabla}V \right) - \\
& -z_{Ca}F \frac{D_{Ca}}{\lambda^2} \left(\bar{\nabla}[Ca^{2+}]_o + \frac{z_{Ca}F}{RT} [Ca^{2+}]_o \bar{\nabla}V \right) = \bar{0}.
\end{aligned} \tag{3.34}$$

A partir da equação 3.34, foi possível explicitar o gradiente de potencial, dado por

$$\bar{\nabla}V = -\frac{RT \sum_{C=1}^4 z_C D_C \bar{\nabla}[C]_o}{F \sum_{C=1}^4 z_C^2 D_C [C]_o}, \tag{3.35}$$

onde C refere-se à espécie iônica. O potencial extracelular V , para cada compartimento extracelular, foi calculado integrando-se $\bar{\nabla}V$ a partir de uma referência remota.

Ao contrário de TUCKWELL e MIURA (1978) que admitiram os potenciais das membranas pré- e pós-sinápticas como sendo iguais, neste modelo ambos os terminais foram explicitamente representados. Nas membranas pré-sinápticas, a permeabilidade de Ca^{2+} , $P_{Ca,pre}$, é dependente do potencial transmembrânico, tendo sido calculada de acordo com a seguinte sigmóide:

$$P_{Ca,pre} = p_o (1 - \tanh(p_g (Vm_{pre} + V_g))), \tag{3.36}$$

com $p_o = 0,039$ cm/s, $p_g = 0,11$ mV⁻¹ e $V_g = 45,0$ mV. Essa equação é similar à equação utilizada por TUCKWELL e MIURA (1978). Vm_{pre} é o potencial transmembrânico do terminal pré-sináptico. As permeabilidades dos outros ions foram consideradas constantes, sendo no terminal pós-sináptico moduladas pela liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, que por sua vez são liberados em função do influxo de Ca²⁺ no terminal pré-sináptico (Φ_{mCa}). Dessa forma, a permeabilidade, $P_{C,pst}$, do íon C no terminal pós-sináptico foi obtida por meio de:

$$P_{C,pst} = p_{C,pst} \Phi_{Ca,pre} \quad (3.37)$$

onde $p_{C,pst}$ é uma constante de permeabilidade máxima que envolve o parâmetro de área.

A corrente iônica transmembrânica, I_C , em ambos os terminais foi calculada a partir da equação de corrente de GHK (HILLE, 1992).

$$I_C = P_C z_C^2 \frac{VmF^2}{RT} \frac{[C]_i - [C]_o \exp\left(-z_C \frac{FVm}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-z_C \frac{FVm}{RT}\right)} \quad (3.38)$$

onde P_C é a permeabilidade do íon C e V_m o potencial transmembrânico.

Multiplicando-se a equação 3.38 por $1/(z_C F)$, obtém-se a equação de “fluxo de GHK”:

$$\phi_C = P_C z_C \frac{VmF}{RT} \frac{[C]_i - [C]_o \exp\left(-z_C \frac{FVm}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-z_C \frac{FVm}{RT}\right)} \quad (3.39)$$

A acumulação e a diminuição dos ions nos meios intra- e extracelulares foram balanceadas por uma bomba baseada em TUCKWELL e MIURA (1978). Essa bomba foi ajustada para cobrir a ação global das bombas de Na⁺ e K⁺, bombas de Ca²⁺, mecanismos de co-transporte e o mecanismo de seqüestro de K⁺ feito por células gliais. A estrutura geral da bomba foi representada por:

$$\phi_C^P = f_C \left(1 - \exp(-r_C ([C]_{o,i} - [C_r]_{o,i})) \right) + \phi_C^*, \quad (3.40)$$

onde ϕ_C^P é o fluxo iônico devido ao bombeamento, f_C é o fator de multiplicação da bomba, ϕ_C^* o fator de regime permanente da bomba, r_C a constante de tempo e $[C_r]$ é a concentração extra- (*o*) ou intracelular (*i*) no repouso.

O fluxo iônico através das membranas sinápticas é dependente do potencial transmembrânico correspondente, como visto nas equações 3.36 e 3.39. A membrana é considerada como sendo permeável aos ions de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Uma extensão da equação de GHK foi deduzida baseando-se na equação 3.38 e assumindo-se que o somatório das correntes iônicas sob condições de equilíbrio dinâmico é zero, tal como feito na equação 3.34. A equação obtida e implementada no modelo foi:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{B - A + \sqrt{(A - B)^2 + 4(A + C)(D + B)}}{2(A + C)}, \quad (3.41)$$

onde

$$A = P_{Na} [Na^+]_i + P_K [K^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o,$$

$$B = P_{Na} [Na^+]_o + P_K [K^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i,$$

$$C = 4P_{Ca} [Ca^{2+}]_i,$$

$$D = 4P_{Ca} [Ca^{2+}]_o.$$

As alterações nas concentrações intracelulares de cada íon foram descritas por:

$$\frac{\partial [C]_{pre}}{\partial t} = -\frac{2\alpha}{1-\alpha} [\phi_{C,pre} + \phi_{C,pre}^P], \quad (3.42)$$

$$\frac{\partial [C]_{pos}}{\partial t} = -\frac{2\alpha}{1-\alpha} [\phi_{C,pos} + \phi_{C,pos}^P], \quad (3.43)$$

onde $\alpha = 0,2$ é a fração de volume, e os índices *pré-* e *pós* representam, respectivamente, a variável correspondente calculada para o terminal pré- e pós-sináptico.

Para o meio extracelular, as alterações nas concentrações iônicas foram descritas

pela eletrodifusão e pelos fluxos iônicos correspondentes e os mecanismos de balanço iônico, resultando em:

$$\frac{\partial [C]_o}{\partial t} = \frac{D_c}{\lambda^2} \nabla^2 [C]_o + \frac{z_c F D_c}{RT \lambda^2} \vec{\nabla} [C]_o \cdot \vec{\nabla} V + \frac{z_c F D_c}{RT \lambda^2} [C]_o \nabla^2 V + \phi_{C,pre} + \phi_{C,pos} + \phi_{C,pre}^P + \phi_{C,pos}^P \quad (3.44)$$

Com esse modelo, ALMEIDA *et al.* (2004) conseguiram reproduzir, pela primeira vez, a propagação do potencial extracelular, uma das principais características da DA, em velocidades observadas experimentalmente. As curvas das dinâmicas iônicas extracelulares também foram reproduzidas dentro do observado experimentalmente. Além disso, a estrutura tridimensional do modelo permitiu a comparação das ondas de DA simuladas com aspectos do sinal intrínseco óptico.

No entanto, o modelo não prevê o detalhamento dos mecanismos de recuperação iônica, como a atuação de glias, mecanismos de bombeamento iônico, co-transporte e uma descrição dos mecanismos de neurotransmissão. A ausência desse detalhamento impede a reprodução do período refratário. Acredita-se que, com essas descrições, seja possível a simulação completa da forma da onda de DA.

Capítulo IV – Descrição da estrutura do modelo de DA

Neste capítulo, será apresentada uma visão geral da estrutura do modelo proposto neste trabalho, tendo como base o modelo apresentado por ALMEIDA *et al.* (2004). Na Figura 4.1, tem-se o diagrama esquemático da **unidade funcional** do modelo de DA proposta.

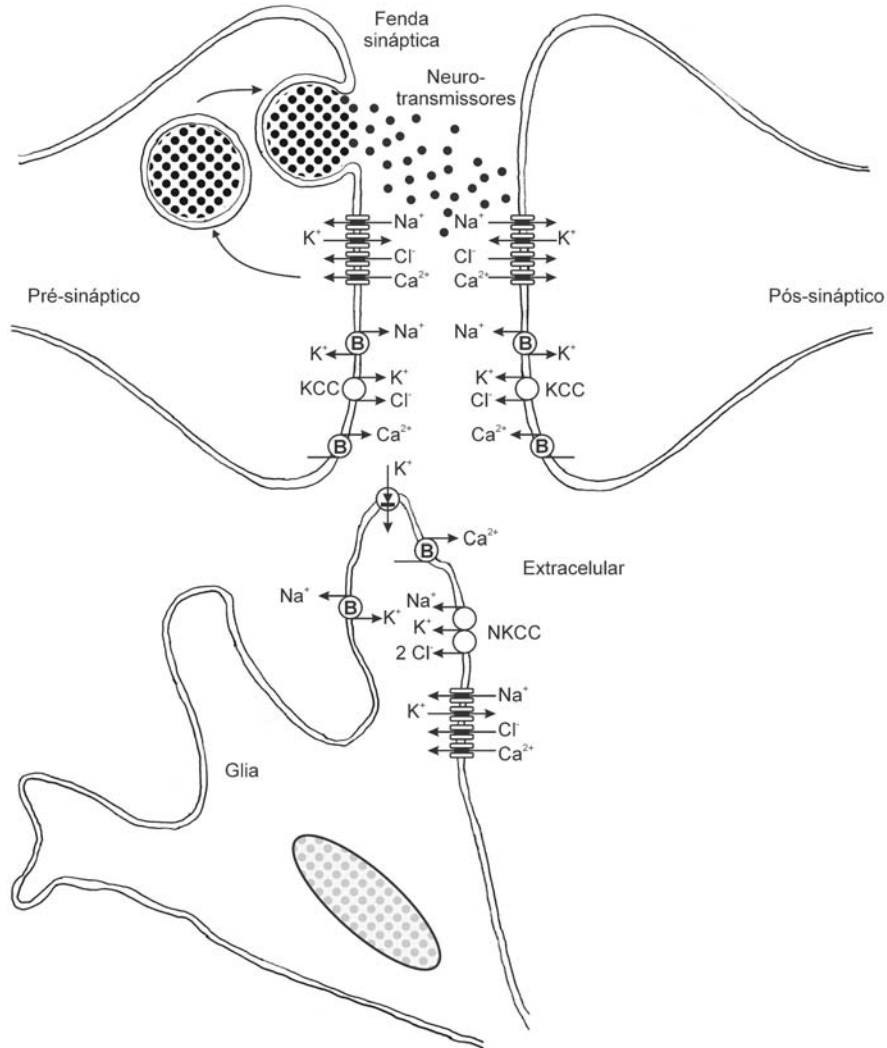


Figura 4.1 – Diagrama esquemático da unidade funcional do modelo de DA para terminais sinápticos, que tem como base o modelo proposto por ALMEIDA *et al.* (2004). A letra **B**, envolta por um círculo, representa a bomba Na,K -ATPase ou a bomba Ca -ATPase. Os canais iônicos são representados por um par de retângulos adjacentes. Um círculo vazio representa o co-transporte KCC. Dois círculos vazios adjacentes representam o co-transporte NKCC. O símbolo de retificação dentro de um círculo representa o canal retificador de K^+ da glia.

Diferente de ALMEIDA *et al.* (2004) e de TUCKWELL e MIURA (1978), a permeabilidade de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico foi descrita segundo o modelo proposto por CHAY (1996), baseando em HODGKIN e HUXLEY (1952). Assim,

$$P_{\text{Ca},pre} = p_{\text{Ca}} \cdot m_1^3 \cdot h_1 \quad (4.1)$$

$$\frac{dm_1}{dt} = \alpha_{m1} \cdot (1 - m_1) - \beta_{m1} \cdot m_1$$

$$\frac{dh_1}{dt} = \alpha_{h1} \cdot (1 - h_1) - \beta_{h1} \cdot h_1,$$

onde p_{Ca} é a constante de permeabilidade máxima de Ca^{2+} . α_{m1} , β_{m1} , α_{h1} , e β_{h1} são as taxas de transferência entre os meios intra- e extracelulares e foram calculadas por meio de:

$$\alpha_{m1} = \frac{0,1 \cdot (Vm_{pre} + 25)}{e^{\left(\frac{Vm_{pre} + 25}{5}\right)} - 1} \quad (4.2)$$

$$\beta_{m1} = 4 \cdot e^{\frac{Vm_{pre}}{9}} \quad (4.3)$$

$$\alpha_{h1} = 0,07 \cdot e^{\frac{Vm_{pre}}{20}} \quad (4.4)$$

$$\beta_{h1} = \frac{1}{e^{\left(\frac{Vm_{pre} + 30}{10}\right)} + 1} \quad (4.5)$$

O fluxo de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico foi obtido da mesma forma que na equação 3.39. As concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- foram mantidas constantes e as permeabilidades fixas em um valor que permita o potencial de membrana se estabelecer em torno de -65 mV à -70 mV. O influxo de Ca^{2+} é o gatilho para o mecanismo de liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, o qual é detalhado no Capítulo VIII. A presença de neurotransmissores na fenda sináptica provoca a modulação das permeabilidades pós-sinápticas, conforme equação 3.37. A partir dos valores das permeabilidades, os fluxos nos terminais pós-sinápticos foram calculados de acordo com a equação 3.39. Os mecanismos fenomenológicos de regulação dos gradientes iônicos adotados por ALMEIDA *et al.* (2004) foram substituídos pelas descrições

fisiológicas da bomba Na,K-ATPase e da bomba Ca-ATPase (Capítulo V), mecanismos de co-transporte (Capítulo VI) e canais retificadores de entrada de K^+ (Capítulo VII).

Para representar a camada IPL da retina de aves, uma matriz tridimensional de compartimentos foi constituída por quinze planos sobrepostos com 201×201 compartimentos, com cada compartimento possuindo $10,5 \mu\text{m}$ de aresta. O passo de iteração Δt foi fixado em 2×10^{-2} s, respeitando a precisão numérica e estabilidade do processo iterativo (Figura 4.2).

Os compartimentos nos nove planos centrais foram constituídos com a unidade funcional do modelo, incluindo o meio extracelular e os meios intracelulares dos terminais pré- e pós-sinápticos e glias. Para representar as camadas que delimitam a IPL nos dois níveis, acima e abaixo dos planos centrais, foi descrito apenas o meio extracelular. Cobrindo toda a estrutura, foram acrescentados dois planos de compartimentos constituídos apenas de meio extracelular, com concentrações iônicas constantes, de forma a se representar o efeito de uma solução de perfusão. A aplicação do estímulo foi feita no plano central da rede. Os resultados apresentados referem-se ao compartimento 51, na linha central do plano de observação.

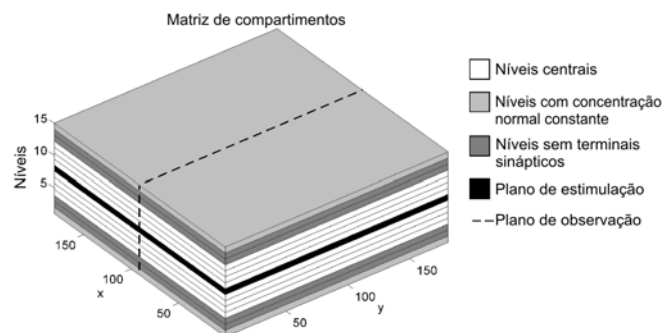


Figura 4.2 – Representação esquemática da IPL consistindo de quinze planos ou níveis com 201×201 compartimentos cada. Os planos mais externos, em cinza claro, representam as camadas que estão em contato direto com a solução de perfusão. Os planos mais internos, em cinza escuro, possuem apenas compartimentos representativos do meio extracelular. Os planos centrais, em branco, são compostos por compartimentos divididos em quatro subcompartimentos: o meio intracelular dos terminais pré- e pós-sinápticos, o meio intracelular das glias e o meio extracelular. O estímulo foi aplicado, no plano em preto (plano de estimulação), por meio de uma distribuição Gaussiana de K^+ . A linha pontilhada delimita um plano perpendicular aos níveis para observação da propagação da onda de DA (plano de observação).

O modelo foi inicializado com as concentrações normais de cada meio (Tabela 4.1). As simulações foram repetidas com passos de iteração diferentes para se verificar a ocorrência de instabilidade ou se a precisão numérica poderia afetar os resultados. Para se determinar o passo de iteração, Δt , ótimo, testou-se valores entre 10^{-5} a 10^{-1} s sendo $\Delta t = 0,02$ s o melhor compromisso de forma a se evitar a propagação de erro numérico e, ao mesmo tempo, reduzir o esforço computacional por meio da redução do número de iterações.

Tabela 4.1 – Valores das concentrações normais no meio extracelular, terminais sinápticos e glias

Íon	Concentração no extracelular (mM)	Concentração nos terminais sinápticos (mM)	Concentração nas glias (mM)
Na ⁺	142,0	18,4	18,4
K ⁺	4,0	140,0	98,0
Cl ⁻	103,0	16,21	16,21
Ca ²⁺	1,2	0,05	0,05

Na Figura 4.3, tem-se um diagrama esquemático da descrição matemática do meio extracelular, que se encontra detalhado em ALMEIDA *et al.* (2004). A entrada do sistema representa um estímulo experimental para a deflagração da onda de DA (1). A partir dos valores de concentração (2) e da distância entre os compartimentos, obtém-se o valor do gradiente de concentração (3), do qual se extrai o valor do Laplaciano de concentração (4). O gradiente de potencial é calculado em função do gradiente de concentração de cada um dos ions (5). Por meio do gradiente de potencial, calculam-se a distribuição de potencial no meio extracelular (6) e o Laplaciano de potencial (7). O Laplaciano de concentração é utilizado para o cálculo da difusão (8). O efeito de campo elétrico é função do produto entre o gradiente de concentração e o gradiente de potencial, juntamente com o produto entre a concentração e o Laplaciano de potencial (9). A eletrodifusão é a superposição dos efeitos de difusão e campo elétrico (10). Após o cálculo da eletrodifusão, as concentrações iônicas são atualizadas (11).

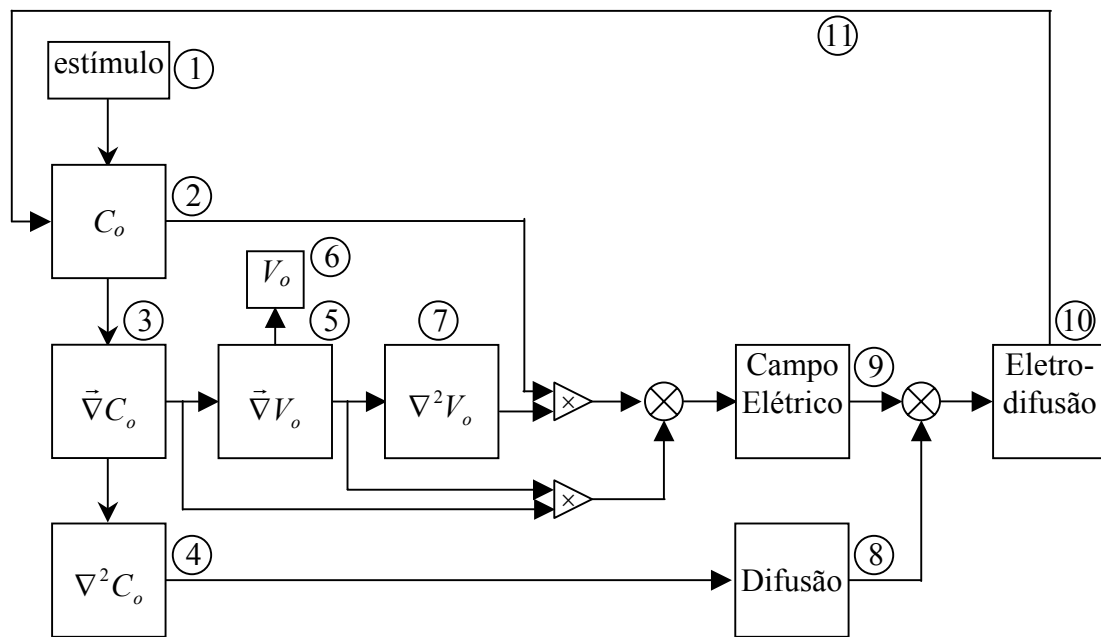


Figura 4.3 – Diagrama simplificado do algoritmo para o cálculo da eletrodifusão no meio extracelular.

A interface do meio extracelular com o meio intracelular dos terminais sinápticos e das glias, através da membrana, é mostrada esquematicamente na Figura 4.4. Após a aplicação do estímulo no meio extracelular, com os valores de concentração intra- e extracelulares e das permeabilidades, calculam-se os potenciais transmembrânicos dos terminais e das glias (1). No caso dos terminais, o próximo passo é o cálculo da permeabilidade de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico, que é dependente do potencial transmembrânico (2). Com esse valor, obtém-se o fluxo de Ca^{2+} pré-sináptico (3). O aumento da concentração pré-sináptica de Ca^{2+} é responsável pela liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, modulando, assim, as permeabilidades pós-sinápticas (4). Nas glias, assumiu-se que as permeabilidades são fixas, não se aplicando os passos (2), (3) e (4). Com os valores de permeabilidade, determinam-se os fluxos iônicos (5). Em seguida, calculam-se os fluxos devido à atuação da bomba Na,K-ATPase e da bomba Ca-ATPase (6) e, no caso da glia, a atuação do canal retificador de K^+ . O efeito eletrogênico das bombas sobre o potencial transmembrânico é considerado (7). Em função das concentrações, calcula-se o fluxo devido aos mecanismos de co-transporte (8), sendo o KCC nos terminais e o NKCC nas glias. Por último, atualizam-se

as concentrações em função dos fluxos através dos canais e dos mecanismos de recuperação iônica (9).

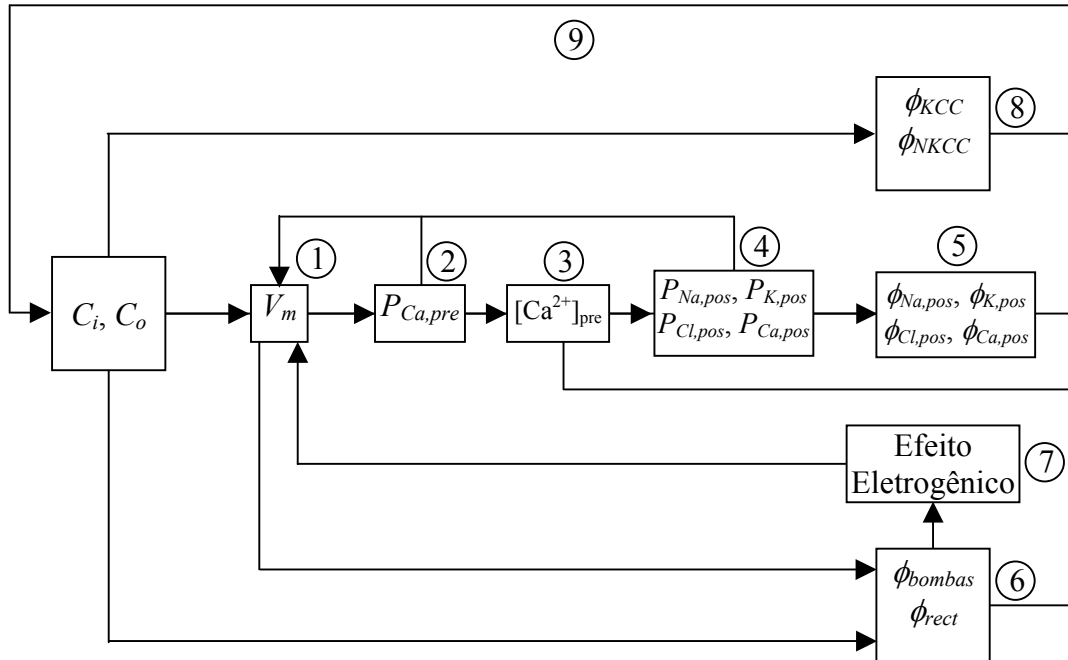


Figura 8.4 - Diagrama simplificado do algoritmo para o cálculo dos fluxos transmembrânicos nos terminais sinápticos e nas glias.

IV.1 – Deflagração da onda de DA

No modelo, a onda de DA foi deflagrada por meio da aplicação de uma distribuição Gaussiana tridimensional de K^+ , conforme descrito em TUCKWELL e MIURA (1978), com centro na coordenada $(13, y_c, z_c)$ na estrutura da Figura 4.2. A distribuição Gaussiana foi utilizada como estímulo para se evitar eventuais erros numéricos originados de alterações espaciais abruptas na $[K^+]_o$. A suavização do estímulo obtida com a Gaussiana é adequada para esse objetivo. A distribuição é normalizada entre 0 e 40 mM de K^+ . A equação foi dada por:

$$y = \frac{e^{-0,5 \cdot \frac{(x-\mu_x)^2 + (y-\mu_y)^2 + (z-\mu_z)^2}{\sigma^2}}}{\sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}}, \quad (4.1)$$

onde $\sigma = 1$, $\mu_x = 13$, $\mu_y = y_c$, $\mu_z = z_c$. A curva para o plano em $z = z_c$ (plano central) é mostrada na Figura 4.5.

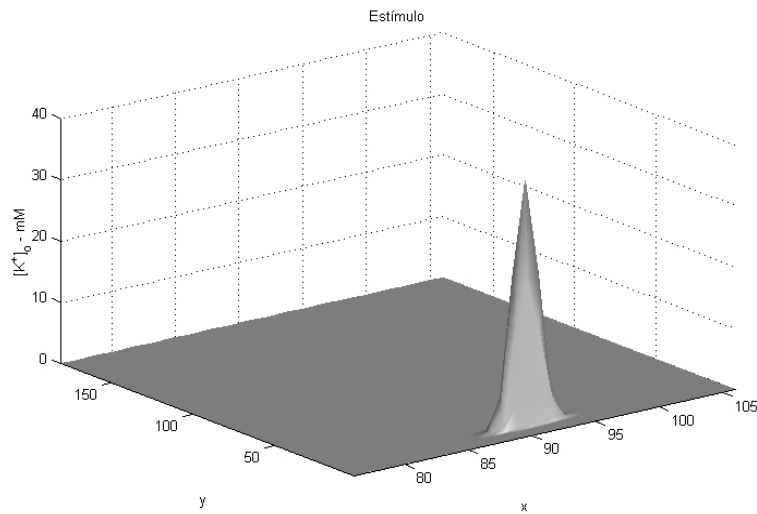


Figura 4.5 – Estímulo de K^+ aplicado no modelo para camadas de terminais sinápticos.

IV.2 – Recursos computacionais

O modelo foi implementado utilizando-se a linguagem FORTRAN 90, com compilador *FORTRAN 90 Compiler 1.2* (SUN Microsystems, EUA). As simulações do modelo são executadas em 2 estações *SUN Ultra 10* equipadas com um processador *UltraSparc-Iii*, 300 Mhz, e 512 MB de memória RAM.

Esses equipamentos estão disponíveis no Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional (LANEC) do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de São João del-Rei. Simulações que demandam maior tempo de processamento são executadas no Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho para Minas Gerais e o Centro-Oeste (CENAPAD-MG/CO) em uma máquina *SUN Starfire ENT10000* que conta com um gabinete com 32 processadores *Ultrasparc* 250MHz e 8 GB memória RAM em módulos de 512 MB. A opção pela linguagem FORTRAN se justifica pela facilidade de migração para outros tipos de plataformas, sem a necessidade de grandes alterações no código-fonte, além da possibilidade de paralelização do algoritmo. Para apresentação gráfica dos resultados utilizou-se o programa *Matlab V5.3* (The MathWorks, EUA).

Capítulo V – Mecanismos de Bombeamento Iônico

Neste capítulo será apresentada uma revisão dos mecanismos de bombeamento baseados na família de enzimas do tipo ATPase. Serão discutidos os procedimentos utilizados para implementação desses mecanismos que incluem a bomba Na,K-ATPase e a bomba Ca-ATPase.

V.1 – Bomba de sódio e potássio

A enzima ATPase, ativada por Na⁺ e K⁺ e dependente de Mg²⁺, é a base molecular da bomba de sódio e potássio nas membranas celulares de animais. Essa bomba sustenta os gradientes de Na⁺ e K⁺ entre os meios intra- e extracelulares. A manutenção desses gradientes é um pré-requisito para a homeostase iônica das células, para a regulação do volume celular e para o transporte secundário ativo de aminoácidos, açúcares, ácidos biliares, neurotransmissores, ions e outros solutos através da membrana celular. Em células eletricamente excitáveis, a criação e a manutenção dos gradientes iônicos através das membranas são necessárias para a geração e propagação de potenciais de ação (GLITSCH, 2001).

A existência de mecanismos de acumulação iônica era conhecida há mais de um século. No entanto, somente em 1957 é que Skou, trabalhando com nervos de caranguejo, identificou a Na,K-ATPase como a enzima envolvida no bombeamento seletivo de ions através de membranas celulares (SKOU, 1957). Essa enzima é composta por duas cadeias de polipeptídios, denominadas α e β , que se estendem pela membrana. A enzima é ativada quando ocorre a ligação de três ions de Na⁺ em uma face e a ligação de dois ions de K⁺ na face oposta. De acordo com o ciclo de Post-Albers, o transporte acoplado de 3 Na⁺ para o exterior e 2 K⁺ para o interior da célula ocorre com a quebra de uma molécula ATP na superfície interna liberando ADP e fósforo inorgânico, Pi. Segundo ARTIGAS e GADSBY (2002), a enzima possui dois estados conformacionais: E₁, relacionado com Na⁺ (e ATP), com acesso ao sítio de ligação pelo meio intracelular, e E₂ relacionado com K⁺ com acesso ao sítio de ligação pelo meio extracelular. Os sítios de ligação dos ions não são completamente acessíveis nos dois estados de conformação, fazendo com que os ions sejam ocluídos no interior da enzima (BLANK, 1995). Somente após a ligação do terceiro Na⁺ na conformação E₁ é que

ocorre a liberação de um fosfato da molécula de ATP para formar o estado fosforilado $E_1P(Na_3)$, no qual 3 íons de Na^+ são ocluídos dentro da proteína e ficam inacessíveis do outro lado da membrana (simbolizado pelos parênteses). Uma relaxação espontânea para o estado E_2P resulta na liberação de 3 íons de Na^+ para o exterior refletindo a aparente afinidade reduzida dos sítios de ligação externos por Na^+ . Os íons de K^+ ligam-se com alta afinidade na conformação E_2P . A ligação do segundo K^+ inicia a desfosforilação da bomba, concomitante com a oclusão dos dois íons K^+ . A taxa do ciclo completo de transporte é limitada pela transição conformacional subsequente da enzima desfosforilante, $E_2(K_2) \rightarrow E_1K_2$, que libera os íons de K^+ para o interior da célula em troca dos íons de Na^+ (Figura 5.1) (ARTIGAS e GADSBY, 2002).

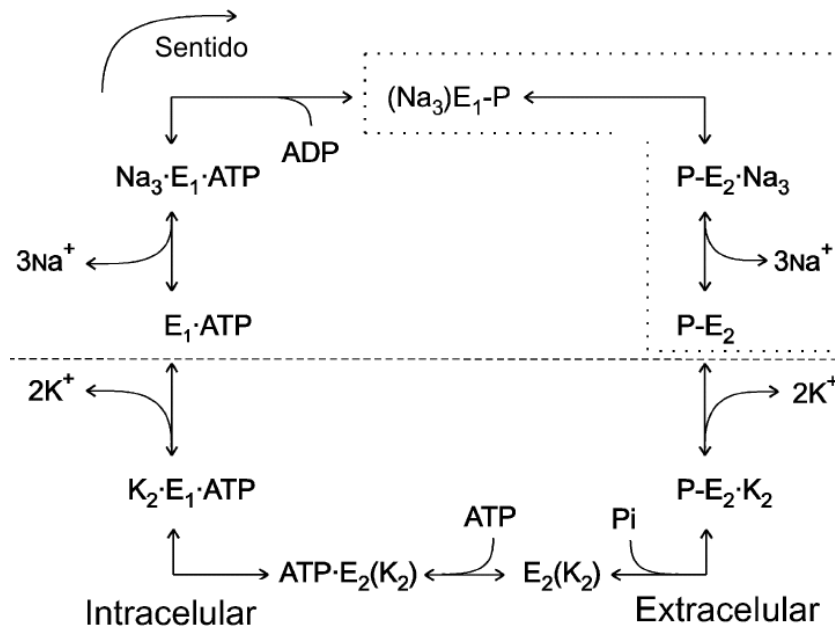


Figura 5.1 – Ciclo simplificado de Post-Albers mostrando o transporte de $3 Na^+ / 2 K^+$ da Na^+,K^+ -ATPase que assume duas conformações principais. Na conformação E_1 , os sítios de ligação iônica estão no meio intracelular e apresentam alta afinidade para Na^+ . Na conformação E_2P , os sítios de ligação se abrem para o meio extracelular com baixa afinidade para Na^+ e alta para K^+ . A fosforilação de ATP, no estado E_1 , oclui três Na^+ , que são liberados para o meio extracelular, depois da alteração conformacional para E_2P , onde 2 K^+ se ligam levando a uma despolarização da proteína e à oclusão de K^+ . A ligação de ATP em um sítio de baixa afinidade favorece a transição subsequente para o estado E_1 , que libera K^+ para o citoplasma, completando o ciclo.

