

Artigo Original

recebido: 15/03/2001 e aceito em 18/08/2001

**Descrição matemática da
dinâmica iônica em tecidos
neurais**

*Mathematical description of the ionic
dynamic of neuronal tissues*

H. Z. Teixeira

Aluno de Doutorado
Programa de Engenharia Biomédica - COPPE/UFRJ
Caixa Postal 68.510, 21945-970 – Rio de Janeiro – RJ
e-mail: hewerson@peb.ufrj.br

A. C. G. Almeida

Professor Adjunto
Laboratório de Neurociência Experimental
e Computacional – DEPEB/FUNREI
e-mail: acga@funrei.br

A. F. C. Infantosi

Professor Titular
Programa de Engenharia Biomédica - COPPE/UFRJ
e-mail: afci@peb.ufrj.br

A. M. Rodrigues

Aluno de Mestrado
Laboratório de Neurociência Experimental
e Computacional – DEPEB/FUNREI
e-mail: antoniomarcio@zipmail.com.br

M. A. Duarte

Professor Adjunto
Departamento de Eletricidade – DEPEL/FUNREI
e-mail: mad@funrei.br

Resumo

Atividades neuronais associadas à epilepsia e à depressão alastrante são responsáveis por grandes movimentações iônicas no meio extracelular de tecidos neuronais, modificando a distribuição iônica extracelular e aumentando a complexidade do sistema. Os modelos matemáticos deste fenômeno usualmente baseiam-se em circuitos elétricos análogos e, por não considerarem os efeitos da eletrodifusão, podem ser questionados. Este trabalho propõe um modelo de eletrodifusão no qual a variação espaço-temporal das concentrações iônicas de K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} no meio extracelular é considerada durante a despolarização de células neuronais. Neste, as dinâmicas iônicas extracelulares são mutuamente acopladas pelo campo elétrico e pelos gradientes de concentração e moduladas pelos processos em nível sináptico; acoplamento este, geralmente, negligenciado. Um modelo eletroquímico para camadas de corpos celulares é também proposto. Experimentos realizados em córtex e em solução salina, onde destacaram-se as dinâmicas de K^+ e do potencial extracelular em resposta a injeções por eletroforese, foram simulados visando a validação do modelo. Os efeitos da eletrodifusão extracelular, precipitando a deflagração de potenciais de ação e contribuindo para a geração do potencial negativo extracelular, comprovam a importância desses mecanismos sobre a excitabilidade neuronal.

Palavras-chave: Dinâmica Iônica, Eletrodifusão, Eletroforese, Meio Extracelular.

Abstract

Neuronal activities associated to epilepsy and spreading depression are responsible for great ionic movements in the extracellular space of neuronal tissues altering the extracellular ionic distribution and increasing the system complexity. Mathematical modeling of this phenomenon are usually based on electric circuits. This approach does not consider electrodiffusion and its use can be questioned. This work proposes an electrodiffusion model where the space-temporal variations of K^+ , Na^+ , Cl^- and Ca^{2+} in the extracellular space are considered during the depolarization of neurons. The ionic dynamics mutually coupled by the electric field and the concentration gradients are modulated by processes at the synaptic level. This coupling is generally neglected. An electrochemical model of cellular body layers associated to the electrodiffusion was developed. Experiments carried out in cortex and in saline solution, where the K^+ and the extracellular potential dynamics in response to electrophoretic injections were emphasized, were simulated aiming at the model validation. The effects of the extracellular electrodiffusion, precipitating the elicitation of action potentials and contributing to the generation of the negative extracellular potential, confirm the importance of these mechanisms on the neuronal excitability.

Keywords: Electrodiffusion, Electrophoreses, Extracellular Medium, Ionic Dynamics.

Extended Abstract

Introduction

Neuronal activities associated to the epilepsy and spreading depression is responsible for great ionic movements in the extracellular space of neuronal tissues. A change in the extracellular ionic distribution influences the dynamics of the whole system, hence increases its complexity. The representation of neuronal systems is usually made with analogies to electric circuits, which negates fundamental mechanisms, such as the diffusion and the effect of the electric field (Vigmond et al., 1997). The ionic movement should consider the coupling of concentration and potential gradient. This work aims to describe an electrodiffusion model that represents the space-temporal variations of the ionic concentrations in the extracellular space, whose dynamics are mutually coupled.

Material and Methods

The extracellular space was represented by a matrix of compartments. The diffusion mechanisms and the effects of the electric field were implemented using difference equations (Almeida et al., 1998). For the diffusion, the changes in the concentration in one compartment is equal to the sum of the neighboring compartments contributions due to the existence of a concentration gradient (equation 1). The effect of the electric field on the concentration is given by the sum of the inward and outward ionic current densities (equation 4). Based on these, the model of the electrodiffusion (equation 6) and the potential distribution (equation 8) were established.

Each extracellular compartment was coupled through a semi-permeable membrane to an intracellular one. The transmembrane potential was determined by means of a generalization of the Goldman-Hodgkin-Katz equation (equation 9) that predicts the influence of bivalent ions (Teixeira et al., 2000). Through the electrodiffusion model for neuronal tissues, simulations with K^+ electrophoretic injections were made in saline solution and in cortical media.

Results and Discussions

Comparing simulation results with experimental data brings to some important aspects about the proposed model. In the simulation considering the free medium the potential curve in response to the electrophoretic injection (Figure 5b) depicts a quite similar result to the experimental measure (Figure 5a). For the cortical medium, the K^+ curve obtained from simulation (Figure 6b) shows a very closed morphology

compared to the experimental result (Figure 6a) of Lux and Neher (1973). Considering the ionic movements mutually coupled by the electric field, the dynamics of the other ions (Figure 7) and the extracellular potential (Figure 8) in response to the stimulus can also be predicted.

In the phase diagrams of the ionic concentration and the extracellular potential (Figure 9) it is noted that the dynamics of the injected ion (K^+) precedes the behavior of the other ions, indicating that the movement of K^+ is responsible for the negativity in the extracellular potential and the ionic displacements. If just the diffusion mechanisms are considered, a higher level of the steady state is reached for the simulation of the K^+ dynamic (Figure 10) in comparison to the experimental result of Figure 6a. However, the experimental behavior of the K^+ extracellular concentration in response to the electrophoretic injection does not substantially differ from the simulations at different levels of injection. Thus the model seems to be capable to describe the steady-state of K^+ concentration (Figure 11).

The effect of the electrodiffusion on excitability was assessed by comparing simulations considering just the diffusion mechanisms to those in which the electric field was considered. In the first, as a response to an electrophoretic injection, just the injected ion (K^+) moves (Figure 12a), while in the second, the movement of K^+ causes the movement of the other ions (Figure 12b-d). The later is due to the coupling effect of the electric field which also implies the negative extracellular shift potential (Figure 12e) and the precipitation of action potentials (Figure 12f). Thus the effect of the electric field over the ionic movement results in an increasing of the excitability.

Conclusion

The K^+ injection is responsible for the ionic gradients along the extracellular medium which generate an electric field, which would then result in a negativity of the extracellular potential. This follows the hypothesis that the negative slow potential can be explained based on the interpretation of Nernst potentials that settle down along the extracellular medium. The coupling between ions is fundamental for simulating the experimental K^+ dynamics and also for mimicking the other ion dynamics and the extracellular potential. Moreover, the representation of the intracellular medium of the neuronal mass in the simulated cortical tissue through a purely electrochemical model, allows to predict the effect of the electric field over the excitability.

