DESENVOLVIMENTO DE UMA FERRAMENTA COMPUTACIONAL PARA O EXPERIMENTO DE VOLTAGE - CLAMP

M. L. A. Camargo*, D. G. Goroso* e R. R. Silva*

* Núcleo de Pesquisas Tecnológicas. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brasil
e-mail: matheus.leonado675@gmail.com

Resumo: Com o avanço nos estudos de células cardíacas viu-se a evolução dos modelos matemáticos que as descrevem. No lugar das formulações tradicionais de Hodgkin e Huxley de 1952, surgem os modelos baseados em cadeias de Markov. Há muitas razões para isso: os modelos de Markov não se restringem à ideia de portas independentes que definem o canal, eles permitem uma descrição mais detalhada, caracterizando as transições específicas entre os estados aberto, fechado ou inativo, descrevendo assim as estruturas subjacentes do canal bem como suas alterações conformacionais. Os conceitos ligados aos canais iônicos têm seu papel no aprendizado geral do funcionamento de órgãos inteiros, por esse motivo é imprescindível a compreensão dessas estruturas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é apresentar o desenvolvimento de uma ferramenta computacional que permite a visualização dos estados e a curva corrente vs tensão (curva I x V) para os principais canais iônicos. O simulador, implementado na plataforma MATLAB, possibilita a realização do experimento de grampeamento de voltagem (*Voltage-Clamp*) ilustrando os pulsos de voltagem, a corrente, estados do canal e a curva I x V de uma forma didática e acessível a estudantes de graduação.
Palavras-chave: canais iônicos, modelo matemático, modelo computacional, ensino.

Abstract: *With advancement in cardiac cell studies, we have seen the evolution of the mathematical models that describe them. Instead of the traditional Hodgkin and Huxley formulations of 1952, models based on Markov chains arise. There are many reasons for this: Markov models are not restricted to the idea of independent ports that define the channel, they allow a more detailed description, characterizing the specific transitions between the open, closed or inactive states, thus describing the underlying structures of the channel as well as their conformational changes. The concepts related to ion channels have their role in the general learning of the functioning of whole organs, for this reason it is essential to understand these structures. In this context, the objective of this work is to present the development of a computational tool that allows visualization of the states and the current vs. voltage curve (I x V curve) for the main ion channels. The simulator, implemented in the MATLAB platform, enables the realization of the Voltage-Clamp experiment, illustrating the voltage pulses, current, channel states and the I x V curve in a didactic and accessible way to undergraduate students.*
Keywords: *ionic channels, mathematical model, computational model, teaching.*

Introdução

Os modelos matemáticos para célula cardíaca começaram a incluir em suas representações os processos estocásticos das cadeias de Markov para descrever o comportamento dos canais iônicos, em substituição as formulações tradicionais propostas por Hodgkin e Huxley em 1952 [1]. Atualmente, a modelagem matemática e computacional da atividade elétrica cardíaca, em particular dos canais iônicos, não estão apenas permitindo elucidar mecanismos científicos básicos nessa área, mas estão cada vez mais ajudando-nos a compreender melhor as arritmias cardíacas, além de fornecer informações importantes sobre como as alterações moleculares na célula podem estar associadas a doenças cardíacas em escalas macroscópicas envolvendo todo o órgão [2].

Por outro lado, o avanço computacional permite aos pesquisadores trabalharem com modelos cada vez mais completos, resolvendo de forma eficiente os sistemas descritos por um grande número de equações diferenciais acopladas [3]. Como consequência, esses modelos anteriormente destinados apenas ao campo da pesquisa também foram incorporados ao campo educacional, no processo de ensino – aprendizagem dos conceitos básicos das ciências, em particular na biologia. Cita-se como exemplo os modelos que foram desenvolvidos com foco na fisiologia e biofísica da célula cardíaca e que deram origem aos simuladores LabHeart® [4] e MioLab® [5] e que descrevem as propriedades das correntes iônicas e força contrátil para miócito ventricular de coelho e rato.