As conformações de oclusão de íons, com sítios de ligações inacessíveis de ambos os lados, representam estados intermediários nessa descrição de acessos alternados de transporte. Elas garantem proteção contra eventos potencialmente destrutivos, além de permitir o acesso simultâneo a ambos os lados da membrana (ARTIGAS E GADSBY, 2003).

Em princípio, cada passo do ciclo é reversível. Com as concentrações apropriadas do íon e do nucleotídeo, o ciclo pode retroceder estrugindo K^+ e importando Na^+ , produzindo ATP a partir de ADP e P_i , e gerando uma corrente de bomba de entrada (ARTIGAS e GADSBY, 2002).

Como resultado de cada ciclo, uma única carga positiva total é exportada provocando o aparecimento de uma corrente de saída em regime permanente através da membrana. A corrente gerada pela bomba é muito pequena para se detectar (~20 attoAmp/bomba). No entanto, essa corrente é perfeitamente mensurável em células contendo milhões de bombas. De acordo com ARTIGAS e GADSBY (2002), para se medir as correntes da bomba Na,K -ATPase é necessário anular a componente da corrente de membrana pela aplicação de um esteróide cardiotônico como a ouabaína.

O trabalho da bomba faz surgir uma corrente de bombeamento I_p através da membrana que, sob condições fisiológicas normais (onde 3 Na^+ são removidos da célula e apenas 2 K^+ são recuperados), é de saída (GLITSCH, 2001). Essa corrente provoca alterações no potencial transmembrânico, caracterizando o efeito eletrogênico da bomba Na,K -ATPase. O conceito de bomba eletrogênica emergiu lentamente durante a década de 50 (THOMAS, 1972). CONNELLY (1959) foi o primeiro a concluir, baseado em evidências experimentais, que as bombas Na,K -ATPase de fibras nervosas são eletrogênicas.

Apesar das bombas e dos canais iônicos serem proteínas integrais da membrana, tradicionalmente esses elementos são considerados entidades bastante diferentes, principalmente por razões cinéticas. Entre as principais diferenças, ARTIGAS e GADSBY (2002 e 2003) apontam:

- o fluxo através dos canais iônicos é do tipo dissipativo, ou seja, a favor do gradiente eletroquímico. Na bomba, o fluxo é contra o gradiente eletroquímico das espécies iônicas envolvidas, à custa de ATP;
- o fluxo através de canais é rápido, da ordem de 10^8 ions/s, enquanto que na bomba o fluxo deslocado é lento, da ordem de 10^2 ions/s;

- os canais iônicos encontram-se a maior parte do tempo fechados, enquanto que as bombas funcionam durante todo o tempo regulando a homeostase celular.

Conforme descrito anteriormente, na bomba, os íons em uma superfície da membrana se ligam a sítios dentro do corpo da proteína e tornam-se temporariamente ocluídos antes de serem liberados para a superfície oposta (ARTIGAS e GADSBY, 2002). Na verdade, as bombas iônicas podem ser interpretadas como canais iônicos com duas portas, conforme sugerido por LÄUGER (1979), estando uma em contato com o meio extracelular e outra em contato com o meio intracelular. Uma regra de operação simples para uma bomba desse tipo é que as portas não podem ser abertas simultaneamente (ARTIGAS e GADSBY, 2003). Caso contrário, a bomba poderia se tornar um canal e conduzir fluxos dissipativos com uma ordem de magnitude muito maior e em direção oposta (ARTIGAS e GADSBY, 2002).

O funcionamento da bomba como canal iônico foi comprovado por ARTIGAS e GADSBY (2002), em estudos feitos em fragmentos de membrana de miócitos cardíacos de porquinhos-da-índia, utilizando a toxina marinha palitoxina ou PTX. A palitoxina interage com a Na,K-ATPase e gera um canal iônico relativamente não-seletivo a cátions, deflagrando um fluxo dissipativo de cátions rápido o suficiente (10^7 ions/s) para ser medido em uma única bomba. Trabalhando com células de levedura, que não possuem bomba de sódio e potássio, confirmou-se que o alvo de ação da PTX é mesmo a Na,K-ATPase.

A PTX converte a bomba Na,K-ATPase em canais de cátions não-seletivos, possivelmente pela ruptura do mecanismo de acoplamento entre as portas da Na,K-ATPase (ARTIGAS e GADSBY, 2004). ARTIGAS e GADSBY (2003) verificaram que aplicações citoplasmáticas de ATP promovem a abertura de canais, e a substituição de íons Na^+ por K^+ promove o fechamento dos canais. Isso sugere que, apesar da presença de PTX, algumas reações parciais do ciclo de transporte normal da Na,K-ATPase persistem e permanecem capazes de efetivar alterações que controlam o acesso a sítios de ligação de cátions nas bombas.

V.2 – Bomba de Cálcio

A atuação da Ca-ATPase é considerada um mecanismo de ajuste fino da concentração intracelular de Ca^{2+} . Essa bomba pertence à família de ATPase do tipo P,

que utiliza energia a partir da quebra da molécula de ATP para transporte de ions contra o gradiente eletroquímico através das membranas (ZYLINSKA e SOSZYNSKI, 2000). O ciclo de reação da Ca-ATPase envolve a formação seqüencial e a degradação de intermediários fosforilados (aspartilfosfato). Da mesma forma que a Na,K-ATPase, a enzima pode se apresentar em dois estados conformacionais distintos (E_1 e E_2) com diferentes afinidades para o Ca^{2+} . Dados experimentais mostram que a bomba opera como um trocador eletrogênico de Ca^{2+}/H^+ com uma estequiometria 1:1 (SALVADOR *et al.*, 1998). Alguns modelos de ativação da Ca-ATPase tem sido relatados, incluindo estimulação por fatores naturais como calmodulina e fosfolipídeos ácidos.

Por causa da alta afinidade ao Ca^{2+} , acredita-se que a única função da bomba é a manutenção da homeostase do Ca^{2+} em células eucariontes (FILOTEO *et al.*, 1997). Em muitos tipos de célula, a bomba Ca-ATPase é o único mecanismo responsável pela extrusão de Ca^{2+} , enquanto que nas células neuronais, ela divide essa tarefa com o trocador Na^+/Ca^{2+} (PENNISTON e ENYEDI, 1998).

V.3 – Implementação da bomba de sódio e potássio

A bomba Na,K-ATPase foi modelada, considerando-se a hipótese de ARTIGAS e GADSBY (2002) de que a bomba possa ser interpretada como canal iônico. Dessa forma, admitiu-se que a enzima Na,K-ATPase constitui um canal através da membrana neuronal, cujo fluxo pode ser descrito pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz para corrente.

A movimentação dos ions Na^+ e K^+ em sentidos opostos, na razão 3:2, foi interpretada como o movimento de uma carga positiva através da membrana. Essa movimentação de cargas gera uma corrente que influencia diretamente o potencial transmembrânico (efeito eletrogênico). Assim, para modelar a bomba Na,K-ATPase como um canal iônico, admitiu-se a movimentação de carga como o movimento de um íon fictício, neste caso, denominado A, monovalente e positivo (Figura 5.2).

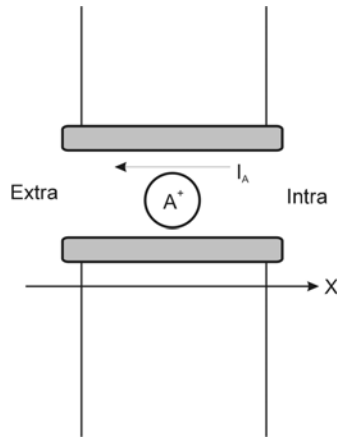


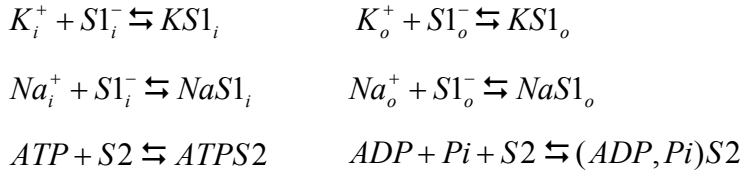
Figura 5.2 – Representação da corrente gerada pelo deslocamento de carga através da Na,K-ATPase. O cátion monovalente fictício representa o saldo de cargas da troca de dois K^+ por três Na^+ .

A corrente transmembrânica I_A gerada pelo deslocamento da carga foi calculada a partir da equação de GHK de corrente (HILLE, 1992):

$$I_A = P_A \cdot \frac{z_A^2 \cdot F^2 \cdot Vm}{R \cdot T} \cdot \left(\frac{[A^+]_i - [A^+]_o \cdot e^{\left(\frac{z_A \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{z_A \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}} \right), \quad (5.1)$$

onde P_A é a permeabilidade do canal, z_A é a valência para um cátion monovalente, F a constante de Faraday, R a constante universal dos gases, T a temperatura em Kelvin, Vm o potencial transmembrânico, $[A^+]_i$ concentração do íon fictício A^+ no meio intracelular e $[A^+]_o$, concentração no meio extracelular.

As concentrações do íon A^+ foram calculadas analisando as reações químicas nos sítios de ligação na face intracelular e extracelular da enzima Na,K-ATPase e os solutos Na^+ , K^+ , ATP, ADP e Pi (RODRIGUES, 2003). Os íons Na^+ e K^+ foram concebidos concorrendo aos mesmos sítios de ligação na enzima (WEISS, 1996), tanto na face intra- ($S1_i$) quanto na face extracelular ($S1_o$). As moléculas de ADP e ATP e fósforo reagem somente em um sítio específico na face intracelular ($S2$). Dessa forma, o modelo da bomba Na,K-ATPase implementado por RODRIGUES (2003), e adotado neste trabalho, foi baseado nas seguintes reações:



Admitindo-se, a cada instante de tempo, o equilíbrio instantâneo das reações, obteve-se:

$$[KS1]_i = \frac{[K^+]_i \cdot [S1^-]_i}{Kd_i^{KS1}}, \quad [KS1]_o = \frac{[K^+]_o \cdot [S1^-]_o}{Kd_o^{KS1}}, \quad (5.2)$$

$$[NaS1]_i = \frac{[Na^+]_i \cdot [S1^-]_i}{Kd_i^{NaS1}}, \quad [NaS1]_o = \frac{[Na^+]_o \cdot [S1^-]_o}{Kd_o^{NaS1}}, \quad (5.3)$$

$$[ATPS2] = \frac{[ATP] \cdot [S2^-]}{Kd^{ATPS2}}, \quad [(ADP, Pi)S2] = \frac{[ADP] \cdot [Pi] \cdot [S2^-]}{Kd^{(ADP, Pi)S2}} \quad (5.4)$$

onde Kd_i^{KS1} e Kd_o^{KS1} , Kd_i^{NaS1} e Kd_o^{NaS1} , Kd^{ATPS2} (em mM) e $Kd^{(ADP, Pi)S2}$ (em mM²) são as constantes de dissociação das respectivas reações.

A concentração de sítios de ligação S1 da enzima, que podem ser ocupados tanto por ions Na⁺ quanto por K⁺, na face intracelular, foi descrita por:

$$[S1^-]_i = [S1^-]_{total} - [NaS1]_i - [KS1]_i, \quad (5.5)$$

onde $[S1^-]_{total}$ é concentração total de sítios de ligação de Na⁺ e K⁺ presentes nas enzimas Na,K-ATPase.

Substituindo as equações 5.2 e 5.3 na equação 5.5 e explicitando o termo $[S1^-]_i$:

$$[S1^-]_i = \frac{[S1^-]_{total}}{1 + \frac{[Na^+]_i}{Kd_i^{NaS1}} + \frac{[K^+]_i}{Kd_i^{KS1}}} \quad (5.7)$$

Levando a equação 5.7 às equações 5.2 e 5.3:

$$[KS1]_i = [S1^-]_{total} \cdot \frac{[K^+]_i}{[K^+]_i + Kd_i^{KS1} \cdot \left(1 + \frac{[Na^+]_i}{Kd_i^{NaS1}}\right)}, \quad (5.8)$$

$$[NaS1]_i = [S1^-]_{total} \cdot \frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_i + K_d([NaS1]_i) \cdot \left(1 + \frac{[K^+]_i}{K_d([KS1]_i)}\right)} \quad (5.9)$$

Analogamente, para $[NaS1]_o$ e $[KS1]_o$, obteve-se:

$$[KS1]_o = [S1^-]_{total} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + Kd_o^{KS1} \cdot \left(1 + \frac{[Na^+]_o}{Kd_o^{NaS1}}\right)}, \quad (5.10)$$

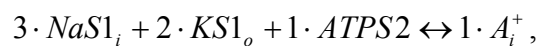
$$[NaS1]_o = [S1^-]_{total} \cdot \frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_o + Kd_o^{NaS1} \cdot \left(1 + \frac{[K^+]_o}{Kd_o^{KS1}}\right)} \quad (5.11)$$

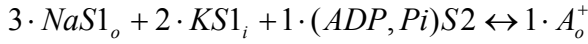
Supondo que as moléculas de ATP concorrem com as moléculas de ADP e Pi para formar ligações com a enzima, então, de forma análoga, tem-se:

$$[ATPS2] = [S2^-]_{total} \cdot \frac{[ATP]}{[ATP] + Kd^{ATPS2} \cdot \left(1 + \frac{[ADP] \cdot [Pi]}{Kd^{(ADP, Pi)S2}}\right)}, \quad (5.12)$$

$$[(ADP, P)S2] = [S2^-]_{total} \cdot \frac{[ADP] \cdot [Pi]}{[ADP] \cdot [P] + Kd^{(ADP, P)S2} \cdot \left(1 + \frac{[ATP]}{Kd^{ATPS2}}\right)} \quad (5.13)$$

A formação de um íon A^+ na superfície interna e na superfície externa ficou, então, associada às seguintes reações:





Admitindo-se que estas reações equilibram-se a cada instante de tempo:

$$[A^+]_i = Kd_i^A \cdot [ATPS2] \cdot ([NaS1]_i)^3 \cdot ([KS1]_o)^2, \quad (5.14)$$

$$[A^+]_o = Kd_o^A \cdot [(ADP, Pi)S2] \cdot ([NaS1]_o)^3 \cdot ([KS1]_i)^2, \quad (5.15)$$

onde $K_i^A = Kd_i^A \cdot [S2^-]_{total} \cdot ([S1^-]_{total})^5$ e $K_o^A = Kd_o^A \cdot [S2^-]_{total} \cdot ([S1^-]_{total})^5$, sendo Kd_i^A e Kd_o^A as constantes de equilíbrio em mM.

A partir das concentrações do íon fictício A^+ (equações 5.14 e 5.15) calculou-se o valor da corrente (equação 5.1) e obteve-se o valor dos fluxos de Na^+ e de K^+ , considerando-se a relação de 3:2:

$$\phi_{Na,bomba} = 3,0 \times I_A / (z_A \cdot F) \quad (5.16)$$

$$\phi_{K,bomba} = -2,0 \times I_A / (z_A \cdot F) \quad (5.17)$$

A corrente que atravessa a bomba Na,K-ATPase foi considerada em suas componentes como fluxos distintos de Na^+ e K^+ . O efeito eletrogênico da bomba sobre o potencial transmembrânico é equivalente ao efeito de um cátion monovalente. Portanto, o cálculo dos termos A e B da equação de GHK (equação 3.41) deduzida no modelo anterior foi alterado para:

$$\begin{aligned} A &= P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_K \cdot [K^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_o + P_A \cdot [A^+]_i \\ B &= P_{Na} \cdot [Na^+]_o + P_K \cdot [K^+]_o + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i + P_A \cdot [A^+]_o \end{aligned} \quad (5.18)$$

V.4 – Implementação da bomba de cálcio

Uma bomba difusiva de cálcio foi implementada nos moldes da bomba Na,K-ATPase. Dessa forma, admitindo-se a existência de um cátion fictício bivalente CA, tem-se,

$$[CA^{2+}]_i = Kd_i^{CA} \cdot \frac{[ATP]}{[ATP] + Kd^{ATP} \cdot \left(1 + \frac{[ADP] \cdot [Pi]}{Kd^{ADP, Pi}}\right)} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + Kd_i^{Ca} \cdot \left(1 + \frac{[Ca^{2+}]_o}{Kd_o^{Ca}}\right)}, \quad (5.19)$$

$$[CA^{2+}]_o = Kd_o^{CA} \cdot \frac{[ATP]}{[ADP] \cdot [Pi] + Kd_i^{ADP, P} \cdot \left(1 + \frac{[ATP]}{Kd^{ATP}}\right)} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_o + Kd_o^{Ca} \cdot \left(1 + \frac{[Ca^{2+}]_i}{Kd_i^{Ca}}\right)}, \quad (5.20)$$

O fluxo devido à movimentação deste íon foi dado modelado por:

$$\phi_{Ca, bomba} = P_{CA} \cdot \frac{2 \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T} \cdot \left(\frac{[CA^{2+}]_i - [CA^{2+}]_o \cdot e^{\left(\frac{2 \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{2 \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}} \right) \quad (5.21)$$

O efeito eletrogênico da bomba sobre o potencial transmembrânico é equivalente ao efeito de um cátion bivalente. Portanto, o cálculo dos termos *C* e *D* da equação de GHK (equação 3.41) foi alterado, acrescentando-se os termos referentes a esse cátion fictício. Assim,

$$\begin{aligned} C &= 4 \cdot (P_{Ca} \cdot [Ca^{2+}]_i + P_{CA} \cdot [CA^{2+}]_i) \\ D &= 4 \cdot (P_{Ca} \cdot [Ca^{2+}]_o + P_{CA} \cdot [CA^{2+}]_o) \end{aligned} \quad (5.22)$$

V.5 – Atuação da bomba de sódio e potássio e da bomba de cálcio durante a DA

Durante a DA, o excesso de K^+ no meio extracelular, provocado pela passagem da onda, faz com que a bomba Na,K-ATPase atue de forma mais intensa, seqüestrando

o K^+ para o meio intracelular e bombeando o Na^+ para o extracelular na relação de $2 K^+ : 3 Na^+$. A simulação da atuação da bomba Na,K -ATPase durante a onda de DA é ilustrada na Figura 5.3. O fluxo iônico, devido ao trabalho da bomba, mostra a concentração de Na^+ que foi retirada do meio intracelular do terminal pós-sináptico, a cada instante de tempo, e a de K^+ que foi acumulada.

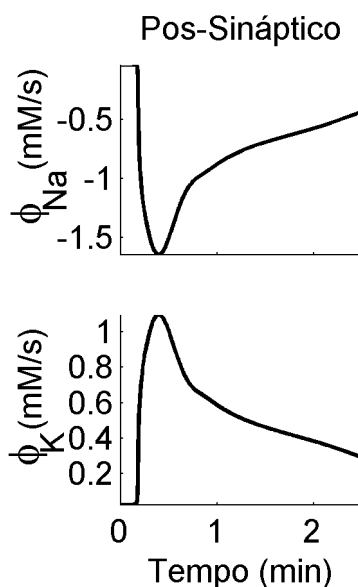


Figura 5.3 – Variação da concentração de Na^+ e K^+ a cada instante de tempo devido à atuação da bomba Na,K -ATPase no terminal sináptico durante a passagem da onda de DA.

A atuação da bomba Na,K -ATPase sobre as concentrações pode ser visualizado sobrepondo-se os resultados das simulações com e sem a atuação da bomba (Figura 5.4, curvas pontilhadas e sólidas, respectivamente).

Observa-se que a atuação da bomba Na,K -ATPase favorece a recuperação da concentração de K^+ extracelular e do Na^+ intracelular. Além disso, houve uma redução na magnitude dos perfis de concentração desses íons. Sem a atuação da bomba, as concentrações intracelulares de Na^+ e K^+ não se recuperam. Nessa condição, o tecido não é capaz de sustentar uma nova onda de DA. A recuperação das concentrações iônicas extracelulares na ausência da bomba se deve ao efeito da eletrodifusão descrita para esse meio.

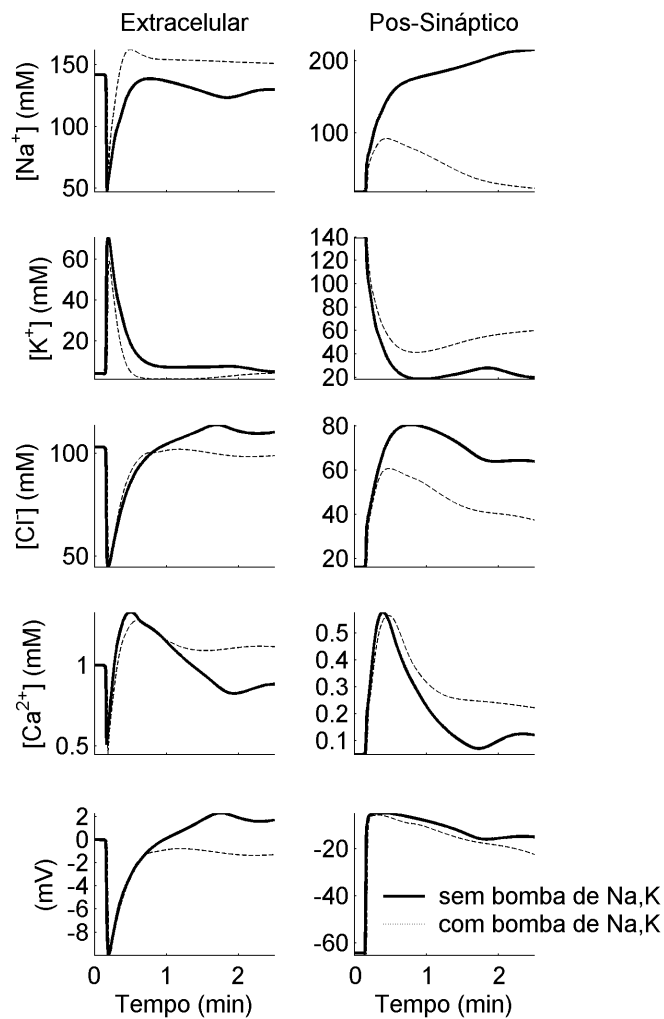


Figura 5.4 – Atuação da bomba Na,K-ATPase sobre as concentrações iônicas e os potenciais durante a onda de DA. O pontilhado representa a simulação com a atuação da bomba Na,K-ATPase. O sólido representa a simulação sem a atuação da bomba.

A bomba de Na,K-ATPase gera gradientes iônicos que são utilizados pelos mecanismos de co-transporte cloreto-dependentes. Isso explica o maior acúmulo desse íon no meio intracelular quando a bomba é desligada. Essas alterações na distribuição iônica entre os meios intra- e extracelulares devido à ausência da bomba se reflete nos potenciais extracelular e transmembrânico.

A bomba Na,K-ATPase também colabora para a manutenção do equilíbrio do sistema. Sem a descrição da bomba, não foram possíveis simulações superiores a 3 minutos devido, principalmente, ao acúmulo de Na^+ no intracelular.

No momento da passagem da onda de DA, ocorre o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (BASARSKI et al, 1998). Para o restabelecimento da concentração normal desse íon, é necessária a atuação da bomba Ca-ATPase. A atividade dessa

bomba pode ser simulada, conforme resultado da simulação, apresentado na Figura 5.5, referente ao fluxo desse íon, por esse mecanismo de bombeamento, durante a DA.

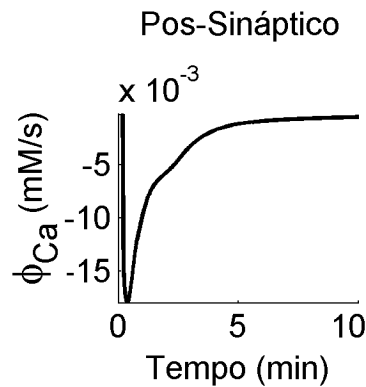


Figura 5.5 – Depleção da concentração de Ca^{2+} intracelular, a cada instante de tempo, devido à atuação da bomba Ca-ATPase no terminal sináptico, durante a onda de DA.

O efeito da atuação da bomba Ca-ATPase sobre as concentrações iônicas é mostrado na Figura 5.6. Observa-se uma recuperação mais rápida da concentração desse íon no meio extracelular devido à perfusão. No meio intracelular, a atividade da bomba evita o acúmulo excessivo de Ca^{2+} . Esse mecanismo se mostra essencial para o retorno da concentração intracelular de Ca^{2+} aos níveis normais.

A regulação da concentração do Ca^{2+} deve ser eficiente, uma vez que este íon é responsável pela liberação de neurotransmissores na fenda sináptica que, por sua vez, modula as permeabilidades dos canais nos terminais pós-sinápticos. A ausência dessa regulação mantém Ca^{2+} intracelular em um nível de concentração que sustenta a liberação de neurotransmissores, dificultando a redução da permeabilidade iônica pós-sináptica. Nesse estado, o fluxo iônico através dos canais dificulta o trabalho da bomba Na,K-ATPase, e dos mecanismos de co-transporte a ela acoplados. Assim, o retorno das concentrações intracelulares dos demais íons e, por conseguinte, do potencial transmembrânico fica prejudicado.

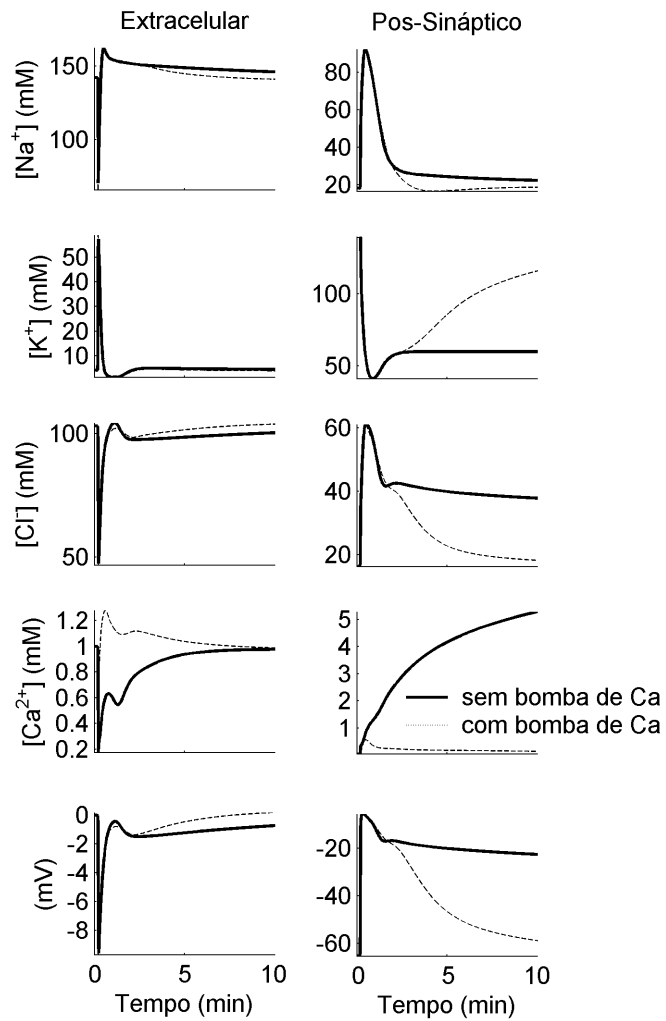


Figura 5.6 – Atuação da bomba Ca-ATPase sobre as concentrações iônicas e os potenciais durante a onda de DA. O pontilhado representa a simulação com a atuação da bomba de cálcio. O sólido representa a simulação sem a atuação da bomba.

Capítulo VI – Mecanismos de Co-Transporte Cátion-Cloreto

Os mecanismos de co-transporte cátion-cloreto (CCC) têm sido identificados como importantes reguladores da concentração neuronal de Cl^- . O transporte de Cl^- mediado por CCCs é eletroneutro, ou seja, não há hidrólise direta de ATP, apesar dos ciclos de transporte serem conduzidos contra o gradiente de concentração das espécies iônicas envolvidas. Os CCCs utilizam a energia que provém dos gradientes de cátions gerados pela atuação da bomba Na,K-ATPase (PAYNE *et al.*, 2003).

A primeira sugestão de um processo de co-transporte acoplado com ions de Na^+ e Cl^- foi feito por SHANES (1958). Evidências de um mecanismo de co-transporte acoplado entre Na^+ , K^+ e Cl^- , bloqueado por *loops* diuréticos, e não afetado por ouabaína, foi apresentado pela primeira vez por GECK *et al.* (1980). Acreditava-se que os vários relatos de processos de co-transportes de Cl^- representavam diferentes modos de atuação de uma única entidade de transporte. Entretanto, com os avanços dos últimos anos, sabe-se agora que co-transportes CCCs são produtos de genes separados (RUSSEL, 2000).

A família genética do CCC consiste de três grupos amplos (Figura 6.1): o co-transporte acoplado Na-Cl (NCC), o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC) e o co-transporte K-Cl (KCC). Sob condições fisiológicas normais, o NCC e o NKCC promovem a acumulação de Cl^- intracelular, enquanto que o KCC opera na extrusão de Cl^- . Como um mecanismo de transporte eletroneutro, a direção de movimentação dos ions pelo co-transporte é determinada apenas pelo somatório das diferenças dos potenciais eletroquímicos (PAYNE, 1997). Portanto, os CCCs são bidirecionais (PAYNE *et al.*, 2003). Até o momento, foram identificados um NCC, duas isoformas NKCC (NKCC1 e NKCC2) e quatro isoformas KCC (KCC1, KCC2, KCC3 e KCC4). O NKCC1 é encontrado no sistema nervoso central tanto em neurônios quanto em glias, e no plexo coroidal e em células vasculares do endotélio. O NKCC2 é encontrado principalmente nos rins. Uma única isoforma do KCC (KCC2) é exclusivamente expressada nos neurônios maduros, sendo responsável pela baixa concentração do Cl^- intracelular. KCC1, KCC3 e KCC4 têm sido encontrados no sistema nervoso, com expressões muito mais limitadas em neurônios (PAYNE *et al.*, 2003).

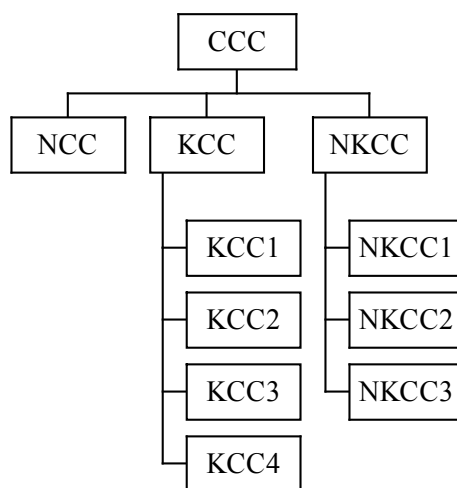


Figura 6.1 – Grupos de co-transportes cátion-cloreto e suas respectivas isoformas (PAYNE *et al.*, 2003).

VI.1 – Co-transporte Na-Cl (NCC)

As propriedades funcionais do NCC foram caracterizadas definitivamente por STOKES *et al.* (1984). Eles demonstraram a interdependência entre os efeitos de Na^+ e Cl^- na absorção de Cl^- e Na^+ respectivamente, a independência de K^+ e que o NCC é inibido por tiazida diurética (droga para controle de pressão arterial) e não por *loops* diuréticos como a furosemida e nem por drogas que inibem o KCC e o trocador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ou outros processos de transporte de aniônicos. Entretanto, há evidências de que o co-transporte NCC seja sensível a bumetanida (um *loop* diurético) na traquéia e na vesícula biliar de *Necturus* (RUSSEL, 2000).

De forma geral, o NCC parece estar extensamente confinado em células epiteliais como os rins onde ele participa da movimentação de Na^+ e Cl^- através da barreira epitelial (RUSSEL, 2000). O NCC ainda não foi identificado em tecidos nervosos (PAYNE *et al.*, 2003).

VI.2 – Co-transporte K-Cl (KCC)

O KCC é uma proteína integrante da membrana que é responsável pelo transporte acoplado e eletricamente neutro entre K^+ e Cl^- , sendo ativado pelo aumento do volume celular, podendo promover uma redução da regulação de volume. Também pode estar envolvido na manutenção da concentração de Cl^- intracelular em níveis inferiores ao de equilíbrio em neurônios. A ativação do KCC pelo aumento de volume

celular está relacionada com a perda de K^+ e Cl^- juntamente com uma equivalência osmótica em água. Isso resulta na redução do volume celular (RUSSEL, 2000).

