

SIMULAÇÃO DO NEURÓNIO DE HODGKIN & HUXLEY

Juliana Couras Fernandes Silva

Mestrado Integrado em Engenharia Computacional

Simulação e Modelação – 3.º Trabalho

INTRODUÇÃO

As células acumulam, no meio intracelular, cargas negativas em excesso que se repelem, acumulando-se em redor da membrana plasmática. Esta, sendo uma camada bilipídica, não permite a passagem destas moléculas carregadas. Este excesso de cargas na face interior da membrana atrai cargas positivas do meio extracelular para a sua face exterior. Esta concentração de cargas opostas nas faces opostas da membrana leva a que esta aja como um condensador:

$$Q = C_m V [1]$$

Q = excesso de cargas, V = voltagem intermembranar, C_m = capacidade.

A capacidade membranar é proporcional à área da superfície da membrana.

$$C_m = c_m A [2]$$

A = área de superfície.

É de notar que os parâmetros constantes considerados nesta simulação, entre os quais a capacidade membranar, estão fixados nos valores que aproximam o resultado fisiológico obtido por Hodgkin & Huxley nas suas experiências num axónio gigante de lula¹. Para além disso, todos os valores introduzidos e produzidos são por unidade de área (mm^2).

Sabe-se que a membrana plasmática é revestida por numerosos canais iónicos que reduzem a resistência ao fluxo elétrico de uma camada bilipídica, pelo que a condutância da membrana depende na densidade e tipo de canais iónicos. Estes canais iónicos são modelados por certos fatores preponderantes, como o potencial de membrana (*voltage-dependent channels*), a concentração interna de mensageiros intracelulares (ex. Ca^{2+}) e neurotransmissores extracelulares.

Convencionou-se que o potencial extracelular é definido como 0. Assim, dado o excesso de cargas negativas intracelulares levam a que o potencial em repouso de um neurónio seja negativo. Em condições de repouso este é de cerca de -65 mV, valor este usado nesta simulação.

Começa-se por apresentar algumas relações elétricas que serão usadas no modelo.

Podemos usar a capacidade membranar para determinar quanta corrente é necessária para modificar o potencial de membrana a uma dada velocidade.

$$c_m \frac{dV}{dt} = \frac{dQ}{dt} [3]$$

Manter o potencial de membrana estável a um nível diferente do repouso também requer corrente, que é determinada pela resistência da membrana.

$$\Delta V = I_e r_m [4]$$

I = corrente, r_m = Resistência membranar.

A resistência membranar é o inverso da condutância. A condutância também é proporcional à área de superfície.



$$g = \frac{1}{r_m} [5]$$

g = condutância

A Resistência varia com o número, tipo e estado dos canais iónicos.

As diferenças elétricas e as diferenças de concentrações iónicas entre os meios intra e extracelulares são as responsáveis pelo movimento dos iões pelos canais. Estas diferenças são mantidas por bombas iónicas, como por exemplo, a bomba Na^+/K^+ . Podemos conhecer o potencial de equilíbrio de um dado ião recorrendo à equação de Nernst. Por comparação deste potencial com o potencial de membrana podemos inferir sobre o movimento dos iões. Isto é, se eles têm tendência a entrar ou a sair da célula.

Equação de Nernst:

$$E = \frac{V_T}{z} \ln \frac{[exterior]}{[interior]} [6]$$

A equação de Nernst aplica-se quando os canais permitem a passagem de apenas um tipo de ião. Para um resultado mais rigoroso, dado que vários canais não são seletivos, usa-se a equação de Goldman, que é um somatório dos vários iões.

Por convecção, a corrente membrana é definida como positiva quando iões positivos saem do neurónio e negativa quando os iões positivos entram no neurónio.

$$i_m = \sum_i g_i (V - E_i) [7]$$

i_m = corrente membrana por unidade de área; g_i = condutância por unidade de área

A complexidade surge porque as condutâncias variam com o tempo. Contudo, alguns fatores que contribuem para a corrente membrana total podem ser tratados como constantes, constituindo a *leakage current*. Por exemplo, a corrente criada pela bomba Na^+/K^+ cai nesta categoria.

$$\bar{g}_L (V - E_L) [8]$$

E_L não é o potencial reverso de nenhum ião em especial, sendo ajustando consoante o modelo. \bar{g}_L também é ajustado para igualar a condutância membrana em repouso. Esta *leakage conductance* é considerada passiva e o acento “-” representa o seu valor constante.

Da equação 3 pode-se escrever:

$$c_m \frac{dV}{dt} = -i_m + \frac{I_e}{A} [9]$$

Esta equação iguala a taxa do potencial de membrana à corrente total que entra no neurónio por unidade de área. Esta é igual à corrente gerada fisiologicamente por condutâncias sináticas e iónicas e, em condições experimentais, à adição de uma corrente injetada nas células por um eléctrodo. Esta injeção de corrente é simulada neste trabalho, quer com corrente alternada quer com pulsos discretos.

Por convenção, corrente que entra no neurónio por um eléctrodo é *positive-inwards* e a corrente de membrana é *positive-outward*.

