



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Márcia Pereira da Silva

**Investigação da correlação de longo alcance na cinética de canais iônicos  
formados pela gramicidina A em membranas artificiais**

Recife  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Márcia Pereira da Silva

**Investigação da correlação de longo alcance na cinética de canais iônicos  
formados pela gramicidina A em membranas artificiais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Recife

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Márcia Pereira da Silva

**Investigação da correlação de longo alcance na cinética de canais iônicos  
formados pela gramicidina A em membranas artificiais.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Biociência Animal. Área de concentração: Morfofisiologia Animal.

Dissertação defendida em 28 de fevereiro de 2018.

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - UFRPE  
Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dijanah Cota Machado  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

---

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenorio  
Departamento de Morfologia - UFPB

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Recife  
2018

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, à Deus que sempre cuida de mim e dos meus sonhos, me dando forças e perseverança para conquistar meus objetivos.

Agradeço ao meu pai José Brasil, que mesmo em meio a tantas dificuldades sempre nos deu suporte para estudar. Pela sua integridade e força, muito obrigado por ser um exemplo para mim

Ao meu orientador, Professor Romildo de Albuquerque Nogueira pela disponibilidade, pelo tempo dedicado e pela orientação. Obrigada também pela paciência e humildade com que nos orienta. Obrigada pelos ensinamentos, àqueles que vão seguir comigo na carreira acadêmica e por aqueles que levo para vida.

Ao meu co-orientador, Professor Cláudio Gabriel Rodrigues, agradeço pelas suas orientações sempre tão valiosas e obrigado também por buscar sempre pela excelência, isso nos ensina que podemos fazer mais do que acreditamos que podemos.

À minha família, minha mãe Suely, meus irmãos Cláudia, Paulo, Marcos e Marta, pelo amor e cuidado, imprescindíveis para a minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu namorado Adama, que mesmo distante sempre esteve presente me aconselhando e escutando minhas alegrias e dificuldades durante o decorrer do mestrado.

À Juliana pela atenção, pelos ensinamentos e pela grande ajuda na realização dos experimentos.

À todos os membros do laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco Dr. Oleg Krasilnikov-UFPE.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análises Computacionais e Realidades Complexas (LACREC) e LABTEC: Eva (e Heitorzinho, claro), Jeine, Hannah, Edbhergue, Cláudio, Rubéns, Radamés, Gesilda, Victor, Camilla, Rubens e Ardilles.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

"Eu pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O  
nosso ir faz o caminho."

C.S. Lewis

## Resumo

Os canais iônicos são proteínas integrais presentes nas membranas celulares, sendo componentes fundamentais em uma grande variedade de processos fisiológicos como propagação do impulso nervoso, contração muscular, controle da excitabilidade cardíaca e secreção celular. Os canais iônicos transitam entre diferentes estados de condutância, ora permitindo, ora interrompendo o fluxo de íons entre os compartimentos celulares. O mecanismo de abertura e fechamento dos canais iônicos tem sido modelado como um processo aleatório, no entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que essas transições em alguns canais apresentam memória, ou seja, correlação de longo alcance. A gramicidina A (gA) é um pentadecapeptídeo produzido pelo *Bacillus brevis* com a capacidade de formar canais iônicos simples quando inseridas em membranas lipídicas. A simplicidade estrutural, a capacidade de formar canais e a facilidade de manipulação molecular de gA tornaram a gramicidina um bom modelo para estudos dos canais iônicos. Sabe-se da grande quantidade de relatos sobre os canais de gramicidina, porém, não foi encontrado estudos com o emprego de métodos matemáticos de dinâmica não-linear na análise da existência de memória nesses canais. Nesse contexto empregamos a análise de flutuação destendenciada (DFA) e a entropia aproximada (ApEn) na investigação da existência de memória e complexidade no processo cinético dos canais de gA, respectivamente. As correntes iônicas unitárias foram registradas em tempo real através de um microcomputador acoplado a um conversor A/D e um amplificador de *patch-clamp*. Todos os experimentos foram realizados nas seguintes condições experimentais: bicamadas lipídicas planas de diftanoil-fosfatidilcolina, solução de NaCl 1 M não tamponada, pH de  $6,3 \pm 0,2$ ; potencial transmembrana de 200 mV e temperatura de 25°C. O valor da condutância do canal de gA foi de  $15,5 \pm 0,05$  pS. As constantes de tempo para o canal de gA para o estado aberto e no estado fechado foram  $\tau_a = 3,1866 \pm 0,1752$  s e  $\tau_f = 12,0743 \pm 0,8658$  s, respectivamente. Em função do número de eventos e do percentual de deleção de regiões das séries temporais observou-se diferentes comportamentos na cinética dos canais de gA: correlação antipersistente ( $\alpha_{DFA} = 0,4$  e  $0,44$ ), correlação persistente ( $\alpha_{DFA} = 0,63$ ) e presença de comportamento aleatório ( $\alpha_{DFA} = 0,53 \pm 0,2$ ). No entanto, foi observado na maioria das séries analisadas que a cinética desses canais tende a apresentar um comportamento aleatório. Os resultados das análises da ApEn mostraram que as séries que possuem comportamento aleatório apresentaram maior complexidade quando comparados as séries que apresentam memória. Os resultados obtidos permitem concluir que o processo cinético do canal de gA possui de elevada complexidade e ausência de memória, comportamento divergente daqueles encontrados em muitos canais iônicos estruturalmente complexos, como alguns canais de sódio e potássio, que possuem um comportamento determinístico.

Palavras-chave: Correlação de longo alcance; Análise de Flutuação Destendenciada; Entropia Aproximada; Gramicidina A; Bicamada Lipídica Plana.

## Abstract

Ion channels are integral proteins present in cell membranes, being fundamental components in a wide variety of physiological processes, e.g. propagation of the nervous impulse, muscular contraction, control of the cardiac excitability and cellular secretion. The ion channels shift between different states of conductance, sometimes allowing, sometimes interrupting the flow of ions between the cellular compartments. The mechanism of opening and closing ion channels has been modeled as a random process, however, some studies have shown that these transitions in some channels have memory, that is, long-term correlation. Gramicidin A (gA) is a pentadecapeptide produced by *Bacillus brevis* with the ability to form simple ion channels when inserted into lipid membranes. The structural simplicity, the ability to form channels and the ease of molecular manipulation of gA have made gramicidin a good model for studies of ion channels. There is a large amount of reports about gA channels, however, we did not find studies using mathematical methods of nonlinear dynamics in the analysis of the existence of memory in these channels. In this context we used the Detrended Fluctuation Analysis (DFA) and the Approximate Entropy (ApEn) in the investigation of the existence of memory and complexity in the kinetic process of the gA channels, respectively. The single-channel currents were recorded in real time through a microcomputer coupled to an A / D converter and a patch-clamp amplifier. All experiments were performed under the following experimental conditions: diphytanoyl phosphatidylcholine planar lipid bilayers in 1 M NaCl solution not buffered, initial pH of  $6.3 \pm 0.2$ ; the transmembrane potential of 200 mV and a temperature of 25 ° C. The conductance of the gA channel was  $15.5 \pm 0.05$  pS. The time constants,  $\tau$ , for the gA channel for the open and closed state were  $\tau_{f=}$   $3.1866 \pm 0.1752$  s and  $\tau_{a=}$   $12.0743 \pm 0.8658$  s, respectively. According to the number of events and percentage deletion of time series regions, different behaviors in kinetics of gA channels were observed: antipersistent correlation ( $\alpha_{DFA} = 0.4$  and  $0.44$ ), persistent correlation ( $\alpha_{DFA} = 0.63$ ) and presence of random behavior ( $\alpha_{DFA} = 0.53 \pm 0.2$ ). However, it has been observed in most of the analyzed series that the kinetics of these channels tend to exhibit a random behavior. The results of the ApEn analyzes showed that the series that have random behavior presented greater complexity when compared to the series that have memory. The results obtained allow us to conclude that the kinetic process of the gA channel has high complexity and absence of memory, divergent behavior from those found in many structurally complex ion channels, such as some sodium and potassium channels, which have a deterministic behavior.

Key words: Long-term correlation; Detrended Fluctuation Analysis; Approximate Entropy; Gramicidin A; Planar Lipid Bilayer.

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 16 |
| <b>2. Revisão de Literatura</b> .....  | 18 |
| 2.1 Canais Iônicos.....  | 18 |
| 2.2 Gramicidina A.....   | 21 |
| 2.3 Correlação de longo alcance (memória) na cinética dos canais iônicos.....  | 28 |
| 2.4 Métodos Matemáticos na análise de séries temporais de sinais biológicos.....   | 28 |
| <i>Análise de Flutuação Destendenciada (do inglês Detrended Fluctuations Analysis, DFA)</i> .....                              | 29 |
| Entropia Aproximada (do inglês Approximate Entropy, ApEn).....   | 30 |
| <b>3. Objetivos</b> .....  | 32 |
| 3.1 Objetivos Gerais.....  | 32 |
| 3.2 Objetivos Específicos.....   | 32 |
| <b>4. Metodologia</b> .....  | 33 |
| 4.1 Formação da Bicamada Lipídica Plana.....   | 33 |
| 4.2 Sistema de aquisição e monitoramento dos registros elétricos.....  | 35 |
| 4.3 Análises dos registros de corrente iônica do canal de gramicidina.....   | 36 |
| 4.4 Obtenção de séries temporais simuladas.....  | 38 |
| Séries temporais simuladas.....  | 38 |
| 4.5 <i>Análise de Flutuação Destendenciada das séries temporais</i> .....  | 39 |
| 4.6 <i>Entropia Aproximada</i> .....   | 40 |
| 4.7 Análise Estatística.....   | 42 |
| <b>5. Referências</b> .....  | 43 |
| <b>6. Capítulo Único</b> .....   | 50 |
| Análise da correlação de longo alcance na cinética de canais iônicos formados pela gramicidina A em membranas artificiais..... | 50 |
| <b>7. Considerações Finais</b> .....   | 70 |

## Lista de Figuras

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>FIGURA 1.</b> Canal de potássio (Kirbac 1.1). A figura esquemática mostra o canal inserido na membrana celular e os diferentes segmentos transmembrana que formam domínios específicos: filtro de seletividade, cavidade, <i>gate</i> e vestibulo.....   | 19   |
| <b>FIGURA 2.</b> Filtro de seletividade do canal de potássio bacteriano KcsA. Detalhe com os peptídeos responsáveis pela seletividade do canal. Adaptado de VAZIRI & PLENIO, 2010.....  | 20   |
| <b>FIGURA 3.</b> Mecanismo de inserção dos peptídeos formadores de canais iônicos. Regiões hidrofóbicas do peptídeo são mostradas em azul e as regiões hidrofílicas em vermelho. Adaptado de BROGDEN, 2005.....   | 22   |
| <b>FIGURA 4:</b> Registro da corrente de canais unitários e histogramas de amplitudes de correntes de canais de gramicidina A em bicamada lipídica com diferentes composições lipídicas. 4A: bicamadas lipídicas constituídas de DOPC/ n-decano; 4B: bicamadas lipídicas constituídas de DLoPC/n-decano. Adaptado de GIRSHMAN <i>et al.</i> , 1997..... | 24   |
| <b>FIGURA 5:</b> Representação Esquemática de duas formas de interação entre os monômeros de gramicidina A em Bicamada Lipídica Plana. 4a Interação paralela; 4b interação <i>head-to-head</i> entre os monômeros de gramicidina. Adaptado de ANDERSEN <i>et al.</i> , 1999.....  | 25   |
| <b>FIGURA 6:</b> Representação Esquemática de duas formas de interação entre os monômeros de gramicidina A em BPL. 4a Interação paralela; 4b interação <i>head-to-head</i> entre os monômeros de gramicidina. Adaptado de CHAUDHURI & CHATTOPADHYAY, 2015.....  | 25   |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 7.</b> Modelo de Preenchimento de espaço de duas formas de interação entre os monômeros de gramicidina A em BPL. 7a <i>head-to-head</i> entre os monômeros de gramicidina, SS; 7b Interação paralela, DS, entre os monômeros de gramicidina. Adaptado de ANDERSEN <i>et al.</i> ,1999.....   | 26 |
| <b>FIGURA 8.</b> Representação esquemática do processo de abertura e fechamento do canal iônico formado por gramicidina. M+ representa cátions monovalentes. Adaptado de ESSEN & KOERT (2008) .....  | 27 |
| <b>FIGURA 9.</b> Bicamada lipídica plana formada no orifício da partição de Teflon®. Detalhe a direita mostra os monômeros de gA incorporados nas monocamadas e também a presença de canais formados pelos monômeros de gA. Adaptado de CARNEY <i>et al.</i> , 2013 e LUNDBÆK <i>et al.</i> , 2010.....  | 33 |
| <b>FIGURA 10.</b> Etapas de formação da bicamada lipídica plana. Adaptado de GUTSMANN <i>et al.</i> , 2015.....  | 35 |
| <b>FIGURA 11.</b> Esquema de formação da bicamada lipídica plana e sistema de monitoramento e aquisição de correntes iônicas através de canais iônicos de gramicidina A em bicamada lipídica plana Adaptado de AGUIAR <i>et al.</i> , 2015.....  | 36 |
| <b>FIGURA 12.</b> Figura 12: Etapas da obtenção e análise dos tempos de permanência nos estados abertos e fechados dos canais iônicos formados por gA. 12A: Aquisição e idealização dos registros de canais unitários; 12B: Obtenção das séries temporais a partir do registro das correntes iônicas e processamento das séries; 12C: Análise das séries temporais através dos métodos matemáticos DFA e ApEn. | 37 |
| <b>FIGURA 13.</b> Idealização dos dados realizadas no <i>Software pClamp</i> . O programa identifica os estados de condutâncias (abertos e fechados) do registro da corrente iônica através dos níveis de condutância de cada estado.....  | 38 |

**FIGURA 14.** Gráfico duplo-log utilizado no método do DFA. A abscissa são logaritmos dos valores de  $n$  e o eixo  $y$  é dado pelo log de  $f(n)$ . a inclinação da reta de regressão linear é o valor do parâmetro  $\alpha_{DFA}$  utilizado para determinação da presença de correlação de longo alcance ou presença de um comportamento aleatório na série temporal analisada.....

## Listas de Figuras do Manuscrito

Pág.

**FIGURA 1** Registro da corrente iônica através de canais de gA em bicamada artificial plana de DPhPC/Hexano. Cada salto discreto representa a formação de um canal..... 58

**FIGURA 2.** Cinética de canais iônicos formados por gA em bicamada plana de DPhPC/Hexano com potencial transmembrana aplicado de 200 mV. 2A: traçado característico do comportamento cinético da Ga; 2B: Diferentes níveis de condutância observados em alguns registros (Seta: mini canais) ..... 59

**FIGURA 3.** Histograma da condutância de canais iônicos formados por gA em bicamada artificial plana de DPhPC em Hexano. Seta: mini canais..... 59

**FIGURA 4.** Distribuição dos tempos de permanência no estado aberto (esquerda) e no estado fechado (direita) dos canais de gA em bicamada lipídica de DPhPC em hexano. Os pontos representam o ponto médio dos *bins* do histograma de distribuição. e a linha em vermelho representa o *fitting* exponencial,  $f(x) = A_i e^{-t/\tau}$  ..... 61

**FIGURA 5.** Cinética de canais iônicos formados por gA em bicamada artificial plana de DPhPC/Hexano com diferentes concentrações de gA. 5A: Baixa concentração de gA; 5B: Elevada concentração de gA..... 62

**FIGURA 6.** Gráficos log f(n) x log n de três séries temporais com os tempos de permanência de gA nos estados abertos e fechados. 6A: Série com  $\alpha_{DFA} = 0.40$ ; 6B: Série com  $\alpha_{DFA} = 0.51$ ; 6A: Série com  $\alpha_{DFA} = 0.63$ ..... 62

**FIGURA 7.** Valores da *ApEn* das séries simuladas com diferentes valores de  $\alpha_{DFA}$  geradas através algoritmo fGn e resultados do teste Kruskal-Wallis e *post-hoc Dunn*..... 66

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Valores do $\alpha_{DFA}$ para as sete séries obtidas a partir dos registros experimentais das correntes iônicas através de canais formados por gA em bicamadas de DPhPC..... | 63 |
| <b>Tabela 2:</b> $ApEn$ ( $\pm dq$ ) das diferentes populações (N=10) de séries simuladas com diferentes valores de $\alpha_{DFA}$ .....   | 65 |
| <b>Tabela 3:</b> Tabela 3: Entropia aproximada das séries temporais integrais (SI) (N=200), das séries temporais dos estados abertos (SA) e fechados (SF) (N=100) .....                        | 66 |

## Lista de Abreviaturas

|                |  |
|----------------|--|
| gA             | Gramicidina A  |
| DLoPC          | Dilinoleoil-sn-glycero-3-fosfocolina                                 |
| DOPC           | Dioleoilfosfatidilcolina   |
| BPL            | Bicamada Plana Lipídica  |
| M              | Monômero   |
| D              | Dímero   |
| DFA            | Detrended Fluctuation Analysis (Análise de Flutuação Destendenciada) |
| ApEn           | Aproximate Entropy (Entropia Aproximada)                             |
| BK             | Big Potássio   |
| $\alpha_{DFA}$ | Parâmetro alfa do DFA  |
| fGn            | Fractional Gaussian Noise (Ruído Gaussiano Fracionário)              |
| DPhPC          | Diftanoilfosfatidilcolina  |
| s              | Segundos   |
| dq             | Desvio interquartílico   |

## 1. Introdução

Os canais iônicos são estruturas formadas por proteínas integrais presentes nas membranas celulares. Eles possuem a função de permitir o fluxo iônico através de membranas. Tal fluxo de íons desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos, sendo responsáveis pela geração de potenciais de membrana, transmissão dos impulsos nervosos, contração muscular, secreção e proliferação celular dentre muitas outras funções (HILLE, 2001). Alterações na estrutura ou na função das proteínas formadoras de canais podem gerar doenças denominadas canalopatias, como diabetes mellitus, epilepsia, síndrome do QT longo, dentre outras patologias. Os canais iônicos desempenham um papel vital para as células e o entendimento da estrutura, atividade e funcionamento desses canais possui enorme importância tanto na biologia como na medicina (FERMINI, 2008; KIM, 2014; LASCANO et al., 2016; FERNÁNDEZ-FALGUERAS et al., 2017).

Em decorrência da presença dos canais iônicos em diversos tipos e processos celulares, a dinâmica de aberturas e fechamentos desses canais tem sido alvos de estudos para o desenvolvimento de novos medicamentos (BAGAL et al., 2012) e o entendimento de processos fisiológicos importantes (HILLE, 2001). Desta forma, o estudo dos canais iônicos tem auxiliado na descoberta de drogas para o tratamento de doenças, drogas usadas como anestésicos locais e gerais (POLLARD e EARNSHAW, 2006), como também na elucidação da gênese de inúmeras doenças decorrente de disfunções destes canais (ASHCROFT, 2000).

