



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE

HELIOVÂNIO TORRES BANDEIRA

**MODELO CAÓTICO E A MEMÓRIA DA CINÉTICA DOS
CANAIS IÔNICOS**

RECIFE

2006

HELIOVÂNIO TORRES BANDEIRA

**MODELO CAÓTICO E A MEMÓRIA DA CINÉTICA DOS
CANAIS IÔNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biometria da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Biometria

Orientador: Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

RECIFE

2006

HELIOVÂNIO TORRES BANDEIRA

**MODELO CAÓTICO E A MEMÓRIA DA CINÉTICA DOS
CANAIS IÔNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biometria da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Biometria

**Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em
19 de junho de 2006.**

ORIENTADOR:

Presidente: _____

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira – UFRPE

EXAMINADORES:

1º Examinador: _____

Dr^a. Cláudia Helena Dezotti - UFRPE

2º Examinador: _____

Dr. Adauto José Ferreira de Souza - UFRPE

3º Examinador: _____

Dr. Catão Temístocles de Freitas Barbosa - UFPE

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Agravípio Euclides Torres Bandeira (in memoriam); à minha mãe: Josete Félix de Andrade; aos meus irmãos: Hebevânia, Herivânio, Heldervânio e Herlivânia; aos meus sobrinhos: João Gabriel, Camila Carla e Gisele Carla.

AGRADECIMENTOS

A Deus que nos orienta e fortalece em nossa caminhada.

Ao meu orientador e pai científico Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira pela amizade, paciência e dedicação na condução desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Catão Temístocles de Freitas Barbosa pela amizade profissionalismo e pela grande ajuda na modelagem matemática deste trabalho.

A mestra Regina Acácia Campos de Oliveira pela gentileza e pela grande ajuda na modelagem matemática deste trabalho.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Biometria professor Dr. Eufrásio de Souza Santos pela dedicação e firmeza a este programa.

Aos professores deste mestrado Dr^a Maria Adélia, Dr. Borko Stosic, Dr^a Cláudia Dezotti, Dr. Eufrásio Santos, Dr. Gauss Cordeiro, Dr. Paulo de Paula e o Dr. Romildo Nogueira.

Aos secretários do mestrado em Biometria Aldameres Vasconcelos e Marco Antônio pela atenção dada aos alunos deste curso.

Aos colegas da turma de 2004 Ady Marinho, Antônio Lopes, Antônio Oliveira, Arundo Júnior, Carlos Batista, Cícero Brito, Dâmocles Aurélio, Fábio Cavalcanti, Franklin Tupinambá, Hérbetes Hollanda, Ilzes Santana, Leonardo Mendes, Sérgio Paiva, pela amizade e companheirismo ao desta lide.

Aos companheiros do LABTEC Ana Carolina Kunicki, Bruno Tenório, Edbergue Ventura, Hellen White, Jeine Emanuele, Walter Santos, pelo agradável convívio e amizade de todos.

Aos Professores e amigos Davi Vieira, Cícero Monteiro, José de Arimatéa, Josinalva Estácio e Maria do Socorro Brasileiro pelo incentivo dado desde a graduação.

À minha mãe Josete Felix de Andrade exemplo de luta e determinação.

Aos meus irmãos Hebevânia, Herivânio, Heldervânio e Herlivânia que sempre me incentivaram e apoiaram para prosseguir em meus estudos.

Aos meus sobrinhos João Gabriel, Camila e Gisele que mesmo sem entender bem o significado de Biometria souberam me apoiar nesta etapa de minha vida.

A Luiz Carlos dos Santos pela compreensão, amizade e apoio.

RESUMO

Canais iônicos são compostos de uma ou poucas moléculas de proteínas que se encontram nas membranas biológicas e constituem uma das vias possíveis para o transporte de íons através dessas membranas. Essas proteínas podem assumir diferentes estados conformacionais, abertos e fechados, fenômeno denominado de cinética de canais iônicos. As transições entre os estados cinéticos dos canais dependem das barreiras de energias potenciais que separam esses estados e, que podem ser controladas por campo elétrico, íons, substâncias químicas e outros agentes. Os tempos de permanências dos canais em cada um dos estados conformacionais têm sido modelados assumindo-se que este processo é markoviano. Um modelo caótico também foi proposto para modelar a cinética de canal iônico (LIEBOVITCH e TÓTH, 1991).

Neste trabalho utilizamos a análise R/S de *Hurst* para testar a correlação de longo alcance (memória) na cinética de um canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*. O coeficiente de Hurst H , um parâmetro que mostra a memória existente em um processo cinético (NOGUEIRA et al., 1995), foi calculado para um registro de um canal para potássio ativado por cálcio e foi encontrado um valor de $H = 0,66 \pm 0,044$ ($n=4$), evidenciando que o sistema apresenta uma memória persistente.

A análise R/S aplicada à seqüência temporal de aberturas e fechamentos obtida para um canal iônico simulado por um modelo caótico mostrou que esse modelo é inadequado para descrever a correlação de longo alcance encontrada nos dados experimentais. Como conclusão, este trabalho mostra que: (i) tempos de permanência para aberturas e fechamentos do canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig* apresentam correlação de longo alcance (memória); (ii) o modelo caótico, proposto por Liebovitch e Tóth (1991), é inadequado para descrever a memória encontrada na cinética do canal.

ABSTRACT

Ionic channels are formed by one or few protein molecules found in biological membranes and constitute one of the possible ways for the transport of ions through these membranes. These proteins can assume different conformational open and closed states, phenomenon named ion channel kinetics. The transitions from one state to another are dependent on the potential energy barrier that separates them and can be controlled by electric field, ions, chemical substances and other physical agents. The dwell times in which the protein-channel stays in one these conformational states have been modeled assuming that the process is Markovian. A chaotic model also was proposed for modeling the ion channel kinetics (LIEBOVITCH e TÓTH., 1991).

In this work we use the R/S Hurst analysis to test the long-range correlation found in calcium-activated potassium channel kinetics in Leydig cells. The Hurst coefficient H , a parameter that show the memory existent in a kinetic process (NOGUEIRA et al., 1995), was calculated to a calcium-activated potassium channel in Leydig cells recording and it was equal to $H = 0,66 \pm 0,044$ ($n=4$), disclosing that the system presents a persistent memory. The R/S analysis when applied to the opening and closing dwell time series obtained from ion channel simulated data using a chaotic model was inadequate to describe the long-term correlation previously found in the experimental data. As conclusion, this work shows that: (i) really, opening and closing dwell times for the single calcium-activated potassium channel of Leydig cells present long-term correlation and (ii) the chaotic model, proposed by Liebovitch and Thót (1991), is not adequate to describe the memory found in the kinetic of this channel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação esquemática dos processos envolvidos na biossíntese dos andrógenos na célula de <i>Leydig</i>	05
Figura 02. – Estrutura conformacional de um canal para potássio dependente de voltagem.....	08
Figura 03 – Perfil da arquitetura de canais para potássio durante o processo de transporte do íon K^+	09
Figura 04 – Esquema cinético representativo de um modelo markoviano de dois estados.....	11
Figura 05 – Representação esquemática de um mapa logístico com diferentes respostas.....	16
Figura 06 – Atrator de Lorenz.....	17
Figura 07 – Esquema ilustrativo para corrente de convecção.....	18
Figura 08 – Diagrama de bifurcação.....	20
Figura 09 – Mapa linear e a sua dinâmica.....	22
Figura 10 – Sinal da corrente no canal.....	22
Figura 11 – Representação esquemática do reservatório de Hurst.....	25
Figura 12 – Esquema da técnica de <i>Patch-Clamp</i> nas configurações <i>Insid-out</i> e <i>whole-cell</i>	30
Figura 13 – Gráfico da análise de <i>Hurst</i>	33
Figura 14 – Fluxograma da análise de <i>Hurst</i> aplicada à seqüência de tempos de permanências de um registro de canal iônico.....	36
Figura 15 – Exemplo de aleatorização de dados temporais empregada	

na verificação de memória dos registros experimentais.....	37
Figura 16 – Esquema representativo de um simulador caótico de dois estados cinéticos.....	38
Figura 17 – Modelo Markoviano de dois estados.....	39
Figura 18 – Ajuste da curva teórica do modelo Markoviano de dois estados feito pelo programa QuB para os dados experimentais.....	39
Figura 19 – Registro de corrente unitária do canal para potássio ativado por cálcio em célula de <i>Leydig</i> dos dados experimentais.....	41
Figura 20 – Distribuição dos coeficientes H aleatorizados do registro 98525017 em 100 estágios de aleatorização.....	43
Figura 21 – Registro de corrente unitária simulado pelo modelo caótico para o canal para potássio ativado por cálcio.....	44
Figura 22 – Distribuição dos coeficientes H simulados pelo modelo caótico para 74 registros de atividade do canal de potássio ativado por cálcio.....	45

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 01 – Coeficientes de <i>Hurst</i> de quatro registros experimentais da atividade de um canal para potássio ativado por cálcio em célula de <i>Leydig</i> antes e após a aleatorização dos dados.....	42
--	-----------

SUMÁRIO

1.1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1.2.1. A Célula de Leydig.....	4
1.2.2. Canais para potássio dependentes de voltagem e da presença do íon cálcio.....	6
1.2.3. O Modelo Markoviano para a Cinética de Canais Iônicos.....	10
1.2.4. O Modelo Caótico para a Cinética de Canais Iônicos.....	12
1.2.5. Uma breve descrição sobre a teoria do caos.....	13
1.2.7. A Análise R/S de Hurst.....	24
2. OBJETIVO.....	28
3. MATERIAL E MÉTODO.....	29
3.1. A Técnica de Patch-Clamp.....	29
3.2. Registro de corrente no canal para potássio ativado por cálcio em células de Leydig.....	30
3.3. Análise R/S de Hurst.....	31
3.4. Aplicação do Método de Hurst na Cinética de Canais Iônicos.....	34
3.5. Simulação do Modelo Caótico.....	37
3.6. Métodos Estatísticos.....	40
4. RESULTADOS.....	41
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7 – REFERÊNCIAS.....	51

Apêndice 1	55
<i>Programa para calcular o coeficiente H da análise R/S de Hurst</i>	55
Apêndice 2	58
<i>Programa de aleatorização de uma seqüência temporal</i>	58
Apêndice 3	59
<i>Programa para gerar uma seqüência caótica de tempos de abertura e fechamento de um canal iônico de dois estados</i>	59

1.1. INTRODUÇÃO

Vários processos fisiológicos envolvem a presença de canais iônicos e um desses é a despolarização e a repolarização das células de *Leydig* pela eletrodifusão do íon potássio para o exterior dessas células durante o processo da secreção de testosterona.

Canais iônicos são proteínas presentes nas membranas biológicas, cujas transições entre diferentes estados conformacionais dessas macromoléculas permitem a abertura e fechamento de vias para o transporte de íons entre o interior e o exterior das células ou vice-versa. A análise dos tempos de permanências dessas macromoléculas em cada um desses estados conformacionais é denominado na literatura especializada de cinética de canais iônicos. Modelos teóricos têm sido usados para descrever as transições entre esses diferentes estados cinéticos, tais como os modelos markoviano, o fractal e o caótico.

No modelo Markoviano a representação da cinética de canais iônicos é descrita como uma cadeia de Markov de parâmetro contínuo – o tempo de observação do fenômeno – e espaço de estados discretos – os estados cinéticos. Num modelo com essas características, as probabilidades de transições, por unidade de tempo, denominadas de taxas cinéticas, entre os estados cinéticos dependem unicamente do estado presente do canal e não dos estados anteriores pelos quais o canal transitou e podem ser obtidas através da análise de funções densidades de probabilidades exponenciais que descrevem o processo da cinética de um determinado canal (COLQUHOUN e HAWKES, 1981; ALBERTSEN e HANSEN, 1994; KOCHETKOV et al., 1999; ROTHBERG e MAGLEBY, 1999).

No modelo fractal a cinética dos canais iônicos tem as seguintes características: 1. taxas de transições entre os estados cinéticos que dependem da resolução temporal no qual o fenômeno é observado (taxa de amostragem) ; 2. a corrente através do canal unitário é auto-similar em diferentes escalas temporais. Nesse modelo as taxas de transições entre os diferentes estados cinéticos seguem uma lei de potência com o tempo da forma $k = At^{1-D}$, onde D é a

dimensão fractal do processo cinético do canal e A um parâmetro dessa cinética (LIEBOVITCH et al., 1987).

A descrição da cinética de canais iônicos por um modelo do tipo caótico foi proposta por Liebovitch e Tóth, (1991). Nesse modelo os autores propõem que as transições entre os estados cinéticos decorrem de forças determinísticas em vez de flutuações randômicas da molécula formadora do canal. Formalmente, esse modelo caótico é baseado num mapa de iteração linear por partes, estabelecido por uma função determinística que depende de um pequeno número de variáveis independentes e mimetiza o comportamento randômico do canal iônico.

Nogueira et al. (1995), utilizando a análise R/S de *Hurst*, mostraram que a seqüência dos intervalos de tempos abertos e fechados da cinética do maxi-canal de potássio ativado por cálcio em células de *Leydig* é um processo que apresenta correlação de longo alcance ou memória. A presença de memória na cinética de canais iônicos não condiz com a descrição markoviana desse processo, pois neste tipo de modelo os tempos de permanências nos diferentes estados cinéticos são randômicos. Recentemente, Oliveira et al. (2006) mostraram que a simulação da cinética do canal de potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*, por um modelo fractal, também não reproduz a memória observada na cinética desse canal.

Um problema importante a ser resolvido nesse tipo de estudo é encontrar um modelo teórico que descreva a memória observada na cinética de canais. A identificação desse modelo é um importante passo para a resposta da seguinte questão: qual o mecanismo molecular que controla a cinética dos canais iônicos?

Neste trabalho investigaremos se o modelo caótico proposto por Liebovitch e Tóth (1991) é adequado para descrever a memória da cinética de canais de potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*.

Devido à interdisciplinaridade do tema abordado e visando tornar o texto compreensível a profissionais de áreas tão díspares como matemática, estatística, física, biologia etc. será realizada uma revisão da literatura, onde serão descritas as células de *Leydig*, os maxi-canais para potássio ativados por cálcio em diferentes células, os fundamentos da teoria do caos, os modelos markoviano e

caóticos para descrição da cinética dos canais iônicos e a análise R/S de *Hurst*, que será o método usado nesse trabalho para identificação de memória na cinética dos canais.