Sob condições fisiológicas normais, o co-transporte KCC é um caminho de efluxo com a direção sendo comandada pelo gradiente de K^+ mantido pela Na,K -ATPase (Figura 6.2). O Cl^- é co-transportado com o K^+ , que é bombeado pela bomba de Na,K -ATPase (TAS *et al.*, 1987). O co-transporte KCC é caracterizado por sua sensibilidade a *loops* diuréticos como a furosemida (maior sensibilidade) e a bumetanida. Essa afinidade a *loops* diuréticos é significativamente menor do que o do co-transporte NKCC (AULL, 1981, LAUF *et al.*, 1984).

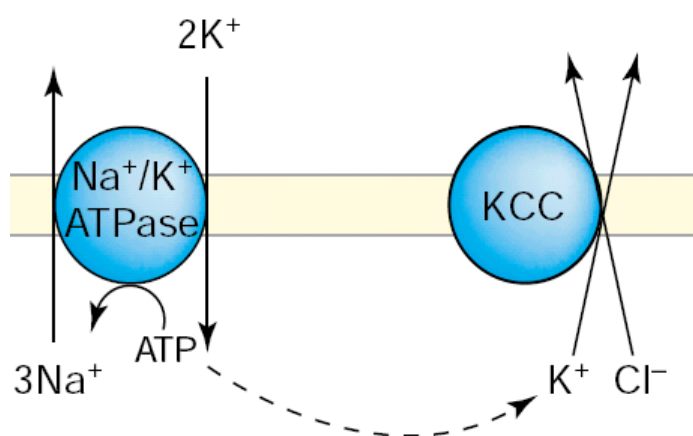


Figura 6.2 – Interdependência entre a bomba Na,K -ATPase e o co-transporte KCC. O excesso de K^+ gerado pela bomba é retornado ao meio extracelular pelo KCC juntamente com Cl^- (extraído de PAYNE *et al.*, 2003).

O isomorfo KCC1 está presente em todos os tipos de tecidos analisados e parece ser uma forma padrão, envolvida com a regulação de volume celular. Esse isomorfo tem uma baixa afinidade aparente por Rb^+ e por Cl^- extracelulares. Há evidências de que o KCC1 possa participar na movimentação de sais em tecidos transepiteliais como o pulmão ou o rim (GILLEN *et al.*, 1996).

A isoforma KCC4 é sensível à variação de volume, sendo ativada bioquimicamente pelo inchaço celular, e mostra pouca expressão em cérebros maduros. A isoforma KCC3 é a única que não é sensível a volume (PAYNE *et al.*, 2003).

O isomorfo KCC2 é encontrado em abundância nas células neuronais. Baseado nessa expressão neuronal abundante, PAYNE *et al.* (1996) propuseram que o KCC2 seria provavelmente a bomba que provocaria o efluxo de Cl^- de neurônios.

O KCC2 apresenta algumas características funcionais bem diferentes em relação ao KCC1, incluindo a insensibilidade ao inchaço celular e uma aparente afinidade ao Rb^+ no lugar do K^+ . As características únicas do KCC2, além de sua especificidade neuronal, fortalece a possibilidade que seus aspectos fisiológicos diferem do KCC1. Uma função potencial do KCC2 poderia ser a redução da concentração neuronal de Cl^- , de forma a favorecer o gradiente eletroquímico de influxo desse íon, para o correto funcionamento de canais dependentes de Cl^- , na inibição pós-sináptica (PAYNE *et al.*, 1996). Sob condições fisiológicas normais, há energia reservada no gradiente químico de K^+ para mover o Cl^- contra seu gradiente para fora do neurônio através do co-transporte eletroneutro de K-Cl.

VI.3 – Co-transporte Na-K-2Cl (NKCC)

O NKCC possui duas formas isomorfas: NKCC1, que é encontrada praticamente em todas as células e principalmente na membrana basolateral de células epiteliais e o NKCC2 que tem sido identificado apenas em regiões medulares e corticais do rim (RUSSEL, 2000).

Sob condições fisiológicas normais, segundo PAYNE *et al.* (2003), o co-transporte NKCC é um caminho de influxo com a direção sendo comandada pelo gradiente de Na^+ mantido pela bomba Na,K-ATPase (Figura 6.3).

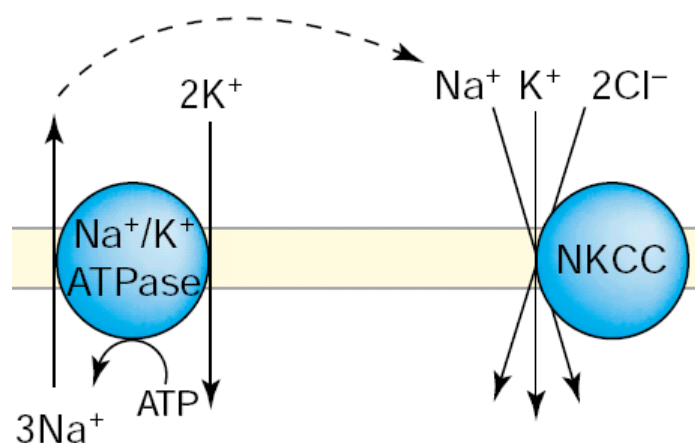


Figura 6.3 – Interdependência entre a bomba Na,K-ATPase e o co-transporte NKCC. O sentido do fluxo é mantido pelo Na^+ acumulado no meio extracelular pela bomba Na,K-ATPase (extraído de PAYNE *et al.*, 2003).

O NKCC é importante na manutenção da concentração intracelular de Cl^- em níveis acima do equilíbrio eletroquímico e serve como rota para correntes de captura de Na^+ e K^+ para o interior da célula e é importante no processo de regulação de volume celular. É afetado pelo volume celular, hormônios, fatores de crescimento, tensão de oxigênio e pela concentração intracelular de Mg^{2+} ionizado (FLATMAN, 2002, HASS e FORBUSH, 2000).

Como o processo de transporte dos íons é eletroneutro, então, o número de cátions (Na^+ e K^+) que atravessam a membrana será igual à soma de ânions Cl^- . Portanto, a estequiometria mais simples de transporte é 1 Na^+ :1 K^+ :2 Cl^- (GECK *et al.*, 1980). Uma estequiometria não usual de 2:1:3 foi observada em axônio de neurônio gigante de lula (RUSSEL, 1983, 2000). Provavelmente, trata-se de um outro isomorfo do NKCC. Essa estequiometria exige muito mais energia dos mesmos gradientes iônicos para bombear Cl^- para o meio intracelular. Uma forma truncada do NKCC2 pode co-transportar 1 Na^+ :1 Cl^- independente de K^+ (FLATMAN, 2002).

O NKCC também mostra algumas características requeridas para um *buffer* eficiente de $[\text{K}^+]_o$, que é uma força de condução dirigida para dentro da célula (PAYNE, *et al.*, 1995).

No cérebro de rato, o NKCC1 parece ser muito mais restrito em sua distribuição e densidade neuronal do que o KCC2. Por exemplo, PLOTKIN *et al.* (1997) descobriram o NKCC1 em altos níveis apenas em neurônios sensoriais e em certos neurônios do tronco cerebral. Isso pode limitar sua função no *buffer* de $[\text{K}^+]_o$ dentro do microambiente neuronal. Portanto, tanto o KCC quanto o NKCC parecem desempenhar funções importantes na regulação neuronal de $[\text{Cl}^-]_i$ e $[\text{K}^+]_o$ no cérebro (PAYNE, 1997).

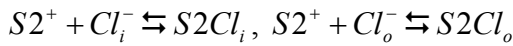
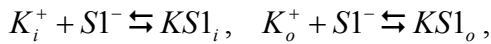
VI.4 – Implementação dos mecanismos de co-transporte

O mecanismo de co-transporte NCC encontra-se distribuído em células epiteliais, sendo o único que não é encontrado em células do sistema nervoso. Dessa forma, somente os mecanismos de co-transporte KCC e NKCC serão considerados no modelo.

O mecanismo de co-transporte KCC é capaz de transportar, simultaneamente, um íon K^+ e um íon Cl^- , através da membrana neuronal, em função do gradiente de concentração de KCl entre os meios intra- e extracelulares. Portanto, trata-se de um transporte eletroneutro (PAYNE, 1997, DEFAZIO *et al.*, 2000). Quando a concentração

de KCl é menor no meio extracelular, é possível que haja um influxo de K^+ contra seu gradiente de concentração, por meio de um co-transporte com o Cl^- .

Para que os ions sejam transportados, os dois ligam-se à enzima, ao mesmo tempo e numa mesma face, intra- ou extracelular. A ligação ocorre em sítios específicos denominados S1 para K^+ e S2 para Cl^- . Dessa forma, as reações dos ions com as enzimas nos meios intra- e extracelulares, segundo RODRIGUES (2003), foram descritas por:



Admitindo-se que o equilíbrio das reações é atingindo a cada instante de tempo e as constantes de dissociação (Kd) de cada reação, tem-se:

$$[KS1]_i = \frac{[K^+]_i[S1]}{Kd^{KS1}}, \quad [KS1]_o = \frac{[K^+]_o[S1]}{Kd^{KS1}}, \quad (6.1)$$

$$[S2Cl]_i = \frac{[S2] \cdot [Cl^-]_i}{Kd^{S2Cl}}, \quad [S2Cl]_o = \frac{[S2] \cdot [Cl^-]_o}{Kd^{S2Cl}}. \quad (6.2)$$

Se for admitido a mesma probabilidade de se fazer ligações nas faces intra- e extracelulares da enzima do co-transporte, então a concentração de sítios livres, $[S1^-]$, que podem formar ligações com o íon K^+ , pode ser relacionada por:

$$[S1^-] = [S1^-]_{total} - [KS1]_i - [KS1]_o, \quad (6.3)$$

onde $[S1^-]_{total}$ é a concentração total de sítios de K^+ das enzimas presentes na membrana.

Substituindo as equações 6.1 e 6.2 na equação 6.3 e explicitando a concentração de sítios livres, tem-se:

$$[S1^-] = \frac{Kd^{KS1} \cdot [S1^-]_{total}}{Kd^{KS1} + [K^+]_i + [K^+]_o} \quad (6.4)$$

Levando a equação 6.4 à 6.1 e à 6.2:

$$[KS1]_i = [S1^-]_{total} \cdot \frac{[K^+]_i}{Kd^{KS1} + [K^+]_i + [K^+]_o} \quad (6.5)$$

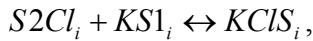
$$[KS1]_o = [S1^-]_{total} \cdot \frac{[K^+]_o}{Kd^{KS1} + [K^+]_i + [K^+]_o} \quad (6.6)$$

De forma análoga, para o Cl⁻:

$$[S2Cl]_i = [S2^+]_{total} \cdot \frac{[Cl^-]_i}{Kd^{S2Cl} + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o} \quad (6.7)$$

$$[S2Cl]_o = [S2^+]_{total} \cdot \frac{[Cl^-]_o}{Kd^{S2Cl} + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o} \quad (6.8)$$

Se for considerada a ligação simultânea de K⁺ e Cl⁻ a um sítio específico S da enzima (onde S representa S1 ou S2 ligados a seus pares), numa mesma face da membrana, o resultado é a formação do composto KCIS, o qual é responsável pelo transporte de K⁺ e Cl⁻ na razão 1:1. Então, as seguintes reações podem ser descritas:



Supondo o equilíbrio instantâneo de cada reação anterior, tem-se:

$$[KCIS]_i = Kd^{KCIS} \cdot [KS1]_i \cdot [S2Cl]_i, \quad (6.9)$$

$$[KCIS]_o = Kd^{KCIS} \cdot [KS1]_o \cdot [S2Cl]_o, \quad (6.10)$$

onde Kd^{KCIS} é a constante de equilíbrio da reação dada em mM⁻¹.

Substituindo as equações 6.5 e 6.7 na equação 6.9 e as equações 6.6 e 6.8 na 6.10:

$$[KClS]_i = Kd^{KClS} \cdot ([S]_{total})^2 \cdot \frac{[K^+]_i \cdot [Cl^-]_i}{(Kd^{KS1} + [K^+]_i + [K^+]_o) \cdot (Kd^{S2Cl} + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o)}, \quad (6.11)$$

$$[KClS]_o = Kd^{KClS} \cdot ([S]_{total})^2 \cdot \frac{[K^+]_o \cdot [Cl^-]_o}{(Kd^{KS1} + [K^+]_i + [K^+]_o) \cdot (Kd^{S2Cl} + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o)} \quad (6.12)$$

Fazendo o fluxo iônico devido ao co-transporte KCC proporcional à diferença entre $[KClS]_i$ e $[KClS]_o$, então:

$$\phi_{KCC} = Q_{KCC} \cdot \frac{[K^+]_i \cdot [Cl^-]_i - [K^+]_o \cdot [Cl^-]_o}{(Kd^{KS1} + [K^+]_i + [K^+]_o) \cdot (Kd^{S2Cl} + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o)}, \quad (6.13)$$

onde $Q_{KCC} = \omega \cdot Kd^{KClS} \cdot ([S]_{total})^2$, sendo ω uma constante de proporcionalidade. Essa concentração de parâmetros facilita na etapa de ajuste de parâmetros, durante as simulações.

Outro mecanismo de co-transporte identificado em tecidos neuronais é o NKCC. Nesse mecanismo, são transportados, simultaneamente, um Na^+ e um K^+ juntamente com dois Cl^- através da membrana glial. Como as concentrações de Na^+ e de Cl^- são elevadas no meio extracelular, então o NKCC depende, basicamente, da variação de $[K^+]_o$. Com isso, K^+ pode ser transportado para o meio intracelular, contra o gradiente de concentração, juntamente com dois Cl^- e um Na^+ . Partindo-se das reações entre os íons Na^+ , K^+ e Cl^- com os sítios de ligação da enzima, de forma análoga ao co-transporte KCC, o fluxo devido ao mecanismo de co-transporte NKCC, ϕ_{NKCC} , pode, segundo RODRIGUES (2003) ser descrito por:

$$\phi_{NKCC} = \frac{Q_{NKCC} \cdot ([Na^+]_i \cdot [K^+]_i \cdot [Cl^-]_i^2 - [Na^+]_o \cdot [K^+]_o \cdot [Cl^-]_o^2)}{(Kd^{NaS1} + [Na^+]_i + [Na^+]_o)(Kd^{KS2} + [K^+]_i + [K^+]_o)(Kd^{S3Cl} + [Cl^-]_i + [Cl^-]_o)^2}, \quad (6.14)$$

onde, $Q_{NKCC} = \chi \cdot Kd^{NaKClS} \cdot ([S]_{total})^4$ sendo χ uma constante de proporcionalidade e S1 e S2 e S3, os sítios de ligação de Na^+ , K^+ e Cl^- , respectivamente.

VI.5 – Atuação dos mecanismos de co-transporte durante a DA

No repouso, o co-transporte KCC atua retirando K^+ e Cl^- do meio intracelular, com a direção sendo comandada pelo gradiente de K^+ , mantido pela bomba Na,K-ATPase. Durante a passagem da onda de DA, as simulações mostram um aumento na intensidade do fluxo através do KCC, que contribui para remover o excesso de Cl^- nos terminais. À medida que a concentração intracelular de K^+ retorna aos valores normais, o fluxo iônico através do KCC retorna aos níveis do repouso (Figura 6.4).

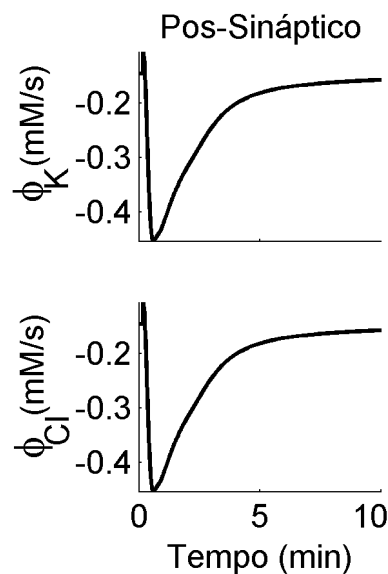


Figura 6.4 – Fluxo de K^+ e Cl^- devido à atuação do co-transporte KCC no terminal sináptico durante a onda de DA

A atuação do co-transporte KCC sobre as concentrações iônicas é mostrado na Figura 6.5. O KCC atua de forma a regular a concentração de Cl^- evitando o acúmulo desse íon no terminal pós-sináptico. Essa regulação é feita de forma eletroneutra aproveitando-se o gradiente eletroquímico do K^+ , que é sustentado pela bomba Na,K-ATPase. O efeito sobre os potenciais de membrana e extracelular é mínimo.

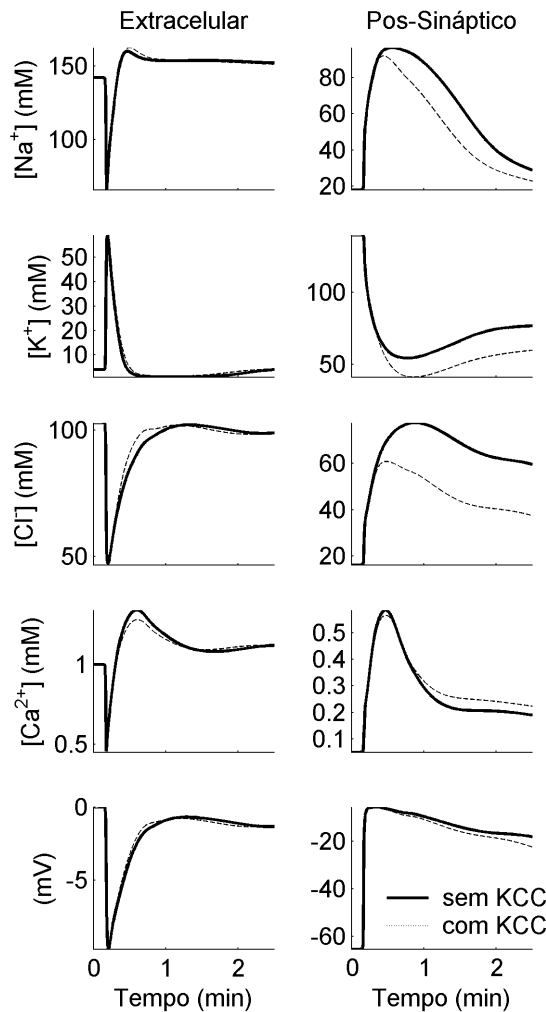


Figura 6.5 – Atuação do co-transporte KCC sobre as concentrações iônicas. As linhas tracejadas representam a simulação feita com o co-transporte. As linhas sólidas representam a simulação onde a atuação do co-transporte foi desativada.

Como já mencionado, segundo PAYNE *et al.* (2003), sob condições fisiológicas normais, o co-transporte NKCC é uma via de influxo, comandada pelo gradiente de Na^+ , mantido pela bomba Na,K-ATPase . Durante a DA, as simulações mostram que o co-transporte NKCC, também atua retirando Na^+ , K^+ e Cl^- do meio extracelular para o interior das glias, durante a passagem da onda de DA. Mas, neste caso, apesar da redução das $[\text{Na}^+]_o$ e $[\text{Cl}^-]_o$, os gradientes desse ions permanecem no sentido extra-intra glial. Com o acúmulo de K^+ no meio extracelular, decorrente da onda de DA (Figura 6.6), fica favorecido o gradiente de $[\text{Na,K,2Cl}]$ no sentido extra-intracelular glial, definindo o influxo pelo co-transporte.

A atuação do NKCC sobre as concentrações iônicas é mostrado na Figura 6.7. Observa-se que à retirada da atuação do co-transporte NKCC corresponde uma maior

redução da $[Cl^-]_i$. Isso está em acordo com o que foi descrito por PAYNE (1997), indicando que o NKCC impede a saída excessiva do Cl^- intracelular glial.

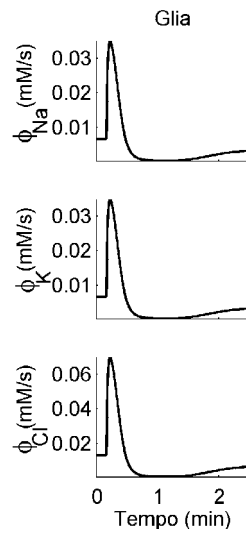


Figura 6.6 – Fluxo iônico de Na^+ , K^+ e Cl^- devido à atuação do co-transporte NKCC na glia.

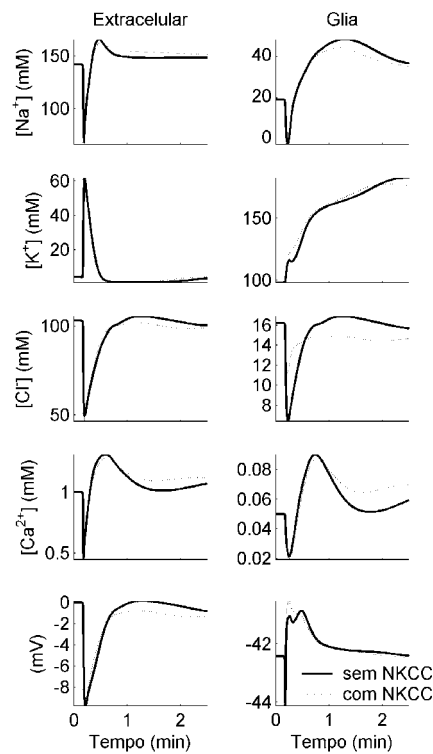


Figura 6.7 – Atuação do co-transporte NKCC sobre as concentrações iônicas. Em pontilhado, tem-se a simulação feita com o co-transporte. Em linhas sólidas, registros simulados a partir da desativação do co-transporte NKCC.

Capítulo VII – Canais Retificadores de Entrada de Potássio

Uma função essencial das células gliais é a regulação da concentração extracelular de K^+ . Por meio do mecanismo de *spatial buffering*, o K^+ é acumulado nas glias e, posteriormente, por meio de um mecanismo denominado *spatial siphoning*, é distribuído para regiões onde a concentração extracelular de K^+ é menor. Em particular, na retina, essa função é desempenhada por um tipo de glia denominada célula de Müller (NEWMAN 1993). Conforme verificado por BREW e ATTWELL (1985), o principal canal de K^+ presente nas células de Müller de retina de anfíbios é o canal retificador de entrada de K^+ .

Os canais retificadores de entrada de K^+ foram observados, pela primeira vez, por KATZ (1949), que utilizou o termo “retificação anômala” para denotar as propriedades de retificação diferentes do que, até então, havia sido observado. A anomalia era uma condutância que aumentava sob condições de hiperpolarização e decrescia na despolarização. Durante a hiperpolarização, observou-se uma corrente de entrada de K^+ que não existia na despolarização. As propriedades mais importantes que foram relatadas a respeito desses canais foram:

- abrem-se com uma dependência acentuada de potencial na hiperpolarização;
- dependência de potencial em função de $[K^+]_o$, deslocando ao longo do eixo de potencial com a quantidade $R \cdot T \cdot \ln[K^+]_o$;
- parte da retificação acentuada parece ser instantânea, ocorrendo em menos de 1 ms, e uma fração adicional pode se desenvolver exponencialmente com constantes de tempo da ordem de mili-segundos a 0,5 s.

Na Figura 7.1, tem-se um exemplo da curva I-V para ovos de estrela do mar submetidos a quatro diferentes concentrações de K^+ (HILLE, 1992). A membrana é mantida no potencial de corrente zero (*zero-current potential*) e despolarizada ou hiperpolarizada com dois micro-eletrodos. As linhas tracejadas mostram as relações I-V instantâneas e as linhas sólidas, as relações de regime permanente após algumas centenas de segundos ($T = 21^\circ\text{C}$):

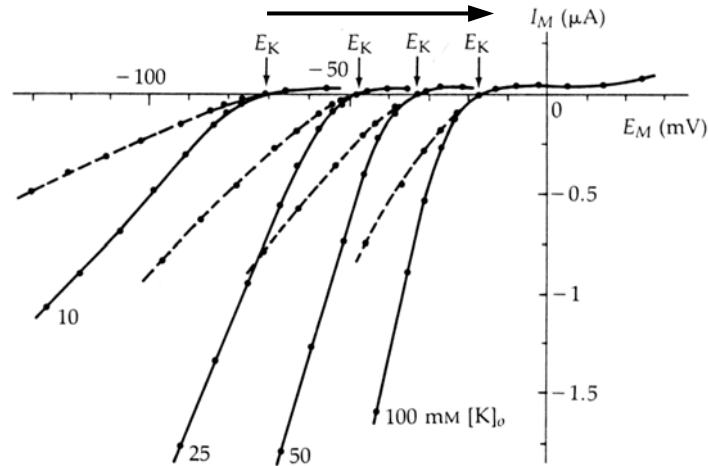


Figura 7.1 – Curva I-V de um canal retificador de K^+ em ovo de estrela do mar para diferentes concentrações de K^+ (extraído de HILLE, 1992, pp. 129).

O potencial de equilíbrio de Nernst de K^+ corresponde àquele para os quais a corrente de K^+ é zero. À medida que a célula se despolariza, aumentado-se a concentração extracelular de K^+ , o potencial de equilíbrio desloca-se em direção ao zero (Figura 7.1, seta superior). Nessa situação, aparece uma corrente negativa que conduz o K^+ para o interior da célula.

Em experimentos de *voltage clamp* com *whole-cell*, em células de Müller, com e sem *end-feet*, realizados por NEWMAN (1993) as curvas de I-V foram levantadas fixando-se a concentração intracelular de K^+ em 98 mM e concentrações extracelulares em 2,5, 10, 30 e 98 mM. As curvas foram ajustadas utilizando-se uma equação incluindo termos da relação de Boltzmann, representando o canal de retificação e a probabilidade de abertura do canal (NEWMAN, 1993):

$$I = \Delta V \cdot G_K \quad (7.1)$$

$$\Delta V = V_m - V_K \quad (7.2)$$

$$V_K = N_{Slope} \cdot \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right) \quad (7.3)$$

$$G_K = \frac{c}{1 + \exp \left(\frac{\Delta V - V_h^R}{S^R} \right)} \quad (7.4)$$

onde I é a corrente de membrana, ΔV é a força para o fluxo de K^+ , E_K é o potencial de Nernst para K^+ , N_{slope} é a constante de Nernst, G_K é a condutância de membrana, c é um fator de escala, V_h^R é a potencial na qual a condutância é metade do máximo, S^R é uma medida da taxa na qual a condutância altera com a potencial. A magnitude da retificação da célula (taxa da corrente de dentro para fora) é descrita pelo parâmetro S^R , enquanto que V_h^R especifica a potencial na qual a retificação ocorre. Os parâmetros c , S^R e V_h^R são variados de forma a se obter o melhor ajuste.

Os canais retificadores de K^+ são sensíveis à $[K^+]_o$ e ao potencial. A sensibilidade das correntes nas células de Müller ao K^+ pode ser verificada determinando-se as relações I-V em soluções de banho contendo 98, 30, 10 e 2,5 mM de K^+ . De acordo com a descrição de NEWMAN (1993), em seus experimentos, os valores calculados para S^R são bastante próximos para células com e sem *end-feet*, conforme mostrado na tabela 7.1:

Tabela 7.1 – Valores dos parâmetros com e sem *end-feet*

	Com <i>end-feet</i>	Sem <i>end-feet</i>
S^R	$33,8 \pm 4,2$ mV	$-13,9 \pm 8,5$ mV
V_h^R	$32,2 \pm 6,1$ mV	$-21,4 \pm 6,1$ mV

Na Figura 7.2, tem-se a relação I-V de *whole-cell* com *end-feet*, onde o $[K^+]_o$ foi gradualmente reduzido de 98 para 2,5 mM.

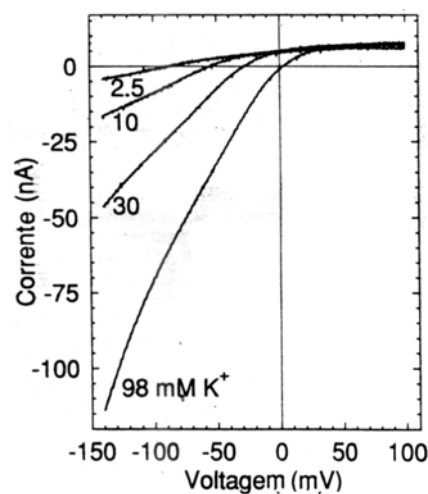


Figura 7.2 – Curva I-V de um canal retificador de K^+ de glia (*whole-cell*) com *end-feet* para diferentes concentrações de K^+ (Extraído de NEWMAN, 1993).

Observa-se que a condutância da membrana é aumentada e o gráfico I-V é deslocado para direita à medida que $[K^+]_o$ aumenta. As relações I-V são deslocadas para direita com o potencial reverso e V_h^R assumindo valores cada vez mais negativos à medida que $[K^+]_o$ diminui. Essas alterações são típicas de correntes geradas por canais retificadores de K^+ .

VII.1 – Implementação dos canais retificadores de potássio

No modelo, o fluxo de K^+ através do canal retificador, ϕ_{rect} , foi obtido pela equação de corrente de GHK, no lugar da Lei de Ohm originalmente utilizada por NEWMAN (1993):

$$\phi_{rect} = P_{rect} \cdot \frac{z_K \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T} \cdot \left(\frac{[K^+]_i - [K^+]_o \cdot e^{\left(\frac{z_K \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{z_K \cdot F \cdot Vm}{R \cdot T}\right)}} \right) \quad (7.5)$$

A permeabilidade do canal P_{rect} foi calculada de modo análogo à condutância descrita por NEWMAN (1993):

$$P_{rect} = \frac{c}{1 + \exp\left(\frac{\Delta V - V_h^R}{S^R}\right)}, \quad (7.6)$$

$$\text{onde } \Delta V = Vm - E_K, \text{ e } E_K = N_{slope} \cdot \ln\left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}\right),$$

sendo ΔV , a força para o fluxo de K^+ , E_K , o potencial de Nernst para K^+ , N_{slope} , a constante de Nernst, P_{rect} , a permeabilidade de membrana, c , fator de escala, V_h^R , a potencial na qual a condutância é metade do máximo e S^R , medida da taxa na qual a condutância se altera com a potencial. A magnitude da retificação da célula (taxa da corrente de dentro para fora) é descrita pelo parâmetro S^R enquanto que V_h^R especifica o

potencial na qual a retificação ocorre. Os parâmetros c , S^R e V_h^R são determinados a partir de ajustes otimizados pelo método do gradiente.

Além da descrição feita por Newman, incluiu-se no modelo o efeito eletrogênico da atuação dos canais retificadores sobre o potencial da membrana glial. Esse efeito foi modelado alterando-se os termos A e B da equação de GHK (equação 3.41) de potencial, somando-se a permeabilidade de K^+ com a permeabilidade do canal retificador. Dessa forma, tem-se:

$$\begin{aligned} A &= P_{Na} \cdot [Na^+]_i + (P_K + P_{rect}) \cdot [K^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_o + P_{NaK} \cdot [NaK^+]_i \\ B &= P_{Na} \cdot [Na^+]_o + (P_K + P_{rect}) \cdot [K^+]_o + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i + P_{NaK} \cdot [NaK^+]_o \end{aligned} \quad (7.7)$$

VII.2 – Atuação do canal retificador de entrada de potássio durante a DA

Como mencionado, estudos como o de NEWMAN (1993), demonstram a importância das glias na remoção do excesso de K^+ do meio extracelular, através dos canais retificadores de entrada de K^+ . A atuação desses canais pode ser visualizada por meio das simulações, durante a passagem da onda de DA (Figura 7.3). O estudo comparativo das $[K^+]_i$ glial e $[K^+]_o$ mostra que na ausência desses canais, o acúmulo de K^+ glial é menor e há um aumento da $[K^+]_o$. Verifica-se que a $[K^+]_o$ atinge 70 mM na ausência dos canais retificadores, uma diferença de 10 mM, comparado-se com o caso controle no qual o NKCC atua. Correspondentemente, a função de *buffer* de K^+ pela glia, fica incrementada pelos canais retificadores, oferecendo um incremento intracelular glial de K^+ de cerca de 15 mM.