A gramicidina (gA) é um peptídeo com capacidade de formar canais iônicos simples em membranas lipídicas, sendo esses canais constituídos apenas por dois monômeros de gA. Os canais iônicos formados por gA possuem um comportamento cinético que sofre grande influência da bicamada lipídica na qual ele encontra-se inserido (HLADKY & HAYDON 1972; LUNDBEAK et al., 1996; ROUX, 2002).

Esse peptídeo tem sido utilizado ao longo das últimas cinco décadas como modelo experimental para estudos de canais iônicos e isso se deve, dentre outros fatores, ao fato da gramicidina pertencer a uma família de moléculas capazes de formar canais iônicos em bicamadas lipídicas e possuir uma estrutura molecular simples. A gramicidina A é um excelente modelo para o estudo das relações entre estrutura e função dos canais iônicos, sua organização e sua dinâmica, bem como a relação da composição da bicamada lipídica com a função dos canais (HLADKY &

HAYDON,1970; ANDERSEN, 1983; ANDERSEN & KOEPPE II, 1992; CIFU, KOEPPE II & ANDERSEN, 1992; LUNDBEAK et al., 1996, ANDERSEN, et al., 2005; KELKAR & CHATTOPADHYAY, 2007; ALEJO, et al., 2013).

Nos últimos anos alguns autores têm observado que a cinética dos canais iônicos complexos, aqueles formados por subunidades proteicas, não apresenta um comportamento aleatório e sim que é um processo correlacionado no tempo, ou seja, apresentam memória (NOGUEIRA et al.,1995; MERCIK et al., 1999; VARANDA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; WAWRZKIEWICZ et al., 2012). A análise dessa propriedade vem sendo realizada através de diferentes métodos matemáticos como Análise de Hurst, Análise de Flutuação Destendenciada (Detrended Fluctuations Analysis, DFA), análise de autocorrelação, dentre outros métodos.

A pesar da grande quantidade de pesquisas sobre a estrutura e função dos canais formados por gA, o comportamento cinético, no que diz respeito a presença de memória de longo alcance, ainda não foi estudado neste canal. Neste trabalho buscamos analisar o comportamento cinético dos canais iônicos formados pela gA, investigando a existência de correlação de longo alcance no mecanismo de abertura e fechamento desses canais.

A compreensão desses processos é de grande importância para um maior entendimento dos mecanismos biofísicos que regem o processo cinético dos canais e entender se a presença da propriedade de memória é um comportamento presente apenas nos canais iônicos mais complexos, formados por subunidades proteicas e que possuem um mecanismo de *gating* ou se essa propriedade está presente nos canais mais simples como nos canais formados pela gramicidina A.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Canais Iônicos

As membranas celulares são barreiras hidrofóbicas que impedem a passagem de moléculas carregadas entre os meios intra e extracelular (DOYLE, 2004). A presença de estruturas denominadas de canais iônicos nessas membranas funciona como vias cuja função é permitir o fluxo rápido e seletivo de íons através da membrana sem o gasto de energia metabólica (HILLE, 2001; LIPSCOMBE & WYLLIE, 2018), sendo esse fluxo governado pelo gradiente eletroquímico através da membrana (ASCROFT, 2000).

Os canais iônicos são estruturas formadas por proteínas integrais com função de permitir o fluxo iônico seletivo através da membrana. Esse fluxo de íons desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos (HILLE, 2001), sendo responsáveis por estabelecer potenciais elétricos na membrana, produzindo a excitação muscular e nervosa, contração muscular, controle da excitabilidade cardíaca, secreção celular como a liberação de hormônios, regulação do volume e proliferação celular, participando também dos mecanismos pelos quais as células respondem a estímulos extracelular, contribuindo para a homeostase e os processos de sinalização celular (ASCROFT, 2000; TRIGGLE et al., 2006; FERMINI, 2008; LIPSCOMBE & WYLLIE, 2018). Os canais iônicos desempenham um papel vital para as células e o entendimento da estrutura, atividade e funcionalidade desses canais possui enorme importância para compreensão dos processos biológicos e na clínica médica (FERMINI, 2008).

Disfunções nos canais iônicos geradas por mutações nos genes codificadores das proteínas formadoras de canais ou por falha no processo de regulação do comportamento desses canais por um ligante intracelular ou extracelular podem provocar mudanças no fluxo iônico e gerar doenças denominadas canalopatias como a síndrome de *Liddle*, fibrose cística, síndrome do QT longo, alguns tipos de diabetes mellitus, dentre inúmeras outras doenças. Para compreender como tais canalopatias são originadas é necessário um maior entendimento das propriedades cinéticas dos canais iônicos (FERMINI, 2008; KIM, 2014; LOUDON & FRY, 2014; LASCANO et al., 2016; FERNÁNDEZ-FALGUERAS et al., 2017).

Os canais iônicos são proteínas altamente heterogêneas em nível estrutural e funcional (KLIPPENSTEIN et al., 2018). Contudo, de um modo geral, os canais iônicos são poros macromoleculares formados por proteínas transmembrana com múltiplas subunidades (Figura 1) que formam domínios especializadas como filtro de seletividade e sensores de estímulo para abertura do canal. Apenas proteínas de canais mais primitivas, encontradas em procariontes possuem apenas um segmento transmembrana. Algumas são grandes peptídeos formados por uma única subunidade, mas muitas contêm várias subunidades proteica (POLLARD e EARNSHAW, 2006).

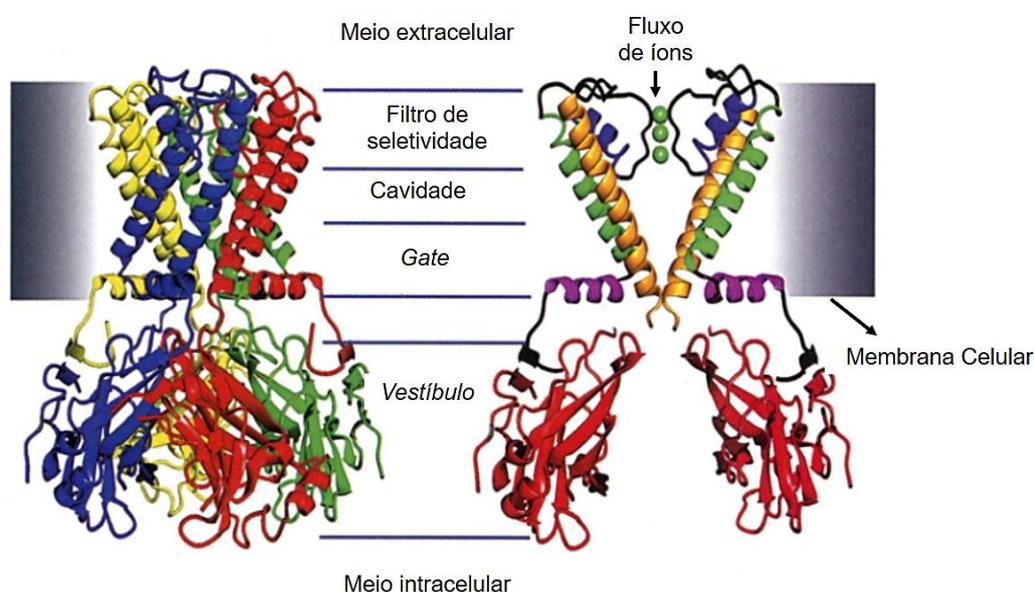


Figura 1: Canal de potássio (Kirbac 1.1). A figura esquemática mostra o canal inserido na membrana celular e os diferentes segmentos transmembrana que formam domínios específicos: filtro de seletividade, cavidade, *gate* e vestibulo. Fonte: [http://chemistry.berea.edu/~biochemistry/2014/af\\_ck\\_pz/](http://chemistry.berea.edu/~biochemistry/2014/af_ck_pz/)

Os canais iônicos permitem o fluxo de íons através de uma barreira naturalmente impermeável (FERMINI, 2008) com um fluxo de  $10^6$  íons/segundo (HILLE, 2001). Existem dois fatores que provocam o fluxo iônico, o campo elétrico e o gradiente de concentração, ou seja, o fluxo iônico permitido pelos canais ocorre a favor do seu gradiente eletroquímico através da membrana (ASHCROFT, 2000). Em condições de equilíbrio eletroquímico, onde as duas influências estão equilibradas, o fluxo resultante é nulo (HILLE, 2001).

Os canais iônicos são seletivos a determinados íons ou grupo de íons e essa capacidade de selecionar tais íons se deve a presença de uma região rica em resíduos

de aminoácidos carregados na superfície interna do poro do canal que formam um filtro estreito de seletividade que estabilizam o íon durante a sua passagem no interior do canal (HILLE, 2001; FERMINI 2008), mutações na sequência de aminoácido dessa região afetam a condutância iônica (KUO et al., 2003). Uma representação esquemática do filtro de seletividade pode ser observada na Figura 2.

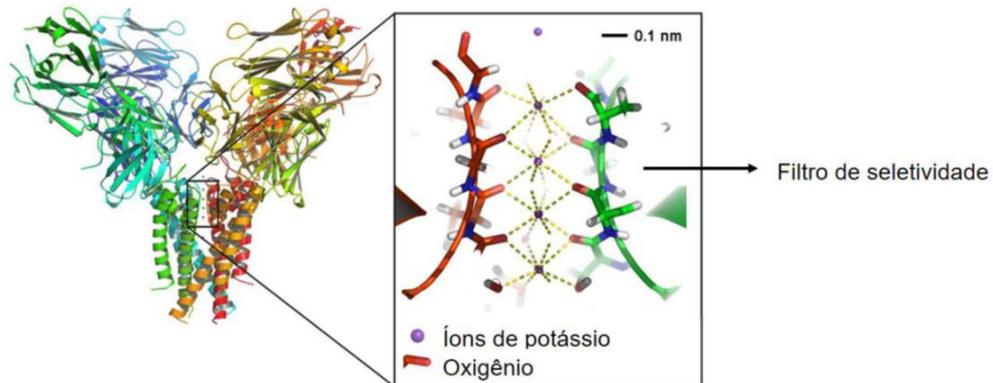


FIGURA 2: Filtro de seletividade do canal de potássio bacteriano KcsA. Detalhe com os peptídeos responsáveis pela seletividade do canal. Adaptado de VAZIRI & PLENIO, 2010.

Os canais mais simples podem ser encontrados em dois estados de condutância: aberto ou fechado (LIEBOVITCH, 1996). Em um potencial de membrana fixo, a condutância dos canais iônicos, quando no estado aberto, permanece constante para a maioria deles. Entretanto muitos canais iônicos se comportam de forma diferente, como o canal de glutamato, por exemplo, que exibe diferentes estados de condutância e diferentes amplitudes de corrente iônica, mesmo quando o potencial de membrana é mantido constante (ASHCROFT, 2000).

Os canais iônicos possuem uma ampla diversidade estrutural e estão envolvidos em uma grande variedade de processos, no entanto sua função compartilha três propriedades básicas: permeabilidade, seletividade e gating. Sendo este último o processo um movimento molecular em resposta a um estímulo externo, que permitem o canal transitar entre diferentes estados conformacionais, sendo responsável pelo processo de abertura e fechamento dos canais iônicos, controlando o fluxo de íons através da membrana (HILLE, 2001; TRIGGLE et al., 2006).

De acordo com Hille (2001) a cinética do gating pode ser descrita através de um diagrama de estado. O diagrama de estado mais simples transita apenas entre dois estados:

### **Aberto ⇌ Fechado**

No entanto canais biológicos não são tão simples podendo possuir múltiplos estados conformacionais para os estados abertos e fechados.

Na grande maioria dos canais iônicos o processo de *gating* pode ocorrer por influência de estímulos específicos. Existem basicamente três grupos bem compreendidos de mecanismos de *gating*: aqueles controlados por variação da voltagem, por controle de ligantes e por controle mecânico. Muitas vezes, existe a influência de hormônios ou neurotransmissores, mediadores que influenciarão a ligação de segundos mensageiros que vão ativar o *gating* nos canais iônicos (HILLE, 2001).

A mudança conformacional que ocorre na proteína formadora de canal quando essa transita entre os diferentes estados são geradas principalmente pela energia derivada das variações térmicas, do campo elétrico e/ou da energia originada da ligação de ligantes presentes no citoplasma ou no meio extracelular ao canal iônico (LIEBOVITCH, 1996).

## **2.2 Gramicidina A**

A gramicidina é uma família de peptídeos, assim como a alameticina, siringomicina E, megainina e cecropina, produzidos por microrganismos com capacidade de formar canais iônicos em membranas (HLADKY & HAYDON 1972); CHRISTENSEN et al., 1988; FEIGIN et al., 1996; EPAND & VOGEL, 1999; SPAAR et al., 2004; BROGDEN, 2005). O mecanismo de ação desses peptídeos se dá através da sua capacidade de inserção e formação de canais iônicos nas membranas celulares (Figura 3), onde as regiões hidrofóbicas dessas moléculas se organizam para estar em contato com a região central da membrana (camada hidrofóbica da bicamada lipídica) e as regiões hidrofílicas se associam as cabeças polares dos fosfolipídios (BROGDEN, 2005).

A presença de tais peptídeos na bicamada lipídica rompe a barreira de permeabilidade da membrana permitindo o vazamento de certos componentes celulares, bem como dissipando o gradiente eletroquímico da membrana (EPAND & VOGEL, 1999).

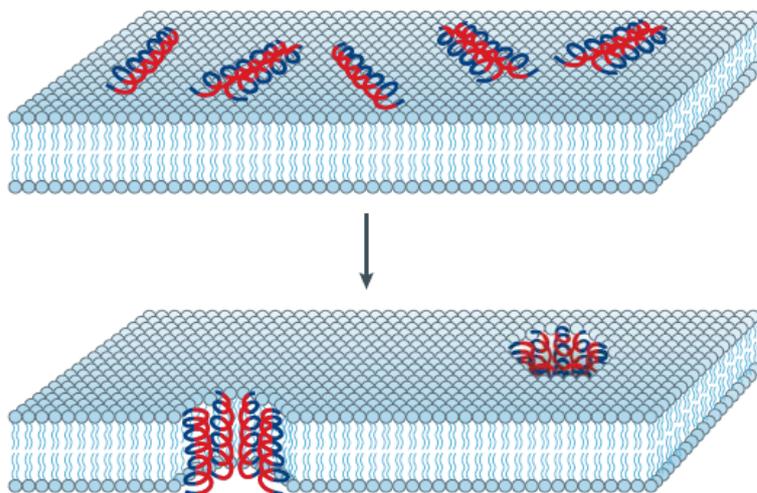


Figura 3: Mecanismo de inserção dos peptídeos formadores de canais iônicos. Regiões hidrofóbicas do peptídeo são mostradas em azul e as regiões hidrofílicas em vermelho. Adaptado de BROGDEN, 2005.

A gramicidina A (gA) é um peptídico linear produzido pelo *Bacillus brevis* e foi isolado pela primeira vez em 1940 (HOTCHKISS & DUBOS, 1940). É um peptídeo com ação antibiótica composto por uma sequência de 15 aminoácidos com capacidade de se inserir e formar canais iônicos simples e permeáveis a cátions monovalentes em membranas celulares (SARGES & WITCOP, 1965; WALLACE, 1990; WALLACE, 2000; LIOU et al., 2015; BROWND et al., 2018).

Tais peptídeos quando incorporados a membrana celular tem a capacidade de formar canais iônicos simples, com apenas um único segmento no interior das bicamadas lipídicas (ANDERSEN & KOEPPE II, 1992) que impedem a célula de manter seu potencial eletroquímico (URRY, 1971) e conseqüentemente leva a morte celular. Sua ação antibiótica tem sido explorada na clínica médica e veterinária desde a sua identificação (HERRELL & HEILMAN, 1941; WADESTEN et al., 1985; BOSSCHA et al., 2004) e mais recentemente tem sido estudado seu potencial clínico no tratamento de outras patologias.

Além da sua ação antibiótica, alguns autores têm observado o potencial de ação da gramicidina no tratamento de outras doenças. Luo et al. (2013) mostraram

que a gramicidina S tem um grande potencial para o tratamento da doença de Alzheimer. Em seus resultados eles observaram que esse peptídeo inibe significativamente a formação de fibrilas de peptídeos beta-amilóides, proteínas que se depositam no cérebro de indivíduos portadores da doença de Alzheimer. O potencial da gramicidina no tratamento do câncer também tem sido estudado. David et al. (2013) observaram que a gramicidina A tem a reduziu a viabilidade, *in vitro*, de células de carcinoma renal e reduziu eficazmente o crescimento de enxertos desses tumores *in vivo*.

A estrutura primária dos peptídeos gA é uma sequência linear constituído por 15 aminoácidos que possuem alternância de isomeria espacial, L- e D-aminoácidos (SU *et al.*, 2017): HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-TrpD-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH. Sua região N-terminal está bloqueada por um grupo formil e na região C-terminal existe uma ligação amida com a etanolamida (SARGES & WITKOP, 1965; CHAUDHURI & CHATTOPADHYAY, 2016).

A formação dos canais de gA em membranas ocorre através de um processo de dimerização, ocorrendo uma associação transmembrana de dois monômeros de gA presentes em cada monocamada da bicamada lipídica formando dímeros de gramicidina, estabelecendo assim a formação dos canais de gA. A estabilidade do dímero ocorre através de ligações de hidrogênio na região formil-NH terminal de cada monômero. Sua estrutura final na bicamada lipídica é constituída por um dímero helicoidal de cadeia simples com rotação para a direita (O'CONNELL et al., 1990; URRY, 1971; ANDERSEN & KOEPPE II, 1992; LUM et al., 2017; BROWND, 2018).

A função dos canais iônicos formados por gA pode variar dependendo da composição lipídica das membranas na qual ele está inserido (LUNDBÆK et al., 1996; GIRSHMAN et al., 1997; LUNDBÆK et al., 2010). Dependendo do tipo lipídio o canal tanto pode variar na amplitude de corrente, como também no tempo de permanência em que o canal permanece aberto e fechado (Figura 4). Esse tipo de comportamento, dependente da composição da bicamada lipídica torna a gA um excelente modelo para estudo da influência do ambiente no comportamento cinético dos canais iônicos.