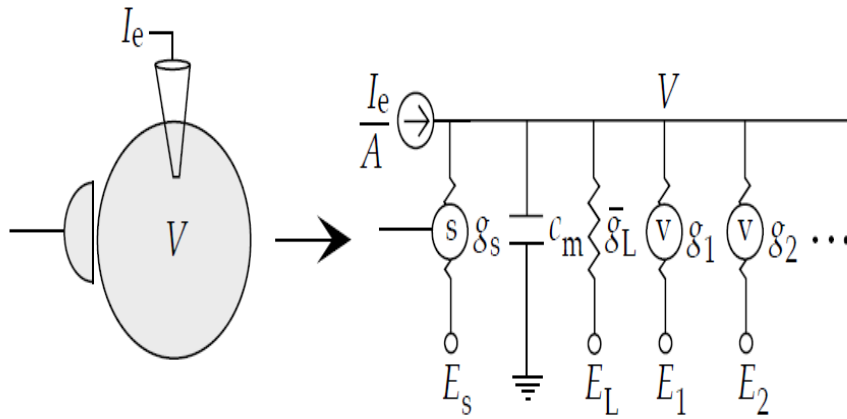


Fig. 1: Representação de injeção de corrente I_e num neurónio e representação do circuito que modela o comportamento da sua membrana. S representa condutância sinática (não simulada neste modelo) e V representa as condutâncias dependentes da voltagem que são as simuladas neste trabalho. ²

Um potencial de ação é disparado quando o potencial de membrana atinge os -55 a -50 mV.

Os canais flutuam rapidamente entre estados abertos e fechados de uma maneira estocástica. A probabilidade de um canal estar ativo depende do potencial de membrana (*voltage-dependent conductance*), da presença ou ausência de um neurotransmissor (para condutância sinática) ou ainda a concentração de Ca^{2+} intracelular. Há um vasto número de neurónios de cada tipo na membrana celular e podemos considerar que são independentes uns dos outros. Assim, pela lei das frequências dos grandes números, a fração de canais abertos em cada tempo é aproximadamente a probabilidade de qualquer ião estar no estado ativo.

O valor de g_i num dado instante é determinado pelo produto da condutância de um canal aberto pela densidade de canais na membrana e pela densidade de canais abertos naquele instante.

$$g_i = \text{condutância de canal aberto} * \text{densidade membranar}$$

$$\bar{g}_i = \text{condutância máxima}$$

$$g_i = \bar{g}_i P_i \quad [10]$$

P_i = probabilidade de encontrar qualquer canal no estado aberto. Os efeitos da voltagem e neurotransmissores refletem-se na probabilidade de o canal estar aberto.

Os canais podem caracterizar-se por dois tipos de condutâncias: persistentes/não inativantes ou transientes.

Relativamente à primeira, a abertura do canal traduz-se em ativação da corrente e fecho em desativação. A probabilidade de o canal estar aberto aumenta quando o neurónio está despolarizado e diminui quando está hiperpolarizado. A *delayed-rectifier K+ conductance* que é responsável pela repolarização de um neurónio após um potencial de ação é um exemplo.

$$P_K = n^k \quad [11]$$

n varia entre 0 e 1, que é a probabilidade um dos k eventos independentes ocorrer. n é a probabilidade da subunidade estar aberta e $n-1$ é a probabilidade de estar fechada. O k pode ser traduzido fisiologicamente como cada subunidade do canal.

A transição de cada subunidade é traduzida por um modelo cinético em que a transição fechado \rightarrow aberto ocorre a uma taxa voltagem-dependente - $\alpha_n(V)$ - e a transição aberto \rightarrow fechado ocorre a uma

taxa voltagem-dependente – $\beta_n(V)$. A grandeza destas taxas é o tempo⁻¹. A probabilidade de que uma subunidade abra a um dado intervalo de tempo é proporcional à probabilidade de encontrar o canal fechado multiplicado pela taxa de abertura.

A taxa à qual a probabilidade de abertura varia é dada pela diferença

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n \quad [12]$$

O primeiro termo do segundo membro descreve o processo de abertura e o segundo o de fecho (daí o sinal menos), que diminui a probabilidade de estar numa configuração aberta.

Se o potencial de membrana for fixo, então as variáveis n , m e h atingem um valor *steady state*:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n_\infty) - \beta_n n_\infty = 0 \quad [13]$$

Fazendo

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad [13.1]$$

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad [13.2]$$

$$\tau_n \frac{dn}{dt} = n_\infty - n \quad [13.3]$$

τ_n indica que para uma voltagem fixa V , n aproxima-se do valor limite n_∞ exponencialmente com uma constante de tempo τ_n .

Assim, uma solução da equação é

$$n = n_\infty \left(1 - e^{\frac{-t}{\tau_n}} \right) + n_0 e^{\frac{-t}{\tau_n}} \quad [14]$$

Relativamente à condutância transiente, além da dicotomia abertura/fecho, também tem o estado de inativo. Um exemplo de canal com este tipo de condutância é o canal de Na^+ .

m – variável de ativação

h – variável de inativação

As equações 12, 13 e 14 aplicam-se a qualquer uma destas variáveis.