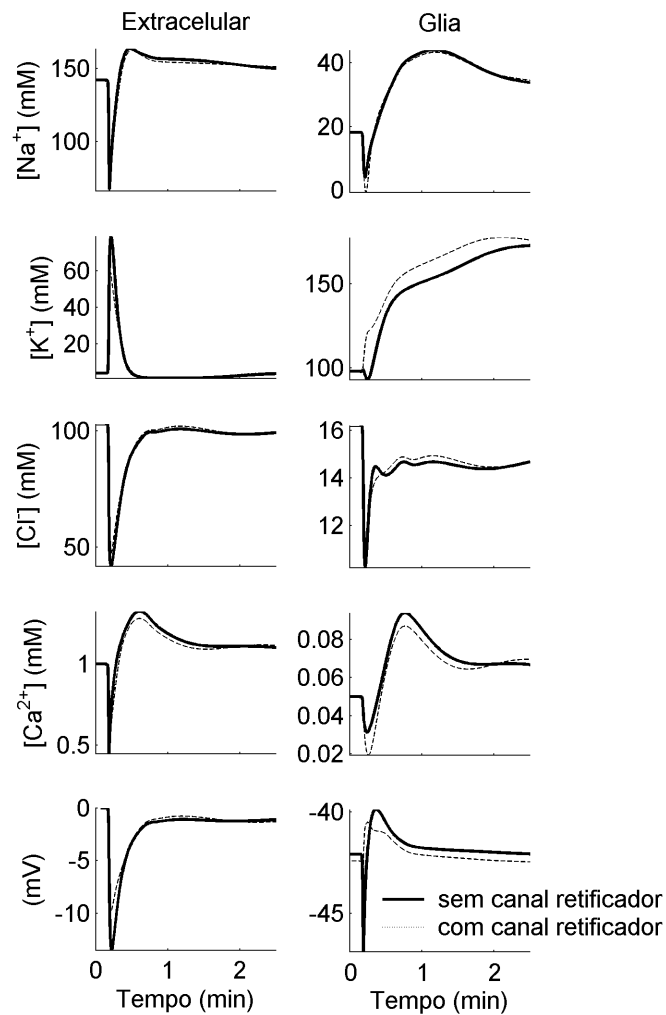


Figura 7.3 – Efeito da atuação do canal retificador de K^+ sobre as concentrações iônicas. Em pontilhado, tem-se a simulação feita com o canal. Em linhas sólidas, o efeito do canal foi desativado.

Acredita-se, ainda, que, sem essa atuação glial, o acúmulo de K^+ extracelular seja responsável pelo aumento da susceptibilidade à deflagração de ondas de DA, como observado por MÜLLER e SOMJEN (1999). Pela Figura 7.4, observa-se que o canal é ativado quando o potencial de Nernst de K^+ supera o potencial de membrana da glia, como demonstrado por NEWMAN (1993). Comparando ainda com a $[K^+]_i$ glial, conforme Figura 7.3, observa-se que mesmo com acúmulo desse íon no intracelular, os canais retificadores continuam a retirá-lo do extracelular, quando o nível de K^+ se eleva nesse meio. Esse influxo é mantido às custas do potencial transmembrânico.

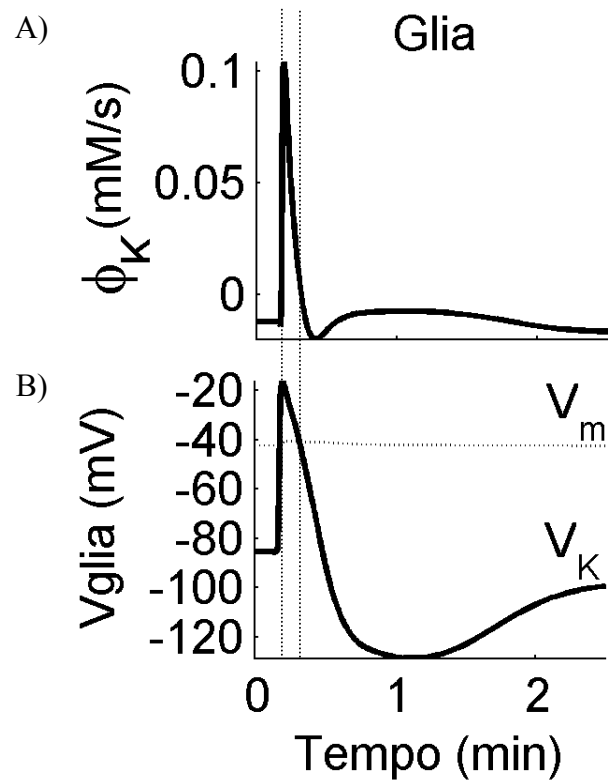


Figura 7.4 – Influxo de K^+ para a glia, através dos canais retificadores de K^+ , durante a onda de DA (A). O canal permanece atuando enquanto o potencial de Nernst de K^+ , V_K (curva sólida em B), for superior ao potencial de membrana glial, V_m (curva pontilhada em B). As linhas verticais auxiliam na comparação entre os dois registros, identificando os pontos em que as curvas de V_K e V_m se cruzam.

Capítulo VIII – Transmissão sináptica

Em 1897, o fisiologista inglês Charles Sherrington descobriu que a transferência de informações entre neurônios ocorre em sítios de contato especializados. Esses sítios foram denominados sinapses e o processo de transferência de informação, transmissão sináptica. A natureza da transmissão sináptica permaneceu uma incógnita durante anos. FURSHPAN e POTTER, (1959) propuseram que a transmissão sináptica fosse de natureza elétrica, considerando-se a velocidade de transmissão. Uma hipótese alternativa surgida antes de 1900, propunha a existência de substância neurotransmissoras. A existência dessas substâncias foi comprovada por Otto Loewi em 1921 (BEAR *et al.*, 1996).

As sinapses químicas, cuja transmissão ocorre pela liberação de substâncias neurotransmissoras de neurônios pré-sinápticos, são as mais comuns. Essas substâncias se difundem na fenda sináptica (20 a 30 nm de distância, segundo KLEINSMITH e KISH, 1995) até atingir o neurônio pós-sináptico. As substâncias neurotransmissoras encontram-se armazenadas em vesículas e são liberadas na fenda quando ocorre a despolarização da membrana. Essas vesículas são de dois tipos: pequenas vesículas sinápticas (50 nm de diâmetro) localizadas próximas à membrana do terminal e grânulos de secreção (90 a 250 nm de diâmetro), que estão distribuídas de forma mais espaçadas no terminal (KLEINSMITH e KISH, 1995).

Nas sinapses elétricas, que são relativamente raras em vertebrados superiores, os neurônios pré- e pós-sinápticos estão fisicamente unidos por estruturas denominadas *gap-junctions*, que permitem comunicação elétrica direta entre os citoplasmas de duas células (WOLFE, 1993). Nessa região, o espaço entre as membranas pré- e pós-sinápticas é de apenas 2 a 3,5 nm. O fluxo de íons através das *gap-junctions* permite a passagem da despolarização da membrana diretamente do terminal pré-sináptico para o terminal pós-sináptico. Esse acoplamento direto permite que o sinal seja transmitido mais rapidamente do que em uma sinapse química, onde é necessário tempo para a difusão das substâncias neurotransmissoras (Figura 8.1).

Os sinais se movem tão rapidamente através das sinapses que por muitos anos acreditou-se que se tratava de um fenômeno puramente elétrico. Apesar dessa informação ser verdadeira para o caso das sinapses elétricas, a maioria das sinapses são

químicas. Os sinais são transmitidos através da fenda sináptica por difusão de moléculas denominadas neurotransmissores. Uma relação dos principais neurotransmissores e as principais áreas de atuação é mostrada na Tabela 8.1.

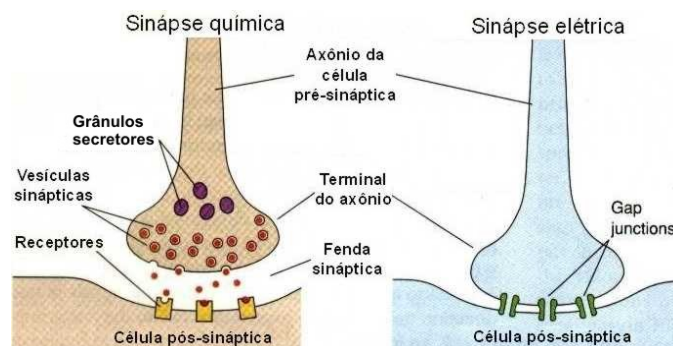


Figura 8.1 – Estrutura das sinapses químicas e elétricas. Nas sinapses químicas os sinais são transmitidos por neurotransmissores liberados por exocitose do terminal pré-sináptico, que se difundem através da fenda sináptica, e se ligam ao receptor no terminal pós-sináptico. Nas sinapses elétricas, os sinais são transmitidos por ions que fluem diretamente através das *gap-junctions* que ligam os citoplasma dos neurônios pré- e pós-sinápticos (extraído de KLEINSMITH e KISH, 1995).

Tabela 8.1 – Relação dos principais tipos de neurotransmissores e o sítio de atuação.

Tipo	Neurotransmissor	Principal área de ação
Aminas	Acetilcolina	Junção neuromuscular e cérebro
	Norepinefrina	Sistema nervoso central e sistema simpático
	Dopamina	Cérebro e sistema simpático
	Serotonina	Cérebro
	Histamina	Hipotálamo
Aminoácidos	Ácido γ -aminobutírico (GABA)	Sistema nervoso central
	Glicina	Medula espinhal
	Glutamato	Sistema nervoso central
Peptídeos	Tirotropina	Hipotálamo
	Leu-enkefalina	Cérebro
	Met-enkefalina	Cérebro
	Gonadotropina	Hipotálamo
	Somatostatina	Hipotálamo
	β -endorfina	Glândula pituitária
	Substância P	Cérebro
	Neurotensina	Cérebro
	Calcitonina	Cérebro
Peptídeo intestinal vasoativo	Intestino	
Purinas	ATP	Cérebro

A liberação de neurotransmissores é regulada pela entrada de íons de Ca^{2+} no terminal (KATZ, 1969 e LLINÁS *et al.*, 1995). Segundo AUGUSTINE (2001), essa liberação envolve muitas reações de transição e cada reação requer um número considerável de interações do tipo proteína-proteína. A membrana do terminal pré-sináptico no repouso é relativamente impermeável ao Ca^{2+} , cuja concentração é maior no meio extracelular. Durante a despolarização, ocorre a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de potencial permitindo a entrada desse íon que, por sua vez, inicia a exocitose das vesículas (BENNETT, 1997).

Além da regulação da exocitose, evidências demonstram que o Ca^{2+} também está envolvido na regulação de outros aspectos da liberação de neurotransmissores, incluindo o recrutamento de vesículas sinápticas para os sítios de liberação (MENNERICK e MATTHEWS, 1996, ROSENMUND e STEVENS, 1996, KOENIG *et al.*, 1993), liberação assíncrona de neurotransmissores (GODA e STEVENS 1994) e várias formas de plasticidade sináptica de curto termo (ZUCKER, 1996).

A liberação de neurotransmissores na fenda sináptica induzida por Ca^{2+} é extremamente rápida, comparada com a exocitose em outras células. A velocidade do processo é baseada na existência das vesículas sinápticas (localizadas junto à superfície interna da membrana do terminal) e dos grânulos secretores, mais afastados, e presos ao cito-esqueleto por uma proteína denominada sinapsina (KLEINSMITH e KISH, 1995). Para explicar a velocidade de liberação de neurotransmissores, considera-se que as vesículas sinápticas possuem uma proteína formadora de canais alinhada com uma proteína semelhante na membrana do terminal. De acordo com esse modelo, o canal formado pelas duas proteínas normalmente estaria fechado, mas um aumento na concentração de Ca^{2+} provocaria uma alteração conformacional que permitiria a abertura do canal para a liberação de neurotransmissores diretamente na fenda sináptica (Figura 8.2). A localização precisa das vesículas sinápticas próximas de canais de Ca^{2+} é determinante para a velocidade de liberação de neurotransmissores (BENNETT, 1997)

Modelos matemáticos indicam que a difusão produz uma rápida acumulação de Ca^{2+} em uma área com poucas dezenas de nanômetros ao redor dos canais de Ca^{2+} (SIMON e LLINÁS, 1985). Essa área é chamada de domínio de Ca^{2+} (CHAD e ECKERT, 1984) ou nanodomínio (KASAI, 1993).

As vesículas sinápticas são uma pequena fração do total da população de vesículas. Sabe-se que a entrada de Ca^{2+} estimula proteínas dependentes de Ca^{2+} que,

por sua vez, catalisa a fosforilação da sinapsina, destruindo sua capacidade de fixar os grânulos ao cito-esqueleto, aumentando a reserva de vesículas de liberação.

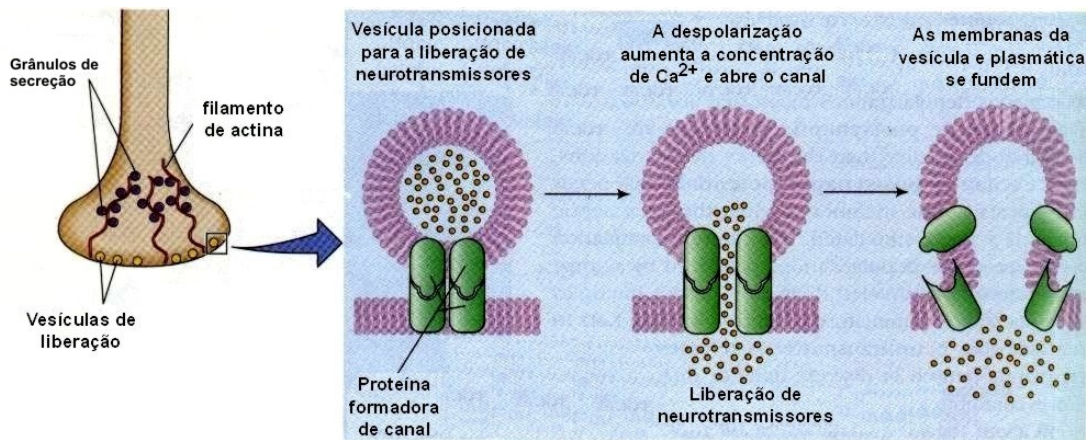


Figura 8.2 – Modelo proposto para explicar a velocidade de liberação dos neurotransmissores. A entrada de íons de Ca^{2+} provoca alterações conformacionais na proteína formadora de canais que se abre e permite a difusão de neurotransmissores para a fenda sináptica (extraído de KLEINSMITH e KISH, 1995).

Como a liberação de neurotransmissores é seguida da fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica, deve existir um mecanismo que previne a expansão descontrolada da membrana plasmática durante a transmissão sináptica. A descoberta de que o número de vesículas presente no terminal não aumenta significativamente durante a transmissão, sugere que o material adicionado à membrana plasmática está sendo continuamente reciclado para a formação de novas vesículas. Esse processo de reciclagem, denominado endocitose, é esquematizado na Figura 8.3.

Os neurotransmissores liberados do terminal pré-sináptico se difundem através da fenda sináptica e se ligam a receptores específicos localizados na membrana pós-sináptica. A ligação de um neurotransmissor ao seu receptor correspondente provoca alterações na permeabilidade e, conseqüentemente, no potencial da membrana pós-sináptica. Neurotransmissores excitatórios provocam a despolarização da membrana, enquanto que neurotransmissores inibitórios induzem a hiperpolarização.

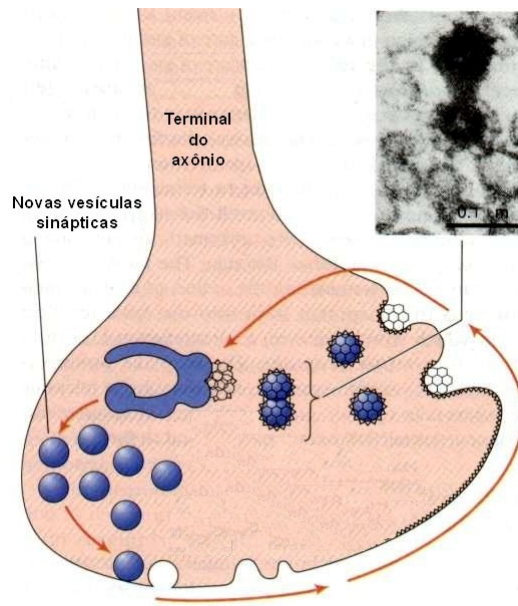


Figura 8.3 – Processo de reciclagem das vesículas sinápticas. O material adicionado à membrana durante a exocitose da vesícula sináptica é retornado por endocitose. A micrografia mostra a fusão de duas vesículas incorporadas (extraído de KLEINSMITH e KISH, 1995).

A neurotransmissão química pode ser dividida em duas categorias principais, baseando-se no tipo de receptor envolvido: a transmissão química rápida e a lenta (WOLFE, 1993). Na transmissão química rápida (requer alguns milissegundos) os canais iônicos possuem receptores que se abrem quando ocupados por neurotransmissores. A ligação de um neurotransmissor a esses receptores altera a permeabilidade do canal, provocando uma alteração imediata no fluxo iônico da membrana pós-sináptica e resultando numa alteração do potencial de membrana. Esse tipo de neurotransmissão é mais comum com a acetilcolina e o glutamato, para sinapses excitatórias, e glicina e GABA para sinapses inibitórias. Na transmissão química lenta (requer centenas de milissegundos) os receptores não estão localizados nos canais e utilizam-se de proteínas específicas, denominadas proteínas G, para desempenhar suas funções. Esses receptores podem alterar as propriedades dos canais e os níveis de mensageiros secundários intracelulares por meio da ação intermediária das proteínas G. A maior parte dos neurotransmissores do tipo amina e peptídicos são dependentes de proteína G.

Além da diferenciação do tipo de receptor empregado e da velocidade de resposta, a transmissão rápida ou lenta também se difere na maneira em que os neurotransmissores são armazenados e liberados. Os neurotransmissores rápidos são

sintetizados e armazenados no terminal do axônio em pequenas vesículas sinápticas e liberados em sítios especializados. Os neurotransmissores lentos são normalmente sintetizados e armazenados em vesículas maiores nos corpos celulares. As vesículas são, então, transportadas para o terminal, onde o conteúdo é liberado por meio de sítios especializados (Figura 8.4). Alguns neurotransmissores podem ser armazenados nos dois tipos de vesículas.

Uma vez que o neurotransmissor tenha se ligado ao receptor, sua ação deve ser neutralizada de forma a prevenir que a célula permaneça num estado contínuo de excitação (ou inibição). Essa neutralização pode se dar por simples difusão das moléculas neurotransmissoras ou por reabsorção pelo terminal sináptico (BEAR *et al.*, 1996, CLEMENTS, 1996). No caso da acetilcolina, a enzima acetilcolinesterase, presente na fenda sináptica, rapidamente degrada o neurotransmissor em acetato e colina. Como a acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor a ser estudado em detalhe, supôs-se que a inativação por degradação enzimática fosse válida para todos os neurotransmissores. No entanto, verificou-se que o mecanismo mais comum para cessar a ação de um neurotransmissor é o seqüestro para o terminal de onde foi liberado. Transportadores de neurotransmissores, localizados na membrana de células gliais ao redor das sinapses também contribuem para a remoção dessas substâncias na fenda sináptica (NEWMAN, 2003).

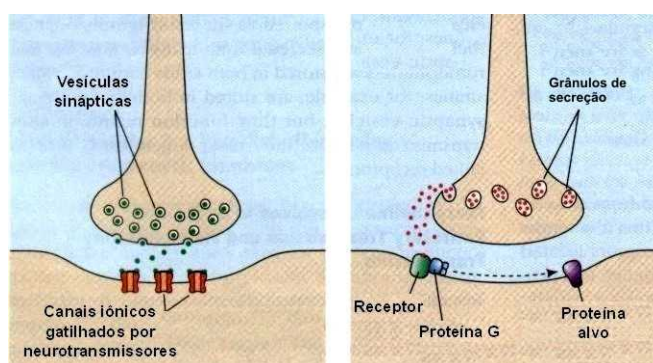


Figura 8.4 – Transmissão química rápida e lenta. A transmissão rápida (à esquerda) utiliza pequenas moléculas neurotransmissoras que são liberadas a partir das vesículas sinápticas, se difundem através da fenda sináptica e atuam diretamente nos canais iônicos na membrana pós-sináptica. À direita, durante a transmissão lenta, os neurotransmissores são liberados a partir de grandes vesículas de secreção e atuam sobre receptores dependentes de proteína G no terminal pós-sináptico (extraído de KLEINSMITH e KISH, 1995).

VIII.1 – Implementação do mecanismo de transmissão sináptica

Segundo JOHNSTON e WU (1995), durante a neurotransmissão, os eventos sinápticos envolvidos podem ser resumidos na seguinte seqüência:

1. **Despolarização neuronal:** a despolarização neuronal, na dependência de canais de Na^+ e K^+ , atinge o terminal pré-sináptico.
2. **Despolarização no terminal:** a despolarização ativa os vários canais dependentes de potencial, presentes no terminal pré-sináptico, principalmente canais de Ca^{2+} , permitindo um influxo desse íon para o terminal.
3. **Fusão da vesícula com a membrana e liberação de neurotransmissores:** a entrada de Ca^{2+} no terminal próximo de sítios receptores provoca a fusão das vesículas sinápticas com a membrana do terminal. Essa fusão resulta na liberação dos neurotransmissores, denominada exocitose.
4. **Difusão:** os neurotransmissores se difundem na fenda sináptica até atingir os receptores da membrana pós-sináptica.
5. **Ligação a receptores:** os neurotransmissores se ligam a receptores específicos na membrana pós-sináptica, que por sua vez modulam a abertura de canais iônicos nesse terminal.
6. **Abertura de canais iônicos:** a ligação dos neurotransmissores a receptores provoca a rápida abertura dos canais. Essa abertura provoca alterações no potencial de membrana do neurônio pós-sináptico. Em algumas sinapses, a ligação de neurotransmissores a receptores provoca a liberação de mensageiros secundários no citoplasma do neurônio pós-sináptico, que por sua vez, modulam a abertura de canais iônicos. Será admitido que os receptores, uma vez ligados ao neurotransmissores, modulam diretamente a abertura dos canais como ocorre com a acetilcolina, o glutamato e o GABA.
7. **Endocitose das vesículas:** depois da exocitose, a membrana da vesícula se separa da membrana do terminal pré-sináptico para formar uma nova vesícula em um processo denominado endocitose.
8. **Seqüestro de neurotransmissores:** de forma a evitar que um terminal permaneça constantemente no estado excitatório, os neurotransmissores, após se ligarem aos receptores, retornam ao terminal de origem para que possam ser reutilizados.

O mecanismo de liberação de neurotransmissores na fenda sináptica foi implementado computacionalmente a partir do modelo elaborado de acordo com os mecanismos básicos da neurotransmissão usualmente aceitos pela literatura. O modelo consiste da descrição de reações químicas que representam cada passo da neurotransmissão sináptica.

Uma síntese do modelo de transmissão sináptica é apresentada na Figura 8.5. Despolarizações da membrana pré-sináptica provocam a abertura de canais de Ca^{2+} . O fluxo iônico através desses canais provoca o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (1). O aumento da concentração deste íon no terminal pré-sináptico faz com que as vesículas se fundam à membrana neuronal, liberando neurotransmissores na fenda sináptica (2). Estes se difundem no meio extracelular da fenda até atingirem o terminal pós-sináptico, onde se ligam a sítios específicos de canais iônicos (3), provocando alterações no valor de permeabilidade (4). Em seguida, os neurotransmissores se desligam dos sítios de ligação, podendo reagir com enzimas de degradação (5). Essas enzimas provocam a inativação dos neurônios que reagem com as enzimas de reabsorção (6), retornando para o terminal pré-sináptico (7), sendo novamente armazenados nas vesículas sinápticas (8), para nova liberação.

O aumento da concentração pré-sináptica de Ca^{2+} , devido ao influxo deste íon, geralmente oriundo de despolarizações neuronais, provoca a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. A liberação dos neurotransmissores para a fenda sináptica, induzida pelo aumento da concentração de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico, foi sintetizada pela seguinte equação:

$$\frac{d[T_{liberado}](t)}{dt} = \gamma \cdot [T_{pre}](t) \cdot ([Ca^{2+}]_{pre}(t) - [Ca^{2+}]_{pre,normal})^2, \quad (8.1)$$

onde γ é uma constante de ajuste ($\gamma = 600,0$), $[T_{liberado}]$ a concentração de neurotransmissores liberados na fenda, $[T_{pre}]$ a concentração pré-sináptica de neurotransmissores armazenados em vesículas próximas à membrana do terminal, portanto, reativa à entrada de Ca^{2+} , e $[Ca^{2+}]_{pre,normal}$ a concentração pré-sináptica de Ca^{2+} no repouso.

A dependência quadrática de $d[T_{liberado}](t)/dt$ com o incremento de Ca^{2+} intracelular foi admitida a partir da busca de uma forma mais adequada para a variação

positiva das permeabilidades na frente da onda de DA. Esse ajuste tomou como base medidas experimentais da taxa de variação da concentração de neurotransmissores na frente da onda de DA, feitas por voltametria (PEREIRA *et al.*, 2003).

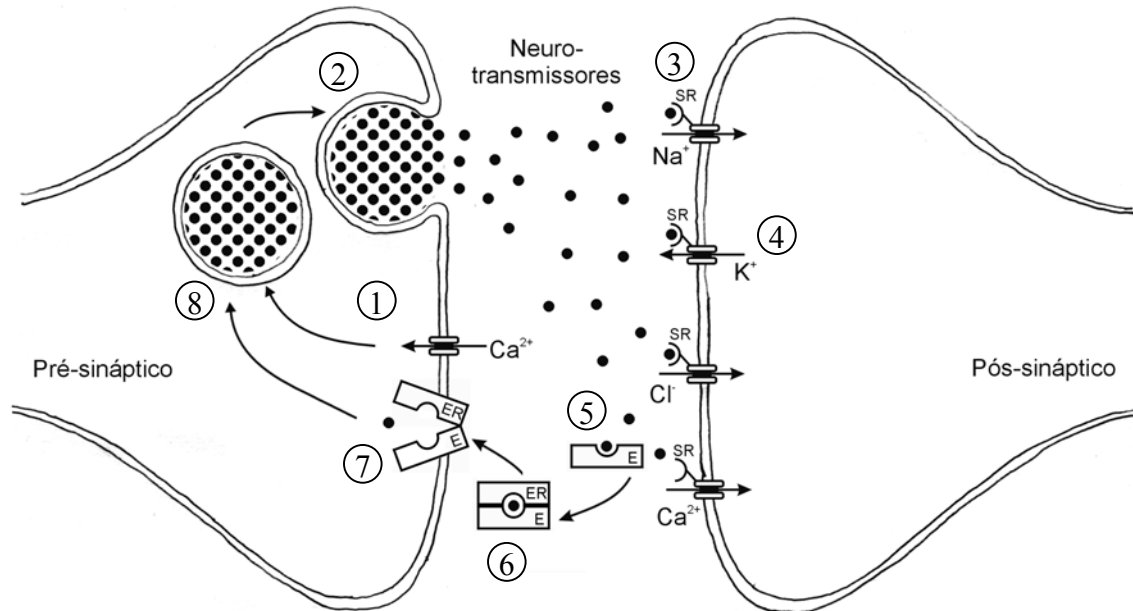


Figura 8.5 – Diagrama esquemático do mecanismo de transmissão sináptica. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , (1), provoca a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, (2). Estes se ligam a sítios específicos, SR, nos canais pós-sinápticos, (3), provocando alterações no valor de permeabilidade e permitindo a ocorrência de fluxos pós-sinápticos, (4). Em seguida, os neurotransmissores se desligam dos sítios de ligação podendo reagir com enzimas de degradação, E, (5), tornando-se inativos. Uma vez no estado inativo, os neurotransmissores reagem com as enzimas de reabsorção, ER, (6), retornando para o terminal pré-sináptico, (7), sendo novamente armazenados nas vesículas sinápticas, (8), para nova liberação.

Uma vez no meio extracelular, os neurotransmissores podem se ligar aos sítios receptores SR, presentes nos canais pós-sinápticos. Esse processo foi representado pela seguinte reação:



onde T_o representa o neurotransmissor livre na fenda sináptica e T_oSR representa o sítio receptor ocupado por um neurotransmissor.

A partir da reação 8.2, a taxa de variação da concentração do composto T_oSR foi expressa por:

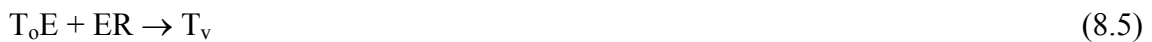
$$\frac{d[T_oSR](t)}{dt} = \varphi \cdot [T_o](t) \cdot [SR_{\max}] - \varepsilon \cdot [T_oSR](t), \quad (8.3)$$

onde SR_{\max} se refere aos sítios receptores, φ e ε são as constantes de dissociação e formação dos compostos, ajustadas em $\varphi = 1,5$ e $\varepsilon = 0,05$. A concentração de SR_{\max} foi mantida constante no seu valor máximo ($[SR_{\max}] = 1,0$) para indicar que o número de receptores é sempre suficiente para a quantidade de neurotransmissores liberados na fenda sináptica.

Na fenda sináptica, existem enzimas de degradação (E) que atuam sobre os neurotransmissores formando o composto T_oE . Essas enzimas são responsáveis por tornar os neurotransmissores inativos. A formação do composto T_oE foi, então, expressa pela reação:



Uma vez no estado inativo, os neurotransmissores podem ser reabsorvidos para o terminal pré-sináptico. A exemplo da enzima acetilcolinesterase nas junções colinérgicas, esse processo foi representado pela reação da enzima de reabsorção ER com T_oE , que será responsável pela formação do conteúdo T_v das vesículas de neurotransmissores, da seguinte forma:



Após formação da vesícula de neurotransmissores, há um decurso de tempo até seu estado de acoplamento à membrana pré-sináptica, quando seu conteúdo estará disponível para nova liberação na fenda, o que foi sintetizado pela seguinte reação.



onde T_v representa os neurotransmissores armazenados em vesículas, mas ainda não reativas à entrada de Ca^{2+} no terminal e \bar{T}_v representa os neurotransmissores armazenados em vesículas que são reativas à entrada de Ca^{2+} no terminal. A reação 8.6 pode ser representada pela seguinte equação:

$$\frac{d[\bar{T}_v](t)}{dt} = \beta[T_v](t), \quad (8.7)$$

onde o parâmetro β é uma constante de tempo associada à ativação dos neurotransmissores das vesículas, ajustada em $0,002 \text{ s}^{-1}$. Deve-se, portanto, observar que a taxa de formação de \bar{T}_v incrementa a taxa de formação de T_{pre} .

Em função da descrição de 8.6 por 8.7, e considerando que há sempre enzimas de reabsorção ER para os neurotransmissores inativos presentes na fenda, e levando em conta a reação 8.5, pode-se descrever a taxa de variação temporal de T_v dada por:

$$\frac{d[T_v](t)}{dt} = \nu \cdot [T_oE](t) - \beta \cdot [T_v](t), \quad (8.8)$$

onde ν é a constante de tempo de armazenamento de T_v nas vesículas, ajustada em $0,16 \text{ s}^{-1}$. O termo $\nu \cdot [T_oE](t)$ refere-se à taxa de formação de T_v a partir de T_oE e ER.

Essas considerações juntadas às reações 8.4 e 8.5 permitem calcular a taxa de variação temporal de T_oE , considerando que $\alpha \cdot [T_o](t) \cdot [E](t)$ é taxa de formação de T_oE , conforme 8.4, sendo α a constante de tempo de formação, ajustada em $0,4 \text{ s}^{-1}$:

$$\frac{d[T_oE](t)}{dt} = \alpha \cdot [T_o](t) \cdot [E](t) - \nu \cdot [T_oE](t) \quad (8.9)$$

Se a concentração máxima de enzimas de degradação (E_{max}) é dada pelo somatório entre as enzimas de degradação livres e ocupadas, então,

$$[E]_{max} = [E] + [T_oE] \quad (8.10)$$

Substituindo-se 8.10 em 8.9, tem-se:

$$\frac{d[T_oE](t)}{dt} = \alpha \cdot [T_o](t) \cdot (E_{\max} - [T_oE](t)) - \nu \cdot [T_oE](t) \quad (8.11)$$

A partir dos equacionamentos anteriores, pode-se calcular a taxa de variação temporal de neurotransmissores livres na fenda sináptica. Essa taxa será função da taxa de neurotransmissores liberados na fenda (equação 8.1), da taxa de formação do composto T_oSR (equação 8.3), da taxa de formação do composto T_oE e da difusão dos neurotransmissores ao longo do espaço extracelular:

$$\begin{aligned} \frac{d[T_o](t)}{dt} = & \gamma \cdot [T_{pre}](t) \cdot ([Ca^{2+}]_{pre}(t) - [Ca^{2+}]_{pre,normal}) - \\ & - \varphi \cdot [T_o](t) \cdot [SR_{\max}](t) + \varepsilon \cdot [T_oSR](t) - \\ & - \alpha \cdot [T_o](t) \cdot ([E]_{\max} - [T_oE](t)) + \\ & + D_{T_o} / \lambda^2 \cdot \nabla^2 [T_o] \end{aligned} \quad (8.10)$$

onde D_{T_o} é a constante de difusão dos neurotransmissores no meio extracelular, ajustada em $3,64 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$.

