

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATEMÁTICA APLICADA

Modelos Matemáticos para o Transporte de Íons por Canais em Membranas de Axônios

por

Cristiano Lima Hackmann

Dissertação submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Matemática Aplicada

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Guidi
Orientador

Prof. Dr. Mark Thompson
Co-Orientador

Porto Alegre, julho de 2007.

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

Hackmann, Cristiano Lima

Modelos Matemáticos para o Transporte de Íons por Canais em Membranas de Axônios / Cristiano Lima Hackmann.—Porto Alegre: PPGMAp da UFRGS, 2007.

71 p.: il.

Dissertação (mestrado) —Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada, Porto Alegre, 2007.

Orientador: Guidi, Leonardo Fernandes; Co-Orientador: Thompson, Mark

Dissertação:

Aos meus pais, Paulo e Maria Helena por estarem sempre comigo, apoiando, incentivando e orientando todas as minhas decisões.

Às minhas irmãs, Cristina e Priscila pela alegria e afeto que me proporcionam.

À minha esposa, Adriana pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos.

À família Vilson, Ana, Fernando e Denise, por incentivarem os meus estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Ao professor Leonardo Fernandes Guidi, pela orientação e pela incansável dedicação no desenvolvimento da dissertação.

Ao professor Mark Thompson, por apresentar o assunto dessa dissertação e pelo constante apoio no desenvolvimento do trabalho e da minha formação.

Aos professores do PPGMAP, por auxiliarem na minha formação profissional, e por estarem sempre dispostos a sanar as minhas dúvidas.

Aos funcionários do PPGMAP.

A todos os meus amigos, que mesmo não entendendo o que eu faço, sabem da importância dos meus estudos. E aos amigos que entendem, em todo ou em parte, pela colaboração com idéias e sugestões no desenvolvimento desse trabalho.

À todos os professores de outros Institutos da UFRGS que me acolheram e auxiliaram no meu desenvolvimento.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

Platão

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 BIOFÍSICA E FUNÇÃO DOS CANAIS IÔNICOS	4
3.1 Nota Histórica	4
3.2 Membrana Celular	5
3.3 Canais Iônicos	6
3.3.1 Nomenclatura dos Canais Iônicos	8
3.3.2 Localização dos Canais Iônicos Dependentes de Voltagem na Membrana Plasmática	9
3.3.3 Estrutura Molecular e Corrente Unitária de Canais Iônicos	10
3.3.3.1 Estrutura dos Canais	11
3.3.3.2 Corrente através dos Canais	13
3.4 Potencial de Ação	13
4 ASPECTOS DE MODELAGEM MATEMÁTICA	16
4.1 Equação de Poisson em Coordenadas Toroidais	16
4.1.1 Campo elétrico aplicado	18
4.1.2 Geometria do canal	18
4.1.3 Coordenadas Toroidais	19

4.1.4	Soluções das Equações de Laplace e Poisson	20
4.1.5	Solução da Equação em Diferenças	25
4.2	Mecânica Estatística do Equilíbrio em Canais Iônicos	27
4.2.1	Descrição do Sistema Biológico	28
4.2.2	Descrição Estatística do Sistema Biológico	28
4.2.2.1	Probabilidade de ocupação e Potencial de Força Média	34
4.2.2.2	Influência do Potencial de Membrana	39
5	CONSIDERAÇÕES SOBRE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL	44
5.1	Eletrostática nos Canais Iônicos	45
5.2	Modelos de permeação	48
5.2.1	Teorias do contínuo	49
5.2.2	Dinâmica Browniana	51
5.2.3	Dinâmica Molecular	57
5.3	Aplicações em Canais Iônicos	60
5.3.1	Canal de Gramicidina A	60
5.3.2	Canais de Potássio	61
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Lista de Figuras

Figura 3.1	Distribuição dos Canais Dependentes de Voltagem. A partir de Lai & Jan, [48].	9
Figura 3.2	Distribuição dos Canais Dependentes de Voltagem em neurônios mielinizados. A partir de Lai & Jan, [48].	9
Figura 3.3	Estrutura do canal de Na_v . A partir de Lai & Jan, [48].	11
Figura 3.4	Estrutura do canal de K_v . A partir de Lai & Jan, [48].	12
Figura 3.5	Potencial de ação e suas fases	15
Figura 4.1	Sistema de coordenadas toroidais. Um toro é gerado pela rotação de dois círculos pela rotação de 360° ao longo do eixo z . Um ponto P qualquer do espaço pode ser definido por (μ, η, ϕ)	19
Figura 4.2	Sistema microscópico. A região do poro é a parte interna da elipse tracejada e a região da solução é a parte externa. Diagrama construído a partir de Roux, [69].	28
Figura 5.1	O canal iônico modelo com dois vestíbulos catenários é gerado pela rotação da curva fechada em 180° ao longo do eixo z . O vestíbulo em cada lado da membrana são construídos usando $z = a \cosh(x/a)$ com $a = 4,87$. O raio da entrada do vestíbulo é 13 \AA e o segmento transmembrana cilíndrico tem um raio de 4 \AA [38].	52

Glossário

ATP	adenosina trifosfato
ADP	adenosina difosfato
Na_v	Canais de sódio dependentes de voltagem
SIA	segmento inicial do axônio
KCNQ	Canais de potássio
$K_{v3.1b}$	Canais de potássio dependente de voltagem
K_{v1}	Canais de potássio dependente de voltagem
JXPs	juxtapanodos
HCN	Canais ativados por hiperpolarização
$K_{v2.1}$	Canais de potássio dependente de voltagem
$K_{v4.2}$	Canais de potássio dependente de voltagem
K_{v3}	Canais de potássio dependente de voltagem
Ca_v	Canais de cálcio dependente de voltagem
K_vAP	canal de K_v da bactéria <i>Aeropyrum pernix</i>
PA	potencial de ação
LTP	potencial de longa duração
LTD	depressão de longa duração
GA	Gramicidina A
PFM	potencial de força média
PB	Poisson-Boltzmann
TR	taxa de reação
PNP	Poisson-Nernst-Planck
DB	dinâmica Browniana
DM	dinâmica molecular
PFM	potencial de força média
KcsA	canal de potássio

RESUMO

Esta dissertação apresenta uma revisão sobre canais iônicos com respeito aos seus aspectos biofísicos e sobre alguns modelos matemáticos utilizados em sua análise.

As abordagens dividem-se em duas classes: uma em que é possível realizar análises exatas e outra mais apropriada à análise numérica. Será revista a solução da equação de Poisson em coordenadas toroidais, que fornece uma expressão para o potencial elétrico na região do canal. Uma outra abordagem estudada utiliza os ensembles da mecânica estatística de equilíbrio para determinar a forma do potencial elétrico médio nessa mesma região. As descrições destinadas à análise numérica compreendem: uma formulação em que todos os elementos são considerados como meios contínuos; a Dinâmica Browniana e a Dinâmica Molecular. A dissertação é encerrada com a apresentação de alguns resultados experimentais sobre canais reais.

Ao final, o leitor deverá ter um panorama sobre os estudos, teóricos e aplicados, no campo da condução passiva de íons através de membranas celulares. Esta dissertação não tem por finalidade esgotar os tópicos que abrangem esta área do conhecimento.

ABSTRACT

This dissertation presents a review about ion channels with respect to their biophysical aspects and some mathematical models employed in its analysis.

Our approach is separated in two parts: one where it is possible to achieve exact results and another more suitable to numerical analysis. There will be reviewed a solution for Poisson's equation in toroidal coordinates which gives an expression for electrical potential in the region of the channel. Also, There will be reviewed the mean force potential formulation derived from the ensembles of equilibrium statistical mechanics. The numerical analysis approach comprehends formulations where all elements are considered as a continuum media and via Brownian Dynamics and the Molecular Dynamics. This dissertation finishes with a discussion of some experimental results about real channels.

At the end of this all, the reader should have an overview about the studies, both theoretical and applied, in the field of passive conduction of ions through cell membranes. However, this dissertation has no intention to be a comprehensive review of the subject.

1 INTRODUÇÃO

Os estudos relacionados a propagação de sinais e transporte de íons em células excitáveis, mobilizam uma grande diversidade de cientistas interessados em uma melhor compreensão desses fenômenos biológicos. No caso das ciências exatas, entre algumas das contribuições que a matemática oferece a essa crescente área da biologia, destacamos a elaboração de modelos, que possam captar os principais aspectos desses eventos, além de ferramentas computacionais para a simulação de tais fenômenos. No presente trabalho, serão apresentados alguns dos principais modelos teóricos e computacionais de transporte iônico, elaborados até o momento, além da biofísica referente ao fenômeno.

Sinais elétricos nos seres vivos são transmitidos através da alteração na concentração intracelular de íons como: potássio (K^+), sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}). Em células eletricamente excitáveis, o movimento dos íons através da membrana plasmática promove alterações no potencial elétrico através da membrana, essas alterações do potencial constituem os sinais primários que transportam mensagens de uma parte a outra de um organismo. O transporte de íons através das membranas celulares é mediado por populações de canais, denominados canais iônicos, e a corrente iônica pela célula reflete o somatório dos comportamentos individuais de cada canal na membrana plasmática.

Os canais iônicos são formados por proteínas que transpassam a bicamada lipídica da membrana celular e formam um caminho para um fluxo rápido e controlado de íons específicos, que fluem a favor do gradiente eletroquímico. Em conjunto com outras proteínas que realizam o transporte ativo - contrário ao sentido do gradiente eletroquímico - os canais iônicos são responsáveis pela propagação dos sinais conhecidos como potenciais de ação (PA) pelas células eletricamente excitáveis presentes nos nervos e músculos.

Os modelos de canais iônicos biológicos remontam há quase 100 anos. Na era anterior à biologia molecular, as interpretações desses modelos simples promoveram a primeira fonte de informação sobre a estrutura desses canais. O advento da biologia molecular, difração por raio-x, técnicas de DNA recombinante e “patch-

clamp”, e simulações de dinâmica molecular, tornaram possível a coleta de dados diretos sobre a estrutura dos canais e o comportamento do fluxo de íons por eles.

2 OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação é realizar uma revisão bibliográfica sobre alguns aspectos relacionados ao processo de permeação de íons em canais iônicos dependentes de voltagem.

Objetivos específicos:

1. Revisar a estrutura, localização, nomenclatura e funções dos canais iônicos dependentes de voltagem.
2. Descrever os principais passos para a solução exata da equação de Poisson em coordenadas toroidais.
3. Obter, a partir de primeiros princípios, uma relação entre as densidades dos íons permeantes no lado I e II da membrana utilizando a mecânica estatística do equilíbrio.
4. Obter, a partir de primeiros princípios, a equação de Nernst utilizando a mecânica estatística do equilíbrio.
5. Descrever a influência da membrana plasmática no potencial de força média.
6. Analisar as principais ferramentas computacionais que simulam a permeação de íons em canais iônicos.
7. Revisar alguns aspectos da teoria estudada nos canais Gramicidina A e $KcsA$

3 BIOFÍSICA E FUNÇÃO DOS CANAIS IÔNICOS

3.1 Nota Histórica

Na atualidade, os pesquisadores que estudam a propagação de sinais em células excitáveis dispõem de técnicas como o “patch-clamp”, a difração de raios-x e manipulação de genes que, nos últimos anos, vem fornecendo uma crescente quantidade de informações a serem analisadas e que permitem o enriquecimento da descrição matemática e uma maior compreensão dos fenômenos. No início do século passado, no entanto, eles não contavam com várias dessas técnicas. Porém, mesmo sem dados diretos sobre o que realmente acontecia dentro e fora da célula, e sobre os principais agentes responsáveis pelo fenômeno biológico, algumas de suas suposições vieram a se confirmar anos mais tarde.

Dois dos conceitos centrais para entender a excitação elétrica foram propostos no início do século XX, mas permaneceram sem suporte por décadas. Bernstein [7], [8] propôs que os potenciais surgem através de uma membrana que é seletivamente permeável e separa soluções de diferentes concentrações iônicas. Ele acreditava que a excitação envolve um aumento da permeabilidade. Já Hermann [26], [27], [28] propôs que a propagação é uma auto-estimulação elétrica do axônio pela ação de uma corrente interna da célula, propagando passivamente de uma região excitada para a região vizinha não-excitada. Estas hipóteses não foram confirmadas até o período de 1935-1952. Poucos anos depois que Hodgkin [30], [31] constatou que correntes de circuito local levam a membrana do repouso para a ação, Cole e Curtis [14], [15] descobriram um grande aumento na permeabilidade da membrana. A corrente iônica para dentro da célula foi atribuída a um aumento na permeabilidade da membrana ao íon Na^+ , no trabalho de Hodgkin e Katz [37]. E finalmente em 1952 a cinética da mudança na permeabilidade dos íons foi descrita com a ajuda de técnicas como o “patch-clamp” [29], [32], [33], [34], [35], [36].

3.2 Membrana Celular

Membranas biológicas são estruturas biomoleculares, entre 60-100 Å de espessura, formadas por fosfolípidos, glicolípidos, colesterol, glicoproteínas e proteínas especializadas. Os blocos fundamentais em uma membrana celular são os fosfolípidos que caracterizam-se por serem moléculas anfipáticas, i. e. , possuem um domínio polar (associado ao fosfato) e um domínio apolar (associado às longas cadeias de carbono). Sob condições fisiológicas, as interações não covalentes entre os fosfolípidos promovem a formação de uma estrutura denominada bicamada fosfolipídica (ou simplesmente bicamada lipídica). Nessa estrutura os fosfolípidos estão dispostos de uma maneira em que os seus domínios polares mantêm contato com as moléculas de água do meio extra-celular e do meio citoplasmático, enquanto que os domínios apolares ficam isolados no região interna da bicamada. A bicamada fosfolipídica não é uma estrutura estática, uma melhor ilustração de seu comportamento é a de um mosaico fluido e dinâmico [70]. Os demais constituintes da membrana possuem o papel de alterar algumas de suas propriedades como a fluidez e rigidez ou então estão associadas ao transporte de substâncias (como no caso dos canais iônicos) e identificação pelo sistema imunológico.

Algumas das principais funções das membranas são: (1) formar uma barreira permeável; (2) agir como um solvente para as proteínas de membrana; (3) criar e explorar os gradientes químicos e elétricos transmembrana; (4) prover transdução de sinal; e (5) prover uma compartimentalização para as funções celulares.

Dado o tempo suficiente, virtualmente qualquer molécula se difundirá através de uma bicamada lipídica isenta de proteína, ao longo de seu gradiente de concentração. A velocidade com a qual ela faz isso, entretanto, varia enormemente, dependendo em parte de seu tamanho e principalmente de sua solubilidade relativa em óleo. Em geral, quanto menor a molécula e quanto mais solúvel ela for em óleo mais rapidamente ela se difundirá através de uma bicamada. Moléculas não-polares pequenas facilmente se dissolvem nas membranas celulares e portanto difundem-se rapidamente através delas. Moléculas polares sem carga também difundem-se rapidamente através de uma bicamada se forem suficientemente pequenas. As bi-

camadas lipídicas são altamente impermeáveis a moléculas carregadas (íons), não importando o quão pequenas elas sejam [1].

3.3 Canais Iônicos

Canais iônicos são proteínas altamente específicas cuja função consiste em facilitar a passagem de determinados íons através da membrana. Eles são encontrados nas membranas de todas as células, procariontes e eucariontes, e algumas de suas funções conhecidas incluem: (1) estabelecer o potencial de repouso da membrana; (2) moldar sinais elétricos; e (3) regular o volume celular. Entre os principais objetivos da biofísica de membranas celulares está a compreensão da relação entre a estrutura tridimensional do canal iônico e sua função no nível molecular. Nos últimos anos, ferramentas poderosas como cristalografia por raio-x, microscopia eletrônica e ressonância magnética nuclear tem sido desenvolvidas para caracterizar a estrutura tridimensional das proteínas no nível atômico [70]. No entanto, uma das principais dificuldades é a obtenção de cristais de proteína com a pureza e as dimensões necessárias à análise cristalográfica.

As proteínas transportadoras da membrana que foram detalhadamente estudadas são proteínas transmembrana multipasso, isto é, as suas cadeias polipeptídicas atravessam a membrana múltiplas vezes. Por formar uma via protéica contínua através da membrana, essas proteínas capacitam solutos hidrofílicos específicos a cruzar a membrana sem entrar em contato direto com o interior hidrofóbico da bicamada lipídica. Todas as proteínas-canal e muitas proteínas carreadoras, permitem aos solutos cruzar a membrana apenas passivamente, um processo denominado transporte passivo (ou difusão facilitada). Se a molécula transportada não tem carga, é simplesmente a diferença de sua concentração entre os dois lados da membrana (o seu gradiente de concentração), que impulsiona o transporte passivo e determina a sua direção. Caso o soluto tenha uma carga elétrica resultante, tanto o seu gradiente de concentração quanto a diferença de potencial elétrico através da membrana (o potencial de membrana) influenciarão o seu transporte. O gradiente de concentração e o gradiente elétrico podem ser combinados para calcular a força resultante para cada soluto carregado [1].

As células também necessitam de proteínas transportadoras que ativamente bombeiem certos solutos através da membrana contra seus gradientes eletroquímicos. Esse processo, conhecido como transporte ativo, é sempre mediado por proteínas carreadoras, e a atividade de bombeamento da proteína tem uma direção determinada. Para que ocorra o transporte de íons existe a necessidade do consumo de energia, via hidrólise de ATP (adenosina trifosfato). Assim, o transporte por proteínas carreadoras pode ser ou ativo ou passivo, enquanto o transporte por proteínas-canal é sempre passivo [1].

Um exemplo de proteína transportadora é a bomba de Na^+/K^+ -ATPase que foi descoberta pelo fisiologista J. Skou em 1957 [74]. Duas das principais funções que a bomba exerce são: (1) regulação do volume celular e (2) manutenção das concentrações de Na^+ e K^+ dentro e fora da célula. Conforme descrito em trabalhos como [4] e [10] o mecanismo é ativado quando os íons de sódio ligam-se em sítios da parte intracelular da proteína enquanto os íons potássio em sítios da parte extracelular. No sítio catalítico ocorre a conversão de ATP em ADP (adenosina difosfato) mais fosfato na parte intracelular da proteína¹, e o transporte ocorre contra o gradiente eletroquímico dos íons. Para cada conversão da molécula de ATP, ocorre um transporte acoplado de 3 íons de Na^+ de dentro da célula para fora e 2 íons de K^+ de fora para dentro^{2, 3}.

A medida da corrente elétrica através dos canais iônicos é determinada no nível microscópico pelo fluxo de íons que estão presentes na solução. Estudos eletrofisiológicos mostraram que os canais de K^+ formam longos poros estreitos, onde os íons permeáveis são parcialmente desidratados e, ordenadamente, movem-se em fila única cercado pelas moléculas de água [81]. O fluxo observado nos canais de K^+ também mostra que a fila formada pelos íons apresentam uma unidade multivalente contendo dois ou três íons [61]. Além do mais, o poro do canal não é uma região onde os íons estão sob a ação de um campo elétrico uniforme mas sim, uma região caracterizada pela presença de um conjunto finito de sítios de ligação específico

¹Cada molécula de ATP é reciclada muitas vezes por minuto [65].

²Cada ciclo da bomba de Na^+/K^+ -ATPase causa o transporte líquido de uma unidade de carga para fora da célula; esse tipo de bomba é chamada de eletrogênica [65].

³A bomba contribui em, aproximadamente, 7% do potencial de repouso no axônio da lula gigante, chegando a 15% em algumas células de mamíferos [41].

para os íons permeáveis. Tais sítios de ligação correspondem a mínimos de potencial eletrostáticos separados por picos através dos quais as espécies permeantes (íons e água) devem passar. A proposta original de Läuger [49] sobre a possível estrutura de tais sítios, é de que eles podem ser formados por uma série de *peptide carbonyl groups*. Estas predições qualitativas sobre as propriedades do poro se mostraram em perfeito acordo com a estrutura do canal de K^+ determinado por raio-x [56].

O retrato físico para a difusão da fila íon-água no interior do poro é que as partículas permeantes sentem forças de curto e longo alcance e, sobre vibrações térmicas no poro, pula para a posição vizinha quando esta estiver vazia. Tal processo pode ser visto como o movimento de partículas entre níveis de energia mínima ao longo do eixo do poro e é convenientemente descrito pela teoria de taxa de reação⁴ (TR) [56].

3.3.1 Nomenclatura dos Canais Iônicos

A seqüência de aminoácidos para os canais iônicos revelam uma forte similaridade estrutural entre grupos de canais, o que permite falar em famílias de proteínas-canal homólogas que evoluíram por processos de sucessiva duplicação gênica, mutação, e seleção de ancestrais comuns[29].

Os canais iônicos dependentes de voltagem compreendem uma superfamília codificada por, pelo menos, 143 genes no genoma humano e são uma das maiores superfamílias de proteínas transdutoras de sinal [80]. Além de sua proeminência na transdução de sinal, estes canais iônicos estão também entre os alvos mais comuns para a ação de fármacos. Portanto, unificar de forma racional as famílias e subfamílias de canais iônicos, e atribuir funções fisiológicas e significância farmacológica para cada membro da família tem sido um importante desafio. Tarefa que foi atribuída ao Comitê de Nomenclatura da IUPHAR (International Union of Pharmacology) em 1999, culminando até o momento no *IUPHAR Compendium of Voltage-Gated Ion Channels 2005* [11].