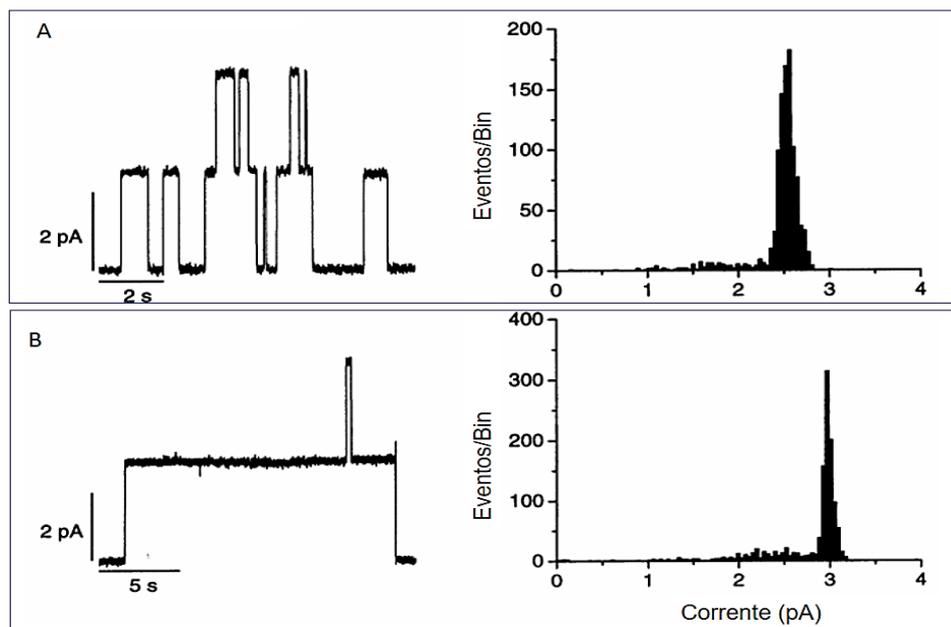


Figura 4: Registro da corrente de canais unitários e histogramas de amplitudes de correntes de canais de gramicidina A em bicamada lipídica com diferentes composições lipídicas. 4A: bicamadas lipídicas constituídas de DOPC/ n-decano; 4B: bicamadas lipídicas constituídas de DLoPC/n-decano. Adaptado de GIRSHMAN et al., 1997.

Os canais de gA tipicamente apresentam um padrão de condutância dependente da composição lipídica (ANDERSEN; SAWYER e KOEPPE II, 1992), no entanto em muitos estudos tem se observado a presença de canais que possuem uma condutância muito abaixo do perfil padrão (BUSATH & SZABO, 1981; MAZET et al., 1984; RUSSELL et al., 1986; SYCHEV et al., 2016). Essas variantes são denominadas de mini canais (BUSATH & SZABO, 1981). A frequência de eventos de mini canais nos registros de canais unitários de gA é pequena, podendo ser de inferior a 10% (MAZET et al., 1984; RUSSELL et al., 1986), no entanto outros em alguns experimentos pode corresponder de 30 a 50% dos eventos nos registros de canais unitários (BUSATH et al., 1987).

A inserção do dímero de gramicidina A na membrana pode ocorrer em diferentes arranjos, DS e SS, por exemplo (Figura 5), no entanto não são todas as formas de dimerização que geram a estrutura com funcionalidade de canal iônico (CHAUDHURI & CHATTOPADHYAY, 2016). A formação de um canal iônico de gA ocorre quando a gramicidina interage na configuração *head-to-head* entre os monômeros, sendo a configuração SS aquela com a capacidade de formar canais iônicos (ARUMUGAM et al. 1996; ANDERSEN et al., 1999).

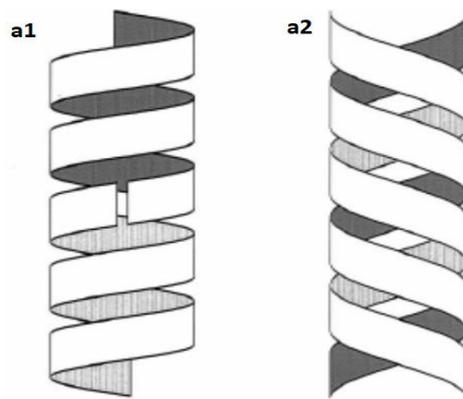


Figura 5: Representação Esquemática de duas formas de interação entre os monômeros de gramicidina A em Bicamada Lipídica Plana. a1 Interação paralela; a2 interação *head-to-head* entre os monômeros de gramicidina. Adaptado de ANDERSEN et al., 1999.

A capacidade do dímero de gA se comportar como canal iônico depende da localização dos resíduos de triptofano na interface proteína-bicamada lipídica, quando o peptídeo interage com a bicamada. A distribuição dos resíduos de triptofano podem ser encontrados em diferentes configurações. O dímero de gA não possui a capacidade de condução iônica quando esses resíduos se distribuem ao longo de toda o comprimento da bicamada. No entanto, a funcionalidade de canal iônico aparece quando o arranjo dos resíduos de triptofano formam *clusters* na região hidrofílica da bicamada (Figura 6 e 7) (CHAUDHURI et al., 2014).

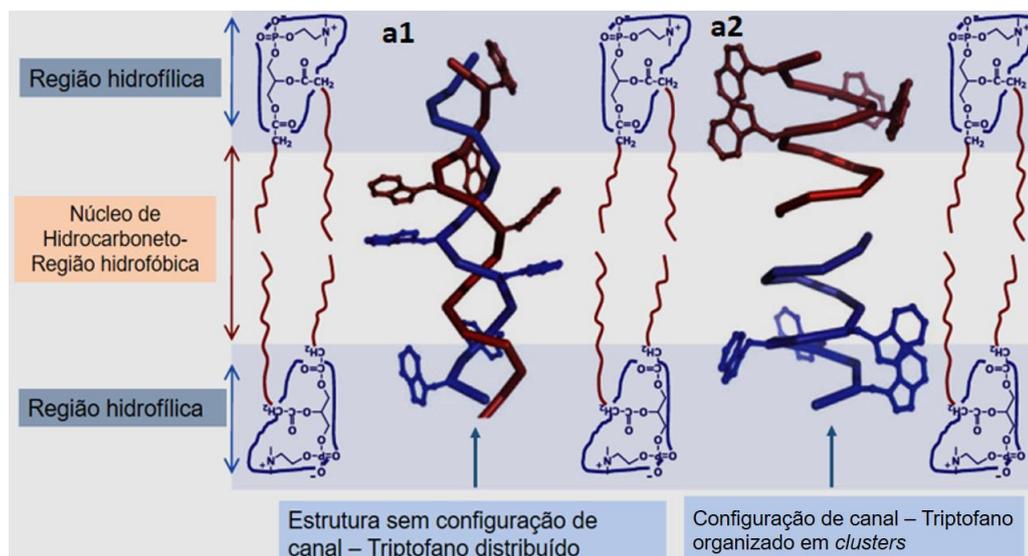


Figura 6: Representação Esquemática de duas formas de interação entre os monômeros de gramicidina A em BPL. a1 Interação paralela; a2 interação *head-to-head* entre os monômeros de gramicidina. Adaptado de CHAUDHURI & CHATTOPADHYAY, 2016.

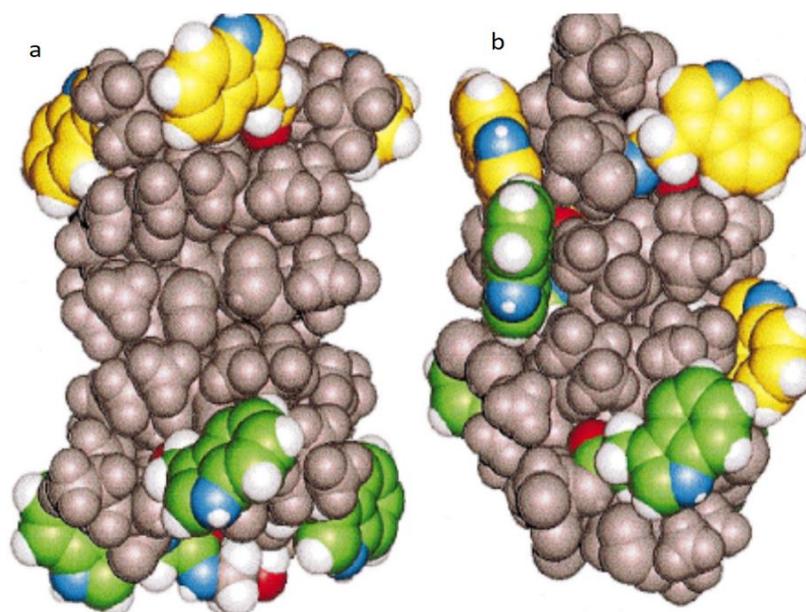


Figura 7: Modelo de Preenchimento de espaço de duas formas de interação entre os monômeros de gramicidina A em BPL. 7a: Interação *head-to-head* entre os monômeros de gramicidina, SS; 7b: Interação paralela, DS, entre os monômeros de gramicidina. Adaptado de ANDERSEN et al., 1999.

A cinética dos canais iônicos de gA não ocorre de maneira semelhante àquela encontrada nos canais complexos, como os canais de sódio e potássio por exemplo. O fluxo iônico através desses canais ocorre quando os monômeros se encontram associados. Tal fluxo é interrompido quando os monômeros se movem a uma distância  $\delta$  um do outro. A ativação da dissociação dos monômeros está relacionada tanto com a energia de ativação intrínseca quanto com a diferença de energia de deformação da bicamada (LUNDBEAK et al., 1996).

O processo de abertura e fechamento desses canais tem sido visto como consequência da formação de dímeros (D), estado "aberto", e posterior dissociação dos monômeros (M), conformação onde ocorre a interrupção do fluxo iônicos e essa conformação é compreendido com estado fechado (M+M) (ANDERSEN 1984; O'CONNELL et al., 1990; LUM et al., 2017). De acordo com esse modelo, a cinética dos canais de gA não consiste em transição conformacionais no interior da proteína gerando as transições entre os estados abertos e fechados, como é visto naqueles canais complexos, porém a cinética de canais iônicos formado por gA seria um processo de associação e dissociação de monômeros ( $M+M \leftrightarrow D$ ) (Figura 8), onde a formação dos canais seria dependente do encontro entre dois monômeros que estão em movimento de difusão na bicamada lipídica.

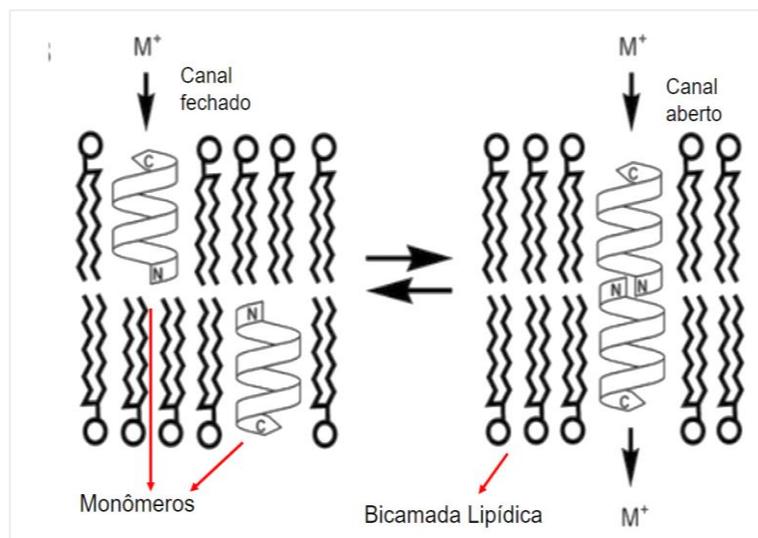


Figura 8: Representação esquemática do processo de abertura e fechamento do canal iônico formado por gramicidina.  $M^+$  representa cátions monovalentes. Adaptado de ESSEN & KOERT (2008).

A taxa de formação dos canais de gA (dimerização) e fechamento (dissociação dos dímeros) é dependente de alguns fatores externos, como: voltagem (BAMBERG & BENZ, 1976; SANDBLOM et al., 2001), espessura de membrana (KOLB & BAMBERG, 1977; ELLIOT et al., 1983), composição da bicamada lipídica (GIRSHMAN et al., 1997), concentração de íons (RING & SANDBLOM, 1988; RING, 1996), das propriedades elásticas da bicamada lipídica (NEHER & EIBL, 1977; GOULIAN et al., 1998; LUNDBÆK & ANDERSEN, 1999).

Muito do entendimento sobre a estrutura e propriedades do funcionamento dos canais iônicos foram obtidos através do uso de canais iônicos formados por gramicidina em bicamadas artificiais planas. Devido ao fato da gramicidina pertencer a uma família de moléculas capazes de formar canais iônicos quando incorporadas em bicamadas lipídicas artificiais, possuir uma estrutura molecular simples, facilidade na manipulação de sua estrutura química e pelo grande volume de dados na literatura sobre este peptídeo, ela tem sido utilizada como uma ferramenta para estudo do comportamento dos canais iônicos (HLADKY & HAYDON, 1970; ANDERSEN, 1983; ANDERSEN & KOEPE II, 1992; CIFU, KOEPE II & ANDERSEN, 1992; LUNDBÆK et al., 1996, ANDERSEN, et al., 2005; KELKAR & CHATTOPADHYAY, 2007; ALEJO, et al., 2013). A gA é um excelente modelo para o estudo das relações entre estrutura e função dos canais iônicos, sua organização e sua dinâmica, bem como a influência da composição da bicamada lipídica com a função dos canais (LUNDBÆK et al., 1996; CHEN & WEI, 2012; RYU et al., 2015; DOKTOROVA et al., 2018).

### 2.3 Correlação de longo alcance (memória) na cinética dos canais iônicos

A cinética dos canais iônicos é caracterizada por uma série de períodos de tempo em que o canal se encontra nos estados abertos ou fechados (BRAZHEA & MAKSIMOV, 2006). Estudos de séries temporais geradas pelos tempos de permanência em que os canais transitam entre os dois estados (aberto e fechado) permite compreender o comportamento cinético dessas proteínas (OLIVEIRA et al., 2006).

De acordo com Ashcroft (2000), o tempo que o canal permanece aberto ou fechado varia aleatoriamente. No entanto, alguns autores têm observado através de métodos matemáticos como Análise H/S de Hurst, Análise de Flutuações Destendenciadas (Detrended Fluctuations Analysis, DFA), análise de autocorrelação, dentre outros métodos, que muitos canais iônicos não se comportam de forma aleatória, eles apresentam a presença de correlação de longo alcance, memória, no seu processo de abertura e fechamento (NOGUEIRA et al., 1995; VARANDA et al., 2000; SIWY et al. 2001).

A presença de memória na cinética dos canais iônicos tem sido observada em diferentes tipos de canais iônicos. Nogueira *et al.* (1995) usando a Análise H/S de Hurst, observaram a presença de memória na cinética do *gating* nos canais de potássio ativados por cálcio (BK) em células de Leydig. Siwy et al. (2001), usando a Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA) e Função de Autocorrelação para estudar a existência de correlação na sequência de aberturas e fechamentos de um canal de potássio tipo BK em fibras musculares da tíbia de gafanhotos, observaram uma maior correlação de longo alcance na sequência de fechamentos.

Oliveira et al. (2006) mostraram, através da Análise H/S de Hurst, que modelos Markovianos e Fractal não são adequados para revelar a memória na cinética dos canais iônicos de potássio do tipo BK. A presença de memória não é uma propriedade exclusiva da cinética de canais do tipo BK, Lan et al. (2008), usando DFA, também mostraram a presença de memória na cinética de canais de potássio dependentes de voltagem em neurônios ganglionares da raiz dorsal em ratos.

### 2.4 Métodos Matemáticos na análise de séries temporais de sinais biológicos

O uso de métodos matemáticos permite compreender propriedades que não podem ser analisadas por meios das técnicas e metodologias experimentais atuais,

como a aleatoriedade de um processo, permitindo estudar fenômenos que muitas vezes são impossíveis de serem analisados experimentalmente. Métodos matemáticos como Análise de Hurst, Função de autocorrelação, DFA e Complexidade de Lempel-Ziv têm sido utilizados para análise de sistemas biológicos (NOGUEIRA et al., 1995; SIWY et al. 2001; HUDETZ et al., 2016).

Muitos sistemas físicos e biológicos apresentam um comportamento complexo caracterizado por correlações de longo prazo. No entanto, abordagens tradicionais não são adequadas para quantificar com precisão correlações de longo alcance em sinais não estacionários (LO, 1989; HU et al., 2001).

#### *Análise de Flutuação Destendenciada (do inglês Detrended Fluctuations Analysis, DFA)*

A correlação de longo alcance, em um dado processo significa que ao longo do fenômeno um determinado padrão se repete (LI & KANEKO, 1992). De acordo com Giraitis et al. (2003) a presença de memória longa em uma dada série temporal indica uma dependência persistente entre as observações da série temporal. Desse modo pode-se dizer que presença dessa correlação na cinética dos canais iônicos significa que o tempo de permanência do canal iônico nos estados abertos ou fechados não ocorre de forma aleatória.

O DFA é um método seguro para quantificação das correlações de longo alcance em séries temporais não-estacionárias, isto é, séries onde seus valores não variam no tempo aleatoriamente em torno de uma média constante. Esse método foi proposto por Peng et al. (1994) para análises de sequências gênicas de DNA, e tem sido utilizado para análise em diversos campos de pesquisas. Sendo um método seguro para quantificação das correlações de longo alcance em séries temporais não-estacionárias, tendo a vantagem, em relação a outros métodos, de evitar a detecção espúria de correlações de longo alcance aparentes quando estas são apenas artefatos da não estacionariedade (PENG et al., 1994).

Ele consiste basicamente em analisar as flutuações de uma série integrada de dados após a retirada das tendências, analisando assim a presença ou ausência de um processo de auto-similaridade dentro das séries temporais (STANLEY et al., 1999; HU et al., 2001). A presença de tendências não é uma característica intrínseca aos dados, elas são introduzidas por efeitos externos e são caracterizados por um comportamento suave ou que oscilam lentamente. A análise dos dados sem levar em

consideração a presença espúria de tendências podem levar a uma falsa identificação (KANTELHARDT et al., 2001). O destendenciamento dos dados é uma etapa importante que permite evitar que algum ruído externo ao sistema que está sendo analisado seja contabilizado na análise. De acordo com Hu (2001), é comum a presença de tendências em séries temporais geradas por sistema biológicos ou físicos.

A análise dos dados através do método de DFA fornece o parâmetro  $\alpha_{DFA}$ , dependendo do valor desse parâmetro obtemos o tipo de comportamento da série temporal analisada. Dentre os possíveis resultados para parâmetro  $\alpha_{DFA}$  e o significado de tais valores para o comportamento cinético do canal iônicos temos:

- i.  $\alpha = 0,5$ : indica uma tendência ao comportamento aleatório;
- ii.  $0,0 < \alpha < 0,5$ : indica a presença de uma memória antipersistente no comportamento da série, ou seja, um intervalo de tempo de permanência longo do canal no estado aberto, por exemplo, tem uma maior probabilidade de ser seguido por um intervalo curto e o mesmo serve para o contrário;
- iii.  $0,5 < \alpha < 1,0$ : que indica a presença de uma memória persistente no comportamento da série, ou seja, existe maior probabilidade de um tempo de permanência curto ser seguido por outro curto.