Em geral, a base para esses modelos são equações diferenciais descritas em alguma linguagem de programação (Fortran, C, C^{++}) ou ambiente computacional (MATLAB®, LabView® ou Delphi®). O MATLAB® que foi o software utilizado no trabalho em questão, é uma ferramenta fundamentada em equacionamentos matriciais. Apresenta diversas bibliotecas para trabalhar nos mais diferentes ramos acadêmicos, incluindo uma específica para equações diferenciais que foi usada para elaborar os modelos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi o de implementar em ambiente computacional, utilizando o software

MATLAB®, os principais modelos de canais iônicos presentes nas células cardíacas e responsáveis pelo potencial de ação a fim de utilizá-los no desenvolvimento de um simulador do experimento de *Voltage-Clamp*, mostrando os efeitos das tensões aplicadas em cada canal isolado.

Materiais e métodos

Conceitos Iniciais - A modelagem biofísica da célula permite observar o comportamento de cada estrutura que a compõe como um componente elétrico. Baseando-se nesse conceito foram propostos diversos modelos matemáticos para descrever a passagem dos íons entre o meio intracelular e o extracelular. Estes modelos consideram os canais iônicos como condutâncias, pois estes permitem a passagem de íons pela membrana celular. Estas condutâncias apresentam seletividade quanto ao tipo de íons que transportam e não são lineares.

Para a implementação dos canais iônicos optou-se em utilizar os modelos baseados em diagramas de estado, pois estes descrevem de forma mais detalhada as diferentes conformações pelo qual cada canal passa. A figura 1 apresenta o diagrama de estados do canal de cálcio de longa duração (iCaL) [6] com seus parâmetros de transição que podem ser constantes ou dependentes de voltagem.

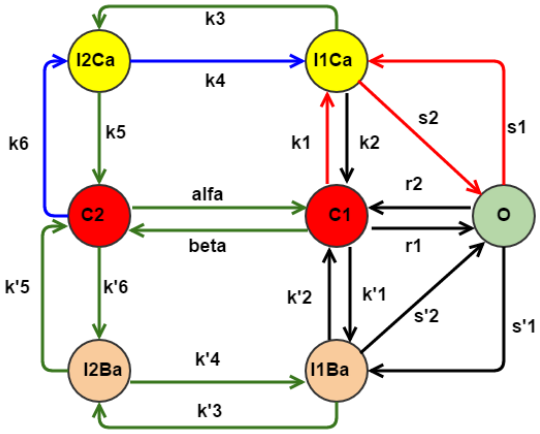

Figura 1: Diagrama de estados do canal de cálcio de longa duração. Adaptado de [6]

Os modelos de canais iônicos utilizados foram: canal de cálcio (Ca^{2+}) de longa duração [6]; canal de sódio (Na^{+}) de ativação rápida [7]; canal de potássio (K^{+}) de ativação rápida e lenta [8]. Estes modelos foram implementados no software MATLAB®.

Voltage-Clamp - Esse experimento foi realizado inicialmente por Hogkin & Huxley [1] utilizando um axônio gigante de lula mergulhado em uma solução salina, onde eram aplicados impulsos elétricos que excitavam a célula. A cada impulso era observado o comportamento da corrente de íons na célula. No trabalho em questão foi desenvolvida uma ferramenta computacional utilizando o mesmo princípio, onde são programados vários impulsos de tensão a serem aplicados em um limite de tempo. Aplicando estes impulsos aos modelos de canais iônicos implementados e plotando os picos de corrente de íons em função da voltagem aplicada, chega-se na curva "I x V", utilizada para se estudar a condutância de cada canal. Todo este processo foi criado utilizando códigos de programação no MATLAB®, onde cada canal foi modelado isoladamente e depois acoplado ao simulador.

Resultados

A interface inicial do simulador consiste em uma tela (Figura 2) onde é possível selecionar *start* para iniciar o programa. Ao clicar em *start*, é apresentada uma tela com as opções de simular a curva "I x V" que é o experimento de *Voltage-Clamp* ou gerar os gráficos dos estados de cada canal.