⁴"*Reaction-rate theory*" Essa teoria será abordada no capítulo 4.

3.3.2 Localização dos Canais Iônicos Dependentes de Voltagem na Membrana Plasmática

A localização e o comportamento dos canais dependentes de voltagem são fundamentais para entender a dinâmica dos potenciais em uma célula excitável. Nesta seção serão apresentados as regiões, de um neurônio modelo (figuras 3.1 e 3.2), de alguns dos canais envolvidos na propagação de sinais de células nervosas. Contudo o foco principal desse trabalho será nos canais dependentes de voltagem, que estão localizados no axônio de um neurônio sem bainha de mielina.

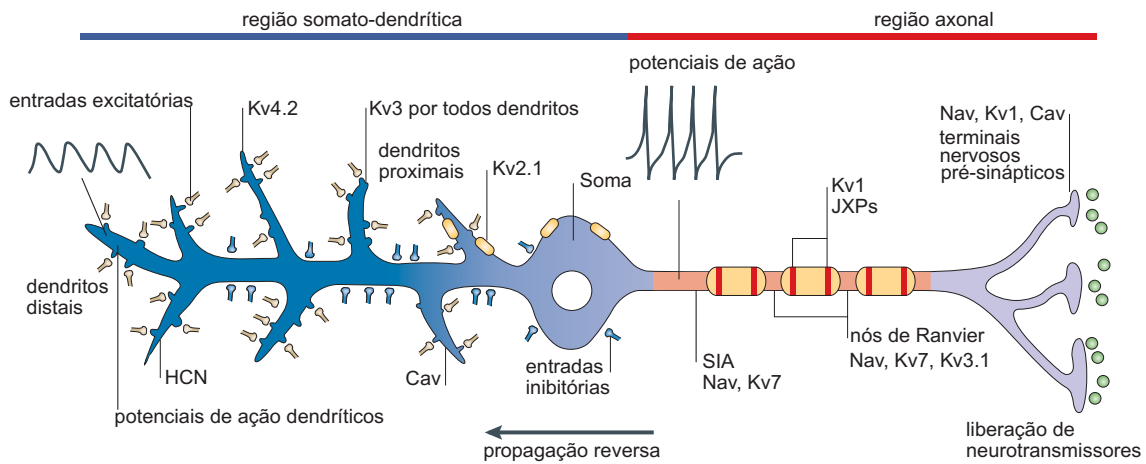


Figura 3.1: Distribuição dos Canais Dependentes de Voltagem. A partir de Lai & Jan, [48].

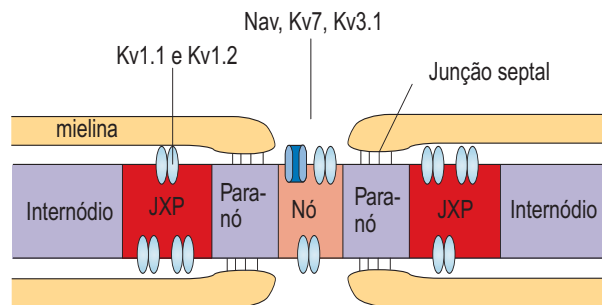


Figura 3.2: Distribuição dos Canais Dependentes de Voltagem em neurônios mielinizados. A partir de Lai & Jan, [48].

1. Ca_v (Canais de cálcio dependente de voltagem): aumentam em densidade perto dos dendritos proximais e soma. Encontram-se também no terminal nervoso pré-sináptico.

2. *HCN* (Canais ativados por hiperpolarização): estão distribuídos entre o soma e os dendritos distais de acordo com um gradiente positivo no sentido dos dendritos.
3. K_{v1} (Canais de potássio dependente de voltagem): juxtapanodos (JXPs)⁵ e terminal nervoso pré-sináptico.
4. $K_{v2.1}$ (Canais de potássio dependente de voltagem): formam aglomerados no soma e nos dendritos proximais.
5. K_{v3} (Canais de potássio dependente de voltagem): estão distribuídos por todo os dendritos.
6. $K_{v3.1}$ (Canais de potássio dependente de voltagem): nodos de Ranvier.
7. $K_{v4.2}$ (Canais de potássio dependente de voltagem): localizam-se em maior número nos dendritos distais.
8. K_{v7} (Canais de potássio dependente de voltagem): segmento inicial do axônio (SIA), axônio e/ou nodos de Ranvier.
9. Na_v (Canais de sódio dependentes de voltagem): segmento inicial do axônio (SIA), axônio e/ou nodos de Ranvier (no caso de neurônio mielinizado) e terminal nervoso pré-sináptico.
10. K_{v7} (Canais de potássio dependente de voltagem): segmento inicial do axônio (SIA), axônio e/ou nodos de Ranvier.

3.3.3 Estrutura Molecular e Corrente Unitária de Canais Iônicos

Devido à sua estrutura molecular complexa e à pequena quantidade de corrente que flui através de cada canal, a análise de seu comportamento não é uma tarefa simples. Duas técnicas desenvolvidas nas últimas décadas tem aumentado enormemente a velocidade de pesquisa em canais iônicos individuais: o DNA

⁵Uma região do axônio adjacente aos paranodos, que, por sua vez, são adjacentes aos nodos de Ranvier e são localizados abaixo da bainha de mielina.

recombinante e técnicas de “patch-clamp”. O primeiro ajuda a determinar a estrutura molecular de um canal iônico, enquanto o segundo permite a medida direta da corrente de íon fluindo através de um único canal aberto [41].

3.3.3.1 Estrutura dos Canais

Canais iônicos dependentes de voltagem são formados tanto por uma subunidade α que é um polipeptídeo contíguo que contém quatro domínios (I-IV) figura 3.3, como nos canais de Na_v e Ca_v , ou quatro subunidades α , como no caso dos canais K_v e HCN.

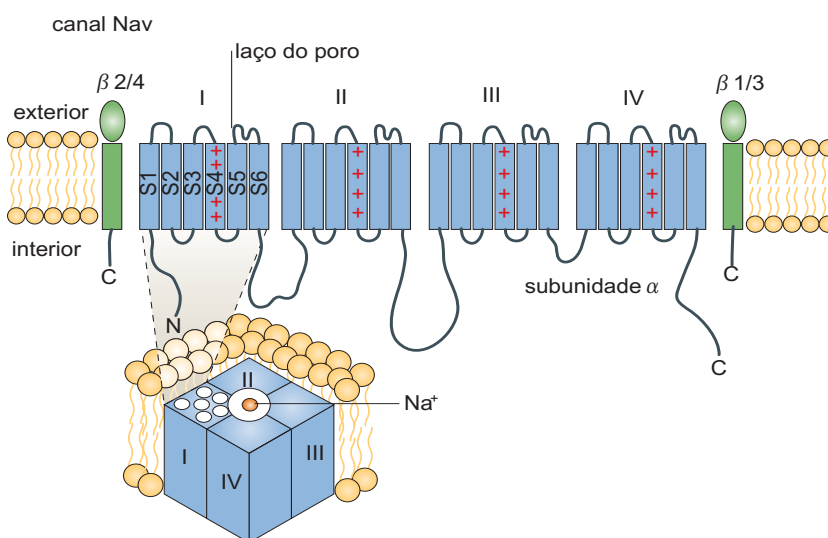


Figura 3.3: Estrutura do canal de Na_v . A partir de Lai & Jan, [48].

Um domínio simples contém seis segmentos transmembrana α -hélice. Entre o quinto e o sexto segmento transmembrana, chamado de domínio do poro, está um laço reentrante do poro, que forma a parte mais estreita do poro. O segmento S1-S4, chamado de domínio sensor-voltagem, cerca o poro e confere a dependência de voltagem para a abertura do canal, sendo que o quarto segmento transmembrana contém múltiplas argininas ⁶ que são as principais responsáveis por detectar estas mudanças no potencial da membrana [48].

⁶Aminoácido que em pH neutro tem carga positiva [55].

canais Kv e HCN

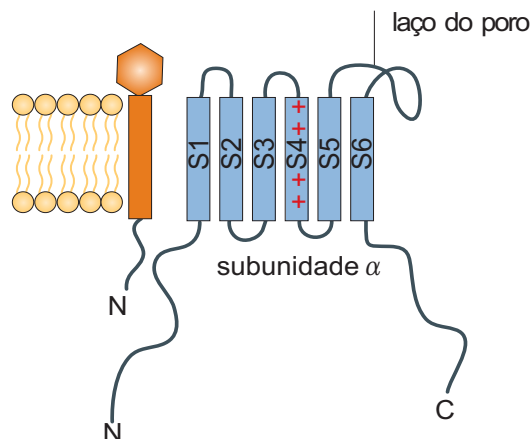


Figura 3.4: Estrutura do canal de K_v . A partir de Lai & Jan, [48].

Um dos canais iônicos mais detalhadamente estudados é o K_v . Em particular pode-se citar o dímero do peptídeo Gramicidina A (GA)⁷, e o canal de potássio KcsA⁸. Nessa seção, serão apresentados alguns detalhes sobre a estrutura do canal de K_v da bactéria *Aeropyrum pernix* (K_vAP).

A estrutura do domínio do poro e do domínio sensor-voltagem de um canal K_vAP foi revelado em recente trabalho de Y. Jiang *et al.* [40]. Entretanto a relação entre esses dois domínios ainda não foi elucidada completamente, mas sabe-se que a mudança na conformação da proteína, que leva a abertura do canal, deve envolver o movimento de grupos de cargas através da membrana. Nesse sentido, foi identificado que o segmento S1-S4 é uma estrutura que gira como um corpo rígido, carregando para fora da célula aproximadamente três cargas elementares por cada segmento S4, acarretando na abertura do canal. Esse movimento vertical para fora da célula, que é consequência de um aumento na voltagem da membrana, compreende uma região de aproximadamente 20 Å. Já o segmento S5-S6 referente ao domínio do poro do K_vAP tem a mesma arquitetura dos outros canais de potássio. Alguns modelos foram criados para a orientação do domínio sensor-voltagem relativo ao domínio do poro nos canais de K_v , e como a conformação e orientação desse

⁷Canal que também é seletivo ao Na^+

⁸Canal proveniente de uma bactéria.

domínio mudam com respeito a despolarização da membrana [73]. Tais modelos podem ser encontrados nos seguintes trabalhos [21], [25], [75].

3.3.3.2 *Corrente através dos Canais*

Para gravar o fluxo da corrente através de um único canal, Neher e Sakmann [64] desenvolveram a técnica de “patch-clamp”. Essa técnica consiste em selar uma pequena área da membrana com um eletrodo de vidro polido, permitindo controlar o valor da voltagem nessa pequena região. Esse controle possibilita a medida direta do fluxo da corrente pelo canal. Se a área selecionada for pequena o suficiente e a densidade de canais for baixa, pode-se controlar a voltagem de apenas um canal, e a abertura e o fechamento deste canal pode ser diretamente monitorado pela medida da corrente unitária [41].

Correntes unitárias de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , além de grupos desses respectivos canais foram analisados. Aparentemente, cada um desses canais abrem e fecham abruptamente e randomicamente, com maior probabilidade de abrir quando a membrana está despolarizada. Se considerarmos uma grande quantidade desses canais, a média desse grupo fornece uma curva suave da corrente que entra na célula, semelhante a corrente macroscópica (toda a célula) descrita em trabalhos como o de Hodgkin e Huxley [41].

Nesse caso o comportamento estocástico da condutância, e os estados aberto e fechado do canal, sugerem uma descrição estocástica do fenômeno ao invés de equações determinísticas.

3.4 **Potencial de Ação**

O potencial de ação (PA) é a mensagem elétrica propagada rapidamente ao longo do axônio do sistema nervoso e sobre a superfície da membrana de muitas células musculares e glandulares. Nos axônios eles são breves, viajam a velocidade constante, e mantém a mesma amplitude. Como todas as mensagens elétricas do

sistema nervoso, o PA é uma mudança no potencial da membrana causada pelo movimento dos íons através dos canais iônicos [29].

Para que as células possam se comunicar é necessário que um sinal do neurônio pré-sináptico seja captado pelo neurônio pós-sináptico. A região em que esse evento acontece é chamada de sinapse, uma fenda que separa as duas células. A fenda sináptica é localizada tanto nos dendritos quanto no soma dos neurônios onde encontramos uma grande concentração de canais iônicos dependente de ligante. Os neurotransmissores liberados pelo neurônio pré-sináptico podem ser excitatórios e inibitórios, assim o balanço espacial e temporal das cargas dos íons, que estão na região somatodendrítica, podem fazer com que ocorra ou não o PA. Caso o potencial não ultrapasse o limiar da membrana, o disparo do neurônio não ocorrerá. Será gerado o PA, se houver uma elevação do potencial que ultrapasse o limiar da membrana, que será iniciada no segmento inicial do axônio (SIA) ou cone de implantação. Conforme descrevemos anteriormente o SIA é uma região de alta densidade de canais iônicos de Na^+ dependente de voltagem. A abertura desses canais em decorrência do aumento do potencial acima do limiar, faz com que os íons Na^+ entrem no citoplasma, a favor do seu gradiente eletroquímico, aumentando ainda mais o potencial da célula e promovendo a inversão da polaridade em seu interior, que passa de um valor negativo para positivo (fase de despolarização) figura 3.5. Em seguida os canais de K^+ abrem gerando um fluxo para fora da célula, a favor do seu gradiente eletroquímico, ao passo que os canais de Na^+ fecham abruptamente cortando sua corrente, fase pela qual o potencial começa a diminuir após um pico máximo (fase de repolarização) até chegar a valores abaixo do potencial de repouso (fase de hiperpolarização). Nessa fase os canais de K^+ , que abrem e fecham mais lentamente que o canal de Na^+ , começam a fechar os seus portões, acarretando em uma estabilização do potencial no seu valor de repouso.

Esse processo percorre por toda a extensão do axônio, pois a fase de despolarização é detectada pelos canais de Na^+ vizinhos fazendo com que os canais abram, reinicializando todas as etapas citadas anteriormente. Quando o sinal chegar no final do axônio, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são ativados causando

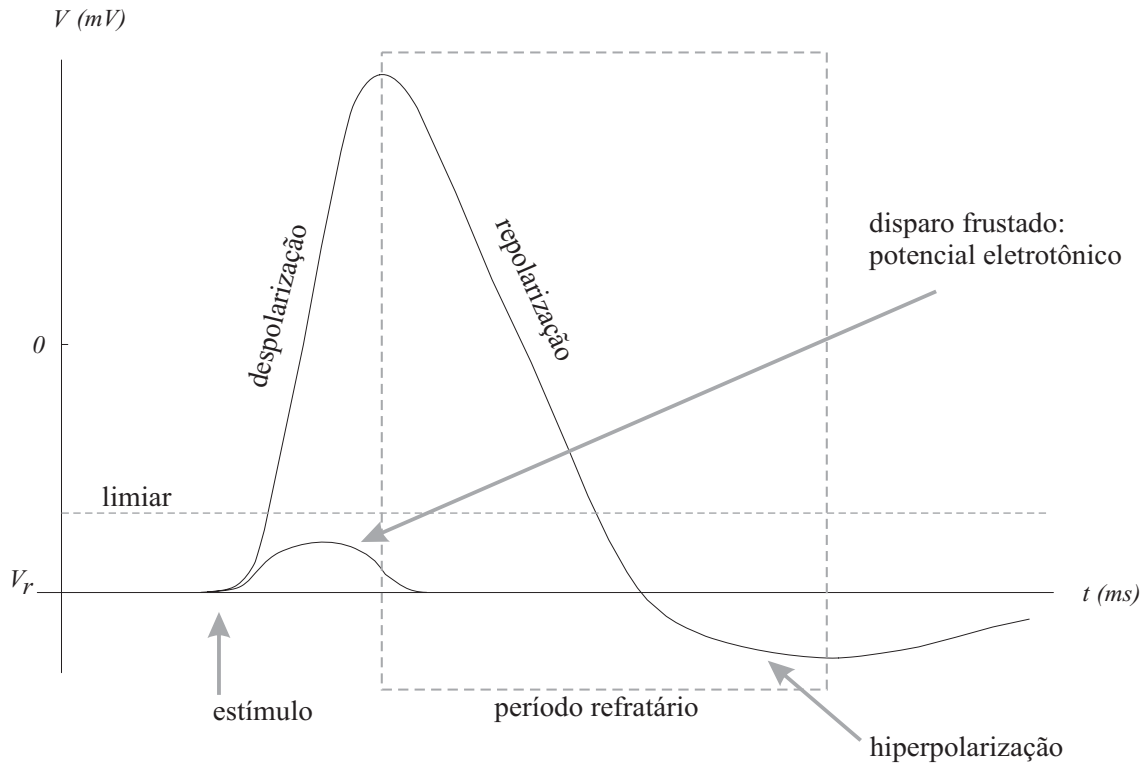


Figura 3.5: Potencial de ação e suas fases

um influxo de íons cálcio acarretando na secreção de neurotransmissores químicos na fenda sináptica estimulando ou inibindo a célula adjacente ⁹.

Nos dendritos, os canais de K_v e os canais de cátion ativado por hiperpolarização (HCN) controlam o PA chamado de “back-propagation”¹⁰. Este PA pode sinalizar a ocorrência de excitação neural recente e influenciar na plasticidade sináptica, levando ao potencial de longa duração (LTP) ou depressão de longa duração (LTD) dependendo do PA (“back-propagation”) relativo às entradas sinápticas. O PA também pode ser gerado localmente nos dendritos, modulando o processamento e integração de entradas sinápticas de ramos de dendritos específicos. A integração sináptica e o padrão resultante do disparo do PA depende da distribuição espacial dos vários canais com diferentes propriedades eletrofisiológicas [48].

⁹Nas células com axônios mielinizados, o PA “pula” entre os nodos de Ranvier para alcançar a extremidade do axônio. Aumentado a sua velocidade de propagação.

¹⁰A propagação do PA para trás no sentido dos dendritos.

4 ASPECTOS DE MODELAGEM MATEMÁTICA

Nesta seção serão apresentados dois desenvolvimentos teóricos que descrevem a interação entre os vários agentes responsáveis pelo transporte de íons dentro dos canais iônicos. Ao contrário dos modelos teóricos da propagação de sinais em células excitáveis, será levado em consideração a estrutura do canal e a interação dos íons com a proteína. As teorias apresentadas não fornecem expressões exatas. Portanto, a análise de suas conseqüências depende fortemente de simulações computacionais.

4.1 Equação de Poisson em Coordenadas Toroidais

Naturalmente, o estudo dos processos de transporte de íons pelos canais da membrana envolve a interação eletromagnética entre os íons, as moléculas de água e os constituintes da membrana, em particular os polipeptídeos que formam o canal.

Em primeira aproximação é comum como considerar a água e a bicamada lipídica como dielétricos macroscópicos, e a natureza do fenômeno como essencialmente eletrostática, no entanto, não há como desconsiderar a estrutura geométrica da proteína que forma um canal iônico.

Mesmo levando em conta essas aproximações, encontrar o perfil do potencial elétrico em qualquer lugar na proteína não é uma tarefa simples. Isto deve-se ao fato de que o perfil é resultado da superposição de potenciais elétricos proveniente de diferentes fontes. Entre as fontes que contribuem para o potencial elétrico no canal estão: (1) o potencial de membrana; (2) resíduos de carga nas paredes protéicas; (3) íons dentro ou na vizinhança do canal; (4) cargas induzidas sobre a parede protéica por estes íons. Ainda deve-se levar em conta que a contribuição relacionada à indução vai depender da posição dos íons no interior do canal [47].

Muitos canais têm aberturas vestibulares similares a uma ampulheta, e constante dielétrica $\varepsilon_p \approx 2$, muito menor que a constante da água $\varepsilon_w \approx 80$, assim

a geometria do canal tem um papel fundamental para determinar a força elétrica aplicada nos íons. Portanto o problema envolve, basicamente, a solução da equação de Poisson em uma geometria apropriada.

Existem muitos sistemas de coordenadas nos quais a equação de Poisson é separável, possibilitando soluções analíticas. No entanto, nenhuma delas pode ser usada para simular uma geometria na forma de ampulheta ou catenária, que melhor se aproxima dos canais biológicos. Assim, na análise do comportamento de canais “realistas”, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos numéricos que aproximem a solução do problema. Um método iterativo que resolve a equação de Poisson em uma geometria qualquer será apresentado no próximo capítulo.

Entre todos os sistemas de coordenadas que a equação de Poisson é separável, o sistema de coordenadas toroidais é o que mais se aproxima de um canal real. Embora esta geometria ofereça uma curvatura, dentro do poro, oposta aos canais biológicos, existem muitas vantagens em obter soluções analíticas. Por exemplo, nas simulações de dinâmica browniana (DB)¹, o potencial elétrico precisa ser calculado muitas vezes, e tal computação é simplesmente inviável caso seja necessário calcular o potencial numericamente a cada passo de tempo. A solução da equação de Poisson em coordenadas toroidais foram baseados nos seguintes trabalhos [39], [47], [53], [60], [62].