A despolarização leva ao aumento de m e à diminuição de h , a hiperpolarização leva ao aumento de h e à diminuição de m .

$$P_{Na} = m^k h \quad [15]$$

Parâmetros de Hodgkin & Huxley para o canal de Na^+ :

$$\alpha_m = \frac{0.1(V + 40)}{1 - e^{-0.1(V+40)}}$$

$$\alpha_h = 0.07e^{-0.05(V+65)}$$

$$\beta_m = 4e^{-0.0556(V+65)}$$

$$\beta_h = \frac{1}{1 + e^{-0.1(V+35)}}$$

Parâmetros de Hodgkin & Huxley para o canal de K^+ :

$$\alpha_n = \frac{0.01(V + 55)}{1 - e^{-0.1(V+55)}}$$

$$\beta_n = 0.125e^{-0.0125(V+65)}$$

O modelo Hodgkin-Huxley traduz as correntes membranares então por

$$i_m = \bar{g}_L(V - E_L) + \bar{g}_K n^4(V - E_K) + \bar{g}_{Na} m^3 h(V - E_{Na}) [16]$$

O que fazendo

$$\frac{I_e}{A} = I_{eA} [17]$$

Traduz a variação do potencial membranar em^{2,3}

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-\bar{g}_L(V - E_L) - \bar{g}_K n^4(V - E_K) - \bar{g}_{Na} m^3 h(V - E_{Na}) + I_{eA}}{c_m} [18]$$

Com as seguintes constantes: $\bar{g}_L = 0.003 \text{ mS/mm}^2$, $\bar{g}_K = 0.36 \text{ mS/mm}^2$, $\bar{g}_{Na} = 1.2 \text{ mS/mm}^2$, $E_L = -54.387 \text{ mV}$, $E_K = -77 \text{ mV}$, $E_{Na} = 50 \text{ mV}$ e $c_m = 0.01 \text{ } \mu\text{F/mm}^2$

MÉTODOS

Com base nos trabalhos experimentais de Hodgkin & Huxley decidiu-se neste trabalho simular três procedimentos:

- *voltage clamp* – a voltagem da corrente é fixada numa dada voltagem e observam-se as variações nas correntes e nas condutâncias dos canais de Na^+ e K^+ ;
- injeção de pulsos de corrente;
- corrente alterada.

O software usado foi o MatLab, optando-se por construir uma interface gráfica para facilitar a interação com o utilizador. Neste são simulados os três procedimentos acima em tempo real, sendo também possível visualizar como variam os parâmetros n , m , h , $\alpha_n(V)$, $\beta_n(V)$, $\alpha_m(V)$, $\beta_m(V)$, $\alpha_h(V)$, $\beta_h(V)$, τ_n , τ_m , τ_h em função da voltagem.

Como explorado na introdução teórica, os parâmetros n , m , h e voltagem membrana são redefinidos consoante o valor anterior à medida que o tempo passa, ou seja, são traduzíveis em equações diferenciais ordinárias com uma dada condição inicial. Assim, para encontrar a solução destas recorreu-se ao método de Euler^{4,5}.

O método de Euler é baseado na definição de derivada:

$$\frac{df}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x}$$

Isto é, para pequenos Δt ,

$$\frac{df}{dt} \approx \frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x} \leftrightarrow f(x + \Delta x) = f(x) + \frac{df}{dt} \Delta x$$

As equações diferenciais a resolver e as respetivas condições iniciais são, portanto

$\frac{dv}{dt} = \alpha_v(1 - v) - \beta_v v$, em que v é a variável n , m ou h , em que $v(0) = \frac{\alpha_0}{\alpha_0 + \beta_0}$, em que os parâmetros α_0 e β_0 são calculados na voltagem de repouso.

$\frac{dV}{dt} = \frac{-\bar{g}_L(V - E_L) - \bar{g}_K n^4(V - E_K) - \bar{g}_{Na} m^3 h(V - E_{Na}) + I_{eA}}{C_m}$, em que $V(0) = V_e$, em que V_e é o potencial em repouso.

RESULTADOS

Verificámos que muitos dos parâmetros usados para descrever o modelo são dependentes da voltagem, pelo que se optou por começar por estudar como variavam estes em função da mesma de modo a tentar intuir mais facilmente a que processo fisiológico corresponde cada um deles.

De facto, as variáveis n , m , h que foram tidas como uma representação de subunidades de canais são um dos parâmetros dependentes das voltagens. Disse-se ainda que as variáveis n e m eram ativantes, enquanto a h era inativante. Assim, espera-se que as variáveis n/m e h tenham uma dependência da voltagem oposta. Com efeito, na figura 2 verificamos que as variáveis m e n se aproximam de 1 quando a voltagem aumenta, ou seja, durante a despolarização, enquanto a variável h se aproxima de 1 quando a voltagem diminui, ou sejam, quando a membrana é hiperpolarizada.