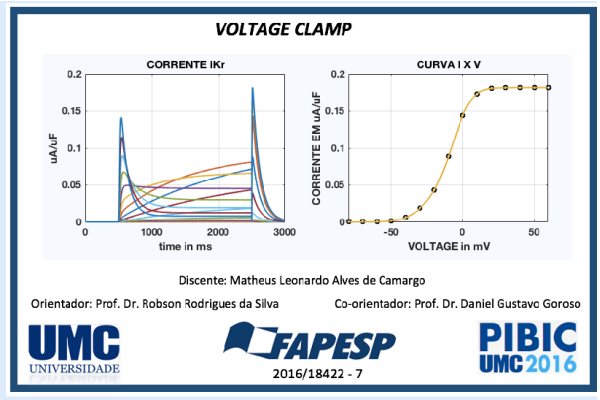

Figura 2: Tela inicial do simulador Voltage - Clamp

Selecionado a opção desejada, surge a tela para a escolha do canal iônico que se pretende simular (Figura 3).

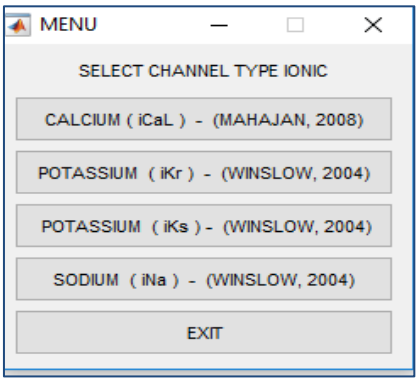

Figura 3: Interface para seleção do canal iônico.

Como exemplo será selecionado o canal de Cálcio de longa duração. Após a seleção do canal é apresentada uma tela (Figura 4) para inserção dos principais parâmetros de simulação: instante de aplicação do pulso de voltagem; tempo de duração; valor do pulso inicial;

valor do pulso final; tempo de simulação após a aplicação do pulso e passo de voltagem.

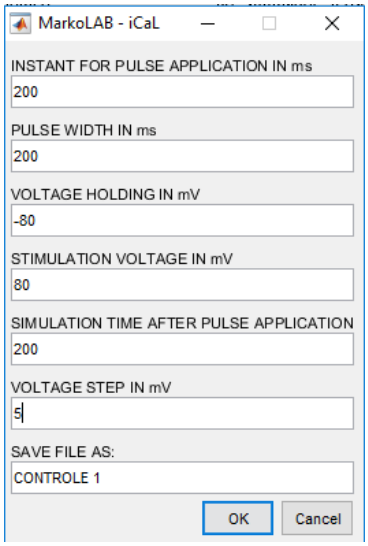

Figura 4: Parâmetros de entrada para simulação.

A figura a seguir mostra como resultado da simulação a corrente iCaL para cada valor de voltagem.

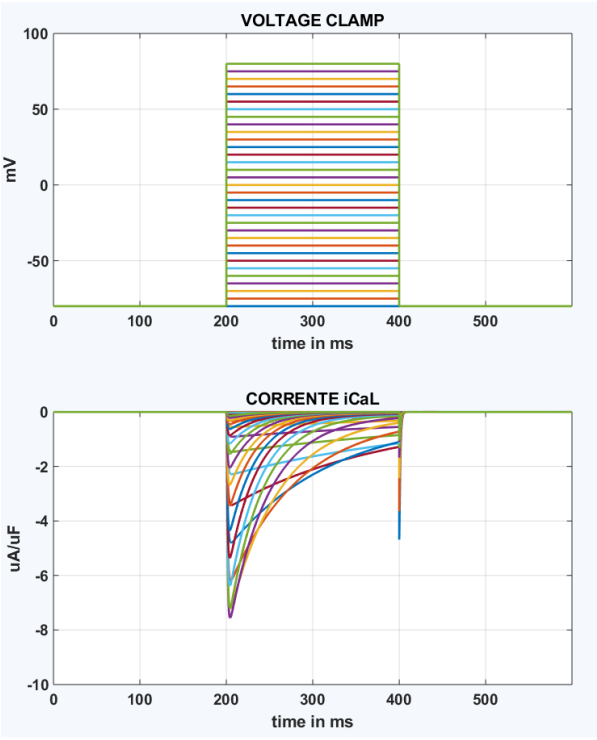

Figura 5: Resultado da simulação do canal de cálcio de longa duração: grampeamento da voltagem e corrente iCaL.

Ainda como resultado dessa simulação é possível visualizar (Figura 6) a variação da condutância do canal e a curva da corrente vs tensão (curva I x V).