Introdução

A modelagem realística de sistemas neuronais é, em geral, abordada a partir da representação dos mecanismos iônicos transmembrânicos por meio de circuitos elétricos análogos. No entanto, na simulação de fenômenos que envolvem grandes fluxos iônicos, como a epilepsia e a depressão alastrante (DA), esse tipo de representação não é adequada, pois mecanismos fundamentais, como a difusão e o efeito de acoplamento iônico intra e extracelulares através do campo elétrico, são negligenciados (Almeida *et al.*, 1998, Vigmond *et al.*, 1997).

Em um tecido neuronal, ao aumento local da concentração de um determinado íon corresponde um gradiente de concentração que, por sua vez, resulta em difusão. Os gradientes de potencial produzidos irão movimentar outros íons presentes, os quais, num processo mutuamente acoplado, influenciarão na dinâmica do primeiro íon.

A movimentação iônica inclui um duplo acoplamento, envolvendo os gradientes de concentração e o gradiente de potencial, devendo, dessa forma, ser descrita por mecanismos de eletrodifusão. A difusão tem sido sugerida como um dos principais mecanismos na eliminação do excesso de íons do meio extracelular (Lux e Neher, 1973) que é um importante canal de comunicação entre células (Nicholson, 1979). Por outro lado, de acordo com Dudek *et al.* (1986), o campo elétrico parece ser um importante processo de acoplamento de massas neuronais, durante atividades de grande excitação, como é o caso da epilepsia e da depressão alastrante.

Este trabalho tem como objetivo a representação da eletrodifusão iônica no meio extracelular de tecidos neuronais, modelando a interação iônica, destacando-se a importância do acoplamento pelo campo elétrico nos processos em que ocorre despolarização de células neuronais. A consistência do modelo pôde ser verificada pela reprodução de observações experimentais realizadas em córtex, por Lux e Neher (1973). O efeito da eletrodifusão sobre a excitabilidade de um tecido neuronal pôde ser verificado comparando-se simulações de potenciais transmembrânicos, considerando-se, ou não, o acoplamento entre os íons.

Modelo para Eletrodifusão em Tecidos Neuronais

O espaço extracelular foi representado tridimensionalmente por uma matriz 11×11×11 cubos, ou compartimentos justapostos, cuja arestas medem 31,6 mm. Para efeito de simplificação, admitiu-se ser um meio

isotrópico (Gardner-Medwin, 1983). Os íons considerados foram sódio, potássio, cloreto e cálcio. Para uma determinada espécie iônica, o fluxo entre dois compartimentos vizinhos depende das diferenças de concentração e de potencial, tendo direção da região de maior potencial eletroquímico para a de menor (Almeida *et al.*, 1996).

A partir de processos discretos no tempo e no espaço, representando de forma elementar os mecanismos básicos da difusão e da eletrodifusão, através de operações de diferenças, deduziu-se as equações contínuas fundamentais desses mecanismos (Almeida *et al.*, 1998). Equações de diferenças constituíram a base das implementações computacionais do modelo, sendo os efeitos de eletrodifusão descritos por operações entre os compartimentos. No caso da difusão, a concentração no compartimento central no instante de tempo atual, $C(x,y,t+\Delta t)$, foi obtida por:

$$C(x,y,t+\Delta t) = C(x,y,t) - k \cdot [4 \cdot C(x,y,t) - C(x+1,y,t) - C(x-1,y,t) - C(x,y+1,t) - C(x,y-1,t)] \quad (1)$$

onde x, y , são as coordenadas do compartimento, t o instante de tempo anterior e $t+\Delta t$, o instante de tempo atual. No limite para Δx e Δt tendendo a zero, pode-se deduzir a segunda lei de Fick:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \nabla^2 C \quad (2)$$

onde $D = k \cdot \Delta x^2 / \Delta t$, sendo D , a constante de difusão (cm^2/s).

O efeito de difusão iônica acarreta movimentação de cargas elétricas que, por sua vez, provocará uma alteração na distribuição de potencial, V . A atividade neuronal é uma fonte importante de movimentações iônicas que resultam em campos elétricos que variam espaço-temporalmente. Esses campos podem alterar significativamente a variação espaço-temporal da concentração iônica, produzindo fluxos iônicos que podem ser mensurados como densidades de correntes iônicas. Uma equação empírica, atribuída a Kohlrausch, foi utilizada para o cálculo da densidade de corrente. O fundamento é que a densidade de corrente iônica, \vec{J} , em uma solução iônica, submetida a um campo elétrico, $-\vec{\nabla}V$, será diretamente proporcional à concentração do íon, à mobilidade do íon, u , à valência, z , do íon e a constante de Faraday, $F = 96,487 \text{ C/mMol}$. A densidade de corrente deverá ter a mesma direção, \vec{n} , do campo elétrico. Dessa forma, tem-se:

$$\vec{J} = -z^2 \cdot F \cdot u \cdot C(x, y, t) \cdot \vec{\nabla} V \cdot \vec{n} \quad (3)$$

Utilizando-se, ainda, a compartimentalização (Figura 1), estimou-se o efeito do campo elétrico sobre a concentração iônica do compartimento central, através de:

$$C(x, y, t + \Delta t) = C(x, y, t) + \frac{\vec{J}_{x+1}}{z \cdot F \cdot \Delta x} + \frac{\vec{J}_{x-1}}{z \cdot F \cdot \Delta x} + \frac{\vec{J}_{y+1}}{z \cdot F \cdot \Delta y} + \frac{\vec{J}_{y-1}}{z \cdot F \cdot \Delta y} \quad (4)$$

A partir da densidade de corrente em cada compartimento, calculou-se a proporção de ions que se desloca de um compartimento para seus vizinhos, num dado intervalo de tempo. De (3) e (4), para o caso bidimensional, tem-se:

$$C(x, y, t + \Delta t) = C(x, y, t) + z \cdot u \cdot \left\{ \left[C(x+1, y, t) \cdot \frac{V(x+1, y, t) - V(x, y, t) \cdot \Delta t}{\Delta x^2} \right] - \left[C(x-1, y, t) \cdot \frac{V(x, y, t) - V(x-1, y, t) \cdot \Delta t}{\Delta x^2} \right] \right\} + z \cdot u \cdot \left\{ \left[C(x, y+1, t) \cdot \frac{V(x, y+1, t) - V(x, y, t) \cdot \Delta t}{\Delta y^2} \right] - \left[C(x, y-1, t) \cdot \frac{V(x, y, t) - V(x, y-1, t) \cdot \Delta t}{\Delta y^2} \right] \right\} \quad (5)$$

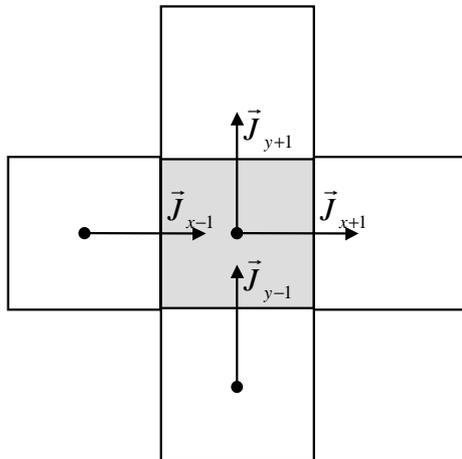


Figura 1. Diagrama esquemático das densidades de correntes iônicas que entram e deixam o compartimento central em direção aos compartimentos vizinhos.
Figure 1. Schematic diagram of the inward and outward density currents in the central compartment.