A água é tratada como um contínuo e os íons como elementos individuais. Os íons movem-se sob a influência de forças eletrostáticas emanadas de outros íons, cargas fixas, campos elétricos aplicados e contorno dielétrico. Para descrever as interações de longo-alcance entre partículas, será considerada a teoria eletrostática macroscópica, portanto, a constante dielétrica da água é aproximadamente 80. Existe em torno de 500 moléculas de água confinadas em cada vestibulo do canal. Quase certamente a constante dielétrica será menor do que valor mencionado acima. Assim, a constante da água nessa região merece atenção experimental e teórica adicional. Na região estreita do canal, onde o raio é menor que 4-5 Å, as moléculas de água estão ordenadas e não são livres para alinhar com o campo externo. A

¹Que será vista no Capítulo 4

representação da dielétrica como um meio contínuo em tal região não é uma boa aproximação.

A interface água-proteína será modelada como um limite único, rígido e bem definido entre os dielétricos. Na realidade sua superfície é preenchida com cadeias polares e hidrofílicas. Os grupos polares e as moléculas de água perto da interface não são incluídas explicitamente, sendo representadas, nesse modelo, pelo contorno dielétrico. É possível tratar a interface mais precisamente, assumindo que há uma camada fina com constante dielétrica intermediária entre os valores da proteína e da água.

4.1.1 Campo elétrico aplicado

Há duas maneiras de produzir a força que move o íon através do canal: uma diferença de potencial ou um gradiente de concentração entre duas faces do canal. No nível macroscópico estes dois são equivalentes, e estão acoplados pela equação de Nernst-Planck. No nível microscópico, porém, os processos físicos são muito diferentes. Um gradiente de potencial elétrico aplica uma força para todos os íons, fazendo com que adquiram uma velocidade de deslocamento. Um gradiente de concentração não causa forças sobre os íons e nenhuma velocidade de deslocamento médio, mas seu movimento browniano aleatório carrega os íons no sentido do gradiente de concentração.

4.1.2 Geometria do canal

A superfície do canal é formada pela rotação de 360° , ao longo do eixo z , com um círculo fechado. Seu raio é de 40 \AA e o centro é localizado em $x = 44 \text{ \AA}$. O segmento da região mais estreita do canal toroidal tem um raio de 4 \AA e dois vestíbulos distando 40 \AA da linha média². O raio selecionado para o segmento estreito correspondendo ao íon potássio com sua primeira camada de hidratação. O modelo corresponde apenas ao canal e não inclui explicitamente os lipídios da membrana, pois inviabilizaria uma solução analítica no sistemas de coordenadas que

²midline

está sendo proposto. Essas dimensões foram utilizadas para averiguar a validade da solução analítica, que será apresentada a seguir, com um método numérico iterativo. E, conforme [47] oferecem resultados semelhantes do potencial elétrico.

4.1.3 Coordenadas Toroidais

Qualquer ponto dentro e fora do toro, bem como na sua superfície, pode ser representada pelo sistema de coordenadas toroidais $(\mu, \eta, \phi) \in \mathbb{R}_+ \times [0, 2\pi)^2$ relacionadas ao plano cartesiano pelas seguintes equações [62]:

$$\begin{aligned} x &= \frac{a \sinh \mu \cos \phi}{\cosh \mu - \cos \eta}, & y &= \frac{a \sinh \mu \sin \phi}{\cosh \mu - \cos \eta}, \\ z &= \frac{a \sin \eta}{\cosh \mu - \cos \eta}, \end{aligned} \quad (4.1)$$

onde a é um parâmetro positivo³.

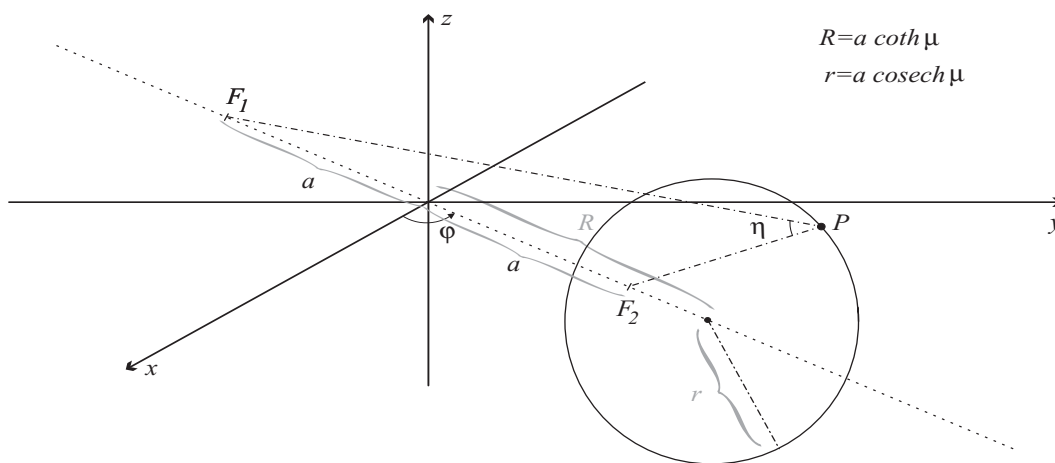


Figura 4.1: Sistema de coordenadas toroidais. Um toro é gerado pela rotação de dois círculos pela rotação de 360° ao longo do eixo z . Um ponto P qualquer do espaço pode ser definido por (μ, η, ϕ) .

De acordo com a figura 4.1, seja $\overline{PF_1}$ a distância do ponto P ao ponto focal F_1 , e $\overline{PF_2}$ a distância do ponto P ao ponto focal F_2 . A coordenada μ é definida como $\log(\overline{PF_1}/\overline{PF_2})$. A superfície dada por $\mu = \mu_1$ constante é o toro de raio menor $r = a \operatorname{cosech} \mu_1$ e raio maior $R = a \operatorname{coth} \mu_1$ no plano $z = 0$ e centro na origem. A

³Uma vez fixada o valor de a , o sistema de coordenadas está definido. No entanto, para qualquer escolha válida de a , o sistema representa todo o \mathbb{R}^3 .

coordenada η é definida pelo ângulo F_1PF_2 . Dado um μ fixo, η traça um círculo de raio fixo r conforme ele percorre o seu intervalo. A coordenada ϕ é o ângulo azimutal sobre o eixo de simetria z .

No plano $y = 0$, o círculo que descreve a superfície toroidal irá cruzar o eixo positivo x duas vezes, em x_1 quando $\eta = 0$ e em x_2 quando $\eta = \pi$. Assim o raio r do toro está relacionado com as coordenadas toroidais pela expressão

$$\begin{aligned} x_1 - x_2 &= \frac{a \sinh \mu_1}{\cosh \mu_1 - 1} - \frac{a \sinh \mu_1}{\cosh \mu_1 + 1} \\ &= \frac{2a \sinh \mu_1}{\cosh^2 \mu_1 - 1} = \frac{2a}{\sinh \mu_1} = 2r. \end{aligned} \quad (4.2)$$

Similarmente, a distância da origem ao centro do toro R pode ser expressa em termos da coordenada toroidal como

$$\begin{aligned} R = x_2 + \frac{x_1 - x_2}{2} &= a \left(\frac{a \sinh \mu_1}{\cosh \mu_1 + 1} + \frac{1}{\sinh \mu_1} \right) \\ &= a \frac{\cosh \mu_1}{\sinh \mu_1} = a \coth \mu_1. \end{aligned} \quad (4.3)$$

Assim, conforme η muda de 0 a 2π , a constante μ_1 descreve um círculo de raio menor, $r = a/\sinh \mu_1$, centrado no raio maior $R = a \coth \mu_1$. Pela rotação dos dois círculos ao redor do eixo perpendicular z , uma geometria toroidal será gerada. Para $\mu = 0$, tanto r quanto R são infinitos, e o círculo será o eixo z . No limite oposto, $\mu \rightarrow \infty$, $R = a$ e $r = 0$, e o toro representará um anel de raio a ao redor do eixo z .

4.1.4 Soluções das Equações de Laplace e Poisson

O Laplaciano para uma função escalar φ é um operador diferencial definido por

$$\Delta\varphi = \frac{1}{h_1 h_2 h_3} \left[\frac{\partial}{\partial u_1} \left(\frac{h_2 h_3}{h_1} \frac{\partial}{\partial u_1} \right) + \frac{\partial}{\partial u_2} \left(\frac{h_1 h_3}{h_2} \frac{\partial}{\partial u_2} \right) + \frac{\partial}{\partial u_3} \left(\frac{h_1 h_2}{h_3} \frac{\partial}{\partial u_3} \right) \right] \varphi,$$

onde h_i para $i = 1, 2, 3$ são os fatores de escala do sistema de coordenada, definido por

$$h_i = \sqrt{\sum_{k=1}^n \left(\frac{\partial x_k}{\partial q_i} \right)^2}, \quad (4.4)$$

para uma parametrização $x_1 = f_1(q_1, q_2, \dots, q_n)$, $x_2 = f_2(q_1, q_2, \dots, q_n)$, \dots , $x_m = f_m(q_1, q_2, \dots, q_n)$. Portanto os fatores de escala referente as relações de (4.4) serão

$$\begin{aligned} h_\mu = h_\eta &= \frac{a}{\cosh \mu - \cos \eta}, \\ h_\phi &= \frac{a \sinh \mu}{\cosh \mu - \cos \eta}. \end{aligned} \quad (4.5)$$

Portanto, a equação de Laplace em coordenadas toroidais é

$$\begin{aligned} &csch \eta (\cosh \mu - \cos \eta)^3 \left[\frac{\partial}{\partial \mu} \left(\frac{\sinh \eta}{\cosh \mu - \cos \eta} \frac{\partial}{\partial \mu} \right) \right. \\ &+ \left. \frac{\partial}{\partial \eta} \left(\frac{\sinh \eta}{\cosh \mu - \cos \eta} \frac{\partial}{\partial \eta} \right) + \frac{\partial}{\partial \phi} \left(\frac{csch \eta}{\cosh \mu - \cos \eta} \frac{\partial}{\partial \phi} \right) \right] \varphi = 0, \end{aligned} \quad (4.6)$$

e a solução é dado em termos das funções trigonométricas η e ϕ , e os harmônicos toroidais (Funções de Legendre de primeira e segunda espécies) $P_{n-1/2}^m(\cosh \mu)$ e $Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu)$. A solução mais geral pode ser escrita como

$$\begin{aligned} \varphi &= f(\mu, \eta) \sum_{n=0}^{\infty} \sum_{m=0}^{\infty} [A_{nm} Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu) + B_{nm} P_{n-1/2}^m(\cosh \mu)] \\ &\times \cos n(\eta - \eta_{nm}) \cos m(\phi - \phi_{nm}), \end{aligned} \quad (4.7)$$

onde

$$f(\mu, \eta) = \sqrt{\cosh \mu - \cos \eta}, \quad (4.8)$$

e os coeficientes A_{nm} , B_{nm} , η_{nm} , ϕ_{nm} serão determinados pelas condições de contorno.

O potencial devido a uma carga pontual q em $r_0 = (\mu_0, \eta_0, \phi_0)$ é dado por [62]

$$\begin{aligned} \frac{q}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_0|} &= \frac{q}{\pi a} f(\mu, \eta) f(\mu_0, \eta_0) \sum_{n=0}^{\infty} \sum_{m=0}^{\infty} (2 - \delta_{n0})(2 - \delta_{m0}) \\ &\times \frac{\Gamma(n - m + 1/2)}{\Gamma(n + m + 1/2)} \cos n(\eta - \eta_0) \cos m(\phi - \phi_0) \\ &\times \begin{cases} P_{n-1/2}^m(\cosh \mu) Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu_0) & \text{se } \mu < \mu_0 \\ Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu) P_{n-1/2}^m(\cosh \mu_0) & \text{se } \mu > \mu_0. \end{cases} \end{aligned} \quad (4.9)$$

A troca das soluções em μ reflete o fato de $P_{n-1/2}^m$ divergir com $\mu \rightarrow \infty$ e $Q_{n-1/2}^m$ divergir com $\mu \rightarrow 0$. A solução da equação de Poisson para uma

carga pontual fora do toro $\mu = \mu_1 > \mu_0$, com constantes dielétricas ε_1 fora e ε_2 dentro do toro, podem ser encontradas superpondo os potenciais nas equações (4.7) e (4.9). Normalmente, em tais problemas de valor de contorno, as soluções ϕ são separáveis, e as fases ϕ_{nm} em (4.7) devem ser coerentes com ϕ_0 , então $\phi_{nm} = \phi_0$ para todo n, m . O mesmo argumento, no entanto, não vale para as soluções η . Pois na raiz quadrada do fator f na equação (4.8), existe um acoplamento entre coeficientes diferentes, e as fases η_{nm} não são necessariamente coerentes com η_0 . Esta é uma característica distintiva das coordenadas toroidais, e complica as soluções dos problemas eletrostáticos em comparação com outros sistemas de coordenadas. Após levantar estas questões, os potenciais superpostos podem ser escritos como

$$\begin{aligned}\varphi_{in} &= f(\mu, \eta) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=0}^{\infty} A_{nm} Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu) \\ &\quad \times \exp[in(\eta - \eta'_{nm})] \cos m(\phi - \phi_0), \\ \varphi_{out} &= f(\mu, \eta) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=0}^{\infty} \{B_{nm} P_{n-1/2}^m(\cosh \mu) \exp[in(\eta - \eta''_{nm})] \\ &\quad + C_{nm} Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu) \exp[in(\eta - \eta_0)] \cos m(\phi - \phi_0)\},\end{aligned}\quad (4.10)$$

onde

$$\begin{aligned}C_{nm} &= \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{q}{\pi a} f(\mu_0, \eta_0) (2 - \delta_{m0}) \frac{\Gamma(n - m + 1/2)}{\Gamma(n + m + 1/2)} \\ &\quad \times P_{n-1/2}^m(\cosh \mu_0),\end{aligned}\quad (4.11)$$

são coeficientes constantes. Em (4.10), foi usado a relação $\mu > \mu_0$ para a carga pontual equação (4.9). Também foram substituídos os cossenos com exponenciais pelas soluções η , pois isso simplifica a equivalência na fronteira.

Aplicando a condição de contorno em $\mu = \mu_1$,

$$\varphi_{in} = \varphi_{out}, \quad \varepsilon_2 \frac{\partial \varphi_{in}}{\partial \cosh \mu} = \varepsilon_1 \frac{\partial \varphi_{out}}{\partial \cosh \mu},\quad (4.12)$$

obtém-se as seguintes equações para todo m :

$$\begin{aligned}&\sum_{n=-\infty}^{\infty} A_{nm} Q \exp[in(\eta - \eta'_{nm})] \\ &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} [B_{nm} P \exp[in(\eta - \eta''_{nm})] \\ &+ C_{nm} Q \exp[in(\eta - \eta_0)]],\end{aligned}\quad (4.13)$$

$$\begin{aligned}
& \varepsilon_2 \sum_{n=-\infty}^{\infty} A_{nm} (fQ' + f'Q) \exp[in(\eta - \eta'_{nm})] \\
&= \varepsilon_1 \sum_{n=-\infty}^{\infty} [B_{nm} (fP' + f'P) \exp[in(\eta - \eta''_{nm})] \\
&+ C_{nm} (fQ' + f'Q) \exp[in(\eta - \eta_0)]] .
\end{aligned} \tag{4.14}$$

Aqui foram introduzidas as seguintes notações para as constantes, $P = P_{n-1/2}^m(\cosh \mu_1)$, $Q = Q_{n-1/2}^m(\cosh \mu_1)$ e $f = f(\mu_1, \eta)$. Similarmente, os apóstrofes em P, Q , e f denotam as derivadas com respeito ao $\cosh \mu$ avaliados em $\mu = \mu_1$. Estas equações podem ser simplificadas mais uma vez pela introdução dos coeficientes complexos

$$\begin{aligned}
A'_{nm} &= A_{nm} \exp[-in\eta'_{nm}], & B'_{nm} &= B_{nm} \exp[-in\eta''_{nm}], \\
C'_{nm} &= C_{nm} \exp[-in\eta_0].
\end{aligned} \tag{4.15}$$

Substituindo os coeficientes acima em (4.13) e (4.14) obtém-se

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} A'_{nm} Q \exp[in\eta] = \sum_{n=-\infty}^{\infty} [B'_{nm} P + C'_{nm} Q] \exp[in\eta], \tag{4.16}$$

$$\begin{aligned}
& \varepsilon_2 \sum_{n=-\infty}^{\infty} A'_{nm} (fQ' + f'Q) \exp[in\eta] \\
&= \varepsilon_1 \sum_{n=-\infty}^{\infty} [B'_{nm} (fP' + f'P) \exp[in\eta] \\
&+ C'_{nm} (fQ' + f'Q) \exp[in\eta]].
\end{aligned} \tag{4.17}$$

A equação (4.16) vale para cada n , e assim pode ser resolvida para B'_{nm} em termos de A'_{nm} :

$$B'_{nm} = (A'_{nm} - C'_{nm} Q) / P. \tag{4.18}$$

Substituindo B'_{nm} em (4.17) e agrupando os termos similares, tem-se

$$\begin{aligned}
& \sum_{n=-\infty}^{\infty} A'_{nm} [\varepsilon_2 (fQ' + f'Q) - \varepsilon_1 (fP' + f'P) Q / P] \exp[in\eta] \\
&= \varepsilon_1 \sum_{n=-\infty}^{\infty} C'_{nm} f (Q' - P' Q / P) \exp[in\eta].
\end{aligned} \tag{4.19}$$

Usando $f' = \frac{1}{2}f$ e substituindo na expressão $f(\mu, \eta) = \sqrt{\cosh \mu_1 - \cos \eta}$, a equação (4.19) pode ser escrita na seguinte forma

$$\begin{aligned}
& 2 (\cosh \mu_1 - \cos \eta) \sum_{n=-\infty}^{\infty} A'_{nm} (\varepsilon_2 Q' - \varepsilon_1 P' Q/P) \exp[in\eta] \\
& + (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \sum_{n=-\infty}^{\infty} A'_{nm} Q \exp[in\eta] \\
& = 2\varepsilon_1 (\cosh \mu_1 - \cos \eta) \sum_{n=-\infty}^{\infty} C'_{nm} (Q' - P' Q/P) \exp[in\eta]. \quad (4.20)
\end{aligned}$$

Note que os fatores $\cos \eta$ implicam um acoplamento dos coeficientes vizinhos, então a equação (4.20) não pode ser resolvida trivialmente. Nesse caso, a análise de Fourier das séries na equação (4.20) em η resulta na seguinte expressão

$$\begin{aligned}
& \sum_{n=-\infty}^{\infty} \{ [2 \cosh \mu_1 (\varepsilon_2 Q' - \varepsilon_1 P' Q/P) + (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) Q] \delta_{n',n} \\
& - (\varepsilon_2 Q' - \varepsilon_1 P' Q/P) (\delta_{n',n+1} + \delta_{n',n-1}) \} A'_{nm} \\
& = \varepsilon_1 \sum_{n=-\infty}^{\infty} C'_{nm} (Q' - P' Q/P) [2 \cosh \mu_1 \delta_{n',n} \\
& - (\delta_{n',n+1} + \delta_{n',n-1})]. \quad (4.21)
\end{aligned}$$

Introduzindo os seguintes coeficientes,

$$\begin{aligned}
E_n^m &= (\varepsilon_2 Q' - \varepsilon_1 P' Q/P) A'_{nm} \\
q_n^m &= 2 \cosh \mu_1 + \frac{(\varepsilon_2 - \varepsilon_1) Q}{\varepsilon_2 Q' - \varepsilon_1 P' Q/P} \\
\lambda_n^m &= \varepsilon_1 (Q' - P' Q/P) C'_{nm}, \quad (4.22)
\end{aligned}$$

tem-se a seguinte equação em diferenças de segunda ordem para os coeficientes E_n^m :

$$E_{n+1}^m - q_n^m E_n^m + E_{n-1}^m = \lambda_{n+1}^m - 2 \cosh \mu_1 \lambda_n^m + \lambda_{n-1}^m. \quad (4.23)$$

As partes real e imaginária desta equação devem ser satisfeitas separadamente, levando a duas equações em diferenças, através das equações (4.15) e (4.22), determina tanto a amplitude A_{nm} quanto a fase η'_{nm} .