Entropia Aproximada (do inglês Approximate Entropy, *ApEn*)

A *ApEn* é um método matemático definido por Pincus (1991) sendo uma estatística que tem como objetivo quantificar a imprevisibilidade das flutuações de uma série temporal, ou seja, a ausência de padrões repetitivos ao longo das flutuações. Sendo capaz de analisar se existe a ocorrência de padrões atuais permanece constantes no futuro e assim é capaz de estimar a complexidade no comportamento de um dado processo (CHEN & CHANG, 2013).

Esse método tem um grande potencial de aplicação na análise de uma ampla variedade de dados fisiológicos e séries temporais proveniente de dados clínicos e pode ser utilizado em séries temporais curtas e com presença de ruídos (PINCUS, 1991; PINCUS & GOLDBERGER, 1994). O método de *ApEn* tem sido empregado em uma variedade de estudos de diferentes processos fisiológicos como análise de sinais elétricos cerebrais (CHOI et al., 2008), análise de sinais cardíacos (CASTIGLIONI &

DI RIENZO, 2008; LIU et al., 2010; HOLZINGER, 2012) bem como uma ferramenta de diagnóstico de doenças (HARTMAN et al., 1994; GUO et al., 2010).

A presença de padrões repetitivos nas flutuações de uma série temporal torna a série mais previsível quando comparado com séries com a ausência desses padrões (HO et al., 1997), possuindo assim uma baixa complexidade. Séries aleatórias, onde padrões repetitivos não estão presentes possuem um elevado grau de complexidade (PINCUS, 1991).

Menores valores para  $ApEn$  indicam que a série temporal apresenta alto grau de regularidade e valores elevados indicam uma alta complexidade (maior irregularidade ou aleatoriedade) em um dado sinal (WU et al., 2016; WU et al., 2017). Valores de  $ApEn$  próximas de 0 indicam a presença de padrões que se repetem ao longo da série e inversamente, valores elevados de  $ApEn$  indicam um comportamento randômico (PINCUS & GOLDBERGER, 1994).

### **3. Objetivos**

#### *3.1 Objetivos Gerais*

Investigar a existência de complexidade e correlação de longo alcance no processo cinético de abertura e fechamento dos canais iônicos formados por gramicidina A inseridos em bicamadas lipídicas planas artificiais.

#### *3.2 Objetivos Específicos*

- a. Obter os registros de corrente iônica de canais unitários formados por gramicidina A inseridos em bicamada lipídica plana;
- b. Obter séries temporais com os tempos de permanência dos canais formados por gramicidina A nos estados aberto e fechado a partir dos registros de corrente iônica;
- c. Empregar o método Análise de Flutuação Destendenciada para analisar a existência de memória no processo cinético do canal de gramicidina A
- d. Empregar o método da entropia aproximada para analisar a existência de complexidade do processo cinético do canal de gramicidina A.

## 4. Metodologia

### 4.1 Formação da Bicamada Lipídica Plana

As bicamadas lipídicas planas (BLP's) utilizadas nos experimentos foram formadas conforme preconizado pela técnica de Montal & Mueller (1972). A montagem experimental onde foi formada a bicamada lipídica consistia em uma câmara de Politetrafluoretileno (Teflon<sup>®</sup>) subdividida em duas hemicâmaras por uma película de Teflon<sup>®</sup>. Cada hemicâmara, denominadas *Cis* e *Trans*, comporta um volume final de 1,2 ml de solução eletrolítica. A película possui um orifício de diâmetro de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ , sendo este a única via de contato condutiva entre os dois compartimentos. As hemicâmaras foram seladas com graxa de silicone para alto vácuo, de modo a isolá-las eletricamente. Ponte salinas e eletrodos de prata cloreto de prata conectavam cada hemicâmara a um amplificador de *patch-clamp* (FIGURA 9).

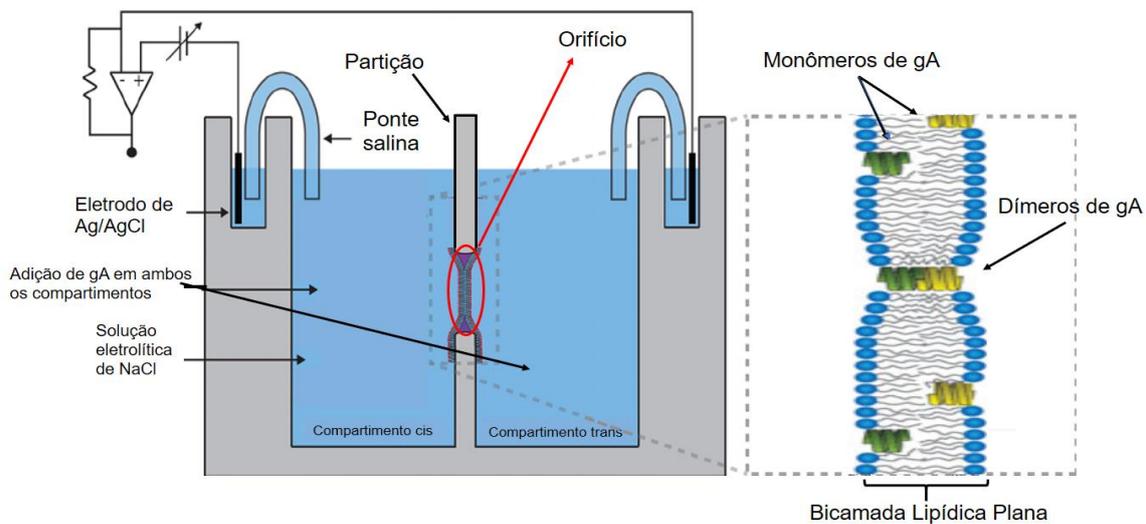


Figura 9: Câmara de Teflon<sup>®</sup> conectadas através de pontes salinas a eletrodos de Ag/AgCl. No detalhe observa-se a bicamada lipídica plana formada no orifício da partição de Teflon<sup>®</sup>. Detalhe a direita mostra os monômeros de gA incorporados nas monocamadas e também a presença de canais formados por dímeros de gA. Adaptado de CARNEY et al., 2013 e LUNDBÆK et al., 2010.

Etapas da formação da bicamada lipídica plana artificial:

- a. Inicialmente foi adicionado 700  $\mu\text{L}$  de solução eletrolítica não tamponada de NaCl 1M em cada um dos compartimentos da câmara, de modo que a solução eletrolítica fique com menisco abaixo do orifício.
- b. Adicionamos 15  $\mu\text{L}$  de Diftanoilfosfatidilcolina (Avanti Polar Lipids, USA) a uma concentração de 10mg/ml em hexano (Merck, Alemanha) na superfície da solução eletrolítica de cada uma das hemicâmaras.
- c. A região da partição que continha o orifício foi rapidamente exposta a solução de hexadecano (Sigma-Aldrich, Brasil) 1% (p/v) em hexano para aumentar a posterior adesão dos lipídeos e estabilidade das monocamadas.
- d. Após 15 minutos, tempo de evaporação do hexano, forma-se espontaneamente um filme lipídico sobre a solução.
- e. Após a formação do filme lipídico foi adicionado, com o auxílio de uma seringa, mais 500  $\mu\text{L}$  de solução eletrolítica no compartimento anterior elevando assim a solução acima do orifício, dessa forma o filme lipídico se deposita sobre o orifício formando a primeira monocamada lipídica.
- f. O procedimento anterior se repete para o compartimento posterior da câmara, depositando a segunda monocamada e assim se forma uma bicamada no orifício da partição de Teflon<sup>®</sup>. A formação da BLP foi detectada pelo aumento da corrente capacitiva basal do sistema em resposta à aplicação de uma onda triangular de voltagem, visualizada no monitor de um microcomputador executando o programa Clampex 10.5 (molecular Devices, USA).

Todas as etapas descritas acima estão esquematizadas na figura 10.

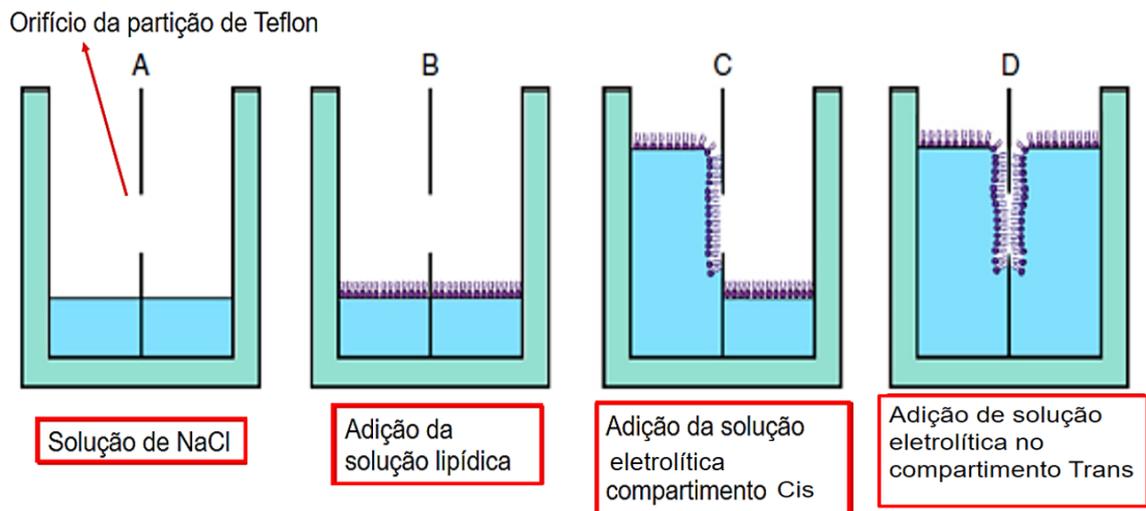


Figura 10: Etapas de formação da bicamada lipídica plana. Adaptado de GUTSMANN et al., 2015.

g. Após a formação da BLP foi adicionado entre 15 e 20  $\mu\text{L}$  de uma solução etanólica de gramicidina A (Sigma-Aldrich, Brasil) numa concentração 0,6 nM em ambas as hemicâmaras, cuja concentração final variou de 0,25 a 0,3 pM. A formação dos canais na bicamada lipídica foi monitorada através do registro da corrente iônica na memória do microcomputador executando o programa Clampex 10.5.

#### 4.2 Sistema de aquisição e monitoramento dos registros elétricos

O sistema de aquisição dos registros elétricos (Figura 11), composto por um gerador de funções (*Minipa* MFG-4201A, Brasil), uma placa conversora A/D (Digidata 1440, Molecular Devices, USA) e um amplificador de patch clamp (Axopatch 200B, Molecular Devices, USA), foi conectada a câmara de Teflon<sup>®</sup> através dos eletrodos de Ag/AgCl em pontes salinas do tipo Ágar-KCl 3M (3% p/v). A saída do amplificador foi conectada ao conversor A/D e a um microcomputador para aquisição e monitoramento dos registros de correntes.

A câmara de Teflon<sup>®</sup> foi mantida no interior de uma gaiola de Faraday, para blindagem elétrica e todo o sistema foi mantido sobre uma mesa de amortecimento de alta performance (TMC model 63-531, USA) para minimização de perturbações mecânicas.

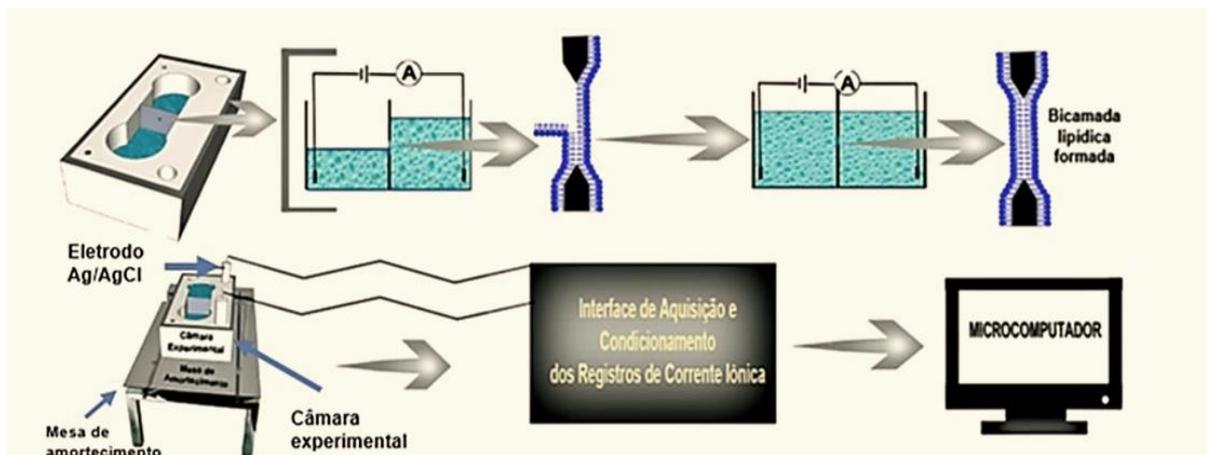


Figura 11: Esquema de formação da bicamada lipídica plana e sistema de monitoramento e aquisição de correntes iônicas através de canais iônicos de gramicidina A em bicamada lipídica plana Adaptado de AGUIAR et al., 2015.

Os registros das correntes iônicas de canais unitários de gA foram filtrados 1 KHz por um filtro de passa-baixa Bessel (Modelo 902 da Frequency Devices) e foram gravados em uma taxa amostral de 100 KHz.

#### 4.3 Análises dos registros de corrente iônica do canal de gramicidina

A análise dos registros das correntes iônicas foi realizada com o software pClamp 10.5 e Sview (v. 4.09, USA). A aquisição das séries temporais foi realizada no programa pClamp 10.5 através da função *single-channel search*. O pCLAMP 10.5 permitiu a idealização dos registros de corrente iônica e determinação dos tempos de permanência nos estados aberto e fechado dos canais individuais. A obtenção dos valores de condutância de cada abertura dos canais de gA foram obtidos no programa Sview. O cálculo do valor da condutância média foi realizado por um ajuste do tipo Gaussiano a um histograma obtido a partir de 711 valores individuais de condutância. Na figura 12 consta um diagrama de bloco das etapas de processamento dos registros de corrente e obtenção das séries temporais.

As constantes de tempos para os tempos de permanência do em cada estado de condutância foram obtidos através do ajuste exponencial do histograma de distribuição dos tempos do canal nos estados abertos e fechados no programa pClamp 10.5.

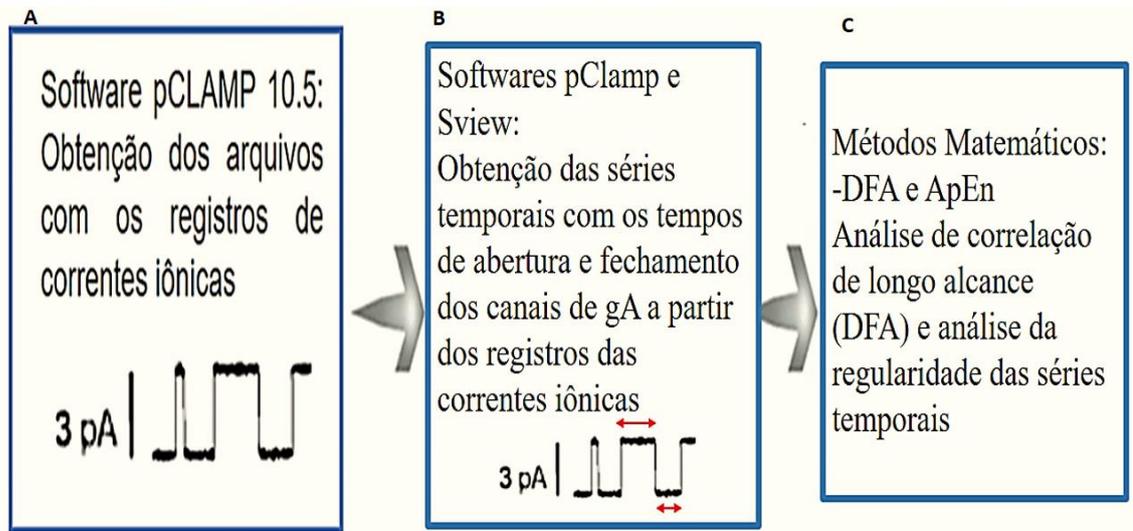


Figura 12: Etapas da obtenção e análise dos tempos de permanência nos estados abertos e fechados dos canais iônicos formados por gA. 12A: Aquisição e idealização dos registros de canais unitários; 12B: Obtenção das séries temporais a partir do registro das correntes iônicas e processamento das séries; 12C: Análise das séries temporais através dos métodos matemáticos DFA e ApEn.

A escolha dos eventos de abertura dos canais iônicos considerados na obtenção das séries temporais foi baseada no valor da condutância média dos canais de gA. Considerou-se estado aberto, apenas aqueles eventos em que a variação do valor de condutância foi de  $2 \times$  o desvio padrão.

Foram utilizados alguns critérios de seleção das series utilizadas na análise:

1. O número N de pontos;
2. A quantidades de segmentos excluídos na série temporal necessários realizar durante o processamento dos dados para obtenção de uma série composta apenas de canais unitários. Um número de deleção de segmentos da série elevado pode gerar problemas para a análise das séries;
3. O valor do  $R^2$  obtidos na regressão linear no gráfico  $\log f(n) \times \log n$  utilizados para obtenção do  $\alpha_{DFA}$ .

A figura 13 representa um registro de corrente típico após idealização dos estados fechados ou abertos do canal de gA. A série temporal de tempos abertos (TA) ou de tempos fechados (TF) foram então analisadas via algoritmo do DFA. As séries TA, TF e integral foram analisadas via algoritmo da entropia aproximada.



Figura 13: Idealização dos dados realizadas no *Software pClamp*. O programa identifica os estados de condutâncias (abertos e fechados) do registro da corrente iônica através dos níveis de condutância de cada estado.

Após a idealização dos dados foi realizado o processamento dos dados para cortes das regiões no registro onde possuía ruídos ou presença de eventos com condutância superior à média, que representava a inserção mais de um canal de gA simultaneamente na bicamada lipídica.