Incorporando os efeitos do gradiente de concentração (1) e do campo elétrico (5) e deduzindo-se a equação no contínuo tem-se a equação de eletrodifusão:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{\lambda^2} \cdot \nabla^2 C + \frac{z \cdot F \cdot D}{R \cdot T \cdot \lambda^2} \cdot \vec{\nabla} C \cdot \vec{\nabla} V + \frac{z \cdot F \cdot D}{R \cdot T \cdot \lambda^2} \cdot C \cdot \nabla^2 V \quad (6)$$

onde λ , tortuosidade do meio, é de 1,6 para tecidos corticais (Nicholson, 1985), R é a constante universal dos gases (8,314 mVc/KmMol) e T , o valor de temperatura em Kelvin (273 + 37 °C).

A equação (6) foi aplicada a cada íon, sendo o potencial elétrico extracelular, V , a variável comum, e portanto o elemento acoplador das dinâmicas iônicas. Logo, o problema fundamental consiste em como o potencial elétrico é estabelecido pelo conjunto de ions em cada compartimento. Na membrana celular, o potencial transmembrânico, de acordo com a equação de Goldman-Hodgkin-Katz, ou GHK (Hille, 1992), fundamenta-se no equilíbrio das correntes iônicas transmembrânicas, sendo esse equilíbrio determinado pela equação de Nernst (potencial de equilíbrio iônico, estabelecido entre as faces de uma membrana com permeabilidade seletiva a um único íon, sujeitas a diferentes concentrações dessa espécie iônica). O princípio do equilíbrio é atingir fluxo total zero através da membrana, i.e, a soma das correntes iônicas através da membrana, para o íon permeável, deve ser nula. A equação de GHK é uma extensão da equação de Nernst para membranas permeáveis a mais do que uma espécie iônica e, portanto, o potencial de equilíbrio fica estabelecido quando o fluxo iônico total através da membrana é nulo.

O potencial extracelular foi calculado em função do equilíbrio de correntes iônicas em cada ponto do meio, i.e., o fluxo iônico total em cada ponto do extracelular deve ser nulo (Teixeira *et al.*, 2000). Assim, tem-se:

$$\begin{aligned} & -z_{Na} \cdot F \cdot D_{Na} \cdot \left(\vec{\nabla} [Na^+] + \frac{z_{Na} \cdot F}{R \cdot T} \cdot [Na^+] \cdot \vec{\nabla} V \right) \\ & -z_K \cdot F \cdot D_K \cdot \left(\vec{\nabla} [K^+] + \frac{z_K \cdot F}{R \cdot T} \cdot [K^+] \cdot \vec{\nabla} V \right) \\ & -z_{Cl} \cdot F \cdot D_{Cl} \cdot \left(\vec{\nabla} [Cl^-] + \frac{z_{Cl} \cdot F}{R \cdot T} \cdot [Cl^-] \cdot \vec{\nabla} V \right) \\ & -z_{Ca} \cdot F \cdot D_{Ca} \cdot \left(\vec{\nabla} [Ca^{2+}] + \frac{z_{Ca} \cdot F}{R \cdot T} \cdot [Ca^{2+}] \cdot \vec{\nabla} V \right) = \vec{0} \end{aligned} \quad (7)$$

A partir de (7), deduziu-se a expressão para o cálculo do gradiente de potencial:

$$\bar{\nabla}V = -\frac{R \cdot T}{F} \cdot \frac{\sum_{j=1}^n z_j \cdot D_j \cdot \bar{\nabla}C_j}{\sum_{j=1}^n z_j^2 \cdot D_j \cdot C_j} \quad (8)$$

onde o subscrito "j" se refere à espécie iônica.

Tomando-se a equação (6), aplicada a cada íon, e a equação (8) para o cálculo do potencial extracelular, tem-se então o modelo que descreve a dinâmica iônica extracelular no qual o acoplamento entre os íons através do potencial extracelular é considerado. Um diagrama simplificado do algoritmo da modelagem é apresentado na Figura 2.

Modelo Eletroquímico para Camada de Corpos Celulares

A cada compartimento do espaço extracelular foi acoplado um compartimento representando o meio intra. Ambos foram conectados entre si por meio de uma membrana semi-permeável contendo canais de sódio, potássio, cloreto e cálcio (Figura 3). As movi-

mentações iônicas entre os compartimentos do meio extracelular foram descritas pelos mecanismos de eletrodifusão.

O potencial transmembrânico, V_m , foi determinado através de uma generalização da equação de GHK que inclui a influência de íons bivalentes (Teixeira *et al.*, 2000):

$$V_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \log \frac{b - a + \sqrt{(a-b)^2 + 4 \cdot (a+c) \cdot (d+b)}}{2 \cdot (a+c)} \quad (9)$$

onde:

$$a = P^{Na} \cdot C_i^{Na} + P^K \cdot C_i^K + P^{Cl} \cdot C_o^{Cl}$$

$$b = P^{Na} \cdot C_o^{Na} + P^K \cdot C_o^K + P^{Cl} \cdot C_i^{Cl}$$

$$c = 4 \cdot P^{Ca} \cdot C_i^{Ca}$$

$$d = 4 \cdot P^{Ca} \cdot C_o^{Ca}$$

P^{Na} , P^K , P^{Cl} e P^{Ca} são valores de permeabilidades iônica que variam em função do potencial transmem-

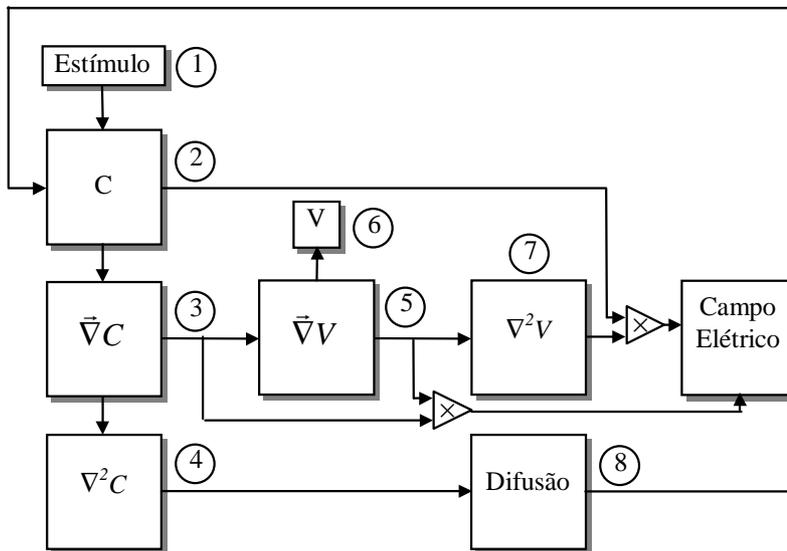


Figura 2. Diagrama simplificado do algoritmo para o cálculo da eletrodifusão no meio extracelular: (1) estímulo; (2) concentração; (3) gradiente de concentração em função das concentrações e das distâncias entre os compartimentos; (4) laplaciano de concentração obtido a partir do gradiente de concentração; (5) gradiente de potencial obtido a partir dos gradientes de concentração; (6) distribuição de potencial e (7) laplaciano de potencial em função do gradiente de potencial; (8) difusão; (9) efeito de campo elétrico; (10) eletrodifusão e (11) atualização das concentrações iônicas. **Figure 2.** Simplified diagram of the algorithm for the calculation of the electrodiffusion in the extracellular space: (1) stimulus; (2) concentration; (3) concentration gradient as a function of concentrations and the distances between compartments; (4) Concentration Laplacian obtained from the concentration gradient; (5) potential gradient obtained from the concentration gradients; (6) potential distribution and (7) Potential Laplacian as a function of the potential gradient; (8) diffusion; (9) effect of the electric field; (10) electrodiffusion and (11) update of the ionic concentrations.