O cálculo da taxa de variação temporal de T_{pre} será função da taxas de variação da concentração de neurotransmissores em vesículas que se tornaram reativas ao influxo de Ca^{2+} (equação 8.7), menos a taxa de liberação na fenda sináptica (equação 8.1), mais a taxa de síntese pelo retículo endoplasmático, representada por $\mu \cdot (1 - [T_{pre}](t))$, onde μ foi ajustado em $0,0013 \text{ s}^{-1}$:

$$\frac{d[T_{pre}](t)}{dt} = -\gamma \cdot [T_{pre}](t) \cdot ([Ca^{2+}]_{pre}(t) - [Ca^{2+}]_{pre,normal}) + \beta \cdot [T_v](t) + \mu \cdot (1 - [T_{pre}](t)) \quad (8.12)$$

Como a permeabilidade pós-sináptica é função da $[T_oSR]$, calculada a partir de 8.3, admitindo uma relação de proporcionalidade ao número de canais abertos, então, $P_{C,pst}$, a permeabilidade iônica de um íon C no terminal pós-sináptico, é calculada por:

$$P_{C,pst} = p_{C,pst} \cdot [T_oSR], \quad (8.13)$$

onde $p_{C,psl}$ é uma constante de proporcionalidade, dada em $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$.

Em síntese, o modelo da neurotransmissão é dado pelo seguinte sistema de equações diferenciais:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[T_oSR](t)}{dt} = \varphi \cdot [T_o](t) \cdot [SR_{\max}] - \varepsilon \cdot [T_oSR](t) \\ \frac{d[T_o](t)}{dt} = \gamma \cdot [T_{pre}](t) \cdot ([Ca^{2+}]_{pre}(t) - [Ca^{2+}]_{pre,normal}) - \\ \quad - \varphi \cdot [T_o](t) \cdot [SR_{\max}](t) + \varepsilon \cdot [T_oSR](t) - \\ \quad - \alpha \cdot [T_o](t) \cdot ([E]_{\max} - [T_oE](t)) + \\ \quad + D_{T_o} \cdot \nabla^2 [T_o] \\ \frac{d[T_oE](t)}{dt} = \alpha \cdot [T_o](t) \cdot (E_{\max} - [T_oE](t)) - \nu \cdot [T_oE](t) \\ \frac{d[T_v](t)}{dt} = \nu \cdot [T_oE](t) - \beta \cdot [T_v](t) \\ \frac{d[T_{pre}](t)}{dt} = -\gamma \cdot [T_{pre}](t) \cdot ([Ca^{2+}]_{pre}(t) - [Ca^{2+}]_{pre,normal}) + \beta \cdot [T_v](t) + \mu \cdot (1 - [T_{pre}](t)) \end{array} \right.$$

VIII.2 – Atuação do mecanismo de transmissão sináptica durante a DA

A resposta do modelo a um degrau de $[Ca^{2+}]_{pre}$ é mostrada na Figura 8.6. Aplicando-se um pulso de Ca^{2+} no meio pré sináptico é possível observar a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica e o seu retorno, com o auxílio das enzimas de degradação e absorção. O retorno de T_{pre} é importante para a definição do período refratário da onda de DA.

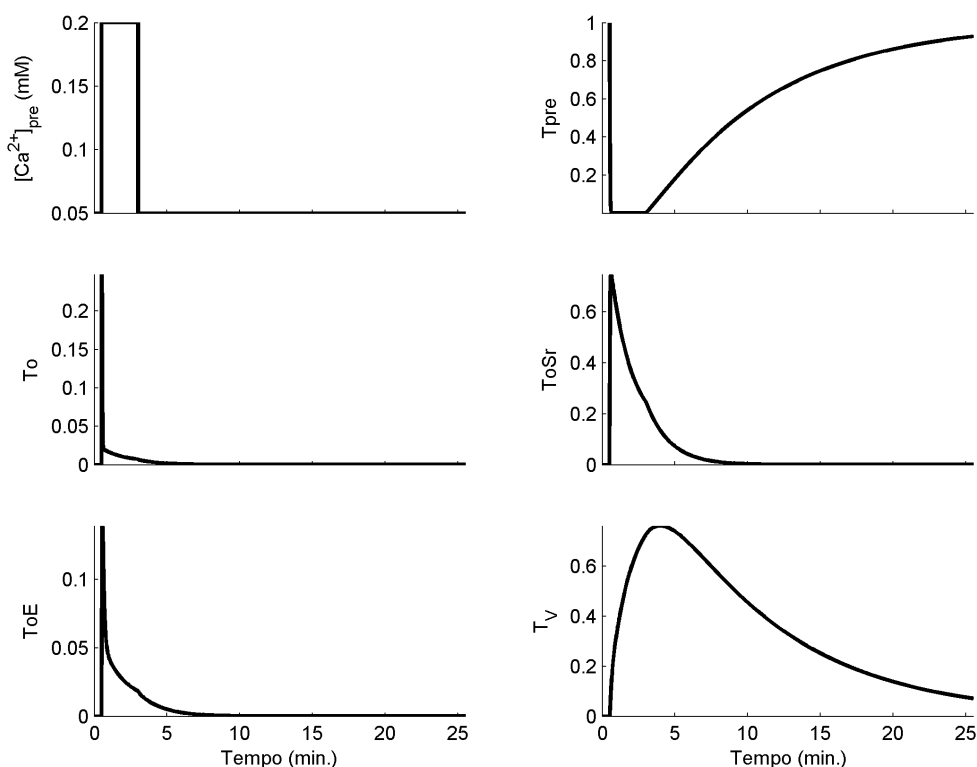


Figura 8.6 – Resposta do modelo de neurotransmissão a um degrau de $[Ca^{2+}]_{pre}$. A quantidade de neurotransmissores no terminal sináptico (T_{pre}) é inicializada em 1. Com o degrau de $[Ca^{2+}]_{pre}$ esse valor diminui, pois o T_{pre} invade a fenda sináptica tornando-se T_o . Parte de T_o se liga aos canais receptores (T_oS_r) enquanto que parte de T_o se liga às enzimas de inativação formando T_oE . Os neurotransmissores inativos na fenda sináptica retornam ao terminal pré-sináptico sendo armazenados em vesículas (T_v). Após o degrau de $[Ca^{2+}]_{pre}$ observa-se a recuperação nos níveis de T_{pre} .

O comportamento do modelo de neurotransmissão durante a onda de DA é mostrado na Figura 8.7. O aumento da concentração pré-sináptica de Ca^{2+} provoca a rápida liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Isso é verificado pela diminuição da concentração de T_{pre} . Uma vez na fenda sináptica, os neurotransmissores (T_o) se ligam rapidamente aos sítios receptores dos canais pós-sinápticos (T_oSR). Em seguida, após modular as permeabilidades pós-sinápticas, os neurotransmissores são degradados por enzimas de inativação (T_oE) e retornam para os terminais pré-sinápticos, onde são armazenados em vesículas (T_v). Observa-se que, após a passagem da onda de DA, a concentração de neurotransmissores no terminal é recuperada no decurso de dez minutos. Esse tempo caracteriza o período de restabelecimento dos níveis normais de

concentrações intracelulares, constituindo o chamado período refratário observado na onda de DA.

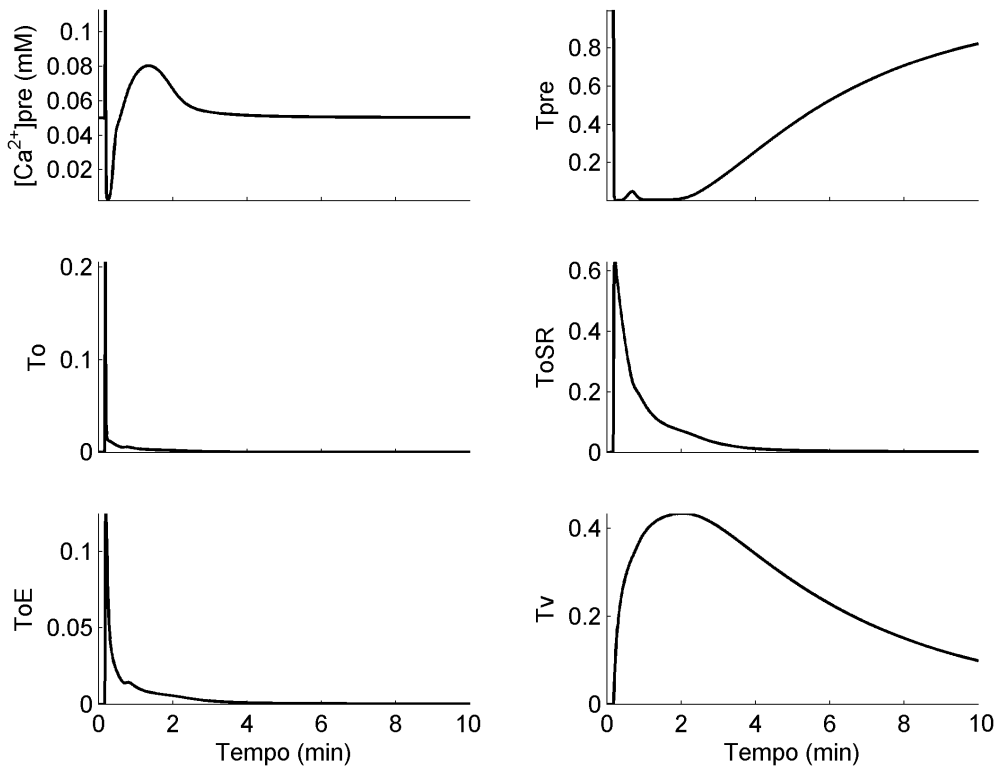


Figura 8.7 – Comportamento do modelo de neurotransmissão durante a onda de DA. O aumento da concentração de Ca^{2+} pré-sináptico provoca a depleção dos neurotransmissores no terminal que invadem a fenda sináptica e se ligam aos sítios receptores dos canais pós-sinápticos. Após a passagem da onda, a concentração pré-sináptica de neurotransmissores retorna aos valores de repouso.

Capítulo IX – Simulações a partir do Modelo Matemático

IX.1 – Simulação do tecido neuronal em condições de repouso e de propagação da onda de DA

A condição de repouso do tecido neuronal, representada pelo modelo, se caracteriza quando, em perfusão com solução de perfusão normal, não se verifica a geração espontânea de ondas de DA. Nesta condição, é necessário que os ajustes feitos nas permeabilidades e nos mecanismos de restabelecimento iônico não provoquem movimentações iônicas através da membrana. Ou seja, os fluxos entre os compartimentos intra- e extracelulares devem estar em equilíbrio. Na Figura 9.1, observa-se a ausência de variações da concentração nos compartimentos do modelo, mesmo após 10 minutos de simulação.

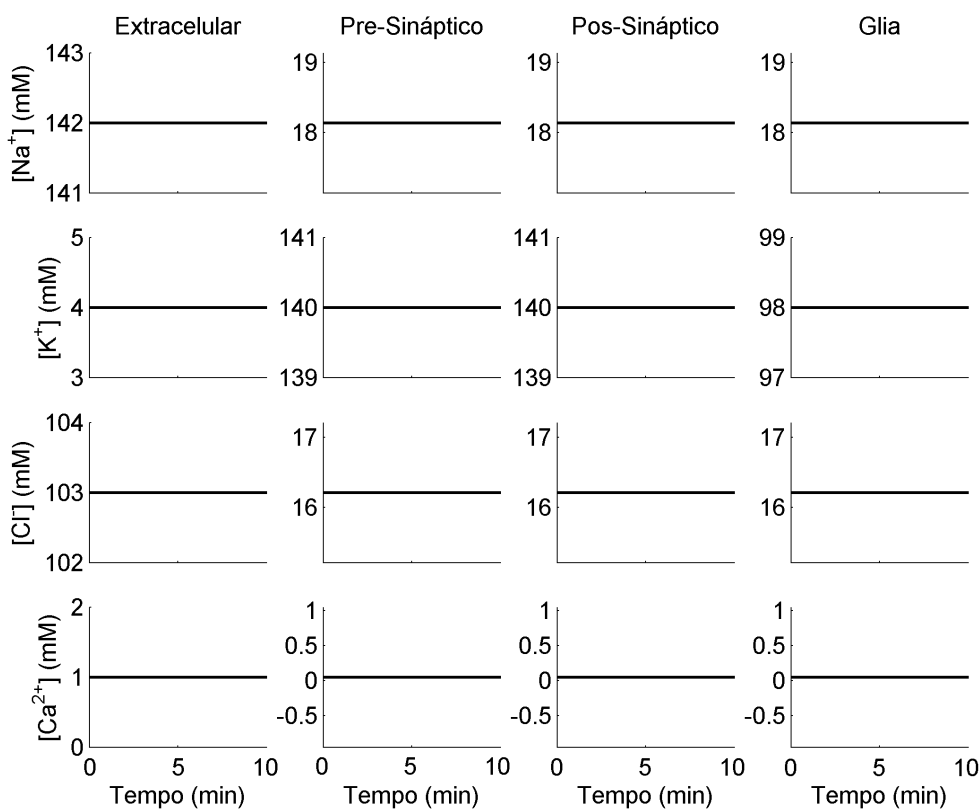


Figura 9.6 – Simulação do tecido neuronal com perfusão de solução normal sem aplicação de estímulo para verificação da estabilidade do modelo.

Uma vez ajustadas as condições de equilíbrio do repouso, foi possível a simulação da onda de DA, deflagrada por meio da aplicação de uma distribuição Gaussiana de $[K^+]_o$, centralizada no ponto de estímulo da rede de compartimentos (compartimento 13 da linha central do plano de observação da Figura 4.2). A DA é o único fenômeno conhecido onde a concentração extracelular de K^+ aumenta de seu valor de repouso (3 a 4 mM) para além do nível limite funcional (*ceiling level*) de 10 mM (HEINEMANN E LUX, 1997) chegando a atingir concentrações superiores a 50 mM (SUGAYA *et al.*, 1975). Várias concentrações de K^+ extracelular foram testadas para o estímulo, onde se determinou que o valor mínimo para a deflagração da onda de DA, no modelo, é 9 mM. Acima desse limite, a velocidade de propagação, a forma de onda e a magnitude independem da intensidade do estímulo. Abaixo desse limite, não foi possível a deflagração de ondas de DA.

Na Figura 9.2, tem-se a simulação da propagação do potencial extracelular, após a aplicação do estímulo, que normalmente é registrado em experimentos de DA. A velocidade da onda simulada foi de 6,02 mm/min. Este valor se encontra dentro da faixa observada experimentalmente para ondas isoladas de DA.

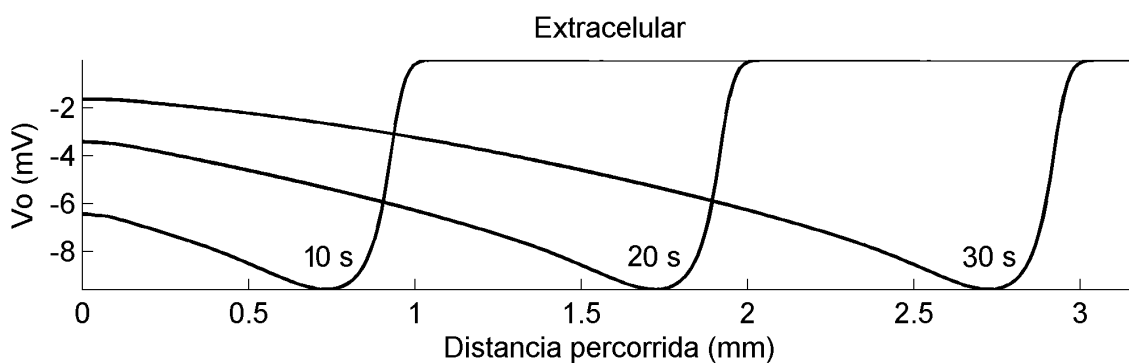


Figura 9.2 – Propagação da onda de potencial extracelular em uma linha central da rede de compartimentos a uma velocidade de 6,02 mm/min.

O modelo possibilita prever, simultaneamente, a dinâmica das concentrações dos ions no meio extracelular. Com as descrições dos fluxos transmembrânicos por meio de canais iônicos e dos mecanismos de recuperação, é possível, ainda, verificar as movimentações iônicas nos terminais sinápticos e nas glias e seus respectivos potenciais transmembrânicos, em resposta ao estímulo (Figura 9.3).

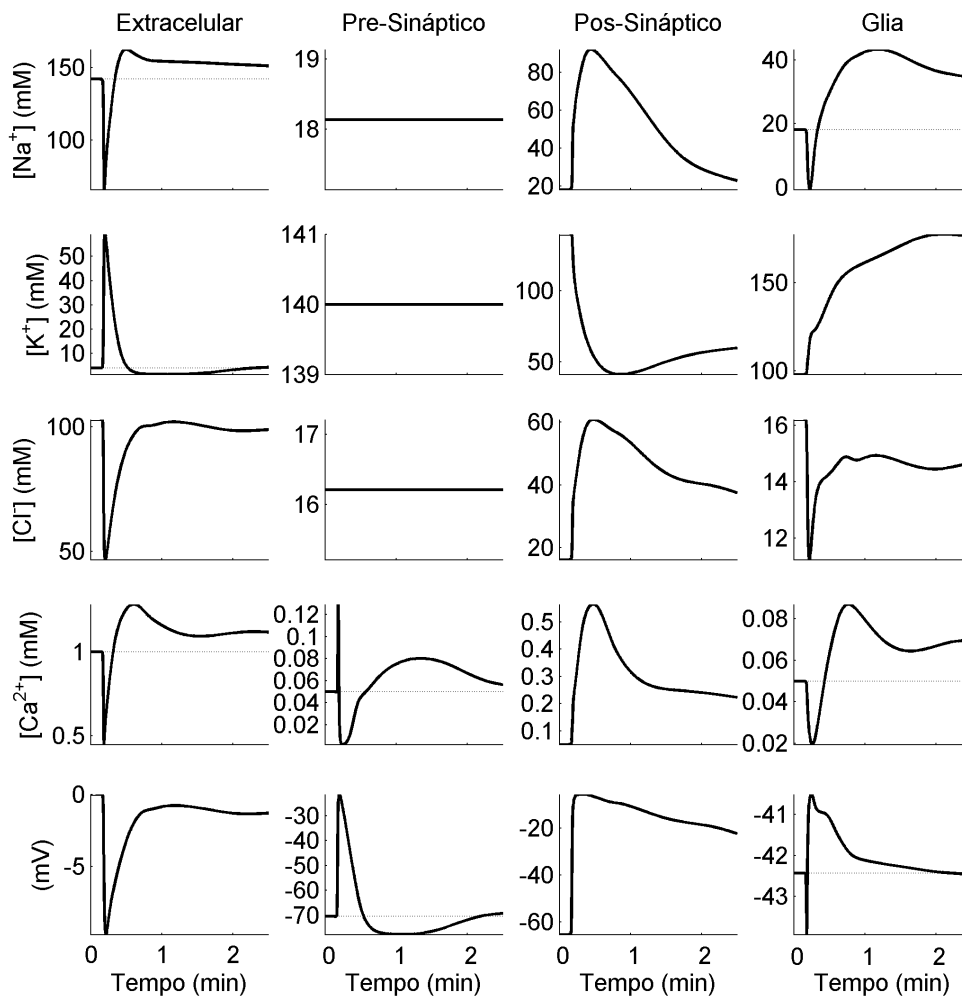


Figura 9.3 – Simulação da dinâmica das concentrações iônicas, do potencial extracelular e transmembrânicos durante a passagem da onda de DA. A linha pontilhada representa a concentração iônica no repouso.

Nesta mesma simulação, porém para um período de tempo de dez minutos (Figura 9.4), nota-se que, embora as concentrações iônicas e potencial extracelulares tenham retornado ao repouso no decurso de dois minutos, esses mesmos parâmetros, previstos para os meios intracelulares de terminais sinápticos e gliais, apresentam um excursão que pode durar mais de dez minutos. As curvas invertidas das dinâmicas das concentrações de K⁺ intracelular para terminais sinápticos e gliais, mostram que o efluxo desse íon nos terminais corresponde ao influxo para as gliais e vice-versa. Observa-se uma rápida recuperação das concentrações extracelulares, enquanto que, no meio intracelular, essa recuperação é mais lenta. Essa dinâmica iônica intracelular pode explicar o período refratário da onda de DA, da ordem de minutos. Durante esse período, o tecido não é capaz de sustentar uma nova onda de DA. Os mecanismos de

recuperação das concentrações intracelulares, os quais foram descritos anteriormente, demandam mais tempo para as trocas iônicas, diferentemente do que ocorre no meio extracelular, onde o processo de perfusão restabelece rapidamente os níveis normais das concentrações iônicas, por meio da eletrodifusão. A lentificação do processo de restabelecimento aos níveis normais de concentração iônica intracelular neuronal é mais intensa para K^+ e Cl^- . As simulações permitem interpretar que a glia, como *buffer* de K^+ , compete com os mecanismos de recuperação de K^+ neuronal, retardando o processo. No caso do Cl^- , a lentificação segue a movimentação do K^+ acoplada pelos mecanismos de co-transporte.

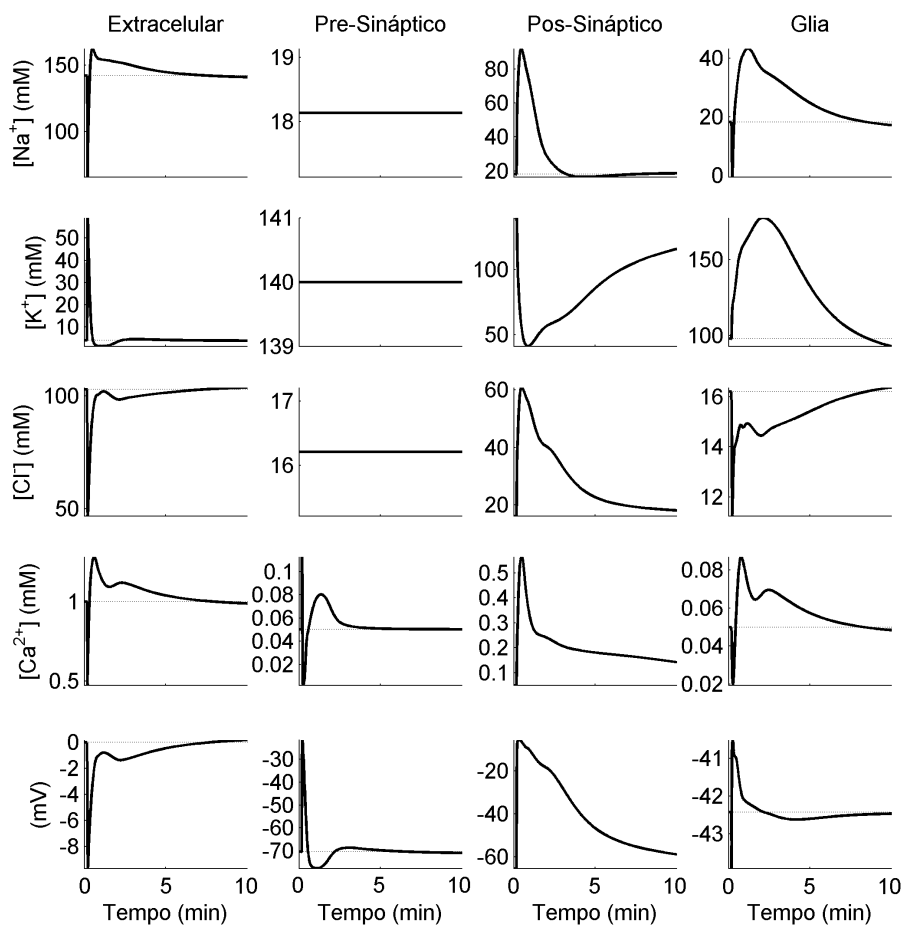


Figura 9.4 – A mesma simulação da evolução temporal das concentrações de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} e potencial referentes ao meio extracelular e o intracelular de terminais sinápticos e de glias, porém, mostrando os minutos subsequentes ao término dos eventos observados no extracelular.

Para validação dos resultados apresentados e discutidos, pode-se comparar as formas das curvas de concentração e potencial extracelulares simuladas (Figura 9.3)

com medidas de DA em retinas de ave e em neocórtex (Figura 9.5). O decaimento das concentrações de Na^+ , em 66,0 mM, de Cl^- , em 46,6 mM, de Ca^{2+} em, 0,45 mM e do potencial extracelular, em $-9,7$ mV, estão dentro da faixa que é registrada experimentalmente, segundo formas semelhantes.

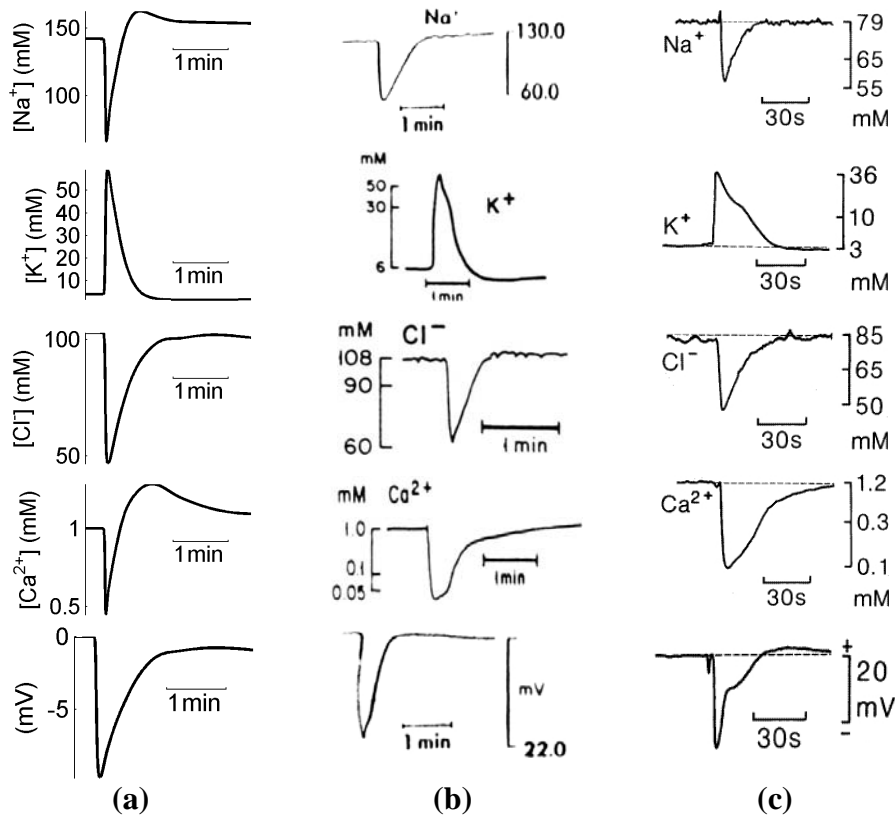


Figura 9.5 – Perfis de concentração e potencial obtidos (a) pelo modelo, (b) em retina de aves (adaptado de DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984 e MARTINS-FERREIRA, 1983) e (c) em neocórtex (adaptado de NICHOLSON, 1984).

IX.2 – Importância do mecanismo de difusão de neurotransmissores

A importância da descrição do mecanismo da difusão de neurotransmissores no meio extracelular pôde ser verificada sobrepondo-se simulações com e sem esse mecanismo (Figura 9.6). A velocidade de propagação da onda se reduziu de 6,02 para 2,70 mm/min. Isso indica uma alteração substancial da excitabilidade do tecido neuronal, verificada por uma maior redução dos gradientes iônicos transmembrânicos, resultante exclusivamente das alterações iônicas intracelulares, como mostra a Figura 9.6. Essas alterações resultam em reduções dos potenciais de Nernst de cada espécie

iônica, implicando em redução da excitabilidade neuronal. Essa constatação vai ao encontro de estudos que consideram a importância dos processos de neurocomunicação denominados neurotransmissão por difusão não-sináptica (VIZI, 2000 e BACH-Y-RITA, 2001), usualmente referenciados por NDN. Essas revisões reportam trabalhos, como o de NICHOLSON e PHILLIPS (1981), que demonstram que em torno de 20% do tecido cerebral é constituído de meio extracelular, isso conjugado ao fato de que os neurotransmissores podem se mover facilmente através desse meio confirma a existência das NDN. Assim, a comprovação, por meio das simulações, de que a subtração dos processos NDN do modelo implicam em alteração da velocidade de propagação, levando a valores fora das constatações experimentais, reforçam a importância desse tipo de neurotransmissão para a propagação da onda de DA.

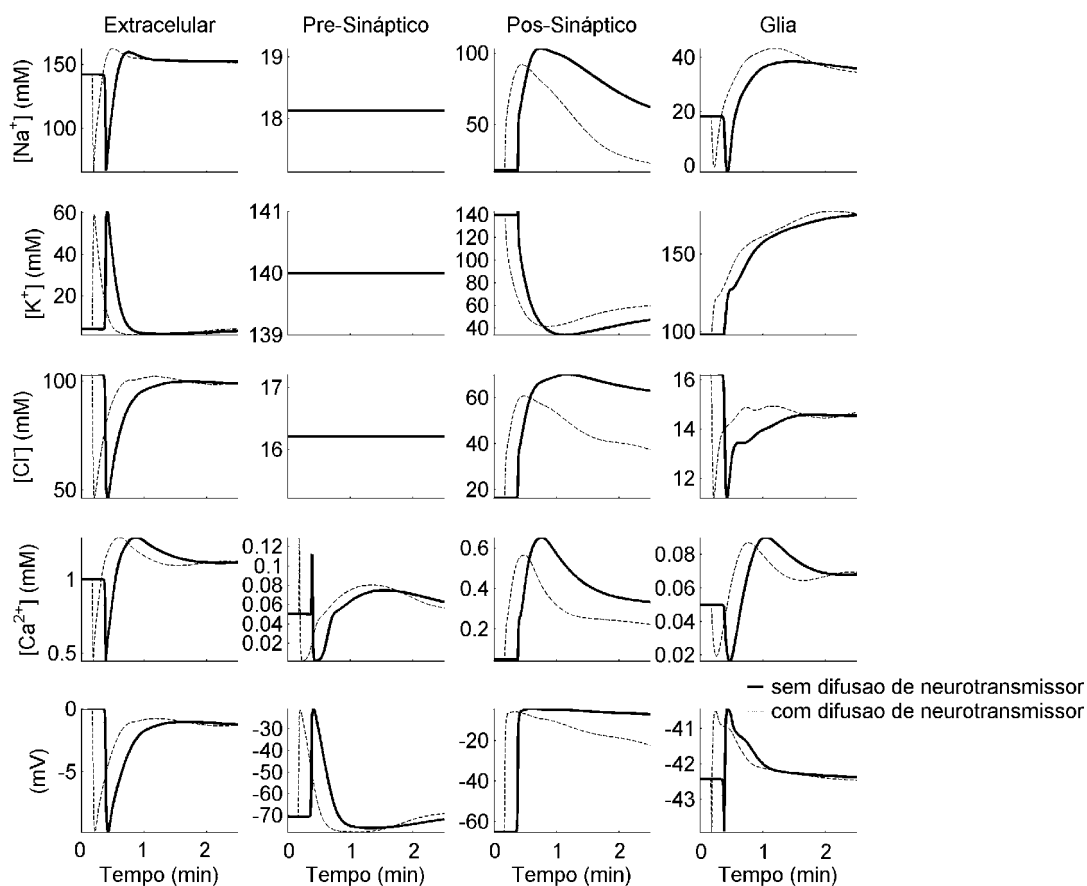


Figura 9.6 – Atuação da difusão de neurotransmissores sobre as concentrações iônicas e os potenciais durante a onda de DA. O pontilhado representa a simulação com a difusão de neurotransmissores. O sólido representa a simulação sem a difusão.