#### 4.4 Obtenção de séries temporais simuladas

##### Séries temporais simuladas

Foram geradas 30 séries temporais simuladas,  $N=500$ , cujo valor do  $\alpha_{DFA}$  era conhecido: 0,2, 0,5 e 0,8 (10 séries para cada valor de  $\alpha_{DFA}$ ). Tais séries foram criadas no Matlab R2009a, utilizando o algoritmo de simulação de ruído gaussiano fracionário (fGn), disponível no site da *MathWorks* (<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/19797-simulation-of-fractional-gaussian-noise--exact-?>). O modelo do fGn foi inicialmente introduzido por Mandelbrot e Van Ness e permite a criação de séries numéricas com a presença de correlação de longo alcance (DELIGNIÈRES, 2015). As séries simuladas foram utilizadas como modelo teórico para as análises dos dados experimentais da entropia aproximada.

#### 4.5 Análise de Flutuação Destendenciada das séries temporais

O algoritmo do DFA utilizado nas análises foi o disponível no site Physionet (<https://physionet.org/physiotools/dfa/>) (GOLDBERGER *et al.*, 2000)

Os passos seguidos pelo método DFA na análise são basicamente os seguintes (PENG *et al.*, 1994; PENG, 1995):

a. O método utilizado pelo Análise de Flutuações Destendenciadas obtém uma série integrada,  $y(k)$ , a partir da série temporal original de acordo com a equação 1:

$$y(k) = \sum_i^k [y(i) - \bar{y}] \quad \text{Eq. 01}$$

Onde  $y(i)$  é o valor de tempo de permanência na série original e  $y$  é a média da série original.

b. Dividir a série temporal integrada de tamanho  $N$ , e assim obter *boxes* de comprimentos iguais,  $n$ , e ajustar uma reta aos dados de cada *box* pelo método dos mínimos quadrados, e esta representa a tendência local de cada *box*.

c. Definir a tendência local em cada *box* de tamanho  $l$ : ajusta-se uma reta ao intervalo, que representa a tendência local.

d. Destendenciar a série temporal, subtraindo a série integrada  $y(k)$  da tendência local,  $y_n(k)$ , em cada *box*.

e. Após destendenciar a série temporal calcula-se as flutuações  $F(n)$  para cada intervalo de tamanho  $n$  da série calculando um  $F(n)$  para cada *box* através da equação 2:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [y(k) - y_n(k)]} \quad \text{Eq. 02}$$

f. Calcula-se  $F(n)$  repetidas vezes para valores crescentes de  $n$ . Normalmente o valor de  $F(n)$  aumenta com o aumento do tamanho de  $n$ .

g. Plota-se um gráfico duplo-log de  $F(n) \times n$  (Figura 14) para determinar a relação entre a função de flutuação,  $F(n)$ , com o tamanho dos *boxes* e calcula-se o coeficiente de regressão linear, inclinação da reta, denominado de  $\alpha_{DFA}$ . O valor do  $\alpha_{DFA}$  nos

fornece informações sobre a presença ou ausência de memória no comportamento da série dos tempos de permanência do canal iônicos nos estados abertos e fechados.

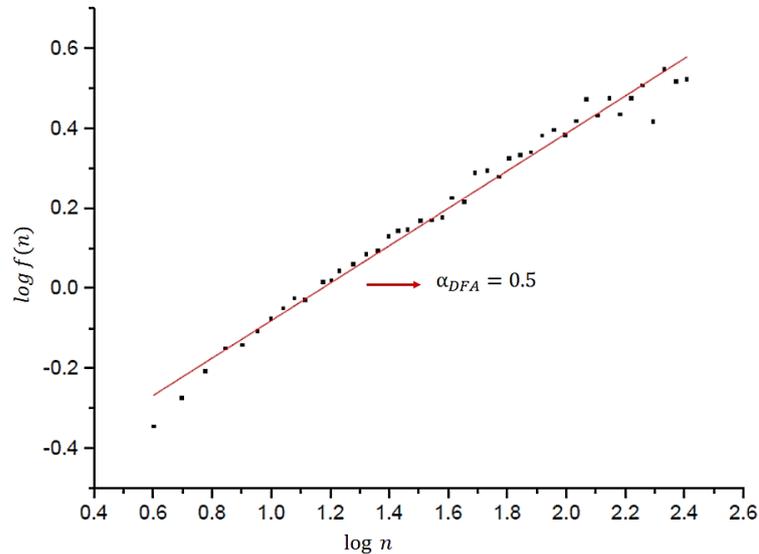


Figura 14: Gráfico duplo-log utilizado no método do DFA. A abscissa são logaritmos dos valores de  $n$  e o eixo  $y$  é dado pelo log de  $f(n)$ . A inclinação da reta de regressão linear é o valor do parâmetro  $\alpha_{DFA}$  utilizado para determinação da presença de correlação de longo alcance ou presença de um comportamento aleatório na série temporal analisada.

#### 4.6 Entropia Aproximada

Para a análise da entropia aproximada  $ApEn(m, r, N)$  de uma determinada série temporal de tamanho  $N$  é necessário definir inicialmente dois parâmetros de entrada: o valor de  $m$  e  $r$  (PINCUS, 1994). O parâmetro  $m$  é um valor inteiro positivo que estipula o tamanho da janela para comparação de similaridade e o  $r$  é o limiar de tolerância para aceitação dessa similaridade (PINCUS & GOLDBERGER, 1994; WU et al., 2016). De acordo com Pincus (1994) tipicamente são utilizadas séries com  $N$  entre 75 e 5000 pontos e para  $m = 1$  ou  $2$ ,  $r$  entre 0,1 e 0,25 do desvio padrão dos dados da série temporal possui boa validade estatística.

Determinados os parâmetros de entrada, o algoritmo compara a distância entre subgrupos  $m$  de dados pertencentes ao sinal, aceitando que tais subgrupos são semelhantes se a distância entre eles for menor que  $r$ .

Os passos seguidos pelo método ApEn durante a análise são basicamente os seguintes (PINCUS, 1991; PINCUS & GOLDBERGER, 1994; PINCUS, 1995; RICHMAN & MOORMAN, 2000; WU et al., 2016):

1. Dada a série temporal  $\{x(i)\}$  de tamanho  $N$ , e os valores de  $i$  e  $t$  determinados o cálculo de ApEn ( $m, r, N$ ), define-se uma sequência de vetores  $x(1), x(2), \dots, x(N - m + 1)$ , onde cada vetor  $x^i(i)=[u(n), u(n + 1), \dots, u(i + m - 1)]$  consistem de  $m$  valores consecutivos  $x$  pertencentes ao sinal e serve com um padrão para comparação com os outros vetores da série temporal analisada.

2. Calcula-se a distância máxima,  $d[x(i), x(j)], 1 \leq j, k \leq N - m + 1$ , entre os componentes escalares que formam os vetores  $u^i(j)$  e  $u^i(k)$  através da equação:

$$d[x(i), x(j)] = \max_{k=1,2,\dots,m} (|u(i+k-1) - u(j+k-1)|) \quad \text{Eq. 03}$$

3. Usa-se a sequência de vetores  $x(i), x(i + 1), \dots, x(i + m - 1)$  para calcular o  $C_i^m(r)$  para cada vetor, onde o  $C_i^m(r)$  que denota a probabilidade de  $k$  satisfazer a condição de que a distância  $d[x(i), x(j)]$  é menor do que  $r$  e é calculado através da equação abaixo:

$$C_i^m(r) = \frac{\text{número de } k \text{ que satisfaz } d[x(i), x(j)] \leq r}{N - m + 1} \quad \text{Eq. 04}$$

O valor de  $C_i^m(r)$  indica a frequência de  $k$  que apresentam similaridade com o vetor  $x(i)$  de comprimento de janela  $m$  e os outros vetores da série dentro do limiar de tolerância  $r$ .

4. Calcula-se a média dos logaritmos naturais de  $C_i^m(r), \phi^m(r)$ :

$$\phi^m(r) = \frac{\sum_{i=1}^{N-m+1} \log_e C_i^m(r)}{N - I + 1} \quad \text{Eq. 05}$$

5. A entropia aproximada para séries finitas é dada então por:

$$\begin{aligned} ApEn(m, r, N) &= |\phi^m(r) - \phi^{m+1}(r)| \\ &= [\sum_{i=1}^{N-m+1} \ln C_i^m(r) / N - m + 1] - [\sum_{i=1}^{N-m} \ln C_i^{m+1}(r) / N - 1] \end{aligned} \quad \text{Eq. 06}$$

#### 4.7 Análise Estatística

Para a comparação entre os grupos de valores da *ApEn* das séries simuladas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% e o post-hoc de Dunn.

## 5. Referências

- AGUIAR, J. P. et al. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. **Quimima Nova**, v. 38, n. 6, p. S1-S3, 2015.
- ALEJO, J. L. et al., Small-molecule photostabilizing agents are modifiers of lipid bilayer properties. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 11, p. 2410-2418, 2013.
- ANDERSEN, O. S. Ion movement through gramicidin A channels. Single-channel measurements at very high potentials. **Biophysical journal**, v. 41, n. 2, p. 119-133, 1983.
- ANDERSEN, O. S. Gramicidin channels. **Annual Review of Physiology**, v. 46, n. 1, p. 531-548, 1984.
- ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E. D. Molecular determinants of channel function. **Physiological Reviews**, v. 72, n. suppl 4, p. S89-S158, 1992.
- ANDERSEN, O. S.; SAWYER, D. B.; KOEPPE II, R. E. Modulation of channel function by the host bilayer. **Biomembrane Structure and Function**, p. 227-244, 1992.
- ANDERSEN, O. S. et al. Gramicidin channel controversy—the structure in a lipid environment. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 6, n. 7, p. 609, 1999.
- ANDERSEN, O.S. et al. Gramicidin channels. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2005.
- ARUMUGAM, S. et al. Conformational trapping in a membrane environment: a regulatory mechanism for protein activity?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 12, p. 5872-5876, 1996.
- ASHCROFT, F. M. **Ion Channels and Disease**. Orlando. Academic Press, 2000. 481 p.
- BAGAL S.K. et al. Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. **Journal Medical Chemistry**, v.56, n.3, p. 593-624, 2012.
- BAMBERG, E.; BENZ, R. Voltage-induced thickness changes of lipid bilayer membranes and the effect of an electric field on gramicidin A channel formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 426, n. 3, p. 570-580, 1976.
- BOSSCHA, M. I. et al. The efficacy and safety of topical polymyxin B, neomycin and gramicidin for treatment of presumed bacterial corneal ulceration. **Br J Ophthalmol**, 88:25-28, 2004
- BROWND, Matthew et al. Gramicidin Subunits that Cross Membranes and form Ion Channels. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 3, p. 454a, 2018.
- BRAZHE, A. R.; MAKSIMOV, G. V. Self-organized critical gating of ion channels: on the origin of long-term memory in dwell time series. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, v. 16, n. 3, p. 033129, 2006.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238, 2005.

- BUSATH, D.; SZABO, G. Gramicidin forms multi-state rectifying channels. **Nature**, v. 294, n. 5839, p. 371, 1981.
- BUSATH, D. D.; ANDERSEN, O. S.; KOEPPE II, R. E. On the conductance heterogeneity in membrane channels formed by gramicidin A. A cooperative study. **Biophysical Journal**, v. 51, n. 1, p. 79-88, 1987.
- CARNEY, R.P. et al. Electrical method to quantify nanoparticle interaction with lipid bilayers. **ACS Nano**, v. 7, n. 2, p. 932-942, 2013.
- CASTIGLIONI, P.; DI RIENZO, M. How the threshold “r” influences approximate entropy analysis of heart-rate variability. In: **Computers in Cardiology, 2008**. IEEE, 2008. p. 561-564.
- CHAUDHURI, A. et al. Importance of indole N H hydrogen bonding in the organization and dynamics of gramicidin channels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 1, p. 419-428, 2014.
- CHAUDHURI, A.; CHATTOPADHYAY, A. Molecular Anatomy of an Ion Channel Explored Utilizing Fluorescence Spectroscopy. In: **Reviews in Fluorescence 2015**. Springer International Publishing, 2016. p. 353-367.
- CHEN, C-C.; CHANG, H-C. Predicting dengue outbreaks using approximate entropy algorithm and pattern recognition. **Journal of Infection**, v. 67, n. 1, p. 65-71, 2013.
- CHEN, D.; WEI, G. W. Quantum dynamics in continuum for proton transport—Generalized correlation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 13, p. 04B606, 2012.
- CHOI, B. M. et al. Approximate entropy as the measurement of the electroencephalographic effect during sevoflurane induction. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 55, n. 4, p. 404-411, 2008.
- CIFU, A. S.; KOEPPE II, R. E., ANDERSEN, O.S. On the supramolecular organization of gramicidin channels. The elementary conducting unit is a dimer. **Biophysical Journal**, v. 61(1), p. 189–203, 1992.
- CHRISTENSEN, B. et al. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 14, p. 5072-5076, 1988.
- DAVID, J. M. et al. Gramicidin A induces metabolic dysfunction and energy depletion leading to cell death in renal cell carcinoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2013.
- DELIGNIÈRES, D. Correlation properties of (discrete) fractional Gaussian noise and fractional Brownian motion. **Mathematical Problems in Engineering**, v. 2015, 2015.
- DOKTOROVA, M. et al. Gramicidin Increases Lipid Flip-Flop in Symmetric and Asymmetric Lipid Vesicles. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 3, p. 198a-199a, 2018.
- DOYLE, D.A. Molecular insights into ion channel function. **Molecular membrane biology**, v. 21, n. 4, p. 221-225, 2004.
- ELLIOTT, J. R. et al. The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 735, n. 1, p. 95-103, 1983.

- EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 11-28, 1999.
- ESSEN, L.; KOERT, U. Ion-channel engineering. **Annual Reports Section "C"(Physical Chemistry)**, v. 104, p. 165-188, 2008.
- FEIGIN, A. M. et al. Properties of voltage-gated ion channels formed by syringomycin E in planar lipid bilayers. **The Journal of membrane biology**, v. 149, n. 1, p. 41-47, 1996.
- FERMINI, B. Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies In: B. Fermini; Priest, B. T. (Org.). Ion Channel: **Topics in Medicinal Chemistry**. Leipzig: Springer, 2008. v. 3. 171 p.
- FERNÁNDEZ-FALGUERAS, A. et al. Cardiac channelopathies and sudden death: recent clinical and genetic advances. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2017.
- GIRAITIS, L. et al. Rescaled variance and related tests for long memory in volatility and levels. **Journal of Econometrics**, v. 112, n. 2, p. 265-294, 2003.
- GIRSHMAN, J. et al. Gramicidin channels in phospholipid bilayers with unsaturated acyl chains. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 3, p. 1310-1319, 1997.
- GOLDBERGER A.L. et al., PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a New Research Resource for Complex Physiologic Signal. **Circulation**, v. 101, N. 23, p. e2015-e220, 2000.
- GOULIAN, M. et al. Gramicidin channel kinetics under tension. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 1, p. 328-337, 1998.
- GUO, L. et al. Epileptic seizure detection using multiwavelet transform based approximate entropy and artificial neural networks. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 193, n. 1, p. 156-163, 2010.
- GUTSMANN, T. et al. Protein reconstitution into freestanding planar lipid membranes for electrophysiological characterization. **Nature Protocols**, v. 10, n. 1, p. 188-198, 2015.
- HARTMAN, M. L. et al. Enhanced basal and disorderly growth hormone secretion distinguish acromegalic from normal pulsatile growth hormone release. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1277-1288, 1994.
- HERRELL, W. E.; HEILMAN, D. Experimental and clinical studies on gramicidin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 20, n. 5, p. 583-591, 1941.
- HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3 ed. Sunderland: Sinauer, 2001. p. 814.
- HLADKY, S. B.; HAYDON, D. A. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. **Nature**, v. 225, n. 5231, p. 451-453, 1970.
- HLADKY, S. B.; HAYDON, D. A. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A: I. Studies of the unit conductance channel. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 274, n. 2, p. 294-312, 1972.

- HO, K. K. L. et al. Predicting survival in heart failure case and control subjects by use of fully automated methods for deriving nonlinear and conventional indices of heart rate dynamics. **Circulation**, v. 96, n. 3, p. 842-848, 1997.
- HOLZINGER, A. et al. On applying approximate entropy to ECG signals for knowledge discovery on the example of big sensor data. **International Conference on Active Media Technology**. Springer, Berlin, p. 646-657, 2012.
- HOTCHKISS, R D.; DUBOS, R. J. Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil bacillus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 791-792, 1940.
- HU, K. et al. Effect of trends on detrended fluctuation analysis. **Physical Review E**, v. 64, n. 1, p. 011114, 2001.
- HUDETZ, A. G. et al. Propofol anesthesia reduces Lempel-Ziv complexity of spontaneous brain activity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 628, p. 132-135, 2016.
- KANTELHARDT, J. W. et al. Detecting long-range correlations with detrended fluctuation analysis. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 295, n. 3-4, p. 441-454, 2001.
- KELKAR, D.A.; CHATTOPADHYAY, A. The gramicidin ion channel: a model membrane protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 9, p. 2011-2025, 2007.
- KIM, J-B. Channelopathies. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 57, n. 1, p. 1-18, 2014.
- KLIPPENSTEIN, V. et al. Probing Ion Channel Structure and Function Using Light-Sensitive Amino Acids. **Trends in Biochemical Sciences**, 2018.
- KOLB, H-A.; BAMBERG, E. Influence of membrane thickness and ion concentration on the properties of the gramicidin A channel Autocorrelation, spectral power density, relaxation and single-channel studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 464, n. 1, p. 127-141, 1977.
- KUO, A. et al. Crystal structure of the potassium channel KirBac1. 1 in the closed state. **Science**, v. 300, n. 5627, p. 1922-1926, 2003.
- LAN, T.H. et al. Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. **Cell Biology International**, v. 32, n. 2, p. 247-252, 2008.
- LASCANO, A. M. et al. Seizures and Epilepsies due to Channelopathies and Neurotransmitter Receptor Dysfunction: A Parallel between Genetic and Immune Aspects. **Molecular Syndromology**, v. 7, n. 4, p. 197-209, 2016.
- LI, W; KANEKO, K. Long-range correlation and partial  $1/f\alpha$  spectrum in a noncoding DNA sequence. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 17, n. 7, p. 655, 1992.
- LIEBOVITCH, L. S. Ion Channel Kinetics. **Fractal Geometry in Biological Systems: An Analytical Approach**, p. 31, 1996.
- LIOU, J. et al. The antimicrobial activity of gramicidin A is associated with hydroxyl radical formation. **PloS One**, v. 10, n. 1, p. e0117065, 2015.
- LIPSCOMBE, D; WYLLIE, D. J. A. Editorial Overview: Ion Channels (2018). **Current Opinion in Physiology**, v. 2, p. iv-vii, 2018.

LIU, C. et al. Comparison of different threshold values  $r$  for approximate entropy: application to investigate the heart rate variability between heart failure and healthy control groups. **Physiological Measurement**, v. 32, n. 2, p. 167, 2010.