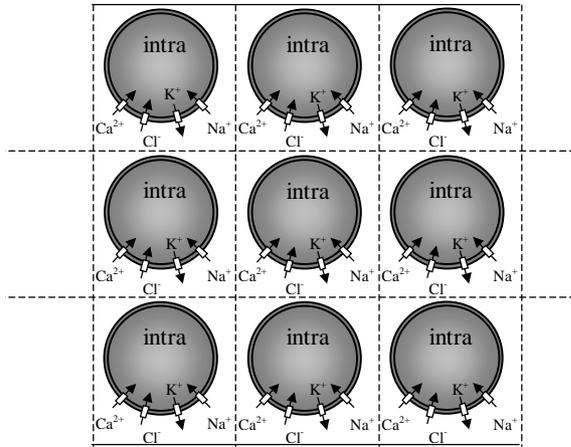


Figura 3. Diagrama esquemático do modelo eletroquímico para camada de corpos celulares imersos em uma matriz extracelular. As setas representam os sentidos dos fluxos iônicos no momento em que ocorre a despolarização da membrana. **Figure 3.** Schematic diagram of the electrochemical model of cellular body layers immersed in an extracellular matrix. The arrows indicate the ionic flow directions at the moment of the membrane depolarization.

brânico, sendo o cálculo destes análogo ao descrito por Hodgkin e Huxley (1952) para condutância. Conforme observa Hille (1992), a grandeza permeabilidade representa melhor a abertura de canais do que a condutância, sendo portanto mais adequado em um modelo eletroquímico. Assim, as permeabilidades iônicas foram determinadas por:

$$P^{Na} = \bar{P}^{Na} \cdot m^3 \cdot h$$

$$P^K = \bar{P}^K \cdot n^4$$

$$P^{Cl} = \bar{P}^{Cl}$$

$$P^{Ca} = \bar{P}^{Ca} \cdot m_1^3 \cdot h_1$$

onde os valores máximos de permeabilidade foram adotados como $\bar{P}^{Na} = 120$, $\bar{P}^K = 36$, $\bar{P}^{Cl} = 0,3$ e $\bar{P}^{Ca} = 100$ cm/s (baseado nos valores máximos de condutância obtidos por Hodgkin e Huxley, 1952). Os valores dos fatores de ativação de canais (m , m_1 e n) e os fatores de inativação (h e h_1) foram obtidos usando-se a expressão geral:

$$\frac{dx}{dt} = \hat{\alpha}_x \cdot (1-x) - \hat{\beta}_x \cdot x \quad \text{para } x = m, m_1, n, h \text{ e } h_1 \quad (10)$$

sendo $\hat{\alpha}_x$ a taxa de transferência iônica proporcional de extra para intra e $\hat{\beta}_x$ a taxa de transferência iônica proporcional de intra para extra. Para o cálculo dos fatores de ativação, as curvas de $\hat{\alpha}_x$ e $\hat{\beta}_x$ foram ajustadas tomando-se:

$$\hat{\alpha}_x = \hat{\alpha}_x^o \cdot \frac{(Vm + V_m^x)}{e^{\left(\frac{Vm + V_m^x}{V_x^\alpha}\right)} - 1} \quad \text{e} \quad \hat{\beta}_x = \hat{\beta}_x^o \cdot e^{\frac{Vm}{V_x^\beta}}$$

enquanto que para os fatores de inativação de canais, utilizou-se:

$$\hat{\alpha}_x = \hat{\alpha}_x^o \cdot e^{\frac{Vm}{V_x^\alpha}} \quad \text{e} \quad \hat{\beta}_x = \frac{\hat{\beta}_x^o}{e^{\left(\frac{Vm + V_m^x}{V_x^\beta}\right)} + 1}$$

sendo os parâmetros de ajuste sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de ajuste das curvas de $\hat{\alpha}_x$ e $\hat{\beta}_x$ para os fatores de ativação e inativação. **Table 1.** Adjust parameters of $\hat{\alpha}_x$ and $\hat{\beta}_x$ curves for activation and inactivation factors

x	$\hat{\alpha}_x^o$	$\hat{\beta}_x^o$	V_m^x	V_x^α	V_x^β
m	0,10	4,000	25	10	18
n	0,01	0,125	10	10	80
m_1	0,10	4,000	25	5	9
h	0,07	1,000	-	20	10
h_1	0,07	1,000	-	20	10

Um diagrama simplificado, esquematizando as etapas do algoritmo do modelo para camadas de corpos celulares, é apresentado na Figura 4. O algoritmo consiste inicialmente em calcular os parâmetros $\hat{\alpha}_x$ e $\hat{\beta}_x$ e, então, determinar os fatores de ativação (m , m_1

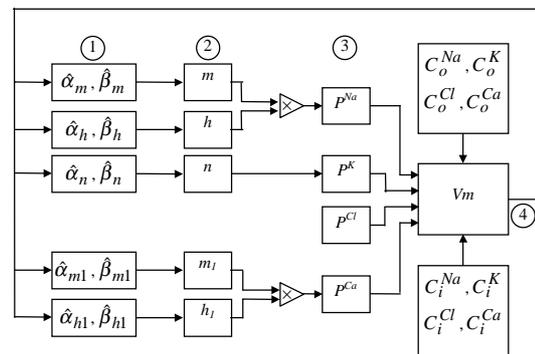


Figura 4. Diagrama simplificado do algoritmo do modelo para corpos celulares: (1) cálculo das taxas de transferência $\hat{\alpha}_x$ e $\hat{\beta}_x$; (2) cálculo dos fatores de ativação, m , m_1 e n , e inativação, h e h_1 ; (3) cálculo das permeabilidades de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} ; (4) potencial transmembrânico (equação 9). **Figure 4.** Simplified diagram of the algorithm of the cellular bodies model: (1) calculation of the transfer rates $\hat{\alpha}_x$ and $\hat{\beta}_x$; (2) calculation of the activation factors, m , m_1 and n , and inactivation factors, h and h_1 ; (3) calculation of the permeability of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} ; (4) transmembrane potential (equation 9).

e n) e inativação (h e h_1) utilizados no cálculo das permeabilidades. A partir destas e das concentrações iônicas entre os meios intra e extra, pode-se calcular o potencial transmembrânico usando-se a equação de GHK (9).