1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. A Célula de *Leydig*

Células de *Leydig* são células intersticiais dos testículos e são responsáveis pela maior parte da produção de testosterona em animais machos. Sua atividade está sob controle hipofisário e responde ao hormônio luteinizante (LH), que leva ao aumento da produção e secreção de testosterona. O acoplamento excitação-secreção nestas células está relacionado com o aumento dos níveis intracelulares de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) e Ca^{2+} (íon cálcio) (JANSZEN et al., 1976; DUFAU et al., 1981). Estes eventos iniciais ocorrem poucos segundos depois da ligação do LH ao seu receptor. O hormônio luteinizante (LH) ou a gonadotropina coriônica humana (hCG) despolarizam as células de *Leydig*. A repolarização destas células é sugerida ser realizada por um canal para potássio ativado por cálcio, existente nestas células (KAWA, 1987; CARNIO e VARANDA, 1995). A molécula de LH associa-se ao seu receptor alvo na membrana da célula de *Leydig*, onde o complexo LH-receptor ativa o adenilato ciclase, catalisando a formação de AMPc. O AMPc citoplasmático liga-se à subunidade reguladora de uma proteína quinase, que subsequente se dissocia, influenciando na ativação da unidade catalítica da enzima. Esta enzima ativada, por seu lado, inicia muitos eventos intermediários, que finalmente dirigem a conversão de colesterol em pregnenolona, o que resulta em um aumento da produção de testosterona (PATTON et al., 1989; AIRES, 1999) (Figura 1)

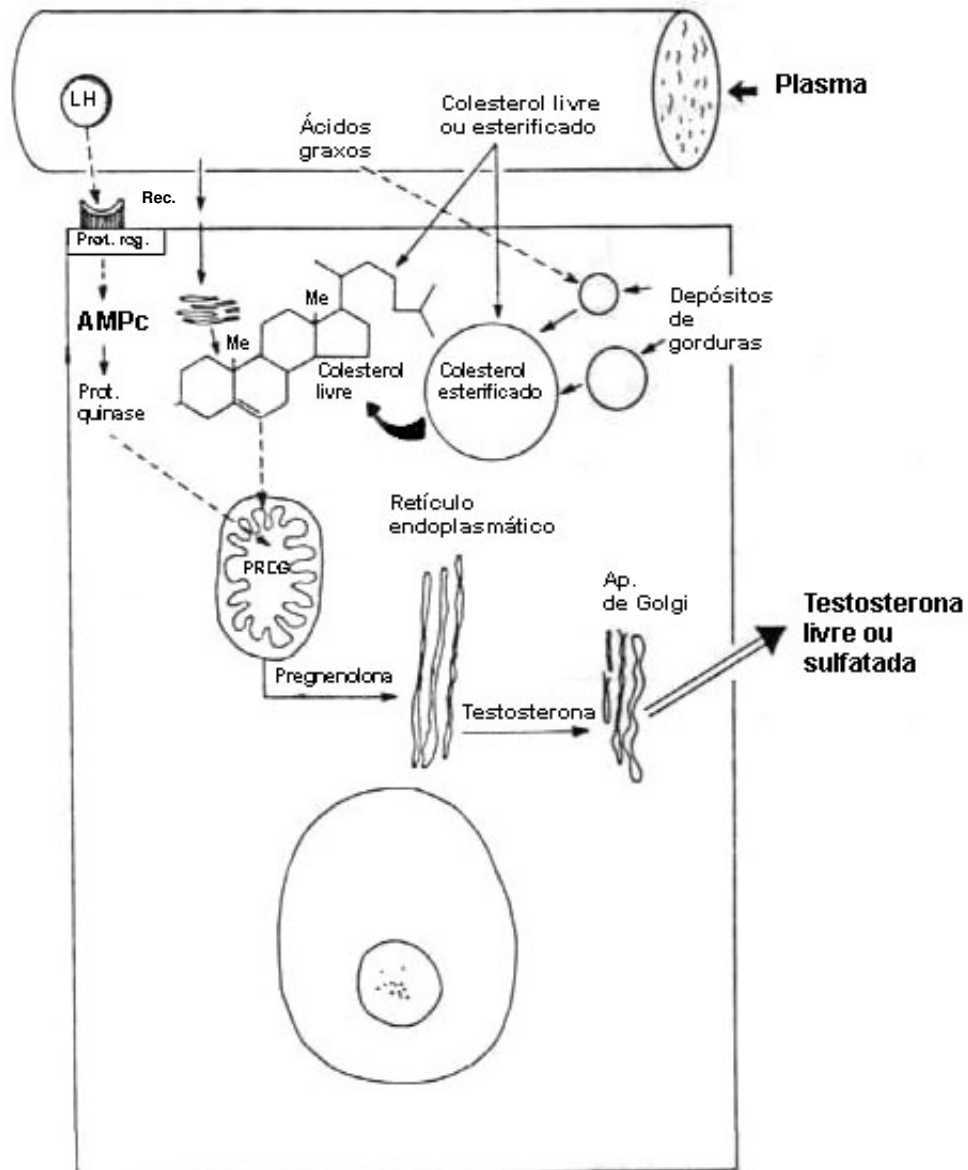


FIGURA 1. Representação esquemática dos processos envolvidos na biossíntese dos andrógenos na célula de *Leydig*. Rec. = receptor; Prot. Reg. = proteína reguladora; Me = CH_3 (AIRES, 1999).

Experimentos eletrofisiológicos realizados por KAWA (1987) em células de *Leydig* de ratos e camundongos revelaram que sua membrana celular apresenta uma diferença de potencial de repouso, medida com microeletrodos entre -25 e -30 mV e parece depender parcialmente da eletrodifusão de íons K^+ . Del Corso e Varanda (2003) utilizando a técnica de **patch-clamp** (ver material e método, figura 12) na configuração **whole-cell** (ver material e método, figura 12)

mostraram que o potencial de repouso em células de *Leydig* de camundongo é de $-32,2 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$ ($n = 159$), sensível a concentrações extracelulares de K^+ e Cl^- e é estabelecido principalmente pela ação da bomba de sódio-potássio (Na^+ - K^+). A aplicação de LH ou gonadotropina coriônica humana (hCG) a estas células leva à despolarização. Em 1987, Kawa reportou a regeneração do potencial de membrana, após a despolarização induzida pelo hormônio luteinizante, em células de *Leydig* de camundongos. Medições de correntes celulares têm revelado a presença de correntes distintas constituídas por Ca^{2+} , Cl^- e/ou K^+ , dependendo da espécie estudada (CARNIO e VARANDA, 1995). O tratamento hormonal das células com LH pode aumentar algumas dessas correntes. Kawa (1987) tinha sugerido a presença de canais de potássio (K^+) ativados por cálcio (Ca^{2+}) (K_{Ca}) em células de *Leydig* e Carnio e Varanda (1995), usando a técnica de **patch-clamp** em células de *Leydig* de camundongos, demonstraram a presença de um canal de alta condutância e seletivo a K^+ cuja cinética mostrou-se dependente dos níveis de Ca^{2+} livre, que banhavam a superfície intracelular desse canal (K_{Ca}). A atividade do canal na configuração **cell-attached** (ver material e método) foi mostrada por Carnio e Varanda (1995) ser modulada por hCG e AMPc adicionadas às soluções banhantes.

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

Os canais para potássio dependentes do íon cálcio e voltagem, tais como o canal para potássio ativado por cálcio em célula de *Leydig*, são membros de uma família de proteínas sinalizadoras de membrana. Essas proteínas possuem poros através dos quais passam cerca de milhões de íons por segundo com surpreendente seletividade e transitam entre os estados abertos e fechados em milissegundos à medida que varia a voltagem ou a concentração do íon cálcio (ligante). Os mais simples desses canais são homotetrâmeros, com cada subunidade contendo um sensor de voltagem (YELLEN, 2002). A figura 2 mostra a

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

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

BK são canais para potássio dependentes de voltagem e Ca^{++} e que apresentam uma elevada condutância entre 100 e 250 picosiemens e por isso, são denominados maxi-canais para potássio (HILLE, 2001). A sua ativação por voltagem ocorre de forma semelhante a dos outros canais dependentes de voltagem, como o de K^+ , Na^+ e Ca^{++} com a participação do segmento transmembrana S4 (HU et al., 2003). Hu et al. (2003) mostraram que, em canais do tipo BK, o segmento transmembrana S4 responsável pela sensibilidade à voltagem não parece estar envolvido no processo de ativação pelo íon cálcio. Porém, a ativação de canais BK pelo íon magnésio depende do segmento transmembrana S4 (HU et al., 2003).

Os canais BK são encontrados em muitos tipos de células, incluindo-se os neurônios, células da musculatura lisa e da musculatura esquelética. A diversidade dos tipos de células que contêm estes canais é compatível à diversidade arquitetônica exibida pelas subunidades que os compõem. Estudos

prévios demonstraram que vários canais BK específicos apresentavam um único tipo de subunidade α , mas cada uma apresentava uma subunidade β discretamente diferente. A diferença das subunidades β permite que os canais BK de diferentes tipos de tecido respondam diferentemente ao cálcio e aos impulsos elétricos (BRENNER et al., 2000). As subunidades β também estão envolvidas na modulação por hormônios esteróides dos canais BK. Estradiol quando associado às subunidades $\beta 1$, facilitam a ativação por voltagem e Ca^{++} dos canais do tipo BK (KING et al., 2006).

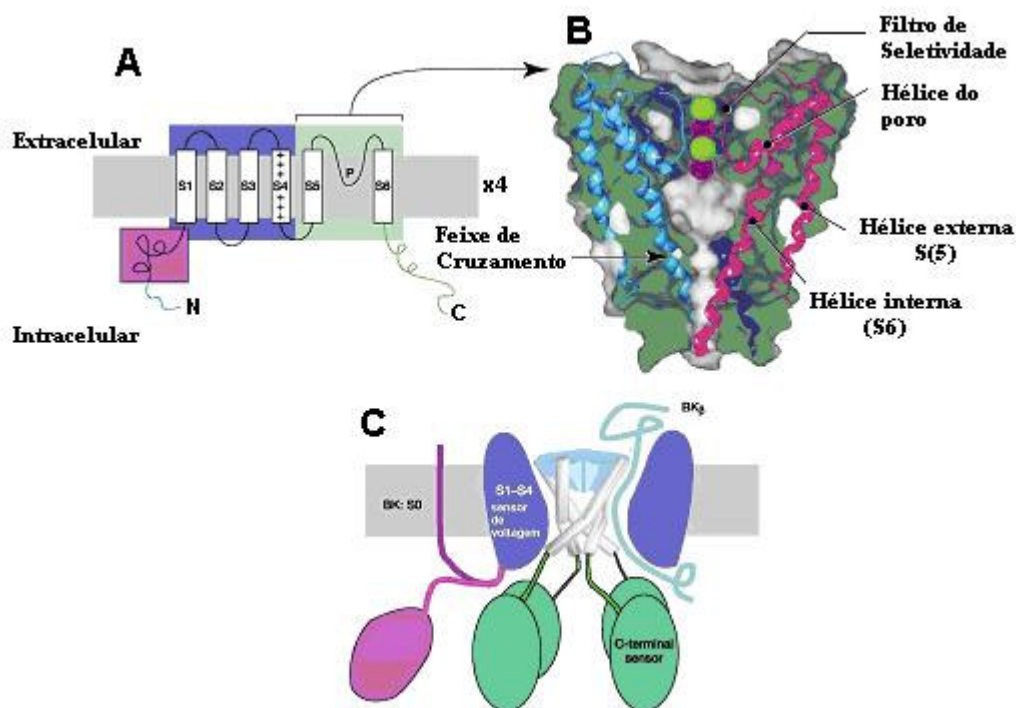


FIGURA 2. Estrutura conformacional de um canal para potássio dependente de voltagem. Os canais de potássio ativados por cálcio são caracterizados pela presença de um terminal sensor – terminal C, cuja função é determinar a localização física do canal e sua associação com complexos sinalizadores. Em alguns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

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

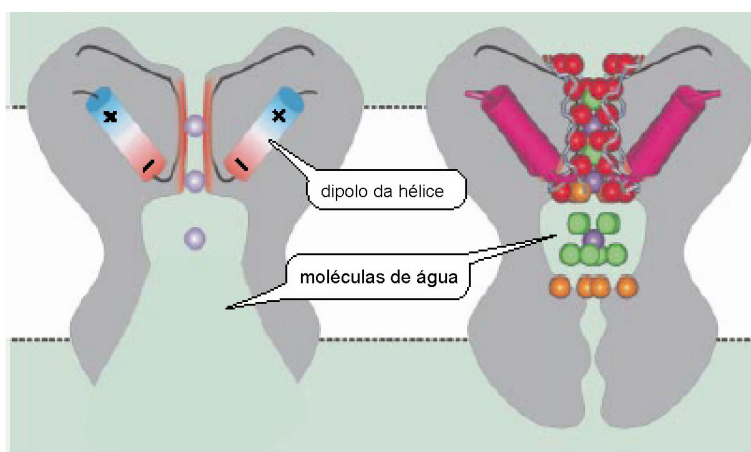


FIGURA 3. Perfis da arquitetura de canais para potássio durante o processo de transporte do íon K^+ . Perfil aproximado para um canal aberto (esquerda) e numa visão com maiores detalhes (direita). O diagrama da direita mostra um acesso mais estreito e provavelmente fechado uma cavidade preenchida com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

1.2.3. O Modelo Markoviano para a Cinética de Canais Iônicos

Nos processos estocásticos as variáveis aleatórias que representam os estados no espaço de eventos $\{X(t_1), X(t_2), \dots, X(t_n)\}$, apresentam algum tipo de dependência. O tipo de dependência mais simples que um processo estocástico pode apresentar é a dependência de Markov. Numa cadeia de Markov é possível prever-se o estado futuro da cadeia conhecendo-se unicamente o seu estado atual. Desta forma, o futuro da cadeia não depende do espaço de estados passados da cadeia. Um processo estocástico com essas características é dito sem memória.

Na cinética de canais iônicos a cadeia de Markov é uma cadeia de parâmetro contínuo – o tempo de observação do fenômeno – e espaço de estados discretos – os estados cinéticos. Num modelo com essas características, as probabilidades de transições, por unidade de tempo, entre os estados cinéticos dependem unicamente do estado presente do canal e não dos estados anteriores pelo qual o canal transitou (COLQUHOUN e HAWKES, 1981; ALBERTSEN e HANSEN, 1994; KOCHETKOV et al., 1999; ROTHBERG e MAGLEBY, 1999). A cinética dos canais iônicos tem sido modelada considerando-se que os tempos nos quais a proteína formadora do canal permanece nos seus diferentes estados cinéticos obedece a um processo estocástico Markoviano. Processos Markovianos são caracterizados por funções densidades de probabilidade do tipo exponencial.

Experimentalmente, a análise é realizada a partir do registro da corrente que passa através de um único canal iônico, usando-se a técnica de **Patch-Clamp**, desenvolvida por Sakmann e Neher em 1976. Nesse registro a duração dos tempos de permanências do canal nos estados abertos e fechados podem ser medidos e, obtidas as taxas de transições entre os diferentes estados cinéticos. As taxas de transições são obtidas a partir dos histogramas dos tempos de permanências do canal nos estados abertos e fechados. A cada estado cinético do canal é associado um termo exponencial do tipo $\exp(-kt)$ no histograma, sendo os k 's parâmetros que refletem as taxas de transições entre dois estados possíveis

do canal (AIDLEY e STANFIELD, 1996). Dependendo da quantidade de estados que o canal apresenta, os histogramas de tempo de permanência podem ser combinados em uma ou mais exponenciais na forma geral:

$f(t) = \sum A_i e^{-k_{ij}t}$, onde os A_i são constantes, os k_{ij} são constantes de transições entre os estados cinéticos e t o tempo.

A análise Markoviana permite descrever a cinética de canais do tipo BK com modelos de muitos estados cinéticos (ROTHBERG e MAGLEBY, 1999). Neste trabalho foi usado um modelo simples de dois estados na simulação do canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*, representado pelo esquema cinético a seguir:

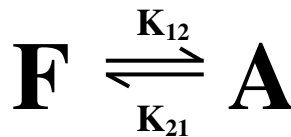


FIGURA 4. Esquema cinético representativo de um modelo Markoviano de 2 estados, com 1 estado fechado (F) e 1 estado aberto (A).

F e A representam os estados cinéticos fechado(F) e aberto(A), respectivamente; K_{12} e K_{21} suas respectivas taxas de transições entre os estados. Num modelo com essas características, a função densidade de probabilidade para os intervalos de fechamentos e aberturas do canal pode ser descrita por uma exponencial, como segue:

$f(t) = \sum A_i e^{-k_{ij}t}$, onde os A_i são constantes, os k_{ij} são constantes de transições entre os estados conformacionais e t o tempo. (COLQUHOUN e HAWKES, 1981).

Na simulação do modelo de dois estados empregou-se um programa de computador específico denominado “QuB” (AUERBACH et al., 2000), descrito na seção de método. O uso desse programa possibilita a obtenção das taxas cinéticas do canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*. A obtenção dessas taxas cinéticas será usada na determinação de parâmetros que

permitirão descrever a cinética de canais do tipo BK por um modelo caótico, como o sugerido por Liebovitch e Tóth (1991) .