LO, A.W. Long-term memory in stock market prices. **National Bureau of Economic Research**, 1989.

LOUDON, K. W.; FRY, A. C. The renal channelopathies. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 441-458, 2014.

LUNDBÆK, J. A. et al. Membrane stiffness and channel function. **Biochemistry**, v. 35, n. 12, p. 3825-3830, 1996

LUNDBÆK, J. A.; ANDERSEN, O. S. Spring constants for channel-induced lipid bilayer deformations estimates using gramicidin channels. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 2, p. 889-895, 1999.

LUNDBÆK, J. A. et al. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. 44, p. 373-395, 2010

LUO, J. et al. Inhibiting and Reversing Amyloid- $\beta$  Peptide (1–40) fibril formation with gramicidin S and engineered analogues. **Chemistry-A European Journal**, v. 19, n. 51, p. 17338-17348, 2013.

MONTAL, M.; MUELLER, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 12, p. 3561-3566, 1972.

MERCIK, S.; WERON, K.; SIWY, Z. Statistical analysis of ionic current fluctuations in membrane channels. **Physical Review E**, v. 60, n. 6, p. 7343, 1999.

MAZET, J. L.; ANDERSEN, O. S.; KOEPPE II, R. E. Single-channel studies on linear gramicidins with altered amino acid sequences. A comparison of phenylalanine, tryptophane, and tyrosine substitutions at positions 1 and 11. **Biophysical Journal**, v. 45, n. 1, p. 263-276, 1984.

NEHER, E.; EIBL, H. The influence of phospholipid polar groups on gramicidin channels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 464, n. 1, p. 37-44, 1977.

NOGUEIRA, R. A. et al. Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 28, n. 4, p. 491-496, 1995.

O'CONNELL, A. M. et al. Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: transmembrane monomer association. **Science**, v. 250. p. 1256-1259, 1990.

OIKI, S.; KOEPPE, R.E.; ANDERSEN, O.S. Voltage-dependent gating of an asymmetric gramicidin channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 6, p. 2121-2125, 1995.

OLIVEIRA, R.A. et al. Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 364, p. 13-22, 2006.

POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C. **E Biologia Celular**. Rio de Janeiro. Elsevier, 2006.

- PENG, C.-K. et al. Mosaic organization of DNA nucleotides. **Physical Review e**, v. 49, n. 2, p. 1685, 1994.
- PENG, C.K. et al. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, v. 5, n. 1, p. 82-87, 1995.
- PINCUS, S. M. Approximate entropy as a measure of system complexity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 6, p. 2297-2301, 1991.
- PINCUS, S. M.; GOLDBERGER, A. L. Physiological time-series analysis: what does regularity quantify?. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 266, n. 4, p. H1643-H1656, 1994.
- PINCUS, S.. Approximate entropy (ApEn) as a complexity measure. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, v. 5, n. 1, p. 110-117, 1995.
- RICHMAN, J. S.; MOORMAN, J. R. Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. **Entropy**, v. 278, p. H2039-H2049, 2000.
- RING, A. Gramicidin channel-induced lipid membrane deformation energy: influence of chain length and boundary conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1278, n. 2, p. 147-159, 1996.
- RING, A.; SANDBLOM, J. O. H. N. Modulation of gramicidin A open channel lifetime by ion occupancy. **Biophysical journal**, v. 53, n. 4, p. 549-559, 1988.
- ROUX, B. Computational studies of the gramicidin channel. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 6, p. 366-375, 2002.
- RYU, H. et al. Investigation of ion channel activities of gramicidin a in the presence of ionic liquids using model cell membranes. **Scientific reports**, v. 5, p. 11935, 2015.
- RUSSELL, E. W. et al. Single-channel studies on linear gramicidins with altered amino acid side chains. Effects of altering the polarity of the side chain at position 1 in gramicidin A. **Biophysical Journal**, v. 49, n. 3, p. 673-686, 1986.
- SANDBLOM, J.; GALVANOVSIS, J.; JILDEROS, B. Voltage-dependent formation of gramicidin channels in lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 2, p. 827-837, 2001.
- SARGES, R.; WITKOP, B. Gramicidin AV The structure of valine-and isoleucine-gramicidin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 9, p. 2011-2020, 1965.
- SIWY, Z. et al. Application of dwell-time series in studies of long-range correlation in single channel ion transport: analysis of ion current through a big conductance locust potassium channel. **Physica A**, v. 297, p. 79-96, 2001.
- SPAAR, A. et al. Conformation of peptides in lipid membranes studied by x-ray grazing incidence scattering. **Biophysical Journal**, v. 87, n. 1, p. 396-407, 2004.
- STANLEY, H. E. et al. Statistical physics and physiology: monofractal and multifractal approaches. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 270, n. 1, p. 309-324, 1999.

- STRÄSSLE, M. et al. Radiolysis and photolysis of ion channels formed by analogues of gramicidin A with a varying number of tryptophan residues. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 980, n. 3, p. 305-314, 1989.
- SU, Z. et al. Gramicidin A ion channel formation in model phospholipid bilayers tethered to gold (111) electrode surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 243, p. 364-373, 2017.
- SYCHEV, S. V. et al. Effective lipid-detergent system for study of membrane active peptides in fluid liposomes. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 2, p. 98-105, 2016.
- TRIGGLE, D. J. et al. **Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets**, v.29. Wiley-VCH, 2006.
- URRY, D. W. The Gramicidin a transmembrane channel: a proposed  $\pi_{(L,D)}$  helix. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 68, n. 3, p. 672-676, 1971.
- WADSTEN, C. J. et al. A randomized clinical trial of two topical preparations (framycitin/gramicidin and oxytetracycline/hydrocortisone with polymyxin B) in the treatment of external otitis. **Archives of Oto-rhino-laryngology**, v. 242, n. 2, p. 135-139, 1985.
- VARANDA, W. A. et al. Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. **Journal of Theoretical Biology**, v. 206, n. 3, p. 343-353, 2000.
- VAZIRI, A.; PLENIO, M.B. Quantum coherence in ion channels: resonances, transport and verification. **New Journal of Physics**, v. 12, n. 8, p. 085001, 2010.
- WALLACE, B. A. Gramicidin channels and pores. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 127-157, 1990.
- WALLACE, B. A. Common structural features in gramicidin and other ion channels. **Bioessays**, v. 22, n. 3, p. 227-234, 2000.
- WAWRZKIEWICZ, A. et al. On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. **European Biophysics Journal**, v. 41, n. 6, p. 505-526, 2012.
- WU, Y et al. Quantification of knee vibroarthrographic signal irregularity associated with patellofemoral joint cartilage pathology based on entropy and envelope amplitude measures. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 130, p. 1-12, 2016.
- WU, Y. et al. Measuring signal fluctuations in gait rhythm time series of patients with Parkinson's disease using entropy parameters. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 31, p. 265-271, 2017.

## **6. Capítulo Único**

Análise da correlação de longo alcance na cinética de canais iônicos formados pela gramicidina A em membranas artificiais

Manuscrito para ser enviado para a revista European Biophysics Journal  
<[http://www.springer.com/life+sciences/biochemistry+%26+biophysics/journal/249?detailsPage=pltci\\_1060318](http://www.springer.com/life+sciences/biochemistry+%26+biophysics/journal/249?detailsPage=pltci_1060318)>

## **Análise da correlação de longo alcance na cinética de canais iônicos formados pela gramicidina A em membranas lipídicas artificiais**

SILVA, M. P<sup>1.</sup>, RODRIGUES<sup>2</sup>, C.G., AGUIAR, J. P<sup>2.</sup>, NOGUEIRA, R.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes do Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

\*Corresponding author: ran.pe@terra.com.br

Contact: (81) 3320-6073

### Resumo

O processo cinético dos canais iônicos tem sido descrito como um processo aleatório, entretanto alguns trabalhos têm observado a presença de memória, ou seja, correlação de longo alcance na cinética de canais complexos como os canais de potássio e sódio. A gramicidina A (gA) é um peptídeo linear com ação antibiótica e que possui capacidade de formar canais iônicos em membranas lipídicas. A gramicidina é um dos canais iônicos mais bem estudados, porém não foi encontrado estudos com o emprego de métodos matemáticos de dinâmica não-linear na análise da existência de memória nesses canais. Os canais de gA têm sido utilizados como modelo experimental para estudo dos canais iônicos, sendo assim uma maior compreensão das propriedades do comportamento cinético desses canais possibilita um maior entendimento dos mecanismos biofísicos que regem a transição entre os diferentes estados de condutância desses canais. Nesse contexto empregamos a análise de flutuação destendenciada (DFA) e a entropia aproximada (ApEn) na investigação da existência de memória e complexidade do processo cinético dos canais de gA, respectivamente. As correntes iônicas unitárias foram registradas através da técnica de bicamada lipídica plana. Todos os experimentos foram realizados nas seguintes condições: bicamadas planas de diftanoil-fosfatidilcolina, solução de NaCl 1 M não tamponada, pH de  $6,3 \pm 0,2$ ; potencial transmembrana de 200 mV e temperatura de 25°C. O valor da condutância do canal de gA foi de  $15,5 \pm 0,05$  pS. As constantes de tempo para o canal de gA para o estado aberto e no estado fechado foram  $\tau_a = 3,1866 \pm 0,1752$  s e  $\tau_f = 12,0743 \pm 0,8658$  s, respectivamente. Em função do número de eventos e do percentual de deleção de regiões das séries temporais observou-se diferentes comportamentos na cinética dos canais de gA: correlação antipersistente ( $\alpha_{DFA} = 0,4$  e  $0,44$ ), correlação persistente ( $\alpha_{DFA} = 0,63$ ) e presença de comportamento aleatório ( $\alpha_{DFA} = 0,53 \pm 0,2$ ). No entanto, foi observado na maioria das séries analisadas que a cinética desses canais tende a apresentar um comportamento aleatório. Os resultados das análises da ApEn mostraram que as séries que possuem comportamento aleatório apresentaram maior complexidade quando comparados as séries que apresentam memória. Os resultados obtidos permitem concluir que o processo cinético do canal de gA possui de elevada complexidade e ausência de memória, comportamento divergente daqueles encontrados em muitos canais iônicos estruturalmente complexos, como alguns canais de sódio e potássio, que possuem um comportamento determinístico.

Palavras-Chave: Correlação de longo alcance; Gramicidina A; Análise de Flutuações Destendenciadas; Entropia; Bicamada Lipídica Plana.

## Introdução

A gramicidina A é um peptídeo linear produzido pelo *Bacillus brevis* formado por uma sequência de 15 aminoácidos (Sarges e Witcop 1965; Chaudhuri e Chattopadhyay 2016) e pertence a uma família de peptídeos capazes de formar canais iônicos, com um único segmento em bicamadas lipídicas (Sawyer et al. 1990; Andersen e Koeppe II 1992; Wallace 2000), sendo seletivos a cátions monovalentes (Hladky e Haydon, 1972; Brownd et al. 2018).

A formação dos canais de gA ocorre através de um processo de dimerização, com a formação de ligações de hidrogênio da região formil-NH terminal de cada monômero que forma o canal de gA, originados a partir dos lados opostos da bicamada lipídica (O'Connell et al. 1990; Lum et al. 2017). Sua estrutura final na bicamada lipídica final é constituída de um dímero helicoidal de cadeia simples com rotação para a direita. Tais canais, quando formados na membrana celular, impedem a célula de manter seu potencial eletroquímico, que é o mecanismo responsável por sua ação antibiótica (Urry 1971; Andersen e Koeppe II 1992; Oiki et al. 1995; Liou et al. 2015).

Diferente dos canais iônicos formados por subunidades protéicas, a cinética dos canais de gA não ocorre através de mudanças conformacionais no interior da proteína. As transições entre os estados abertos e fechados nos canais de gA ocorrem através do processo de associação e dissociação dos seus monômeros, que estão em movimento de difusão lateral em cada monocamada (Harms et al. 2003; Lum et al. 2017). A presença dos monômeros dissociados não permitem fluxo de corrente iônica, sendo interpretado como o estado fechado, já o estado aberto ocorre quando os monômeros se associam através da bicamada, permitindo o fluxo iônico (Strässle et al. 1989; Harms et al. 2003).

A cinética dos canais iônicos possui um comportamento randômico, não existindo correlação entre os tempos em que o canal permanece aberto e fechado (Ashcrof 2000). No entanto, alguns autores têm mostrado que a sequência dos tempos de permanência do canal nos estados abertos e fechados é um processo com

memória (correlação de longo alcance) (Nogueira et al. 1995; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Wawrzkievicz et al. 2012).

O canal de gA apresenta um comportamento cinético muito mais simples que outros canais de membranas, tais como os do tipo BK e o canal de potássio, nos quais a presença de memória foi observada (Lan et al. 2008; Varanda et al. 2000). Assim é instigante investigar se no canal de gA a memória também está presente ou se o processo é randômico, em decorrência do canal ser formado a partir do encontro aleatório de dois monômeros de gramicidina.

Métodos matemáticos como Análise de Hurst, Função de autocorrelação, DFA e Complexidade de Lempel-Ziv têm sido utilizados para análise de correlação de longo alcance em vários sistemas biológicos (Nogueira et al. 1995; Siwy et al. 2001; Hudetz et al. 2016), inclusive na análise da cinética de canais iônicos.

Neste trabalho, dois métodos de dinâmica não linear serão usados para análise da cinética do canal de gA. São eles o DFA e a entropia aproximada (ApEn). O DFA, um método proposto por PENG (1994), que detecta a presença ou ausência de correlação de longo alcance (memória) em séries temporais para séries não paramétricas. A *ApEn*, proposto por Pincus (1991), é um método que permite quantificar a imprevisibilidade das flutuações de uma série temporal.

O objetivo do presente estudo é empregar o método da entropia aproximada e do DFA na investigação da existência de complexidade e correlação de longo alcance no processo cinético de abertura e fechamento dos canais iônicos formados pela gramicidina A inseridos em bicamadas lipídicas planas artificiais.

## **Materiais e Métodos**

### **Construção das bicamadas lipídicas planas**

As bicamadas lipídicas planas (BLP's) utilizadas nos experimentos foram formadas pela técnica de Montal e Mueller (1972). Os experimentos foram realizados com soluções eletrolítica não tamponadas de NaCl 1 M. A temperatura durante a aquisição dos registros das correntes iônicas foi de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . As BLP's foram formadas pela aposição de um filme de difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC) em hexano (10% p/v) em um orifício (diâmetro  $\cong 60 \mu\text{m}$ ) presente em uma partição de Politetrafluoretileno (Teflon<sup>®</sup>) que subdivide uma câmara de Teflon<sup>®</sup> em dois compartimentos, cada um

com volume final igual a 1,2 ml de solução eletrolítica. As correntes iônicas dos canais formados por gA foram obtidas em potencial de membrana igual a 200 mV. A gramicidina A (Sigma-Aldrich, USA) foi diluída em etanol em concentração de 609 pM. Foi adicionado uma alíquota dessa solução estoque de gA em ambos os compartimentos da câmara, resultando uma concentração final na câmara de 0,25-0,3 pM.

### **Aquisição dos dados**

A obtenção dos registros das correntes iônicas de canais unitários foi realizada com a aplicação de um potencial de 200mV em um sistema de aquisição e monitoramento das correntes iônicas. Esse sistema consistiu basicamente em um gerador de funções (Minipa, modelo MFG-4201A), um amplificador de patch clamp (Molecular Devices, USA) e uma placa conversora analógico-digital (Digidata 1440, Molecular Devices, USA) conectado a um microcomputador IBM PC, o qual possui o Programa pClamp 10.5 (Molecular Devices, USA).

Esse sistema de aquisição dos registros das correntes iônicas era conectado a câmara de Teflon<sup>®</sup> através de eletrodos de Ag/AgCl em pontes salinas do tipo Ágar-KCl 3M (3% p/v). A saída do amplificador estava conectada a um microcomputador onde foram executados programas computacionais que permitem a aquisição e monitoramento dos registros de correntes.

A análise dos registros das correntes iônicas foi realizada com o software pClamp 10.5 e Sview (v. 4.09, USA). A aquisição das séries temporais foi realizada no programa pClamp 10.5 através da função *single-channel search*. O pCLAMP 10.5 permitiu a idealização dos registros de corrente iônica e determinação dos tempos de permanência nos estados aberto e fechado dos canais individuais. A obtenção dos valores de condutância de cada abertura dos canais de gA foram obtidos no programa Sview. O cálculo do valor da condutância média foi realizado por um ajuste do tipo Gaussiano a um histograma obtido a partir de 711 valores individuais de condutância.

As constantes de tempos para os tempos de permanência do em cada estado de condutância foram obtidos através do ajuste exponencial do histograma de distribuição dos tempos do canal nos estados abertos e fechados no programa pClamp 10.5.

Regiões dos registros das correntes iônicas foram deletados durante a obtenção das séries temporais, devido ao fato de se tratar de ruídos externos ao sinal ou a presença de eventos com condutância superior à dois desvios padrão acima da média, valor indicativo de presença de mais de um canal inseridos simultaneamente na bicamada lipídica, de modo que as séries apresentaram uma descontinuidade nos dados.

A escolha dos eventos de abertura dos canais iônicos considerados na obtenção das séries temporais foi baseada no valor da condutância média dos canais de  $g_A$ . Considerou-se estado aberto, apenas aqueles eventos em que a variação do valor de condutância foi até  $\pm 2 \times$  o desvio padrão.

Os critérios utilizados na seleção das series temporais utilizadas nas análises dos dados foram a quantidade de pontos das séries (N), o percentual de deleções de segmentos da série temporal durante o processamento dos dados, necessários para obtenção de uma série composta apenas de canais unitários; valor do  $R^2$  obtidos no ajuste linear no gráfico  $\log f(n) \times \log n$  utilizados para obtenção do  $\alpha_{DFA}$ .

### 2.3 Obtenção das séries temporais simuladas

Foram geradas 30 séries temporais simuladas (10 séries para cada valor de  $\alpha_{DFA}$ ),  $N=500$ , cujo valor do  $\alpha_{DFA}$  era conhecido: 0,2, 0,5 e 0,8. Tais séries foram criadas no Matlab R2009a, utilizando o algoritmo de simulação de ruído gaussiano fracionário (fGn), disponível no site da *MathWorks* (<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/19797-simulation-of-fractional-gaussian-noise--exact-?>).

O modelo do fGn foi inicialmente introduzido por Mandelbrot e Van Ness e permite a criação de séries numéricas com a presença de correlação de longo alcance (Delignières 2015). As séries simuladas foram utilizadas como modelo teórico para as análises dos dados experimentais da entropia aproximada.