Materiais e Métodos

Parâmetros do modelo

O meio livre, no modelo, foi mimetizado como uma solução salina com 150 mM de NaCl e 3 mM de KCl e tortuosidade $\lambda = 1,0$. A concentração iônica usada para o meio extracelular cortical foi 142 mM de Na^+ , 4 mM de K^+ , 103 mM de Cl^- e 1,2 mM de Ca^{2+} e a tortuosidade adotada foi de $\lambda = 1,6$.

Para concentração iônica no meio intracelular adotou-se 18 mM de Na^+ , 140 mM de K^+ , 16 mM de Cl^- e $6,37 \times 10^{-3}$ mM de Ca^{2+} , as quais foram mantidas fixas com vistas a se determinar a influência da eletrodifusão extracelular sobre os excitabilidade neuronal.

Iontoforese

Para simular os experimentos realizados por Lux e Neher (1973), que utilizaram a injeção de ions em córtex através de eletroforese, a injeção de corrente I_j foi representada diretamente pelo fluxo iônico ϕ_j aplicado ao compartimento central, no meio extracelular, da rede de compartimentos, sendo:

$$\phi_j = \frac{I_j \cdot \Delta t}{z_j \cdot F \cdot (\Delta x \cdot \Delta y \cdot \Delta z)} \quad (11)$$

onde Δx , Δy e Δz são as dimensões do compartimento, z_j a valência do íon j , F , a constante de Faraday e $\Delta t = 1 \times 10^{-4}$ s.

Injeção de Corrente por Eletroforese em Meio Livre

Para a validação do modelo, foram realizadas, experimentalmente, injeções de corrente de K^+ por eletroforese, em um meio livre composto por uma solução salina com 150 mM de NaCl e 3 mM de KCl. Um cuba de vidro, medindo $2,0 \times 2,5 \times 1,0$ cm, foi preenchida com a solução salina e a injeção de K^+ foi feita a partir da aplicação de um potencial positivo, com duração de 5 s, através de um microeletrodo de vidro (diâmetro da ponta: 1,5 mm) preenchido com solução KCl a 3,0 M. O potencial resultante da movimentação de K^+ no meio livre foi medido com um microeletrodo idêntico ao da injeção, sendo um eletrodo Ag-AgCl utilizado como referência. Através de um micromani-

pulador, a distância entre os microeletrodos foi mantida em torno de 40 mm.

Recursos Computacionais

Os modelos foram implementados em linguagem Fortran 90 (compilador *FORTRAN 90 Compiler 1.2 – SUN Microsystems*) e as simulações realizadas em estação *SUN Ultra 10*, com processador *UltraSparc-III*, 300 MHz, e 512 MB de memória RAM. Para exibição gráfica, o programa *MATLAB 5.3* foi utilizado.

Resultados e Discussão

Dinâmicas de Concentração e de Potencial no Espaço Extracelular

Utilizando-se o modelo para eletrodifusão em tecidos neuronais, simulações com injeções de corrente por eletroforese de K^+ , variando de 40 a 320 nA, foram realizadas para solução salina e para meio cortical, tendo como ponto de injeção o compartimento central da rede. Os resultados das simulações referem-se às concentrações no compartimento vizinho ao de injeção, visando aproximar a reprodução dos experimentos de Lux e Neher (1973), que mediram a uma distância de 40 mm do ponto de injeção.

Para o meio livre, a curva de potencial simulada (Figura 5b) apresenta comportamento bastante similar a medida experimental do potencial elétrico associado à injeção de K^+ em solução de nutriente para retina de ave (Figura 5a).

Consideração análoga pode ser feita quando da comparação do resultado da simulação para o meio cortical. Na Figura 6a é mostrada a medida de K^+ realizada por Lux e Neher (1973), a partir da aplicação de uma corrente de 80 nA, por eletroforese de K^+ , durante 50 s, em córtex de gato. Segundo estes autores após 20 s de injeção há um aparente regime permanente da concentração deste íon, e quando a corrente cessa, a taxa de decaimento da concentração de K^+ em direção aos níveis iniciais é aproximadamente uma imagem especular da fase de aumento da concentração, tanto em meio livre quanto em meio cortical. Este comportamento praticamente não se difere do resultado da simulação (Figura 6b).

Utilizando-se o modelo de eletrodifusão proposto, as dinâmicas das concentrações dos demais ions associadas às injeções de K^+ por eletroforese podem ser previstas (Figura 7). Similarmente a simulação do meio livre, é possível prever a dinâmica de potencial no meio extracelular de córtex (Figura 8). Como à injeção de K^+ extracelular associa-se um campo elétrico

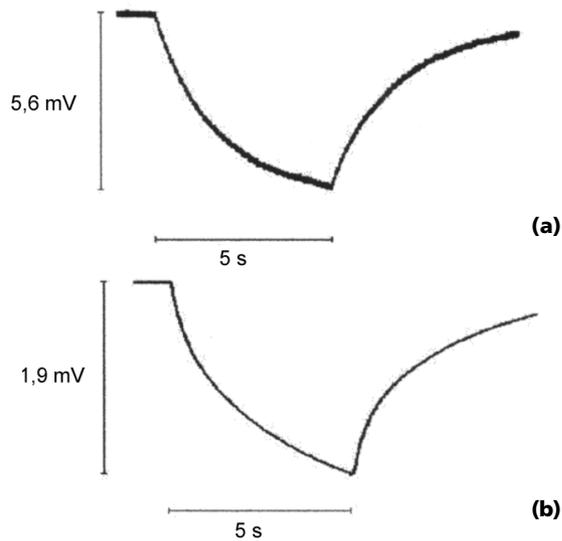


Figura 5. Resposta do potencial à injeção de K^+ por eletroforese (320 nA) em solução nutritiva para retina de ave: **(a)** experimental, **(b)** simulação. **Figure 5.** Potential response to the electrophoretic injection of K^+ (320 nA) in a nutritious solution for chicken retina: **(a)** experimental, **(b)** simulation.

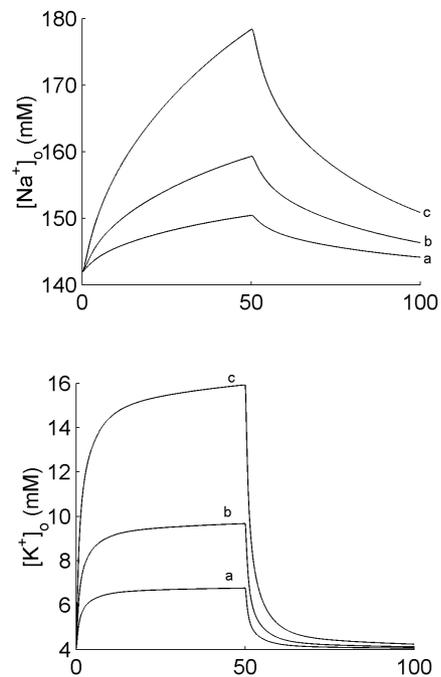


Figura 7. Dinâmica de concentração no compartimento central do meio extracelular de córtex em resposta a injeção por eletroforese de K^+ durante 50 s. (a) 80; (b)160; (c) 320 nA. **Figure 7.** Concentration dynamics in the central compartment of the cortical extracellular space in response to K^+ electrophoretic injection during 50 sec. (a) 80; (b)160; (c) 320 nA.