1.2.4. O Modelo Caótico para a Cinética de Canais Iônicos

Modelos Markovianos (discretos) baseiam-se em estados cinéticos discretos e independentes, onde a proteína formadora do canal tem limitado número de conformações distintas e a mudança entre uma conformação e outra é tida como um processo aleatório; enquanto que no modelo caótico as transições entre os estados cinéticos baseiam-se num conjunto de forças determinísticas em vez de flutuações randômicas da molécula formadora do canal (LIEBOVITCH e TÓTH, 1991). As aberturas e fechamentos dos canais resultam de processos determinísticos.

Os processos caóticos são caracterizados por suas propriedades: 1. ser determinístico, que significa ser regido por uma lei específica (uma função); 2. depender de um pequeno número de variáveis independentes; 3. mimetizar comportamento randômico; 4. sensibilidade às condições iniciais, significa que pequenas variações nas condições iniciais acarretam grandes diferenças no resultado final do processo.

Muitos sistemas naturais, sociais, biológicos, químicos e econômicos são essencialmente não-lineares. A descrição destes sistemas por modelos e técnicas não-lineares torna-se mais efetivas do que por modelos e técnicas lineares. Entretanto, as dificuldades inerentes ao estudo dos problemas não-lineares incentivaram cada vez mais o estudo e o desenvolvimento de modelos lineares bem comportados.

1.2.5. Uma breve descrição sobre a teoria do caos

Os estudos de modelos e técnicas lineares criaram paradigmas que ficaram enraizados na tradição histórica, como o determinismo de Laplace. O determinismo é uma doutrina filosófica que propõe que todo evento tem uma causa e que, ocorrendo esta causa, o evento acontece invariavelmente. O determinismo foi formulado como princípio universal da natureza pelo matemático, astrônomo e físico francês Pierre Simon de Laplace (1749-1827).

No final do século XIX, Poincaré estudando o problema da dinâmica de três corpos, contrapôs as idéias do caos ao determinismo de Laplace. Apesar da nova visão não-determinística de Poincaré, só em 1963 foi que Lorenz utilizando a ferramenta computacional digital no estudo do fenômeno da formação de correntes de convecção entre duas placas mantidas a temperaturas distintas, retomou a idéia de sistemas caóticos. Ele observou que uma pequena variação nas condições iniciais poderia acarretar grandes diferenças na evolução do sistema. Este fenômeno ficou conhecido como efeito borboleta em alusão ao fato de o bater de asas de uma borboleta num lugar qualquer do planeta poder alterar a resposta de um sistema dinâmico em outra parte da Terra. Para Gleick (1987) esse trabalho trouxe a compreensão de que equações matemáticas simples podiam modelar sistemas bastante complexos.

Os sistemas dinâmicos são descritos por um conjunto de grandezas (variáveis dependentes) que variam no tempo (variável independente). O estado de um sistema dinâmico é representado pelos valores, num dado instante, do conjunto de suas variáveis dependentes. A evolução de um sistema dinâmico é descrita por um conjunto de equações discretas ou contínuas (diferenciais) que constituem a regra que permite prever o seu comportamento futuro, global ou parcial, uma vez conhecido o seu estado inicial. Uma maneira prática de representar a evolução temporal de um sistema dinâmico é através de um espaço de fase. O espaço de fase foi proposto há aproximadamente cem anos atrás por Poincaré quando mostrou que uma série temporal pode ser descrita como um objeto no espaço (MOON, 1987). Na prática, o espaço de fase de uma série

temporal é obtido traçando-se um gráfico no qual as coordenadas de cada ponto são os valores da mesma variável em estudo nos instantes t (abscissa) e $t + \Delta t$ (ordenada). Espaço de fase é uma ferramenta que pode ser usada para diferenciar processos randômicos de determinísticos. A dimensão do espaço de fase de um sistema dinâmico coincide com o número de variáveis de estado deste sistema. Alguns sistemas dinâmicos determinísticos são capazes de apresentar comportamento caótico.

Nos fenômenos caóticos as pequenas diferenças nas condições iniciais do sistema podem produzir grandes diferenças no seu estado final. O crescimento dessas divergências nas condições iniciais podem ser descritas como segue: $\mathbf{\epsilon}(t) = \mathbf{\epsilon}_0 \cdot e^{\lambda t}$, onde $\mathbf{\epsilon}_0$ é a diferença das condições iniciais, $\mathbf{\epsilon}$ é a propagação das divergências das condições iniciais sobre o comportamento do sistema num instante t e λ é o expoente de Liapunov. Essa equação expressa a sensibilidade às condições iniciais, pois uma pequena diferença nessas condições iniciais cresce exponencialmente no tempo. O expoente de Lyapunov avalia a sensibilidade às condições iniciais, verificando a divergência exponencial no tempo de trajetórias vizinhas. Este é um importante critério utilizado para definir o caos em sistemas dinâmicos.

O termo caos é originado da palavra cháos, que em grego significa abertura ou fenda. Referência ao vazio do universo antes do seu início. Os romanos deram-lhe a conotação de desordem, contrariamente ao kósmos ou ordem. Nosso vernáculo, através dos dicionários modernos incorporou a idéia de desordem ao caos. Entretanto, é incorreto dizer que caos está ligado à desordem se ele é basicamente caracterizado pela sua sensibilidade às condições iniciais.

O sistemas caóticos se caracterizam por apresentarem comportamento aparentemente aleatório, porém são governados por leis bem definidas e que apresentam uma grande sensibilidade às variações das condições iniciais. Sistemas como estes, regidos por leis bem definidas, são chamados sistemas determinísticos. O caos que eventualmente aparece nestes sistemas é chamado de caos determinístico.

Sistemas dinâmicos discretos têm sido usados com sucesso na modelagem de vários processos biológicos como o número dos indivíduos de uma espécie em um ecossistema (MAY, 1976), os batimentos do coração (GUEVARA et al., 1981), e os intervalos entre os picos do potencial de ação nos neurônios (LÁBOS, 1981, 1984; GLASS e MACKEY, 1988).

Mapeamentos consistem fundamentalmente numa regra determinística que permite a obtenção das variáveis que descrevem o sistema em função de seus valores em instantes anteriores. A forma generalizada desse tipo de mapeamento é dada pela seguinte aplicação $X_{i+1} = F(X_1, \dots, X_i, \dots, a_1, \dots, a_n)$, onde os a_k são parâmetros do sistema.

Robert May, físico e biólogo na década de 1970, trabalhando no instituto de Estudos Avançados em Princeton, nos Estados Unidos, estudou detalhadamente uma função matemática na descrição da população de certas espécies ao longo dos anos. O modelo proposto por May (1976) é conhecido como mapa logístico e seu estudo foi extremamente importante para mostrar como sistemas muito simples poderiam ter um comportamento bastante complexo. Este mapeamento permite determinar a população em um dado ano (X_{n+1}) a partir de informações do ano anterior (X_n). A equação logística é a seguinte: $X_{n+1} = aX_n(1 - X_n)$. A variação do parâmetro **a** conduz ao surgimento da chamada rota para o caos por dobra de período. Uma representação gráfica do mapeamento logístico é mostrada na figura 5 para diferentes valores do parâmetro **a**. O espaço de fase da equação logística é um gráfico de X_{n+1} versus X_n .

Na figura 5 pode-se observar a representação esquemática de um mapeamento logístico baseado no modelo proposto por May (1976). O mapa apresenta uma grande sensibilidade às variações das condições iniciais. Para **a** = 2.5 após algumas iterações o sistema se estabiliza em um ponto (o atrator). Quando o valor de **a** é igual a 3.1 o sistema oscila entre dois valores e, para **a** = 3.8 aparece o comportamento caótico no sistema.

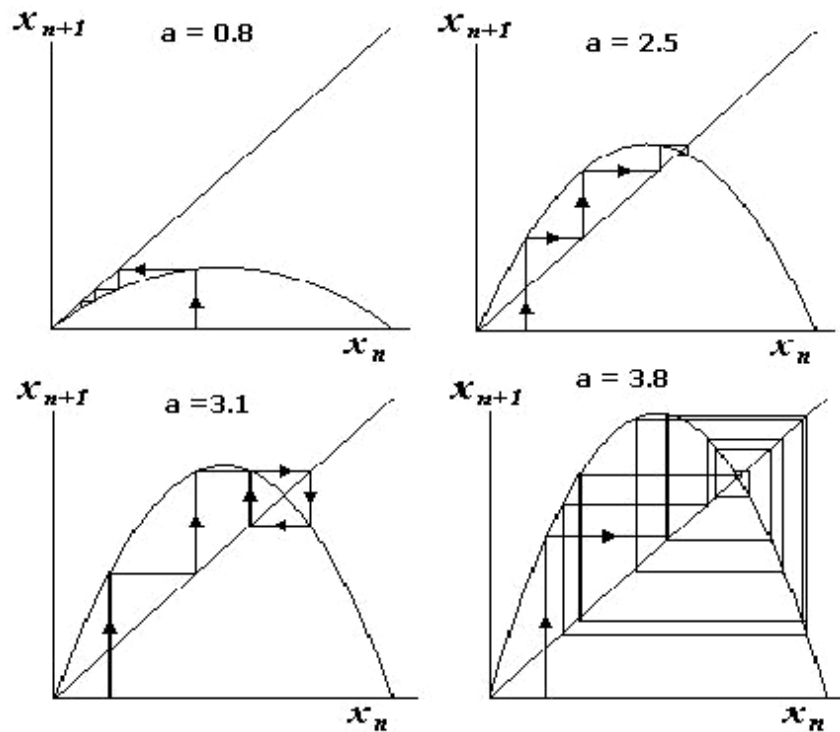


Figura 5. Representação esquemática de um Mapa logístico com diferentes respostas (GLEICK, 1987).

Atrator é o estado no qual um sistema dinâmico eventualmente se estabiliza. Um atrator é um conjunto de valores no espaço de fase para o qual o sistema migra com o tempo (se função contínua) ou por iterações (se função discreta). Basicamente, os atratores podem ser de três naturezas: puntiformes (um ponto), periódicos (um ciclo limite) e estranhos (caótico). Os dois primeiros tipos correspondem, respectivamente, a equilíbrios estáveis e à trajetórias periódicas, e o terceiro tipo corresponde a sistemas caóticos como o atrator de Lorenz. Na figura 6 é mostrada uma ilustração para o atrator de Lorenz.

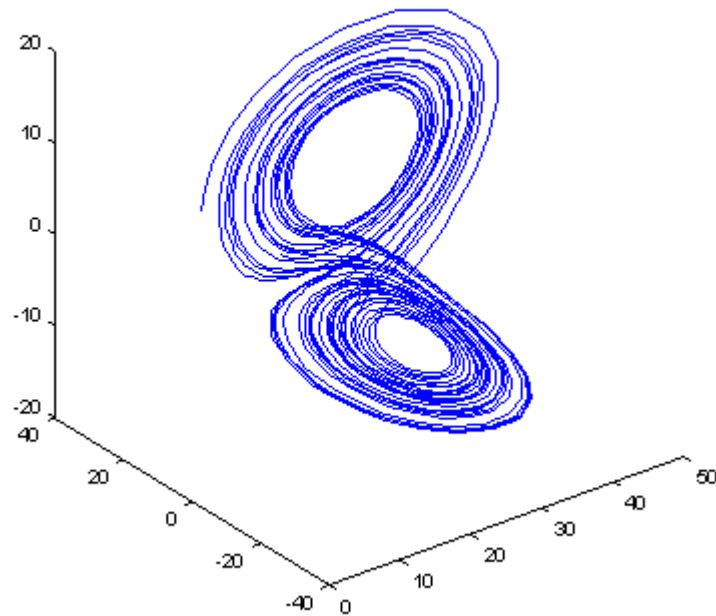


Figura 6. Atrator de Lorenz

Este atrator tem uma dimensão fractal $d = 2,03$, sendo formado por infinitas trajetórias dispostas num espaço finito. Na época da concepção do atrator de Lorenz, as idéias de Benoit Mandelbrot sobre estruturas fractais ainda não haviam sido difundidas pela comunidade científica, dificultando enormemente sua compreensão.

Lorenz se deparou com o caos estudando o fenômeno de formação de corrente de convecção entre duas placas mantidas a temperaturas distintas, separadas por um fluido.

O problema considera duas placas (inferior e superior). A placa inferior apresentando temperatura maior que a placa superior (figura 7). O gradiente de temperatura induz o fluido a se movimentar de forma ascendente enquanto que o efeito da gravidade induz o fluido a se movimentar de forma descendente. Quando a diferença de temperatura é pequena, existe condução de calor para a placa superior. Entretanto, quando a diferença de temperatura é maior que um certo

valor, a condução é substituída por convecção, situação em que a força ascensional devida às flutuações é demasiado intensa e supera a gravidade.

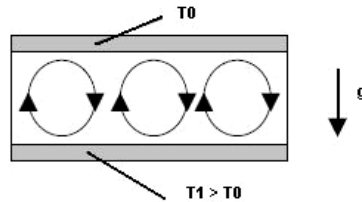


Figura 7. esquema ilustrativo para as correntes de convecção

Lorenz usou para descrever o processo de convecção o seguinte conjunto de equações diferenciais:

$$\frac{d x_1}{d t} = -\sigma x_1 + \sigma x_2$$

$$\frac{d x_2}{d t} = -x_1 x_3 + r x_1 - x_2$$

$$\frac{d x_3}{d t} = x_1 x_2 - b x_3$$

$$\sigma = 10, b = 8/3, r = 28$$

Onde, as variáveis são definidas como:

x_1, x_2, x_3 são funções reais do tempo e σ , r e b parâmetros reais positivos.

x_1 é proporcional a velocidade de circulação do fluido;

x_2 caracteriza a diferença de temperatura entre as correntes ascendentes e descendentes;

x_3 é proporcional aos desvios da temperatura vertical desde o valor do equilíbrio.

σ é o número de Prandtl, uma quantidade adimensional que depende da natureza do fluido. Para a água seu valor é entre 5 e 10.

O parâmetro r é o número de Rayleigh que está diretamente relacionado ao gradiente de temperatura. Variando-se a diferença de temperatura pode-se modificar a importância relativa dos efeitos não lineares.

A maioria dos experimentos numéricos tem sido realizada fixando-se $\sigma = 10$, $b = 8/3$ variando-se o parâmetro r . Lorenz fixou o valor dos parâmetros σ e b , variando o valor de r . Verificou assim que para valores de $r > 24,7$, o sistema apresentava um comportamento complicado, surgindo um atrator estranho. Ao resolver numericamente o sistema de equações descrito, Lorenz pôde visualizar o atrator (figura 6).

Rotas de ordem para o caos foram estudadas por Feigenbaum. A partir de equações simples o físico Feigenbaum (1979) encontrou estranhos resultados sobre os efeitos da recursividade matemática de determinadas funções, tal como os obtidos por Lorenz aos denominados “atratores estranhos”. Os sistemas caóticos podem transitar do previsível para o imprevisível, dependendo de valores de um ou mais parâmetros da equação ou equações que descrevem o sistema dinâmico. Na natureza os sistemas podem mudar de um regime estável para outro instável. Por exemplo, um fluxo laminar pode mudar para um fluxo turbulento ou um coração que batia regularmente (estável) pode passar para um estado de fibrilação (instável). Feigenbaum descobriu que existem certas leis universais presentes no comportamento de um sistema dinâmico na transição de um estado regular para um regime caótico, onde ocorrem as bifurcações.

O termo bifurcação está associado a uma mudança qualitativa no comportamento de um sistema dinâmico, como conseqüência de uma variação dos parâmetros de controle. Isto é, um salto qualitativo que progride para dinâmicas mais complexas, como pode ser visto na figura 9. O fenômeno da bifurcação está relacionado à existência de caos no sentido de que um sistema dinâmico que não apresenta algum tipo de bifurcação não apresenta uma resposta caótica. Entretanto, a recíproca não é verdadeira, ou seja, um sistema que apresenta bifurcações não apresenta, necessariamente uma resposta caótica.