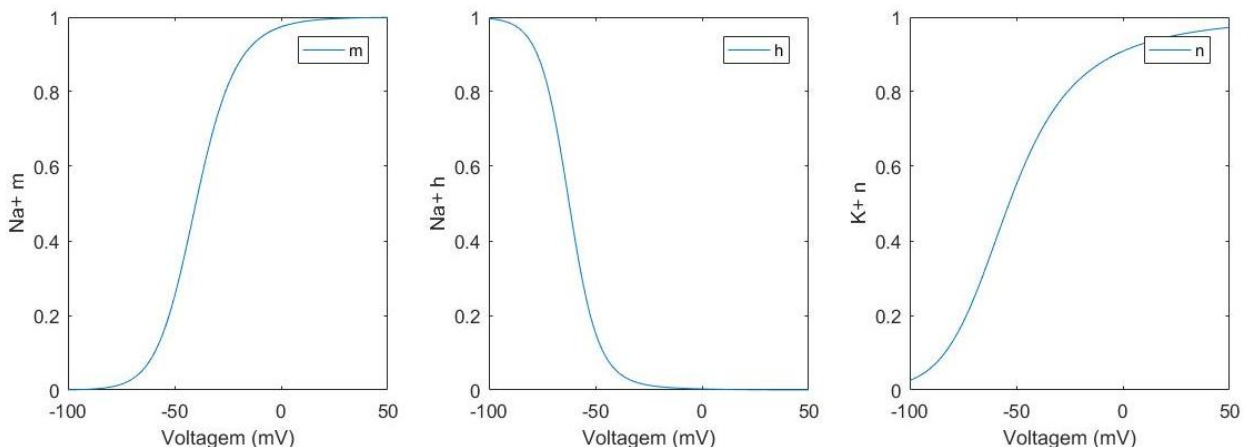


Fig. 2: *Steady-state* das variáveis n , m , h em função da voltagem.

Relativamente às taxas dependentes da voltagem – $\alpha_n(V)$ e $\beta_n(V)$ –, podemos observar a concordância com a figura 2, uma vez que para as variáveis ativantes a taxa de abertura – $\alpha_v(V)$ – cresce com a voltagem e a taxa de fecho – $\beta_n(V)$ – decrece. No caso da variável inativante, observamos o comportamento oposto.

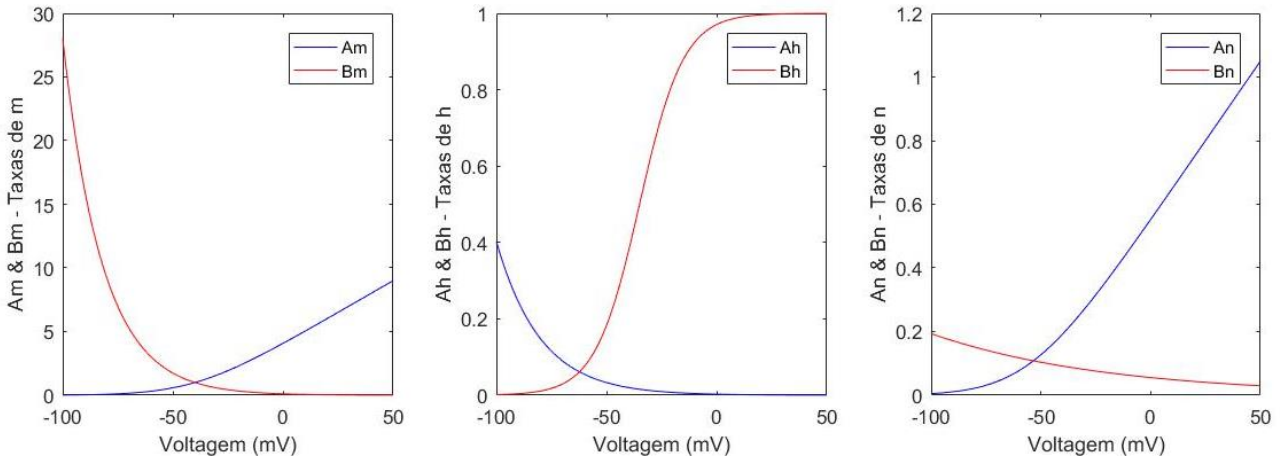


Fig. 3: Taxas de abertura e de fecho para cada uma das variáveis n, m, h em função da voltagem.

Outro parâmetro que pode ter interesse estudar é a constante de tempo τ que aparece na solução das equações diferenciais das variáveis n, m, h e que depende das taxas acima, Quanto menor o τ , mais rapidamente a varável atinge o *steady-state*.