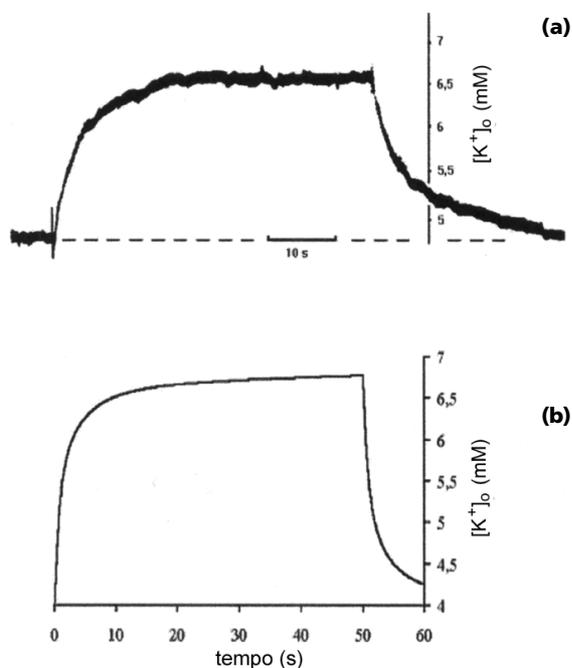
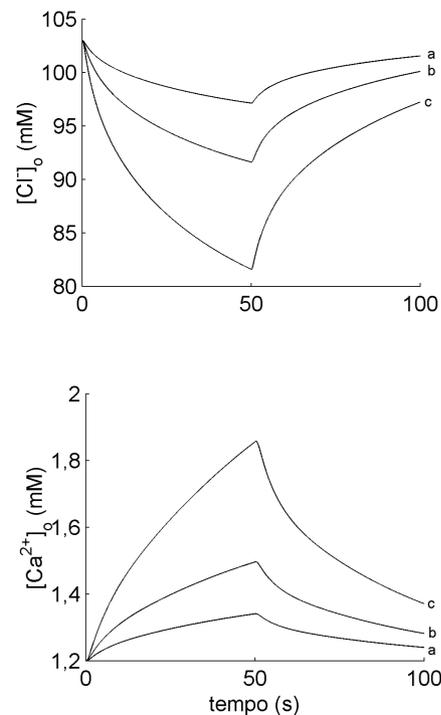


Figura 6. Dinâmica de K^+ no meio extracelular de córtex em resposta à injeção de 80 nA durante 50 s. **(a)** experimental, **(b)** simulação. **Figure 6.** Dynamics of K^+ in the cortical extracellular space in response to an injection of 80 nA during 50 sec. **(a)** experimental, **(b)** simulation.



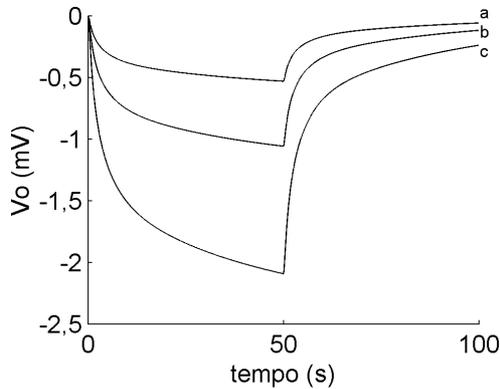


Figura 8. Dinâmica de potencial no meio extracelular de córtex em resposta a uma injeção durante 50 s. (a) 80; (b)160; (c) 320 nA. **Figure 8.** Potential dynamics in the cortical extracellular space in response to an injection during 50 sec. (a) 80; (b)160; (c) 320 nA.

(variação na distribuição de potencial extracelular, Figuras 5 e 8) e a atuação deste campo pode acarretar a movimentação dos demais íons, a dinâmica de cada íon em relação ao potencial extracelular foi investigada através de diagramas de fase (Figura 9).

Tais diagramas de fase constituem um retrato da estrutura do sistema, permitindo verificar como as dinâmicas iônicas e do potencial estão relacionadas ao estímulo. Tomando-se o sentido da órbita o mesmo da injeção em meio livre, na Figura 9 observa-se que o cátion injetado (K^+) tem uma dinâmica que antecede o comportamento dos demais íons, relativamente ao potencial extracelular. Além disso, nota-se que os cátions apresentam órbitas com sentido anti-horário quando se injeta K^+ . O oposto ocorre para os ânions em resposta ao estímulo, e.g. para o Cl^- .

Esta constatação, não evidenciável em gráficos de concentrações e potencial extracelular em função do tempo, conduz a apontar a injeção de K^+ como a responsável pela negatividade extracelular e pelos deslocamentos iônicos. Consideração similar pode ser feita sobre a dinâmica iônica em meio livre.

Quando apenas os mecanismos de difusão são considerados (equação 1), a simulação da dinâmica do K^+ (Figura 10) difere daquela registrada experimentalmente (Figura 6). A ausência do acoplamento iônico, proporcionado pelos mecanismos da eletrodifusão, resulta, como mostrado na Figura 10, em uma dinâmica de K^+ além dos níveis determinados por Lux e Neher (1973). Uma possível interpretação deste resultado seria que no modelo de eletrodifusão o campo elétrico criado pela injeção de K^+ , ao estabelecer um gradiente iônico, atuaria como uma retroalimen-

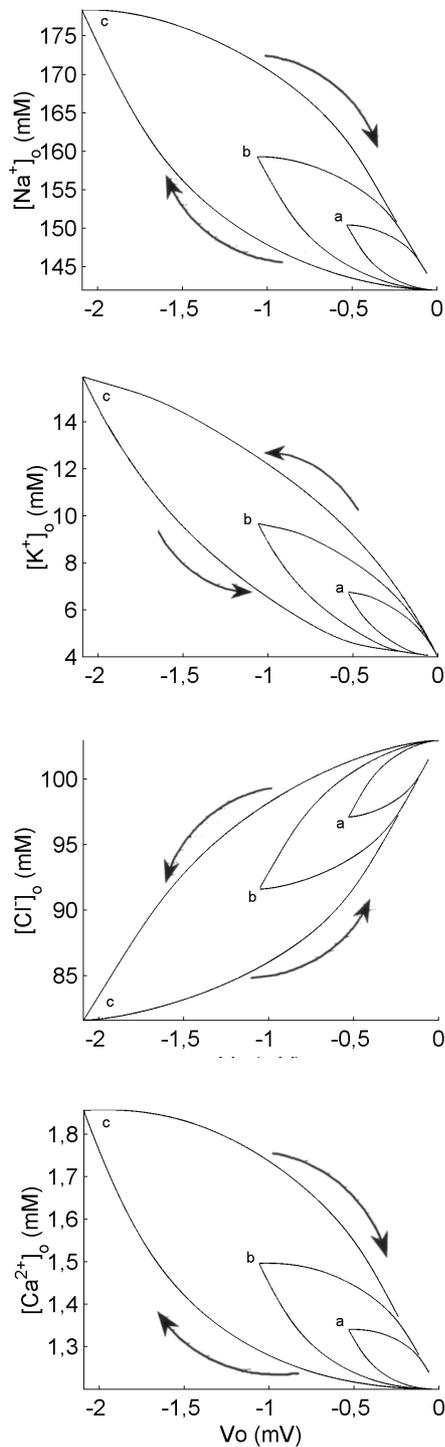


Figura 9. Diagrama de fase entre o potencial e a concentração, no meio extracelular de córtex, referente ao compartimento vizinho ao de injeção por eletroforese de K^+ durante 50 s. (a) 80; (b)160; (c) 320 nA. **Figure 9.** Phase diagram between potential and concentration in the cortical extracellular space, regarding the neighboring compartment to the K^+ electrophoretic injections injection during 50 sec. (a) 80; (b)160; (c) 320 nA.