Feigenbaum observou que a razão entre os comprimentos de uma bifurcação e a bifurcação posterior é uma constante igual a $\delta = 4,6692$ para qualquer fenômeno caótico. Este valor é atualmente conhecido como constante de Feigenbaum. A constante de Feigenbaum (δ) é dada pela seguinte relação: $\delta = \mu_n - \mu_{n-1} / \mu_{n+1} - \mu_n$. μ é o ponto onde ocorre as bifurcações.

A figura 8 representa um diagrama de bifurcações em função da variação de um parâmetro de controle de sistema dinâmico. Na figura 8 pode-se observar o surgimento das chamadas rotas para o caos por dobras de períodos $1 \Rightarrow 2 \Rightarrow 4 \Rightarrow 8 \Rightarrow 16 \Rightarrow \dots$ caos.

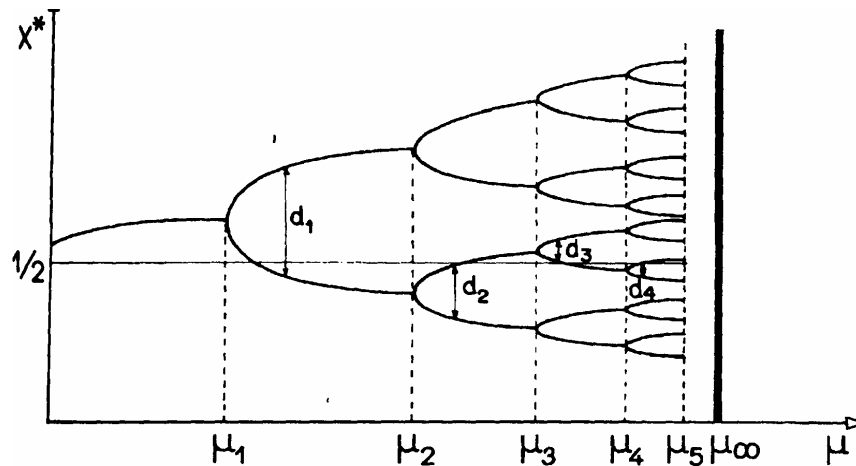


Figura 8. Diagrama de bifurcação

1.2.6. Um modelo caótico para cinética de canais iônicos

Na descrição da cinética de canais iônicos por um modelo do tipo caótico as transições entre os estados cinéticos decorrem de forças determinísticas em vez de flutuações randômicas da molécula formadora do canal (LIEBOVITCH e TÓTH, 1991). Este modelo alternativo é um mapa de iteração, linear por partes, e responde de forma semelhante a um modelo Markoviano de dois estados (fechado-aberto). Ou seja, o modelo determinístico consegue imitar o modelo de Markov onde a cinética é randômica.

Liebovitch e Tóth (1991) sugeriram um mapa de iteração para cinética do canal com os seguintes regimes: um que descreve o estado fechado; um outro que descreve a região de transição entre os estados; e, finalmente, um regime

para descrição do estado aberto. Formalmente, os três regimes do mapa iterativo são descritos pelas seguintes equações:

$$\begin{aligned} X(n+1) &= a_1x(n), & \text{com } 0 < x(n) < d_1 \\ X(n+1) &= [d_2 - x(n)] / (d_2 - d_1) & d_1 \leq x(n) \leq d_2 \\ X(n+1) &= a_2[x(n) - 1] + 1 & d_2 < x(n) < 1 \end{aligned}$$

Onde, d_i ($i = 1,2$) são os limites do subintervalo

a_i ($i = 1,2$) são as inclinações dos mapas lineares que correspondem aos estados fechado e aberto, respectivamente.

Os três regimes deste mapa são expressos pela função $f[X(n)]$.

O modelo de mapa linear por partes, a dinâmica do processo iterativo e o gráfico da corrente iônica através do canal são mostrados graficamente nas figuras 9A, 9B e 10. Na figura 9A é mostrado o espaço de fase do processo, normalizado para valores entre zero e um, tanto para o eixo horizontal como vertical. São mostradas, também, a diagonal do quadrado que delimita o espaço de fase e os parâmetros a_i ($i=1,2$) e d_i ($i=1,2$) que são as inclinações e os limites dos subintervalos dos estados, fechado e aberto, respectivamente.

A dinâmica inicia-se a partir de um certo valor x no eixo- x , que terá o seu valor correspondente na função $X(n+1) = f[X(n)]$. Este valor correspondente em $f[X(n)]$ é projetado sobre a diagonal do quadrado e, a partir deste valor inicia-se a próxima iteração. Este processo é repetido um grande número de vezes.

Uma trajetória típica a partir de $x(0)$, no estado fechado, dentro do subintervalo $(0,d_1)$, é mostrada na figura 9B. Após várias iterações $x(t)$ alcança um valor maior que d_1 e transita para o subintervalo intermediário. Neste subintervalo intermediário do mapa ocorre a mudança do estado fechado ao aberto. Uma vez que, o sistema atinge o estado aberto, começa a transitar neste estado, até alcançar a região de mudança, então voltará ao estado fechado. Este processo continua, produzindo uma variedade de tempos de permanências nos estados, aberto e fechado. Se, n é o número de iterações em um estado, então o tempo de permanência naquele estado é $n\Delta t$. Para este processo continuar sempre, devem ser cumpridas certas condições nos parâmetros a_i e d_i do modelo.

A condição mais importante para ocorrer uma mudança contínua entre os dois estados é que a_1 e a_2 sejam maiores que 1 para tornar a transição entre os respectivos estados possível. A média dos tempos de permanências em cada um dos estados dependerá dos valores atuais dos parâmetros correspondentes. Estes tempos de permanências serão mais curtos se as inclinações a_i ficarem mais íngremes, porque menos iterações bastarão para que haja mudança de estado. O valor de d_i também tem um impacto no comprimento da média dos tempos de permanências.

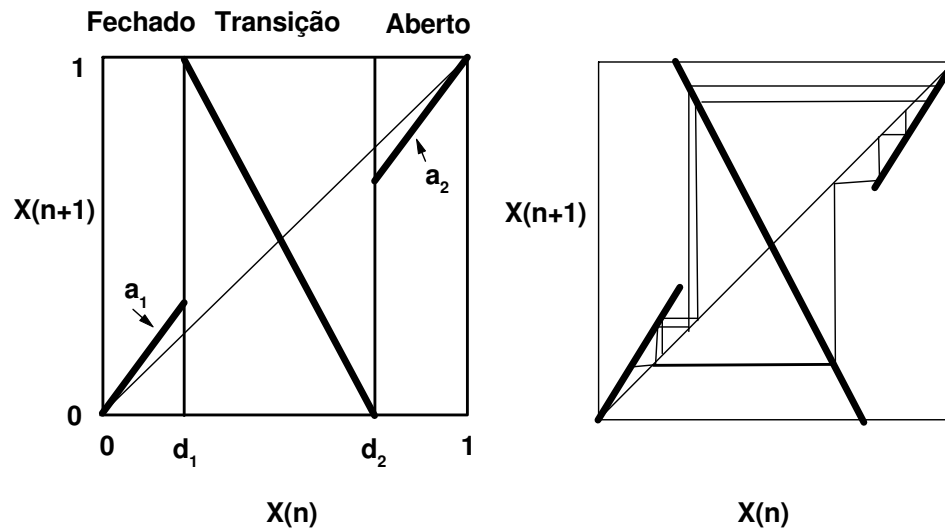


Figura 9. A(esquerda) Mapa linear com seus três regimes e B(direita) Dinâmica do processo.

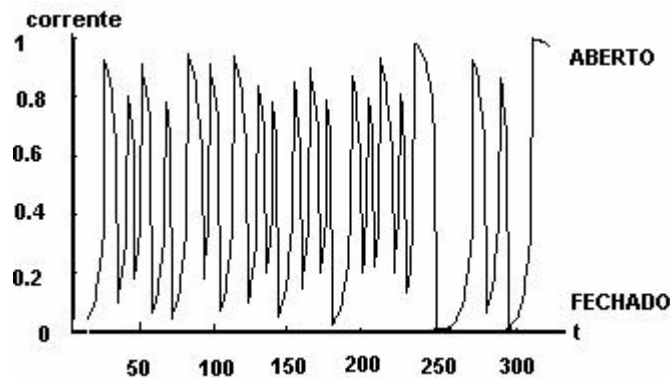


Figura 10: Sinal da corrente no canal (série temporal)

No modelo de mapa linear a evolução temporal da corrente $X(t)$ é sensível às condições iniciais e os seus valores divergem a uma taxa que é exponencialmente dependente do número de iterações n . A taxa desta divergência exponencial é o expoente de Lyapunov, que é igual ao $\ln a_1$. Para dois valores iniciais $X_1(0)$ e $X_2(0)$ no estado fechado após n iterações o mapa apresenta a seguinte configuração:

$$X_1(n) = a_1^n X_1(0)$$

$$X_2(n) = a_1^n X_2(0)$$

$$X_1(n) - X_2(n) = a_1^n [X_1(0) - X_2(0)] = [\exp(n \ln a_1)] [X_1(0) - X_2(0)].$$

O processo ocorre de forma semelhante para as iterações dentro do estado aberto. A região de mudança não altera esta dependência, e assim o mapa inteiro possui um subintervalo de dependência sensível às condições iniciais. Logo o mapa é caótico. Para períodos longos de tempo, se apenas as condições iniciais são conhecidas à precisão finita, não se pode prever a sucessão de tempo de $X(n)$ ou as durações dos tempos de permanências em cada estado. Contudo, o que se pode fazer é derivar a distribuição de probabilidade deles/delas. Fazendo-se $X(0)$ ser o primeiro ponto alcançado no estado fechado depois de uma mudança do estado aberto. Após $n\Delta t$ iterações $X(n) = a_1^n X(0)$, o canal ainda encontra-se no estado fechado se

$$a_1^n X(0) < d_1$$

$$X(0) < d_1 / a_1^n$$

O tempo de permanência $t = n\Delta t$ é proporcional ao número de iterações n no estado fechado. Por conseguinte, a probabilidade de ter um tempo de

permanência maior ou igual a $n\Delta t$ é igual à probabilidade de $X(0)$ está no intervalo

$$0 < X(0) < d_1 / a_1^n$$

Sendo o mapa caótico, $X(n)$ alcança todos os valores no intervalo $(0, d_1)$ com probabilidade igual. Então, a probabilidade de $X(0)$ está definida no intervalo $[0, d_1 / a_1^n]$ pode ser determinada como segue:

$$P[\text{tempo de permanência no estado fechado} > n\Delta t] = P[0 < x(0) < d_1 / a_1^n] = (d_1 / a_1^n) / d_1 = a_1^{-n} = \exp[-(\ln a_1)n].$$

Desde que n iterações correspondam à duração de tempo $n\Delta t$, a distribuição de probabilidade acumulada $P(t)$ para tempos de permanências é

$$P(t) = \exp(-kt)$$

Onde $k = \ln a_1$

Esta é a mesma distribuição de probabilidade acumulada $P(t)$ é predita pelo modelo de Markov para abertura-fechamento com taxas de transições k entre os estados aberto e fechado. Este modelo pode ser generalizado para vários subestados discretos aberto ou fechado. Isto pode ser obtido subdividindo, por exemplo, o intervalo que corresponde ao estado fechado em um número finito de subintervalos, e definindo em cada um destes subintervalos um mapa linear com inclinações diferentes.

1.2.7. A Análise R/S de Hurst

Hurst et al (1965) desenvolveu este método estatístico para medir memória na análise de séries temporais de diferentes processos. Este método tem sido amplamente aplicado a uma vasta gama de eventos, desde os fisiológicos até os hidrometeorológicos (HOOP et al., 1993; PENG et al., 1995; MONTANARI et al.,

1996; KARAMAVRUÇ e CLARK, 1997; MIRANDA e ANDRADE, 2001; PETERS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006). O tratado original de HURST (1951) contém várias informações obtidas durante sua carreira como engenheiro civil, geográfico e ecológico trabalhando no vale do rio Nilo. O engenheiro Harold Edwin Hurst precisava estimar, a partir de dados de precipitação pluviométrica durante um milênio na região do rio Nilo, que volume mínimo de água a represa de Assuã precisaria armazenar para fornecer um fluxo regular rio abaixo. Hurst se propôs a resolver o problema de como construir uma barragem de maneira que o reservatório nunca extravasasse e também nunca esvaziasse. Inicialmente, Hurst, propôs que o volume do reservatório é a integral no tempo da diferença entre o fluxo de entrada e de saída, como mostrado na figura 11. O *range* (R) representa a diferença entre os volumes máximo e mínimo sobre um período de tempo definido.

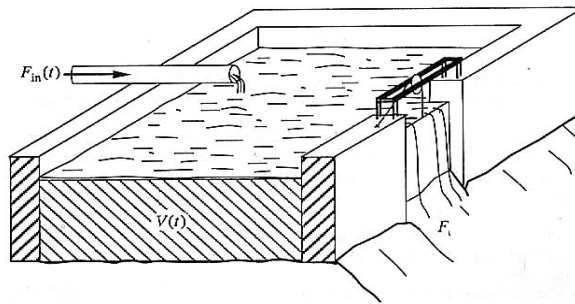


FIGURA 11. Representação esquemática do Reservatório de Hurst. As mudanças do volume do reservatório no tempo são medidas das diferenças acumuladas entre o fluxo de entrada e de saída. Se o fluxo de entrada cada ano é $F_{in}(t)$, então o fluxo de entrada acumulado sobre t anos será:

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

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

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

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

O objetivo de Hurst ao utilizar a análise estatística que levou o seu nome, no projeto da represa de Assuã, foi construir um reservatório ideal, no qual o fluxo de saída é controlado de tal maneira que o reservatório nunca transbordaria ou esvaziaria. Para tanto, Hurst analisou estimativas registradas de mais de mil anos, tais como os fluxos do rio, as turvações das bordas pelo lodo no lago (aluviões) durante o ano, turvações da coroa do rio Nilo e até mesmo os preços do trigo, entre outros eventos.

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

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

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

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

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

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

calcula-se o valor médio de R/S. A divisão dos dados em subconjuntos é realizada até um subconjunto de dois dados ser obtido.

Hurst mostrou que o valor médio da razão R/S para cada iteração obedece à seguinte relação empírica: $(R/S)_{\text{médio}} = (T/2)^H$, onde T assume valores iguais a τ , $\tau/2$, $\tau/4$, etc. O expoente H da relação empírica, denominado coeficiente de Hurst, permite determinar a existência ou não de memória (correlação) numa série temporal, no nosso caso, a seqüência de aberturas e fechamentos de um canal iônico. FELLER (1951) mostrou que para uma série temporal totalmente aleatória, o valor esperado do coeficiente H para esta série é igual a 0,5. Quando H difere de 0,5 diz-se que a função tem memória. Sendo $H > 0,5$ a série é positivamente correlacionada (memória positiva), ou persistente, onde uma tendência de crescimento no passado é mais provável de ser seguida por uma tendência de crescimento no futuro. Por outro lado, $H < 0,5$ indica uma antipersistência, (memória negativa), onde um aumento no passado é mais provável de ser seguido por um decréscimo no futuro (MALAMUD e TURCOTTE, 1999).

2. OBJETIVO

Investigar se o modelo caótico descrito por Liebovitch e Tóth (1991) permite gerar a memória encontrada por Nogueira et al. (1995) na seqüência dos tempos de aberturas e fechamentos do canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. A Técnica de *Patch-Clamp*

A técnica de *patch-clamp* foi desenvolvida por Sakmann e Neher, em 1976, na Alemanha, com o objetivo de registrar as correntes, da ordem de picoamperes, que fluem através de um único canal iônico (SAKMANN e NEHER, 1995).