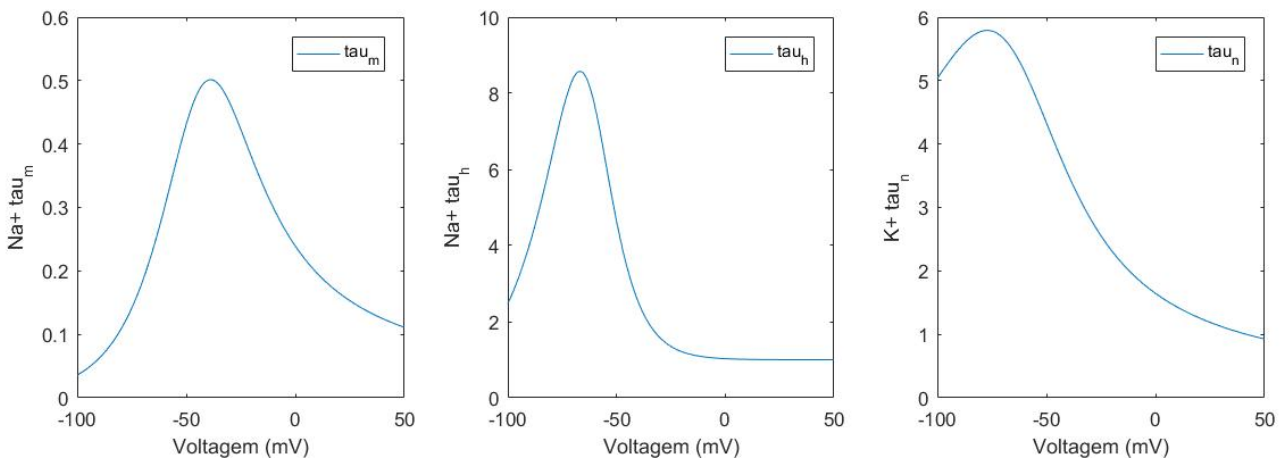


Fig. 4: τ em função da voltagem para cada uma das variáveis n, m, h .

No que diz respeito às simulações dos procedimentos experimentais, começa-se por estudar as correntes iónicas e as condutâncias dos canais iónicos num contexto de *voltage clamp*, pois ao fixarmos a voltagem da membrana num dado valor podemos estabelecer as relações voltagem-dependentes dos canais iónicos e da voltagem membranar. De facto, verificamos, por exemplo, que a condutância do K^+ tende para um valor máximo à medida que se aumenta a voltagem da membrana que ronda os 0.35 mS, o que se aproxima com o valor estimado e definido na introdução teórica de $\bar{g}_K = 0.36 \text{ mS/mm}^2$. Para além disso, verificamos que à medida que o potencial aumenta a condutância do K^+ aumenta mais depressa (declive mais acentuado). O mesmo se verifica para a condutância do Na^+ , com efeito à medida que a voltagem aumenta esta tende para o valor máximo de 1.5 mS que, novamente, se aproxima do considerado inicialmente de $\bar{g}_{Na} = 1.2 \text{ mS/mm}^2$. Usando *voltage clamp* Hodgkin & Huxley puderam então estimar as condutâncias máximas para descrever o modelo. Podemos verificar que a principal diferença entre a condutância do K^+ e do Na^+ é que no caso da última esta decresce rapidamente para 0 ainda antes do potencial da membrana regressar ao repouso, enquanto no caso do primeiro, mesmo depois do potencial

da membrana voltar ao repouso a condutância ainda tarda a chegar a 0. Esta diferença traduz-se na propriedade dos canais de Na^+ terem o estado extra de inativo para além do aberto/fechado.