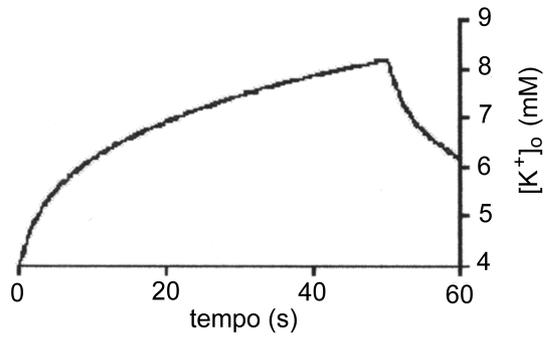


Figura 10. Simulação da dinâmica de K^+ no meio extracelular de córtex, em resposta a um injeção de K^+ (80 nA), considerando-se apenas os mecanismos de difusão. **Figure 10.** Simulation of the K^+ dynamic in the cortical extracellular space, in response to an electrophoretic injection of K^+ (80 nA), considering just the diffusion mechanism.

tação negativa sobre a dinâmica desse íon, estabelecendo, assim, um nível inferior de aparente regime permanente de concentração de K^+ .

Resultados experimentais da concentração de K^+ extracelular em resposta a eletroforese de K^+ comparados aos obtidos por simulação, tanto para o córtex quanto para o meio livre, não se diferem substancialmente, em particular no córtex para injeções de corrente inferiores a 160 nA (Figura 11). Tais achados sugerem ser o modelo capaz de descrever os aparentes regimes permanentes de concentração de K^+ , para diferentes níveis de corrente constantes de injeção desse íon no córtex cerebral e em meio livre.

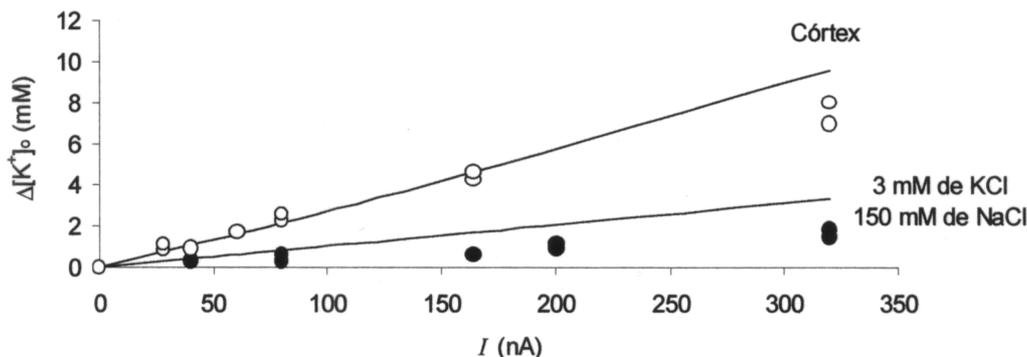


Figura 11. Concentração de K^+ extracelular em resposta a injeção por eletroforese de K^+ . Os símbolos, (•) solução salina e (o) córtex, referem-se aos dados experimentais e as linhas sólidas as simulações. $\Delta[K^+]_o$ refere-se a variação da concentração de K^+ em relação à concentração normal (4 mM para o meio extracelular cortical e 3 mM para meio livre). **Figure 11.** Extracellular K^+ concentration in response to K^+ electrophoretic injection. The symbols, (•) saline solution and (o) cortex, are related to the experimental data and the solid lines to simulation data. $\Delta[K^+]_o$ refers to the variation of the concentration of K^+ in relation to the normal concentration in absence of stimulus (4 mM for the cortical extracellular space and 3 mM for free medium).

Efeitos da Eletrodifusão sobre a Excitabilidade de Camadas de Corpos Celulares

Sabendo que a liberação de K^+ para o meio extracelular pode provocar a despolarização de células (Somjen, 1974), o efeito do acoplamento iônico, através do campo elétrico, sobre a excitabilidade de massas neuronais, foi investigado usando-se o modelo eletroquímico para camadas de corpos celulares. Para tal, mimetizou-se uma injeção de corrente de 120 nA de K^+ por eletroforese (equação 11) no compartimento central do meio extracelular, obtendo-se, então, os potenciais intra e extracelulares simulados, associados a cada compartimento.

A Figura 12 mostra as dinâmicas temporais das concentrações iônicas e dos potenciais extracelular e transmembrânico no compartimento central para a modelagem com acoplamento iônico, ou seja, considerando-se os mecanismos de eletrodifusão (equações 6 e 8), e decorrentes do efeito exclusivo da difusão (equação 1). Como esperado, ao contrário do que ocorre no sistema real, quando os efeitos de eletrodifusão não são considerados, apenas o íon injetado, K^+ , se movimenta (Figura 12a). Para os demais íons, a movimentação ocorre somente na presença do campo elétrico (Figura 12b-d); durante a injeção de K^+ , as concentrações de Na^+ e Ca^{2+} e de K^+ aumentam no compartimento de injeção enquanto que concentração de Cl^- decai rapidamente, com vistas a manter o meio em equilíbrio. Quando a injeção cessa ($t = 4$ s), o sistema tende a retornar para os valores iniciais de concentração.