Esta técnica consiste basicamente em aderir-se um microeletrodo de vidro (específico para *patch-clamp*) a membrana celular, numa região onde existe um canal iônico. Para conseguir-se uma boa aderência (selo) entre a pipeta e a membrana e reduzir o ruído durante o registro da atividade iônica é realizada uma sucção na pipeta de maneira que não haja fuga de corrente entre a pipeta e a membrana (gigaselo). Esse arranjo original, no qual o eletrodo de *patch* permanece sobre a célula depois que o gigaselo se forma é chamado de configuração *cell-attached*. Se a pipeta é arrastada para fora da célula e um *patch* (pedaço) da membrana é extirpado junto com a pipeta, forma-se uma nova configuração denominada *inside-out*. Neste caso, a face extracelular do *patch* da membrana está em contato com a solução na pipeta e a sua face citoplasmática é banhada pela solução externa. A vantagem neste caso, é que as soluções em contato com ambos os lados da membrana podem ser controladas, como também o potencial através da membrana. Uma forte sucção ou um breve pulso acima de 1V aplicado à configuração *cell-attached* perfura a célula, mantendo o gigaselo. Neste caso, o eletrodo de *patch* fica em contato com o interior da célula, e permite registrar tensões ou mudanças de corrente a partir da membrana de toda a célula. Esta última configuração é chamada de *whole-cell* (AYDLEY e STANFIELD, 1995) (figura 12).

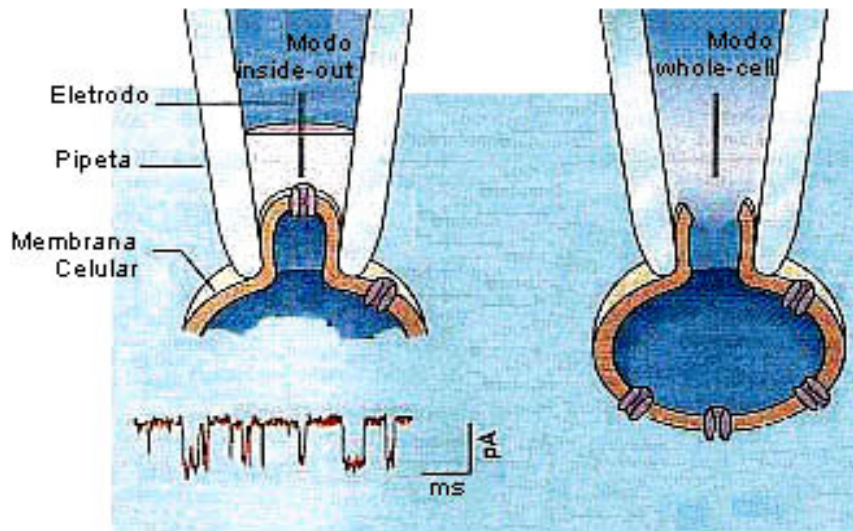


FIGURA 12. Exemplo de esquema da técnica de **patch-clamp** nas configurações **inside-out** e **whole-cell**. Na configuração **inside-out** o patch de membrana é extraído da célula para o registro da atividade iônica. No modo **whole-cell** o patch é perfurado e o eletrodo de medição tem acesso a todo o interior da célula.

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

Os registros das correntes no canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig* foram realizados no Laboratório de Biofísica de Membranas do Dr. Wamberto A. Varanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, SP.

Nos registros das correntes iônicas através de canais unitários foi usada a técnica de **patch-clamp** na configuração **inside-out** descrita por Hamill et al.(1981) Tal registro é obtido selando-se na membrana celular uma micropipeta preenchida com uma solução salina – dita interna – que banha um eletrodo de Ag/AgCl. O circuito é fechado pelo eletrodo de banho, semelhante ao de registro, em contato com a solução onde se encontra a célula, dita externa. Ambos os eletrodos conectam-se a um amplificador específico (Axopatch - 200A) acoplado a

um computador (IBM - PC 486) provido do *software* Pclamp6, responsável por armazenar os registros.

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

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

3.3. Análise R/S de Hurst

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Calcular a relação $R/S = R(\tau)/S(\tau)$ e colocar o valor em um gráfico duplo logaritmo de R/S versus $\tau / \tau_{\text{máx}}$ (neste primeiro estágio, N é igual ao número total de valores na série temporal e é o ponto no qual ocorre $\tau_{\text{máx}}$);

6. Para o próximo estágio, N cobrirá apenas uma fração de todos os valores no conjunto de dados, tipicamente $N=N_{\text{máx}}/2$, e um novo $\tau=N\Delta t$. Então, o procedimento de entrada é repetido (passos 1-5) e determinado R/S para cada segmento do conjunto de dados.

Repetindo o procedimento, são usados valores menores de τ , em cada estágio, dividindo o conjunto de dados em segmentos e encontrando a média de R/S destes segmentos. O resultado, com as estimativas dos valores médios de R/S para cada τ , é mostrado na figura 13.

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

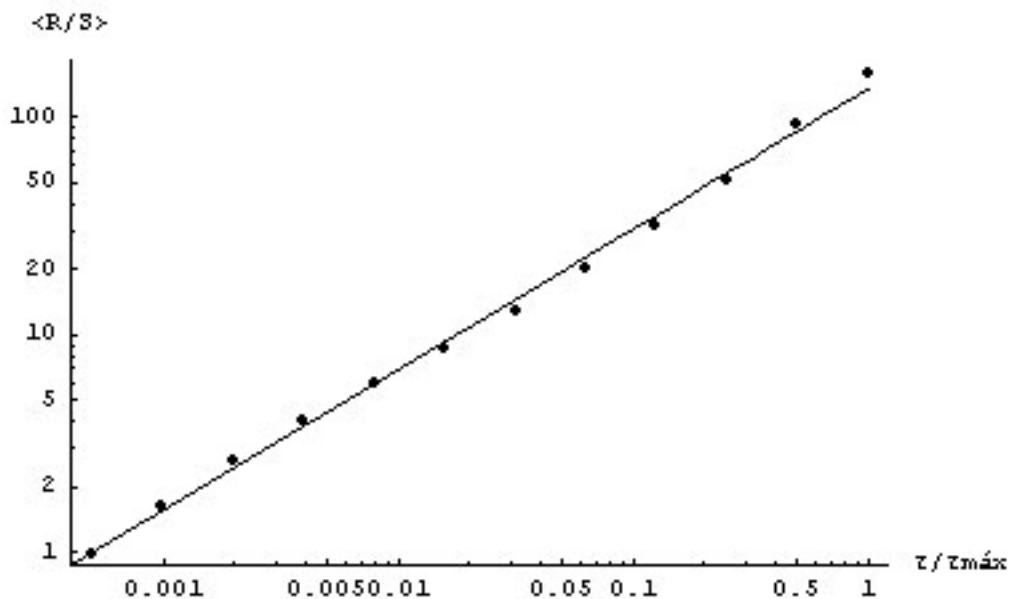


FIGURA 13. Gráfico da análise de *Hurst*. A abscissa é a razão entre a duração de cada intervalo de tempo escolhido e o período total de tempo. O coeficiente de Hurst, H , representa a inclinação da reta de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados num gráfico duplo-log dos valores médios de R/S contra $\tau / \tau_{\text{máx}}$. Neste gráfico foram usados 4096 intervalos de aberturas e fechamentos resultantes de um registro de canal para potássio ativado por cálcio em célula de Leydig. O H obtido foi igual a 0.696002

3.4. Aplicação do Método de *Hurst* na Cinética de Canais Iônicos

Na cinética de canais iônicos a série temporal é a seqüência dos tempos de aberturas e fechamentos resultante da atividade do canal iônico. A investigação de correlação de longo alcance entre os tempos de aberturas e fechamentos foi feita usando-se a análise *R/S* de *Hurst*, através de um programa elaborado no *Mathematica* (WOLFRAM, 1993).

A análise *R/S* tem sido usada (NOGUEIRA et al., 1995; VARANDA et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006) para estudar registros da atividade de canais iônicos. O método de *Hurst* foi aplicado à análise de eventos de canais iônicos unitários, onde a série temporal, neste caso, consiste de um registro corrente *versus* tempo de uma certa duração. A função a ser analisada é o decurso do tempo de atividade do canal, amostrado sobre N intervalos de tempos adjacentes de abertura e fechamento.

A estratégia empregada foi a seguinte (fluxograma da figura 14 e apêndice 1):

1. Os dados empregados corresponderam aos 2^n primeiros termos da seqüência temporal do registro do canal iônico, onde n esteve na faixa de 10 a 13;

2. O valor de *R/S* foi calculado primeiramente usando os 2^n dados da amostra inicial, um segundo valor médio de *R/S* foi calculado usando 2 amostras de 2^{n-1} dados e assim sucessivamente até que o valor *R/S* médio fosse calculado sobre 2^{n-1} amostras de 2 dados. Dessa maneira, foram realizadas n iterações para o cálculo do valor de *R/S* médio, partindo-se da amostra inicial;

3. Os valores médios de *R/S* foram plotados contra $\tau/\tau_{\text{máx}}$ em um gráfico duplo logarítimo;

4. O coeficiente de Hurst foi calculado a partir do declive da linha reta resultante deste tipo de gráfico.

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

A “aleatorização” foi feita de maneira semelhante ao procedimento descrito em KOCHETKOV et al. (1999). Em resumo, o procedimento de Kochetkov é equivalente a gerar uma tabela de dados aleatórios e realizar uma equivalência com uma tabela de dados experimentais. No nosso caso, os dados aleatórios foram organizados em ordem decrescente e o mesmo deslocamento de posição obtido por cada dado da tabela de dados aleatórios na formação dessa tabela decrescente foi aplicada a cada dado equivalente na tabela experimental. Como resultado, um conjunto de dados experimentais, agora “embaralhado aleatoriamente”, foi obtido (figura 15 e apêndice 2).

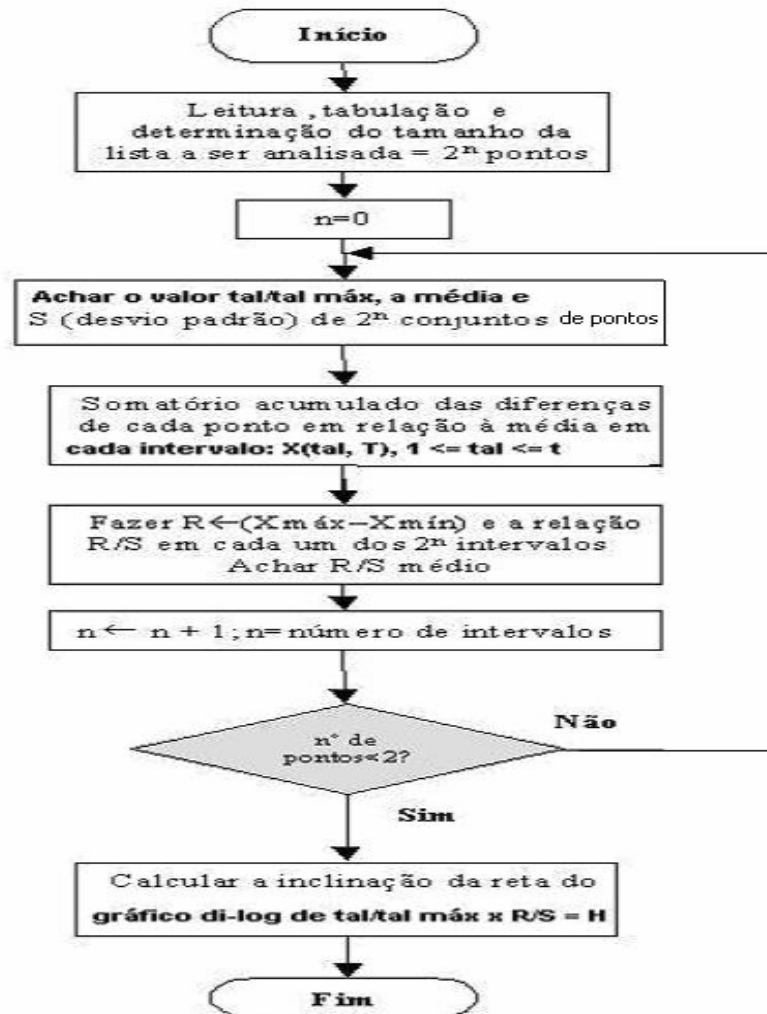


FIGURA 14. Fluxograma da análise R/S aplicada à seqüência de tempos de permanência de um registro de canal iônico para determinar a memória (correlação de longo alcance) na seqüência temporal.

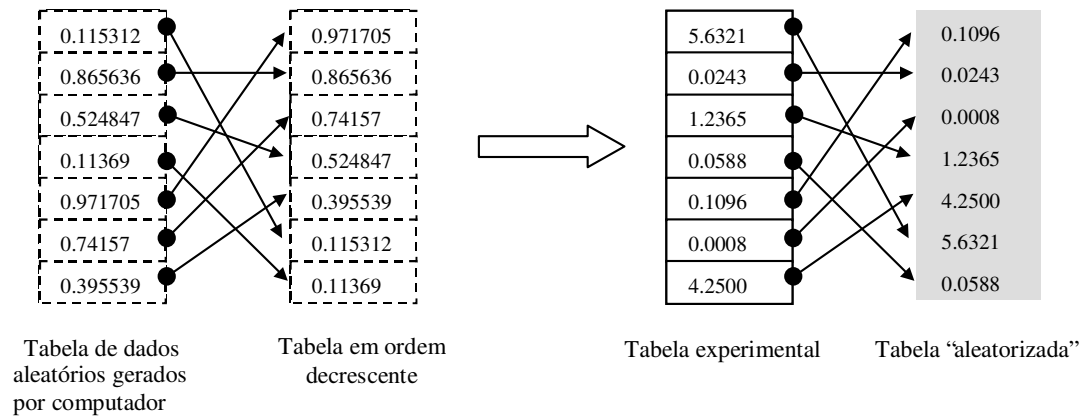


FIGURA 15. Exemplo de “aleatorização” de dados temporais empregada na verificação de memória dos registros experimentais. O mesmo deslocamento produzido na tabela de dados aleatórios gerados por computador na sua ordenação decrescente é executado equivalentemente na tabela de dados temporais a serem “aleatorizados”.

3.5. Simulação do Modelo Caótico

A simulação do modelo caótico foi realizada usando-se o mapa linear proposto por Liebovitch e Tóth (1991) (ver figura 16). O programa de simulação foi construído no Mathematica para um canal com dois estados cinéticos aberto-fechado (ver programa no apêndice 3). Foi gerada uma seqüência de 2^{12} tempos de fechamento e abertura.