IX.3 – Simulação do sinal óptico da onda de DA na retina

Como demonstram as simulações apresentadas, durante a onda de DA, ocorre intensa movimentação iônica entre os meios intra- e extracelulares. Essa movimentação, há muito medida para o extracelular (DO CARMO e MARTINS-FERREIRA, 1984), explica as alterações significativas nos volumes intra- e extracelulares, ocasionadas por variações da osmolaridade do meio, implicando em alterações na geometria do tecido, como demonstraram OLIVEIRA CASTRO e MARTINS-FERREIRA (1971), para o caso da DA em retina, SOMJEN *et al.* (1986), para a DA induzida por hipóxia no hipocampo, LUX *et al.* (1986), para atividades epileptiformes induzidas em tecidos cerebrais, e NICHOLSON *et al.* (1981), para DA em tecidos corticais. Considerando o efeito de lente, produzido por refração da luz na interface criada pela membrana celular entre o citosol e o interstício, é possível deduzir que variações de volumes resultariam em alteração no espalhamento de luz. Ainda que esse efeito seja diminuto, quando envolvendo finos processos, como é o caso dos processos neuronais dendríticos, as múltiplas refrações resultariam em efeito multiplicador. Isso está em acordo com as constatações experimentais de que há predominância das variações ópticas da DA nas camadas radiatum e oriens do hipocampo (MÜLLER e SOMJEN, 1999). Além disso, a permanência dessas variações ópticas durante o bloqueio da atividade glial, verificada por MÜLLER e SOMJEN (1999), apontam para os processos neuronais dendríticos como os principais sítios geradores do sinal óptico da DA. Contudo, esses mesmos autores, embora admitam o efeito multiplicador criado pelos terminais dendríticos, não consideram que as variações de geometria possam explicar o sinal óptico, uma vez que manipulações experimentais dessas variações geométricas não produziram resultados consistentes com as alterações ópticas. Os autores propõem as macromoléculas do citosol e as organelas celulares como as fontes mais prováveis do espalhamento de luz gerador do sinal óptico. A diluição ou concentração desses corpos espalhadores teria efeito modulador sobre o espalhamento. Por outro lado, DUARTE (2000) considerou a hipótese de que o espalhamento de luz seria oriundo de variações do índice de refração, ocasionadas por mudanças na osmolaridade dos meios intra- e extracelulares. Simulações computacionais de estruturas ópticas, semelhantes às camadas dos processos dendríticos, mostraram que pequenas variações no índice de refração relativo entre os meios intra- e extracelulares, na ordem de 10^{-2} , são suficientes para reduzir a transmitância em 10%. Essa alta sensibilidade às alterações dos índices de refração se

deve às múltiplas reflexões nas várias interfaces de membranas dos terminais sinápticos, separando os meios intra- e extracelulares.

Utilizando a hipótese de que a variação da razão dos índices de refração intra- e extracelulares pode modular o espalhamento de luz em tecidos neuronais e considerando que o modelo em desenvolvimento apresenta resultados preliminares onde as variações iônicas intracelulares podem ser previstas durante a DA, julgou-se pertinente verificar se modulações dos índices de refração, a partir das variações iônicas intra- e extracelulares, seriam suficientes para reproduzir a forma do sinal óptico durante a DA. Esse resultado seria de grande importância para o presente trabalho oferecendo a possibilidade de validação do modelo. Durante o primeiro pico de espalhamento de luz do sinal óptico da DA (fase b – Figura 2.3), com duração da ordem de dois minutos, observa-se, no extracelular, o DC negativo do potencial (característica básica do fenômeno), bem como as variações iônicas detectadas com eletrodos íonsensíveis (DO CARMO e MARTINS-FERREIA, 1984). Porém, concomitantemente ao segundo pico de espalhamento de luz do sinal óptico da DA (fase d – Figura 2.3), que se prolonga por todo o período refratário (com duração de 10 a 20 minutos), não há variações expressivas e consistentes desses parâmetros. É lógico, portanto, supor que variações de concentração no meio intracelular devem perdurar ao longo de todo o decurso dos primeiro e segundo espalhamentos do sinal óptico, justificando o período refratário da DA. As simulações apresentadas no item IX.1 prevêm esse tipo de variação intracelular e, por isso, permitem verificar se as variações de osmolaridade, ao alterarem o índice de refração dos meios intra- e extracelulares, seriam suficientes para reconstruir a forma característica do sinal óptico.

Admitindo-se, a fim de reconstruir as alterações de osmolaridade (O), que esta possa ser representada pelo somatório das concentrações iônicas nos dois meios, então:

$$O_o = [Na^+]_o + [K^+]_o + [Cl^-]_o + [Ca^{2+}]_o, \quad (9.1)$$

$$O_i = [Na^+]_i + [K^+]_i + [Cl^-]_i + [Ca^{2+}]_i, \quad (9.2)$$

onde O_o e O_i , representam, respectivamente, as osmolaridades extracelular e intracelular de terminais pós-sinápticos.

Normalizando-se as osmolaridades em função das concentrações iônicas no estado de repouso, tem-se:

$$O_o^N = \frac{[Na^+]_o + [K^+]_o + [Cl^-]_o + [Ca^{2+}]_o}{[Na_r^+]_o + [K_r^+]_o + [Cl_r^-]_o + [Ca_r^{2+}]_o}, \quad (9.3)$$

$$O_i^N = \frac{[Na^+]_i + [K^+]_i + [Cl^-]_i + [Ca^{2+}]_i}{[Na_r^+]_i + [K_r^+]_i + [Cl_r^-]_i + [Ca_r^{2+}]_i}, \quad (9.4)$$

onde O_o^N e O_i^N são as osmolaridades normalizadas dos meios extra- e intracelular respectivamente. Portanto, a estimativa da osmolaridade relativa (O_r) entre os meios intra- e extracelulares foi modelada por:

$$O_r = \frac{O_i^N}{O_o^N}, \quad (9.5)$$

A partir da equação 9.5, pôde-se calcular O_r para a simulação de DA apresentada na Figura 9.4, conforme a Figura 9.7.

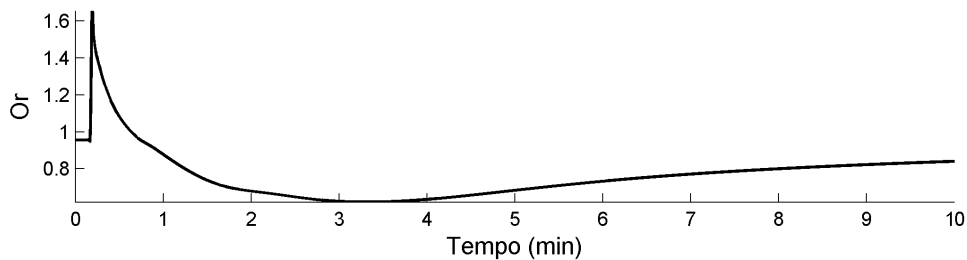


Figura 9.7 – Simulação da osmolaridade relativa do tecido durante a passagem da onda de DA.

Considerando que as variações do índice de refração relativo entre os meios intra- e extracelulares, n_r , devam ser muito pequenas, e que no repouso o equilíbrio osmótico justifique a transparência do tecido, como é o caso da retina (DUARTE, 2000), pôde-se estimar n_r em função de O_r por uma relação linear:

$$n_r = K_n \cdot O_r + 1 - K_n, \quad (9.6)$$

onde $K_n = 0,077$. O coeficiente K_n foi propositalmente ajustado para que n_r , durante a DA, varie no entorno de 1,0 numa faixa de $\pm 0,02$ (MESQUITA, 2004) (Figura 9.8).

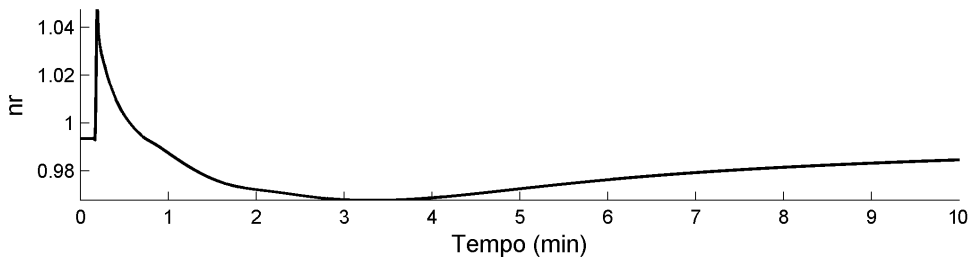


Figura 9.8 – Simulação do índice de refração relativo do tecido durante a passagem da onda de DA.

Com base em simulações da trajetória de raios de luz na IPL por meio da óptica geométrica, utilizando-se a lei de Snell, DUARTE (2000) obteve um gráfico que relaciona o espalhamento de luz e o índice de refração relativo (Figura 9.9).

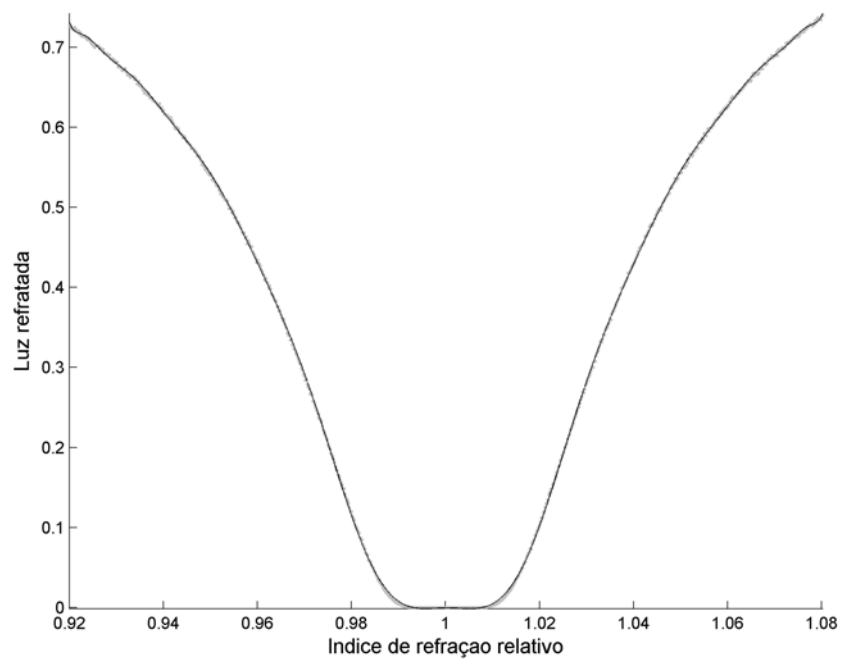


Figura 9.9 – Simulação da luz refratada numa camada de processos dendríticos em função do índice de refração relativo (Modificado de DUARTE, 2000). Observa-se que desvios do índice relativo na ordem de 0,02 resultam em redução de 10% da transmitância.

Essa simulação consistiu do cálculo, por método de Monte Carlo, do percentual de raios refratados em uma região com múltiplas interfaces intra/extracelular, com geometria semelhante a camadas de processos dendríticos, como é o caso da camada plexiforme interna de retina e a camada radiatum do hipocampo. Para valores que se afastam do índice unitário, na faixa de $1,00 \pm 0,02$, observa-se uma redução do espalhamento de luz e, por conseguinte, um aumento da transmitância, na ordem de 10%.

Calculando o percentual de raios refratados durante a DA, a partir da combinação das curvas das Figuras 9.8 com 9.9, obtém-se o traçado da Figura 9.10, que, comparada com um registro óptico da DA (Figura 9.11), sugere que o sinal óptico deve ter uma forte componente oriunda das variações iônicas intra- e extracelulares. Observa-se que o modelo foi capaz de descrever tanto a fase b do sinal óptico, relacionada com a intensa movimentação na frente de onda, quanto a fase d, mais relacionada com metabolismo celular.

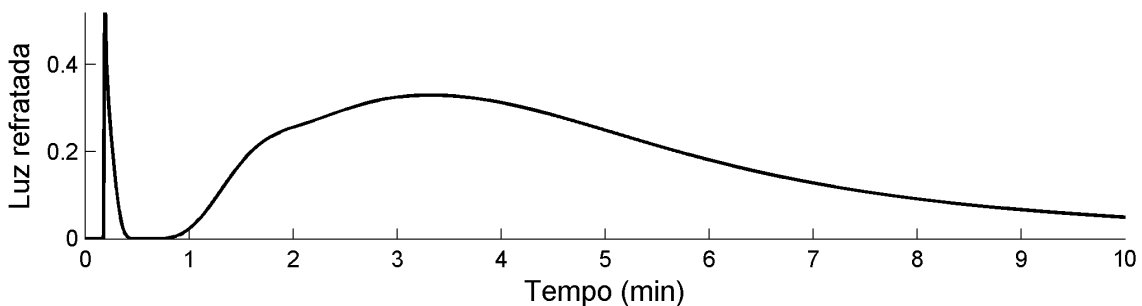


Figura 9.10 – Simulação da luz refratada pelo tecido durante a passagem da onda de DA.

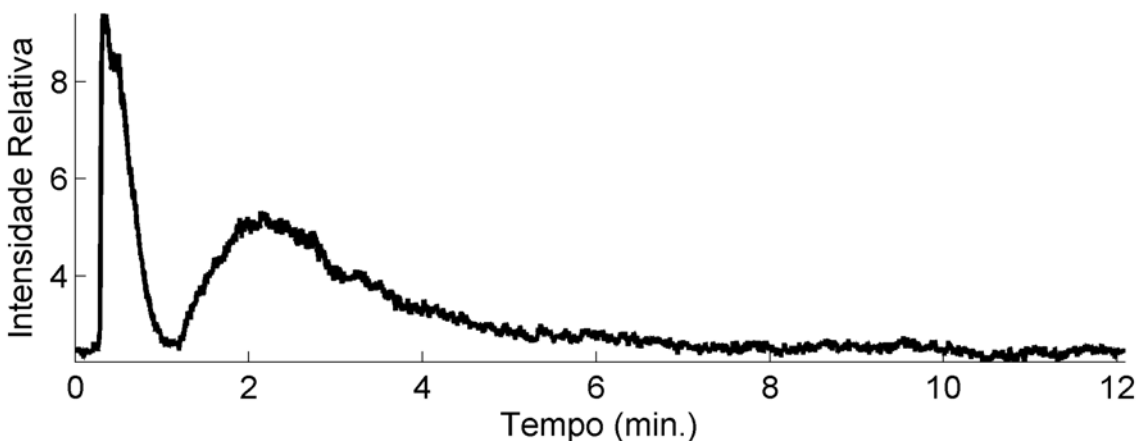


Figura 9.11 – Reconstrução do sinal intrínseco óptico do espalhamento de luz em um experimento com retina de ave (Extraído de VASCONCELOS, 2003).

A partir de imagens de propagação da DA, pode-se calcular a velocidade de propagação (TEXEIRA *et al.*, 2004), que traduz informações importantes sobre a excitabilidade do tecido (MARROCOS e MARTINS-FERREIRA, 1990). O primeiro pico de espalhamento (fase b) é concomitante às variações do potencial extracelular (MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966), sendo que, ao aumento da amplitude do potencial extracelular corresponde o aumento da intensidade do sinal óptico (VASCONCELOS, 2003). Como o potencial extracelular pode ser deduzido das variações iônicas extracelulares (ALMEIDA *et al.*, 2004), logo as variações iônicas extracelulares devem influenciar na amplitude do primeiro pico do sinal óptico da DA. O segundo pico (fase d), como mostram as simulações apresentadas nesse capítulo, oferecem informações relativas ao estado das concentrações iônicas intracelulares. Portanto, a simulação do período refratário da DA, pretendida a partir da incorporação dos mecanismos de transmissão sináptica (Capítulo VIII), poderá ser validada simulando-se o sinal óptico, com destaque para o segundo pico de espalhamento, e comparando-o com o sinal óptico medido experimentalmente. Isso justifica a necessidade de se realizar medidas experimentais do sinal óptico e desenvolver procedimentos computacionais para extração de parâmetros do tipo velocidade de propagação, amplitude dos picos de espalhamento e seus comprimentos longitudinais, como é apresentado no próximo capítulo.

IX.4 – Simulação da onda de DA durante o período refratário

Após a propagação da frente de onda da DA, o tecido se encontra em um estado denominado período refratário absoluto. Durante este estado, que dura, em média, dois minutos, o tecido não é capaz de sustentar uma nova onda. A recuperação total do tecido ocorre em um período de vinte minutos, denominado período refratário relativo. BRAND *et al.* (1998) estudaram a propagação da onda de DA durante o período refratário relativo, relacionando a velocidade de propagação e a amplitude do potencial extracelular com o intervalo entre estímulos. O período entre o primeiro e o segundo estímulo variou entre dois e dezenove minutos. A velocidade e a amplitude do potencial extracelular foram normalizadas com a velocidade e amplitude da onda devido ao primeiro estímulo. Os autores constataram que tanto a velocidade quanto a amplitude do potencial extracelular aumentam à medida que o intervalo entre estímulos aumenta (Figura 9.12).

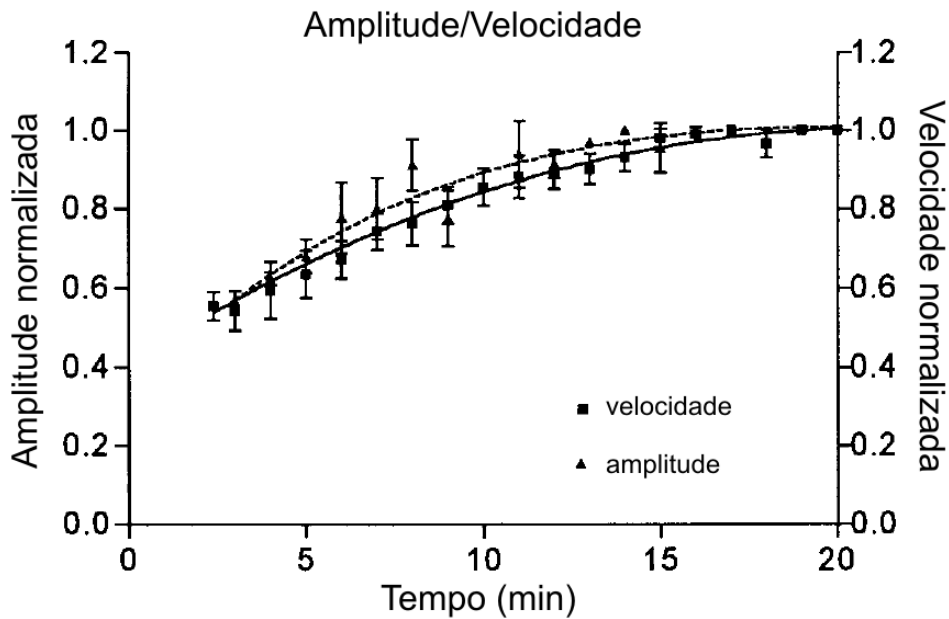


Figura 9.12 – A velocidade de propagação normalizada (linha sólida) e amplitude normalizada do potencial extracelular (linha tracejada) em função do intervalo entre os estímulos, em retina de ave (modificado de BRAND *et al.*, 1998).

Esse mesmo procedimento experimental foi verificado com o modelo. Da mesma forma que no experimento, o período entre o primeiro e o segundo estímulo variou entre dois e dezenove minutos. A velocidade e a amplitude do potencial extracelular foram normalizadas com a velocidade e amplitude da primeira onda. Pelas simulações, observou-se que o período refratário absoluto do modelo é de aproximadamente quatro minutos (Figura 9.13). O resultado das simulações é sintetizado na Figura 9.14 e estão de acordo com os achados de BRAND *et al.* (1998), ou seja, a velocidade e a amplitude do potencial extracelular são proporcionais ao aumento do intervalo entre estímulos.

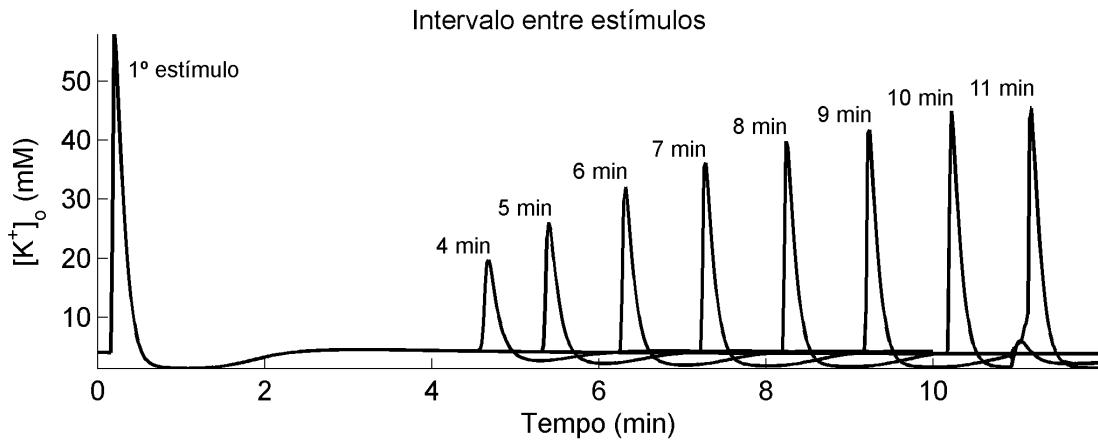


Figura 9.13 – Simulação do perfil de concentração de $[K^+]_o$ durante o período refratário relativo após a aplicação de um segundo estímulo. O intervalo entre estímulos variou de 4 a 11 minutos.

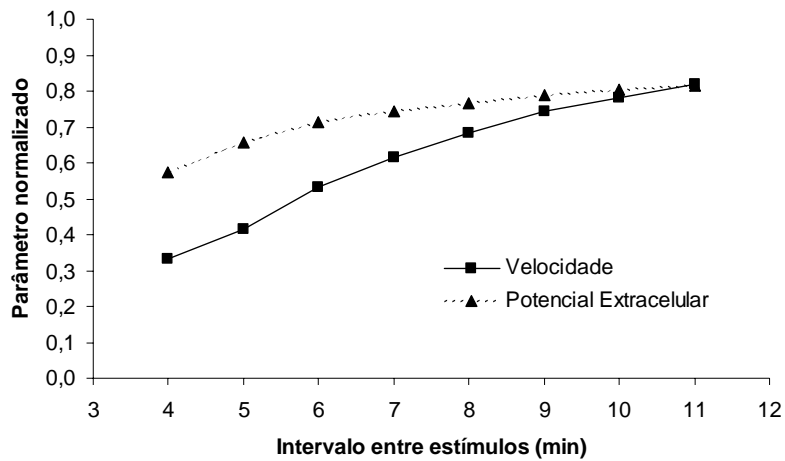


Figura 9.14 – Simulação da velocidade de propagação normalizada (linha sólida) e amplitude normalizada do potencial extracelular (linha tracejada) em função do período refratário da retina.

Capítulo X – Medidas Experimentais

X.1 – Procedimentos

Os experimentos de DA foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional (LANEC) da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas 8 retinas de ave (*Gallus gallus*) com idade entre 2 e 10 dias. Os procedimentos para se isolar a retina e o protocolo experimental encontram-se detalhados em DUARTE *et al.* (2003). Os animais foram sacrificados por decapitação. Com uma microtesoura, as pálpebras foram removidas para exposição da região anterior do globo ocular. Por meio de uma tesoura de ponta longa e aguda, os músculos extrínsecos e o nervo óptico foram seccionados e procedeu-se a enucleação. Considerando como pólos do globo ocular a região da córnea e o fundo do olho, uma secção, por meio de um bisturi, foi feita ao longo do equador. A retina pode ser identificada na região interna do fundo do olho ainda recoberta por *humor vítreo*. O *humor vítreo* foi removido por meio de uma pinça, e o hemisfério inferior foi colocado em uma placa de Petri com solução nutriente padrão a 30 °C. Passados quinze minutos de repouso, a retina foi descolada do hemisfério inferior utilizando-se uma espátula de ponta arredondada, a fim de evitar lesões. A retina isolada foi mantida em uma cuba (9 ml de volume) e imersa em uma solução nutriente padrão (Figura 10.1). A temperatura foi mantida constante em $29,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a taxa de perfusão baixa (1,5 ml/min). Essa taxa foi mantida por meio de uma bomba peristáltica PD5002 (Heidolph, Alemanha).

Para se visualizar a passagem da onda de DA, o plano de observação, perpendicular às camadas da retina foi iluminado por um feixe de laser vermelho do tipo He-Ne e potência de 2 mW 05-LHR-551 (Xerox, EUA) (Figura 10.1). Uma lente objetiva 5x/0.12/ ∞ Achrostigmat (Zeiss, Alemanha) e uma lente cilíndrica (5 mm de diâmetro) foram utilizadas para direcionar o feixe de laser. Para focalizar as camadas da retina no plano de observação, foi utilizado um cilindro plástico preto com 2,5 mm de diâmetro, colocado sob o tecido. A luz do laser espalhada pelas camadas da retina foi direcionada para um microscópio estéreo binocular GSZ 2T (Askania, Alemanha) acoplado a uma câmera CCD KCC310ND (Kocom, Japão). O sinal da câmera foi gravado em fita VHS utilizando-se um videocassete de uso doméstico VR426HF

(Zenith, Brasil) e então, digitalizadas em um computador pessoal com processador Pentium IV 1,8 GHz e 512 MB de memória RAM por meio de uma placa de captura de vídeo DC10plus (Pinnacle Systems, EUA) a uma taxa de 30 quadros/s e salvas em arquivos no formato AVI. Em seguida, os quadros foram extraídos do arquivo AVI e salvos em arquivos de imagens individuais do tipo JPEG de 24 bits a uma resolução de 640×480 pixels. A extração dos quadros foi feita por meio do programa *Fast Movie Processor* que se encontra livre na internet para utilização não-comercial. O formato JPEG foi escolhido por proporcionar o armazenamento de imagens de forma comprimida sem perda considerável de qualidade, permitindo o uso de arquivos de tamanho reduzido. As imagens em JPEG foram processadas em MATLAB para determinar as velocidades e o perfil da onda de DA ao longo do tempo.

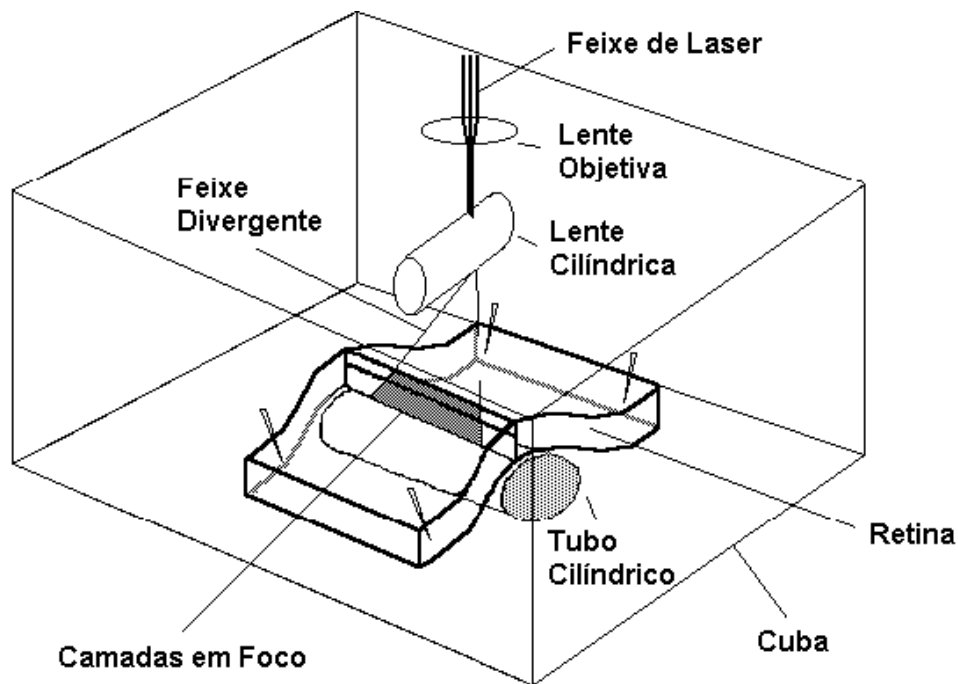


Figura 10.1 – Diagrama esquemático mostrando a retina posicionada sobre um tubo de plástico preto (2,5 mm de diâmetro) com a camada dos *endfeet* voltada para cima, dentro da cuba de vidro. Uma lente objetiva e outra cilíndrica foram utilizadas para direcionar o feixe de laser de forma a iluminar uma região plana perpendicular às camadas da retina (Extraído de DUARTE *et al.* 2003).

A solução nutriente padrão foi baseada em MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO (1966), cuja composição é mostrada na Tabela 10.1:

Tabela 10.1 – Composição da solução nutriente padrão.

Substância	Quantidade (mM)
NaCl	100,0
KCl	6,0
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	30,0
NaHPO ₄	1,5
Glicose	20,0
Tris	10,0
CaCl ₂	1,0

A retina permaneceu nesta solução por 1 h e 30 min. A onda de DA foi deflagrada mecanicamente, a cada 30 minutos, por uma agulha bem fina. Inicialmente, para cada retina nesta solução padrão, determinou-se o nível de luminância do espalhamento de luz da IPL (linha de base) sem a onda de DA e a velocidade da onda. Este procedimento foi repetido (após 30 minutos) com o objetivo de se verificar a viabilidade do tecido. A solução nutriente padrão foi, então, alterada, variando-se a concentração de NaCl para 60, 80, 120 or 140 mM. Para cada solução alterada, foram utilizadas duas retinas de aves distintas. A retina permaneceu em repouso nesta solução até que a linha de base do espalhamento de luz retornasse para os níveis de espalhamento em solução normal. Em geral, o equilíbrio osmótico era alcançado em menos de 1,5 h. Em cada retina, a onda de DA foi deflagrada várias vezes a cada 30 minutos. Ao final do experimento, a onda de DA foi deflagrada na retina em solução padrão com o objetivo de se verificar as condições do tecido.

A velocidade de propagação da DA de cada retina em solução nutriente modificada foi normalizada pela velocidade média da DA das respectivas retinas em solução padrão. Esse procedimento para estabelecer a velocidade relativa em cada retina foi o mesmo adotado por MARROCOS e MARTINS-FERREIRA (1990) e foi utilizado para se evitar uma possível variabilidade entre retinas diferentes. Esse procedimento também foi adotado para os resultados simulados.

X.2 – Estimando a velocidade de propagação

O procedimento para o cálculo da velocidade de propagação da onda de DA foi feito utilizando-se a seqüência de quadros digitalizados (Figura 10.2 A). O

procedimento consiste em, inicialmente selecionar a região da IPL em cada quadro que contém a frente da onda de DA (Figura 10.2 B). Em seguida, os fragmentos de IPL foram dispostos verticalmente em quadros de imagem sucessivos (Figura 10.2 C). A velocidade de propagação da onda foi determinada pela tangente do ângulo (θ) formado entre a reta que passa pelas frentes de onda de cada quadro e uma reta perpendicular à abscissa:

$$V = \tan(\theta) = \frac{\Delta x}{\Delta t}, \quad (10.1)$$

onde V é a velocidade de propagação da frente de onda da DA, Δx , a distância percorrida pela frente de onda, em mm e Δt , o intervalo de tempo gasto pela frente de onda percorrer a distância Δx em minutos.

Essa técnica permite verificar, além da velocidade de propagação, a uniformidade da propagação da onda e, portanto, as condições de preparação da retina. As retinas com algum tipo de problema foram descartadas.

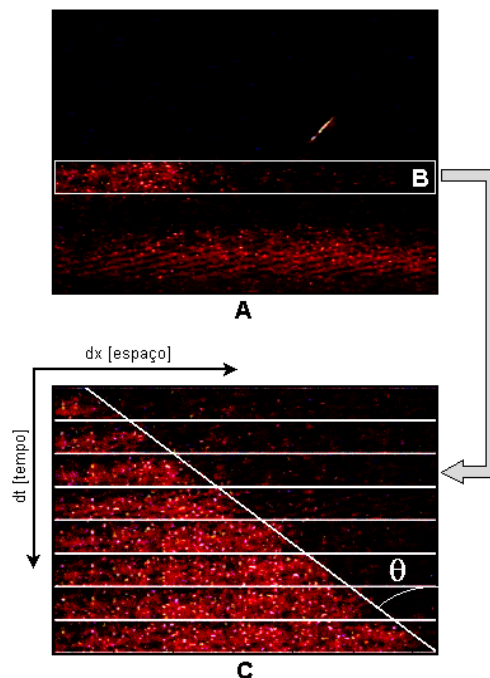


Figura 10.2 – Cálculo da velocidade de propagação da frente de onda da DA por meio da $\tan(\theta)$ em experimento feito no LANEK. A) Quadro de imagem. B) Janela do quadro de imagem referente a IPL. C) Imagem resultante formada pela disposição de B de quadros sucessivos.