4.1.5 Solução da Equação em Diferenças

A seguir será apresentado os principais passos para a solução da equação (4.23). Por conveniência, o sobrescrito m será suprimido, mas a mesma equação tem que ser resolvida para cada valor de m . A função de Green correspondente a equação (4.23) satisfaz

$$G_{n+1,N} - q_n G_{n,N} + G_{n-1,N} = \delta_{n,N+1} - 2 \cosh \mu_1 \delta_{n,N} + \delta_{n,N-1}, \quad (4.24)$$

para cada valor de N . As soluções da equação (4.23) são dadas por

$$E_n = \sum_{N=-\infty}^{\infty} G_{n,N} \lambda_N, \quad (4.25)$$

como pode ser verificado substituindo a equação (4.25) em (4.23) e usando a equação (4.24) [53]. Para construir a função de Green, primeiro acha-se as soluções da equação homogênea,

$$G_{n+1,N} - q_n G_{n,N} + G_{n-1,N} = 0, \quad (4.26)$$

e depois é implementado as “condições de contorno” impostas em (4.24). As duas soluções independentes de (4.26) podem ser encontradas pelo estudo da sua forma assintótica com $|n| \rightarrow \infty$. Nesse limite, $q \rightarrow 2 \cosh \mu_1$, e a razão $G_{n+1,N}/G_{n,N}$ das soluções tendem a $\exp(\pm \mu_1)$. Destes resultados, que podem ser vistos com detalhes no trabalho [60], é possível construir as soluções da equação (4.26)

$$\begin{aligned} \frac{G_{n+1,N}}{G_{n,N}} &= \frac{1}{q_{n+1} - \frac{1}{q_{n+2} - \frac{1}{q_{n+3} - \dots}}} \equiv \alpha_{n+1}, \\ \frac{G_{n-1,N}}{G_{n,N}} &= \frac{1}{q_{n-1} - \frac{1}{q_{n-2} - \frac{1}{q_{n-3} - \dots}}} \equiv \beta_{n-1}. \end{aligned} \quad (4.27)$$

A equação (4.27) pode ser escrita como relação de recorrência entre α_n e β_n :

$$\alpha_n = \frac{1}{q_n - \alpha_{n+1}}, \quad \beta_n = \frac{1}{q_n - \alpha_{n-1}}, \quad (4.28)$$

que provê um método simples para seus cálculos de modo iterativo. Pelas propriedades de simetria de $P_{n-1/2}^m$, $Q_{n-1/2}^m$ e suas derivadas, segue que $q_{-n} = q_n$ na equação (4.22). Usando este fato em (4.28), verifica-se que $\alpha_n = \beta_{-n}$, e portanto apenas

um conjunto de coeficientes precisam ser calculados. Reescrevendo a equação (4.27) como

$$\begin{aligned} G_{n+1,N} &= \alpha_{n+1}G_{n,N}, & n \geq N+1 \\ G_{n-1,N} &= \beta_{n-1}G_{n,N}, & n \leq N-1, \end{aligned} \quad (4.29)$$

$G_{n,N}$ pode ser determinado de (4.29) recursivamente, uma vez que $G_{N+1,N}$ e $G_{N-1,N}$ são especificados. Para calcular essas duas quantidades, usa-se as “condições de contorno” de (4.24) em $n = N-1, N, N+1$, que resulta nas seguintes equações:

$$\begin{aligned} (\beta_{N-2} - q_{N-1})G_{N-1,N} + G_{N,N} &= 1 \\ G_{N-1,N} - q_N G_{N,N} + G_{N+1,N} &= -2 \cosh \mu_1 \\ G_{N,N} + (\alpha_{N+2} - q_{N+1})G_{N+1,N} &= 1, \end{aligned} \quad (4.30)$$

onde foi substituído $G_{N-2,N} = \beta_{N-2}G_{N-1,N}$ e $G_{N+2,N} = \alpha_{N+2}G_{N+1,N}$ da equação (4.29). A solução do conjunto de equações lineares em (4.30) resulta em

$$\begin{aligned} G_{N-1,N} &= \frac{(2 \cosh \mu_1 - q_N)\beta_{N-1}}{q_N - \alpha_{N+1} - \beta_{N-1}} \\ G_{N,N} &= \frac{(2 \cosh \mu_1 - \alpha_{N+1} - \beta_{N-1})}{q_N - \alpha_{N+1} - \beta_{N-1}} \\ G_{N+1,N} &= \frac{(2 \cosh \mu_1 - q_N)\alpha_{N+1}}{q_N - \alpha_{N+1} - \beta_{N-1}}. \end{aligned} \quad (4.31)$$

Substituindo as equações (4.29) e (4.31) na equação (4.25), finalmente é obtido o coeficiente E_n ,

$$\begin{aligned} E_n &= \sum_{N=-\infty}^{\infty} \frac{\lambda_N}{(q_N - \alpha_{N+1} - \beta_{N-1})} \\ &\times \left\{ (2 \cosh \mu_1 - \alpha_{N+1} - \beta_{N-1})\delta_{n,N} + (2 \cosh \mu_1 - q_N) \right. \\ &\times \left. \left[\Theta(n-N) \prod_{k=N+1}^n \alpha_k + \Theta(N-n) \prod_{k=n}^{N-1} \beta_k \right] \right\}. \end{aligned} \quad (4.32)$$

onde $\Theta(x)$ é a função degrau, isto é, $\Theta(x) = 1$ se $x > 0$, e 0 caso contrário.

Deve ser enfatizado que as equações eletrostáticas que foram apresentadas descrevem meramente os fenômenos no nível macroscópico e, conforme será visto no próximo capítulo, falham quando analisado microscopicamente. Implícita nas equações de Laplace e Poisson, está a suposição de que os íons podem ser idealizados como cargas pontuais e o dielétrico pode ser representado como um meio contínuo [47]. A solução analítica para a equação de Poisson em uma geometria toroidal é um primeiro passo para o estudo da dinâmica do transporte de íons em canais transmembrana, pois é utilizada em simulações da permeação de íons. Mesmo que a solução represente uma situação em que o íon encontra-se em uma posição fixa no sistema.

Na seção seguinte será apresentado a mecânica estatística do equilíbrio em canais iônicos, que também é uma descrição formal de um sistema estático. Mas é de importância fundamental para uma futura mecânica estatística de não-equilíbrio.

4.2 Mecânica Estatística do Equilíbrio em Canais Iônicos

O avanço das ferramentas computacionais vem impulsionando a computação de sistemas complexos. Com isso, crescem as possibilidades de desenvolver simulações que levam em conta todos os átomos envolvidos na passagem de íons por um canal. Assim, mesmo com suas limitações, as simulações com dinâmica molecular (DM)⁴ estão se tornando cada vez mais freqüentes. Nesse sentido, desenvolvimentos teóricos são fundamentais para melhor entender e aperfeiçoar tais ferramentas. A DM pode ser usada para simular canais iônicos em equilíbrio, portanto, uma formulação estatística é a alternativa mais adequada para formalizar esse sistema. Nessa seção será descrita a mecânica estatística do equilíbrio para canais iônicos seletivos, conforme os seguintes desenvolvimentos teóricos [68], [69], [70], [71].

⁴Que será visto no próximo capítulo

4.2.1 Descrição do Sistema Biológico

Para a descrição do sistema biológico, considera-se um canal iônico que transpassa a membrana lipídica em solução salina. A solução eletrolítica não é simétrica, e existe um potencial de Nernst através da membrana. Assume-se que o canal é passivamente permeável a apenas uma espécie iônica e permanece no estado aberto sem potencial de ação. Nem um outro íon pode passar através do canal ou da membrana. Essa é uma extensão direta do conceito de membrana semipermeável, que é obrigatório para a existência de um potencial de Nernst [29], [68]. Outra consideração sobre o sistema é a possibilidade de identificar uma região chamada de "poro", da qual são excluídas todas as espécies de íons não permeantes, e outra região chamada de "solução" ⁵, que contém a solução eletrolítica. Conforme a ilustração na Figura 4.2.

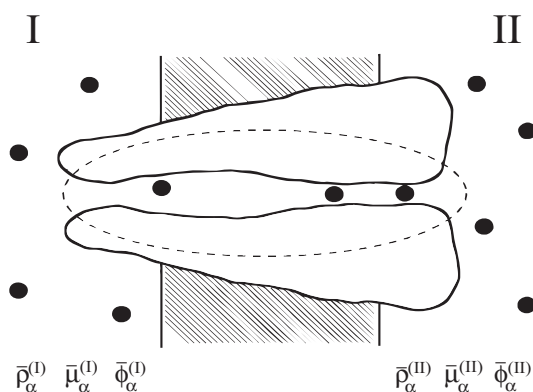


Figura 4.2: Sistema microscópico. A região do poro é a parte interna da elipse tracejada e a região da solução é a parte externa. Diagrama construído a partir de Roux, [69].

4.2.2 Descrição Estatística do Sistema Biológico

Inicialmente serão descritas as propriedades estatísticas do sistema formado por uma membrana semipermeável e duas regiões preenchidas por soluções eletrolíticas e separadas pela membrana. As propriedades estatísticas são obtidas a partir do ensemble grande canônico formado por um conjunto enumerável de sis-

⁵bulk

temas idênticos capazes de trocar energia e partículas entre si. O objetivo dessa abordagem é desenvolver uma relação entre as densidades dos íons permeantes na duas soluções eletrolíticas separadas pela membrana sem detalhes sobre a sua estrutura interna. Essa relação será utilizada mais adiante em um modelo mais detalhado para a membrana.

Será considerado o ensemble grande canônico em que os sistemas são constituídos por duas soluções eletrolíticas compostas por 2 espécies de íons com cargas de sinal contrário, imersos em um dielétrico contínuo (água). As soluções são contidas em duas regiões delgadas $\Omega_I, \Omega_{II} \subset \mathbb{R}^3$ adjuntas às faces de uma membrana plana permeável a apenas uma das espécies de íons, por simplicidade a espécie 1. Além do mais, considera-se um ensemble que permita flutuações da espécie 1 apenas.

De acordo com a estatística do ensemble, uma configuração formada pelos $N_s^{(i)} \in \mathbb{N}$ íons da espécie i contidos em Ω_s , cujas posições $\mathbf{r}_{s,1}^{(i)}, \dots, \mathbf{r}_{s,N_s^{(i)}}^{(i)}$ são agrupadas na $N_s^{(i)}$ -upla $R_s^{(i)} = \{\mathbf{r}_{s,1}^{(i)}, \mathbf{r}_{s,2}^{(i)}, \dots, \mathbf{r}_{s,N_s^{(i)}}^{(i)}\} \in \Omega_s^{N_s^{(i)}}$, $s = I, II$, $i = 1, 2$, possui probabilidade

$$\frac{1}{\Xi} \left(\frac{1}{N_I^{(1)}! N_{II}^{(1)}!} e^{-\beta(\mu_I N_I^{(1)} + \mu_{II} N_{II}^{(1)})} e^{-\beta \mathcal{H}(\{R_I^{(j)}, R_{II}^{(j)}\}_{j=1}^2)} \right), \quad (4.33)$$

onde μ_I, μ_{II} são os potenciais químicos da espécie 1 em Ω_I e Ω_{II} respectivamente, $\beta = \frac{1}{k_B T}$ é o “inverso da temperatura” (devido à constante de Boltzmann, k_B , β^{-1} possui unidade de energia) e \mathcal{H} é o funcional energia de uma configuração de íons distribuídos de acordo com os vetores posição. A medida de probabilidade é normalizada pela “grande função de partição” Ξ ⁶,

$$\Xi = \sum_{N_I^{(1)}=0}^{\infty} \sum_{N_{II}^{(1)}=0}^{\infty} \frac{e^{-\beta(\mu_I N_I^{(1)} + \mu_{II} N_{II}^{(1)})}}{N_I^{(1)}! N_{II}^{(1)}!} \int_{\Omega_I^{N_I^{(1)}}} dR_I^{(1)} \dots \int_{\Omega_{II}^{N_{II}^{(1)}}} dR_{II}^{(2)} e^{-\beta \mathcal{H}}. \quad (4.34)$$

A partir da grande função de partição pode-se calcular o valor médio $\langle N_s^{(1)} \rangle_{\Xi}$ do número de íons da espécie 1 contidos na região Ω_s , $s = I, II$, de acordo com a estatística do ensemble. Por definição, o valor médio é calculado a partir da

⁶por simplicidade, estamos supondo que as componentes dos vetores posição são números, i. e, não possuem unidades de medida.

soma

$$\begin{aligned} \langle N_s^{(1)} \rangle_{\Xi} &= \frac{1}{\Xi} \sum_{N_I^{(1)}=0}^{\infty} \sum_{N_{II}^{(1)}=0}^{\infty} N_s^{(1)} \frac{e^{-\beta(\mu_I N_I^{(1)} + \mu_{II} N_{II}^{(1)})}}{N_I^{(1)}! N_{II}^{(1)}!} \\ &\times \int_{\Omega_I^{N_I^{(1)}}} dR_I^{(1)} \cdots \int_{\Omega_{II}^{N_{II}^{(1)}}} dR_{II}^{(2)} e^{-\beta\mathcal{H}} \end{aligned} \quad (4.35)$$

que em termos da grande função de partição pode ser escrita como

$$\langle N_s^{(1)} \rangle_{\Xi} = -\frac{1}{\beta} \frac{\partial}{\partial \mu_s} \ln \Xi. \quad (4.36)$$

No limite termodinâmico a relação entre as densidades dos íons permeáveis em cada uma das regiões pode ser calculado a partir da expressão acima. Para tanto, deve-se dispor de uma forma exata para a grande função de partição Ξ . A principal dificuldade nessa tarefa envolve a forma do funcional \mathcal{H} .

O funcional energia da configuração é decomposto na soma de duas partes, o termo $U \left(\{R_I^{(i)}, R_{II}^{(i)}\}_{i=1}^2 \right)$,

$$U \left(\{R_I^{(i)}, R_{II}^{(i)}\}_{i=1}^2 \right) = \sum_{s \in \{I, II\}} \sum_{i=1}^2 \sum_{\mathbf{r} \in R_s^{(i)}} q^{(i)} \Phi(\mathbf{r}), \quad (4.37)$$

onde $q^{(i)}$ é a carga do i -ésimo íon e Φ é solução da equação de Poisson para a distribuição de cargas concentradas na posição dada pelos vetores dos conjuntos $R_s^{(i)}$. E o outro termo $\Psi \left(\{R_I^{(i)}, R_{II}^{(i)}\}_{i=1}^k \right)$ também de origem coulombiana mas associado à distribuição dos elétrons em torno de cada íon. Ψ é formado por uma soma de potenciais de dois corpos repulsivos mas de curto alcance. Esse termo impede o colapso de íons de carga oposta.

Dada a forma dos termos U e Ψ , a tarefa de obter a expressão exata para Ξ é extraordinariamente complexa. No entanto, é possível propor algumas simplificações que sejam capazes de capturar as propriedades principais do sistema. Inicialmente, considera-se que a contribuição para o potencial devido a distribuições de cargas externas é constante em Ω_I e Ω_{II} , o que equivale ao caso em que a distribuição de cargas externas é neutra e todas as demais contribuições da expansão multipolar são desprezíveis. Nessa situação, o valor do funcional é dominado

pela contribuição formada pela distribuição das cargas excedentes pelas duas faces da membrana que age como um capacitor plano e estabelece uma diferença de potencial entre as duas regiões. Como estamos interessados no limite termodinâmico desse ensemble, será considerada a forma do potencial coulombiano de um capacitor plano de placas paralelas. Assim, atribuindo o valor constante 0 para o potencial na região intermediária entre as duas faces da membrana, o potencial na região Ω_I será dado por

$$\Phi(\mathbf{r}) = \frac{q^{(1)}}{4C} \left(\left(N_{II}^{(1)} - N_{II}^{(2)} \right) - \left(N_I^{(1)} - N_I^{(2)} \right) \right), \quad \mathbf{r} \in \Omega_I, \quad (4.38)$$

onde C é a capacitância da membrana, definida por

$$C = \epsilon \frac{A}{d}, \quad (4.39)$$

onde ϵ é a permissividade elétrica da membrana, d a sua espessura e $A = \frac{1}{\epsilon} |\Omega_I| = \frac{1}{\epsilon} |\Omega_{II}|$ é a área da superfície de uma face da membrana, por simplicidade, considera-se que o volume da região adjacente às faces da membrana onde as cargas se encontram possui volume $A\epsilon$. O potencial na região Ω_{II} possui expressão análoga.

Em resumo, será utilizada a seguinte forma para o potencial Φ ,

$$\Phi(\mathbf{r}) = \begin{cases} \frac{q}{4C} \left(\left(N_{II}^{(1)} - N_{II}^{(2)} \right) - \left(N_I^{(1)} - N_I^{(2)} \right) \right) & , \mathbf{r} \in \Omega_I \\ -\frac{q}{4C} \left(\left(N_{II}^{(1)} - N_{II}^{(2)} \right) - \left(N_I^{(1)} - N_I^{(2)} \right) \right) & , \mathbf{r} \in \Omega_{II} \end{cases}. \quad (4.40)$$

De acordo com a forma do potencial, a contribuição do potencial Φ em uma configuração do sistema é calculada pela expressão U ,

$$\begin{aligned} U &= \frac{1}{2} \left(\sum_{\mathbf{r} \in R_I^{(1)}} q^{(1)} \Phi(\mathbf{r}) + \sum_{\mathbf{r} \in R_I^{(2)}} q^{(2)} \Phi(\mathbf{r}) + \sum_{\mathbf{r} \in R_{II}^{(1)}} q^{(1)} \Phi(\mathbf{r}) + \sum_{\mathbf{r} \in R_{II}^{(2)}} q^{(2)} \Phi(\mathbf{r}) \right) \\ &= -\frac{(q^{(1)})^2}{8C} \left(\left(N_I^{(1)} - N_I^{(2)} \right) - \left(N_{II}^{(1)} - N_{II}^{(2)} \right) \right)^2 \\ &= -\frac{(q^{(1)})^2}{8C} \left(-2\Delta\mathcal{N}N_I^{(1)} + 2\Delta\mathcal{N}N_{II}^{(1)} - 2N_I^{(1)}N_{II}^{(1)} + \right. \\ &\quad \left. \Delta\mathcal{N}^2 + \left(N_I^{(1)} \right)^2 + \left(N_{II}^{(1)} \right)^2 \right) \end{aligned} \quad (4.41)$$

onde $\Delta\mathcal{N} = N_I^{(2)} - N_{II}^{(2)}$ é a constante dada pela diferença entre o número de íons da espécie 2 entre as faces da membrana.

As contribuições de curto alcance não podem ser ignoradas, já que U (4.40) possui os termos $\left(N_I^{(1)}\right)^2$ e $\left(N_{II}^{(2)}\right)^2$ que prejudicam a somabilidade da grande função de partição Ξ . Uma condição suficiente para a existência do limite termodinâmico é a “estabilidade do potencial”, ou seja, dada uma configuração qualquer com N elementos, a somabilidade da grande função de partição estará garantida se $\mathcal{H} \geq -kN$, onde k é uma constante não negativa. Para que o funcional energia de configuração seja estável, Ψ deve possuir a seguinte forma para uma configuração com $N_I^{(1)}$ íons de espécie 1 em Ω_I e $N_{II}^{(1)}$ íons de espécie 1 em Ω_{II} ,

$$\Psi(\{R_I^{(i)}, R_{II}^{(i)}\}_{i=1,2}) = \frac{(q^{(1)})^2}{8C} \left(N_I^{(1)} - N_{II}^{(1)}\right)^2. \quad (4.42)$$

De acordo com essa escolha para os funcionais Φ e Ψ , a energia de uma configuração $\{R_I^{(i)}, R_{II}^{(i)}\}_{i=1,2}$ de íons é dada por

$$\mathcal{H} = -\frac{q^2}{8C} (\Delta\mathcal{N}^2 - 2\Delta\mathcal{N} (N_I - N_{II})), \quad (4.43)$$

onde os índices (1) foram omitidos para aliviar a notação.

Essa escolha para o funcional \mathcal{H} desacopla as variáveis espaciais na grande função de partição de modo que as integrais lá presentes serão iguais ao volume das regiões. Introduzindo a nova variável $\mathcal{N} = N_I^{(2)} + N_{II}^{(2)}$, a grande função de partição assume a forma

$$\begin{aligned} \Xi &= e^{\frac{\beta q^2}{8C} \Delta\mathcal{N}^2} |\Omega|^{\mathcal{N}} \sum_{N_I=0}^{\infty} |\Omega|^{N_I} \frac{\exp\left[-\beta\left(\mu_I + \frac{q^2}{4C}\Delta\mathcal{N}\right)N_I\right]}{N_I!} \times \\ &\times \sum_{N_{II}=0}^{\infty} |\Omega|^{N_{II}} \frac{\exp\left[-\beta\left(\mu_{II} - \frac{q^2}{4C}\Delta\mathcal{N}\right)N_{II}\right]}{N_{II}!}. \end{aligned} \quad (4.44)$$

As somas são independentes e correspondem à função exponencial,

$$\Xi = e^{\frac{\beta q^2}{8C} \Delta\mathcal{N}^2} |\Omega|^{\mathcal{N}} \exp\left[|\Omega|e^{-\beta\left(\mu_I + \frac{q^2}{4C}\Delta\mathcal{N}\right)}\right] \exp\left[|\Omega|e^{-\beta\left(\mu_{II} - \frac{q^2}{4C}\Delta\mathcal{N}\right)}\right]. \quad (4.45)$$

A partir da grande função de partição e de (4.36) pode-se obter os números médio de ocupação,

$$\langle N_I \rangle_{\Xi} = e^{-\beta \left(\mu_I + \frac{q^2}{4C} \Delta \mathcal{N} \right)} \quad (4.46)$$

e

$$\langle N_{II} \rangle_{\Xi} = e^{-\beta \left(\mu_{II} - \frac{q^2}{4C} \Delta \mathcal{N} \right)}. \quad (4.47)$$

Tomando o limite termodinâmico $|\Omega|, C, N_1^{(2)}, N_2^{(2)} \rightarrow \infty$ e mantendo as seguintes razões constantes,

$$\frac{\Delta \mathcal{N}}{C} = \frac{\varpi}{c}, \quad \frac{N_I}{|\Omega|} = \bar{\rho}_I \quad \text{e} \quad \frac{N_{II}}{|\Omega|} = \bar{\rho}_{II}, \quad (4.48)$$

onde $\bar{\rho}_I$ e $\bar{\rho}_{II}$ são as densidades médias dos íons de espécie 1 na região das faces da membrana; c é a capacitância por unidade de área e ϖ é diferença entre as densidades de íons de espécie 2 nas duas faces multiplicada pela espessura ε da região adjacente às faces da membrana que contém os íons. Assim, a relação entre as densidades é dada por

$$\frac{\bar{\rho}_I}{\bar{\rho}_{II}} = \frac{e^{-\beta \left(\mu_I + \frac{q^2}{4C} \Delta \mathcal{N} \right)}}{e^{-\beta \left(\mu_{II} - \frac{q^2}{4C} \Delta \mathcal{N} \right)}} = \frac{e^{-\beta \mu_I}}{e^{-\beta \left(\mu_{II} - \frac{q^2}{2c} \varpi \right)}}. \quad (4.49)$$

É comum encontrar na literatura [68], [69], [71], a definição dos termos μ_1, μ_2 como “potenciais químicos intrínsecos” e os termos $\mu_I + \frac{q^2}{4c} \varpi$ e $\mu_{II} - \frac{q^2}{4c} \varpi$ como “potenciais químicos em excesso”, simbolizados por $\bar{\mu}_I$ e $\bar{\mu}_{II}$ respectivamente. Será adotado os mesmos símbolos no restante deste capítulo, então

$$\bar{\mu}_I \doteq \mu_I + \frac{q^2}{4c} \varpi \quad (4.50)$$

e

$$\bar{\mu}_{II} \doteq \mu_{II} - \frac{q^2}{4c} \varpi. \quad (4.51)$$

Os potenciais químicos intrínsecos μ_1, μ_2 , surgem de interações locais do íon com as partículas ao seu redor no reservatório, e $\frac{q^2}{4c} \varpi$ é o potencial eletrostático na solução eletrolítica. O valor do potencial químico em excesso corresponde

aproximadamente a combinação do modelo de solvatação de Born [10] com a teoria de Debye-Hückel [23] para as soluções eletrolíticas. O primeiro depende da constante dielétrica do solvente e o último depende da força iônica da solução de sal [59].