Simulador de atividade de canal iônico por modelagem caótica

Simulador de atividade de canal iônico dois estados O \leftrightarrow C a partir do modelo caótico de Liebovitch e Tóth (1991)

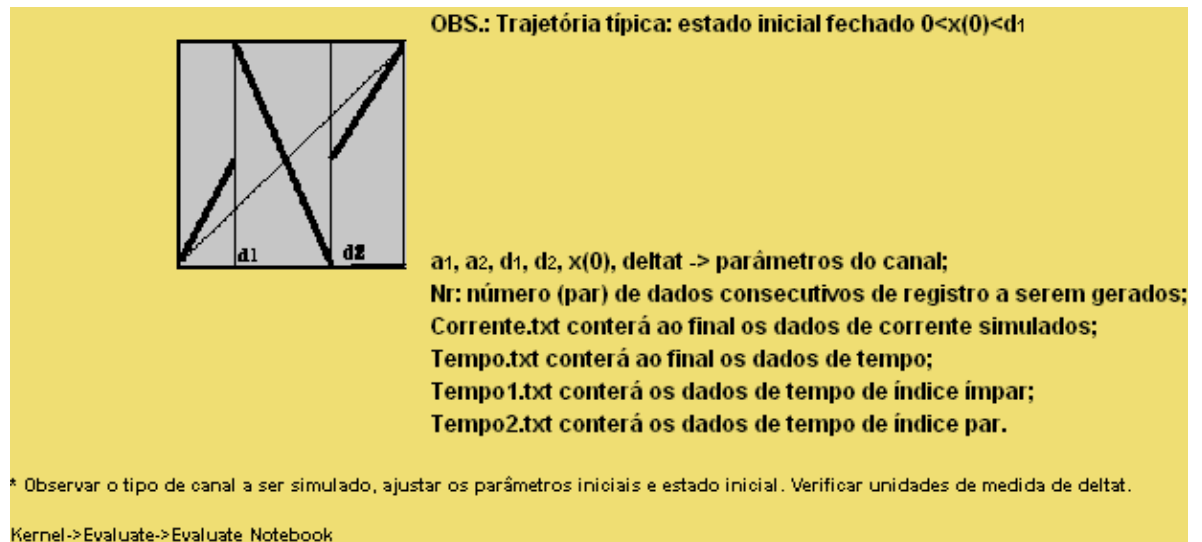


FIGURA 16. Esquema representativo de um simulador de atividade de canal iônico para o modelo caótico de dois estados cinéticos, um fechado (C) e um aberto (O).

Os valores dos parâmetros do mapa determinístico a_1, a_2 foram determinados usando-se as taxas de transição cinética K_{12} e K_{21} , obtidas a partir da simulação de um modelo Markoviano de dois estados. Os valores obtidos de K_{12} e K_{21} foram respectivamente 217,02ms e 224,53ms. No modelo caótico proposto por Liebovitch e Thót (1991), K_{ij} é igual ao $\ln a_i$. Conhecendo-se os valores de a_i ($i=1,2$) pode-se determinar os valores dos d_i ($i=1,2$) através das seguintes expressões (ver LIEBOVITCH e TÓTH, 1991):

$$d_1 = [d_2 - a_2(d_2 - 1) - 1] / (d_2 - d_1)$$

$$d_2 = (d_2 - a_1 d_1) / (d_2 - d_1)$$

Os valores obtidos de a_1 e a_2 foram os mesmos 1,25 e, d_1 e d_2 foram respectivamente, 0,32 e 0,68.

A partir da determinação dos valores destes parâmetros foram feitas as simulações do modelo caótico e, extraídas as seqüências de tempos de fechamentos e aberturas de um registro do canal para potássio ativado por cálcio em célula de *Leydig*.

Os valores das taxas de transições K_{12} e K_{21} foram obtidos a partir da análise dos dados experimentais, considerando-se um modelo cinético de dois estados (ver figura 17). O Programa QuB (www.qub.buffalo.edu) foi usado seguindo o protocolo descrito abaixo:

1. pré-processamento dos dados experimentais no programa QuB;
2. obtenção de segmentos idealizados a partir dos dados experimentais pré-processados (usando o Idl da rotina SKM) ;
3. Determinação dos parâmetros K_{12} e K_{21} do modelo de dois estados (veja Figura 18 abaixo) usando a rotina MIL (máximo intervalo de verossimilhança para estimação de constantes) do QuB na interface de modelagem.

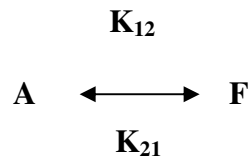


Figura 17 – Modelo Markoviano de dois estados. A representa o estado aberto e F o estado fechado. K_{12} e K_{21} são as taxas de transições do estado aberto para o fechado (1-2) e do estado fechado para o aberto (2-1).

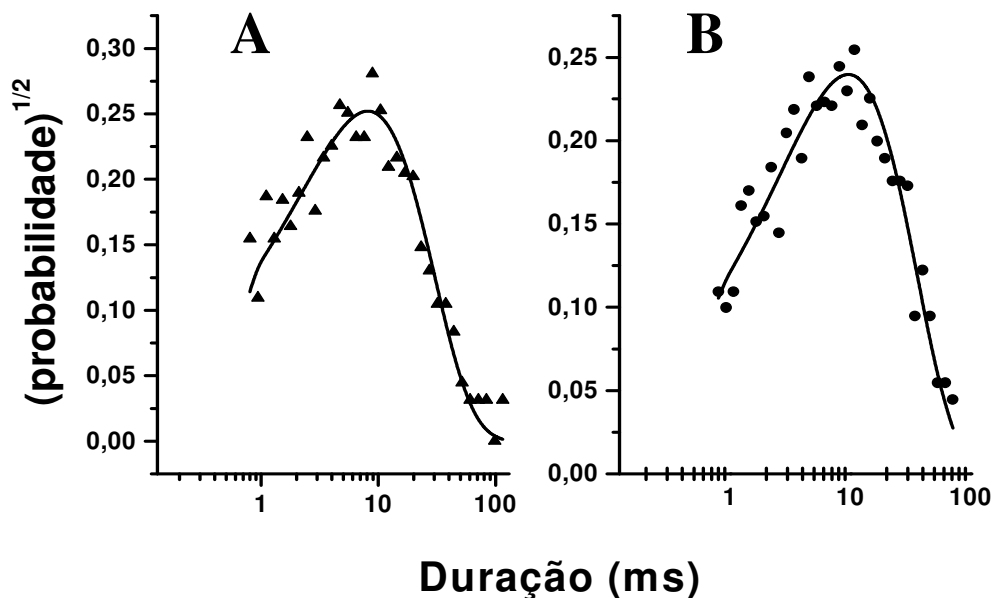


Figura 18 – A figura representa o ajuste da curva teórica do modelo Markoviano de 2 estados feito pelo programa QuB para os dados experimentais. A) distribuição da probabilidade do tempo de abertura do canal de BK e B) Distribuição da probabilidade do tempo de fechamento.

3.6. Métodos Estatísticos

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

Neste trabalho foi utilizado um microcomputador IBM compatível com a seguinte configuração: *Pentium 4* 1.7 GHz; 352 *megabytes* de memória RAM, disco rígido com 80 *gigabytes* de memória.

Os programas empregados foram o *Mathematica* versão 5.2, da empresa *Wolfram Research, Inc.* (1999), *STATISTICA* versão 5.1, desenvolvido pela empresa *StatSoft, Inc.* (1998), *Origin* versão 5.0, desenvolvido pela *Microcal Software, Inc.* (1997), e *Excel 97*, da *Microsoft Corporation*.

4. RESULTADOS

A figura 19 apresenta um dos registros da corrente através do canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*, numa membrana com a voltagem fixada em -80 mV e numa concentração de cálcio livre de 10 nM. A condutância observada neste registro está de acordo com a condutância característica do canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig* que é igual a 265 pS (VARANDA et al., 2000).

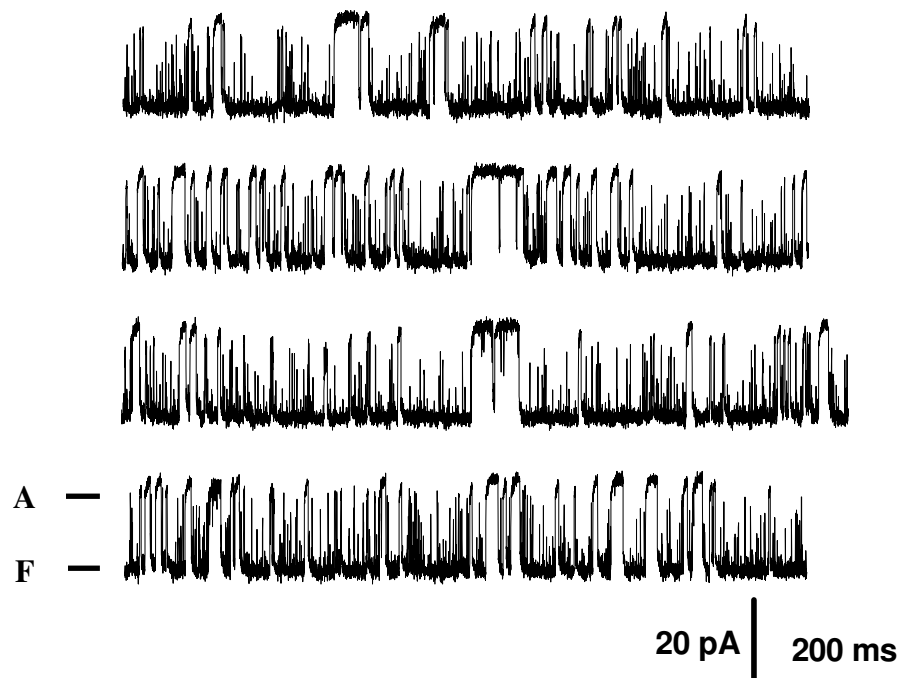


FIGURA 19. Registro de corrente unitária através do canal para potássio ativado por cálcio em célula de *Leydig* medida a -80 mV e a 10 nM Ca^{2+} dos dados experimentais. A linha de base do registro é a linha inferior, o traço superior representa a abertura do canal (A) e o inferior o fechamento do canal (F).

A tabela 1 mostra os valores dos coeficientes de *Hurst* obtidos para quatro registros experimentais da corrente no canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig*. O valor médio obtido para o coeficiente de *Hurst* nesses experimentos é igual a $0,660082 \pm 0,044010$ ($n=4$). Este valor sugere a existência

de memória positiva no processo cinético desse canal. Quando esses dados experimentais são embaralhados no programa de “aleatorização” a memória é perdida e um valor de $H = 0,557354 \pm 0,023694$ ($n=100$) é encontrado nessa condição. Esse procedimento mostra que a correlação de longo alcance é uma propriedade inerente à série temporal associada à seqüência dos tempos de aberturas e fechamentos do canal unitário.

Arquivo experimental	H	H para dados Embaralhados
98522003	0.595891	0.542711
98525004	0.673741	0.533398
98525017	0.696002	0.582634
98528006	0.674692	0.571382

TABELA 1. Coeficientes de *Hurst* de quatro registros experimentais da atividade iônica de um canal para potássio ativado por cálcio em célula de *Leydig* em comparação com os coeficientes dos mesmos registros temporais quando submetidos a um primeiro estágio de aleatorização.

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

1. O arquivo 98525017, de maior memória positiva, serviu de entrada para o programa de aleatorização. Ao arquivo resultante da aleatorização foi aplicada uma segunda aleatorização, até que o número de estágios de aleatorização chegasse a 100;
2. Foi feito um teste de Shapiro-Wilks (figura) nos 100 valores de H dos arquivos obtidos em cada estágio de aleatorização. O teste mostrou que os dados podem ser descritos por uma distribuição normal ($p = 0,6496$);
3. Foi feito um teste-Z bicaudal sobre o valor médio de H dos registros experimentais e os 100 H's obtidos da aleatorização. O teste Z mostrou que o valor do H experimental é significativamente diferente do valor de H obtido pela aleatorização do registro 98525017 ($p = 0$). Este procedimento mostrou que o H experimental não pertence à distribuição

dos coeficientes H do registro aleatorizado, evidenciando a existência de uma memória positiva no registro experimental, estatisticamente diferente daquela obtida se os dados fossem aleatórios.

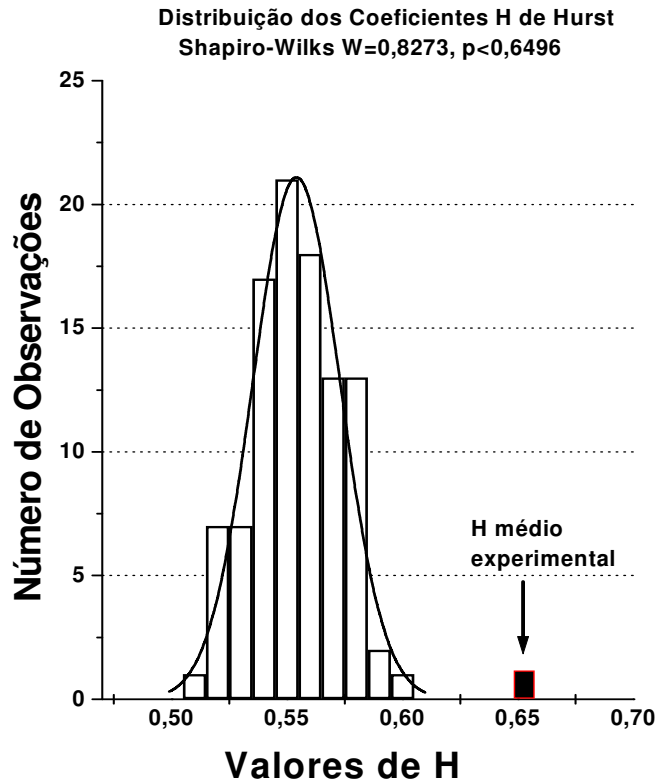


FIGURA 20. Distribuição dos coeficientes H “aleatorizado” do registro 98525017 em 100 estágios de aleatorização. O teste de Shapiro-Wilks indicou uma chance de 64,96% de que a distribuição dos H’s dos dados “aleatorizado” fosse normal, o que habilitou a utilização do teste-Z para a comparação das médias de H experimental e H “aleatorizado”. O teste-Z indicou uma probabilidade nula de que o valor médio experimental de H (0,660082) pertencesse à distribuição dos H “aleatorizados”, indicando que os dados experimentais não podem ser considerados aleatórios.

A figura 20 mostra um histograma de distribuição dos valores de H aleatorizados a partir do registro 9852017 e o valor médio de H experimental inserido no gráfico. Observa-se que H experimental encontra-se fora da curva normal dos valores aleatorizados.

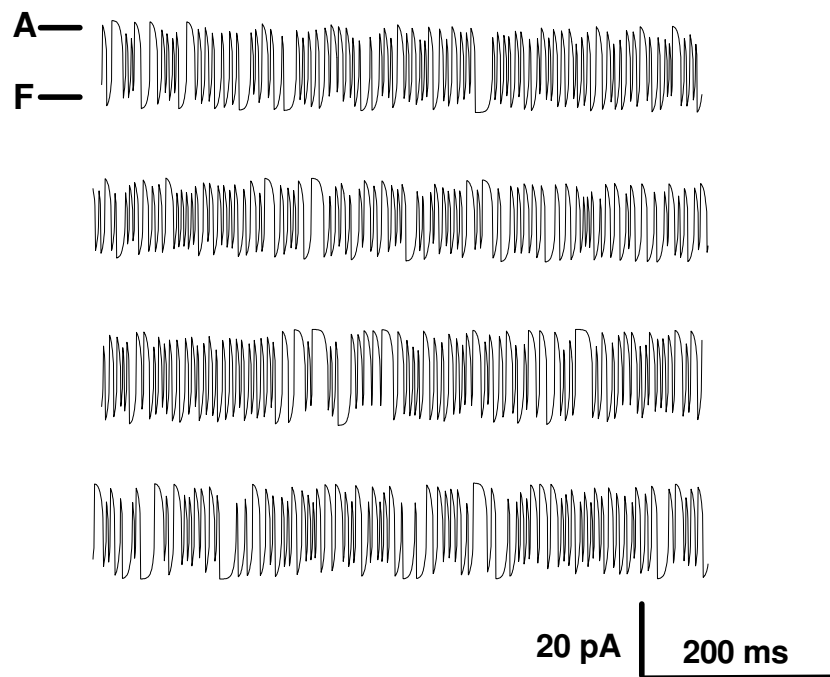


FIGURA 21. Registro de corrente unitária simulado pelo modelo caótico para o canal para potássio ativado por cálcio. O estado aberto é representado pela letra A e o estado fechado do canal pela letra F.