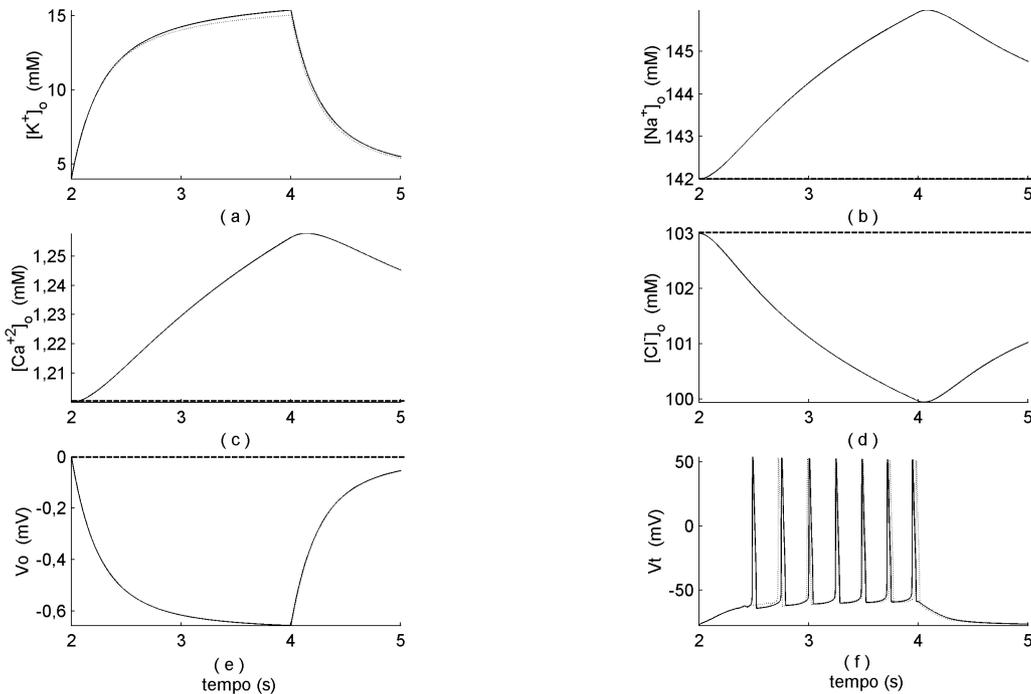


Figura 12. Dinâmica das concentrações iônicas (a – d), do potencial extracelular (e) e do potencial transmembrânico (f), em resposta a injeção de K^+ por eletroforese (120 nA durante 2 s) em meio cortical com acoplamento entre os ions através do campo elétrico (—) e sem acoplamento (---). **Figure 12.** Dynamic of ionic concentrations (a – d), of the extracellular potential (e) and of the transmembrane potential (f) in response to an electrophoretic injection of K^+ (120 nA during 2 sec) in the cortex, considering the ionic coupling effect of the electric field (—) and the effect of diffusion only (---).

O acoplamento iônico favorece o surgimento do *shift* negativo de potencial extracelular (Figura 12e), aspecto este não notado quando da modelagem exclusiva dos mecanismos de difusão. Na Figura 12f, considerando-se o efeito do campo elétrico, observa-se que o primeiro potencial de ação (PA) ocorre em $t = 2,5$ s, enquanto que ao se considerar somente a difusão, PA dispara 0,2 s depois. Portanto, a ação do campo elétrico sobre a movimentação iônica resulta em aumento da excitabilidade do sistema. Tais achados sugerem que em sistemas que envolvam grande sincronização de despolarizações neuronais, como na epilepsia e na DA, o acoplamento mútuo promovido pelo campo elétrico deve ser mais um fator a influenciar os processos responsáveis pela auto-organização que deflagra tais fenômenos.

O modelo de eletrodifusão proposto para o meio extracelular (equações 6 e 8), ao permitir a previsão do comportamento simultâneo de concentrações iônicas e de potenciais extracelulares e transmembrânicos (quando da injeção de K^+), constitui-se numa nova ferramenta para o estudo da atividade eletroquí-

mica em tecidos neuronais, sendo, além disso, mais compatível com os mecanismos intrínsecos desse tipo de sistema.

Conclusão

A modelagem dos mecanismos de eletrodifusão revela a origem do potencial negativo que surge no meio extracelular. Nas simulações de injeções de correntes por eletroforese, observa-se que a injeção de K^+ em solução salina, ou em tecido cortical, resultou em gradientes iônicos ao longo do meio extracelular que geram um campo elétrico, o qual explicaria a negatividade do potencial na vizinhança da injeção em relação a pontos mais distantes. Tal consideração segue hipóteses há muito apontadas para explicar o potencial lento negativo, tendo como base a interpretação dos potenciais de Nernst que se estabelecem ao longo do meio extracelular.

As simulações mostram a coerência entre a dinâmica de K^+ prevista pelo modelo e resultados experimentais, tanto em córtex quanto em solução salina. Através do modelo matemático, também é possível

prever a dinâmica dos demais ions, uma vez que estes se encontram mutualmente acoplados pelo campo elétrico. O acoplamento entre ions é fundamental para a reprodução da dinâmica de K^+ medida experimentalmente. Na modelagem, assumindo-se apenas o mecanismo de difusão, portanto não se considerando o campo elétrico criado pelo gradiente de concentração do íon injetado e ainda o acoplamento mútuo que esse campo cria entre os ions presentes no meio, obtém-se uma variação da concentração de K^+ além dos níveis mensurados experimentalmente.

A representação dos meios intracelulares da massa neuronal do tecido cortical simulado, através de um modelo puramente eletroquímico, no qual não figuram componentes de um circuito elétrico, mostrou ser razoável admitir a equação generalizada de GHK para um regime quase estacionário. Comportamentos capacitivos da membrana, bem como despolarizações abruptas em potenciais de ação, foram verificados, permitindo prever o efeito dos mecanismos de eletrodifusão extracelular sobre a excitabilidade do sistema.

Agradecimentos

Ao CNPq, à FAPERJ e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Referências

- Almeida, A.C.G., De Lima, V.M.F., Hanke, W. (1996), "Descrição Compartmentalizada das Dinâmicas Iônicas Intra e Extracelulares de Tecidos Neuronais", In: *Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 2, p. 647-648, Campos do Jordão, 13-17 Out.
- Almeida, A.C.G., Duarte, M.A., Teixeira, H.Z. (1998), "Modelo Matemático e Simulação da Eletrodifusão em Tecidos Neuronais", In: *Anais do IV Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde*, p. 337-338, Curitiba, 18-22 Out.

- Dudek, F.E., Snow, R.W., Taylor, C.P. (1986) "Role of Electrical Interactions in Synchronization of Epileptiform Bursts", In: *Advances in Neurology*, v. 44, p. 593-617, Raven Press, New York.
- Gardner-Medwin, A. R. (1983), "Analysis of Potassium Dynamics in Mammalian Brain Tissue", *J. Physiol.-London*, v. 335 (FEB), p. 393-426.
- Hille, B. (1992), "Elementary Properties of Ions Solution", In: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2ª ed., Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) "A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction in Nerve", *J. Physiology*, v. 117, n. 4, p. 500-544.
- Lux, H.D., Neher, H. (1973) "The Equilibration Time Course of $[K^+]$ ", *Exp. Brain Res.*, v. 17, n. 2, p. 190-205.
- Martins-Ferreira, H., Nedergaard, M., Nicholson, C. (2000), "Perspectives on Spreading Depression", *Brain Research Reviews*, v. 32, n. 1, p. 215-234.
- Nicholson, C. (1979), "Brain-Cell Microenvironment as a Communication Channel", In: *The Neurosciences Fourth Study Program*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, Edited by F. O. Schmitt, F. G. Worden, p. 457-476.
- Nicholson, C. (1985), "Diffusion from an Injected Volume of a Substance in Brain Tissue with Arbitrary Volume Fraction and Tortuosity", *Brain Research*, v. 333, n. 2, p. 325-329.
- Somjen, G.G. (1979), "Extracellular Potassium in the Mammalian Central Nervous System", *Annual Rev. Physiol.*, v. 41, p. 159-77.
- Teixeira, H.Z. (2000), *Modelagem Computacional da Eletrodifusão Extracelular durante a Depressão Alastrante*, Dissertação de Mestrado, Programa de Engenharia Biomédica, COPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 119 p., dez.
- Teixeira, H.Z., Infantes, A.F.C., Rodrigues, A.M., Duarte, M.A., Almeida, A.C.G. (2000), "Análise da Dinâmica Iônica no Meio Extracelular de Tecidos Neuronais", In: *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 1, p. 1003-1008, Florianópolis, 11-13 Set.
- Vigmond, E.J., Velazques, E.J., Valiante, T.A., et al. (1997), "Mechanisms of Electrical Coupling Between Pyramidal Cells", *J. Neurophysiol.*, v. 78, n. 6, p. 3107-3116.