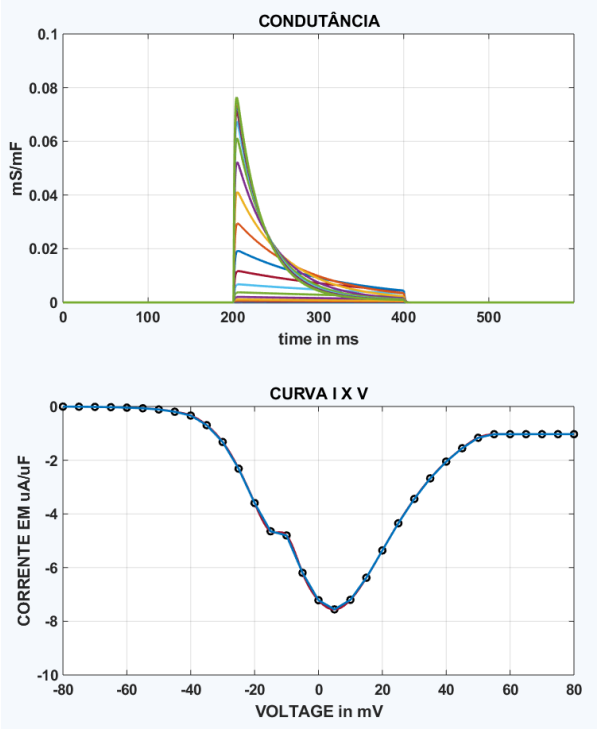

Figura 6: Resultado da simulação do canal de cálcio de longa duração: variação da condutância do canal e sua respectiva curva I x V.

Discussão

Com a implementação dos modelos biofísicos de células em meio computacional, pode-se desenvolver ferramentas que facilitem o aprendizado dessas estruturas. Muitas áreas do conhecimento já utilizam o MATLAB® como ferramenta para facilitar o ensino. Por esse motivo o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma ferramenta computacional para simular um importante experimento utilizado para estudo da condutância dos principais canais iônicos: o *Voltage-Clamp*. Com essa ferramenta é possível entender alguns conceitos que só seriam observados experimentalmente, visto que nem todos os cursos que possuem na grade curricular matérias de biofísica conseguem abordar esse tema de forma empírica. Utilizando a ferramenta o estudante pode alterar parâmetros e observar quais as mudanças ocorrem nas correntes iônicas bem como visualizar os estados desses canais.

Nesse contexto, o trabalho em questão busca facilitar a compreensão de conceitos de biofísica a partir de ferramentas computacionais, complementando assim o ensino dos princípios básicos do funcionamento dos canais iônicos para estudantes da área de biologia. Como proposta para trabalhos futuros, pretende-se comparar os resultados das simulações com dados experimentais reportados na literatura e implementar ferramentas que simulem o efeito de fármacos e condições patológicas que afetam os principais canais iônicos.

Referências

[1] HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. 45 p. Paper (PhD) - Physiological Laboratory, University of Cambridge, [S.l.], 1952.

[2] NOBLE, D.; GARNY, A.; NOBLE, P.J. How the Hodgkin – Huxley equations inspired the cardiac physiome project. Journal Physiol. n. 590.11, p. 2613 – 2628, 2012.

[3] MCCULLOCH, A.D. Systems Biophysics: Multiscale Biophysical Modeling of Organ Systems. Biophysical Journal. n. 110, p. 1023 – 1027, 2016.

[4] PUGLISI J.L.; BERS D.M. LabHEART: an interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport. Am J Physiol 2001 Dec; 281(6): C2049-60.

[5] SILVA, R.S.; BISSACO, M.A.S.; GOROSO, D.G. MioLab, a rat cardiac contractile force simulator: applications to teaching cardiac cell physiology and biophysics. Computer Methods and Programs in Biomedicine (Print), v. 122, p. 480-490, 2015.

[6] MAHAJAN A et al. A Rabbit Ventricular Action Potential Model Replicating Cardiac Dynamics at Rapid Heart Rates. Biophysical Journal Volume 94, 392 – 410, 2008.

[7] BONDARENKO VE et al. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H1378–H1403, 2004.

[8] WINSLOW et al. A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. Biophys J. 2004 Sep; 87(3): 1507-25.