De acordo com a mesma estatística, a média da diferença de potencial entre as duas faces da membrana é dada por

$$\langle \Phi(\mathbf{r}_{II}) - \Phi(\mathbf{r}_I) \rangle_{\Xi} = \frac{q}{2C} \left(\langle N_I^{(1)} \rangle_{\Xi} - \langle N_{II}^{(1)} \rangle_{\Xi} - N_I^{(2)} + N_{II}^{(2)} \right) \quad (4.52)$$

e no limite termodinâmico, define-se a diferença de potencial média, V ,

$$V = \lim_{|\Omega| \nearrow \infty} \langle \Phi(\mathbf{r}_{II}) - \Phi(\mathbf{r}_I) \rangle_{\Xi} = \frac{q\varepsilon}{2c} (\bar{\rho}_I - \bar{\rho}_{II}) - \frac{q}{2c} \varpi. \quad (4.53)$$

Na situação em que $\mu_I = \mu_{II}$, segue de (4.49) que a razão entre as densidades está relacionada à ϖ por

$$\varpi = -\frac{2c}{\beta q^2} \ln \frac{\bar{\rho}_I}{\bar{\rho}_{II}} \quad (4.54)$$

que aplicada à expressão para a diferença de potencial V conduz a uma forma que depende apenas das densidades dos íons permeantes e das características da membrana,

$$V = \frac{1}{\beta q} \ln \frac{\bar{\rho}_I}{\bar{\rho}_{II}} + \frac{q\varepsilon}{2c} (\bar{\rho}_I - \bar{\rho}_{II}). \quad (4.55)$$

Levando em conta os valores típicos para membranas biológicas (c da ordem de $10^{-6} F/cm^2$, ε da ordem de $10^{-10} m$ e temperatura T da ordem de $300K$), o termo $\frac{q\varepsilon}{2c} (\bar{\rho}_I - \bar{\rho}_{II})$, em valor absoluto, é três ordens de grandeza menor do que o termo $\frac{1}{\beta q} \ln \frac{\bar{\rho}_I}{\bar{\rho}_{II}}$, o que permite obter a forma do potencial de Nernst,

$$V \approx V_{Nernst} = \frac{1}{\beta q} \ln \frac{\bar{\rho}_I}{\bar{\rho}_{II}}. \quad (4.56)$$

O restante desta seção segue o desenvolvimento sugerido por Roux em [69],[68] e [71].

4.2.2.1 Probabilidade de ocupação e Potencial de Força Média

Nesta subseção, a estrutura interna da membrana será levada em conta na estatística para o sistema. O objetivo é construir um ensemble grande canônico

para a ocupação dos poros. O ponto de partida é um ensemble canônico em que o número de íons em cada lado da membrana é fixo.

A energia potencial total do sistema é $\mathcal{H}(\{R, \mathbf{X}\})$ onde $R = \{\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N\} \in \mathcal{R}$ é a N -upla formada pelos vetores posição dos N íons permeantes. De modo semelhante, a variável $\mathbf{X} = \{\mathbf{X}_i, \mathbf{X}_w, \mathbf{X}_l, \mathbf{X}_c\} \in \mathcal{U}$ contém informação sobre os graus de liberdade (por exemplo, posição e estado interno) de todos os demais elementos que constituem o sistema, subdivida em

1. \mathbf{X}_i : íons não permeantes;
2. \mathbf{X}_w : moléculas de água;
3. \mathbf{X}_l : moléculas de lipídio;
4. \mathbf{X}_c : canal iônico;

onde $\mathcal{R} = \Omega^N$ é o espaço de configurações dos íons permeantes e \mathcal{U} é o espaço de configurações de todos os demais elementos.

Os íons permeáveis podem ser transportados de um lado para o outro, no entanto os íons não permeáveis não podem intercambiar entre os lados 1 e 2 da membrana. Como o número desses íons $N^{(S)}$ são fixos em cada lado da membrana, suas configurações são restritas ao lado em que esses íons estão localizados; ao invés dos íons permeantes cujo espaço de configurações é todo o volume do sistema.

Seja a união disjunta da região do poro Ω_p e a região da solução eletrolítica $\Omega_s = \Omega/\Omega_p$, então definimos o número total de íons permeáveis dentro do poro em uma configuração $R \in \mathcal{R}$, como $\nu(R)$

$$\nu(R) = \int_{\Omega_p} d\mathbf{z} \sum_{\mathbf{r} \in R} \delta(\mathbf{z} - \mathbf{r}), \quad (4.57)$$

onde \mathbf{r}_i é a posição do i -ésimo íon.

A probabilidade de ter exatamente n íons no poro é calculado pela média,

$$P_n = \langle \delta_{n, \nu(\cdot)} \rangle = \frac{\int_{\Omega} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} \delta_{n, \nu(R)} e^{-\beta\mathcal{H}}}{\int_{\Omega} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta\mathcal{H}}}, \quad (4.58)$$

onde $\delta_{n,\nu(R)}$ é a função delta de Kronecker discreta definida por

$$\delta_{n,\nu(R)} = \begin{cases} 1 & \text{se } n = \nu(R) \\ 0 & \text{caso contrário.} \end{cases} \quad (4.59)$$

Por construção, as probabilidades P_n são normalizadas, isto é, $\sum_{n=1}^N P_n = 1$, devido a completude da delta de Kronecker. Segue que a média sobre qualquer observável A pode ser expressa como uma soma sobre os estados de ocupação do canal,

$$\langle A \rangle_p = \sum_{n=1}^N P_n \langle A \rangle_{p,(n)}, \quad (4.60)$$

onde $\langle A \rangle_{p,(n)}$ é a média de A quando exatamente n íons estão dentro da região do poro. No limite termodinâmico, $N \rightarrow \infty$, e a estatística obtida é a de um ensemble grande canônico associado à ocupação do poro.

Para determinar a probabilidade de ocupação, é útil considerar o fator de ligação B_n ,

$$B_n \doteq \frac{P_n}{P_0}. \quad (4.61)$$

Para $n = 1$, tem-se

$$B_1 = \frac{\int_{\Omega} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} \delta_{1,\nu(R)} e^{-\beta\mathcal{H}}}{\int_{\Omega} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} \delta_{0,\nu(R)} e^{-\beta\mathcal{H}}}, \quad (4.62)$$

como o valor da delta de Kronecker é zero ao menos que um dos N íons esteja dentro do poro, o fator de ligação pode ser reescrito da seguinte maneira

$$B_1 = N \frac{\int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_2 \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} \delta_{1,\nu(R)} e^{-\beta\mathcal{H}}}{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} \delta_{0,\nu(R)} e^{-\beta\mathcal{H}}}, \quad (4.63)$$

e similarmente o fator de ligação para n -íons é

$$B_n = \frac{N!}{n!(N-n)!} \times \frac{\int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_n \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_{n+1} \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta\mathcal{H}}}{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta\mathcal{H}}}. \quad (4.64)$$

Os termos N e $\frac{N!}{n!(N-n)!}$ são de origem combinatória e levam em conta as diferentes maneiras de obter uma configuração com 1 íon e n íons na região do poro, respectivamente, quando dispomos de N íons permeantes.

Portanto o fator de ligação de 1-íon pode ser expresso por

$$B_1 = N \frac{\int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 e^{-\beta W(r_1)}}{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_1 e^{-\beta W(r_1)}}, \quad (4.65)$$

onde $W(r_1)$ é o potencial de força média (PFM) com um íon dentro do poro. O PFM corresponde ao trabalho necessário para adiabaticamente mover um íon na região do poro. Sua primeira derivada é igual ao valor negativo da força média exercida sobre um íon pelo canal, água, os outros íons, e a membrana. Isto é, $\langle F \rangle = -\nabla W(r_1)$. Nesse sentido, o PFM não é igual a energia potencial média mas a energia livre. Para ter uma relação simples com o potencial químico em excesso do íon no reservatório, o PFM relativo a um sistema com um íon, sem interação com as demais forças, será definido por

$$e^{-\beta W(r_1)} = \frac{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_2 \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta \mathcal{H}}}{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_2 \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta \mathcal{H}_1^*}}, \quad (4.66)$$

onde \mathcal{H}_1^* significa que todas as interações envolvendo o íon 1 com o resto do sistema foram desligadas. Note que por construção, $W(\mathbf{r}_1) \rightarrow \bar{\mu}_s$ conforme \mathbf{r}_1 se distancia da região do poro. E a integral sobre o reservatório é

$$\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_1 e^{-\beta W(r_1)} = |\Omega_I| e^{-\beta \bar{\mu}_I} + |\Omega_{II}| e^{-\beta \bar{\mu}_{II}} \quad (4.67)$$

$$\begin{aligned} &= \frac{N}{\bar{\rho}_I} e^{-\beta \bar{\mu}_I} \\ &= \frac{N}{\bar{\rho}_{II}} e^{-\beta \bar{\mu}_{II}}, \end{aligned} \quad (4.68)$$

pois $N = |\Omega_I| \bar{\rho}_I + |\Omega_{II}| \bar{\rho}_{II}$ e $e^{-\beta \bar{\mu}_{II}} = (\bar{\rho}_{II}/\bar{\rho}_I) e^{-\beta \bar{\mu}_I}$. Logo,

$$\begin{aligned} B_1 &= \bar{\rho}_I \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 e^{-\beta [W(r_1) - \bar{\mu}_I]} \\ &= \bar{\rho}_{II} \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 e^{-\beta [W(r_1) - \bar{\mu}_{II}]}. \end{aligned} \quad (4.69)$$

Similarmente, o fator de ligação de n -íon é

$$B_n = (\bar{\rho}_I)^n \frac{1}{n!} \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 \cdots \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_n e^{-\beta [W(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) - n\bar{\mu}_I]}, \quad (4.70)$$

onde o PFM de n -íon é definido por

$$e^{-\beta W(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)} = \frac{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_{n+1} \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta \mathcal{H}}}{\int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_{n+1} \cdots \int_{\Omega_s} d\mathbf{r}_N \int_{\mathcal{U}} d\mathbf{X} e^{-\beta \mathcal{H}_{1, \dots, n}^*}}, \quad (4.71)$$

onde $\mathcal{H}_{1,\dots,n}^*$ significa que todas as interações envolvendo os íons $1, \dots, n$ com o resto do sistema foram desligados.

Uma vez determinados os fatores de ligação, a probabilidade de qualquer estado de ocupação pode ser obtida diretamente deles. Pois segundo a definição de fator de ligação (4.61) e levando em conta a normalização das probabilidades dos estados de ocupação $\sum_{n=0}^{\infty} P_n = 1$, tem-se que P_0 e os fatores estão relacionados por

$$\sum_{n=0}^{\infty} B_n = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{P_n}{P_0} = \frac{1}{P_0}. \quad (4.72)$$

Então substituindo a expressão para P_0 dada por (4.72) na expressão para P_n , em termos dos fatores B_n , obtém-se a seguinte expressão para a probabilidade de ocupação com n íons,

$$P_n = P_0 B_n = \frac{B_n}{1 + B_1 + B_2 + B_3 + \dots}. \quad (4.73)$$

E em particular, a probabilidade do poro estar desocupado é

$$P_0 = \frac{1}{1 + B_1 + B_2 + B_3 + \dots}. \quad (4.74)$$

Os denominadores das equações (4.73) e (4.74) podem ser expressos na forma de um ensemble grande canônico para um sistema finito, aberto, e em contato com um banho de partículas,

$$\Xi = \sum_{n=0}^{\infty} e^{n\beta\bar{\mu}_I} (\bar{\rho}_I)^n \frac{1}{n!} \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_1 \dots \int_{\Omega_p} d\mathbf{r}_n e^{-\beta W(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)}. \quad (4.75)$$

Para qualquer canal real, a probabilidade de ocupação deve ser zero a partir de um N_{Max} , o número máximo de íons que pode ser ocupado pelo poro simultaneamente. Um caso particularmente importante é quando o poro não pode ser ocupado por mais de um íon ao mesmo tempo [49], [58]. Nesse caso, os fatores de ligação $B_2 = B_3, \dots = 0$, e a probabilidade de encontrar um íon dentro do poro é

$$P_1 = \frac{B_1}{1 + B_1}. \quad (4.76)$$

4.2.2.2 *Influência do Potencial de Membrana*

Os desenvolvimentos feitos até aqui descrevem a situação mais geral possível, com soluções assimétricas e um potencial de Nernst na membrana. Soluções simétricas sem potencial na membrana correspondem a um caso particularmente importante.

As propriedades do sistema no equilíbrio, em uma situação geral, pode ser expressa em termos de uma contribuição dominante correspondente a solução simétrica sem potencial na membrana, somada a outras contribuições associadas ao potencial transmembrana. Para explicitar essa decomposição, convém separar o sistema entre as regiões do poro Ω_p e da solução Ω_s e representar os graus de liberdade associados aos elementos contidos na região poro por \mathbf{X}_p (que inclui íons, canal e água) e os demais por \mathbf{X}_s . O principal propósito dessa separação é a possibilidade de utilizar uma eletrostática do contínuo para descrever a influência do potencial transmembrana na região do poro. Por simplicidade, o desenvolvimento a seguir será elaborado para o PFM de 1-íon, embora o tratamento pode ser facilmente generalizado para o PFM de n -íons de maneira análoga ao desenvolvimento da subseção anterior.

O subsistema é constituído pelo íon, o canal, e um número fixo m de moléculas do solvente mais próximas na região do poro. Grau de liberdade $\mathbf{X}_p = \{\mathbf{r}_1, \mathbf{X}_{w/p}, \mathbf{X}_c\} \in \Omega_p \times \mathcal{U}_p$ e $\mathbf{X}_s = \{\mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n, \mathbf{X}_t, \mathbf{X}_{w/s}\} \in \mathcal{U}_s$ onde

1. $\mathbf{X}_{w/p}$: m moléculas do solvente na região do poro;
2. $\mathbf{X}_{w/s}$: moléculas do solvente na região da solução;
3. \mathbf{X}_t : íons não permeantes;

\mathcal{U}_p é o espaço das possíveis configurações dos elementos que formam o poro e m moléculas do solvente, e \mathcal{U}_s é o espaço das configurações dos demais íons permeantes, não permeantes e as das demais moléculas de solvente.

De acordo com a escolha anterior, a energia potencial total \mathcal{H} de uma configuração pode ser escrita como a soma de três contribuições, $\mathcal{H} = \mathcal{H}_p(\mathbf{X}_p) +$

$\mathcal{H}_{ps}(\mathbf{X}_p, \mathbf{X}_s) + \mathcal{H}_s(\mathbf{X}_s)$, onde $\mathcal{H}_p(\mathbf{X}_p)$ é a contribuição dada pelos elementos na região do poro, $\mathcal{H}_{ps}(\mathbf{X}_p, \mathbf{X}_s)$ é a contribuição dada pela interação entre os elementos contidos na região do poro e os demais elementos na solução, e $\mathcal{H}_s(\mathbf{X}_s)$ é a contribuição dada pela interação entre os elementos contidos na solução.

Assim, em uma configuração fixa, a energia livre do íon e do subsistema no potencial da membrana é [6]

$$e^{-\beta F(\mathbf{X}_p)} = \frac{\int_{\mathcal{U}_s} d\mathbf{X}_s \mathbf{1}_{\Omega_p}(\mathbf{X}_s) e^{-\beta[\mathcal{H}_p(\mathbf{X}_p) + \mathcal{H}_{ps}(\mathbf{X}_p, \mathbf{X}_s) + \mathcal{H}_s(\mathbf{X}_s)]}}{\int_{\mathcal{U}_s} d\mathbf{X}_s e^{-\beta \mathcal{H}_s(\mathbf{X}_s)}}, \quad (4.77)$$

onde $\mathbf{1}_{\Omega_p}(\cdot)$ é uma espécie de função característica para a região do poro, i. e., $\mathbf{1}_{\Omega_p}(\mathbf{X}_s) = 0$ se alguma das variáveis espaciais que determinam a posição dos íons permeantes, não permeantes e todas as demais $m + 1, m + 2, \dots$ moléculas de água estiverem na região do poro Ω_p ; e $\mathbf{1}_{\Omega_p}(\mathbf{X}_s) = 1$ caso contrário.

No caso geral, a energia livre depende das concentrações nos lados I e II

$$F(\mathbf{X}_p) = F(\mathbf{X}_p; \bar{\rho}_I, \bar{\rho}_{II}), \quad (4.78)$$

e no caso simétrico, sem potencial de membrana temos

$$F_s(\mathbf{X}_p) = F(\mathbf{X}_p; \bar{\rho}_I = \bar{\rho}_{II} = \bar{\rho}). \quad (4.79)$$

O potencial transmembrana é resultado de uma interação eletrostática de longo alcance devido a um pequeno desequilíbrio das cargas líquidas, envolvendo os íons móveis do reservatório nos dois lados da membrana. Para descrever a sua influência no PFM, é necessário usar alguma aproximação. Uma possível abordagem é utilizar a eletrostática do contínuo baseada na equação de PB modificada para levar em conta o potencial de equilíbrio de Nernst,

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r})] - \bar{\kappa}^2(\mathbf{r}) [\phi(\mathbf{r}) - V \Theta(\mathbf{r})] = -4\pi \lambda \rho_p(\mathbf{r}), \quad (4.80)$$

onde $\Theta(\mathbf{r})$ é a função degrau igual a um no lado II e zero caso contrário, $\bar{\kappa}^2$ é o fator de Debye, $\rho_p(\mathbf{r})$ é a densidade de carga do poro e λ é o parâmetro de acoplamento.

Uma expressão para a energia livre $F(\mathbf{X}_p)$ do subsistema baseado na equação (4.80) é

$$F(\mathbf{X}_p) = \mathcal{H}_p(\mathbf{X}_p) + F_{cav} + \frac{1}{2} CV^2 + \left[\sum_p q_p \phi_{mp}(\mathbf{r}_p) \right] V + \frac{1}{2} \left[\sum_p q_p \phi_{rf}(\mathbf{r}_p) \right], \quad (4.81)$$

onde o primeiro termo é a energia do poro, o segundo termo é a energia livre associada com a criação de uma cavidade para inserir um subsistema neutro na membrana, o terceiro termo é a energia livre associada a capacitância do sistema, o quarto termo representa a interação das cargas da proteína com o potencial da membrana (calculada com $\lambda = 0$ e $V = 1$)

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \phi_{mp}(\mathbf{r})] - \bar{\kappa}^2(\mathbf{r}) [\phi_{mp}(\mathbf{r}) - \Theta(\mathbf{r})] = 0, \quad (4.82)$$

e o quinto termo representa o campo de reação devido ao solvente. O campo de reação é computado como a diferença entre o potencial ϕ do ambiente e o vácuo, isto é $\phi_{rf} = \phi(amb) - \phi(vac)$, onde ϕ é a solução da equação de PB padrão sem potencial de membrana ($\lambda = 1$ e $V = 0$):

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r})] - \bar{\kappa}^2(\mathbf{r}) \phi(\mathbf{r}) = -4\pi\lambda\rho_p(\mathbf{r}). \quad (4.83)$$

A contribuição da capacitância é muito pequena, portanto pode ser ignorada no presente caso. O termo da cavidade é independente do potencial da membrana e é aproximadamente proporcional a área da superfície exposta do solvente.