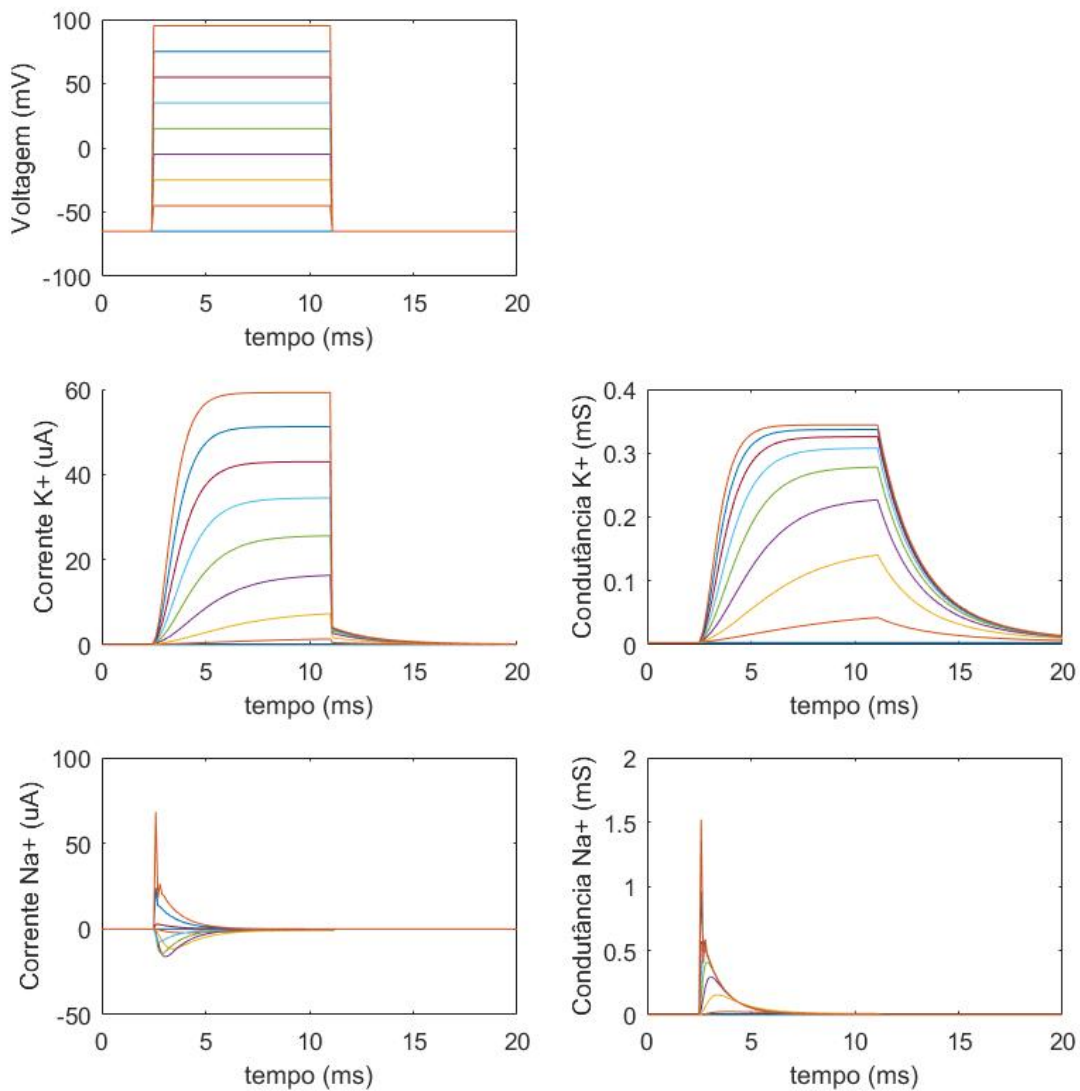


Fig. 5: Correntes e condutâncias iônicas para potenciais de membrana fixos entre -65mV e 105 mV.

Passando então à simulação de injeção de corrente, podemos fazê-lo de duas formas: injetando pulsos discretos ou fornecendo corrente alternada.

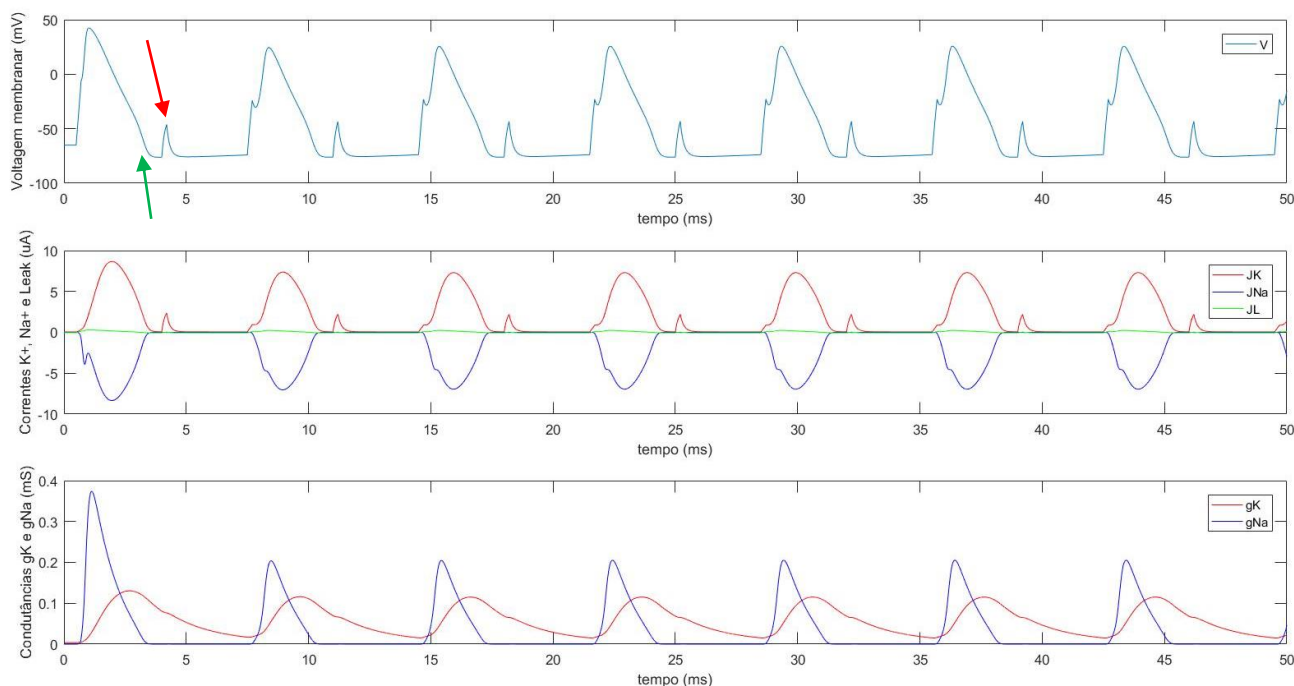


Fig. 6: Potencial membranar, correntes e condutâncias iônicas aquando da injeção de pulsos de corrente com intensidade de 3 uA durante 0.2 ms a cada 3.5 ms. É de nota que correntes negativas representam entrada de cargas positivas no interior da célula e correntes positivas representam a saída de cargas positivas.