A figura 21 representa a corrente unitária através de um canal iônico simulado pelo modelo caótico, observe que as transições entre os estados abertos e fechados ocorrem de maneira suave e não de forma discreta como mostrado no traçado experimental.

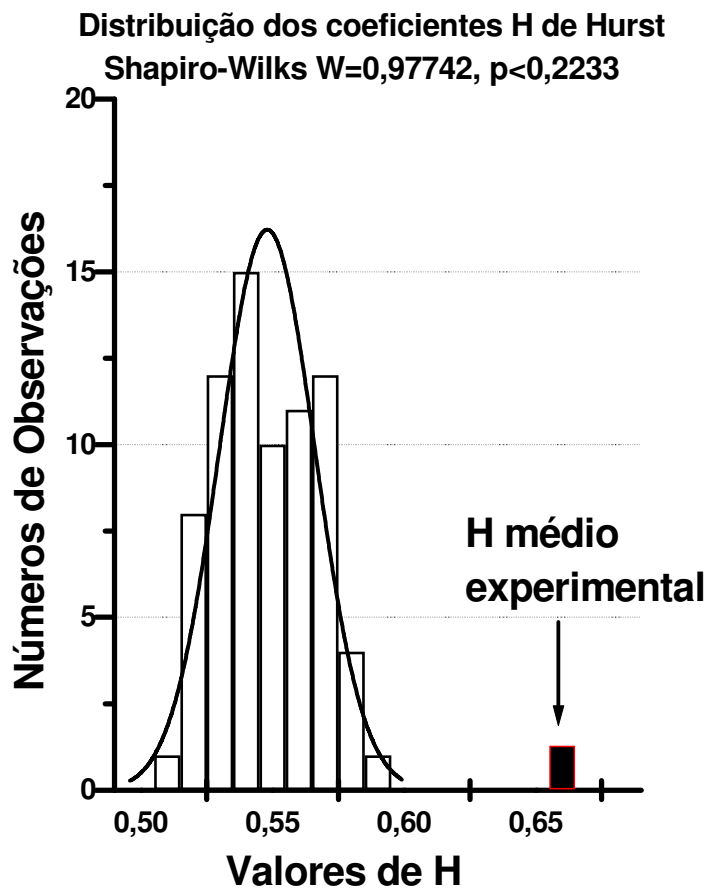


FIGURA 22. Distribuição dos coeficientes H simulados pelo modelo caótico para 74 registros de atividade do canal de potássio ativado por cálcio. O teste de Shapiro-Wilks indicou uma chance de 22,33% de que a distribuição dos H's do registro caótico fosse normal, o que habilitou a utilização do teste-Z para a comparação das médias de H experimental e H caótico. O teste-Z indicou uma probabilidade nula de que o valor médio experimental de H (0,660082) pertencesse à distribuição dos H's do modelo caótico, indicando que os dados experimentais não podem ser descritos pelo modelo caótico.

A figura 22 representa um histograma de distribuição dos valores de H simulados a partir do modelo caótico ($n=74$). O valor médio de H experimental é também mostrado no gráfico e pode-se observar que seu valor encontra-se fora da curva normal para os valores de H obtidos a partir da simulação do modelo caótico.

5. DISCUSSÃO

Uma importante questão no estudo de séries temporais resultantes de uma seqüência de medidas de grandezas que flutuam no tempo é encontrar um modelo que melhor descreva suas propriedades. Na cinética de um único canal iônico as séries temporais são compostas de uma longa seqüência de eventos de abertura e fechamentos, de acordo com as transições características do canal estudado. Modelos Markoviano, fractal e caótico têm sido usados para representar a dinâmica da cinética de abertura e fechamento dos canais do tipo BK.

O modelo Markoviano aplicado à análise da cinética em diferentes canais iônicos não tem levado em consideração as propriedades físicas das proteínas formadoras de canais iônicos e considera as transições entre os estados abertos e fechados como um processo aleatório. No modelo Markoviano as transições entre os estados cinéticos de canal iônico são descritas por taxas de transições cinéticas (constantes), que representam as probabilidades de o canal transitar por unidade de tempo entre dois estados discretos, sendo, portanto, um processo meramente probabilístico.

As propriedades que regem os processos cinéticos das proteínas formadoras de canais iônicos não são ainda bem conhecidas. No entanto, é provável que as proteínas de membrana compartilhem muitas propriedades em comum com as proteínas globulares, das quais algumas propriedades estruturais e físicas já são bastante conhecidas.

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

Apesar de sua inconsistência com a compreensão atual das proteínas globulares, o conceito Markoviano de cinética persiste e continua sendo

predominante. No entanto, tem sido mostrado que a estrutura das proteínas formadoras de canais iônicos são tão flexíveis que as transições entre os estados cinéticos ocorrem através de muitas barreiras suaves de energias e não através de poucas barreiras com picos separados por vales profundos, como sugerido por um modelo do tipo markoviano (KAZACHENKO et al., 2001).

No nosso caso usamos o modelo Markoviano de dois estados somente para determinar as constantes cinéticas que foram usadas no modelo caótico. No entanto, é interessante observar o ótimo ajuste da curva de distribuição de probabilidades para o modelo Markoviano de dois estados aos dados experimentais. Portanto, modelos markovianos com dois, três, quatro ou onze estados (NOGUEIRA et al, 1995; VARANDA et al., 2000; BARBOSA et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2006), podem descrever a cinética do canal de maneira adequada. Isto demonstra, claramente, que o modelo Markoviano não passa de um ajuste de curvas exponenciais, sem nenhum significado físico do processo dinâmico das transições entre os estados abertos e fechados do canal de BK.

No que diz respeito à memória, a análise de *Hurst* aplicada aos dados cinéticos obtidos com a simulação do modelo Markoviano tem e mostrado não reproduzir a correlação de longo alcance identificada no canal para potássio ativado por cálcio em células de *Leydig* (NOGUEIRA et al., 1995; VARANDA et al., 2000; OLIVEIRA, 2006). KOCHETKOV et al. (1999) também mostrou a presença de memória num canal para potássio ativado por cálcio em células *Vero* dos rins e que modelos markovianos são inadequados para descrever a memória encontrada na cinética desses canais. Isto mostra que Modelos Markovianos que descrevem muito bem as distribuições de tempos de permanências do canal nos estados abertos e fechados, foram ineficazes para descrever a correlação de longo alcance encontrada para os tempos de abertura e fechamento nestes canais ativados por cálcio. Este fato indica que modelos que assumem que proteínas formadoras de canais fazem transições apenas entre estados discretos de energia não são completamente adequados para descrever o processo cinético do canal unitário (VARANDA et al., 2000).

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

A análise cinética usando um modelo caótico determinístico tem sido proposta por Liebovitch e Tóth (1991) como adequada para explicar a dinâmica molecular presente no mecanismo do abrir e fechar dos canais iônicos. Entretanto, em nosso trabalho, a modelagem caótica realizada para o canal para potássio ativado por cálcio também não gerou dados cinéticos capazes de descrever a memória apresentada no registro experimental, mostrando um valor de H diferente do valor experimental (ver tabela e a figura 3- distribuição dos H experimental comparado com a média do modelo caótico). Isso evidencia a existência de características das proteínas formadoras do canal ainda não previstas nem na modelagem Markoviana nem na caótica.

Medições biofísicas, tal como a ressonância magnética nuclear (NMR), mais sensíveis ao movimento do canal, ao número de estados conformacionais e à distribuição das barreiras de energias podem fornecer informações adicionais sobre a natureza física do canal e, mais especificamente, sobre a sua cinética (BASSINGTHWAIGTHE et al., 1994). As propriedades estatísticas de uma proteína mudando de um estado para outro, como a de qualquer outro sistema complexo que transita entre estados diferentes, são muito pouco conhecidas. Devido à complexidade envolvida no mecanismo de mudança conformacional da estrutura da proteína formadora do canal iônico para a abertura e fechamento do mesmo, sugere-se a continuação do estudo da memória na cinética de canais iônicos utilizando outros modelos matemáticos, tais como as redes neurais. É necessário utilizar outras modelagens cinéticas para descrever o padrão temporal de abertura e fechamento dos canais iônicos que levem em consideração as

prováveis propriedades físicas da proteína formadora do canal e que se atenham à complexidade do processo cinético, no intuito de identificar os parâmetros físicos responsáveis pela memória da cinética de canais iônicos.

6. CONCLUSÃO

O modelo caótico proposto por Liebovitch e Tóth (1991) foi inadequado para descrever a memória (correlação de longo alcance) encontrada por Nogueira et al. (1995) na seqüência dos tempos de aberturas e fechamentos do canal para potássio ativado por cálcio de células de *Leydig*.

7 – REFERÊNCIAS

AIDLEY, D. J.; STANFIELD, P. R. **Ion Channels, Molecules in Action**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

ALBERTSEN, A.; HANSEN, U. Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. *Biophysical Journal*, v. 67, p. 1393-1403, 1994.

AUERBACH, A.; MILESCU, L.; QIN, F.; QIONG, F.; SACHS, F. “**Single Channel Kinetic. Analysis Made Easy - Tutorial 2000**”. Buffalo: State University of New York at Buffalo, Buffalo, 2000.

BARBOSA, C. T. F. ; RODRIGUES, A. ; OLIVEIRA, Regina Acácia Campos de ; VARANDA, W. A. ; LIEBOVITCH, L. S. ; NOGUEIRA, R. A. . Memory in single calcium activated potassium channel kinetics (in press). *Proceedings of the IEEE*, 2004.

BASSINGTHWAIGTHE, J. B.; LIEBOVITCH, L. S.; WEST, B. J. **Fractal Physiology**. New York: Oxford University Press, 1994.

BERAN, J. **Statistics for Long-Memory Processes**. New York: Chapman e Hall, 1994.

BRENNER, R.; PERÉZ, G. J.; BONEV, A. V.; ECKMAN, D. M.; KOSEK, J.C.; WILER, S. W.; PATTERSON, A. J.; NELSON, M. T.; ALDRICH, R. W. Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, v. 407, p. 870-876, 2000.

CARNIO, E. A.; VARANDA, W. A. Calcium - activated potassium channels are involved in the response of mouse Leydig cells to human chorionic gonadotropin. *Brazilian J. Med. Biol. Res*, v. 28, p. 813-824, 1995.

COULQUHOUN, D.; HAWKES, A.G. On the stochastic properties of single ion channel openings and clusters of bursts. *Philos. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B300*, p. 1-59, 1981.

DEL CORSSO, C.; VARANDA, W. A. The resting potential of mouse Leydig cells: role of an electrogenic Na^+/K^+ pump. *Journal of Membrane Biology*, v. 191, n. 2, p. 123-31, jan. 2003. National Center of Biotechnology Information [on line]. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [capturado em 11 jan. 2006]. Resumo.

DUFAU, M. L.; SORREL, S. H.; CATT, K. J. Gonadotropin-induced phosphorylation of endogenous proteins in the Leydig cell. *FEBS LETTER*, v. 131, p. 229-234, 1981.

FEDER, J. **Fractals**. New York: Plenum Press, 1988.

FEIGENBAUM, M. J. The Universal Metric Properties of Non-linear Transformations. *J. Phys Stat* 21, p.669-706,1979.

FELLER, W. The asymptotic distribution of the range of sums of independent random variables. *Ann. Mat. Stat.*22, p.427-432, 1951.

GLASS, L.; MACKEY, M. C. From Clocks to Chaos. Princeton, Princeton University Press, 1988.

GLEICK, J. Chaos: Making a new Science. Viking, New York, 1987.

GUEVARA, M. R.; GLASS, L.; SHRIER, A. Phaselocking, periodic-doubling bifurcations, and irregular dynamics in periodically stimulated cardiac cells. *Science* n.214, p.1350-1353, 1981.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMAN, B.; SIGWORTH, F.I. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, v. 391, p. 85-100, 1981.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3 ed. Sunderland:Sinauer, 2001.

HOOP,B.; KAZEMI, H.; LIEBOVITCH, L. Rescaled range analysis of resting respiration. *Chaos*, v.3, p.27-29, 1993.

HU, L.; SHI, J.; MA, Z.; KRISHNAMOORTHY, G.; SIELING, F.; ZHANG, G.; HERRIGAN, F.; CHUI, J. Participation of the S4 voltage sensor in the Mg^{2+} -dependent activation of large conductance (BK) K^+ channels, v 100, p 10488-10493, 2003.

HURST, H. E. Long-term storage capacity of reservoirs. *Trans. Amer. Soc. Civ. Eng.* v. 116, p. 770-808, 1951.

HURST, H. E.; BLACK, R. P.; SIMAIKI, Y. M. **Long-term Storage: An Experimental Study**. London: Constable, 1965.

JANSZEN, F. H. A.; COOKE, B. A.; VAN DRIEL, M.J.A.; VAN DER MOLEN, H. J. The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. *Biochem. J.*, v. 160, p. 433-437, 1976.

KING, J.T.; LOVELL, P.V.; RISHNIW, M.; KOTLIKOFF, M.I.; ZEEMAN, M.L.; MCCOBB, D.P. *Journal Neurophysiology*, V 95, p 2878-2888, 2006.

KARAMAVRUÇ, A.I.; CLARK, N.N A fractal approach for interpretation of local instantaneous temperature signals around a horizontal heat transfer tube in a bubbling fluidized bed. *Powder Technology*, v.90, p.235-244, 1997.

KARPLUS, M.; McCAMMON, J. A. The internal dynamics of globular proteins. *CRC Crit. Ver. Biochem.* v. 9, p. 293-349, 1981.

KAWA, K. Existence of calcium channels and intracellular couplings in the testosterone secreting cells of mouse. *J. Physiol.*, v. 393, p. 606-647, 1987.

KAZACHENKO, V. N.; KOCHETKOV, K. V.; ASLANIDI, O.V.; GRINEVICH, A. A. Fractal properties of the ion channel gating mechanism: a fast Fourier transform study. *Biophysics*, v. 46, n. 6, p. 1010-1018, 2001.

KOCHETKOV, K. V.; KAZACHENKO, V. N.; ASLANIDI, O. V.; CHEMERIS, N.K.; GAPEYEV, A.B. Non-markovian gating of Ca^{2+} -activated K^+ channels in cultured kidney cell Vero. Range Analysis. *Journal of Biological Physics*, v. 25, p. 211-222, 1999.

LABOS, E. A model of dynamics neurons and their. Abstract of 46th Annual Meeting, Hungarian Physiological Society 1.S4 N^o 176, p. 117 Hungarian, 1981.

LABOS, E. Periodic and non-periodic motions in different classes of formal neuronal networks and chaotic spike generators. In: *Cybernetics and Systems Research*, Amsterdam, v. 2, p 237-243, 1984.

LIEBOVITCH, L. S ; TÓTH, T. I. A Model of Ion Channel Kinetics using Deterministic Chaotic rather than Stochastic Processes. *Journal Theory Biology*, v 148, p 243-267, 1991.

LIEBOVITCH, L. S. Interpretation of protein structure and dynamics from the statistics of open and closed times measured in a single ion-channel protein. *Journal Statistical Physiology*, v. 70, p. 329-337, 1993.

LIEBOVITCH, L. S.; FISCHBARG, J.; KONIAREK, J. P. Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov processes. *Mathematical Biosciences*, v. 84, p. 37-68, 1987.

MALAMUD, B.D.; TURCOTTE, D.L. Self-affine time series: measures of weak and long persistence. *Journal Statistical Planning Inference*, v.80, p.173-196, 1999.

MAY, R. M. Simple mathematical models with very complicated dynamics. *Nature*, Lond, n. 261, p 459-467, 1976.

MIRANDA, J.G.V.; ANDRADE, R.F.S. R/S analysis of pluviometric records: comparison with numerical experiments. *Physica. Série A*, v.295, p.38-41, 2001.

MONTANARI, A.; ROSSO, R.; TAQQU, M.S. Some long-run properties of rainfall records in Italy. *J. of Geophysical Research*, v.101D, n.23, p 29431-29438, 1996.