Conforme as equações (4.71) e (4.77) o PFM de um íon pode ser expresso como

$$e^{-\beta W(\mathbf{r}_1)} = \frac{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F(\mathbf{X}'_p)}}{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F^*(\mathbf{X}'_p)}}, \quad (4.84)$$

onde a notação F^* significa que todas as interações envolvendo o íon com todos os átomos do sistema (reservatório e poro) foram desligados. No caso geral, o PFM é $W(\mathbf{r}_1)$ e depende sobre todas as condições do sistema. No caso especial de uma solução eletrolítica simétrica e sem potencial de membrana, o PFM é $W^0(\mathbf{r}_1)$, que será chamado de PFM intrínseco. Assim, procura-se uma expressão para a diferença $W(\mathbf{r}_1) - W^0(\mathbf{r}_1)$,

$$\begin{aligned} e^{-\beta[W(\mathbf{r}_1) - W^0(\mathbf{r}_1)]} &= \frac{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F(\mathbf{X}'_p)}}{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F^*(\mathbf{X}'_p)}} \times \frac{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F_s^*(\mathbf{X}'_p)}}{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F_s(\mathbf{X}'_p)}} \\ &= \frac{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F(\mathbf{X}'_p)}}{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F_s(\mathbf{X}'_p)}} \times \frac{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F_s^*(\mathbf{X}'_p)}}{\int_{\Omega_p \times \mathcal{U}_p} d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F^*(\mathbf{X}'_p)}} \\ &= \langle e^{-\beta \Delta F} \rangle_{(F_s; \mathbf{r}_1)} \times \langle e^{-\beta \Delta F^*} \rangle_{(F_s^*)}^{-1}, \end{aligned} \quad (4.85)$$

onde $\Delta F = F - F_s$ e $\Delta F^* = F^* - F_s^*$ são as contribuições da energia livre em excesso causadas pela assimetria relativa ao sistema simétrico. E

$$\langle \cdots \rangle_{(F_s; \mathbf{r}_1)} \equiv \frac{\int d\mathbf{X}'_p \cdots \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F_s(\mathbf{X}'_p)}}{\int d\mathbf{X}'_p \delta(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}'_1) e^{-\beta F_s(\mathbf{X}'_p)}}, \quad (4.86)$$

com o íon fixo em \mathbf{r}_1 , onde F_s é a energia livre de um sistema simétrico. Uma expressão similar pode ser apresentada para a energia livre F_s^* .

Agora as energias livres em excesso ΔF_s e ΔF_s^* podem ser avaliadas. A formação da cavidade F_{cav} não tem contribuição, pois é independente do potencial da membrana. Além disso, caso a blindagem iônica da solução seja a mesma em ambos os lados da membrana, conforme o potencial transmembrana é aplicado, a energia livre do campo de reações, que surge de interações eletrostáticas de longo alcance entre as cargas no poro e o ambiente, não contribui para a energia livre em excesso. Segue que

$$\begin{aligned} \Delta F(\mathbf{X}_p) &= V \left[\sum_p q_p \phi_{mp}(\mathbf{r}_p) \right] \\ &= V \left[q_1 \phi_{mp}(\mathbf{r}_1) + \sum_{p>1} q_p \phi_{mp}(\mathbf{r}_p) \right], \end{aligned} \quad (4.87)$$

similarmente

$$\Delta F^*(\mathbf{X}_p) = V \left[\sum_{p>1} q_p \phi_{mp}(\mathbf{r}_p) \right]. \quad (4.88)$$

É possível expressar o PFM da energia livre em excesso como uma série de potências do potencial de membrana V

$$\langle e^{-\beta \Delta F} \rangle = e^{-\beta \langle \Delta F \rangle + \beta^2 [\langle \Delta F^2 \rangle - \langle \Delta F \rangle^2] / 2 + \dots}, \quad (4.89)$$

tal expansão em cumulantes não requer que as perturbações sejam pequenas, e se torna uma boa aproximação caso os termos de ordem mais altas possam ser desprezados.

Pela equação (4.85) o PFM de 1-íon é

$$W(\mathbf{r}_1) = W^{(0)}(\mathbf{r}_1) + W^{(1)}(\mathbf{r}_1) + W^{(2)}(\mathbf{r}_1) + \dots \quad (4.90)$$

onde o termo de primeira ordem é

$$\begin{aligned}
W^{(1)}(\mathbf{r}_1) &= \langle \Delta F \rangle_{(F_s; \mathbf{r}_1)} - \langle \Delta F \rangle_{(F_s^*)} \\
&= V [q_1 \phi_{mp}(\mathbf{r}_1) + , \\
&\quad \left. \left\langle \sum_{p>1} q_p \phi_{mp}(\mathbf{r}_p) \right\rangle_{(F_s; \mathbf{r}_1)} - \left\langle \sum_{p>1} q_p \phi_{mp}(\mathbf{r}_p) \right\rangle_{(F_s^*)} \right] \quad (4.91)
\end{aligned}$$

fornecendo a expressão para o PFM.

O desenvolvimento teórico desta seção fornece uma aproximação para a energia livre total de uma proteína-canal com uma configuração fixa, imerso em uma membrana e submetido a uma voltagem externa [71]. A mecânica estatística do equilíbrio, bem como a equação de Poisson desenvolvida anteriormente, são válidas para sistemas em que o diâmetro do poro for maior que 10 Å. No entanto, conforme será abordado na próxima seção, tratar a eletrostática como um meio contínuo não fornece bons resultados em canais estreitos.

5 CONSIDERAÇÕES SOBRE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Os dados cristalográficos sobre a disposição dos átomos nos canais de potássio, sódio, cloreto e cálcio têm sido combinados com simulações computacionais para explorar as relações entre estrutura e função nos canais iônicos. Essas simulações permitem apreciar os aspectos dinâmicos do sistema íons-proteína-membrana que não podem ser observados diretamente pela biologia estrutural.

A necessidade da integração entre os dados biológicos e métodos computacionais, torna-se evidente devido à grande quantidade de agentes envolvidos na dinâmica desses fenômenos. As simulações fornecem uma poderosa ferramenta para testar algumas hipóteses sobre as interações físico-químicas no comportamento dos íons e das moléculas de água na região interna do poro, que é diferente quando esses íons encontram-se fora do canal.

Tipicamente, as proteínas dos canais iônicos contêm milhares de átomos que somados aos conteúdos nas bicamadas lipídicas e nos eletrólitos, constituem um sistema muito grande para uma descrição fundamental. Frente a tal complexidade, a resposta mais comum é procurar um modelo mínimo que, ao menos qualitativamente, descreva os fenômenos observados no sistema. Se a formulação for bem sucedida, tal modelo fenomenológico representa uma ferramenta muito significativa para desenvolvimentos futuros pois, (1) provê uma estrutura simples para o entendimento e interpretação dos dados experimentais, (2) pode ser usado para fazer previsões futuras sobre o comportamento do sistema sobre diferentes condições, e (3) oferece uma ponte natural entre as observações experimentais e uma abordagem teórica mais fundamental. Um modelo fenomenológico necessariamente contém parâmetros livres que normalmente são ajustados aos dados disponíveis. Naturalmente, a determinação desses parâmetros a partir de uma teoria mais fundamental, concede ao modelo um status mais respeitado. No entanto, a tarefa de descrever o comportamento de sistemas complexos a partir de primeiros princípios pode ser impossível [45]. Neste capítulo serão abordados os principais modelos que simulam a permeação de íons, bem como as vantagens e limitações que cada teoria oferece.

Aplicações desses modelos nos canais gramicidina A e KcsA também serão consideradas.

5.1 Eletrostática nos Canais Iônicos

Uma componente chave na modelagem de canais é a força elétrica agindo no íon, que, em última instância, é responsável pela condutância dos canais [44]. Na eletrostática do contínuo, água, proteínas de membrana e bicamada lipídica são tratados como meios contínuos com constantes dielétricas uniformes. Assume-se que a fronteira entre a água e a proteína é bem definida. Uma vez que a posição das cargas fixas na proteína e os íons móveis na água são especificados, o potencial φ e o campo elétrico \mathbf{E} agindo nos íons são determinados pela solução da equação de Poisson

$$\varepsilon_0 \nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \varphi(\mathbf{r})] = -\rho_{el}(\mathbf{r}) - \rho_{ex}(\mathbf{r}) - \sigma(\mathbf{r}), \quad (5.1)$$

com condições de contorno

$$\varphi_1 = \varphi_2, \quad \varepsilon_1 \nabla \varphi_1 \cdot \hat{\mathbf{n}} = \varepsilon_2 \nabla \varphi_2 \cdot \hat{\mathbf{n}}, \quad (5.2)$$

onde os subscritos 1 e 2 referem-se ao valor limite das variáveis em cada lado da fronteira, ε é a permissividade relativa, ε_0 é a permissividade do vácuo, $\rho_{el}(\mathbf{r})$ é a densidade de carga de origem iônica, $\rho_{pr}(\mathbf{r})$ é a densidade de carga na proteína, $\sigma(\mathbf{r})$ é a densidade de carga na superfície da membrana e $\hat{\mathbf{n}}$ é o vetor normal unitário a superfície.

A permissividade relativa $\varepsilon(\mathbf{r})$ é dada pela expressão

$$\varepsilon(\mathbf{r}) = \begin{cases} \varepsilon_p & \text{se } \mathbf{r} \in (\text{proteína ou membrana}) \\ \varepsilon_w & \text{caso contrário} \end{cases}$$

onde a água é representada por $\varepsilon_w \sim 80$, e a proteína/lipídio por $\varepsilon_p \sim 2$. Esses são os valores tipicamente usados nos estudos do contínuo de biomoléculas, mas ainda não foi estabelecido se esses valores são apropriados para o estudo dos canais.

É possível obter expressões exatas para o potencial na região dos canais iônicos se admitirmos que a geometria dos mesmos pode ser convenientemente

descrita em coordenadas toroidais.¹ [44]. Para uma geometria geral, sem impor qualquer simetria tanto na forma do canal, quanto na posição dos íons, resolve-se a equação (5.1) aplicando o método desenvolvido por Levitt [50], que será apresentado brevemente nesse trabalho.

A equação (5.2) pode ser expressa em termos do campo elétrico \mathbf{E} como

$$\varphi_1 = \varphi_2, \quad \varepsilon_1 \mathbf{E}_1 \cdot \hat{\mathbf{n}} = \varepsilon_2 \mathbf{E}_2 \cdot \hat{\mathbf{n}}. \quad (5.3)$$

A descontinuidade do campo elétrico através do contorno da geometria pode ser representada pela densidade de carga polarizada, σ , induzida na superfície. Dividindo a geometria do canal em segmentos infinitesimais de área s_i , tem-se pela lei de Gauss que em cada segmento de área na posição \mathbf{r}' , pode-se representar a diferença entre os campos elétricos como

$$(\mathbf{E}_1(\mathbf{r}') - \mathbf{E}_2(\mathbf{r}')) \cdot \hat{\mathbf{n}}(\mathbf{r}') = \frac{\sigma(\mathbf{r}')}{\varepsilon_0}. \quad (5.4)$$

Assim o campo elétrico pode ser escrito como

$$\mathbf{E}_1(\mathbf{r}') = \mathbf{E}_{ex}(\mathbf{r}') + \frac{\sigma(\mathbf{r}')}{2\varepsilon_0} \hat{\mathbf{n}}(\mathbf{r}'), \quad \mathbf{E}_2(\mathbf{r}') = \mathbf{E}_{ex}(\mathbf{r}') - \frac{\sigma(\mathbf{r}')}{2\varepsilon_0} \hat{\mathbf{n}}(\mathbf{r}'), \quad (5.5)$$

onde \mathbf{E}_{ex} é a parte devido a todas as cargas exceto aquelas no segmento s_i . Eliminando \mathbf{E}_2 das equações (5.3), (5.4) e substituindo \mathbf{E}_1 da equação (5.5), obtém-se a relação entre a densidade de carga na superfície e o campo externo,

$$\sigma(\mathbf{r}') = 2\varepsilon_0 \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_1}{\varepsilon_2 + \varepsilon_1} \mathbf{E}_{ex}(\mathbf{r}') \cdot \hat{\mathbf{n}}(\mathbf{r}'). \quad (5.6)$$

Na equação (5.6), $\mathbf{E}_{ex} \cdot \hat{\mathbf{n}}$ é determinado pela derivada normal do potencial externo, pois $\mathbf{E} \cdot \hat{\mathbf{n}} = \nabla\varphi \cdot \hat{\mathbf{n}}$. Utilizando a equação (5.6) para o campo elétrico e integrando esta expressão, obtém-se o potencial externo em função da distribuição de carga na solução eletrolítica, ρ , e da distribuição de cargas na superfície da membrana, σ ,

$$\varphi_{ex}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \left[\left(\sum_{i=1}^2 \int \frac{\rho_i(\mathbf{r}')}{\varepsilon_i |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^3\mathbf{r}' \right) + \int_{r' \neq r} \frac{\sigma(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^2\mathbf{r}' \right]. \quad (5.7)$$

¹Conforme descrito no Capítulo 3.

Começando com uma densidade de carga inicial de $\sigma_0(\mathbf{r}') = 0$, pode-se fazer uma estimativa inicial do potencial na fronteira pela equação (5.7). Este potencial serve como valor de entrada para a equação (5.6) e uma nova densidade $\sigma_1(\mathbf{r}')$ é obtida. As equações (5.6) e (5.7) são iteradas até a convergência do resultado. Para levar em consideração a curvatura dos segmentos, este método foi otimizado no trabalho de Hoyles *et al.* [39].

A teoria de Poisson-Boltzmann (PB) fornece uma descrição contínua de um sistema na qual cargas externas fixas de densidade por ρ_{pr} , são cercadas por íons móveis de densidade ρ_{el} em um meio dielétrico. A principal suposição da teoria é que, equilíbrio, a distribuição dos íons móveis no sistema é dado pelo fator de Boltzmann

$$\rho_{el}(\mathbf{r}) = \sum_{\nu} q_{\nu} n_{0\nu} \exp[-q_{\nu} \varphi(\mathbf{r})/k_B T], \quad (5.8)$$

onde $n_{0\nu}$ é a densidade dos íons da espécie ν , q_{ν} sua carga, k_B é a constante de Boltzmann e T . Substituindo a densidade de carga (5.8) na equação (5.1), obtém-se para um eletrólito formado por íons de carga q e $-q$ a seguinte equação (PB)

$$\varepsilon_0 \nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \varphi(\mathbf{r})] = 2q n_0 \sinh[q\varphi(\mathbf{r})/k_B T] - \rho_{pr}(\mathbf{r}). \quad (5.9)$$

Em aplicações práticas, a equação (5.9) é resolvida numericamente usando o método de diferenças finitas. Nessa forma, a equação de PB só pode ser resolvida analiticamente para um plano infinito (teoria de Gouy-Chapman), que não tem muita relevância para canais iônicos. Um exemplo mais útil é provido por um íon em solução eletrolítica que pode ser resolvido pela equação de Poisson linearizada (Teoria de Debye-Hückel [22])

$$\nabla^2 \varphi = \kappa^2 \varphi, \quad \kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon k_B T}{2q^2 n_0}}. \quad (5.10)$$

Aqui κ^{-1} é o comprimento de blindagem de Debye² e $\rho_{ex} = 0$. A solução da equação (5.10) produz o seguinte potencial de Coulomb ao redor de um íon de diâmetro $a/2$

$$\varphi = \frac{q}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon r} \frac{e^{-\kappa(r-a)}}{(1 + \kappa a)}. \quad (5.11)$$

²Debye screening length

A densidade radial da blindagem da carga $P(r)$ é proporcional ao potencial

$$P(r) = 4\pi r^2 \rho_{el} = -4\pi r^2 \varepsilon_0 \varepsilon \kappa^2 \varphi = \frac{-q\kappa^2}{1 + \kappa a} r e^{-\kappa(r-a)}, \quad (5.12)$$

em que atinge o seu maior valor em $r = \kappa^{-1}$ e depois decai exponencialmente. O volume dessa blindagem para uma esfera de raio r é dado por

$$Q(r) = -q \left[1 - \frac{1 + \kappa r}{1 + \kappa a} e^{-\kappa(r-a)} \right]. \quad (5.13)$$

A equação (5.13) mostra que $-Q(r)/q$ cresce monotonicamente com r , levando a 25% da blindagem de uma carga central com $r = \kappa^{-1}$, aumentando para 90% em $r = 4\kappa^{-1}$. A temperatura ambiente ($T = 298K$) e tendo a água como solvente, o fator Debye é relacionado com a concentração da seguinte forma $\kappa^{-1} = 3.07/(z\sqrt{c_0})$, portanto em concentração fisiológica $c_0 = 0.15M$, $\kappa^{-1} = 7.9$. Assim, um comprimento entre 25-30 Å é necessário para praticamente blindar uma carga iônica, e o volume em questão é de aproximadamente 10^5Å^3 . Canais iônicos tem um volume tipicamente duas ordens de magnitude menor. Moy *et al.* [63] mostram detalhadamente, através da comparação com DB, que a teoria de PB falha em poros estreitos.

5.2 Modelos de permeação

A ênfase nas abordagens a seguir relacionam a estrutura do canal com sua função. Os modelos de taxa de reação (TR) formam uma outra classe que descreve a permeação dos íons dentro do canal, mas não leva em conta a sua estrutura. No modelo de TR assume-se que os íons são localizados em regiões específicas do poro, e a cinética é dada por um processo estocástico com probabilidades de transição entre as regiões e entre as regiões e o meio externo ao canal. Caso a interação entre os íons não possa ser negligenciada, esse modelo é uma aproximação adequada para a simulação da corrente no canal. Os trabalhos [16], [29], [51],[56], [76] servem de referência para o leitor interessado em maiores detalhes dessa teoria.

5.2.1 Teorias do contínuo

Teorias do contínuo para permeação foram propostas como alternativas mais realistas às teorias de taxa de reação [29]. Essas teorias são a forma mais simples de incorporar a estrutura do canal com a permeação do íon. O fluxo \mathbf{J}_ν de cada espécie de íon é descrito pela equação de Nernst-Planck³ que combina a lei de Fick (difusão devido ao gradiente de concentração)

$$\mathbf{J}_{\text{Dif } \nu} = -D_\nu \nabla n_\nu, \quad (5.14)$$

com a lei de Ohm⁴ (condução devido ao campo elétrico)

$$\mathbf{J}_{\text{Cond } \nu} = -D_\nu \frac{q_\nu n_\nu}{k_B T} \nabla \varphi, \quad (5.15)$$

segue que

$$\mathbf{J}_\nu = -D_\nu \left(\nabla n_\nu + \frac{q_\nu n_\nu}{k_B T} \nabla \varphi \right), \quad (5.16)$$

onde D_ν é o coeficiente de difusão dos íons da espécie ν . Para ser consistente, a equação (5.16) precisa ser resolvida simultaneamente com a equação de Poisson (5.1), e juntos formam a equação de Poisson-Nernst-Planck (PNP). Devido a sua natureza não-linear, a equação de PNP só pode ser resolvida numericamente [43], exceto em alguns casos particulares como, por exemplo, a equação de Goldman-Hodgkin-Katz [41]. A falta de soluções analíticas torna difícil obter uma descrição intuitiva da permeação do íon na abordagem PNP e dificulta o reconhecimento de problemas na aplicação em canais iônicos.

Quando $\mathbf{J}_\nu = 0$ em (5.16), a equação de PNP reduz-se trivialmente à equação PB com a densidade dada pelo fator de Boltzmann

$$n_\nu = n_{0\nu} e^{-\psi_\nu}, \quad \psi_\nu = q_\nu \varphi / k_B T, \quad (5.17)$$

onde ψ_ν é a energia potencial expressa na forma adimensional. Usando a equação (5.17) para n_ν como um fator de integração em (5.16), tem-se

$$\mathbf{J}_\nu = -D_\nu e^{-\psi_\nu} \nabla (n_\nu e^{\psi_\nu}). \quad (5.18)$$

³Esta equação representa a ação de duas leis que são válidas para a média de várias partículas.

⁴Já incluída a relação de Einstein para a mobilidade elétrica

Sobre condições estacionárias, e assumindo que somente a componente z em \mathbf{J}_ν seja diferente de zero, a equação (5.18) é reduzida a uma dimensão e pode ser integrada entre os pontos $[0, L]$

$$\mathbf{J}_\nu = -D_\nu \frac{n_{\nu L} e^{-\psi_{\nu L}} - n_{\nu 0} e^{-\psi_{\nu 0}}}{\int_0^L e^{\psi_\nu(z')} dz'}, \quad (5.19)$$

onde os subscritos 0 e L em n_ν e ψ_ν referem-se aos valores nos extremos. Fazendo a mesma integração de $[0, z]$ em (5.18) e usando (5.19) para eliminar \mathbf{J}_ν/D_ν , pode-se encontrar uma expressão para a densidade iônica em termos do potencial

$$n_\nu(z) = e^{-\psi_\nu} \left[n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}} + (n_{\nu L} e^{\psi_{\nu L}} - n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}}) \frac{\int_0^z e^{\psi_\nu(\xi)} d\xi}{\int_0^L e^{\psi_\nu(z')} dz'} \right]. \quad (5.20)$$

Finalmente, substituindo (5.20) na equação (5.1), obtém-se a equação integro-diferencial para o potencial em PNP

$$\begin{aligned} \varepsilon_0 \frac{d}{dz} \left[\varepsilon \frac{d}{dz} \varphi(z) \right] &= - \sum_\nu q_\nu e^{-\psi_\nu} \\ &\times \left[n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}} + (n_{\nu L} e^{\psi_{\nu L}} - n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}}) \frac{\int_0^z e^{\psi_\nu(\xi)} d\xi}{\int_0^L e^{\psi_\nu(z')} dz'} \right] - \rho_{ex}. \end{aligned} \quad (5.21)$$

Isto é similar a equação de PB, e reduz-se a ela quando $n_{\nu L} e^{\psi_{\nu L}} = n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}}$: isto é, quando o balanço das forças eletroquímicas e o sistema está em equilíbrio ($\mathbf{J}_\nu = 0$). Em geral, não existe uma solução analítica para a equação (5.21). Uma importante exceção é a solução linear na forma

$$\psi_\nu(z) = \psi_{\nu 0} + (\psi_{\nu L} - \psi_{\nu 0})z/L. \quad (5.22)$$

Usando a equação (5.22) nas equações (5.19) e (5.20) obtém-se as seguintes soluções para o fluxo e a densidade,

$$\mathbf{J}_\nu = \frac{-D_\nu (\psi_{\nu L} - \psi_{\nu 0}) (n_{\nu L} e^{\psi_{\nu L}} - n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}})}{L (e^{\psi_{\nu L}} - e^{\psi_{\nu 0}})}, \quad (5.23)$$

$$n_\nu(z) = e^{-\psi_\nu(z)} \left[n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}} + (n_{\nu L} e^{\psi_{\nu L}} - n_{\nu 0} e^{\psi_{\nu 0}}) \frac{e^{\psi_\nu(z)} - e^{\psi_{\nu 0}}}{e^{\psi_{\nu L}} - e^{\psi_{\nu 0}}} \right]. \quad (5.24)$$

O efeito das forças eletroquímicas na densidade, que não fica evidente na equação (5.21), pode ser visto mais claramente na equação (5.24): a densidade, que varia linearmente entre os valores limites quando não existem forças elétricas (lei de Fick), exibe um comportamento exponencial quando é aplicado um campo uniforme [44].