X.3 – Estimando o comprimento longitudinal da onda de DA

O termo “comprimento longitudinal” corresponde ao comprimento da onda na direção de propagação e foi calculado entre o início e o término da fase b (definido em MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA CASTRO, 1966), onde o nível de espalhamento de luz alcança 20% do espalhamento máximo da onda de DA como proposto por BASARSKY *et al.* (1998). Para estimar o comprimento longitudinal da frente de onda de DA e verificar sua variação em função da velocidade de propagação, a seqüência de quadros foi montada em uma única imagem disposta em uma matriz bidimensional (Figura 10.3). Nessa imagem, as frentes de onda em cada quadro foram alinhadas uma abaixo da outra (Figura 10.4 A). Esse alinhamento foi feito calculando-se o deslocamento de cada frente de onda em cada quadro em função da velocidade de propagação em pixels/s (ou colunas/s). De um quadro para o subseqüente, a onda desloca d_{pixels} . Esse valor é função da velocidade da onda (em pixels/s) e da taxa de amostragem (em quadros/s) (equação 10.2). Fazendo-se a média da luminância dos pixels ao longo da dimensão das colunas da imagem na matriz, o resultado é um vetor linha (Figura 10.4 B) que representa o espalhamento de luz médio na IPL durante a DA. A partir desse gráfico foi possível determinar o comprimento longitudinal da frente de onda (fase b). Os sinais ópticos em cada quadro foram subtraídos de suas respectivas linhas de base antes de qualquer tratamento computacional.

$$d_{pixels} (pixels / quadro) = \frac{velocidade(pixels / s)}{Taxa\ de\ amostragem(quadros / s)} \quad (10.2)$$

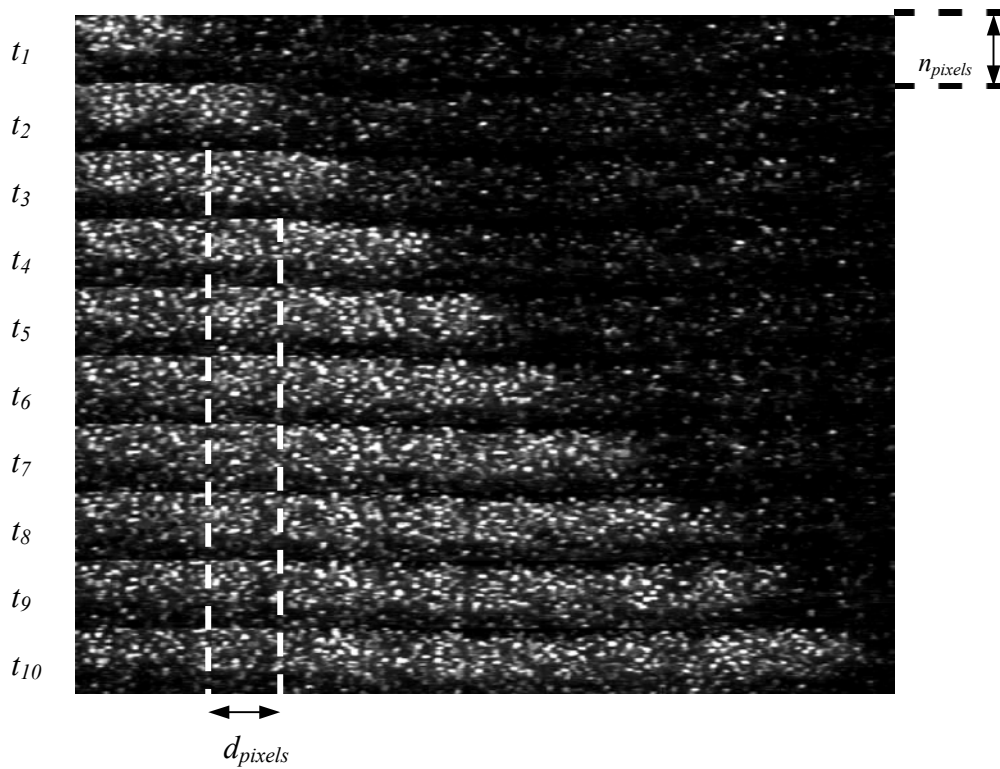


Figura 10.3 – Exemplo típico do procedimento de reconstrução da imagem da propagação da onda de depressão alastrante (DA) na IPL de retina de aves após a digitalização de quadros sucessivos. d_{pixels} representa o número de pixels percorridos pela onda entre quadros sucessivos, n_{pixels} a altura de cada quadro e t , o instante de tempo (Experimento feito no LANEC).

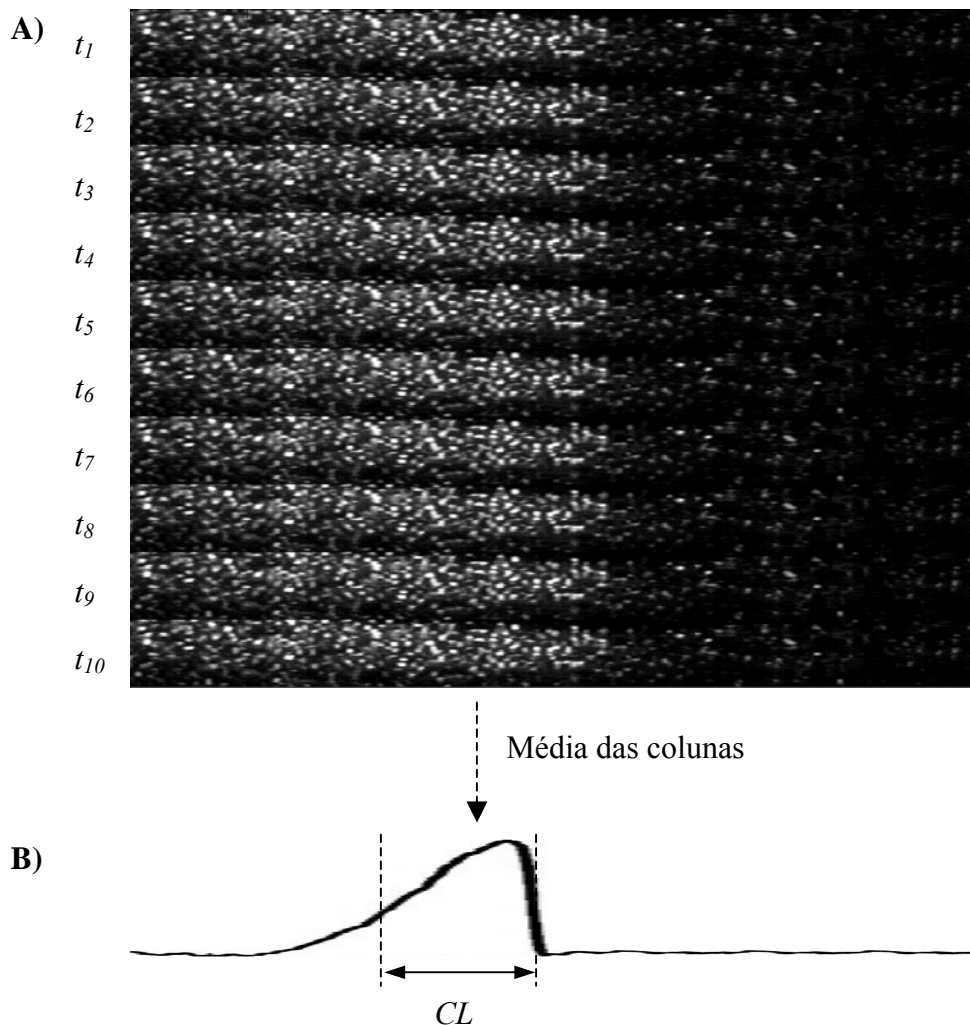


Figura 10.4 – Alinhamento dos quadros sucessivos da onda de DA em função da velocidade de propagação e da taxa de amostragem (A). A média de cada pixel no sentido das colunas resulta no gráfico da intensidade do sinal óptico (B). CL representa o comprimento longitudinal da onda de DA (Experimento feito no LANEK).

A partir do gráfico resultante, é possível determinar o comprimento longitudinal da onda de DA (CL) que é medido em torno do primeiro pico (fase **b**).

O resultado de um alinhamento é mostrado na Figura 10.5 (A). Esse alinhamento foi feito calculando-se o deslocamento de cada quadro em função da velocidade de propagação em pixels (ou colunas) por quadro. Fazendo-se a média da luminância na dimensão das colunas da matriz, o resultado é um vetor linha mostrado no gráfico da Figura 10.5 (B). Esse vetor representa o espalhamento de luz médio na IPL durante a DA. A partir desse resultado, foi possível determinar o comprimento longitudinal da onda, correspondente à fase **b** (definida em MARTINS-FERREIRA e OLIVEIRA

CASTRO, 1966). O comprimento longitudinal da frente de onda foi estabelecido na posição em volta do pico onde o nível de espalhamento de luz é 20% do valor máximo, como definido em BASARSKY *et al.* (1998).

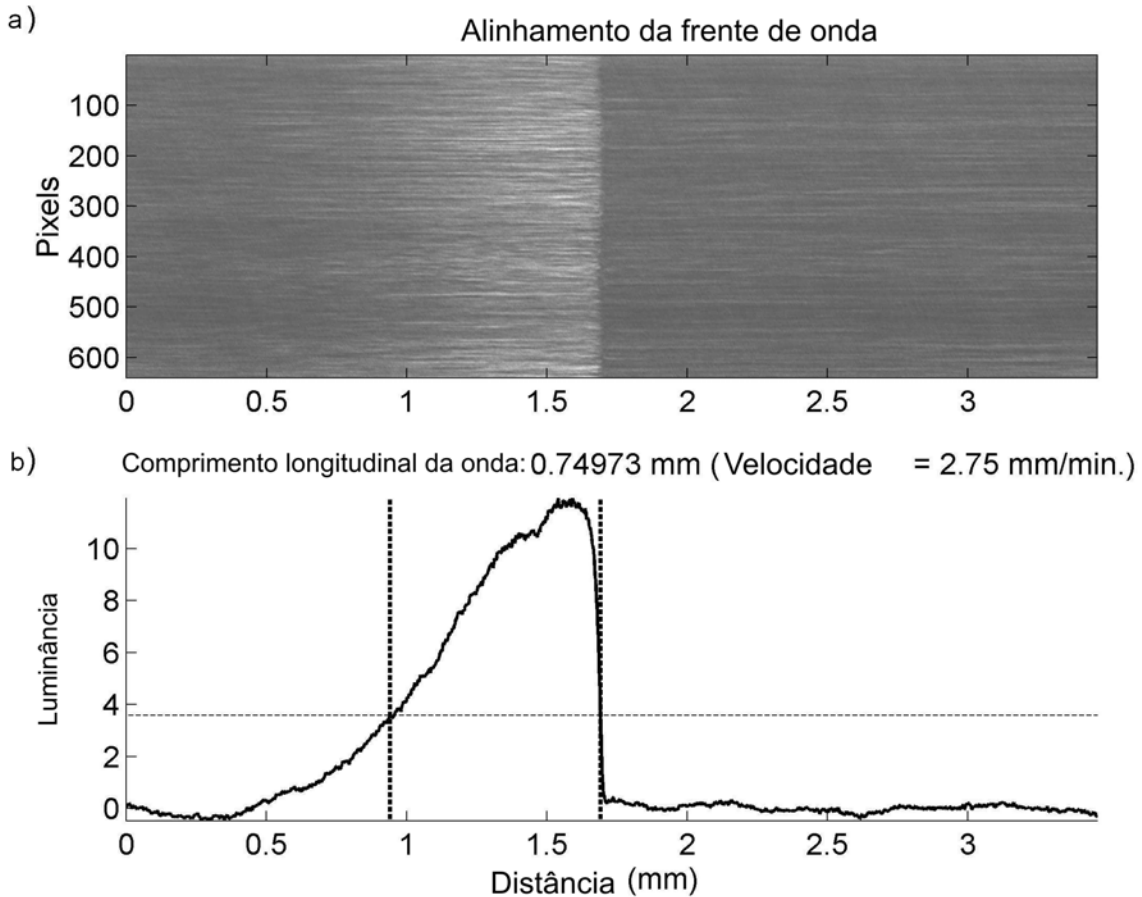


Figura 10.5 – A) Alinhamento de quadros sucessivos da frente de onda de DA. O deslocamento de cada quadro foi feito em função da velocidade da onda em pixels por quadro. B) Valor médio da luminância do alinhamento das frentes de onda. O limiar para se determinar o comprimento longitudinal da frente de onda foi definido como sendo entre 20% do valor do pico da fase **b**.

X.4 – Relação entre a velocidade e o comprimento longitudinal da frente de onda

Em um conjunto de 57 ondas obtidas experimentalmente, a velocidade de propagação foi alterada variando-se a concentração de NaCl (60, 80, 100, 120 and 140 mM) na solução de perfusão, sendo o valor de 100 mM adotado como referência. Para cada solução alterada foram utilizadas 2 retinas de aves distintas. As velocidades

foram obtidas de acordo com o método descrito no item X.2. As maiores velocidades foram observadas para soluções contendo 60 mM de NaCl e as menores para soluções contendo 140 mM de NaCl. As velocidades de DA na solução padrão, calculadas para as 8 retinas (total de 14 obtidas no início de cada experimento), resultaram em um valor médio e um erro médio padrão de $3,31 \pm 0,04$ mm/min. O erro médio padrão indica a consistência do protocolo experimental. Aplicando-se o teste t de Student ($\alpha = 0,05$) entre retinas em uma mesma solução, as velocidades relativas são estatisticamente iguais. Entre retinas em soluções distintas (tabela 10.2), a igualdade entre as velocidades relativas médias só pôde ser assumida entre as soluções de 120 e 140 mM ($\alpha = 0,05$).

Tabela 10.2 – Média e erro médio padrão da velocidade relativa e o comprimento longitudinal relativo da onda de DA para cada solução alterada.

NaCl (mM)	Nº de ondas	Velocidade relativa	Comprimento Longitudinal relativo
60	8	$1,35 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,01$
80	8	$1,12 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,10$
120	8	$0,83 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,03$
140	8	$0,83 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,04$

Como o sinal intrínseco óptico é mais intenso na IPL, essa região foi selecionada (Figura 10.6 (a)) para se obter o alinhamento das frentes de ondas. As Figuras 10.6 (b) a 10.6 (f) indicam que, experimentalmente, quanto maior a velocidade, maior o comprimento longitudinal da onda de DA.

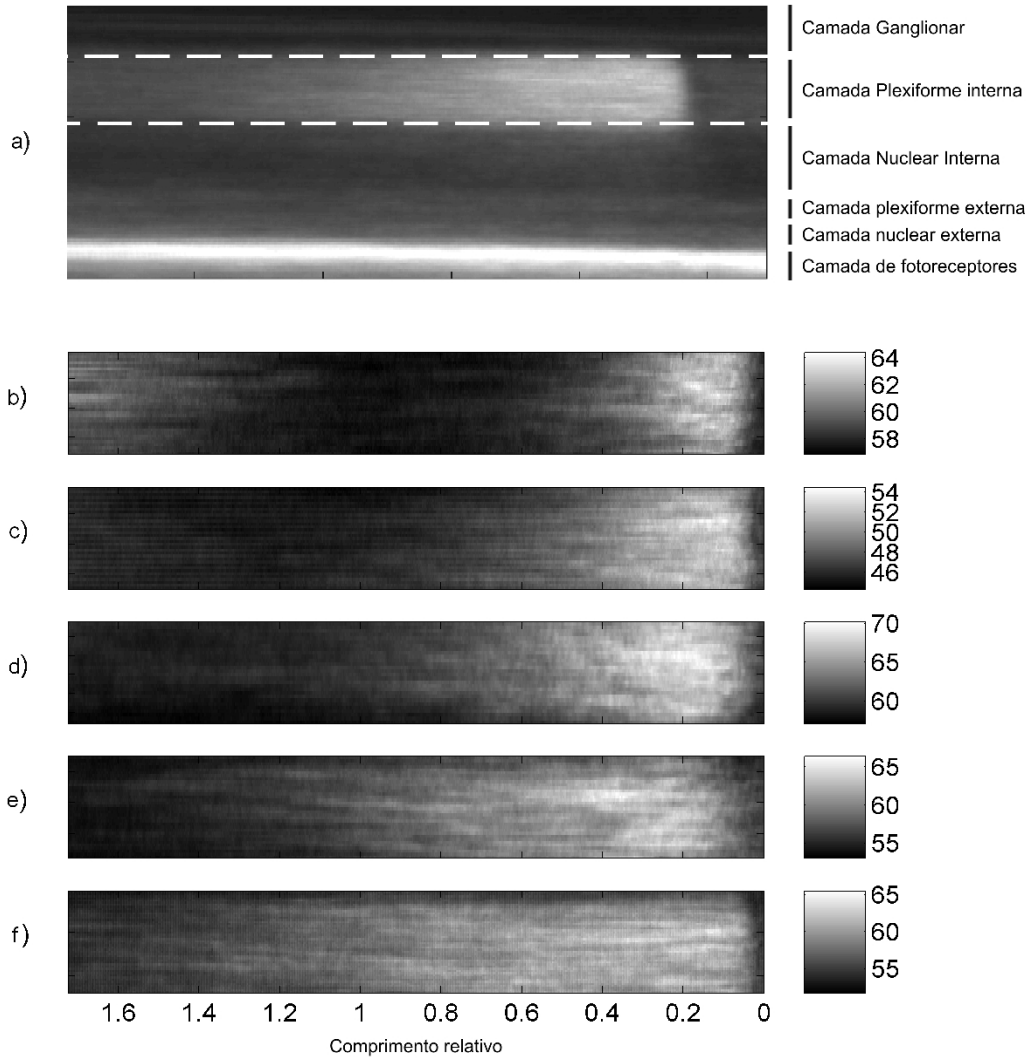


Figura 10.6 – Disposição das ondas de DA selecionadas em ordem crescente de velocidade de propagação. a) Espalhamento de luz da DA após a reconstrução da imagem, onde a região da IPL foi selecionada. b) Alinhamento das frentes de onda se propagando a 1,88 mm/min, c) 2,42 mm/min, d) 2,76 mm/min, e) 3,35 mm/min e f) 4,57 mm/min (Experimento feito no LANEC).

Para a simulação do sinal óptico da DA utilizou-se um parâmetro que considera a variação da concentração iônica total que estaria diretamente associada ao sinal óptico. Este parâmetro, denominado $\Delta[T]$, é dado por:

$$\Delta[T] = \frac{|\Delta[Na^+]_o| + |\Delta[K^+]_o| + |\Delta[Cl^-]_o| + |\Delta[Ca^{2+}]_o|}{[Na_r^+]_o + [K_r^+]_o + [Cl_r^-]_o + [Ca_r^{2+}]_o}, \quad (10.3)$$

onde o subscrito “ r ” representa a concentração iônica no estado de repouso.

A distribuição de $\Delta[T]$ é calculada ao longo do plano perpendicular às camadas da retina, conforme Figura 4.2, durante a onda de DA. Dessa maneira, a simulação da propagação do parâmetro de distribuição pode ser comparada com o espalhamento de luz na IPL mostrado na figura 10.6. Os aspectos morfológicos bem como as dimensões espaciais são similares. O resultado é mostrado na simulação da Figura 10.7 onde o plano de observação da rede de compartimentos foi destacado. Os mapas em escala de cinza da dinâmica do parâmetro $\Delta[T]$ ($t = 19$ s) para ondas simuladas com valores diferentes para concentração de Na (111, 131, 151, 171 e 191 mM) são mostradas na Figura 10.7 (b) a 10.7 (f), respectivamente. Esses valores foram escolhidos na simulação devido à menor faixa de variação na velocidade. Os resultados indicam um aumento do comprimento longitudinal da frente de onda com o aumento da velocidade.

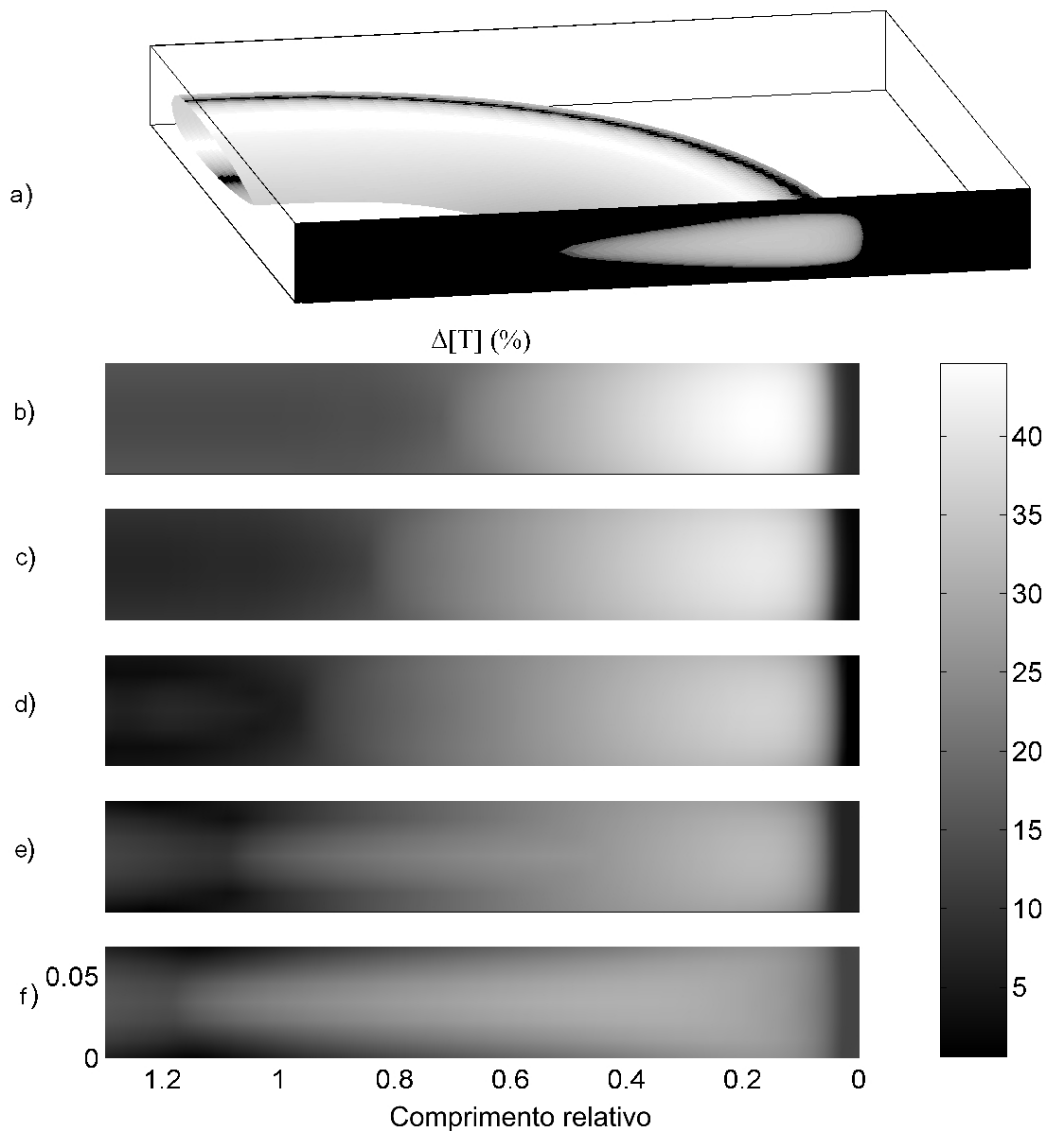


Figura 10.7 – Simulação da dinâmica espacial de $\Delta[T]$ no instante $t = 19$ s após a deflagração da onda de DA. As concentrações extracelulares de Na^+ (mM) e as respectivas velocidades relativas de propagação foram (mm/min.): b) 111 e 0,83, c) 131 e 1,0, d) 151 e 1,17, e) 171 e 1,33 e f) 191 mM e 1,46.

O aumento na velocidade, com o aumento do comprimento longitudinal da onda de DA, pode ser atribuído a um aumento na excitabilidade do meio. De fato, é esperado que em um meio mais susceptível, a onda deva ocupar uma área maior. O maior comprimento da onda em velocidades mais altas também poderia refletir a limitação dos mecanismos de equilíbrio iônicos em atuar com constantes de tempo suficientes para recuperar a área afetada para as condições normais de concentração. A mesma tendência foi verificada computacionalmente (Figura 10.8). A comparação entre os resultados

experimentais e as simulações indica que os mecanismos mais críticos envolvidos na propagação da DA parecem ter sido considerados no presente modelo.

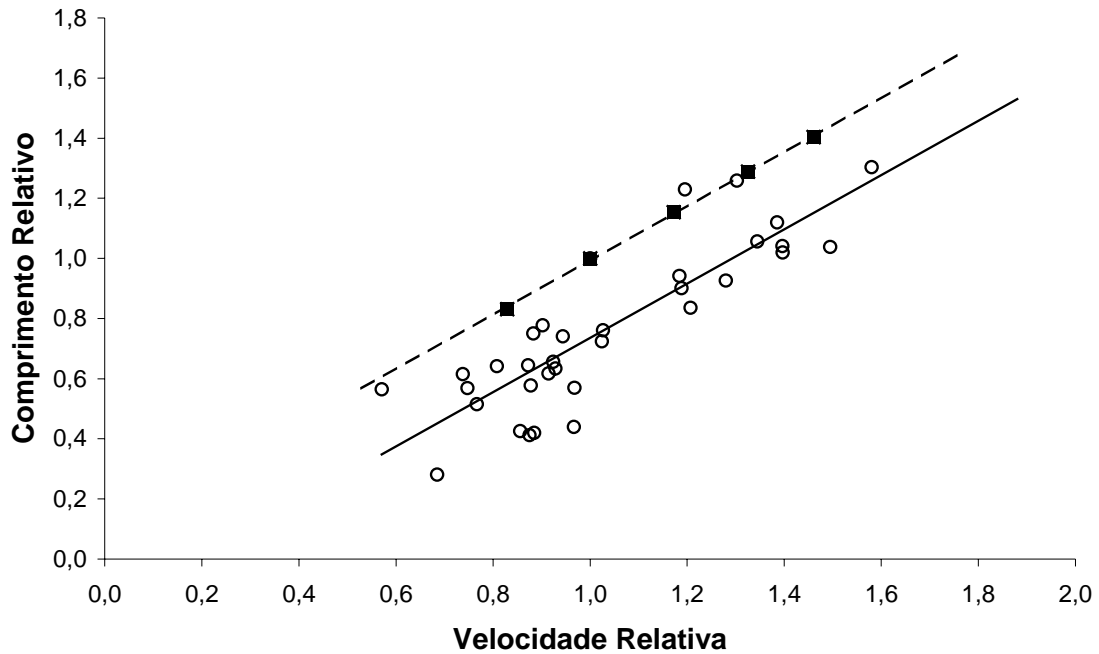


Figura 10.8 – Dependência da variação do comprimento longitudinal relativo da onda em função da velocidade de propagação. A dispersão dos dados experimentais é representada por (○) e da simulação por (■). As linhas que ajustam os dados experimentais (—) e os resultados simulados (---) apresentam coeficientes angulares próximos.

Capítulo XI – Conclusão

No modelo desenvolvido por ALMEIDA *et al.* (2004), a descrição compartimentalizada do meio extracelular consiste da modelagem das dinâmicas iônicas por meio de mecanismos de eletrodifusão. O duplo acoplamento entre as espécies iônicas por meio de gradientes de concentração e de potencial possibilitou a simulação do deslocamento lento e negativo do potencial extracelular, uma característica marcante da onda de DA. No entanto, a adoção de mecanismos de bombeamento fenomenológicos, que mimetizam a atuação conjunta dos diversos mecanismos de recuperação iônica, faz com que os gradientes sejam recuperados rapidamente. Esse fato altera a dinâmica das concentrações intracelulares, não correspondendo ao que deve ocorrer no interior de terminais dendríticos e dos processos glias. Com as descrições fisiológicas das bombas Na,K-ATPase e Ca,K-ATPase, do mecanismo de co-transporte KCC, das bombas Ca-ATPase, e das glias, que incluem a representação do co-transporte NKCC e canais retificadores de K^+ , foi possível estimar essas dinâmicas no meio intracelular de terminais e glias.

Os resultados deste estudo permitem identificar que o bloqueio de cada um dos mecanismos pouco afeta a recuperação das concentrações no meio extracelular. Esse fato se deve à eletrodifusão extracelular que auxilia no retorno das concentrações iônicas aos valores normais. No entanto, para o meio intracelular, essa recuperação é mais lenta, tem uma dinâmica mais complexa e que precisava ser descrita para o estudo do período refratário da onda de DA.

As descrições dos mecanismos de eletrodifusão extracelular, das dinâmicas transmembrânicas, dos mecanismos de restabelecimento iônico e do processo de liberação de neurotransmissores, dispostos em uma estrutura compartimentalizada, permitiram prever, simultaneamente, as principais características da DA, como a dinâmica de concentração extracelular e do meio intracelular de terminais sinápticos e glias, a velocidade de propagação, o deslocamento de potencial negativo extracelular, o perfil completo do sinal óptico intrínseco e o período refratário. Isso ficou demonstrado por meio da comparação entre os diversos resultados experimentais e simulações. Isso faz desse modelo uma ferramenta útil para o estudo da DA, auxiliando na interpretação dos resultados experimentais. A partir das simulações de sinais mensuráveis

experimentalmente, tais como: potenciais intra- e extracelulares, sinal óptico intrínseco e concentrações extracelulares, pode-se inferir sobre os processos envolvidos em cada manobra experimental, identificando a participação dos mecanismos subcelulares sobre os eventos analisados.

Demonstrando que o modelo proposto pode contribuir para o estudo da DA, no presente trabalho, algumas características do fenômeno foram estudadas identificando-se ou propondo processos envolvidos em suas gêneses. Assim, foi visto que: i) a bomba Na,K-ATPase gera gradientes iônicos que são utilizados pelos mecanismos de co-transporte cloreto-dependentes, explicando o maior acúmulo desse íon no meio intracelular, quando a bomba é desligada; ii) a regulação da concentração do Ca^{2+} intracelular pré-sináptico influencia no restabelecimento das concentrações iônicas intracelulares pós-sinápticas; iii) a atuação do co-transporte NKCC nas glias, além de participar dos processos de restabelecimento dos gradientes iônicos, impede a saída excessiva do Cl^- intracelular glial; iv) as simulações demonstram a importância das glias na remoção do excesso de K^+ do meio extracelular, através dos canais retificadores de entrada de K^+ , mesmo contra o gradiente de concentração transmembrânico glial desse íon; v) o período refratário corresponde ao período de tempo mínimo necessário para o retorno dos neurotransmissores ao terminal pré-sináptico. É também quando os gradientes iônicos transmembrânicos neuronais e gliais são restabelecidos, deixando o tecido apto a sustentar uma nova deflagração de DA; vi) a difusão de neurotransmissores no meio extracelular contribui para o aumento da excitabilidade do tecido e reforça as teorias que apontam para a importância dos processos de neurocomunicação denominados neurotransmissão por difusão não-sináptica; vii) o sinal óptico intrínseco tem como componente o espalhamento de luz oriundo das variações dos índices de refração dos meios intra- e extracelulares, em função da osmolaridade, e permite monitorar o restabelecimento das concentrações iônicas intracelulares durante a DA na retina isolada.

Anexo – Trabalhos publicados no período

- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., VASCONCELOS, M. A., DUARTE, M. A., 2004, “Simulation of the Effect of Na^+ and Cl^- on the Velocity of Spreading Depression's Wave using a Simplified Electrochemical Model of Synaptic Terminals”, *Journal of Neural Engineering*, v. 1, pp. 117-125.
- ALMEIDA, A. G. C., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., INFANTOSI, A. F. C., 2004, “Modeling Extracellular Space Electrodifusion during Leão's Spreading Depression”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 51, pp. 450-458.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A. M., DUARTE, M. A., 2004, “Modelagem Computacional dos Mecanismos de Recuperação Iônica durante a Depressão Alastrante”. In: *Anais do III Congresso Latino Americano de Engenharia Biomédica*, v. 5, pp. 1467-1470, João Pessoa, Paraíba, Set.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A. M., DUARTE, M. A., 2002, “Simulação do Efeito de Na^+ e Cl^- na Velocidade da Onda de Depressão Alastrante através de um Modelo Eletroquímico”. In: *Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 5, pp. 101-106, São José dos Campos, São Paulo, Set.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A. M., DUARTE, M. A., 2001, “Descrição Matemática da Dinâmica Iônica em Tecidos Neurais”, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 17, pp. 85-96. (premiado como melhor artigo do ano).