Como se observa na figura 6, existem momentos em que é injetada corrente, mas não é gerado um potencial de ação (seta vermelha). Tal deve-se a uma propriedade dos neurónios que se designa período refratário absoluto que decorre do facto de m diminuir rapidamente com a hiperpolarização causada pela lenta saída de K^+ - como se analisou no *voltage clamp* e como se pode ver no terceiro gráfico da figura 6, a condutância do K^+ tarda em voltar aos valores de repouso, o que leva à repolarização do neurónio e também à sua leve hiperpolarização (seta verde). Por outro lado, a condutância do Na^+ diminui rapidamente, ou seja, h aumenta. Assim temos um aumento de h e uma diminuição do m , o que leva a que não seja possível desencadear um novo potencial de ação imediatamente a seguir a um. Por outro lado, observamos que os potenciais de ação que se desencadeiam depois do primeiro têm menor amplitude. Tal deve-se ao chamado período refratário relativo em que fisiologicamente os canais de Na^+ deixam de estar inativos - o que no modelo se traduz por uma diminuição de h e um aumento de m para valores mais próximos do repouso. Todavia, pela lentidão da condutância do K^+ a membrana poderá ainda estar hiperpolarizada, pelo que o potencial de ação tem uma amplitude menor do que o anterior.

No que diz respeito à injeção de corrente alternada, o mecanismo é o mesmo que o descrito acima, sendo que a existência ou não de potencial de ação depende da frequência do estímulo. Se a frequência for demasiado elevada nunca se vê um potencial de ação, pois é como se não houvesse tempo para o condensador carregar.

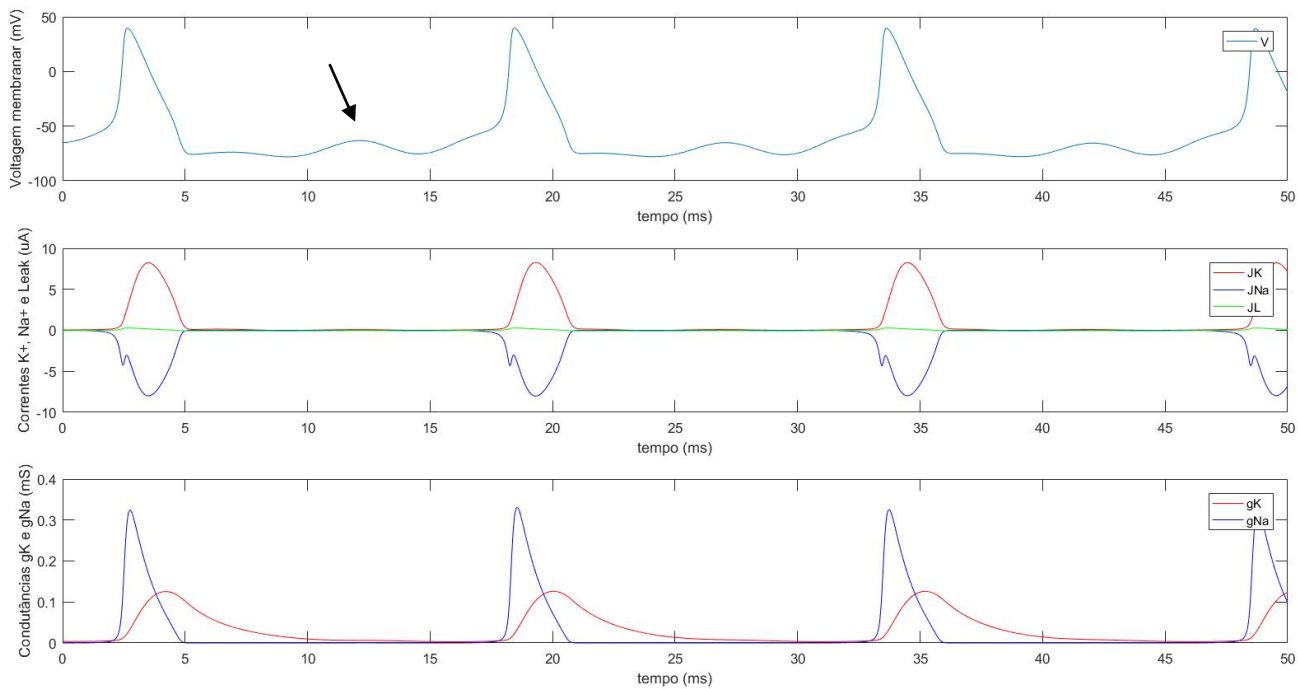


Fig. 7: Potencial membranar, correntes e condutâncias iónicas aquando da injeção de corrente alternada com intensidade de 0.1 uA com frequência de 0.2 Hz;

De facto nota-se na figura 7 que existem momentos em que apesar de haver corrente (seta preta), não existe potencial de ação. Verifica-se ainda na figura 8 que se aumentar a frequência para 0.7 Hz não se desenvolve potencial de ação e o que se observa é somente o impulso eléctrico fornecido.