### **Análise de Flutuação Destendenciadas (DFA)**

A Análise de Flutuações Destendenciadas foi realizada através do algoritmo disponível na plataforma Physionet (Goldberger et al. 2000). Esse método tem a capacidade de detectar a presença de correlação de longo alcance nas séries

temporais obtidas através do tempo de permanência dos canais de gA em cada estado de condutância.

O método DFA consiste basicamente em, a partir da série temporal original integrada, dividir tal série em N segmentos, performar um ajuste linear (que representam a tendência local) em cada segmento através do método dos mínimos quadrados de modo que é possível destendenciar a série temporal. Posteriormente, calcula-se as flutuações  $F(n)$  para cada intervalo de tamanho n da série calculando um  $F(n)$  para cada segmento através da equação abaixo:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [y(k) - y_n(k)]^2}$$

O cálculo de  $F(n)$  é repetido várias vezes para valores crescentes de n. Normalmente o valor de  $F(n)$  aumenta com o aumento do tamanho de n. O coeficiente angular da reta de regressão linear do gráfico duplo-log de  $F(n) \times n$ ,  $\alpha_{DFA}$  nos fornece informações sobre a presença ou ausência de memória no comportamento da série dos tempos de permanência do canal iônicos nos estados abertos e fechados.

Valores de  $\alpha_{DFA} = 0,5$  indicam comportamento aleatório da série. Valores entre 0 e 0,5 indicam a presença de memória antipersistente, ou seja, um intervalo de tempo de permanência longo do canal no estado aberto, por exemplo, tem uma maior probabilidade de ser seguido por um intervalo curto e o mesmo serve para o contrário. Valores para  $\alpha_{DFA}$  entre 0,5 e 1,0 indicam a presença de memória persistente, ou seja, existe maior probabilidade de um tempo de permanência curto ser seguido por outro curto.

### **Entropia aproximada (ApEn)**

Para análise da complexidade do processo cinético da gA foi utilizado o algoritmo para a análises de *ApEn* disponível no site Physionet (<https://www.physionet.org/physiotools/ApEn/>). As análises foram realizadas no programa Matlab®.

Para a análise da entropia aproximada ApEn ( $m, r, N$ ) de uma determinada série temporal de tamanho  $N$  é necessário definir inicialmente dois parâmetros de entrada: o valor de  $i$  e  $t$  (Pincus 1995). O parâmetro  $m$  é um valor inteiro positivo que estipula o tamanho da janela para comparação de similaridade e o  $r$  é o limiar de tolerância para aceitação dessa similaridade (Pincus e Goldberger 1994; Wu et al. 2016). De acordo com Pincus (1995) tipicamente são utilizadas séries com  $N$  entre 75 e 5000 pontos,  $m = 1$  ou  $2$  e  $r$  entre  $0,1$  e  $0,25$  do desvio padrão dos dados da série temporal possui boa validade estatística. Nesse trabalho utilizamos nas análises de entropia aproximada os valores  $m = 2$  e  $r = 0,25$ .

Determinados os parâmetros de entrada, o algoritmo compara a distância entre subgrupos  $m$  de dados pertencentes ao sinal, aceitando que tais subgrupos são semelhantes se a distância entre eles for menor que  $r$ .

Em resumo, o cálculo de ApEn ( $m, r, N$ ) de cada série temporal  $\{x(i)\}$  de tamanho  $N$ , e os valores de  $m$  e  $r$  determinados foi obtido por definir uma vetores  $x(1), x(2), \dots, x(N - m + 1)$ , onde cada vetor  $x^i(i)=[u(n), u(n + 1), \dots, u(i + m - 1)]$  consistem de  $m$  valores consecutivos  $x$  pertencentes ao sinal e serve com um padrão para comparação com os outros vetores da série temporal analisada. Posteriormente, calcular a distância máxima,  $d[x(i), x(j)], 1 \leq j, k \leq N - m + 1$ , entre os componentes escalares que formam os vetores  $u^i(j)$  e  $u^i(k)$  através da equação:

$$d[x(i), x(j)] = \max_{k=1,2,\dots,m} (|u(i+k-1) - u(j+k-1)|)$$

Essa sequência de vetores  $(i), x(i + 1), \dots, x(i + m - 1)$  foi utilizada para calcular o  $C_i^m(r)$  para cada vetor, onde o  $C_i^m(r)$  que denota a probabilidade de  $k$  satisfazer a condição de que a distância  $d[x(i), x(j)]$  é menor do que  $r$ , indicando a frequência de similaridade entre o vetor  $x(i)$  de comprimento de janela  $m$  e um determinado padrão  $x(i)$  dentro do limiar de tolerância  $r$ . Obtido os valores de  $C_i^m(r)$  para cada vetor, calcula-se a média dos logaritmos naturais de  $C_i^m(r)$ ,  $\emptyset^m(r)$  e obtêm-se o valor da entropia aproximada para séries finitas através da equação:

$$\begin{aligned} ApEn(m, r, N) &= |\emptyset^m(r) - \emptyset^{m+1}(r)| \\ &= [\sum_{i=1}^{N-m+1} \ln C_i^m(r) / N - m + 1] - [\sum_{i=1}^{N-m} \ln C_i^{m+1}(r) / N - 1] \end{aligned}$$

Elevados valores para  $ApEn(m, r, N)$  indicam que a série temporal apresenta alto grau de regularidade e valores elevados indicam uma alta complexidade (irregularidade ou aleatoriedade) em um dado sinal (WU et al., 2016; WU et al., 2017). Valores de  $ApEn$  próximas de 0 indicam a presença de padrões que se repetem ao longo da série e inversamente, valores elevados de  $ApEn$  indicam um comportamento randômico (Pincus e Goldberger 1994).

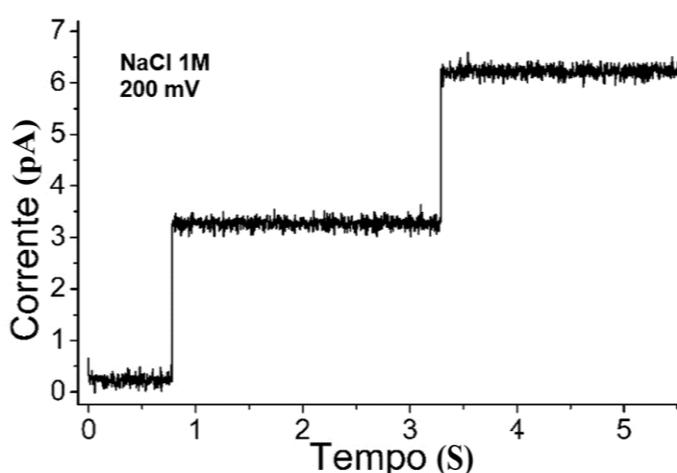
### Análises Estatísticas

Para a comparação entre os grupos de valores da  $ApEn$  das séries simuladas foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* com nível de significância de 5% e o *post-hoc* de *Dunn*.

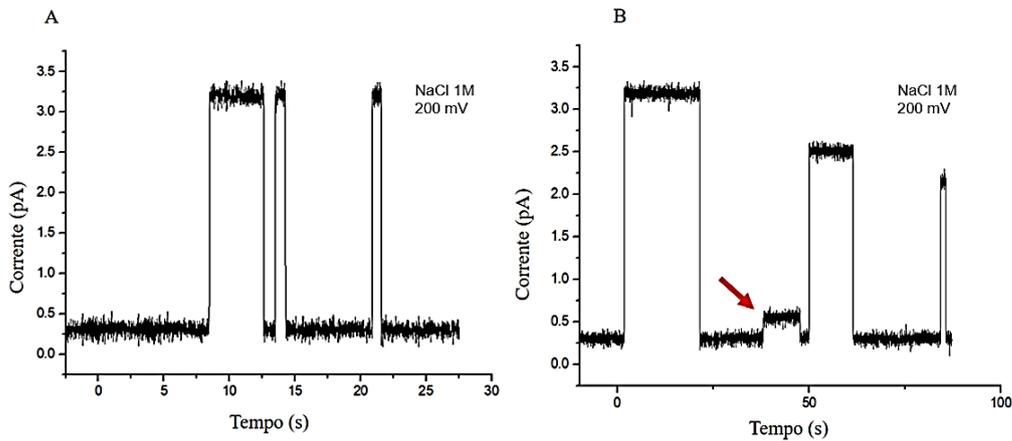
### Resultados e Discussão

#### Registros das correntes iônicas

A Figura 1 e 2 representam os registros de correntes iônicas através do canal de gA em bicamada lipídica de DPhPC, submetido a um potencial transmembrana de 200 mV. Os traços da corrente mostram o comportamento típico da condutância no canal de gA, onde pode-se observar saltos discretos na corrente iônica, onde cada salto é indica da formação de um canal de gA na bicamada lipídica.

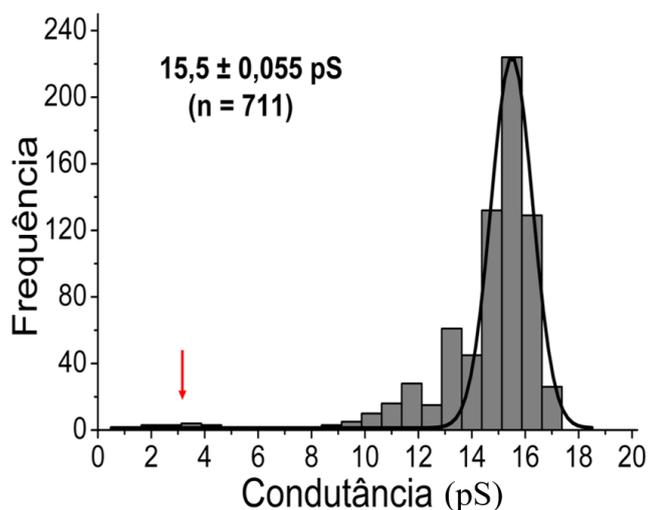


**Fig. 1** Registro da corrente iônica através de canais de gA em bicamada plana de DPhPC/hexano. Cada salto discreto representa a formação de um canal.



**Fig. 2** Cinética de canais iônicos formados por gA em bicamada plana de DPhPC/Hexano com potencial transmembrana aplicado de 200 mV. 2A: traçado característico do comportamento cinético da gA; 2B: Diferentes níveis de condutância observados em alguns registros (Seta: mini canais).

Os canais de gA apresentaram uma condutância média de  $15,54 \pm 0,05$  pS e em todos os registros mais de 90% dos eventos de canais unitários adequam-se dentro uma distribuição Gaussiana (Figura 3), sendo ajustados por uma única exponencial (Figura 4). Os valores da condutância para os canais de gA observados estão de acordo com a condutância características desses canais para as mesmas condições experimentais observados em outros estudos (Sawyer et al. 1990; Williams et al. 1992).



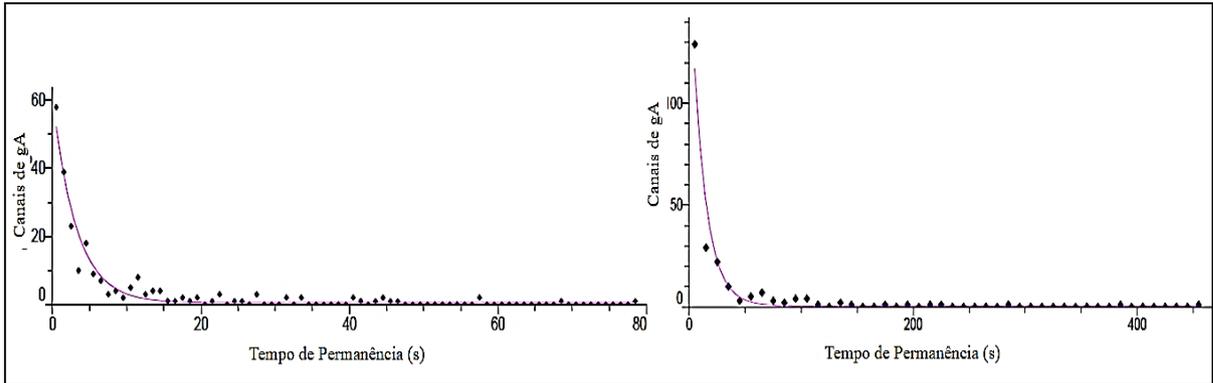
**Fig. 3** Histograma da condutância de canais iônicos formados por gA em bicamada artificial plana de DPhPC em Hexano. Seta: mini canais.

Os canais de gA apresentaram uma condutância padrão com valores próximos da média, no entanto foi observado também a presença dos chamados mini canais, que possuíam uma condutância média de 3.3583 pS ( $\pm 1,2559$ ) (2B). A presença de tais mini canais no comportamento cinético de gA tem sido reportado por muitos autores. A condutância dos canais de gA não é completamente homogênea, de acordo com Sawyer et al. (1990), 95% dos canais formados por gA possuem uma condutância padrão, pertencentes a distribuição Gaussiana do histograma de condutâncias, no entanto existe a presença de em torno de 5% dos eventos apresentando condutâncias não pertencentes a essa distribuição.

A ocorrência dessas correntes iônicas com valores de condutância muito inferior à média, a pesar de se tratar de eventos estáveis e com razoável tempo de vida, não reflete uma característica intrínseca dos canais formados por esse peptídeo, refletindo sim um comportamento modulado pelas condições experimentais, podendo estar relacionadas com três diferentes fatores: o solvente utilizado para diluição da gA, como a idade da solução eletrolítica, a amostra do lipídio utilizado, bem como a presença de detergentes, que mesmo em baixas concentrações, podem alterar o comportamento dos canais de gA (Busath et al. 1987; Sawyer et al. 1989). Busath e Szabo (1981), mostraram que mesmo se tratando de gA purificada, a presença desses canais com níveis de condutância muito abaixo da média (mini canais) pode ser observado com uma frequência de 30 a 50%. Com base nessas informações apenas eventos que estavam dentro da distribuição Gaussiana principal foram considerados nas nossas análises.

As constantes de tempo para o canal de gA obtidos através do ajuste exponencial da distribuição dos tempos estado aberto e no estado fechado (Fig. 4) foram  $\tau_a = 3.1866 \pm 0,1752$  s e  $\tau_f = 12,0743 \pm 0.8658$  s, respectivamente. Os dados foram ajustados por uma exponencial única:

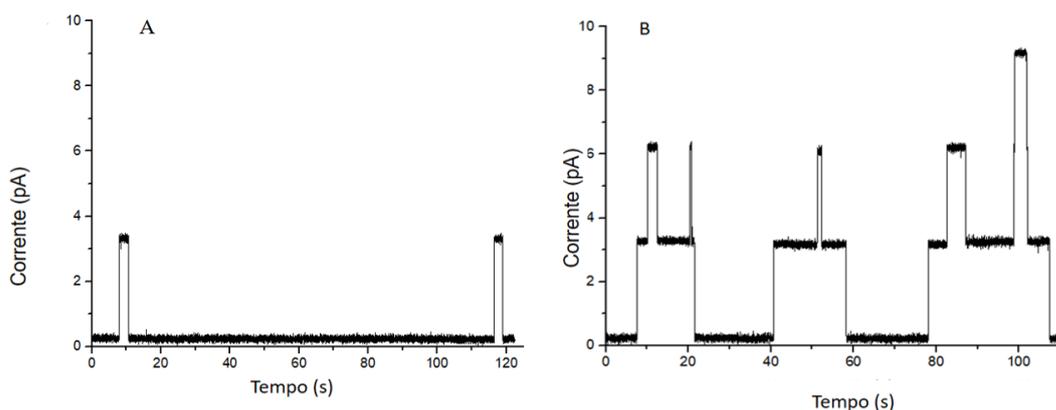
$$f(x) = A_i e^{-t/\tau}$$



**Fig. 4** Distribuição dos tempos de permanência no estado aberto (esquerda) e no estado fechado (direita) dos canais de gA em bicamada lipídica de DPhPC em hexano. Os pontos representam o ponto médio dos *bins* do histograma de distribuição e a linha em vermelho representa o ajuste exponencial,  $f(x) = A_i e^{-t/\tau}$ .

Para obtenção das séries temporais e posterior análise de memória na cinética dos canais iônicos de gA é necessário o registro de corrente com apenas um canal unitário transitando entre os estados abertos e fechados (Figura 5A). Baixas concentrações de gA possibilitam a obtenção desses registros, no entanto nessa condição a transição entre os estados é muito lenta, gerando registros com poucas transições entre os estados e consequentemente uma série temporal com baixa quantidade de pontos transições cinéticas, situação não ideal para análise de correlação de longo alcance.

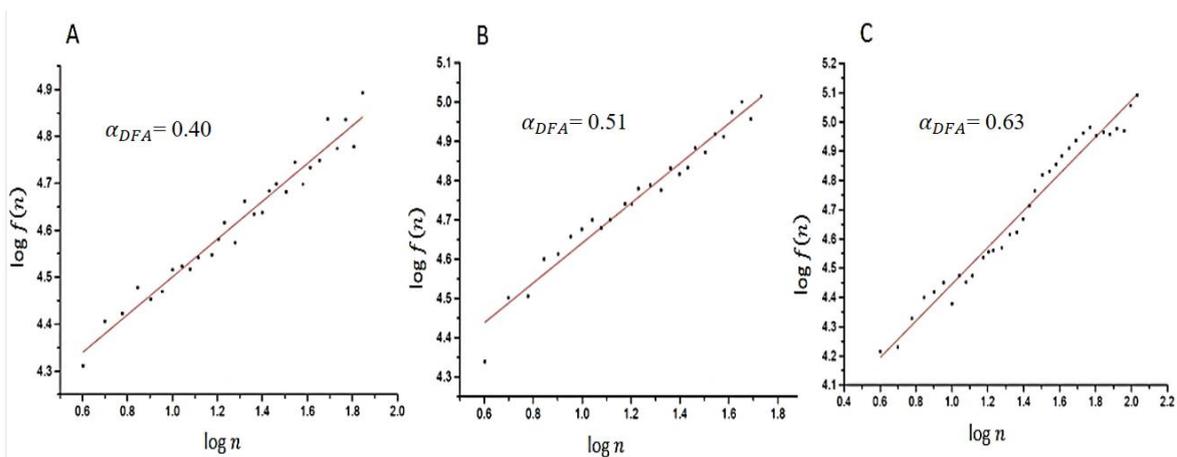
Por outro lado, experimentos com maior concentração de gA apresentaram uma transição mais rápida entre os estados abertos e fechados desses canais, e consequentemente um maior número de eventos, gerando séries temporais com N elevado. No entanto apresentam também um aumento da presença de mais de um canal no estado aberto simultaneamente na bicamada lipídica (Figura 5B). Eventos desse tipo não permite a obtenção dos tempos de permanência de cada um dos canais nos diferentes estados de condutância, dado necessário para a geração das séries temporais. Mesmo utilizando a concentração mínima de gA (para as nossas condições experimentais) para a obtenção de registros de canais unitário, os registros apresentaram eventos semelhantes aos observados na figura 5B, mas em menor quantidade, de modo que durante a obtenção das séries temporais parte do sinal foi deletado gerando uma descontinuidade nas séries temporais.