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, A. G. C., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., INFANTOSI, A. F. C., 2004, “Modeling Extracellular Space Electrodifusion during Leão’s Spreading Depression”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 51, pp. 450-458.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2002, “Ion Channel-like Properties of the Na⁺/K⁺ Pump”, *Annals of the New York Academy of Sciences Online*, v. 976, pp. 31-40.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2003, “Na⁺/K⁺-Pump Ligands Modulate Gating of Palytoxin-Induced Ion Channels”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, pp. 501-505.
- ARTIGAS, P., GADSBY, D. C., 2004, “Large Diameter of Palytoxin-induced Na/K Pump Channels and Modulation of Palytoxin Interaction by Na/K Pump Ligands”, *The Journal of General Physiology*, v. 123, pp. 357-376.
- ATRI, A., ADMUNDSON, J., CLAPHAM, D., SNEYD, J., 1993, “A Single-pool Model for Intracellular Calcium Oscillations and Waves in the *Xenopus Laevis* Oocyte”, *Biophysical Journal*, v. 65, pp. 1727–1739.
- AUGUSTINE, G. J., 2001, “How Does Calcium Trigger Neurotransmitter Release?”, *Current Opinion in Neurology*, v. 11, pp. 320-326.
- AULL, F., 1981, “Potassium Chloride Cotransport in Steady-state Ascite Tumor Cells”, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 643, pp. 339–345.
- BACH-Y-RITA, P., 2001, “Nonsynaptic Diffusion Neurotransmission in the Brain: Functional Considerations”, *Neurochemical Research*, v. 26, pp. 871-873.
- BARKLEY, D., 1991, “A Model for Fast Computer Simulation of Waves in Excitable Media”, *Physica D.*, v. 49, pp. 61-70.
- BASARSKY, T. A., DUFFY, S. N., ANDREW, R. D., BRIAN, A. M., 1998, “Imaging Spreading Depression and Associated Intracellular Calcium Waves in Brain Slices”, *Journal of Neuroscience*, v. 18, pp. 7189-7199.

- BEAR, M. F., CONNORS, B. W., PARAISO, M. A., 1996, "Synaptic Transmission", In: *Neuroscience: Exploring the Brain*, 1^a ed., chapter 5, Baltimore: Williams & Wilkins.
- BENNETT, M. K., 1997, "Ca²⁺ and the Regulation of Neurotransmitter Secretion", *Current Opinion in Neurobiology*, 1997, v. 7, pp. 316-322.
- BLANK, M. 1995, "An Ion Pump Mechanism Based on Channel Processes in the Na,K-ATPase", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 38, pp. 275-279.
- BRAND, S., LIMA, V. M. F., HANKE, W., 1998, "Pharmacological Modulation of the Refractory Period of Retinal Spreading Depression", *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 357, pp. 419-425.
- BREW, H., ATTWELL, D., 1985, "Is the Potassium Channel Distribution in Glial Cells Optimal for Spatial Buffering of Potassium", *Biophysical Journal*, v. 48, pp. 843-847.
- BURES, J., BURESOVÁ, J., KRIVÁNEK, J., 1974, *The Mechanism and Applications of Leão's Spreading Depression of Electroencephalographic Activity*, 1^a ed., New York: Academic Press.
- CHAD, J. E., ECKERT, R., 1984, "Calcium Domains Associated with Individual Channels Can Account for Anomalous Voltage Relations of Ca²⁺-Dependent Responses. *Biophysical Journal*, v. 45, pp. 993-999.
- CHAY, T. R., 1996, "Modeling Slowly Bursting Neurons via Calcium Store and Voltage-Independent Calcium Current, *Neural Computation*, v. 8, pp. 951-978
- CLEMENTS, J. D., 1996, "Transmitter Timecourse in the Synaptic Cleft: Its Role in Central Synaptic Function", *Trends in Neuroscience*, v. 19, pp. 163-171.
- CONNELLY, C. M., 1959, "Recovery Processes and Metabolism of Nerve", *Reviews of Modern Physics*, v. 31, pp. 475-484.
- DAHLEM, M. A., MÜLLER, S. C., 1997, "Self-induced Splitting of Spiral-shaped Spreading Depression Waves in Chicken Retina", *Experimental Brain Research*, v. 115, pp. 319-324.

- DE SCHUTTER, E., SMOLEN, P., 1998, "Calcium Dynamics in Large Neuronal Networks". In: KOCH, C., SEGEV, I. (eds), *Methods in Neuronal Modeling. From Ions to Networks*, 2^a ed., pp 211-250, Cambridge, MA: MIT Press.
- DEFAZIO, R. A., KEROS, S., QUICK, M. W., HABLITZ, J. J., 2000, "Potassium-Coupled Chloride Cotransport Controls Intracellular Chloride in Rat Neocortical Pyramidal Neurons", *The Journal of Neuroscience*, v. 20, pp. 8069-8076.
- DELLNITZ, M., GOLUBITSKY, M., HOHMANN, A., STEWART, I., 1995, "Spirals in Scalar Reaction-diffusion Equations." *International Journal of Bifurcation and Chaos*, v. 5, pp. 1487-1501.
- DI FRANCESCO, D., NOBLE, D., 1985, "A Model of Cardiac Electrical Activity Incorporating Ionic Pumps and Concentration Changes", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.*, v. B307, pp. 353-398.
- DIPOLO, R., BEAUGÉ, L., 1979 "Physiological Role of ATP-driven Calcium Pump in Squid Axon", *Nature*, v. 278, pp. 271-273.
- DO CARMO, R. J., LEÃO, A. A. P., 1972, "On the Relation of Glutamic Acid and Some Allied Compounds to Cortical Spreading Depression", *Brain Research*, v. 28, pp. 515-518.
- DO CARMO, R. J., MARTINS-FERREIRA, H., 1984, "Spreading Depression of Leão Probed with Ion-Selective Microelectrodes in Isolated Chick Retina", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 56, pp. 401-421.
- DUARTE, M. A., 2000, *Uma Técnica para o Estudo do Sinal Óptico Intrínseco da Depressão Alastrante em Retina de Aves*, Tese de D. Sc., Departamento de Engenharia Biomédica, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- DUARTE, M. A., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., BASSANI, J. W. M., 2003, "Functional Imaging of the Retinal Layers by Laser Scattering: an Approach for the Study of Leão's Spreading Depression in Intact Tissue", *Journal of Neuroscience Methods*, v. 123, pp. 139-151.

- FAST, V. G., EFIMOV, I. R., 1991, "Stability of Vortex Rotation in an Excitable Cellular Medium.", *Physica D*, v. 49, pp. 75-81.
- FERREIRA-FILHO, C.R., MARTINS-FERREIRA, H., 1982, "Electrical Impedance of Isolated Retina and its Changes During Spreading Depression", *Journal of Neuroscience*, v. 7, pp. 3231-3239.
- FIFKOVA, E., VAN HARREVELD, A., 1974, "Glutamate and Spreading Depression", *Journal of Neurobiology*, v. 5, pp. 469-73.
- FILOTEO, A. G., ELWESS, N. L., ENYEDI, A., CARIDE, A., AUNG, H. H., PENNISTON, J. T., 1997, "Plasma Membrane Ca²⁺ Pump in Rat Brain; Patterns of Alternative Splices Seen by Isoform-Specific Antibodies", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, pp. 23741–23747.
- FLATMAN, P. W., 2002, "Regulation of Na-K-2Cl Cotransport by Phosphorylation and Protein-Protein Interactions", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1566, pp. 140-151.
- FURSHPAN, E. J., POTTER, D. D., 1959, "Transmission at the giant motor synapses of the crayfish", *Journal of Physiology (London)* v. 145, pp. 289-325.
- GECK, P., PIETRZYK, C., BURCKHARDT, B. -C., 1980, "Electrically Silent Cotransport of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich Cells", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 600, pp. 432–447.
- GILLEN, C. M., BRILL, S., PAYNE, J. A., FORBUSH III, B., 1996, "Molecular Cloning and Functional Expression of the K-Cl Cotransport from Rabbit, Rat, and Human: a New Member of the Cationchloride Cotransporter Family", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271 pp. 16237–16244.
- GLITSCH, H. G., 2001, "Electrophysiology of the Sodium-Potassium-ATPase in Cardiac Cells", *Physiological Reviews*, v. 81, pp. 1791-1826.
- GODA, Y., STEVENS, C. F., 1994, "Two Components of Transmitter Release at a Central Synapse", *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, pp. 12942-12946.

- GOURAS, P., 1958, "Spreading Depression of Activity in Amphibian Retina", *American Journal of Physiology*, v. 195, pp. 28-32.
- GRAFSTEIN, B., 1956, "Mechanism of Spreading Cortical Depression", *Journal of Neurophysiology*, v.19, pp. 154-171.
- GRAFSTEIN, B., 1963, "Neuronal Release of Potassium during Spreading Depression." In: *Brain Function. Cortical Excitability and Steady Potentials*, California, Brazier MAB. Berkeley, CA: University of California, pp. 87-124.
- HANSEN, A. J., ZEUTHEN T., 1981, "Extracellular Ion Concentrations during Spreading Depression and Ischemia in the Rat Brain Cortex", *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 113, pp. 437-45.
- HASS, M., FORBUSH, B., 2000, "The Na-K-Cl Cotransporter of Secretory Epithelia", *Annual Review of Physiology*, v. 62, pp. 515-534.
- HEINEMANN, U., LUX, H. D., 1977, "Ceiling of Stimulus Induced Rises in Extracellular Potassium Concentration in the Cerebral Cortex of Cat", *Brain Research*, v. 120, pp. 231-249.
- HILLE, B., 1992, "Elementary Properties of Ions Solution". In: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2^a ed., ch. 5, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- HINES, M., CARNEVALE, N. T., 1997, "The Neuron Simulation Environment", *Neural Computation*, v. 9, pp. 1179-1209.
- HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F., 1952, "A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction in Nerve", *Journal of Physiology*, v. 117, pp. 500-544.
- HOFFMAN, C. J., CLARK, F. J., OCHS, S., 1973, "Intracortical Impedance Changes during Spreading Depression", *Journal of Neurobiology*, v. 4, pp. 471-486.
- JOHNSTON, D., WU, S. M., 1995, "Synaptic Transmission I: Presynaptic Mechanisms", In: *Foundations of Cellular Neurophysiology*, 1^a ed., chapter 11, Massachusetts, USA, The MIT Press.

- KAGER, H., WADMAN, W. J., SOMJEN, G. G., 2000, "Simulated Seizures and Spreading Depression in a Neuron Model Incorporating Interstitial Space and Ion Concentrations", *Journal of Neurophysiology*, v. 84, pp. 495-512.
- KAGER, H., WADMAN, W.J., SOMJEN, G. G., 2002, "Conditions for the Triggering of Spreading Depression Studied with Computer Simulations", *Journal of Neurophysiology*, v. 88, pp. 2700-2712.
- KASAI, H., 1993, "Cytosolic Ca²⁺ Gradients, Ca²⁺ Binding Proteins and Synaptic Plasticity", *Neuroscience Research*, v. 1993, v. 16, pp. 1-7.
- KATZ, B., 1949, "Les Constantes Électriques de la Membrane du Muscle", *Archives des Sciences Physiologiques*, v. 2, pp. 285–299.
- KATZ, B., 1969, "The Release of Neural Transmitter Substances", Liverpool, Liverpool University Press.
- KATZ, B., MILEDI, R., 1973, "The Binding of Acetylcholine to Receptors and its Removal from the Synaptic Cleft", *Journal of Physiology*, v. 231, pp. 549-74.
- KATZ, B., THESLEFF, S., 1957, "A Study of the Desensitization Produced by Acetylcholine at the Motor End-plate", *Journal of Physiology*, v. 138, pp. 63-80.
- KEENER, J., SNEYD, J., 1998, *Mathematical Physiology*, 1^a ed., New York: Springer-Verlag.
- KLEINSMITH, L. J., KISH, V. M., 1995, "Neurons and Synaptic Signaling", In: *Principles of Cell and Molecular Biology*, 2^a ed., ch. 17, New York, Harper Collins College.
- KOENIG, J. H., YARNAOKA, K., LKEDA, K., 1993, "Calcium-Induced Translocation of Synaptic Vesicles to the Active Site", *Journal of Neuroscience*, v. 13, pp. 2313-2322.
- LADEWIG, T., HANKE, W., GOLDERMANN, M., ALMEIDA, A. C. G., LIMA, V. M. F., 1998, "Distribution of Gap Junctions in the Chicken Retina", *Journal of Brain Research*, v. 39, pp. 77-86.

- LARGO, C., CUEVAS, P., SOMJEN, G. G., MARTÍN DEL RÍO, R., HERRERAS, O., 1996, "The Effect of Depressing Glial Function in Rat Brain in Situ on Ion Homeostasis, Synaptic Transmission, and Neuron Survival", *Journal of Neuroscience*, v. 16, pp. 1219-1229.
- LARGO, C., IBARZ, J. M., HERRERAS, O., 1997a, "Effects of the Gliotoxin Fluorocitrate on Spreading Depression and Glial Membrane Potential in Rat Brain in Situ", *Journal of Neurophysiology*, v. 78, pp. 295-307.
- LARGO, C., TOMBAUGH, G. C., AITKEN, P. G., HERRERAS O., SOMJEN, G. G., 1997b, "Heptanol but not Fluoroacetate Prevents the Propagation of Spreading Depression in Rat Hippocampal Slices", *Journal of Neurophysiology*, v. 77, pp. 9-16.
- LAUF, P. K., ADRAGNA, N. C., GARAY, R. P., 1984, "Activation by *N*-ethylmaleimide of a Latent K^+ - Cl^- Flux in Human Red Blood Cells", *American Journal of Physiology*, v. 246, pp. C385–C390.
- LÄUGER, P., 1979, "A Channel Mechanism for Electrogenic Ion Pumps", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 552, pp. 143-161.
- LÄUGER, P., 1991, "Kinetic Basis of Voltage Dependence of the Na,K-pump", *Society of General Physiologists Series*, v. 46, pp. 303-15.
- LEÃO, A. A. P., 1944a, "Spreading Depression of Activity in Cerebral Cortex", *Journal of Neurophysiology*, v. 7, pp. 359-390.
- LEÃO, A. A. P., 1944b, "Pial Circulation and Spreading Depression of Activity in Cerebral Cortex", *Journal of Neurophysiology*, v. 7, pp. 391-396.
- LEIBOWITZ, D. H., 1992, "The Glial Spike Theory I. On an Active Role of Neuroglia in Spreading Depression", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, v. 250, pp. 287-295.
- LEMIEUX, D. R., ROBERGE, F. A., JOLY, D., 1992, "Modeling the Dynamic Features of the Electrogenic Na, K Pump of Cardiac Cells", *Journal of Theoretical Biology*, v. 154, pp. 335-358.

- LLINÁS, R., SUGIMORI, M., SILVER, R. B., 1995, "Time Resolved Calcium Microdomains and Synaptic Transmission", *Journal of Physiology (Paris)*, v. 89, pp. 77-81.
- LUX, H. D., HEINEMANN, U., DIETZEL, I., 1986, "Ionic Changes and Alterations in the Size of the Extracellular Space during Epileptic Activity", In: DELGADO-ESCUETA, A. V., WARD, A. A. WOODBURY, D. M., PORTER, R. J. (eds.), *Advances in Neurology*, v. 44, ch 31: New York, Raven Press.
- MARROCOS, M. A., MARTINS-FERREIRA, H., 1990, Effect of Na⁺ and Cl⁻ on the Velocity of Propagation of the Spreading Depression in Chick Retina, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 23, pp. 473-476.
- MARTINS-FERREIRA, H. 1954, *Variações Lentas de Potencial do Córtex Cerebral*, Tese de D. Sc., Instituto de Biofísica, Rio de Janeiro, Brasil.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1983, "Spreading Depression in the Chicken Retina", In: OOKAWA, T. (ed), *The Brain and the Behaviour of the Fowl*, Tokyo: Scientific Societies Press, pp. 317-333.
- MARTINS-FERREIRA, H., 1994, "Spreading Depression: A Neurohumoral Reaction", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, pp. 851-863.
- MARTINS-FERREIRA, H., DO CARMO, R. J., 1987, "Retinal Spreading Depression and the Extracellular Milieu", *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 65, pp. 1092-1098.
- MARTINS-FERREIRA, H., NEDERGAARD, M., NICHOLSON, C., 2000, "Perspectives on Spreading Depression", *Brain Research Reviews*, v. 32, pp. 215-234.
- MARTINS-FERREIRA, H., OLIVEIRA CASTRO, G., 1966. "Light-Scattering Changes Accompanying Spreading Depression in Isolated Retina", *Journal of Neurophysiology*, v. 29, pp. 715-726.
- MARTINS-FERREIRA, H., RIBEIRO, L. J. C., 1995, "Biphasic Effects of Gap Junctional Uncoupling Agents on the Propagation of Retinal Spreading

- Depression”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 28, pp. 991-994.
- MENNERICK, S., MATTHEWS, G., 1996, “Ultrafast Exocytosis Elicited by Calcium Current in Synaptic Terminals of Retinal Bipolar Neurons”, *Neuron*, v. 17, pp. 1241-1249.
- MESQUITA, O. N., 2004, *Comunicação pessoal*, Belo Horizonte, Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais.
- MORI, S., MILLER, W. M., TOMITA, T., 1976, “Müller Cell Function during Spreading Depression in Frog Retina”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73, pp. 1351- 1354.
- MORRIS, C., LECAR, H., 1981, “Voltage Oscillation in the Barnacle Giant Muscle Fiber”, *Biophysical Journal*, v. 35, pp. 193-213.
- MÜLLER, M., SOMJEN, G. G., 1999, “Intrinsic Optical Signals in Rat Hippocampal Slices during Hypoxia-induced Spreading Depression-Like Depolarization”, *Journal of Neurophysiology*, v. 82, pp. 1818-1831.
- NEDERGAARD, M., COOPER, A. J., GOLDMAN, S. A., 1995, “Gap Junctions Are Required for the Propagation of Spreading Depression”, *Journal of Neurobiology*, v. 28, pp. 433-444.
- NEWMAN, E. A., 1989, “Electrophysiology of Retinal Glial Cells”, *Progress in Retinal Research*, v.8, pp. 153-171.
- NEWMAN, E. A., 1993, “Inward-rectifying Potassium Channels in Retinal Glial (Müller) Cells”, *Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 8, pp. 3333-3345.
- NEWMAN, E., 2003, “New Roles for Astrocytes: Regulation of Synaptic Transmission”, *Trends in Neurosciences*, v. 26, pp. 536-542.
- NEWTON, C. M., 1984, “Why Model?”. In: NICOLINI, C. (ed), *Modeling and Analysis in Biomedicine*, Singapore: World Scientific Publishing.

- NICHOLSON, C., 1984, "Comparative Neurophysiology of Spreading Depression in the Cerebellum", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 56, pp. 481–494.
- NICHOLSON, C., BRUGGENCATE, G. T., STEINBERG, R., STOCKLE, H., 1977, "Calcium Modulation in Brain Extracellular Microenvironment Demonstrated with Ion-selective Micropipette", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, pp. 1287-90.
- NICHOLSON, C., KRAIG, R. P., 1981, "The Behavior of the Extracellular Ions during Spreading Depression". In: ZEUTHEN, T. (ed), *The Application of Ion-selective Microelectrodes*, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 217-238.
- NICHOLSON, C., PHILLIPS, J. M., 1981, "Ion Diffusion Modified by Tortuosity and Volume Fraction in the Extracellular Microenvironment of the Rat Cerebellum", *Journal of Physiology*, v. 321, pp. 225–257.
- NICHOLSON, C., PHILLIPS, J. M., TOBIAS, C., KRAIG, R. P., 1981, "Extracellular Potassium, Calcium and Volume Profiles during Spreading Depression", In: SKOVÁ, E., HNÍK P., VYKLYCKY, L. (eds), *Ion-Selective Microelectrodes and Their Use in Excitable Tissues*, New York: Plenum Press, pp. 211- 223.
- OLIVEIRA CASTRO, G., MARTINS-FERREIRA, H., 1971, "Deformation and Thickness Variation Accompanying Spreading Depression in the Retina", *Journal of Neurophysiology*, v. 33, pp. 891-900.
- PAYNE, J. A., 1997, "Functional Characterization of the Neuronal-Specific K-Cl Cotransporter: Implications for $[K^+]_o$ Regulation", *American Journal of Physiology*, v. 273, pp. C1515-C1525.
- PAYNE, J. A., RIVERA, C., VOIPIO, J. KAILA, K., 2003, "Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication, Development and Trauma", *Trends in Neurosciences*, v. 26, pp. 199-206.
- PAYNE, J. A., STEVENSON, T. J., DONALDSON, L. F., 1996, "Molecular Characterization of a Putative K-Cl Cotransporter in Rat Brain: a Neuronal-Specific Isoform", *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, pp. 16245–16252.

- PAYNE, J. A., XU, J.-C., HAAS, M., LYTLE, C. Y., WARD, D., FORBUSH III, B., 1995, "Primary Structure, Functional Expression, and Chromosomal Localization of the Bumetanide-sensitive Na-K-Cl Cotransporter in Human Colon", *Journal of Biological Chemistry*, v. 270 pp. 17977–17985.
- PENNISTON, J. T., ENYEDI, A., 1998, "Modulation of the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump", *Journal of Membrane Biology*, v. 165, pp.101-109.
- PEREIRA, D. R., ALMEIDA, A. C. G., DUARTE, M. A., SILVA, C. A., "Métodos Voltamétricos para Medidas de Neurotransmissores Catecolaminérgicos" . In: *Anais do II Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São João del-Rei*, pp. 87, São João del-Rei, Dec.
- PLESSER, T., MULLER, K. H., 1995, "Fourier Analysis of the Complex Motion of Spiral Tips in Excitable Media", *International Journal of Bifurcation and Chaos*, v. 5, pp. 1071-1084.
- PLOTKIN, M. D., KAPLAN, M. R., PETERSON, L. N., GULLANS, S. R., HEBERT, S. C., DELPIRE, E., 1997, "Expression of the $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ Cotransporter BSC2 in the Nervous System", *American Journal of Physiology*, v. 272, pp. C173–C183.
- REGGIA, J. A., MONTGOMERY, D., 1994, "Modeling Cortical Spreading Depression", *Proceedings of the Annual Symposium on Computer Application in Medical Care*, pp. 873-877.
- REGGIA, J. A., MONTGOMERY, D., 1996, "A Computational Model of Visual Hallucinations in Migraine", *Computers in Biology and Medicine*, v. 26, pp. 133-141.
- RESHODKO, L. V., BURES, J., 1975, "Computer Simulation of Reverberating Spreading Depression in a Network of Cell Automata", *Biological Cybernetics*, v. 18, pp. 181-189.
- REVERT, K., RUPPIN, E., GOODALL, S., REGGIA, J. A., 1998, "Spreading Depression in Focal Ischemia: a Computational Study." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolic*, v. 18, pp. 998-1007.

- RIBEIRO, L. J., MARTINS-FERREIRA, H., 1994, "Elicitation of Retinal Spreading Depression by Barium Ions", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, pp. 2457-2460.
- RODRIGUES, A. M., 2003, *Modelo Eletroquímico de Atividades Epileptiformes Sustentadas por Modulações Não-sinápticas*, Tese de M. Sc., Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Física, Química e Neurociência, UFSJ, São João del-Rei, Brasil.
- ROSENMUND, C., STEVENS, C. F., 1996, "Definition of the Readily Releasable Pool of Vesicles at Hippocampal Synapses", *Neuron*, v. 16, pp. 1197-1207.
- RUPPIN, E., OFER, E., REGGIA, J. A., REVETT, K., SHARON, GOODAL, S., 1999, "Pathogenic Mechanisms in Ischemic Damage: A Computational Study", *Computers in Biology and Medicine*, v. 29, pp. 39-59.
- RUPPIN, E., REGGIA, J. A., 2001, "Cortical Spreading Depression and the Pathogenesis of Brain Disorders: A Computational and Neural Network-based Investigation", *Neurological Research*, v. 23, pp. 447-456.
- RUSSELL, J. M., 1983, "Cation-coupled Chloride Influx in Squid Axon", *Journal of General Physiology*, v. 81, pp. 909– 925.
- RUSSELL, J. M., 2000, "Sodium-Potassium-Chloride Cotransport", *Physiological Reviews*, v. 80, pp. 211-276.
- SALVADOR, J.M., INESI, G., RIGAUD, J. L., MATA A. M., 1998, "Ca²⁺ Transport by Reconstituted Synaptosomal ATPase Is Associated with H⁺ Countertransport and Net Charge Displacement", *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, pp. 18230-18234
- SCHWARTZKROIN, P. A., BARABAN, S. C., HOCHMAN, D. W., 1998, "Osmolarity, Ionic Flux, and Changes in Brain Excitability", *Epilepsy Research*, v. 32, pp. 275-285.

- SHANES, A. M., 1958, "Electrochemical Aspects of Physiological and Pharmacological Action in Excitable Cells. Part 1. The Resting Cell and Its Alteration by Extrinsic Factors", *Pharmacological Reviews*, v. 10, pp. 59–164.
- SHAPIRO, B. E., 2001, "Osmotic Forces and Gap Junctions in Spreading Depression: A Computational Model", *Journal of Computational Neuroscience*, v. 10, pp. 99-120.
- SIMON, S. M., LLINAS, R. R., 1985, "Compartmentalization of the Submembrane Calcium Activity during Calcium Influx and its Significance in Transmitter Release", *Biophysical Journal*, v. 48, pp. 485-498.
- SKOU, J. C., 1957, "The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerve", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 23, pp. 394-401.
- SOMJEN, G. G., 1973, "Electrogenesis of Sustained Potentials", *Progress in Neurobiology*, v. 1, pp. 201-237.
- SOMJEN, G. G., 2001, "Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization", *Physiological Reviews*, v. 81, pp. 1065-1096.
- SOMJEN, G. G., AITKEN, P. G., CZECH, G. L., HERRERAS, O., JING, J., YOUNG, J. N., 1992, "The Mechanism of Spreading Depression: a Review of Recent Findings and Hypothesis", *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 70, pp. 5248-5254.
- SOMJEN, G. G., AITKEN, P. G., GIACCHINO, J. L., MCNAMARA, J. O., 1986, "Interstitial Ion Concentration and Paroxysmal Discharge in Hippocampal Formation and Spinal Cord". In: DELGADO-ESCUETA, A. V., WARD, A. A. WOODBURY, D. M., PORTER, R. J. (eds.), *Advances in Neurology*, v. 44, ch. 33, New York: Raven Press.
- STOKES, J. B., LEE, I., D'AMICO, M., 1984, "Sodium Chloride Absorption by the Urinary Bladder of the Winter Flounder. A Thiazidesensitive, Electrically Neutral Transport System", *Journal of Clinical Investigation*, v. 74, pp. 7–16.

- STRAESSLE, A., LOUP, F., ARABADZISZ, D., OHNING, G. V., FRITSCHY, J. M., 2003, "Rapid and Long-term alterations of Hippocampal GABA_B Receptors in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy", *European Journal of Neuroscience*, v. 18, pp. 2213-26.
- SUGAYA, E., TAKATO, M., NODA, Y. 1975, "Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat", *Journal of Neurophysiology*, v. 38, pp. 822-841.
- TAS, P. W. L., MASSA, P. T., KRESS, H. G., KOSCHEL, K., 1987, "Characterization of an Na⁺ / K⁺ / Cl⁻ Co-transport in Primary Culture of Rat Astrocytes", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 903, pp. 411-416.
- TEIXEIRA, H. Z., 2000, *Modelagem Computacional da Eletrodifusão Extracelular durante a Depressão Alastrante*, Tese de M. Sc., Programa de Engenharia Biomédica, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A. M., DUARTE, M. A., 2001, "Descrição Matemática da Dinâmica Iônica em Tecidos Neurais", *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 17, pp. 85-96.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A. M., DUARTE, M. A., 2002, "Simulação do Efeito de Na⁺ e Cl⁻ na Velocidade da Onda de Depressão Alastrante através de um Modelo Eletroquímico". In: *Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 5, pp. 101-106, São José dos Campos, São Paulo, Set.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G, INFANTOSI, A. F. C., VASCONCELOS, M. A., DUARTE, M. A., 2004, "Simulation of the Effect of Na⁺ and Cl⁻ on the Velocity of Spreading Depression's Wave using a Simplified Electrochemical Model of Synaptic Terminals", *Journal of Neural Engineering*, v. 1, pp. 117-125.
- THOMAS, R. C., 1972, "Electrogenic Sodium Pump in Nerve and Muscle Cells", *Physiological Reviews*, v. 52, pp. 563-594.
- TOBIAS, C. NICHOLSON, C., 1982, "Tetrodotoxin Resistant Propagation and Extracellular Sodium Changes During Spreading Depression in Rat Cerebellum", *Brain Research*, v. 241, pp. 329-333.

- TRAUB, R. D., JEFFERYS, J. G., MILES, R., WHITTINGTON, M. A., TÓTH K., 1994, "A Branching Dendritic Model of a Rodent CA3 Pyramidal Neurone", *Journal of Physiology*, v. 15, pp. 79-95.
- TUCKWELL, H. C., 1980, "Predictions and Properties of a Model of Potassium and Calcium Ion Movements during Spreading Cortical Depression", *International Journal of Neuroscience*, v. 10, pp. 145-164.
- TUCKWELL, H. C., 1981, "Simplified Reaction-Diffusion Equations for Potassium and Calcium ion Concentrations during Spreading Cortical Depression", *International Journal of Neuroscience* v. 12, pp. 95-107.
- TUCKWELL, H. C., HERMANSEN, C. L., 1981, "Ion and Transmitter Movements during Spreading Cortical Depression", *International Journal of Neuroscience*, v. 12, pp. 109-135.
- TUCKWELL, H. C., MIURA, R. M., 1978, "A Mathematical Model for the Spreading Cortical Depression", *Biophysical Journal*, v. 23, pp. 257-276.
- VAN HARREVELD A., 1959, "Compounds in Brain Extracts Causing Spreading Depression of Cerebral Cortical Activity and Contraction of Crustacean Muscle", *Journal of Neurochemistry*, v. 3, pp. 300-315.
- VAN HARREVELD, A., 1978, "Two Mechanisms for Spreading Depression in the Chicken Retina", *Journal of Neurobiology*, v. 9, n. 6, pp. 419-431.
- VAN HARREVELD, A., FIFKOVA, E., 1970, "Glutamate Release from the Retina during Spreading Depression", *Journal of Neurobiology*, v. 2, pp. 13-29.
- VAN HARREVELD, A., KHATTAB, F. I., 1967, "Changes in Cortical Extracellular Space during Spreading Depression Investigated with the Electron Microscope", *Journal of Neurophysiology*, v. 30, pp. 911-929.
- VASCONCELOS, M. A., 2003, Efeitos da Osmolaridade sobre Parâmetros Cinéticos da Onda de Depressão Alastrante em Retina de Ave, Dissertação de M. Sc., Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Física, Química e Neurociência, UFSJ, São João del-Rei, Brasil.

- VIZI, E. S., 2000, "Role of High Affinity Receptors and Membrane Transporters in Nonsynaptic Communication and Drug Action in the Central Nervous System," *Pharmacology Review*, v. 52, pp. 63–90.
- WEISS, T. F., 1996, *Cellular Biophysics*, vol. 2, 1^a ed., Cambridge, MA: MIT Press.
- WOLFE, S. L., 1993, "The Functions of Membranes in Ionic Transport and Molecular Transport", In: *Molecular and Cellular Biology*, 1^a ed., ch. 6, Belmont: Wadsworth.
- YAN, J. C. G., 1995, "Formation and Deformation of Patterns through Diffusion." *Journal of Mathematical Biology*, v. 34, pp. 17-40.
- ZUCKER, R. S, 1996, "Exocytosis: A Molecular and Physiological Perspective", *Neuron*, v. 17, pp. 1049-1055.
- ZYLINSKA, L., SOSZYNSKI, M., 2000, "Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in Excitable and Nonexcitable Cells", *Acta Biochimica Polonica*, v. 47, pp. 529-539.