MOON, F.C. *Chaotic vibrations*. New York: John Wiley and sons, 1987.

NOGUEIRA, R. A.; VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S. Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 28, p. 491-496, 1995.

OLIVEIRA, R. A. C.; BARBOSA, C. T. F.; CONSONI, L. H. A.; RODRIGUES, A. R. A.; VARANDA, W. A.; NOGUEIRA, R. A. Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. *Physica A*. v. 364, p 13-22, 2006.

PATTON, H. D.; FUCHS, F. A.; HILLE, B.; SCHER, A. M.; STEINER, R. **Textbook of Physiology**. 21 ed. London: W. B. Saunders, 1989. v.2.

PENG, C.K.; HAVLIN, S.; STANLEY, H.E.; GOLDBERGER, A.L. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos*, v. 5, p. 82-87, 1995.

PETERS, O.; HERTLEIN, C.; CHRISTENSEN, K.A Complexity view of rainfall. *Physical Review Letters*, v.88, n, 1, p.1-4, 2002.

ROTHBERG, B. S.; MAGLEBY, K. L. Gating kinetics of single large-conductance Ca^{2+} - activated K^{+} channels in high Ca^{2+} suggest a two-tiered allosteric mechanism. *J. Gen. Physiol.* v. 114, p. 93-124, jul. 1999.

SAKMANN, B.; NEHER, E. **Single-Channel Recording**. 2 ed. New York: Plenum, 1995.

VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S.; FIGUEIROA, J. N.; NOGUEIRA, R. A. Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. *J. Theor. Biol.*, v. 206, p. 243-353, 2000.

WOLFRAM, S. **Mathematica, A System for Doing Mathematics by Computer**. 2 ed. Reading: Addison-Wesley, 1993.

YELLEN, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, v. 419, p. 35-42, 2002.

Apêndice 1

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

Análise de Hurst

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

Abrindo a lista no Mathematica

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

```
N1(Tamanho da lista)=4253;
tempo=TimeUsed[];
Clear[recepfile]
recepfile=ReadList["C:\Program Files\Wolfram Research\Mathematica\5.2\98525017.txt",Number];
Clear[N1,lista]
N1=Length[recepfile];Print["N1(Tamanho da lista)=" ,N1]
lista=Table[x[n]=Part[recepfile,n],{n,1,N1}];
```

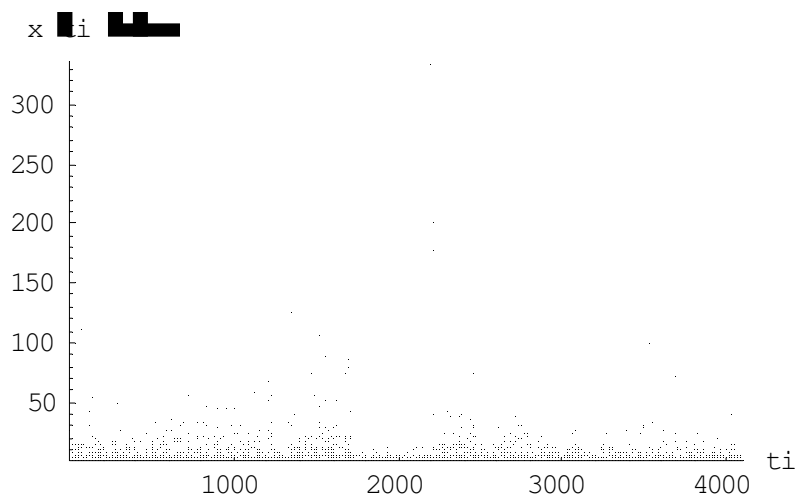
Utilizar apenas um conjunto de pontos que seja múltiplo de 2. Os pontos restantes serão descartados

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

Pontos utilizados= 4096

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

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



Abertura do pacote estatístico

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

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

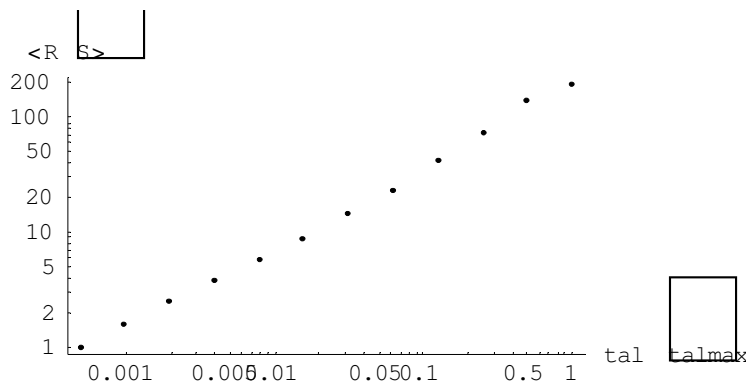
```
Needs["Statistics`DescriptiveStatistics`"]
N2=N1;Nele=1;Datagraf={};
While[N2>=2,
  Clear[Tabela,S1,Desvmed,Mda,SDM,xmax1,xmin1,Rtau1,RSHurst1,RSmed,NXP];
div=0;SRS=0;Dados=lista;
Ptx=N[N2/N1];
While[Nele>div,Tabela=Table[x[n]=Take[Dados,N2]];
  S1=Table[x[n]=Apply[Plus,Tabela]];Mda=N[S1/N2];
  Stau=N[StandardDeviationMLE[Tabela]];
  Desvmed=Table[Tabela[[i]]-Mda,{i,1,N2}];
  nn=2;SDM={First[Desvmed]};S0=First[Desvmed];
  While[nn<=N2,S0=S0+Desvmed[[nn]];SDM=Append[SDM,S0];nn+=1;
  ];
  xmax1=Max[SDM];xmin1=Min[SDM];Rtau1=xmax1-xmin1;
  If[Stau!=0,RSHurst1=N[Rtau1/Stau]];
  div+=1;SRS+=RSHurst1;Dados=Drop[Dados,N2]
];
RSmed=N[SRS/div];NXP={Ptx,RSmed};Datagraf=Join[Datagraf,NXP];Nele=2Nele;
N2=N[N2/2]
]
```

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

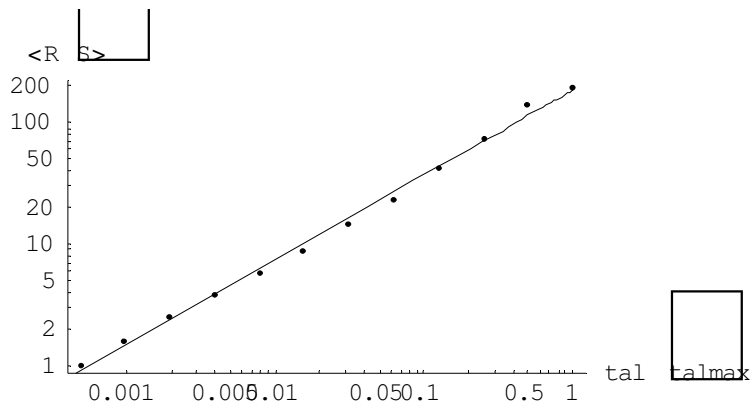
```
Datagraf=Partition[Datagraf,2];Reg=N[Log[10,Datagraf]];
Lin=Fit[Reg,{1,x},x];
H=Coefficient[Lin,x];b=Coefficient[Lin,x,0];
dezelevado=b+H*Log[10,x];y=10^dezelevado;
Print["Coeficient de Hurst=",H];
```

Coeficient de Hurst= 0.696002

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



```
RApprox=LogLogPlot[y,{x,0.0001,1},DisplayFunction->$DisplayFunction];
Show[G1,%]
```



Graphics

Cálculo do tempo de execução

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

Tempo em minutos= 0.0427167

Salva valores de H em arquivo

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

Apêndice 2

Programa de aleatorização de uma seqüência temporal

Aleatorização de Lista

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

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

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

```
t1=TimeUsed[];
Clear[faixadat]
faixadat=ReadList["C:\\Program Files\\Wolfram Research\\Mathematica\\5.2\\98525017.txt",Number];
Clear[Totn,conjunto]
Totn=Length[faixadat];
Print["Totn(tamanho do conjunto)=" ,Totn]
conjunto=Table[x[n]=Part[faixadat,n],{n,1,Totn}];
Totn(tamanho do conjunto)=4253;
```

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

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

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

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

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

```
P0=1;
While[P0<=Totn,cof=Tabestfim[[P0]];
fin=Position[Est,cof];fin=fin[[1,1]];
cjtfim[[P0]]=conjunto[[fin]];
P0+=1]
```

Aqui coloca os dados em forma de coluna em um arquivo de extensão txt que ficará em:

"C:\\Arquivos de programas\\Wolfram Research\\Mathematica\\5.2\\cjtfim.txt"

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

Aqui calcula o tempo total gasto na execução dos cálculos

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

Tempo de execução em minutos= 0.422383

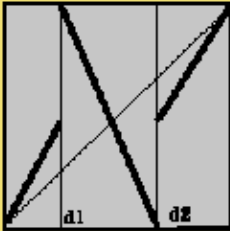
Apêndice 3

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

Simulador de atividade de canal iônico por modelagem caótica

Simulador de atividade de canal iônico dois estados O<->C a partir do modelo caótico de Liebovitch e Tóth (1991)

OBS.: Trajetória típica: estado inicial fechado $0 < x(0) < d_1$



$a_1, a_2, d_1, d_2, x(0), \text{deltat}$ -> parâmetros do canal;
Nr: número (par) de dados consecutivos de registro a serem gerados;
Corrente.txt conterá ao final os dados de corrente simulados;
Tempo.txt conterá ao final os dados de tempo;
Tempo1.txt conterá os dados de tempo de índice ímpar;
Tempo2.txt conterá os dados de tempo de índice par.

* Observar o tipo de canal a ser simulado, ajustar os parâmetros iniciais e estado inicial. Verificar unidades de medida de deltat.

Kernel->Evaluate->Evaluate Notebook

`tp= TimeUsed[];`

Entrar parâmetros iniciais do canal $a_1, a_2, d_1, d_2, x(0)$ ($0 < x(0) < d_1$), $\text{delta } t$ e o número de dados a serem gerados:

```
aum=1.25;
adois=1.25;
deum=0.32;
dedois=0.68;
xiszero=0.05;
deltat=1;
Nr=8192;
```

Mapa:

$$x(n+1) = a_1 x(n) \quad \text{quando } 0 < x(n) < d_1$$

$$x(n+1) = [d_2 - x(n)] / (d_2 - d_1) \quad \text{quando } d_1 \leq x(n) \leq d_2, \text{ e}$$

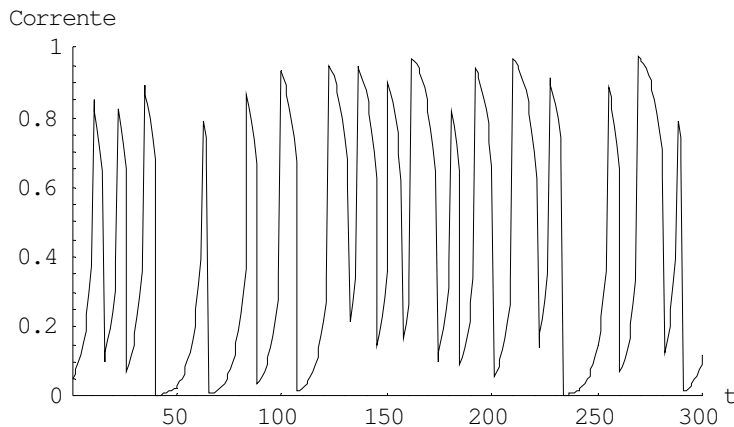
$$x(n+1) = a_2 [x(n) - 1] + 1 \quad \text{quando } d_2 < x(n) < 1.$$

```
Grafcaot77={xiszero};xisene=xiszero;xis=0;
Gt={};ultte=0;
Tf=0;
```

```

While[Tf<Nr,
  If[xisene>0eexisene<deum,xis=aum*xisene;ultte=ultte+deltat];
  If[(xisene >deum|xisene==deum )ee( xisene<dedois|xisene==dedois),xis=(dedois-xisene)/(dedois-
deum);Gt=Join[Gt,{ultte}]; ultte=0;Tf+=1];
  If[xisene>dedois ee xisene<1,xis=adois*(xisene-1)+1;ultte=ultte+deltat];
  Grafcaot77=Join[Grafcaot77,{xis}];xisene=xis;
]
*Gráfico da corrente: visualizar a faixa controlando o "PlotRange".
ListPlot[Grafcaot77,PlotStyle→PointSize[0.0075],
  AxesOrigin→{1,Min[Grafcaot77]},PlotRange→{{1,300},{0,1}},
  AxesLabel→{"t","Corrente"},PlotJoined→True,
  DisplayFunction→$DisplayFunction];

```



Aqui retorna o tempo total de atividade do canal conseguido na simulação; divide os tempos da forma 1- Fechamento e 2-Abertura; calcula os tempos médios experimentais e tempos mínimos e máximos de fechamento e abertura:

```

Soma=Apply[Plus, Grafcaot77];Imed=N[Soma/Nr];
Imin=Min[Grafcaot77];Print["Corrente77 mínima = ",Imin];
Imax=Max[Grafcaot77];Print["Corrente77 máxima = ",Imax];
Print["Corrente77 média = ",Imed];

```

```

Corrente77 mínima = 0.0000848329
Corrente77 máxima = 0.999952
Corrente77 média = 3.97916

```

Aqui retorna o tempo total de atividade do canal conseguido na simulação; separa os tempos e calcula os tempos médios experimentais e tempos mínimos e máximos:

```

Sot=Apply[Plus, Gt];Print["Tempo total de atividade iônica = ",Sot];
im=1;pp=2;Somaim=0;Spar=0;Grpar={};Grimp={};
While[pp<=Nr,Somaim=Somaim+Gt[[im]];Grimp=Join[Grimp,{Gt[[im]]}];im+=2;
  Spar=Spar+Gt[[pp]];Grpar=Join[Grpar,{Gt[[pp]]}];pp+=2];
Clear[Sf,Sa];Sf=N[Somaim*2/Nr];Sa=N[Spar*2/Nr];
Tminimp=Min[Grimp];Tmaximp=Max[Grimp];Tminpar=Min[Grpar];Tmaxpar=Max[Grpar];
Print["(1) Fechamento:"];Print["Tempo77 médio = ",Sf];Print["Tempo77 mínimo= ",Tminimp];Print["Tempo77
máximo = ",Tmaximp];
Print["(2) Abertura:"];Print["Tempo77 médio = ", Sa];Print["Tempo77 mínimo = ",Tminpar];Print["Tempo77
máximo = ",Tmaxpar];
Tempo total de atividade iônica = 57351

```

(1) Fechamento:

Tempo77 médio = 7.04956

Tempo77 mínimo = 2

Tempo77 máximo = 37

(2) Abertura:

Tempo77 médio = 6.95215

Tempo77 mínimo = 2

Tempo77 máximo = 40

Seqüência de dados armazenados em arquivo. Os dados em arquivo de formato .txt ficam no diretório C:\\Arquivos de Programas\\Wolfram Research\\Mathematica\\5.2\\[Arquivo].txt ou em outro diretório a ser pesquisado por um sistema de busca:

```
Grafcaot77=ColumnForm[Grafcaot77];Grafcaot77>>Corrente77.txt
Gt=ColumnForm[Gt];Gt>>Tempo77.txt
Grimp=ColumnForm[Grimp];Grimp>>Tempo77a.txt
Grpar=ColumnForm[Grpar];Grpar>>Tempo77b.txt
```

Calcula o tempo total de processamento do programa:

```
tfim=TimeUsed[]-tp;Tseg=N[tfim/60];
Print["Tempo77 de processamento do programa em minutos = ",Tseg];
```

Tempo77 de processamento do programa em minutos = 3.0289