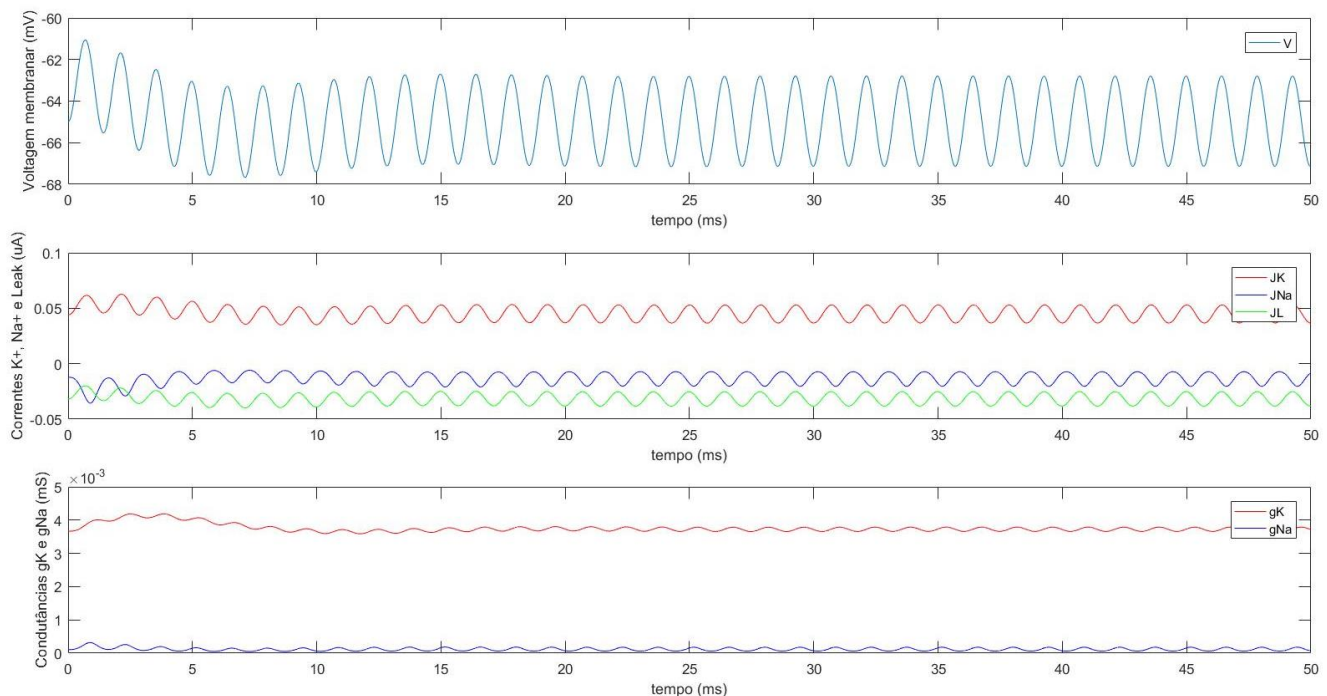


Fig. 8: Potencial membranar, correntes e condutâncias iónicas aquando da injeção de corrente alternada com intensidade de 0.1 uA com frequência de 0.7 Hz;

Para finalizar apresenta-se a interface gráfica criada que permite ao utilizador simular estes três procedimentos em tempo real



Fig. 9: GUI que permite simular *voltage clamp*, pulsos discretos e corrente alternada, bem como fornecer os gráficos apresentados nas figuras 2, 3 e 4. Para iniciar qualquer simulação deve carregar em START e depois selecionar a simulação desejada alterando os respetivos parâmetros. Para mudar de tipo de simulação basta carregar no botão desejado e a voltagem membranar retornará ao repouso e começará o novo tipo de simulação. Carregar multiplamente em “Pulso” fornece um impulso de corrente quando a simulação está no modo de corrente discreta, permitindo visualizar o efeito de quando se fornece corrente, mas as condutâncias dos canais iônicos ainda não retornaram ao valor basal, não havendo potencial de ação ou havendo potencial de ação com menor amplitude – períodos refratários absoluto e relativo.

DISCUSSÃO

O modelo de Hodgkin & Huxley tem os seus parâmetros ajustados para um axónio gigante de lula, embora seja genericamente aceite como um modelo de um neurónio. Assenta, contudo, em algumas suposições:

- Cada canal iónico é seletivo para um ião;
- Princípio da independência: cada tipo de corrente não depende da concentração de outros iões;
- A relação linear entre Intensidade e Voltagem instantânea;
- Independência das variáveis de ativação e inativação;
- As correntes de abertura não são consideradas (correntes causadas pela própria abertura dos canais para além do fluxo iónico);

É de destacar a reprodutibilidade fisiológica desde modelo no que concerne aos períodos refratários absolutos e relativos explorados nos resultados.

CONCLUSÃO

Verificou-se que recorrendo ao modelo de Hodgkin & Huxley se conseguiu obter uma boa aproximação fisiológica do que acontece ao potencial de membrana quando este é simulado em várias condições experimentais.

A criação de uma interface gráfica que simula genericamente um neurónio nas várias condições constitui uma ferramenta de fácil utilização e com potenciais fins educativos, uma vez que a sua execução em tempo real permite ao utilizador perceber o que está a acontecer ao potencial de membrana, às correntes e às condutâncias iónicas, bem como associar tal comportamento ao observado fisiologicamente.

Referências bibliográficas:

1. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
2. Dayan, P. & Abbott, L. F. *Theoretical Neuroscience: Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems*. (The MIT Press, 2005).
3. Mallot, H. A. *Computational Neuroscience: A First Course*. (Springer, 2013).
4. Wallisch, P. *et al. MATLAB for Neuroscientists, Second Edition: An Introduction to Scientific Computing in MATLAB*. (Academic Press, 2013).
5. Cooper, I. *Doing Physics with Matlab - Hodgkin-Huxley Model: Membrane Current*. (School of Physics, University of Sidney).