A única diferença entre as equações de PB e PNP é a presença de forças no caso de PNP, fora isso elas possuem a mesma aproximação de campo médio no cálculo dos potenciais e da concentração. Detalhadas comparações entre a equação de PNP com simulações de dinâmica browniana (DB)⁵ confirmaram que o efeito de blindagem é superestimado no caso de PNP [19], da mesma maneira que em PB. Esta blindagem excessiva em PNP praticamente cancela a contribuição da repulsão da auto-energia dielétrica, levando a maiores concentrações e correntes comparadas com aquelas encontrados nas simulações de DB. Outro problema das teorias do contínuo é como tratar as interações íon-canal e íon-íon, que não são levadas em conta corretamente no formalismo de PNP, e assim, não fornece um modelo confiável para a permeação de íons em canais estreitos. Aqui estreito refere-se a raios menores ou iguais a 5\AA , que é o caso da maioria dos canais biológicos [45]. Contudo é importante enfatizar que estas soluções são válidas em soluções eletrolíticas com grande quantidade de moléculas, fora do canal.

5.2.2 Dinâmica Browniana

A discussão acima desencoraja a aplicação da teoria do contínuo em canais iônicos. Nesse caso, a teoria de permeação mais simples que trata os íons como partículas é a dinâmica Browniana (DB).

Nas simulações de DB, a trajetória de cada partícula em um sistema de N íons é determinada pela equação de Langevin (5.25). Colisões de um íon com as moléculas de água ao seu redor são representadas por forças aleatórias mais uma força de fricção média. As forças elétricas sistemáticas agindo nos íons devido às várias fontes podem ser determinadas pela solução da equação de Poisson (5.1) para o sistema de íons e a geometria da proteína [52].

⁵Esta abordagem para a simulação de canais iônicos será discutida na próxima seção

Estudos teóricos passados de canais iônicos focavam principalmente em canais de membrana artificiais tais como gramicidina A, que pode ser modelada como um tubo cilíndrico estreito com 2 \AA de raio. Devido à sua simplicidade e volume pequeno, estes canais têm sido analisados detalhadamente usando uma grande variedade de teorias microscópicas [16] e macroscópicas [29]. Em contraste, canais biológicos reais são caracterizados por uma geometria mais complicada e volumes maiores. Tipicamente, esses canais possuem aberturas vestibulares grandes e seguem uma geometria catenária até a entrada do poro estreito, como ilustra a figura (5.1) [77].

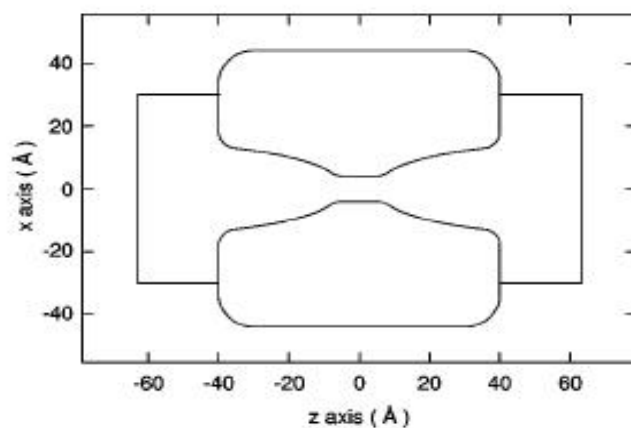


Figura 5.1: O canal iônico modelo com dois vestibulos catenários é gerado pela rotação da curva fechada em 180° ao longo do eixo z . O vestibulo em cada lado da membrana são construídos usando $z = a \cosh(x/a)$ com $a = 4,87$. O raio da entrada do vestibulo é 13 \AA e o segmento transmembrana cilíndrico tem um raio de 4 \AA [38].

Esta estrutura impõe um sério problema para o cálculo das forças elétricas agindo em um íon dentro do canal. A solução numérica para a equação de Poisson em uma geometria aproximada de um canal iônico pode ser computacionalmente proibitiva. Nesse caso, um sistema de coordenadas no qual a equação de Poisson possa ser resolvida exatamente, parece ser uma alternativa adequada. Conforme apresentado na seção 3.1, as coordenadas toroidais são o único sistema que oferece uma geometria vestibular e admite soluções exatas [47]. A importância dos vestibulos em um canal é demonstrado no trabalho de e Li *et al.* [52].

O movimento do i -ésimo íon com massa m_i e carga q_i é governado pela equação de Langevin

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = -m_i \gamma_i \mathbf{v}_i + \mathbf{F}_R(t) + \mathbf{F}_i, \quad i = 1, \dots, N, \quad (5.25)$$

onde γ_i e \mathbf{v}_i são respectivamente o seu coeficiente de fricção e sua velocidade. Os três termos na equação (5.25) correspondem as forças de fricção, forças aleatórias e a força sistemática total que agem nos íons. As forças de fricção e aleatória na equação (5.25), juntas descrevem os efeitos das colisões com as moléculas de água que cercam o íon, e são conectadas pelo teorema da flutuação-dissipação [67], que relaciona os coeficientes de fricção à função de autocorrelação das forças aleatórias

$$m_i \gamma_i = \frac{1}{2k_B T} \int_{-\infty}^{\infty} \langle F_{Ru}(0) F_{Ru}(t) \rangle dt, \quad u = x, y, z, \quad (5.26)$$

onde os parênteses angulares indicam uma média no tempo,

$$\langle f(t) \rangle \doteq \frac{1}{T} \int_0^T dt' f(t+t'), \quad (5.27)$$

para $T \gg \frac{1}{\gamma_i}$ ⁶. E o termo $\mathbf{F}_i = q_i \mathbf{E}(\mathbf{r}_i) \equiv q_i \mathbf{E}_i$ na equação (5.25) determina a força elétrica total agindo no íon. O campo elétrico sentido pelo i -ésimo íon, \mathbf{E}_i , é devido a (i) outros íons, (ii) cargas fixas na proteína, (iii) potencial de membrana, e (iv) indução das cargas na superfície entre as moléculas de água e a parede da proteína. É computado pela solução da equação de Poisson (5.1) e será discutido posteriormente.

Os principais passos na solução da equação de Langevin (5.25) formulada por van Gunsteren e Berendesen [78] seguem a seguir.

Considerando a equação (5.25) na direção x (resultados idênticos são obtidos para as outras direções),

$$\frac{dv}{dt} + \gamma v = (F_R(t) + F)/m \quad (5.28)$$

onde, o subíndice i foi suprimido por conveniência. Usando a identidade

$$\frac{dv}{dt} + \gamma v = e^{-\gamma t} \frac{d}{dt} (v e^{\gamma t}) \quad (5.29)$$

⁶(ensemble averages)

a equação (5.28) pode ser integrada do tempo inicial t_n até t , resultando na expressão

$$v(t)e^{\gamma t} - v(t_n)e^{\gamma t_n} = \frac{1}{m} \int_{t_n}^t [F_R(t') + F(t')] e^{\gamma t'} dt'. \quad (5.30)$$

A integral sobre as forças aleatórias na equação (5.30) pode ser obtida usando as propriedades estocásticas de $F_R(t)$. Para a força elétrica, pode-se expandir $F(t)$ em séries de Taylor ao redor de t_n ,

$$F(t) = F(t_n) + \dot{F}(t_n)(t - t_n), \quad (5.31)$$

onde \dot{F} denota a derivada de $F(t)$ em $t = t_n$. Substituindo a equação (5.31) em (5.30) e integrando esses termos

$$\begin{aligned} v(t) &= v(t_n)e^{-\gamma(t-t_n)} + \frac{F(t_n)}{m\gamma}(1 - e^{-\gamma(t-t_n)}) \\ &+ \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^2} [\gamma(t - t_n) - 1 + e^{-\gamma(t-t_n)}] \\ &+ \frac{e^{-\gamma t}}{m} \int_{t_n}^t F_R(t')e^{\gamma t'} dt'. \end{aligned} \quad (5.32)$$

Para encontrar a posição depois de um passo de tempo Δt , é necessário integrar a equação (5.32) mais uma vez de t_n a $t_n + \Delta t$. A integração de todos os termos da equação (5.32) é imediata, com exceção do último, que pode ser resolvido através de integração por partes. Nesse caso

$$\begin{aligned} &\int_{t_n}^{t_n+\Delta t} \left(\frac{e^{-\gamma t}}{m} \int_{t_n}^t F_R(t')e^{\gamma t'} dt' \right) dt = \\ &= \frac{1}{m\gamma} \int_{t_n}^{t_n+\Delta t} [1 - e^{\gamma(t-t_n-\Delta t)}] F_R(t) dt \equiv X_n(\Delta t), \end{aligned} \quad (5.33)$$

a partir do qual definimos a variável randômica $X_n(\Delta t)$, que possui as mesmas propriedades estocásticas de $F_R(t)$ ⁷. Usando a equação (5.33), no tempo $t_{n+1} = t_n + \Delta t$ encontra-se

$$\begin{aligned} x(t_{n+1}) &= x(t_n) + \frac{v(t_n)}{\gamma}(1 - e^{-\gamma\Delta t}) + \frac{F(t_n)}{m\gamma^2}(\gamma\Delta t - 1 + e^{-\gamma\Delta t}) \\ &+ \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^3} \left(1 - \gamma\Delta t + \frac{\gamma^2\Delta t^2}{2} - e^{-\gamma\Delta t} \right) + X_n(\Delta t). \end{aligned} \quad (5.34)$$

⁷Os detalhes da implementação de $X_n(\Delta t)$ no algoritmo para DB podem ser obtidos no artigo de van Gunsteren *et al.* [78].

Aqui $\tau = \gamma\Delta t$ é o parâmetro adimensional que significa um regime difusivo quando $\tau \gg 1$ ou um regime balístico quando $\tau \ll 1$. Uma forma mais conveniente para $x(t_{n+1})$, que não envolve a velocidade, pode ser obtido pela adição de $e^{-\tau}x(t_{n-1})$ na equação (5.34),

$$\begin{aligned} x(t_{n+1}) &= x(t_n)(1 + e^{-\tau}) - x(t_{n-1})e^{-\tau} \\ &+ \frac{F(t_n)}{m\gamma^2}\tau(1 - e^{-\tau}) + \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^3} \left(\frac{\tau^2}{2}(1 + e^{-\tau}) - \tau(1 - e^{-\tau}) \right) \\ &+ X_n(\Delta t) - X_n(-\Delta t)e^{-\tau}. \end{aligned} \quad (5.35)$$

Similarmente, a expressão para a velocidade pode ser encontrada pela subtração de $x(t_{n-1})$ na equação (5.34),

$$\begin{aligned} v(t_n) &= \frac{2\gamma}{\sinh \tau} [x(t_{n+1}) - x(t_{n-1})] + 2 \left(\frac{F(t_n)}{m\gamma^2} - \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^3} \right) \\ &\times (\sinh \tau - \tau) - X_n(\Delta t) + X_n(-\Delta t). \end{aligned} \quad (5.36)$$

As equações (5.35) e (5.36) constituem as relações de recorrências principais para o algoritmo de DB usado nas simulações. A cada passo de tempo, os valores calculados de F , \dot{F} e X_n são inseridos nessas equações para determinar a nova posição e velocidade dos íons no sistema. O algoritmo de DB requer o cálculo de forças elétricas agindo nos íons a cada passo de tempo. Dada a posição dos íons, isto pode ser determinado pela solução da equação de Poisson em uma geometria apropriada. No entanto, conforme comentado anteriormente, esta abordagem exige um esforço computacional muito grande. Hoyles *et al.* [38] propuseram um método alternativo onde a força e o potencial elétrico são pré-calculados em uma grade de pontos para várias configurações e o resultado é armazenado em um conjunto de tabelas. Durante as simulações, o campo e o potencial nos pontos desejados são reconstruídos pela interpolação entre as entradas da tabela. Comparado à solução exata da equação de Poisson em coordenadas toroidais, o método proposto por Hoyles *et al.* é duas ordens de magnitude mais rápido. E ainda conta com a vantagem de que a geometria do canal não fica restrita as coordenadas toroidais, pois utiliza coordenadas generalizadas (permitindo, por exemplo, a estrutura catenária). Por conveniência, o cálculo total do potencial φ_i sentido pelo íon i é separado em quatro

partes usando o princípio da superposição

$$\varphi_i = \varphi_{X,i} + \varphi_{S,i} + \sum_{j \neq i} (\varphi_{C,ij} + \varphi_{R,j}), \quad (5.37)$$

onde (i) $\varphi_{X,i}$ é o potencial externo devido ao campo aplicado, cargas fixas na parede da proteína, e cargas induzidas por este. Como é um termo que independe dos íons, $\varphi_{X,i}$ não muda durante a simulação. A equação de Poisson é resolvida sem a presença dos íons e os resultados são armazenados em uma tabela. (ii) $\varphi_{S,i}$ é o auto-potencial devido as cargas na superfície induzidas pelo íon i na fronteira do canal. A equação de Poisson é resolvida para um único íon com o campo aplicado e sem as cargas fixas. O íon é movido através da grade de pontos e os auto-potenciais calculados são armazenados. Os outros dois termos da equação (5.37) levam em conta a influencia dos outros íons, (iii) $\varphi_{R,j}$ é a imagem do potencial devido as cargas induzidas pelo íon j . Este é similar ao caso (ii) com exceção que o segundo íon é movido através de toda a grade de pontos enquanto o primeiro é fixo em um ponto. Como a solução da equação de Poisson contem o potencial de Coulomb e o auto-potencial na posição i , estes precisam ser subtraídos para obter $\varphi_{R,j}$ para o devido armazenamento dos resultados. (iv) $\varphi_{C,ij}$ é o potencial de Coulomb devido ao íon j . É calculado diretamente da lei de Coulomb

$$\varphi_{C,ij} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_w} \frac{q_j}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|}, \quad (5.38)$$

onde \mathbf{r}_i e \mathbf{r}_j são as posições dos íons. O campo elétrico sentido pelo íon é decomposto da mesma maneira

$$\mathbf{E}_i = \mathbf{E}_{X,i} + \mathbf{E}_{S,i} + \sum_{j \neq i} (\mathbf{E}_{C,ij} + \mathbf{E}_{R,j}), \quad (5.39)$$

onde cada componente do campo elétrico tem uma definição similar a equação (5.37) [38].

Conforme discutido anteriormente, o modelo contínuo das forças eletrostáticas é válido somente nas regiões que são grandes comparadas com o diâmetro das moléculas de água e dos íons. Na região estreita do poro, cujo o raio pode ser de apenas 4 Å (aproximadamente igual ao íon potássio com sua primeira camada de hidratação), a representação do dielétrico como um meio contínuo não é uma aproximação razoável. Os grupos polares da parte interna da proteína interagem

com as moléculas de água que estão ao redor do íon conforme ele tenta atravessar o poro, e a habilidade das moléculas de água, residentes dentro do poro, em alinhar com um campo elétrico será severamente restrita. O mais provável é que esta interação entre os dipolos na parede da proteína e a primeira ou segunda camadas de hidratação de um íon é o que determina a seletividade iônica dos canais de ânion ou cátion. Estudos que relacionam a dependência da temperatura com a condutividade nos canais iônicos revelam que os íons encontram uma barreira de energia de aproximadamente $3k_B T$ (temperatura ambiente), suprimindo a corrente em uma ordem de magnitude comparada com a predição feita por considerações puramente geométricas [46]. Esta barreira pode surgir das interações dinâmicas que ocorrem no segmento estreito do canal entre a parede da proteína e a camada de hidratação. Elucidações no processo de permeação que ocorre nessa região requerem cálculos de dinâmica molecular (DM) [52] conforme será apresentado a seguir.

5.2.3 Dinâmica Molecular

Simulações de DM proporcionam uma estrutura detalhada de um poro aberto, e um modelo atômico dinâmico do sistema biomolecular de interesse. Nessas simulações, o sistema microscópico inclui explicitamente as moléculas de água, os íons e os fosfolípidios da membrana. Tipicamente, os modelos microscópicos que levam em conta todos os átomos possuem dezenas de milhares de partículas. Uma vez que esse sistema esteja em equilíbrio, as propriedades macroscópicas podem ser calculadas diretamente das trajetórias dos átomos [71].

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = \mathbf{F}_i \quad (5.40)$$

onde m_i , \mathbf{r}_i e $\ddot{\mathbf{r}}_i$ são a massa, a posição e a aceleração do i -ésimo átomo respectivamente, e a força microscópica agindo no átomo i é

$$\mathbf{F}_i = -\nabla U(\mathbf{r}_i), \quad (5.41)$$

onde U é a função potencial do sistema.

Primeiro, monta-se um modelo atômico inicial do canal, da bicamada lipídica e das soluções eletrolíticas nos dois lados do canal. Posiciona-se alguns íons na água, com temperatura fixa, e aplica-se uma voltagem ou gradiente de

concentração. Desta forma, o fluxo de íons é medido diretamente como função do tempo conforme a dinâmica atômica do modelo é simulada no computador. A cada passo de tempo da simulação, todas as forças em cada átomo são calculadas (covalente, cargas fixas, dipolar, etc.) e os átomos movem-se sob a ação dessas forças por um período de tempo suficientemente curto⁸ [51].

Estas simulações podem ser usadas para obter informações sobre a energia potencial local [2] e, conforme será mostrado a seguir, estimar coeficientes de difusão dos íons como função da posição no canal. Estas informações podem ser usadas em combinação com a DB ou com PNP para calcular o fluxo do canal.

Considerando um poro cilíndrico de comprimento L e raio R , o coeficiente de difusão D para o movimento em uma dimensão no eixo z (ao longo do poro) é usualmente obtido pela relação

$$\langle (z(t) - z(0))^2 \rangle = 2Dt. \quad (5.42)$$

A equação (5.42) é válida somente para longos períodos de tempo na qual o movimento da partícula é difusivo: na prática $\langle (z(t) - z(0))^2 \rangle$ é usualmente monitorado na faixa de 50-100 ps. A equação (5.42) pode ser usada em simulações de longos poros infinitos [54], mas falha para poros finitos, se for considerado apenas partículas que tenham posições $|z| < L/2$ entre os tempos 0 e t em $\langle (z - z_0)^2 \rangle$. Nesse caso, $\langle (z - z_0)^2 \rangle$ não é linear por muito tempo, ao contrário, apresenta um comportamento de saturação.

Assumindo que as partículas dentro do poro de comprimento L move-se apenas pela ação da difusão na direção z , a probabilidade $p(z/z_0)$ de uma determinada partícula estar na posição z , no tempo t , dado que no tempo inicial estava no ponto z_0 é

$$p(z/z_0) = \frac{2}{\sqrt{4\pi Dt}} \frac{e^{-(z-z_0)^2/4Dt}}{\left[\Phi\left(\frac{L/2-z_0}{\sqrt{4Dt}}\right) - \Phi\left(\frac{-L/2-z_0}{\sqrt{4Dt}}\right) \right]}, \quad (5.43)$$

onde $\Phi(x)$ é a função erro: $\Phi(x) = (2/\sqrt{\pi}) \int_0^x dy e^{-y^2}$. O denominador na equação (5.43) surge da necessidade de $p(z/z_0)$ ser normalizada em relação ao comprimento

⁸Na ordem de picosegundos (ps)

L do poro. Assumindo que as partículas são uniformemente distribuídas ao longo do poro, $p(z_0) = 1/L$. A média $\langle [z(t) - z(0)]^2 \rangle$ é dada por

$$\langle (z - z_0)^2 \rangle = \frac{1}{L} \int_{-L/2}^{L/2} dz_0 \int_{-L/2}^{L/2} dz (z - z_0)^2 p(z/z_0). \quad (5.44)$$

A integral (5.44) pode ser reescrita da seguinte maneira

$$\langle (z - z_0)^2 \rangle = 2Dt + \frac{\sqrt{4Dt}}{L\sqrt{\pi}} \int_{-L/2}^{L/2} dz_0 F(z_0), \quad (5.45)$$

onde

$$F(z_0) = \frac{-(L/2 - z_0)e^{-(L/2-z_0)^2/4Dt} + (-L/2 - z_0)e^{-(-L/2-z_0)^2/4Dt}}{\Phi\left(\frac{L/2-z_0}{\sqrt{4Dt}}\right) - \Phi\left(\frac{-L/2-z_0}{\sqrt{4Dt}}\right)}. \quad (5.46)$$

A expressão (5.45), que pode ser calculada numericamente, descreve a evolução temporal de $\langle (z - z_0)^2 \rangle$ em um canal finito de comprimento L , onde são incluídas somente as partículas que estão dentro do poro nos tempos 0 e t . Para canais de comprimento infinito, o segundo termo da equação (5.45) é igual a zero, o que a torna igual a (5.42).