**Fig. 5** Cinética de canais iônicos formados por gA em bicamada artificial plana de DPhPC/Hexano com diferentes concentrações de gA. 5A: Baixa concentração de gA; 5B: Elevada concentração de gA.

### Análise de Flutuação Destendenciada (DFA)

A Figura 6 mostra os gráficos  $\log f(n) \times \log n$  que correspondem as três categorias de correlação de longo alcance observados nos resultados das análises com o método DFA.



**Fig. 6** Gráficos  $\log f(n) \times \log n$  de três séries temporais com os tempos de permanência de gA nos estados abertos e fechados. 6A: Série com  $\alpha_{DFA}=0.40$ ; 6B: Série com  $\alpha_{DFA}=0.51$ ; 6A: Série com  $\alpha_{DFA}=0.63$

A Tabela 1 apresenta os valores do  $\alpha_{DFA}$  obtidos para os tempos de permanência do canal de gA nos estados abertos e fechados.

Tabela 1: Valores do  $\alpha_{DFA}$  para as sete séries obtidas a partir dos registros experimentais das correntes iônicas através de canais formados por gA em bicamadas de DPhPC

| Série temporal | Número de Pontos | Perda de pontos (%) | $\alpha_{DFA}$ |
|----------------|------------------|---------------------|----------------|
| 1              | 458              | 11                  | 0.63           |
| 2              | 295              | 15                  | 0.40           |
| 3              | 171              | 28                  | 0.55           |
| 4              | 231              | 6,5                 | 0.51           |
| 5              | 353              | 19                  | 0.52           |
| 6              | 883              | 8                   | 0.53           |
| 7              | 174              | 4,4                 | 0.44           |

Os resultados obtidos através da análise com o método DFA mostra tanto registros com a presença de correlação de longo alcance persistente (Série 1) quanto a presença de memória antipersistente (Séries 2 e 7). No entanto a maioria dos registros apresenta um comportamento aleatório (Séries 3, 4, 5 e 6),  $\alpha_{DFA}$  médio =  $0,53 \pm 0,02$ .

A ausência de memória no comportamento cinético dos canais iônicos de gA, observado nos nossos resultados, são diferentes daqueles encontrados para canais iônicos estruturalmente mais complexos, formados por subunidades proteicas como os canais de potássio e os canais BK (Nogueira *et al.* 1995; Varanda *et al.* 2000; Siwy *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2006; Wawrzkievicz *et al.* 2012). De acordo com Wawrzkievicz *et al.* (2012) a memória pode ser originada no efeito de mudanças na espessura da bicamada lipídica sobre o *gate* do canal iônico. Se de fato a origem da memória está nessa relação membrana/*gate*, nossos resultados através do método DFA podem ser um indicativo de que o efeito memória aparece apenas em canais iônicos mais complexos e que apresentem um mecanismo de *gating*, o que não ocorre nos canais iônicos formados por gA, de acordo com o modelo cinético aceito atualmente para esses canais.

A presença de correlação de longo alcance em duas das séries analisadas pode ter sido consequência de fatores externos: presença de uma descontinuidade nas séries temporais gerada pela necessidade de deleções em determinadas partes do registro que apresentaram ruído ou mais de um canal no estado aberto simultaneamente e valor do N das séries temporais inferior a 500 eventos. De acordo com Bryce e Sprague (2012), séries muito curtas podem ter um efeito nos valores obtidos para o  $\alpha_{DFA}$  e de acordo com Chen *et al.* (2002) descontinuidade presentes nas séries temporais originadas a partir de deleções de regiões das séries temporais

também podem afetar o valor  $\alpha_{DFA}$  dependendo do quantidade e dos tamanhos das regiões eliminadas.

O modelo proposto para o processo cinético dos canais gA é o processo de abertura desses canais através da dimerização de monômeros de gramicidina presente nas monocamadas que formam a bicamada lipídica, sendo o estado dimerizado o estado que permite o fluxo iônico, denominado de estado aberto. Esses canais não se fecham através de um processo de *gating*, como ocorre em canais mais complexos, a interrupção do fluxo iônico ocorre quando tais monômeros se dissociam. De acordo com Harms et al. (2003) os monômeros dissociados estão em movimento difusional, aleatório, na bicamada lipídica, de modo que a associação dos monômeros no processo de dimerização durante a formação do canal de gA ocorre ao acaso e é dependente do tipo de lipídio presente na bicamada lipídica. Esse comportamento poderia explicar a presença da aleatoriedade na cinética dos canais de gA em bicamada de DPhPC.

A presença de memória curta na cinética de canais iônicos formados por gA, foi observado por Harms *et al.* (2003) analisando registros de canais unitários de gA em bicamadas formadas por diftanoilfosfatidiletanolamina/diftanoilfosfatidilcolina através de análises de função de autocorrelação. Eles demonstraram que os tempos de permanência nos estados abertos e fechados desses canais possuem dependência dentro de um curto período de tempo, memória de curto alcance. Os tempos de permanência desses canais nos estados abertos possui uma memória curta de 8 segundos, no entanto para os tempos de permanência nos estados fechados a memória foi ainda menor (0,4 segundos).

Em muitas condições experimentais, como a do presente trabalho, o período de tempo igual a 8 segundos muitas vezes não é tempo suficiente para que o canal transite entre os estados aberto e fechado, de modo que esse tipo de memória encontrada por Harms et al. (2003) se perderia antes do próximo estado aberto no comportamento dos canais de gA. De acordo com esses autores a dinâmica dos canais iônicos formados por gA pode ser significativamente diferente quando se muda a composição da bicamada lipídica, devido ao fato da transição entre os estados abertos e fechados estarem associados com o movimento de difusão numa bicamada particular.

## Análise da Entropia Aproximada

### Análise da Entropia Aproximada para as séries experimentais

Em consequência da presença de diferentes comportamentos das flutuações dos dados das séries experimentais, a análise de entropia das séries se mostrou pertinentes para entender se a complexidade, em outras palavras, se a aleatoriedade dos dados se mostrava menor naquelas séries onde o comportamento apresentava memória quando comparado com a séries que apresentaram um comportamento randômicos. A análise através do método *ApEn* foi escolhido devido ao fato desse método poder ser empregado, de acordo com Pincus (1995), na análise de séries curtas,  $N=100$ , como também dados com presença de ruídos, ambas as características presentes em nossos dados.

Os valores da *ApEn* obtidos para as séries temporais simuladas podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Entropia aproximada das séries temporais integrais (SI) ( $N=200$ ), das séries temporais dos estados abertos (SA) e fechados (SF) ( $N=100$ ).

| Série | 1 ( $\alpha_{DFA}=0.63$ ) | 2 ( $\alpha_{DFA}=0.4$ ) | 4 ( $\alpha_{DFA}=0.51$ ) | 5 ( $\alpha_{DFA}=\alpha=0.52$ ) | 6 ( $\alpha_{DFA}=0.53$ ) |
|-------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| SI    | 0.51                      | 0.56                     | 0.60                      | 0.84                             | 0.68                      |
| SA    | 1.15                      | 0.63                     | 0.92                      | 1.07                             | 0.98                      |
| SF    | 0.79                      | 0.11                     | 0.99                      | 1.13                             | 1.02                      |

Medianas  $\pm$  desvio interquartilico. Para cada valor do  $\alpha_{DFA}$  foram simuladas 10 séries

Nossos resultados mostraram que os valores da *ApEn* das séries temporais integrais são mais elevados nas séries que apresentam  $\alpha_{DFA} \cong 0.5$  quando comparados com os dados que possuem memória. Quando analisado separadamente, a entropia dos tempos permanências aberto e fechado, observamos que em séries que apresentam correlação de longo alcance a *ApEn* do estado fechado é menor do que no estado aberto (registro 1 e 2). No entanto quando a série possui um comportamento aleatório (registros 4, 5 e 6) a entropia de ambos os estados são similares.

### Análise da Entropia Aproximada para as séries simuladas

Para comparação e análise dos valores da *ApEn* das séries experimentais foi realizado um estudo teórico com séries simuladas com comportamentos conhecidos:

presença de memória antipersistente, comportamento aleatório e presença de memória persistente ( $\alpha_{DFA} \cong 0,2, 0,5$  e  $0,8$ , respectivamente). Tal estudo foi realizado para avaliar o efeito na relação observada entre os valores do  $\alpha_{DFA}$  e  $ApEn$  obtidos nos resultados experimentais. Esperávamos que séries temporais com um comportamento aleatório apresentasse elevado valor de  $ApEn$  quando comparados com séries temporais com presença de correlação de longo alcance, visto que processo com presença de uma repetição de um padrão, como séries com memória, tendem a apresentar entropia baixa.

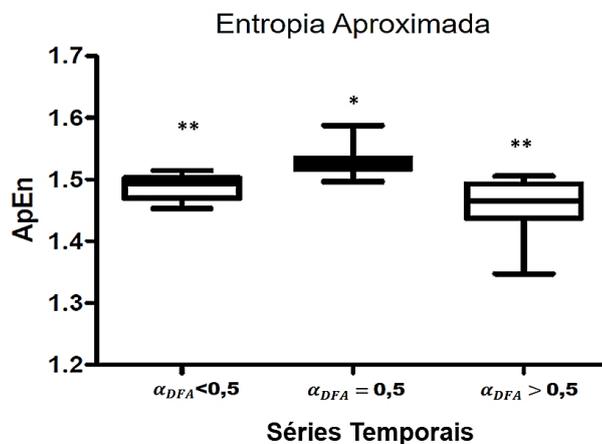
Os resultados das análises para  $ApEn$  das séries simuladas podem ser observados na Tabela 3. Séries temporais que apresentaram um comportamento aleatório nas análises através do método DFA apresentaram maior complexidade do que aquelas que apresentaram memória.

Tabela 3:  $ApEn$  ( $\pm dq$ ) das diferentes populações (N=10) de séries simuladas com diferentes valores de  $\alpha_{DFA}$ .

| Série  | $\alpha_{DFA} < 0,5$ | $\alpha_{DFA} = 0,5$ | $\alpha_{DFA} > 0,5$ |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
| $ApEn$ | $1,494 \pm 0,032$    | $1,526 \pm 0,018$    | $1,466 \pm 0,056$    |

Medianas  $\pm$  desvio interquartilico. Para cada valor do  $\alpha_{DFA}$  foram simuladas 10 séries

Os resultados do teste Kruskal-Wallis e *post-hoc Dunn* (Figura 7) mostraram que não existe diferença estatística entre os valores de  $ApEn$  das séries simuladas com memória persistente e antipersistente ( $p < 0,05$ ), no entanto estas diferem significativamente daquelas com comportamento aleatório.



**Fig. 7** Valores da  $ApEn$  das séries temporais simuladas com diferentes valores de  $\alpha_{DFA}$  geradas através algoritmo fGn e resultados do teste Kruskal-Wallis e *post-hoc Dunn*.

Os resultados para os dados simulados foram semelhantes aos resultados das análises de  $ApEn$  para os dados experimentais, mostrando que a mesma relação entre os resultados do  $\alpha_{DFA}$  e o valor de  $ApEn$  encontrados nos dados experimentais também ocorrem em séries sem a presença de descontinuidades. De modo que podemos concluir que existe uma relação entre os resultados entre os métodos do DFA e  $ApEn$ , onde sistemas que exibem correlação de longo alcance no comportamento dos dados tendem a possuir uma baixa complexidade.

## Conclusão

Os métodos de DFA e  $ApEn$  demonstram que a cinética de transição entres os estados aberto e fechado do canal de gA nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho é um processo que possui de elevada complexidade e ausência de memória, comportamento divergente daqueles encontrados em muitos canais iônicos estruturalmente complexos, como alguns canais de sódio e potássio, que possuem um comportamento determinístico. Dessa forma nossos resultados corroboram com o modelo empregado classicamente. De acordo com esse modelo (O'Connell et al. 1990; Lum et al. 2017) os canais iônicos formados por gA transitam entre dois estados, condutivos e não condutivos (aberto e fechado), através de um processo de dimerização e dissociação entre monômeros originados de lados opostos na bicamada lipídica, de modo que, durante o estado dissociado esses canais se encontram num processo de difusão aleatório nas monocamadas, podendo ser esse o fator que produz uma aleatoriedade no processo geral de abertura e fechamento desses canais.

## Referências

- Andersen OS, Koeppe II RE (1992) Molecular determinants of channel function. *Physiological Reviews* 72:S89-S158.
- Ashcroft FM (2000) *Ion Channels and Disease*. Academic Press, Orlando
- Bryce, RM, Sprague KB (2012) Revisiting detrended fluctuation analysis. *Scientific Reports* 2: 315.
- Brownd, M. et al. (2018) Gramicidin subunits that cross membranes and form Ion Channels. *Biophysical Journal*, 114(3), 454a.
- Busath, D, Szabo G (1981) Gramicidin forms multi-state rectifying channels. *Nature* 294(5839): 371.
- Busath, et al. (1987) On the conductance heterogeneity in membrane channels formed by gramicidin A. A cooperative study. *Biophysical Journal* 51(1): 79-88.

- Chaudhuri, A, Chattopadhyay A (2016) Molecular anatomy of an ion channel explored utilizing fluorescence spectroscopy. *Reviews in Fluorescence* 2015: 353-367.
- Chen Z et al. (2002) Effect of nonstationarities on detrended fluctuation analysis. *Physical Review E* 65(4):041107.
- Delignières D (2015) Correlation properties of (discrete) fractional Gaussian noise and fractional Brownian motion. *Mathematical Problems in Engineering*, 2015.
- Goldberger AL et al. (2000) Physiobank, physiotoolkit, and physionet. *Circulation* 101(23):215-e220.
- Harms GS et al. (2003) Probing conformational changes of gramicidin ion channels by single-molecule patch-clamp fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* 85(3):1826-1838.
- Hladky, SB and Haydon DA (1972) Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A: I. Studies of the unit conductance channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 274(2): 294-312.
- Hudetz, AG et al. (2016) Propofol anesthesia reduces Lempel-Ziv complexity of spontaneous brain activity in rats. *Neuroscience Letters*, 628, 132-135.
- Lan TH et al. (2008) Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. *Cell Biology International* 32(2): 247-252.
- Liou JW et al. (2015) The antimicrobial activity of gramicidin A is associated with hydroxyl radical formation. *PLoS One* 10(1), e0117065.
- Lum K et al. (2017) Exchange of Gramicidin between Lipid Bilayers: Implications for the Mechanism of Channel Formation. *Biophysical Journal* 113(8):1757-1767.
- Montal M, Mueller P (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69:3561-3566.
- Nogueira RA et al. (1995) Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas* 28:491-496.
- O'Connell AM et al. (1990) Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: transmembrane monomer association. *Science* 250:256-259.
- Oiki S et al. (1995) Voltage-dependent gating of an asymmetric gramicidin channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:2121-2125.
- Oliveira RC et al. (2006) Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 364,13-22.
- Peng, C-K et al. (1994) Mosaic organization of DNA nucleotides. *Physical Review* 49:1685.
- Pincus SM (1991) Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 2297-2301.
- Pincus SM, Goldberger AL (1994) Physiological time-series analysis: what does regularity quantify?. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 266:H1643-H1656.

- Pincus SM (1995) Approximate entropy (ApEn) as a complexity measure. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 5:110-117.
- Sarges R, Witkop B (1965) Gramicidin AV The structure of valine-and isoleucine-gramicidin A. *Journal of the American Chemical Society* 87:2011-2020.
- Sawyer DB et al. (1989) Induction of conductance heterogeneity in gramicidin channels. *Biochemistry* 28(16):6571-6583.
- Sawyer DB et al. (1990) Gramicidin single-channel properties show no solvent-history dependence. *Biophysical Journal* 57(3): 515-523.
- Siwy Z et al (2001) Application of dwell-time series in studies of long-range correlation in single channel ion transport: analysis of ion current through a big conductance locust potassium channel. *Physica A* 297:79–96.
- Strässle M et al. (1989) Radiolysis and photolysis of ion channels formed by analogues of gramicidin A with a varying number of tryptophan residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 980:305-314.
- Urry DW (1971) The Gramicidin A Transmembrane channel: a proposed  $\pi_{(L,D)}$  helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68: 672-676.
- Varanda WA et al. (2000) Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. *Journal of Theoretical Biology* 206: 343-353.
- Wallace BA (2000) Common structural features in gramicidin and other ion channels. *Bioessays*, 22(3): 227-234.
- Wawrzkievicz A et al. (2012) On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. *European Biophysics Journal* 41:505-526.
- Williams LP et al. (1992) Molecular and channel-forming characteristics of gramicidin K's: a family of naturally occurring acylated gramicidins. *Biochemistry* 31(32):7311-7319.
- Wu Y et al. (2016) Quantification of knee vibroarthrographic signal irregularity associated with patellofemoral joint cartilage pathology based on entropy and envelope amplitude measures. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 130:1-12.
- Wu Y et al. (2017) Measuring signal fluctuations in gait rhythm time series of patients with Parkinson's disease using entropy parameters. *Biomedical Signal Processing and Control* 31:265-271.

## 7. Considerações Finais

As análises das séries temporais obtidas através dos registros de correntes iônicas através dos canais de gA em bicamadas lipídicas planas de DPhPC através do método DFA e ApEn demonstraram a presença de comportamentos distintos nas séries. No entanto o comportamento aleatório apareceu na maioria das séries, resultados que contradizem aqueles encontrados para canais iônicos estruturalmente complexos, formados por subunidades proteicas como os canais de potássio e os canais BK (NOGUEIRA *et al.*, 1995; VARANDA *et al.*, 2000; SIWY, Z. *et a.*, 2001; OLIVEIRA, R.A. *et al.*, 2006; WAWRZKIEWICZ, A. *et al.*, 2012).

As condições experimentais utilizadas para obtenção das séries temporais podem não ter favorecido a obtenção de séries longas, com um N superior a 1000, valor que pode influenciar os resultados obtidos pelos matemáticos utilizados. A utilização de diferentes composições lipídicas, modificação no solvente utilizado para diluição da gramicidina, mudanças no tempo de uso da solução eletrolítica e modificações na concentração de gA podem ser necessários para os experimentos posteriores de modo a propiciar a obtenção de séries temporais longas e com presença de apenas canais unitários. Outras técnicas disponíveis para esse tipo de análise podem também ser necessário para obtenção dos resultados ideais para análise de memória como a técnica bicamada em ponta de pipeta (*patch-clamp pipette*) que consiste em uma técnica que combina a técnica de bicamada lipídica plana com a técnica de *patch-clamp* tradicional e pode ser uma alternativa para nossas análises futuras.