Nas simulações de DM, as interações de longo alcance entre moléculas de água e entre íons em uma solução eletrolítica são representados por potenciais de Coulomb e Lennard-Jones (U_{LJ})

$$U_{LJ} = 4\epsilon[(\zeta/r)^{12} - (\zeta/r)^6], \quad (5.47)$$

onde ϵ é a profundidade do potencial no ponto de mínimo ($r_{min} = 2^{1/6}\zeta$), e ζ é o ponto em que ele zera. As ligações covalentes que mantêm a proteína e os átomos de lipídio juntos são descritas simplesmente por potenciais harmônicos.

Existem duas limitações que impedem a DM de se tornar o modelo para os estudos de permeação. O primeiro é de ordem prática: devido ao grande esforço computacional, a DM faz simulações da permeação na ordem de nanosegundos usando os computadores atuais. Enquanto muitos microsegundos são necessários para determinar a condutância de um canal. Mesmo que a velocidade de processamento dos computadores continuem crescendo nas taxas atuais, décadas serão necessárias para alcançar esse nível de performance. O segundo, refere-se a omissão

dos efeitos de polarização. Essas interações constituem uma parte significativa da energia total de uma molécula de água ou íon, mas como é muito dispendioso calcular a contribuição de forças não-aditivas, é tratado aproximadamente pela absorção de seus efeitos nos potenciais de Coulomb e Lennard-Jones. Isso pode ser razoável em um ambiente que contenha uma grande quantidade de moléculas, mas durante a permeação, as moléculas movem-se para dentro de um canal, em fila única, o que implica em características de polarização muito diferentes. Portanto, é importante desenvolver forças de campo polarizáveis para obter melhores valores para a energia livre dos íons [45].

5.3 Aplicações em Canais Iônicos

Após o desenvolvimento de alguns modelos para o estudo da condutividade, pode-se aplicar essas teorias a canais particulares e, assim, comparar com dados experimentais para avaliar os modelos. Portanto, os modelos computacionais citados anteriormente serão analisados para os canais Gramicidina A (GA) e canal de potássio (KcsA). Uma característica importante dos canais iônicos, que não será abordado nesse trabalho, é a seletividade entre diferentes íons, permitindo a passagem de alguns e bloqueando outros. Essa seletividade pode ser referente a carga (positiva ou negativa), ao tamanho ou a valência (monovalente ou divalente) do íon.

5.3.1 Canal de Gramicidina A

Nas membranas, o dímero do peptídeo GA forma um canal cilíndrico de altura 25 Å e raio 2 Å, que seletivamente conduz cátions monovalentes, liga cátions divalentes, e rejeita ânions. Suas propriedades fisiológicas são caracterizadas por uma curva linear I-V e concentração de saturação⁹ relativamente grande. Além do mais, estudos com RNM (ressonância magnética nuclear) indicaram sítios de ligação bem estabelecidos perto do poro de entrada [44].

⁹half-saturation

A eletrostática do contínuo falha no canal de GA [24], pois as moléculas de água e íons formam uma fila única dentro do poro. Na ausência de uma força confiável, pode ser aplicado o método inverso para construir um potencial de força média (PFM) dos íons que reproduz muito bem as propriedades conhecidas da GA quando aplicados a simulação de DB. Esse PFM foi desenvolvido para os íons potássio conforme o trabalho de Edwards *et al.* [24]. No perfil desse potencial pode-se encontrar dois sítios de ligação na entrada do canal e uma barreira central de aproximadamente $5 k_B T$. Os vales de energia são requeridos para explicar os sítios de cátions na entrada do poro e a barreira é essencial para reproduzir a saturação da condutância.

O PFM desenvolvido mostra as propriedades observadas no canal GA, portanto pode ser diretamente usada para avaliar a exatidão do perfil do PFM calculado pela simulação de DM. Todos os cálculos da DM tem levado a barreiras de energia muito altas para permitir a permeação de íon através do poro da GA [45]. Uma possível explicação da falha desses campos de forças é a negligencia dos efeitos da polarização, pois conforme [42] a polarização tem reconhecida importância no canal de GA.

O canal de GA tem um papel fundamental no desenvolvimento dos modelos de permeação nos canais iônicos, pois a grande quantidade de dados experimentais desse canal é uma ótima referência para a validação de modelos teóricos. O leitor que desejar mais informações sobre a modelagem desses canais, pode recorrer aos seguintes trabalhos [18], [66], [71], [72].

5.3.2 Canais de Potássio

A determinação da estrutura do canal de potássio KcsA tem dado um novo impulso na modelagem dos canais iônicos. Enquanto KcsA é um canal de potássio de uma bactéria, muito diferente daquelas encontradas em animais, acredita-se que duas de suas principais características são preservadas em todos os canais de potássio, especialmente, o filtro seletivo estreito¹⁰ com um raio de 1.5 \AA que contém 2 íons K^+ , e uma cavidade cheia de água [45].

¹⁰O papel do filtro é selecionar os íons K^+ ao invés de Na^+

A condutância dos canais de potássio diferem um do outro por mais de uma ordem de magnitude, estendendo-se de 10 a 40 pS para canal de potássio de condutância-baixa (por exemplo K_{ir}) a 100-300 pS para canais de potássio de condutância-alta (por exemplo KcsA). O canal de potássio de maior condutância (BK) pode passar íons a uma taxa de aproximadamente 10^8 íons por segundo [76].

Apenas 2 dos quatro sítios de ligação dentro do poro são ocupados por íons e cada íon é separado por uma molécula de água no sítio intermediário. Assim 2 íons permeantes ocupam os sítios 1 e 3 ou 2 e 4 com uma molécula de água entre eles, e os íons provavelmente podem oscilar entre essas duas configurações sem uma barreira de energia substancial [18].

Quando um terceiro íon, localizado em uma das entradas do poro, entra no filtro seletivo do canal, o equilíbrio dos dois íons residentes é perturbado, e a coluna move-se ao longo do poro até a ejeção de um dos íons para fora do canal. Nesse caso, o novo íon assume um dos sítios dentro do canal. Simulações de DB [12], [13], [57] e DM [3], [5], [9], [71] tem confirmado o mecanismo de permeação descrito acima e vem auxiliando a determinar o perfil de energia quando múltiplos íons localizam-se no interior do canal. Foi sugerido que a diversidade nas condutâncias dos canais de potássio deve-se aos valores encontrados para o raio da parte intracelular do poro. A condutância aumenta proporcionalmente ao aumento do raio.

Canais de potássio permitem passar alguns cátions monovalentes (mas notavelmente não passa Na^+), são bloqueados por cátions divalentes enquanto não permitem a entrada de ânions. Discussões da seletividade em estudos teóricos dos canais de K^+ tem geralmente focado na discriminação entre os íons de K^+ e Na^{+11} . Esse assunto tem-se mostrado um dos aspectos mais difíceis para elucidar. A rejeição de ânions pode ser explicada simplesmente usando a informação estrutural. O grupo carbonila alocado dentro do filtro seletivo, cria um potencial eletrostático negativo que atrai cátions e repele íons. A discriminação entre cátions monovalentes e divalentes não pode se restringir a presença de cargas negativas dentro do filtro seletivo, pois estas cargas atraem os dois tipos de íons. Alguns estudos sugerem que essa seletividade deve-se a exata força de atração para os íons permeantes [17],

¹¹A seletividade iônica do KcsA é de interesse primário de simulações de DM, pois na DB não existe diferenciação entre os cátions monovalentes [44]

[20]. Os íons divalentes tem uma interação eletrostática maior, com qualquer carga da proteína, do que os íons monovalentes. Este fato pode explicar o motivo pelo qual os canais de potássio são bloqueados pelo íon Bário (Ba^{2+}). Quando esse íon entra no filtro seletivo ele é "ligado" eletrostaticamente de tal forma que ele só pode sair com a repulsão de um segundo cátion divalente, sugerindo uma condutância de íons divalentes ao invés de monovalentes. Apenas quando maiores informações estruturais sobre esses canais forem disponíveis, os verdadeiros mecanismos poderão ser elucidados [18].

6 CONCLUSÕES

- A aplicação de teorias macroscópicas não fornece valores satisfatórios para o potencial elétrico de um canal iônico quando a parte mais estreita do poro for de poucos Angstroms.
- A equação de Poisson-Nernst-Planck pode ser utilizada para realizar simulações computacionais da condutância de um canal iônico quando a parte mais estreita do poro apresentar um diâmetro maior que 10 \AA .
- Caso a parte mais estreita do poro tenha um diâmetro menor que 10 \AA , pode-se utilizar a dinâmica Browniana para simular a condutância no canal. Contudo, parâmetros como difusão e as forças que atuam sobre cada íon devem ser melhores determinados por simulações de dinâmica molecular.

Referências Bibliográficas

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., *Biologia molecular da célula*, 4^a Ed., 2004, Artmed: Porto Alegre.
- [2] Allen, R., Hansen, J.P., *Molecular dynamics investigation of water permeation through nanopores*, Journal of Chemical Physics, 2003, 119, 3905-3919.
- [3] Allen, T.W., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Molecular dynamics study of the KcsA potassium channel*, Biophys. J., 1999, 77, 2502-2516.
- [4] Apell, H., *How do P-type ATPase transport ions?* Bioelectrochemistry, 2004, 63, 149-156.
- [5] Åqvist, J., Luzhkov, V., *Ion permeation mechanism of the potassium channel*, Nature, 2000, 404, 881-884.
- [6] Beglov D. e Roux, B.: *Finite representation of an infinite bulk system: Solvent boundary potential for computer simulations*. J. Chem. Phys., 1994, 100, 9050-9063.
- [7] Bernstein, J., *Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme*. Erster Theil. Pflügers Arch., 1902, 92, 521-562.
- [8] Bernstein, J., *Elektrobiologie*. Vieweg, Braunschweig, 1912, 215.
- [9] Bernèche, S., Roux, B., *Molecular dynamics of the KcsA K⁺ channel in a bilayer membrane*, Biophys. J., 2000, 78, 2900-2917.
- [10] Born, M., *Volumen und hydrationswärme der ionen*, Z. Phys., 1920, 1, 45-48.
- [11] Catterall, W. A., Gutman, G., Chandy, K.G., *IUPHAR Compendium of Voltage-Gated Ion Channels 2005*, 2^a ed., 2005, IUPHAR Media: Leeds.
- [12] Chung, S.H., Allen, T.W., Hoyles, M., Kuyucak, S., *Permeation of ions across the potassium channel: Brownian dynamics studies*, Biophys. J., 1999, 77, 1133-1156.

- [13] Chung, S.H., Allen, T.W., Kuyucak, S., *Conducting-state properties of the KcsA potassium channel from molecular and Brownian dynamics simulations*, Biophys. J., 2002, 82, 628-645.
- [14] Cole, K. S., H. J. Curtis., *Electric impedance of Nereis during activity*, J. Gen. Physiol., 1938, 64, 22-37.
- [15] Cole, K. S., Curtis, H. J., *Electrical impedance of the squid giant axon during activity*, Gen. Physiol. 1939, 22, 649-670.
- [16] Cooper, K., Jacobsson, E., Wolynes, P., *The theory of ion transport through membrane channels*, Prog. Biophys. Mol. Biol., 1985, 46, 51-96.
- [17] Corry, B., Allen, T.W., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Mechanisms of permeation and selectivity in calcium channels*, Biophys. J., 2001, 80, 195-214.
- [18] Corry, B., Chung, S.H., *Mechanisms of valence selectivity in biological ion channels*, Cell. Mol. Life Sci., 2006, 63, 301-315.
- [19] Corry, B., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Tests of continuum theories as models of ion channels: II. Poisson-Nernst-Planck theory versus Brownian dynamics*, Biophys. J., 2000, 78, 2364-2381.
- [20] Corry, B., Vora, T., Chung, S.H., *Electrostatics basis of valence selectivity in cationic channels*, Biochim. Biophys. Acta, 2005, 1711, 72-86.
- [21] Cuello, L.G., Cortes, D.M., Perozo, E., *Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel in a lipid bilayer*, Science, 2004, 306, 491-495.
- [22] Debye, P., Hückel, E., *Zur theorie der elektrolyte*, Physik. Zeitschr, 1923, 24, 185-206.
- [23] Debye, P., Hückel, E., *Zur theorie der elektrolyte. II. Das Grenzesetz für die elektrische leitfähigkeit*, Physikalische Zeitschrift, 1923, 24, 305-325.
- [24] Edwards, S., Corry, B., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Continuum electrostatics fails to describe ion permeation in the gramicidin channel*, Biophys. J., 2002, 83, 1384-1360.

- [25] Ghandi, C.C., Isacoff, E.Y., *Molecular models of voltage sensing*, J. Gen. Physiol., 2002, 120, 455-463.
- [26] Hermann, L., *Zur theorie der erregungsleitung und der elektrischen erregung*, Pflügers Arch., 1872, 75, 574-590.
- [27] Hermann, L., *Lehrbuch der physiologie*, 13^a ed., 1905a, August Hirschwald: Berlin.
- [28] Hermann, L., *Beiträge zur Physiologie und Physik des Nerven*, Pflügers Arch., 1905b, 109, 95-144.
- [29] Hille, B., *Ionic channel of excitable membranes*, 2^a ed., 1992, Sinauer: Sunderland.
- [30] Hodgkin, A. L., *Evidence for electrical transmission in nerve*, J. Physiol, Part 1, 1937a, 90, 183-210.
- [31] Hodgkin, A. L., *Evidence for electrical transmission in nerve*, Physiol., Part II 1937b, 90, 211-232.
- [32] Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*, J. Physiol., 1952a, 116, 449-472.
- [33] Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., *The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo*, J. Physiol., 1952b, 116, 473-496.
- [34] Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo*, J. Physiol. 1952c, 116, 497-506.
- [35] Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, J. Physiol., 1952d, 117, 500-544.
- [36] Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B., *Measurements of current-voltage relations in the membrane in the giant axon*, J. Physiol., 1952, 116, 424-448.

- [37] Hodgkin, A. L., Katz, B., *The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid*, J. Physiol., 1949, 108, 37-77.
- [38] Hoyles, M., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Computer simulation of ion conductance in membrane channels*, Physical Review E, 1998, 58, 3654-3661.
- [39] Hoyles, M., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Solutions of Poisson's equation in channel-like geometries*, Computer Physics Communications, 1998, 115, 45-68.
- [40] Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R., *X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel*, Nature, 2003, 423, 33-41.
- [41] Johnston, D., Wu, S. M., *Foundations of cellular neurophysiology*, 1995, MIT Press: Massachusetts.
- [42] Jordan, P.C., *Ion-water and ion-polypeptide correlations in a gramicidin-like channel*, Biophys. J., 1990, 58, 1133-1156.
- [43] Kurnikova, M.G., Coalson, R.D., Graf, P., Nitzan, A., *A lattice relaxation algorithm for three-dimensional Poisson-Nernst-Planck theory with application to ion transport through the gramicidin A channel*, Biophys. J., 1999, 76, 642-656.
- [44] Kuyucak, S., Andersen, O.S., Chung, S.H., *Models of permeation in ion channels*, Reports on Progress in Physics, 2001, 64, 1427-1474.
- [45] Kuyucak, S., Bastug, T., *Physics of ion channels*, Journal of Biological Physics, 2003, 29, 429-446.
- [46] Kuyucak, S., Chung, S.H., *Temperature dependence of conductivity in electrolyte solutions and ionic channels of biological membranes*, Biophys. Chem., 1994, 52, 15-24.
- [47] Kuyucak, S., Hoyles, M., Chung, S.H., *Analytical solutions of Poisson's equation for realistic geometrical shapes of membrane ion channels*, Biophys. J., 1998, 74, 22-36.

- [48] Lai, H.C., Jan, L.Y., *The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels*, Nature Reviews Neuroscience, 2006, 7, 548-562.
- [49] Lauger, P., *Ion transport through pores: a rate theory analysis*, Biochim. Biophys. Acta, 1973, 311, 423-441.
- [50] Levitt, D.G., *Electrostatics calculations for an ion channel. I. Energy and potential profiles and interactions between ions*, Biophysical Journal, 1978, 22, 209-219.
- [51] Levitt, D. G., *Modelling of ion channel*, Journal of General Physiology, 1999, 113, 789-794.
- [52] Li, S. C., Hoyles, M., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels*, Biophysical Journal, 1998, 74, 37-47.
- [53] Love, J. D., *The dielectric ring in a uniform, axial, electrostatic field*, J. Math. Phys., 1972, 13, 1297-1304.
- [54] Lynden-Bell, R. M., Rasaiah, J. C., *Mobility and solvation of ions in channels*, Journal of Chemical Physics, 1996, 105, 9266-9280.
- [55] Stryer, L., *Bioquımica*, 3^a ed., 1992, Guanabara Koogan: Rio de janeiro.
- [56] Luzhkov, V. B., Aqvist, J., *Ions and blockers in potassium channels: Insights from free energy simulations*, Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1747, 109-120.
- [57] Mashl, R.J., Tang, Y., Schnitzer, J., Jakobsson, E., *Hierarchical Approach to predicting permeation in ion channels*, Biophys. J., 2001, 81, 2473-2483.
- [58] McGill, P., Schumaker, M. F., *Boundary conditions for single-ion diffusion*, Biophys. J., 1996, 71, 1723-1742.
- [59] McQuerry, D. A., *Statistical Mechanics*, 2000, University Science Books: Sausalito.
- [60] Milne-Thomson, L. M., *The calculus of finite differences*, 1960, McMillan: London.

- [61] Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., MacKinnon, R., *Energetic optimization of ion conduction rate by the K^+ selective filter*, Nature 2001, 414, 37-42.
- [62] Morse, P. M., Feshbach, H., *Methods of Theoretical Physics*, Vol. 2, 1953, McGraw-Hill: New York.
- [63] Moy, G., Corry, B., Kuyucak, S., Chung, S.H., *Tests of continuum theories as models of ion channels: I. Poisson-Boltzmann theory versus Brownian dynamics*, Biophys. J., 2000, 78, 2349-2363.
- [64] Neher, E., Sakmann, B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*, Nature, 1976, 260, 779-802.
- [65] Nelson, P., *Biological Physics: Energy, Information, Life*, 2004, W. H. Freeman and Company: Nova York.
- [66] Partenskii, M.B., Jordan, P.C., *Theoretical perspectives on ion-channel electrostatics: continuum and microscopic approaches*, Q. Rev. Biophys., 1992, 25, 477-510.
- [67] Reif, F., *Fundamentals of statistical and thermal physics*, 1965, McGraw-Hill: Nova York.
- [68] Roux, B., *Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein*, Biophysical Journal, 1997, 73, 2980-2989.
- [69] Roux, B., *Statistical mechanical equilibrium theory of selective ion channels*, Biophysical Journal, 1999, 77, 139-153.
- [70] Roux, B., *Environment of a membrane protein*, The Encyclopedia of Computational Chemistry, 1998, John Wiley and Sons: Chichester.
- [71] Roux, B., Allen, T., Bernèche, S., Im, W., *Theoretical and computational models of biological ion channels*, Quarterly Review of Biophysics, 2004, 37, 15-103.
- [72] Roux, B., Karplus, M., *Molecular dynamics simulations of the gramicidin channel*, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1994, 23, 731-761.

- [73] Sands, Z., Grotessi, A., Sansom, M.S.P., *Voltage-gated ion channels*, Current Biology, 2005, 15, R771-R774.
- [74] Skou, J.C., *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves*, Biochim. Biophys. Acta., 1957, 23, 394-401.
- [75] Starace, D.M., Bezanilla, F., *A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field*, Nature, 427, 2004, 548-553.
- [76] Tolokh, I.S., Tolokh, I.I., Cho, H.C., D'Avanzo, N., Backx, P.H., Goldman, S., Gray, C.G., *Non-Michaelis-Menten kinetics model for conductance of low-conductance potassium ion channels*, Physical Review E, 2005, 71, 021912-1 - 021912-9
- [77] Toyoshima, C. e Unwin, N., *Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes*, Nature, 1988, 336, 247-250.
- [78] van Gunsteren, W. F., Berendsen, H.J.C., *Algorithms for Brownian dynamics*, Mol. Phys., 1982, 45, 637- 647.
- [79] Yeagle, P. L., *The membranes of cells*, 2^a ed., 1993, Academic press: San Diego.
- [80] Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall W.A., *Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily*, Pharmacological Reviews, 2005, 57, 387-395.
- [81] Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., MacKinnon, R., *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*, Nature, 2001, 414, 43-48.